

161

88

TD 488

Stella Caffaro

**INCREMENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO  
INTRACELULAR INDUCIDA POR DOPAMINA EN CELULAS  
PINEALES DE RATA**

**Carlos Elkin Rey Gaitán**

**Tesis presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias  
Biológicas por la Universidad de Sevilla**

**Sevilla, 1999**



UNIVERSIDAD DE SEVILLA. FACULTAD DE MEDICINA  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA MÉDICA Y  
BIOFÍSICA**

Avda. Sánchez Pizjúan, 4. 41009 Sevilla. ESPAÑA  
Tfn.: 95 4 55 17 68 y 95 4 55 17 70. FAX 95 4 55 17 69.

---

Doña Lucía Tabares Domínguez, Profesora Titular de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla

CERTIFICA:

Que Don Carlos Elkin Rey Gaitán, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado "Incremento de la concentración de calcio intracelular inducida por dopamina en células pineales de rata", que presenta para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad de Sevilla.



DPTO. DE FISIOLÓGIA MÉDICA  
Y BIOFÍSICA  
FACULTAD DE MEDICINA

Fdo.: Lucía Tabares Domínguez

Sevilla, a 4 de Mayo de 1999



R.18.308

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar agradezco a la Dra. Lucía Tabares su gran ayuda y valiosa orientación durante el tiempo que ha durado este trabajo. Al Prof. José López Barneo por brindarme la oportunidad de iniciar este estudio y por su colaboración en los aspectos moleculares de esta memoria desarrollados en su laboratorio. A la Dra. M<sup>a</sup> D. Chiara y al Dr. Antonio Castellano por su valiosa experiencia y guía en la realización de los experimentos de biología molecular. A D. Francisco Monje, Dña. Beatriz Campo, D. Tarik Smani, D. Eladio Gil, D. Cesar Bernabé, Dr. Juan M. Poyato y D. Ricardo Pardal por su amabilidad y en general a todos mis compañeros del Departamento por su apoyo y amistad. Igualmente, a quienes realizan las labores administrativas. Especialmente mi agradecimiento a Fabián y Nieves quienes han estado presentes en todo momento.

Así mismo, extender mi agradecimiento al Dr. Rafael Alonso Solís, Dr. Pedro Abreu y D. Francisco Hernández por su colaboración en las medidas de inositol fosfato y AMPc realizados en su laboratorio en el Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina de la Universidad de La Laguna, Tenerife.

Quiero expresar de forma especial mi gratitud al Dr. Rodolfo Llinás y al Dr. Herman Moreno por su invaluable contribución a mi formación científica y personal.

*A mis padres*

La realización de esta memoria ha sido posible gracias al soporte financiero, técnico y humano de:

#### COLCIENCIAS

Organización de Estados Iberoamericanos O.E.I.

The British Council-Colombia y Madrid.

Departamento de Fisiología Médica y Biofísica de la  
Universidad de Sevilla.

## CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1. FISIOLÓGÍA DE CATECOLAMINAS EN LA GLÁNDULA PINEAL</b> .....	1
1.1. DA y secreción de melatonina.....	2
1.2. Receptores dopaminérgicos.....	4
1.3. Inervación dopaminérgica.....	5
<b>2. ASPECTOS GENERALES DE LOS RECEPTORES PARA CATECOLAMINAS</b> .....	6
2.1. Receptores Adrenérgicos.....	12
2.2. Receptores Dopaminérgicos.....	17
<b>3. HOMOLOGÍA ESTRUCTURAL ENTRE LOS RECEPTORES CATECOLAMINÉRGICOS</b> .....	24
3.1. Segmentos transmembrana.....	24
3.2. Interacción ligando-receptor.....	27
3.3. Lazos intracelulares.....	31
3.3.1. Interacción con proteínas G.....	31
3.3.2. Sitios de fosforilación.....	32
3.4. Extremo amino terminal.....	33
3.5. Extremo carboxilo terminal.....	35
<b>4. FISIOPATOLOGÍA</b> .....	37
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS</b> .....	39
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	41
<b>1. CULTIVO CELULAR</b> .....	41
1.1. Localización y características generales de la glándula pineal de rata.....	41
1.2. Extracción de la glándula.....	43
1.3. Dispersión celular.....	44
1.4. Siembra y mantenimiento del cultivo celular.....	45
<b>2. MICROFLUOROMETRÍA</b> .....	47
2.1. Indicador de calcio.....	47
2.2. Equipo de microfluorimetría.....	49
2.3. Calibración del sistema.....	54
2.4. Cámara de registro y sistema de perfusión.....	55

2.5. Proceder experimental.....	57
2.6. Soluciones de registro.....	57
2.7. Adquisición y análisis.....	58
<b>3. DETERMINACIÓN DE ADENOSINA MONOFOSFATO CÍCLICO (AMPc).....</b>	<b>61</b>
3.1. Medida de AMPc por enzima inmunoensayo (EIE).....	63
3.2. Proceder experimental.....	63
3.3. Disposición de grupos experimentales.....	64
3.4. Adquisición y análisis.....	65
<b>4. DETERMINACIÓN DE INOSITOLES FOSFATOS (IPs).....</b>	<b>68</b>
4.1. Proceder experimental.....	68
4.2. Estimulación dopaminérgica.....	69
4.3. Extracción y purificación de los [ <sup>3</sup> H]-IPs.....	70
<b>5. CLONADO DEL ADNc.....</b>	<b>71</b>
5.1. Extracción del ARN.....	71
5.2. Elección de los oligonucleótidos.....	72
5.3. Amplificación por PCR.....	73
5.4. Subclonado y transformación.....	74
5.5. Secuenciación.....	78
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>80</b>
<b>1. EFECTO DE CATECOLAMINAS SOBRE EL CALCIO CITOSÓLICO.....</b>	<b>80</b>
1.1. La DA induce un incremento de la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> con un curso temporal bimodal.....	80
1.2. Liberación de Ca <sup>2+</sup> de almacenes intracelulares y entrada de Ca <sup>2+</sup> desde el medio externo.....	81
1.3. Curva dosis-respuesta [DA]-[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> .....	81
1.4. Incrementos en la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> inducidos por DA y fenilefrina.....	84
1.5. Los agonistas dopaminérgicos no aumentan la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> .....	87
1.6. Los antagonistas dopaminérgicos inhiben el incremento de la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> inducido por DA.....	89
1.7. Los antagonistas adrenérgicos inhiben el incremento de la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> inducido por DA.....	96
1.8. Incremento de la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> y transportadores de catecolaminas.....	103
<b>2. ACUMULACIÓN DE INOSITOLES FOSFATO (IPs) MEDIADA POR DA.....</b>	<b>111</b>

3. INCREMENTO DE LOS NIVELES DE AMPc MEDIADADO POR DA .....	114
4. AMPLIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DEL ADNc.....	122
4.1. Comparación de secuencias y diseño de cebadores.....	122
4.2. Transformación.....	123
4.3. Secuenciación.....	125
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>128</b>
1. SEÑAL DE Ca <sup>2+</sup> INDUCIDA POR DA.....	128
Significado funcional de la DA en la glándula pineal.....	129
2. EL INCREMENTO DE Ca <sup>2+</sup> MEDIADO POR DA SE PRODUCE A TRAVÉS DE LA VÍA DE LOS IPs.....	130
3. CÉLULAS INSENSIBLES A DA.....	132
4. INCREMENTO DE LOS NIVELES DE AMPc POR DA.....	133
5. FARMACOLOGÍA DE LOS RECEPTORES ACTIVADOS POR DA.....	135
6. IMPLICACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE CATECOLAMINAS SOBRE EL INCREMENTO DE Ca <sup>2+</sup> .....	141
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>143</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>146</b>
<b>APÉNDICE.....</b>	<b>160</b>



## INTRODUCCIÓN

### 1. FISIOLÓGÍA DE CATECOLAMINAS EN LA GLÁNDULA PINEAL

La glándula pineal de los mamíferos es un órgano de secreción interna, en el que una señal neural procedente del sistema nervioso simpático regula la producción y liberación rítmica de melatonina. En los mamíferos la glándula pineal no es directamente sensible a la luz, por lo tanto el ritmo de la secreción de melatonina es dependiente fundamentalmente de la actividad de los núcleos supraquiasmáticos los cuales son sincronizados por el fotoperíodo vía la retina (Collin *et al.*, 1986). Las conexiones neurales entre la retina y la pineal son similares en todos los mamíferos, incluido el hombre. La información procedente de la retina hace escala en los núcleos supraquiasmáticos y paraventriculares del hipotálamo y en la columna intermedio lateral de la médula espinal torácica, antes de alcanzar las neuronas postganglionares del ganglio cervical superior, de donde parten fibras simpáticas noradrenérgicas que inervan el órgano pineal (**Figura 1**) (Collin *et al.*, 1988). La noradrenalina liberada durante la noche actúa sobre receptores adrenérgicos  $\alpha$  y  $\beta$  en células pineales aumentando los niveles intracelulares de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

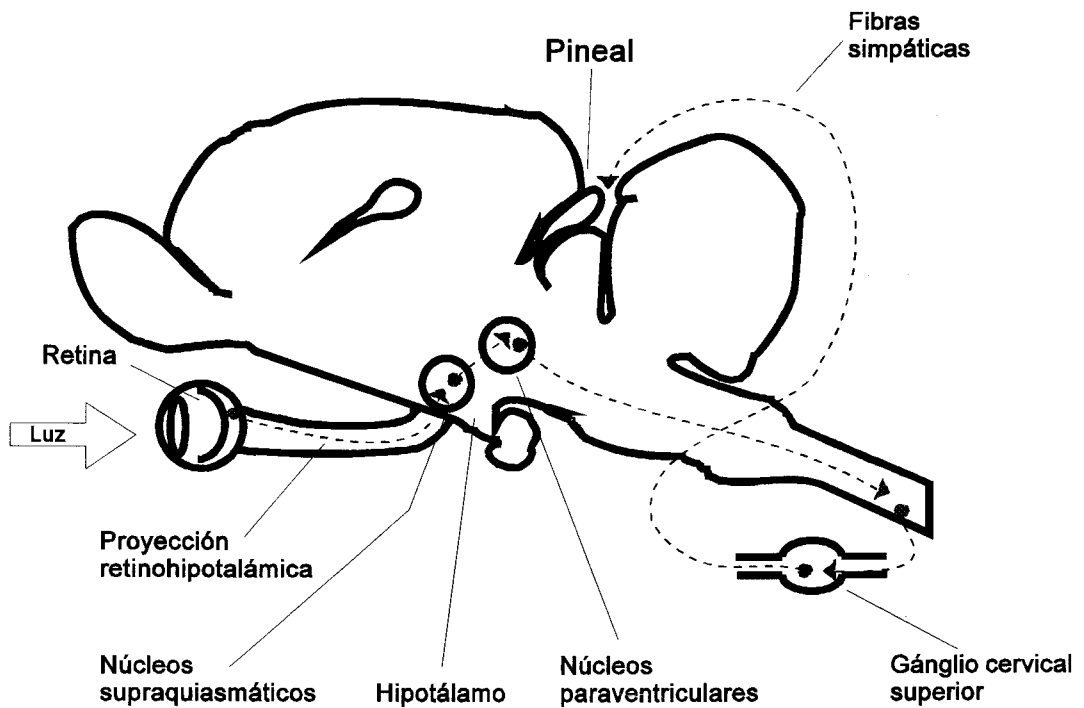
(AMPC), guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc) y  $Ca^{2+}$ , dando lugar al aumento de la actividad de serotonina N-acetiltransferasa (NAT), enzima limitante en la síntesis de melatonina (Klein *et al.*, 1973; Vanacek *et al.*, 1985).

La existencia de otros receptores de membrana en las células pineales además de los adrenérgicos, junto con inervación procedente de otras zonas del cerebro hacen pensar, sin embargo, que la vía retino-supraquiasmática no es la única que regula la secreción en esta glándula. Datos experimentales relativamente recientes demuestran la existencia de receptores dopaminérgicos en la glándula pineal y sugieren un posible papel fisiológico de la dopamina (DA) en la secreción de melatonina. A continuación, se resumen los datos experimentales más relevantes al respecto.

### **1.1. DA y secreción de melatonina**

La primera indicación de una función dopaminérgica en la pineal fue la comprobación que la DA estimula la producción de melatonina en glándulas pineales de rata en cultivo (Axelrod *et al.*, 1969). Posteriormente, se mostró que la DA aumenta la actividad de la NAT en pineales de rata (Deguchi y Axelrod, 1972).

Los niveles de DA en la glándula pineal de rata (Fujiwara *et al.*, 1980; Saavedra *et al.*, 1982) siguen un patrón circadiano similar al de la noradrenalina (NA) alcanzándose las mayores concentraciones durante la noche.



**Figura 1.** La glándula pineal en la rata esta localizada superficialmente bajo el cráneo. La señal luminosa procesada en la retina es transmitida a los núcleos hipotalámicos supraquiasmático y paraventricular, desde donde se proyectan a la médula espinal torácica para establecer conexiones con las neuronas del gánglio cervical superior, de donde salen fibras simpáticas que finalizan directamente sobre las células pineales.

La actividad tirosina hidroxilasa y dopamina  $\beta$ -hidroxilasa son también más altas durante la noche que durante el día (Racké *et al.*, 1989). Mientras que en la rata el pico de concentración de DA es considerablemente menor que el de noradrenalina durante este período (10 y 40 ng/mg de proteína, respectivamente) (Saavedra, 1982), en la glándula pineal bovina, por el contrario, la concentración de DA es igual o más alta que la de noradrenalina (Govitrapong *et al.*, 1989). En ratas recién nacidas, de 0-4 días de edad, no se encuentra DA en la glándula pineal, aunque durante el desarrollo aumenta progresivamente su concentración hasta el nivel de adulto a los 30 días de edad (Hyypä, 1971).

## 1.2. Receptores dopaminérgicos

Estudios farmacológicos de unión de radioligandos mostraron la presencia de dos sitios de unión para el espiroperidol (o espiperone, antagonista D<sub>2</sub>) en glándulas pineales bovinas, sugiriendo la presencia de dos receptores dopaminérgicos del tipo D<sub>2</sub> (Govitrapong *et al.*, 1984). Estudios posteriores, también han mostrado la presencia de receptores dopaminérgicos de la familia D<sub>1</sub> en pineal bovina (Simonneaux *et al.*, 1990). La función de estos receptores parece estar relacionada, al igual que en la retina (Iuvone, 1986; Zawilska y Iuvone, 1989), con la regulación de la actividad de la enzima NAT y del contenido de melatonina en la pineal.

Los efectos directos de la DA sobre la actividad de la NAT (Govitrapong *et al.*, 1989) y sobre la producción de melatonina

(Axelrod *et al.*, 1969) han sido estudiados en glándula pineal de rata en cultivo. Govitrapong *et al.* (1989) encontró que bajas concentraciones de DA (0.1  $\mu\text{M}$ ) inhiben la actividad NAT, mientras que altas concentraciones la incrementan (10-100  $\mu\text{M}$ ). Axelrod *et al.* (1969) reportó que 300  $\mu\text{M}$  DA incrementa los niveles de melatonina. Dado que la NAT es directamente activada por AMPc (Klein y Weller, 1973) y la AC puede ser regulada a través de la activación de receptores dopaminérgicos del tipo D<sub>1</sub>, por una proteína G estimuladora (Gs), y el tipo D<sub>2</sub> por una inhibitoria (Gi), puede ocurrir que la actividad NAT y consecuentemente la síntesis de melatonina (Zatz, 1981) sean moduladas por la AC unida a receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>.

La densidad de receptores dopaminérgicos de tipo D<sub>1</sub> en la glándula pineal bovina es entre 20-30 veces mayor que la densidad de receptores D<sub>2</sub> (Govitrapong *et al.*, 1984; Simonneaux *et al.*, 1991), 5-6 veces mayor que los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos y cerca de 20 veces mayor que los receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos (Simonneaux *et al.*, 1991). Estos datos sugieren una importante función de la DA en la regulación de la fisiología pineal bovina.

En cuanto a la presencia de receptores dopaminérgicos en glándula pineal de rata, no se ha demostrado su existencia.

### **1.3. Inervación dopaminérgica**

Se han encontrado fibras dopaminérgicas en glándulas pineales de distintas especies pero su origen aún no está totalmente aclarado.

En pineal de hamster dorado se han demostrado la existencia de células neuronales tirosina hidroxilasa positivas pero dopamina  $\beta$ -hidroxilasa negativas, sugiriendo que fibras dopaminérgicas inervan esta glándula (Jin *et al.*, 1988). En la rata y el gerbil se encuentran células neuronales tirosina hidroxilasa positivas y dopamina  $\beta$ -hidroxilasa positivas. Los estudios de Racké *et al.* (1989) en glándula pineal de rata demostraron que la tirosina es convertida en DA en esta glándula pero sólo una parte de las células que sintetizan y acumulan DA fueron capaces de convertirla en noradrenalina. Esto sugiere que gran parte de la DA presente en la glándula pineal se origina en neuronas dopaminérgicas.

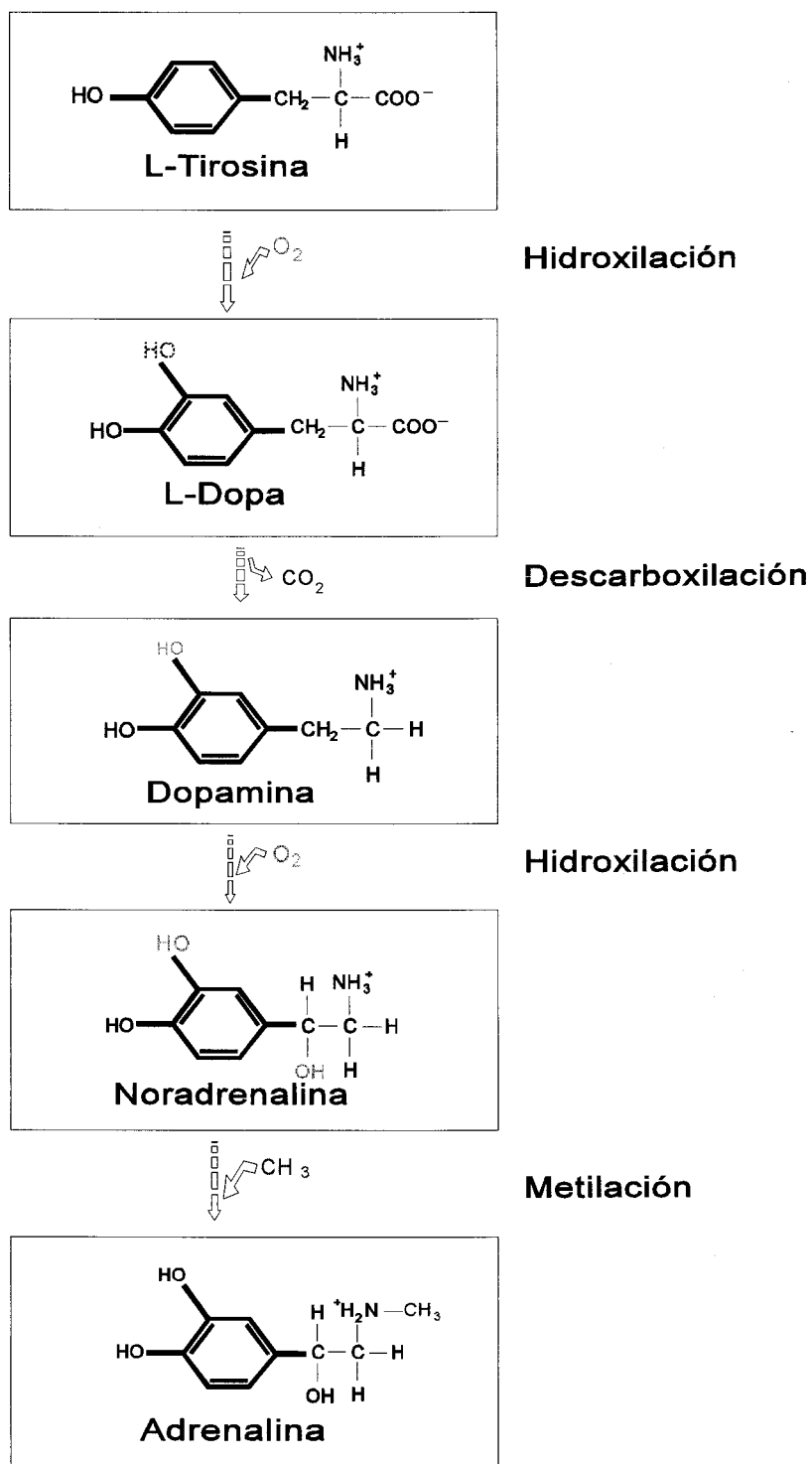
A continuación se hace una revisión del estado actual de los receptores catecolaminérgicos y de la similitud funcional y estructural que entre ellos existe.

## **2. ASPECTOS GENERALES DE LOS RECEPTORES PARA CATECOLAMINAS**

Las aminas biógenas constituyen un grupo de neurotransmisores dentro del cuál se encuentra la histamina, la serotonina y las catecolaminas. Al grupo de las catecolaminas pertenece la dopamina, la noradrenalina y la adrenalina. Las catecolaminas se forman por hidroxilación y descarboxilación del aminoácido tirosina (**Figura 2**). El primer paso en la vía de la biosíntesis de las catecolaminas es la hidroxilación de la tirosina, proceso catalizado por la tirosina hidroxilasa, tras lo cual se produce L-DOPA, presente en todas las

neuronas catecolaminérgicas. Esta se convierte en dopamina tras un paso de descarboxilación, catalizado por la descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos. La DA en neuronas noradrenérgicas actúa simplemente como un precursor de la noradrenalina, hidroxilándose en la cadena lateral por medio de la enzima dopamina  $\beta$ -hidroxilasa, dando lugar a la noradrenalina. Las neuronas adrenérgicas contienen, además, otra enzima, la feniletanolamina-N-metiltransferasa, que cataliza la donación de un grupo metilo (a partir de la S-adenosilmetionina) a la noradrenalina, formándose adrenalina.

Los receptores catecolaminérgicos son proteínas integrales de membrana, cuya secuencia aminoacídica contiene siete regiones hidrofóbicas de aproximadamente 20 a 25 residuos cada una. El sitio de unión para las catecolaminas se halla en la parte externa del receptor. La unión del ligando al receptor produce un cambio conformacional que permite la interacción con una segunda proteína en la vía de transducción de la señal, una proteína que une GTP. Los receptores catecolaminérgicos, por tanto, pertenecen a la denominada superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. Poseen una estructura común de siete segmentos transmembrana (STM), regiones hidrofóbicas, un extremo amino (N) terminal en el lado extracelular y un extremo carboxilo (C) terminal, en el lado citoplasmático (**Figura 3**). El tercer lazo intracelular (III LI) es más largo que los demás y constituye el nexo de unión con las proteínas G, cuyo acoplamiento es necesario para la activación de los mecanismos efectores.

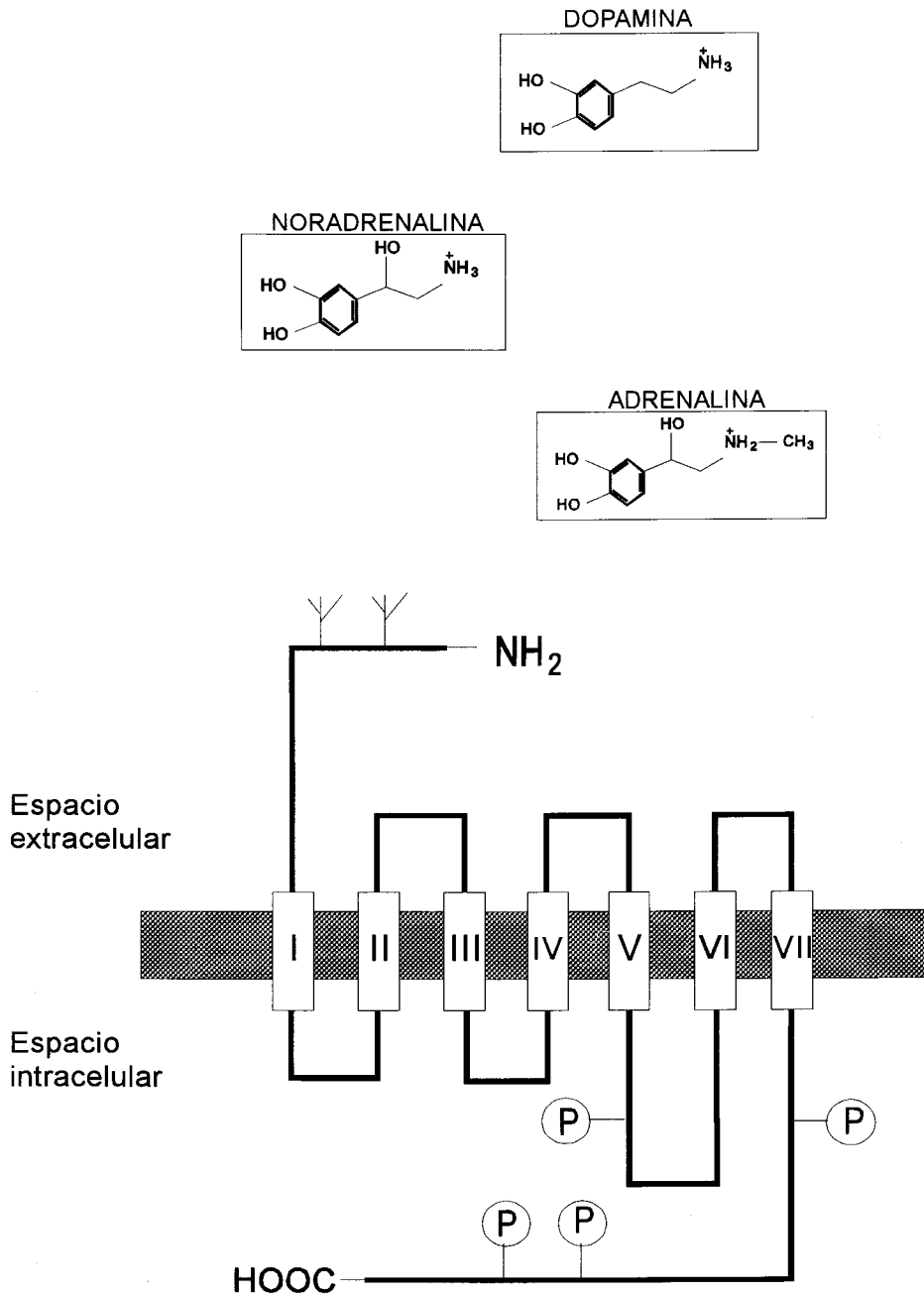


**Figura 2.** Biosíntesis de los neurotransmisores de naturaleza catecolamínica (Modificado de Lefkowitz., 1996).

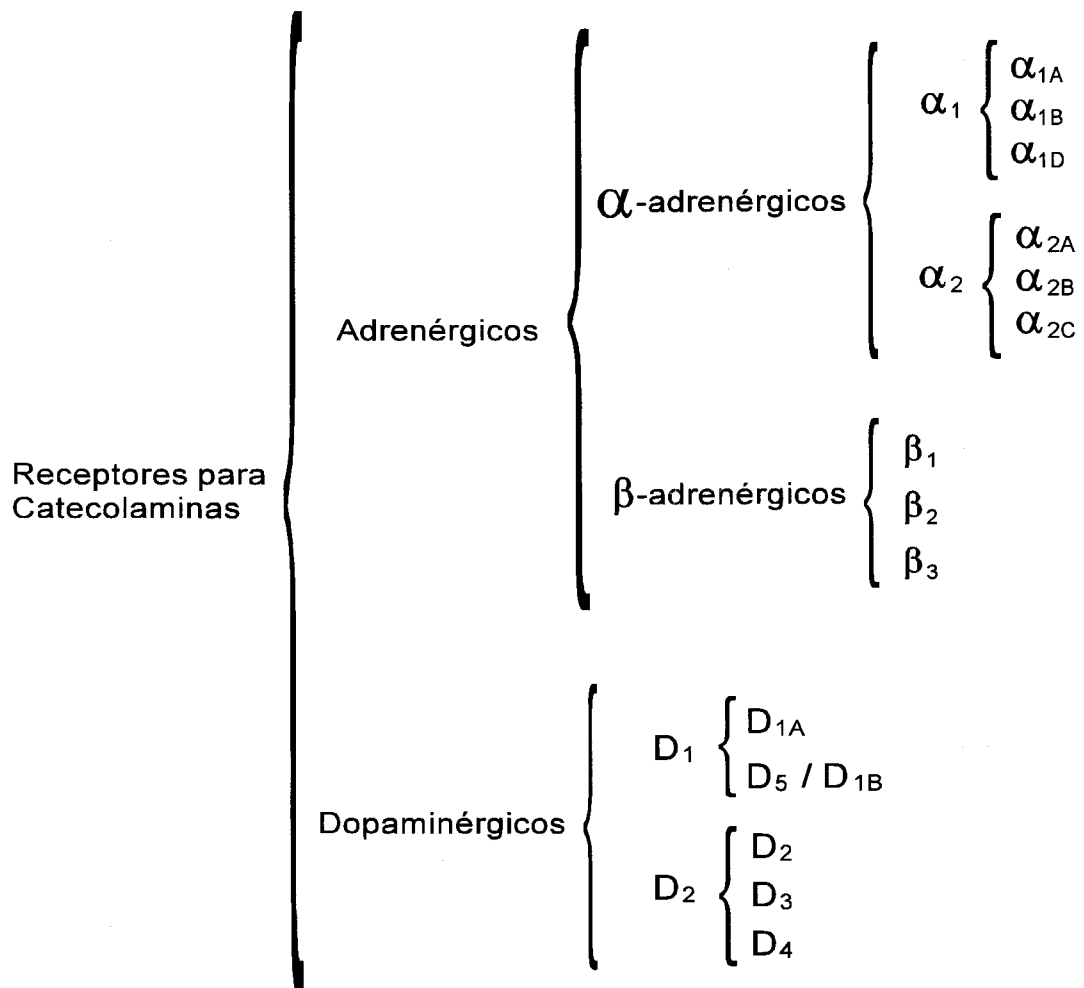


Estos receptores, según el tipo de proteína G (Gs, Gi, Go, Gq) a la que se encuentran acoplados producen respuestas relativamente rápidas, por ejemplo, la activación de canales de K<sup>+</sup>, o lentas, como la activación o inhibición de diversas vías de segundos mensajeros, principalmente las mediadas por AMPc, GMPc, iones Ca<sup>2+</sup> y por los productos de la hidrólisis del fosfato de fosfatidilinositol (PI) en inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>), y diacilglicerol (DAG).

Con base en criterios fundamentalmente farmacológicos, clásicamente los receptores para catecolaminas dopaminérgicos y adrenérgicos se han clasificado en varios tipos. Los receptores dopaminérgicos se han subdividido en la familia D<sub>1</sub> y la familia D<sub>2</sub>, y los receptores adrenérgicos en las familias  $\alpha$  y  $\beta$ . Sin embargo, en los últimos años, el descubrimiento de nuevos fármacos y el gran desarrollo de las técnicas de biología molecular han permitido establecer la existencia de nuevos subtipos de receptores catecolaminérgicos. La clasificación actual de los receptores catecolaminérgicos se presenta en la **Figura 4**.



**Figura 3.** Estructura propuesta para los receptores acoplados a proteínas G. Siete hélices  $\alpha$  atraviesan la membrana (I-VII). Las localizaciones para la glicosilación (Y) se encuentran en el extremo amino extracelular, mientras que aquellas en las que puede ocurrir la fosforilación (P) se localizan en el extremo carboxilo y/o en el tercer lazo intracelular. En la parte superior se muestra la estructura química de los neurotransmisores catecolaminérgicos.

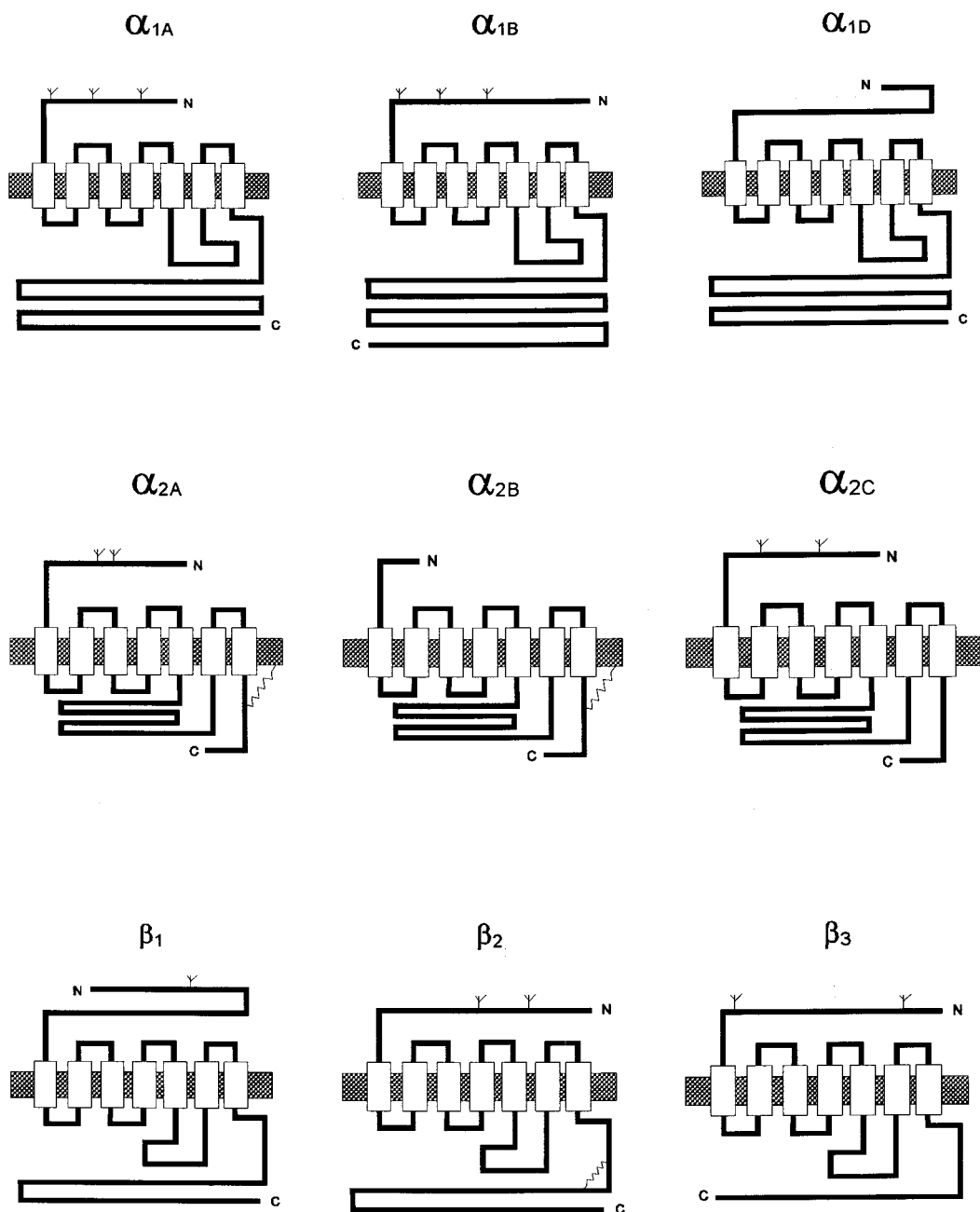


**Figura 4.** Clasificación de los receptores dopaminérgicos y adrenérgicos.

## 2.1. Receptores Adrenérgicos

La liberación de adrenalina y noradrenalina se produce de dos formas, como consecuencia de la actividad nerviosa simpática o por la estimulación de la médula suprarrenal. La noradrenalina es el neurotransmisor simpático postganglionar predominante, y los diversos efectos de estas catecolaminas se explican por la interacción con diferentes tipos de receptores. Las principales respuestas mediadas por los receptores  $\beta$ -adrenérgicos son el aumento de la contractibilidad cardíaca y la broncodilatación. La respuesta principal mediada por los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos es la contracción de la musculatura lisa vascular.

Los receptores adrenérgicos son los receptores catecolaminérgicos mejor estudiados; estos receptores están formados por una cadena polipeptídica de entre 413 y 477 aminoácidos y conforman una familia con una estrecha relación estructural y funcional. En la actualidad se han clonado diez genes que codifican receptores adrenérgicos, de ellos siete codifican receptores  $\alpha$ -adrenérgicos ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1C}$ ,  $\alpha_{1D}$ ,  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$ ), y tres receptores  $\beta$ -adrenérgicos ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ) (Ford *et al.*, 1994; Bylund, 1992). Desde el punto de vista estructural, las familias de receptores  $\alpha_1$  y  $\beta$ -adrenérgicos se caracterizan por poseer un extremo carboxilo terminal largo y un tercer lazo citoplasmático corto (**Figura 5**). En contraposición, los receptores adrenérgicos de la familia  $\alpha_2$  presentan un tercer lazo citoplasmático largo y un extremo carboxilo terminal corto (Hoffman y Lefkowitz, 1996).



**Figura 5.** Estructura molecular general de los receptores adrenérgicos (Modificado de Hoffman y Lefkowitz., 1996).

Los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos inicialmente se clasificaron atendiendo a su localización celular y a su función. Los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos se ubicaron en terminaciones postsinápticas, mediando los efectos excitadores de las catecolaminas sobre tejidos como la musculatura lisa vascular o sobre el corazón. Los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos se describieron como autoreceptores presinápticos de tipo inhibitor (Langer y Lehmann, 1988). Actualmente esta clasificación se ha completado con datos farmacológicos. Los receptores  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ -adrenérgicos son más sensibles a la adrenalina que a la noradrenalina y son bloqueados por el prazosín y la yohimbina, respectivamente (Lefkowitz *et al.*, 1996). A pesar de todo, la estructura general es notablemente similar, encontrándose el máximo grado de homología en las siete hélices  $\alpha$  transmembrana.

Tras la clonación y secuenciación de los receptores adrenérgicos y otros miembros de la familia de receptores acoplados a proteínas G (por ejemplo, los subtipos de receptores colinérgicos muscarínicos) se ha encontrado que en su extremo amino terminal poseen sitios para la glicosilación, sus siete STM normalmente están constituidos de 22 a 25 aminoácidos, en su extremo carboxilo terminal y en el tercer lazo intracelular se han encontrado una serie de serinas (S) y de treoninas (T) que constituyen sitios probables de fosforilación protéica mediada por proteínquinasas.

Entre los subtipos de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos existen diferencias en el tipo de segundo mensajero al que se hallan unidos. Los receptores de la familia  $\alpha_1$ -adrenérgicos están acoplados a la

cascada del fosfoinosítido a través de una proteína del tipo Gq. La activación de esta proteína G estimula distintos tipos de fosfolipasas, fosfolipasa C (PLC), fosfolipasa D (PLD) y fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (Tabla I). Por el contrario, la familia de los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos inhiben la adenilato ciclasa (AC), activan los canales de K<sup>+</sup> e inhiben los canales de Ca<sup>2+</sup> sensibles a voltaje (Leftkowitz *et al.*, 1996).

Los receptores  $\beta$ -adrenérgicos se pueden distinguir farmacológicamente entre sí por su diferente sensibilidad hacia las catecolaminas endógenas adrenalina y noradrenalina. Así, mientras los receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos son sensibles tanto a la adrenalina como a la noradrenalina, los receptores del tipo  $\beta_2$  son relativamente insensibles a la noradrenalina. Los receptores  $\beta_3$  son diez veces más sensibles a la noradrenalina que a la adrenalina y son relativamente resistentes al bloqueo por antagonistas como propranolol, lo que le permite mediar respuestas en sitios con características farmacológicas atípicas como por ejemplo en tejido adiposo. Sin embargo, la función del receptor  $\beta_3$  en la regulación de la lipólisis en humanos no está bien determinada (Rosenbaum *et al.*, 1993; Krief *et al.*, 1993; Lönnqvist *et al.*, 1993).

**Tabla I.** Características funcionales de los subtipos de receptores adrenérgicos.

Receptor	Proteína G	Efactor
<b><math>\alpha_1</math>-adrenérgicos</b>	Gq	↑ PLC
<b>(<math>\alpha_{1A}</math>, <math>\alpha_{1B}</math>, <math>\alpha_{1D}</math>)</b>	Gq	↑ PLD
	Gq, Gi/Go	↑ PLA <sub>2</sub>
	Gq	↑ Canales de Ca <sup>2+</sup> ?
<b><math>\alpha_2</math>-adrenérgicos</b>	Gi <sub>1/2</sub> ó G <sub>3</sub>	↓ AC
<b>(<math>\alpha_{2A}</math>, <math>\alpha_{2B}</math>, <math>\alpha_{2C}</math>)</b>	Gi (subunidades $\beta\gamma$ )	↑ Canales de K <sup>+</sup>
	Go	↓ Canales de Ca <sup>2+</sup> (tipos L y N)
	Gi/o ?	↑ PLC, PLA <sub>2</sub>
<b><math>\beta</math>-adrenérgicos</b>		
<b><math>\beta_1</math></b>	Gs	↑ AC ↑ Canales de Ca <sup>2+</sup> tipo L
<b><math>\beta_2</math></b>	Gs	↑ AC
<b><math>\beta_3</math></b>	Gs	↑ AC

(Modificado de Lefkowitz et al., 1996).

Todos los receptores  $\beta$ -adrenérgicos interactúan con la AC vía proteína Gs (Taussig y Gilman, 1995). La estimulación del receptor lleva al incremento del AMPc, a la activación de la proteína quinasa dependiente de AMPc y a la modificación de numerosas proteínas celulares como resultado de su fosforilación. Además, estos receptores están acoplados a canales de Ca<sup>2+</sup> (Molinoff, 1995).

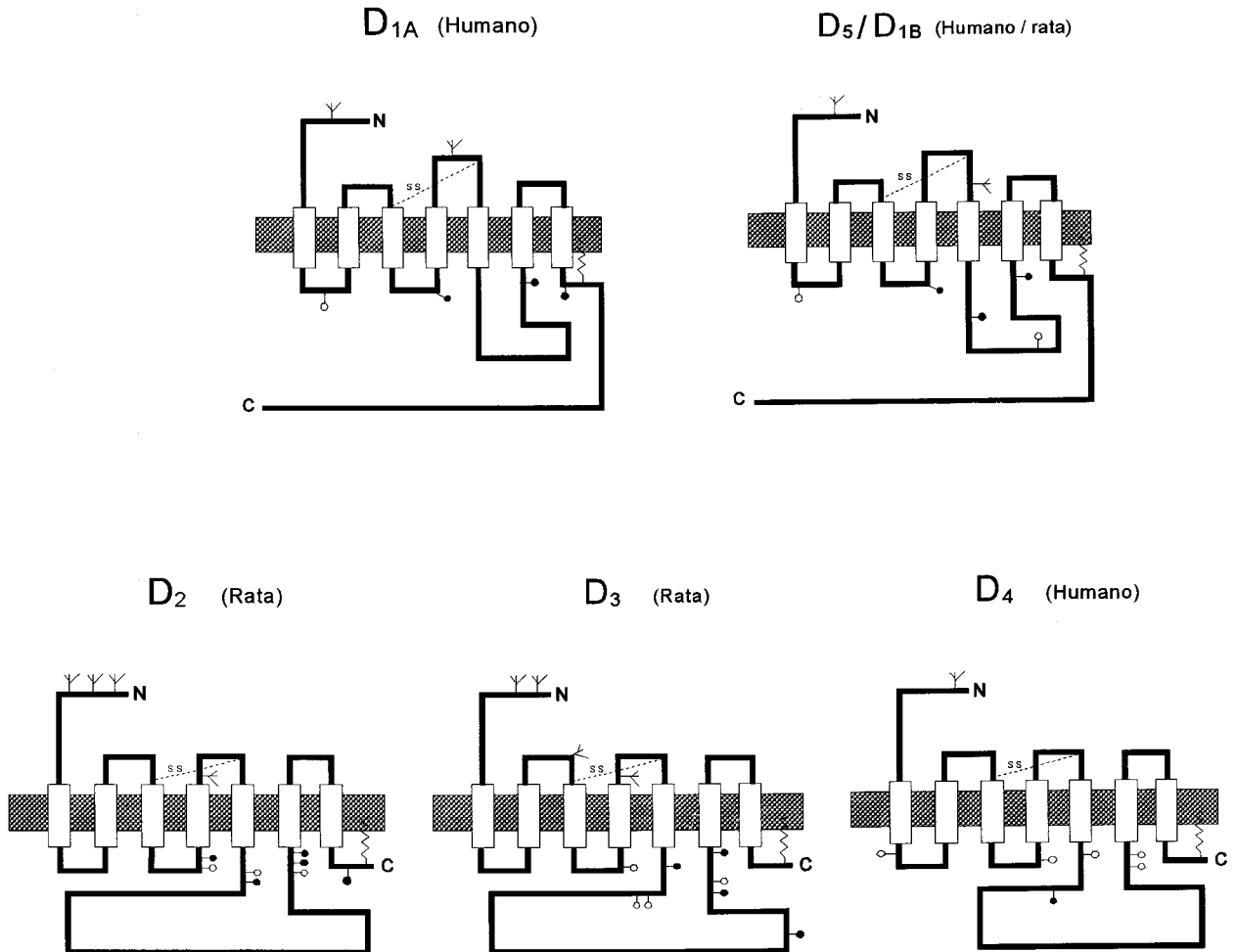


## 2.2. Receptores Dopaminérgicos

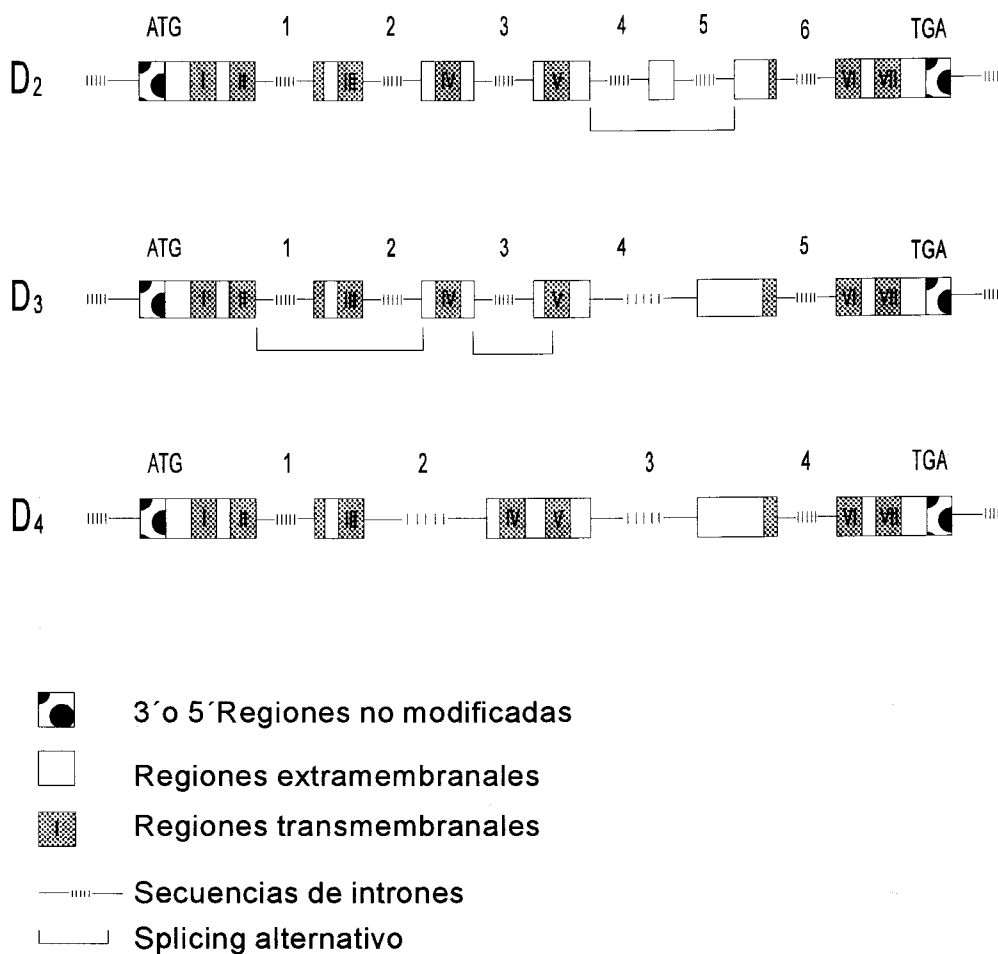
Los receptores dopaminérgicos son proteínas transmembranarias con un número de aminoácidos entre 387 y 447. Se encuentran distribuidos mayoritariamente en el sistema nervioso central, especialmente en el cerebro medio, y periféricamente, en riñón y corazón. En la actualidad se han clonado cinco genes que codifican distintos subtipos funcionales de receptores dopaminérgicos, dos de la familia  $D_1$  y tres de la familia  $D_2$  (**Figura 6**). En 1988 se consiguió la clonación del primer receptor dopaminérgico, el subtipo  $D_2$  de rata (Bunzow *et al.*, 1988). Este receptor fue aislado de una librería de cerebro de rata usando el ADNc del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico de hamster como sonda. A mediados de 1990, se clonó el primer receptor dopaminérgico de la familia  $D_1$ , el subtipo  $D_{11}$  de humano (Deary *et al.*, 1990). En este mismo año se publicaron diferentes artículos sobre la clonación y expresión del receptor  $D_1$  de rata en células COS-7 (Monsma *et al.*, 1990). Los receptores dopaminérgicos de la familia  $D_1$  poseen un tercer lazo citoplasmático corto y un extremo carboxilo relativamente largo. Por el contrario los receptores de la familia  $D_2$  poseen un tercer lazo citoplasmático largo y un extremo carboxilo muy corto (**Figura 6**). Los subtipos de la familia  $D_1$ , incluyen el receptor  $D_{1A}$  (Deary *et al.*, 1990; Sunahara *et al.*, 1990; Zhou *et al.*, 1990) y los receptores  $D_5 / D_{1B}$  (Sunahara *et al.*, 1991; Tiberi *et al.*, 1991). El receptor  $D_5$  y el receptor  $D_{1B}$  son homólogos de especie, clonados a partir de tejido humano y de tejido de rata, respectivamente. La familia de receptores dopaminérgicos  $D_2$  comprende los subtipos  $D_2$  (Bunzow *et al.*, 1988),  $D_3$  (Sokoloff *et*

*et al.*, 1990), y  $D_4$  (Van Tol y cols., 1991). Se han clonado dos isoformas del subtipo  $D_2$  que difieren en la longitud de su tercer lazo intracelular, uno corto ( $D_{2S}$ ) y otro largo ( $D_{2L}$ ) (Bunzow *et al.*, 1988).

Los genes para los receptores dopaminérgicos  $D_{1A}$  y  $D_5 / D_{1B}$  no poseen intrones en sus regiones codificantes, esta es una característica compartida con otros receptores acoplados a proteínas G (Dohlman *et al.*, 1987). Por el contrario, dentro de la familia de los receptores  $D_2$  la región codificante está interrumpida por cinco o seis intrones (Dal Toso *et al.*, 1989; Giros *et al.*, 1989; Grandy *et al.*, 1989; Monsma *et al.*, 1989; Selbie *et al.*, 1989). El receptor  $D_3$  posee cinco intrones (Sokoloff *et al.*, 1990), y cuatro el receptor  $D_4$  (Van Tol *et al.*, 1991). En cada uno de estos tres receptores, los intrones se encuentran dentro del segundo STM y el inicio del sexto STM (Gingrich y Caron, 1993) (Figura 7). La presencia de intrones dentro de la región codificante permite la posibilidad de un intercambio alternativo "splicing" de los exones. Estas variaciones pueden generar proteínas receptoras funcionalmente diferentes (Van Tol *et al.*, 1991).



**Figura 6.** Comparación de las características estructurales de los subtipos de receptores de dopamina. El símbolo (Y) representa los sitios potenciales de N-glicosilación. Los residuos de cisteína (S-S) uniendo el primero y segundo dominios extracelulares están conservados también en los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos. Los círculos oscuros representan la presencia de sitios para la unión de PKA y los círculos claros sitios para la unión de PKC (Modificado de Gingrich y Caron, 1993).



**Figura 7.** Esquema de la estructura de intrones y exones de los genes de los receptores dopaminérgicos de la familia D<sub>2</sub> dentro de su secuencia codificante. Los exones son representados como los rectángulos y las líneas entre ellos representan los exones. Los números romanos indican la región codificante de los STM (Modificada de Gingrich y Caron, 1993).

Los receptores dopaminérgicos de la familia  $D_1$  están asociados a la activación de la AC. Dentro de la familia  $D_2$ , los subtipos  $D_2$  y  $D_4$  parecen estar acoplados a la inhibición de la actividad AC, la disminución de las corrientes de  $Ca^{2+}$  y la activación de corrientes de  $K^+$  (Vallar y Meldolesi, 1989) (Tabla II). No ha sido identificado aún el segundo mensajero acoplado a la acción del receptor  $D_3$ . Además de los receptores clonados, fundamentalmente acoplados a la excitación o inhibición de la AC, se postula la existencia de otro receptor dopaminérgico que pudiera utilizar la vía del inositol fosfato (IP) junto o no con la vía del AMPc (Felder *et al.*, 1989; Liu *et al.*, 1992).

Farmacológicamente los receptores dopaminérgicos también presentan ciertas características que marcan la diferencia entre subfamilias. Por ejemplo, la afinidad por la dopamina del receptor  $D_5$  es casi diez veces mayor que la de los subtipos  $D_1$  y  $D_2$  (Sunahara *et al.*, 1991) mientras que el receptor  $D_3$  es el que presenta la mayor afinidad por la dopamina (Tabla III). La afinidad de los subtipos  $D_1$  y  $D_5$  por el agonista dopaminérgico SKF38393 es de 60 a 100 veces mayor que por los subtipos de la familia  $D_2$ . En el caso de antagonistas dopaminérgicos, la mayor afinidad por el haloperidol se presenta con los receptores de la familia  $D_2$ , mientras que con el SCH-23390 la mayor afinidad es sobre los receptores de la familia  $D_1$ .

**Tabla II.** Características estructurales y funcionales de los subtipos de receptores dopaminérgicos.

Características	Familia D <sub>1</sub>		Familia D <sub>2</sub>		
	D <sub>1</sub>	D <sub>5</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>
<b>Estructura molecular</b>					
Número de aminoácidos	446	447	D <sub>2a</sub> :443 D <sub>2b</sub> :414	446	387
Tamaño del ARNm	3,8 kb	3 kb	2,5 kb	8,3 kb	5,3 kb
Localización cromosómica	5q33-q35	4p15,1-p15,3	11q22-q23	3q13,3	11p15,5
Efecto sobre AMPc	Estimulador	Estimulador	Inhibidor	(?)	Inhibidor
Afinidad por DA	Micromolar	Submicromolar	Micromolar	Nanomolar	Submicromolar
Localización sináptica	Postsináptica	(?)	Presináptica Postsináptica	Presináptica Postsináptica	(?)
Distribución SNC	Corteza N. caudado N. putamen N. <i>accumbens</i> S. nigra	Hipotálamo Hipocampo Corteza frontal	N. caudado N. putamen N. <i>accumbens</i> S. nigra	B. Olfatorio N. <i>accumbens</i> S. nigra	Corteza frontal Médula Amígdala
Periferia	—	Riñón	Corazón	—	—

(Modificada de Álamo, Cuenca y López-Muñoz, 1996).

**Tabla III.** Farmacología de los receptores dopaminérgicos. Valores de  $K_i$  en nM.

Agonistas	Familia D <sub>1</sub>		Familia D <sub>2</sub>		
	D <sub>1</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>
Dopamina	2,000	250	2,000	30	450
Apomorfina	700	400	70	70	(4) <sup>2</sup>
Bromocriptina	700	500	5	7	300
Quinpirola	14,000	-	1,400	40	50
SKF38393	150	100	10,000	5,000	10,000
<b>Antagonistas</b>					
Haloperidol	30	40	0,6	3	5
(-)Sulpirida	40,000	80,000	10	20	50
Clozapina	140	250	70	500	9
SCH-23390	0,3	0,3	1,000	1,000	3,500

(Modificado de Schwartz et al., 1993).

### 3. HOMOLOGÍA ESTRUCTURAL ENTRE LOS RECEPTORES CATECOLAMINÉRGICOS

La comparación de las secuencias aminoacídicas de receptores adrenérgicos y dopaminérgicos muestra que las regiones más conservadas son los segmentos hidrofóbicos, es decir, los siete STM, que presentan una identidad entre el 40 y 46 % (Zhou *et al.*, 1990; Sunahara *et al.*, 1990). Por el contrario, el amino terminal, los tres lazos intracelulares y el carboxilo terminal presentan una menor homología en su secuencia (O'Dowd *et al.*, 1989).

#### 3.1. Segmentos transmembrana

La gran mayoría de los residuos conservados en los STM están en la mitad citoplasmática de las hélices  $\alpha$ . Estos residuos son necesarios para la interacción del receptor con sus efectores citoplasmáticos. Estudios de delección apuntan a que, así mismo, el tercer lazo intracelular es fundamental para el acoplamiento a proteínas G (O'Dowd *et al.*, 1988). En contraste, los aminoácidos que se encuentran en la mitad extracelular de las hélices  $\alpha$ , están íntimamente relacionados con la unión del ligando (Dohlman *et al.*, 1988; Strader *et al.*, 1987). Estas regiones parecen formar un sitio de unión a manera de bolsillo donde se acoplan las catecolaminas (Strader *et al.*, 1994; Hutchins, 1994).

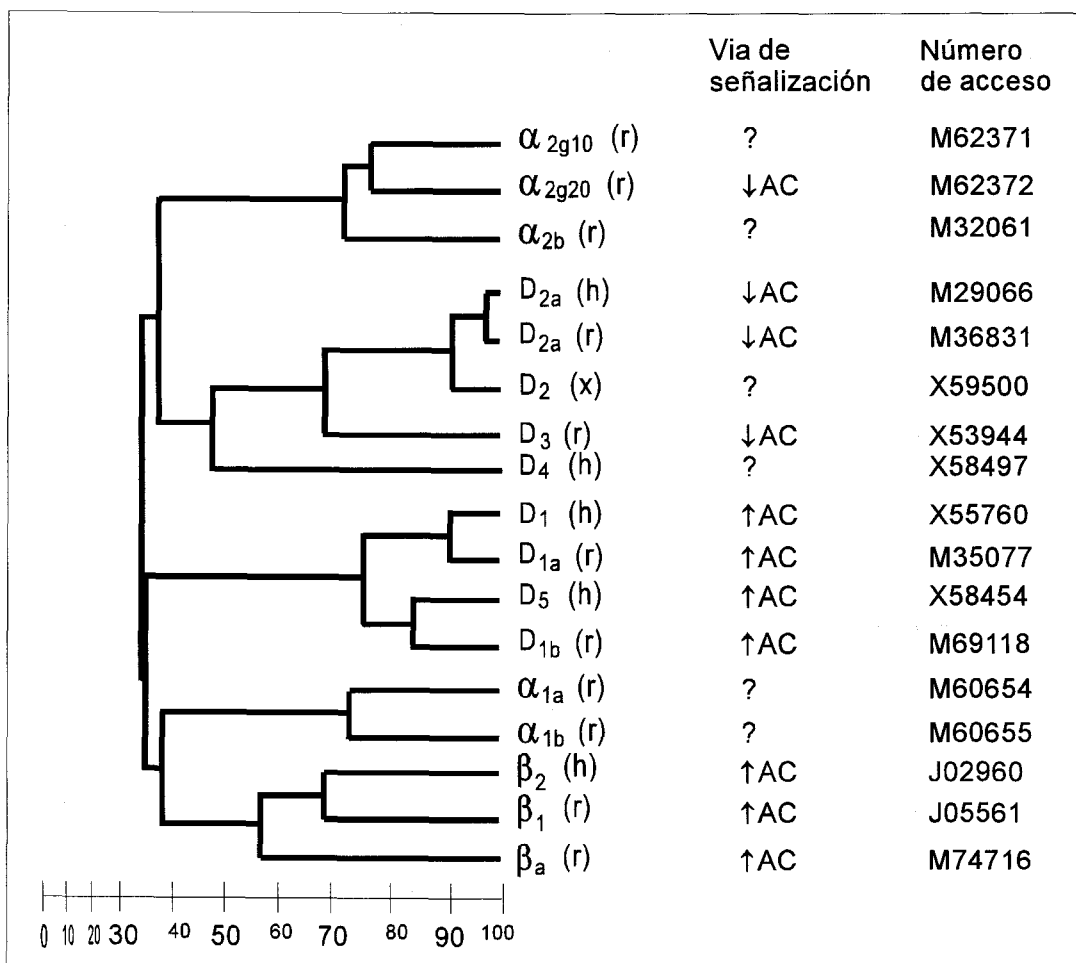
Desde el punto de vista estructural y funcional, los receptores  $\beta$ -adrenérgicos comparten ciertas características con los receptores de



la familia  $D_1$  como son un tercer lazo intracelular corto, un terminal carboxilo relativamente largo y la capacidad de estimular la AC por medio de una proteína Gs. Así mismo, la estructura molecular de los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos se asemeja a la de los receptores dopaminérgicos de la familia  $D_2$ , ya que poseen un tercer lazo intracelular relativamente largo, un terminal carboxilo corto e inhiben la actividad AC por medio de una proteína Gi (Figuras 5 y 6).

Dentro de los receptores adrenérgicos, el mayor porcentaje de homología compartida entre los siete STM se encuentra en la familia de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos (Figura 8). Los tres subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos presentan una homología entre sí de aproximadamente el 75 %, al igual que los tres subtipos de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos entre sí; sin embargo, los subtipos  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  no son más similares entre sí que los subtipos  $\alpha$  y  $\beta$  (aproximadamente 30 - 40 %). Los tres subtipos de receptores  $\beta$ -adrenérgicos poseen aproximadamente el 60 % de homología entre sus STM (Lefkowitz *et al.*, 1996).

Dentro de la familia de los receptores dopaminérgicos  $D_1$  ( $D_{1A}$ ,  $D_5$  /  $D_{1B}$ ) la homología entre sus STM es de 75 - 78 %. Sin embargo, entre los subtipos de la familia de los receptores  $D_2$  la homología es menor; el receptor  $D_2$  comparte un 75 % de identidad con el receptor  $D_3$  y de un 50 - 53 % con el receptor  $D_4$ . Al igual que entre las familias de receptores adrenérgicos  $\alpha$  y  $\beta$ , la homología entre las familias  $D_1$  y  $D_2$  es de 30 % a 40 % (Gingrich y Caron., 1993) (Figura 8).



**Figura 8.** Homología estructural entre distintos receptores catecolaminérgicos. El alineamiento de las secuencias se ha realizado utilizando las regiones hidrofóbicas de cada uno de los receptores numerados (regiones entre I STM - V STM, mas los VI STM y VII STM). Las longitudes de las líneas horizontales son inversamente proporcionales al porcentaje de la secuencia que es similar entre receptores o grupos de receptores. Para nombrar el receptor se hace referencia al tipo general de receptor, y entre paréntesis se señala la especie, correspondiendo (r) a rata, (h) a humano y (x) a *Xenopus*. El número de acceso hace referencia al localizador de la base de datos Genbank. (Modificado de Feng *et al.*, 1996).

### 3.2. Interacción ligando-receptor

Como se mencionó anteriormente, los receptores adrenérgicos comparten varios residuos conservados dentro de sus STM, los cuales se cree son fundamentales para la unión de las catecolaminas. Esta característica es compartida por los receptores para dopamina, donde se encuentran presentes dos serinas (S) en el quinto STM y un ácido aspártico (D) cerca del extremo extracelular del tercer STM. Las serinas están involucradas en el reconocimiento de los dos grupos hidroxilo (OH) de las catecolaminas y el ácido aspártico participaría en la interacción electrostática como un contraión con el grupo amino del ligando (Strader *et al.*, 1989; Dixon *et al.*, 1987).

En el esquema de la **Figura 9** se muestra la comparación de las secuencias de 18 receptores catecolaminérgicos, clonados de humano, rata y *Drosophila*, en la región del III STM y V STM.

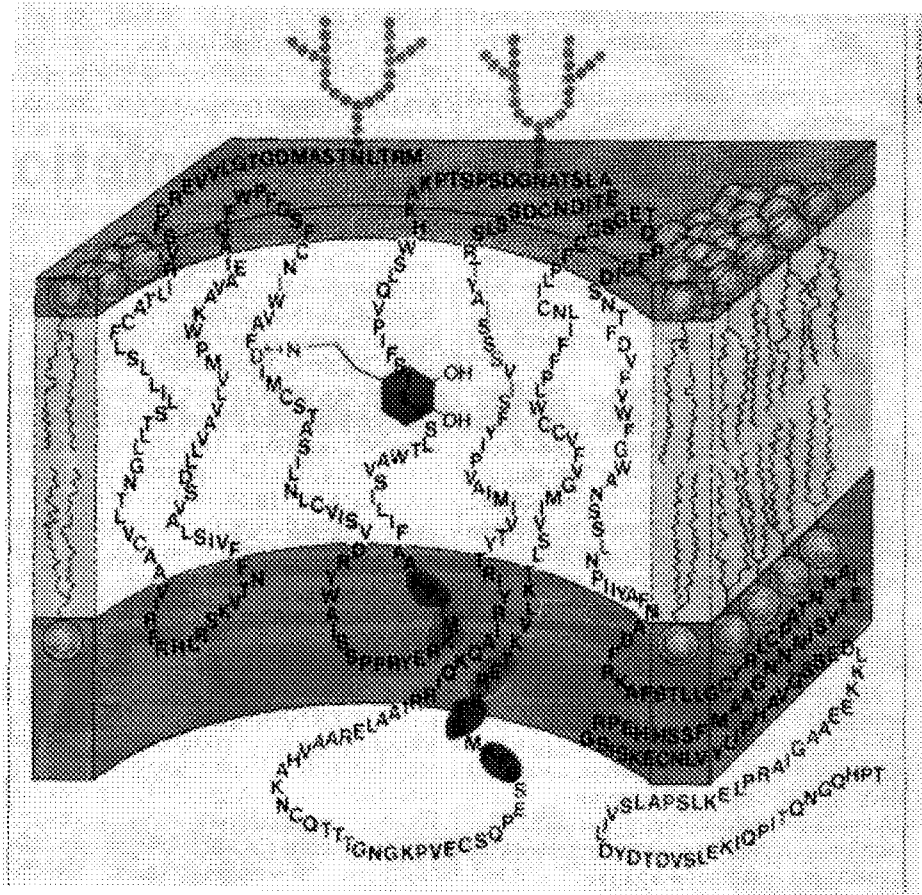
En la **Figura 10** se muestra un modelo que ilustra la estructura topográfica del receptor dopaminérgico D<sub>1</sub> de humano y donde se puede observar la posición del ácido aspártico y las serinas implicadas en la unión de la DA (Deary *et al.*, 1990). El ácido aspártico está conservado en todos los receptores de aminas biógenas (adrenérgicos, dopaminérgicos, colinérgicos muscarínicos y serotoninérgicos) (Lefkowitz *et al.*, 1996).

Estudios de mutagénesis dirigida, indican que al mutar el ácido aspártico de la posición 113 en el tercer STM del receptor  $\beta_2$  de hamster, se impide la unión de antagonistas (Strader *et al.*, 1987). Este dato es compatible con el ya mencionado ácido aspártico propuesto como contraión para las catecolaminas en el receptor  $\beta_2$  humano (Strader *et al.*, 1987). Por otro lado, al sustituir la cisteína (C) de la posición 106, situada en el primer lazo extracelular del receptor  $\beta_2$  de hamster, se altera la unión de los agonistas (Dixon *et al.*, 1987).

**Figura 9.** Comparación de la secuencia de receptores catecolaminérgicos. En el III STM es conservado un ácido aspártico (D), y en el V STM son conservadas dos serinas (S). Se cree que las catecolaminas tienen su sitio de unión entre estos residuos. En el III STM también se puede apreciar la secuencia de ácido aspártico, arginina y tirosina (DRY) muy conservada. El tipo de receptor es indicado por la letra en mayúscula y la especie entre parentesis, siendo (r) rata, (h) humano y (x) *Xenopus*. El subtipo dopr35ef corresponde a *Drosophila*.

	III STM			V STM		
$\alpha_{1A}$ (r)	CDVWAAVDVL	CCTASILSLC	TISVDRYVGV	TEEVGYAIFSS	SVCSS	FYLPMA VIVVMYCRVY
$\alpha_{1B}$ (r)	CDIWAAVDVL	CCTASILSLC	AISIDRYIGV	TEEPFYALFSS	SLGSS	FYIPLA IMAFVYLRVF
$\alpha_{2g10}$ (r)	CGVYLAIDVL	FCTSSIVHLC	AISLDRYWSV	NDETWYILSS	CIGSS	FFAPCL IMGLVYARIY
$\alpha_{2g20}$ (r)	CEIYLAIDVL	FCTSSIVHLC	AISLDRYWSI	NDQKWYVIS	SIGSS	FFAPCL IMILVYVRIY
$\alpha_{2B}$ (r)	CEVYLAIDVL	FCTSSIVHLC	AISLDRYWAV	NQEAWYILASS	SIGSS	FFAPCL IMILVYLRIY
$\beta_1$ (r)	CELWTSVDVL	CVTASIETLC	VIALDRYLAI	VTNRAYAIASS	SVVSS	FYVPLC IMAFVYLRVF
$\beta_2$ (h)	CEFWTSIDVL	CVTASIETLC	VIAVDRYFAI	FTNQAYAIASS	SIVSS	FYVPLV IMVFVYSRVF
$\beta_A$ (r)	CELWTSVDVL	CVTASIETLC	ALAVDRYLAV	ASNMPYALLSS	SSVSS	FYLPLL VMLFVYARVF
$D_1$ (h)	CNIWVAFDIM	CSTASILNLC	VISVDRYWAI	SLSRTYAIASS	SVISS	FYIPVA IMIVTYTRIIY
$D_{1A}$ (r)	CNIWVAFDIM	CSTASILNLC	VISVDRYWAI	RLSRTYAIASS	SLISS	FYIPVA IMIVTYTSIIY
$D_5$ (h)	CDVWVAFDIM	CSTASILNLC	VISVDRYWAI	SLNRTYAIASS	SLISS	FYIPVA IMIVTYTRIIY
$D_{1B}$ (r)	CDIWVAFDIM	CSTASILNLC	IISVDRYWAI	SLNRTYAIASS	SLISS	FYIPVA IMIVTYTRIIY
$D_{2A}$ (h)	CDIFVTLDIM	MCTASILNLC	AISIDRYTAV	.....FVVYSS	SIVSS	FYVPFI VTLLVYIKIY
$D_{2A}$ (r)	CDIFVTLDVM	MCTASILNLC	AISIDRYTAV	.....FVVYSS	SIVSS	FYVPFI VTLLVYIKIY
$D_2$ (x)	CDIFVTLDVM	MCTASILNLC	AISIDRYTAV	.....FVIYSS	SIVSS	FYVPFI VTLLVYVQIY
$D_3$ (r)	CDVFVTLDVM	MCTASILNLC	AISIDRYTAV	.....FVIYSS	SVVSS	FYVPGF VTLVYARIY
$D_4$ (h)	CDALMAMDVM	LCTASIFNLC	AISVDRFVAV	.....YVVYSS	SVCSS	FFLPCP LMLLLYWATF
<b>dopr35ef</b>	CDTWVAFDVM	CSTASILNLC	AISMTRYIHI	DLTPTYAVVSS	SCISS	FYFPCV VMIGIYCRLY

Figura 9. Secuencias de receptores catecolaminérgicos.



**Figura 10.** Estructura del receptor dopaminérgico D<sub>1</sub> de humano. Compuesto por 446 aminoácidos con siete STM de 20 a 25 aminoácidos cada uno. La dopamina se une a un aspartato (D) del III STM y dos serinas (S) del V STM. Dicha unión activa la adenilato ciclasa, este proceso es mediado por proteínas G que interactúan con el tercer lazo citoplasmático. La cola carboxilo terminal (larga) y el tercer lazo citoplasmático (corto) marcan la diferencia con respecto al receptor D<sub>2</sub>, el cuál inhibe la adenilato ciclasa (Dearry *et al*; Zhou *et al*; Sunahara *et al.*, 1990).

### 3.3. Lazos intracelulares

La comparación de la secuencia de los lazos intracelulares de los receptores  $D_{1A}$  y  $D_5/D_{1B}$  revela que estos dominios tienen el mayor grado de homología por regiones después de los STM, y esto es consistente con la habilidad que poseen para activar la misma vía de señalización. Los receptores dopaminérgicos  $D_2$  y  $D_3$  también comparten un alto grado de homología en estas regiones aunque el receptor  $D_4$  es menos homólogo.

#### 3.3.1. Interacción con proteínas G

La secuencia presente en el tercer lazo intracelular del receptor  $D_1$  de humano (aminoácidos 216 a 228) (**Figura 11**), es similar a la del receptor  $\beta_1$ -adrenérgico de humano (aminoácidos 246 a 258). Se cree que este lazo intracelular tiene una función muy importante en el acoplamiento del receptor a las proteínas G (O'Dowd *et al.*, 1988). Igualmente la secuencia DRY conservada en el segundo lazo intracelular en los receptores catecolaminérgicos, puede también ser importante en el proceso de unión de las proteínas G (ver **Figura 9**).

Estudios de la relación estructura-función entre receptores adrenérgicos  $\alpha_{2A}$  y  $\beta_2$  de humano, de los dominios implicados en la unión del ligando y el acoplamiento a proteínas G, han revelado que la región del tercer lazo intracelular y el quinto STM están íntimamente relacionados en el acoplamiento del receptor a proteínas G (Kobilka *et al.*, 1988). Al receptor  $\alpha_{2A}$  se le deleccionó un fragmento del tercer

lazo intracelular que contenía las serinas y treoninas, como consecuencia este receptor no presentó la desensibilización inducida por el agonista (Liggett *et al.*, 1992).

	III LI	
D <sub>1</sub> (h)	<b>RIYRIAQ</b>	K <b>QIRRI</b>
D <sub>1</sub> (r)	<b>RIYRIAQ</b>	L <b>QIRRI</b>
D <sub>5</sub> (h)	<b>RIYRIAQ</b>	V <b>QIRRI</b>
β <sub>1</sub> (h)	<b>RVFREAQ</b>	K <b>QVKKI</b>
D <sub>2</sub> (h)	<b>KIYIVLR</b>	R <b>RRKRV</b>
D <sub>2</sub> (r)	<b>KIYIVLR</b>	K <b>RRKRV</b>
D <sub>3</sub> (r)	<b>RIYIVLR</b>	Q <b>RQRKR</b>

**Figura 11.** Comparación de la secuencia de aminoácidos conservados en la región del tercer lazo intracelular ( III LI) entre varios subtipos de los receptores dopaminérgicos y el receptor β<sub>1</sub>-adrenérgico de humano.

### 3.3.2. Sitios de fosforilación

Los cambios conformacionales en las proteínas suelen estar regulados por los mecanismos de fosforilación, por esto es importante tener en cuenta que una pequeña modificación estructural, puede inducir procesos como la sensibilización o desensibilización de los receptores a estímulos externos.

En el receptor adrenérgico β<sub>2</sub> de humano se han identificado dos sitios de fosforilación intracelulares para la PKA en el III LI y en el



terminal carboxilo. En este terminal carboxilo también se han encontrado sitios de fosforilación para la quinasa activada por el receptor  $\beta$ -adrenérgico ( $\beta$ ARK) (O'Dowd *et al.*, 1989).

Como se mencionó anteriormente, las serinas y treoninas en el relativamente largo III LI del receptor adrenérgico  $\alpha_{2A}$  de humano pueden ser fosforiladas por quinasas como  $\beta$ ARK. En cuanto al efecto de la fosforilación sobre la actividad de este receptor, se sabe que al generar un receptor mutante por delección, carente de los sitios de fosforilación, presenta como principal característica la no desensibilización, es decir, mantiene su función en presencia continua del agonista (Liggett *et al.*, 1992). En el III LI de este receptor  $\alpha_{2A}$  adrenérgico, hay una treonina (T<sup>348</sup>) que está conservada en otros receptores adrenérgicos cuya sustitución induce la actividad del receptor en ausencia de agonista, es decir, un receptor con actividad constitutiva (Ren *et al.*, 1993).

### 3.4. Extremo amino terminal

En general, el amino terminal de los receptores catecolaminérgicos posee una o dos secuencias consenso de ácido aspártico por serina o treonina (N x S-T) para la N-glicosilación. En estos receptores y en general para los receptores de aminas biógenas la N-glicosilación parece no ser necesaria en la unión con el ligando o en su acoplamiento a proteínas G, tal y como se ha visto en el caso de receptores  $\beta$ -adrenérgicos purificados en los que un tratamiento para eliminar residuos de carbohidratos no afecta a ninguna de estas dos

funciones (Benovic *et al.*, 1987). De la misma manera inhibidores de la N-glicosilación, como la tunicamicina, no afectan la unión de ligandos al receptor (Doss *et al.*, 1985). Es muy probable que la glicosilación sea esencial para la distribución subcelular de algunos receptores, aunque no de todos. Se ha visto que en el caso del receptor  $\beta$ -adrenérgico, receptores mutantes carentes de las secuencias consenso de glicosilación no llegan correctamente a la superficie celular (Rands *et al.*, 1990).

Otra característica compartida por los receptores catecolaminérgicos es la presencia de un residuo de cisteína (C) conservado en el primero y segundo lazos extracelulares, aunque en los receptores dopaminérgicos además se conservan dos cisteínas en el tercer lazo extracelular (III LE). Estos residuos se han relacionado con la formación de un puente disulfuro ya que, por ejemplo, la sustitución de cualquiera de estos dos por valina (V) en el receptor  $\beta$ -adrenérgico origina un receptor mutante con propiedades de fijación al agonista alteradas (Dixon *et al.*, 1987). De estos estudios se ha deducido que el puente disulfuro no participa directamente de la fijación con el ligando sino que más bien juega un papel físico en el mantenimiento de la estructura terciaria de los receptores acoplados a proteínas G (Mengod y Palacios., 1996).

La falta de homología significativa en la secuencia de aminoácidos y la variación en la longitud del amino terminal entre varios receptores adrenérgicos sugiere que no hay un rol funcional general para el amino terminal (O'Dowd *et al.*, 1989), aunque cada uno

de los receptores adrenérgicos presenta sitios de glicosilación putativos en esta región.

Los receptores dopaminérgicos poseen varios sitios potenciales de glicosilación (**Figura 6**). La familia de los receptores D<sub>1</sub> poseen dos sitios de glicosilación, uno en el amino terminal y otro en el segundo lazo extracelular. En el receptor D<sub>1</sub> de humano se encuentran en las posiciones N<sup>5</sup> y N<sup>175</sup> respectivamente (Hubbard *et al.*, 1981). Para los receptores D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub> el número de sitios de glicosilación se incrementa a cuatro y están ubicados en los dominios extracelulares. En contraste, el receptor D<sub>4</sub> solamente posee un sitio de glicosilación. También se han encontrado en cada uno de los receptores de dopamina clonados, dos cisteínas entre el primer y segundo lazos extracelulares y se cree que son sitios de uniones disulfuro (Fraser 1989; Dohlman *et al.*, 1990).

### 3.5. Extremo carboxilo terminal

En el extremo carboxilo terminal cerca al VII STM existe una cisteína (C<sup>347</sup>) presente en muchos receptores acoplados a proteínas G, que se ha conservado a lo largo de la evolución. Esta cisteína está palmitoilada, es decir, presenta un ácido palmítico (ácido graso) unido covalentemente como en el caso de los receptores  $\alpha_{2A}$ ,  $\beta_2$  - adrenérgicos (O'Dowd *et al.*, 1989) y el receptor de rodopsina (Ovchinnikov *et al.*, 1988). Si esta cisteína se sustituye por una alanina (A) o fenilalanina (F) en el receptor  $\alpha_{2A}$  de humano, se impide la

aparición del ácido palmítico y también evita la disminución de los niveles de receptores tras exposición prolongada al agonista, conocida como regulación negativa (down-regulation) (Eason *et al.*, 1994). Este fenómeno de regulación negativa inducida por el agonista no se presenta en el receptor adrenérgico  $\alpha_{2C}$ , pues al no poseer la cisteína tampoco tiene unido el ácido graso, lo que evidencia el papel de los ácidos grasos en la regulación de la expresión del receptor.

En los receptores de la familia  $D_1$  esta cisteína es localizada en la parte inicial de su largo carboxilo terminal, mientras que para la familia de los receptores  $D_2$  se encuentra en la parte final de su corto carboxilo terminal. La función de esta palmitoilación no está clara aún pero se cree que el grupo palmitoilo puede servir de ancla de parte del extremo carboxilo del receptor en la membrana, controlando de esta manera la estructura terciaria de esta región del receptor. La sustitución de esta cisteína por una glicina en el receptor  $\beta$ -adrenérgico da lugar a una pérdida de la capacidad del receptor para activar las proteínas G (O'Dowd *et al.*, 1989), sugiriendo que la naturaleza de la cadena lateral en esta posición es crítica para la función del receptor.

La fosforilación múltiple puede incapacitar ciertos receptores adrenérgicos para activar proteínas G. Los residuos de serina (S) en la región carboxilo terminal del receptor  $\beta$ -adrenérgico se fosforilan por una quinasa específica que actúa sobre el complejo ligando-receptor, pero no sobre el receptor aislado. La fosforilación en múltiples lugares impide al complejo ligando-receptor catalizar el intercambio GDP-GTP y por consiguiente bloquea la transmisión de la señal. El receptor  $\beta$ -

adrenérgico se inactiva por fosforilación múltiple y el proceso contrario es decir su desfosforilación restaura la capacidad del receptor para activar la proteína G (Murga y Mayor Jr, 1996).

#### 4. FISIOPATOLOGÍA

En mamíferos, los receptores para dopamina son importantes en procesos de regulación neuroendocrina, control motor y estados patológicos. En regiones del mesencéfalo como la sustancia negra, se encuentran neuronas que contienen altos niveles de dopamina. Algunos axones de estas neuronas terminan en el cuerpo estriado, donde participan en el control de los movimientos complejos. En la enfermedad de Parkinson se produce degeneración de las sinapsis dopaminérgicas en el cuerpo estriado, que pueden ser la causa de los temblores musculares y la rigidez característica de esta enfermedad. De acuerdo con estudios de hibridación *in situ*, que permiten la visualización del ARNm en tejido cerebral, se han localizado los receptores dopaminérgicos D<sub>1A</sub> y D<sub>2</sub> en los núcleos caudado, putamen, accumbens y tuberculo olfatorio (Fremeau *et al.*, 1991; Sunahara *et al.*, 1991; Tiberi *et al.*, 1991; Weiner *et al.*, 1991). Los receptores D<sub>5</sub>/D<sub>1B</sub> en núcleos talámico parafacicular, mamilar lateral e hipocampo (Tiberi *et al.*, 1991).

Las drogas antipsicóticas conocidas como neurolépticos son efectivas en el tratamiento de ciertos desordenes psiquiátricos, poseen afinidad en el rango de nanomolar por los receptores dopaminérgicos, en especial por los receptores D<sub>2</sub>. Esta observación junto con la

expresión selectiva del ARNm del receptor D<sub>3</sub> en el núcleo accumbens y el tubérculo olfatorio y la alta afinidad de los receptores D<sub>4</sub> (corteza frontal, amígdala, cerebro medio y puente) por los neurolépticos atípicos como clozapina, sugieren que la disminución de los síntomas de la psicosis por neurolépticos puede ser en parte debida a su habilidad para antagonizar los receptores D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub>. Las disfunciones motoras (síndrome extrapiramidal) observadas con el tratamiento prolongado con neurolépticos puede ser debido a un incremento en la densidad de los receptores D<sub>2</sub> en el estriado (Sokoloff *et al.*, 1990).

La clonación molecular ha puesto de manifiesto que la diversidad observada dentro de cada familia de receptores de neurotransmisores surge de la existencia de genes distintos que codifican diferentes subtipos de receptores. El gen para el receptor D<sub>2</sub> humano fue localizado en el cromosoma 11q22-23 (Grandy *et al.*, 1989) y ha sido asociado con un polimorfismo de longitud del gen, relacionado con alcoholismo y otras condiciones psiquiátricas (Comings *et al.*, 1991), lo cual ha generado controversia (Bolos *et al.*, 1990; Gelernter *et al.*, 1991). Además, no hay suficiente evidencia para asociar este polimorfismo a enfermedades como la esquizofrenia (Moises *et al.*, 1991) o maníaco depresión (Holmes *et al.*, 1991). Recientemente se ha publicado la localización cromosómica del gen responsable de la enfermedad de Parkinson, el 4q21-23 autosómico dominante (Shoulson, 1998). El gen para el receptor de dopamina D<sub>3</sub> se ha localizado en el cromosoma 3q13.3 (Giros *et al.*, 1991) y el gen para el receptor D<sub>4</sub> en el brazo corto del cromosoma 11 el mismo cromosoma para el gen del receptor D<sub>2</sub> (Van Tol *et al.*, 1991).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

La DA está implicada en numerosos trastornos del SNC donde las drogas antipsicóticas son fundamentalmente antagonistas de receptores de la familia D<sub>2</sub>, pero también, bloquean con alta afinidad los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos (Gingrich y Caron, 1993). Los receptores dopaminérgicos y  $\alpha_1$ -adrenérgicos aunque presentan gran homología estructural y molecular, difieren fundamentalmente en la vía de señalización intracelular a la que están acoplados. La unión de la DA a su receptor produce la activación o inhibición de la AC, mientras que la estimulación de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos da lugar al inicio de la vía del inositol fosfato. Sin embargo, algunos autores sugieren la existencia de un tipo de receptor dopaminérgico, diferente de los hasta ahora clonados y caracterizados, que activa la vía del inositol fosfato y de cuya activación resulta un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  (Felder *et al.*, 1988, 1989; Dearry *et al.*, 1990). En la glándula pineal de distintas especies se ha descrito la existencia de receptores dopaminérgicos (Simonneaux *et al.*, 1990, 1991) y fibras tirosina hidroxilasa positivas pero dopamina  $\beta$ -hidroxilasa negativas (Jin *et al.*, 1988). Por otra parte, se ha demostrado que la DA tiene una acción reguladora sobre la actividad de la enzima NAT (Deguchi y Axelrod, 1972) y la síntesis de melatonina (Axelrod *et al.*, 1969) sugiriendo un

importante papel funcional de la DA en la glándula pineal.

El presente trabajo, fruto de la conjunción de cuatro diferentes aspectos metodológicos como son la técnica de registro de la concentración  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular mediante microfluorometría en célula única, la medida de la concentración de AMPc por ensayo inmuno (EIE), la determinación de la concentración de inositol fosfato (IPs) mediante inositol marcado con tritio y la clonación de ADNc por técnicas de biología molecular, tuvo como objetivo general estudiar la acción de la DA en células dispersas de la glándula pineal de rata.

Nuestros resultados indican que la DA en estas células, no sólo actúa sobre la vía de la AC sino que, además, produce un incremento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  similar al producido por los agonistas  $\alpha_1$ -adrenérgicos (Marín *et al.*, 1996; Sugden *et al.*, 1987).

El planteamiento experimental se centró en tres aspectos fundamentales:

- a) Estudiar farmacológicamente el tipo de receptor activado por DA presente en las células pineales de rata.
- b) Establecer la/s vía/s de señalización intracelular mediante la/s cuál/es ocurre el incremento de calcio intracelular tras la estimulación con DA.
- c) Determinar con técnicas de biología molecular la presencia o no de receptores dopaminérgicos.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **1. CULTIVO CELULAR**

Se utilizaron pinealocitos en cultivo primario procedentes de glándulas pineales de ratas macho de la cepa Wistar, aproximadamente de 100 a 150g de peso y de 25 a 30 días de edad. Las glándulas se extrajeron y trataron mediante dispersión enzimática y mecánica. Las células disociadas se sembraron en placas de Petri conteniendo cubres tratados con poly-L-lisina. Posteriormente se mantuvieron a 37 °C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y en medio de cultivo suplementado con suero bobino fetal y antibióticos.

#### **1.1. Localización y características generales de la glándula pineal de rata**

La glándula pineal o epífisis cerebral en la rata es un pequeño órgano de color blanco rosado que en su desarrollo ha migrado en sentido dorsal para localizarse superficialmente bajo el cráneo, concretamente, a nivel del punto lambda de las coordenadas estereotáxicas del cerebro de rata (ver Figura 1 de Introducción).

La glándula pineal en la rata está conectada con el resto del diencefalo y tercer ventrículo por un pedúnculo o tallo (que contiene fibras nerviosas, vasos sanguíneos y tejido conectivo). Esta glándula tiene forma ovoide, mide ~ 1-2 mm de diámetro y está envuelta por una capa de tejido conectivo o piamadre. Dicha estructura ocupa un espacio triangular en *cuña*, delimitado rostralmente por el ángulo que forman la corteza cerebral retrosplenial y estriada de cada hemisferio, al separarse del plano de simetría del cerebro. El límite dorsal de la ubicación de la glándula lo constituye el lóbulo 4 y 5 del cerebelo. La base sobre la que descansa la glándula pineal es la depresión existente entre los tubérculos cuadrigéminos superiores e inferiores.

Dos tipos celulares componen esta glándula, los pinealocitos y la neuroglía. Los pinealocitos son las células principales de la glándula pineal. En su origen filogénico eran auténticos fotorreceptores directamente sensibles a la luz, conectados al cerebro por medio de neuronas de segundo orden. Posteriormente, estos fotorreceptores fueron evolucionando y desaparecieron las neuronas de conexión (como en las tortugas, lagartos y aves). Finalmente, en los mamíferos, los pinealocitos han perdido la capacidad de detectar directamente la luz, convirtiéndose en células neurosecretoras. La información del estado del entorno luminoso llega a estas células a través del sistema simpático, de manera que la función de la pineal como transductor de señales fotoperiódicas ha permanecido a lo largo de la evolución (Collin *et al.*, 1986).

Los pinealocitos son células de aspecto estrellado con prolongaciones semejantes a dendritas que terminan en unas

pequeñas expansiones celulares en íntimo contacto con vasos capilares. En su protoplasma destaca la existencia de un aparato de Golgi bien desarrollado y de numerosas vesículas de secreción, especialmente en la proximidad de las expansiones perivasculares. La neuroglía está integrada por células semejantes a los astrocitos, presentes en el sistema nervioso central, por lo cual se les ha adjudicado una función de soporte.

## **1.2. Extracción de la glándula**

Se emplearon 6 ratas en cada preparación. Con cada animal se procedió secuencialmente de igual forma. Las ratas se decapitaron con guillotina (PANLAB, España). Inicialmente, se seccionó de forma sagital la piel que recubre la calota craneana, esta fue expuesta y con unas tijeras se realizó la craneotomía del hueso occipital y las porciones más dorsomediales de los huesos parietales. A continuación se retiró esta sección de hueso quedando al descubierto la duramadre.

Tras retirar dicha membrana, y al ser la ubicación de la glándula muy superficial, esta quedó bien expuesta. Posteriormente la glándula pudo ser fácilmente extraída tras la sección del pedúnculo pineal que la conecta al resto del diencefalo, y se depositó en medio de cultivo DMEM a temperatura ambiente. Los suplementos se prepararon como se indica en la **Tabla IV**.

**Tabla IV.** Solución y suplementos para la extracción de la glándula pineal.

<b>Compuesto</b>	<b>[mM]</b>	<b>Referencia</b>
<b>DMEM</b>		Life Technologies BRL 11880-010
<b>Acido ascórbico</b>	0.56	Sigma, A-4544
<b>Albúmina sérica bovina</b>	1mg/ml	Sigma, A-6003
<b>EGTA</b>	3.5	Sigma, E-4378
<b>L-Glutamina</b>	2	Sigma, G-6392
<b>Penicilina- estreptomina</b>	50 $\mu$ g/ml	Biomedicals
<b>Suero bovino fetal</b>	5%	Sigma, F2442

EGTA: etilén bis[oxietilennitrilo]-tetraacético.  
DMEM: Dulbecco's Medium Eagle Modified.

### 1.3. Dispersión celular

Obtenidas las 6 glándulas, se limpiaron de restos de tejido conectivo y de vasos sanguíneos con ayuda de pinzas finas (Nº 3), tras lo cual se lavaron en medio limpio. A continuación, se pasaron las glándulas a una solución de idéntica composición a la anterior pero conteniendo 1.25 mg/ml de tripsina (tipo III, T-8253, Sigma), y 80  $\mu$ g/ml de deoxiribonucleasa II (tipo IV, D-8764, Sigma).

Las glándulas se mantuvieron en un incubador (Steri-cult 200 incubator, Forma Scientific, Ohio, USA.) a 37 °C y una atmósfera de 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>, durante 30 min para la digestión enzimática del tejido conectivo. Transcurridos 15 min de incubación, se pasaron cinco

veces a través de una pipeta (Gold Seal 5 in 1/10 ml TD20 °C) estéril de 10 ml, para facilitar la acción enzimática.

Una vez terminada la segunda incubación, se detuvo la acción de la tripsina mediante la adición de 2% v/v de suero bovino fetal (SBF) (F-2442, Sigma). Posteriormente, las células fueron centrifugadas (Sorvall RT6000B) durante 5 minutos a 1000 rpm a temperatura ambiente. Se desechó el sobrenadante y al precipitado resultante se le adicionó 2 ml de medio de dispersión celular y DNasa (80 $\mu$ g/ml). La dispersión mecánica de las células se realizó con pipetas Pasteur de vidrio recubiertas por una capa de sigmacote (SL-2, Sigma) y con diámetros de punta progresivamente menores. Esta operación se realizó suavemente, para evitar maltratar las células, hasta obtener una solución homogénea y turbia.

La solución se pasó a través de un filtro de gasa estéril y se centrifugó durante 10 min a 1000 rpm. A este precipitado se le adicionó 5 ml de medio de cultivo, suplementado con 10% v/v de SBF, 1% de penicilina-estreptomicina y 1% de L-Glutamina, este medio se usó para mantener las células pineales en incubación hasta su uso. Durante la dispersión y siembra celular, se mantuvieron condiciones de esterilidad realizando este procedimiento en una campana de flujo de aire laminar (Bio48, Faster, Italia.) y utilizando material de un sólo uso.

#### **1.4. Siembra y mantenimiento del cultivo celular**

Las células fueron sembradas en cubres de vidrio (Deckgläser Hirschmann N° 1, laborgerate, Germany) previamente preparados con

poly-L-lisina, y depositados en una placa de Petri (35/10 mm) de poliestireno estéril. El cultivo celular se mantuvo en un incubador a 37 °C y una atmósfera de 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>, hasta el momento del registro (y hasta 5 días después de la dispersión).

Previo a la extracción de las glándulas pineales, se prepararon los soportes para la siembra celular. Este proceso se realizó como sigue a continuación:

- a) Se cortaron cubreobjetos de vidrio en trozos de aproximadamente 5 x 15 mm, con una punta de diamante, y se mantuvieron en etanol al 90% durante 15 minutos para eliminar posibles impurezas.
- b) Se lavaron con agua desionizada y se secaron en la campana de flujo de aire laminar, una vez secos, se flamearon en la llama de un mechero bunsen.
- c) Se depositaron en una solución de poli-L-lisina (sal hidrobromuro, P-1524, Sigma), 1 mg/ml, con tampón tris (hidroximetil) aminoetano, pH 8.5, (TRIZMA 8.5, T-5378, Sigma) a concentración de 19 mg/ml. Este compuesto, formado por distintos poliaminoácidos de alto peso molecular (>300.000 D), forma una matriz que favorece la adhesión celular a la misma.
- d) Una vez transcurridos 45-60 min, se extrajeron dichos soportes y se lavaron con agua desionizada dos veces.
- e) Posteriormente, se secaron y depositaron en una placa de Petri de poliestireno, ya listos para la siembra celular.

El material empleado en este proceso, como las pipetas Pasteur de vidrio, se esterilizaron en un autoclave (Microclave S-477, Selecta, España) durante 45 minutos a 125° C y 1.2 atmosferas.

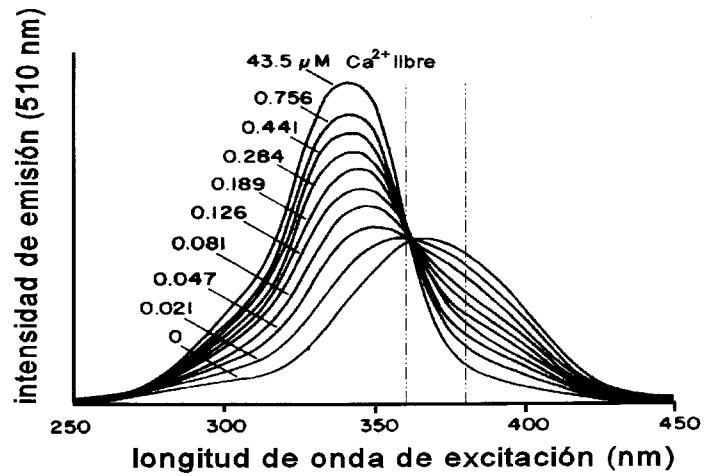
## 2. MICROFLUOROMETRÍA

Por medio de la microfluorometría, y usando el indicador fluorescente fura-2AM, se han monitorizado los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  en células dispersas de glándula pineal. Esta técnica óptica permite cuantificar la emisión de fluorescencia de una muestra microscópica que ha sido marcada con una sustancia cuya radiación de luz es sensible a un parámetro de interés.

### 2.1. Indicador de calcio

La detección de cambios transitorios de la concentración de calcio se denominó señal transitoria de calcio, y su aumento intracelular se detectó por medios ópticos. El indicador fluorescente de calcio empleado fue fura-2AM (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.). Este fluoróforo posee la capacidad de atravesar pasivamente la membrana plasmática, y está conjugado con grupos ésteres acetoxi metilos (AM), que una vez dentro de la célula son hidrolizadas por esterasas intracelulares volviéndose no permeables a través de la membrana lipídica.

En la **Figura 12** se muestra el espectro de excitación de fura-2 *in vitro*, a concentraciones crecientes de calcio libre. En el eje de las ordenadas se representa la intensidad de fluorescencia emitida a 510 nm después de ser excitada con diferentes longitudes de onda. A una longitud de onda de excitación de 340 nm el fura-2 incrementa su emisión de fluorescencia cuando une  $Ca^{2+}$ . Por el contrario, la emisión de fluorescencia es inversamente proporcional a la  $[Ca^{2+}]_i$  a 390 nm.



**Figura 2.** Espectro de excitación del fura-2 a concentraciones crecientes de  $\text{Ca}^{2+}$ . Se emplearon filtros de excitación a 357 y 380 nm.

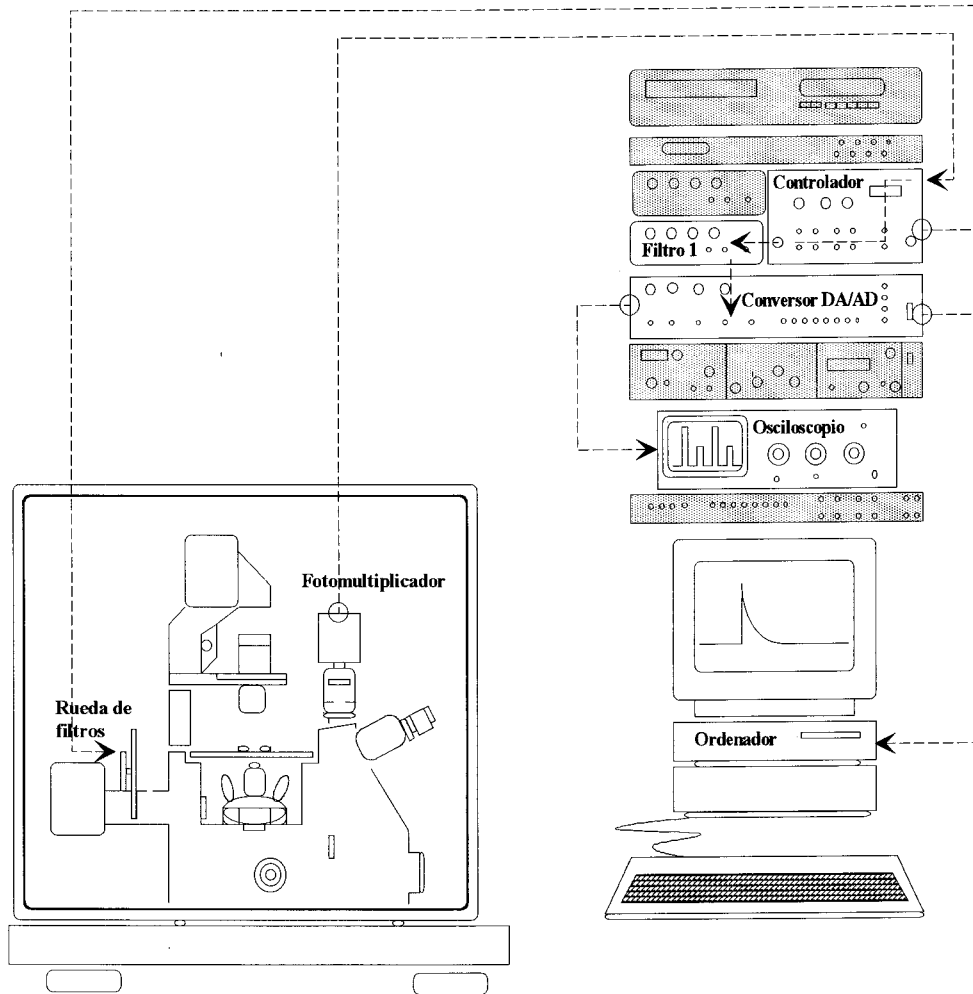


La emisión es independiente de la concentración de calcio a 360 nm, este es el punto isobéptico del fura-2. La intensidad de emisión máxima, por tanto, se desplaza en el espectro de 370 nm a 340 nm cuando una solución libre se satura con calcio. Este desplazamiento permite usar el método de la razón de fluorescencia, que hace la medida de calcio independiente de la concentración del indicador y del tamaño de la célula (Grynkiewicz, 1985).

## **2.2. Equipo de microfluorometría**

El equipo para la medida de la  $[Ca^{2+}]_i$ , está ubicado dentro de una jaula de Faraday la cuál esta cubierta con un paño opaco para evitar interferencias de la luz ambiental. Además de una cámara de registro, sistema de perfusión y mesa antivibratoria (Micro-g, TMC, EE.UU.) el dispositivo experimental (**Figura 13**) está compuesto por:

- a) Un microscópio invertido (Zeiss, Axiovert 35) dotado con epifluorescencia, que utiliza una lámpara de xenón (XBO 75 W/2) como fuente de luz para excitación.
- b) Un juego de filtros de excitación (Optisk Laboratories, Lyngby, Dinamarca), de emisión y espejo dicróico, además de un diafragma en la vía de excitación y otro en la de emisión.
- c) Un fotomultiplicador (Luigs & Neumann, Alemania) donde se transduce la emisión de fluorescencia en señal eléctrica, con una fuente de alto voltaje, y que va montado con un adaptador en C al microscopio, lo que permite que toda la luz pase hacia el fototubo o hacia el binocular, o parte hacia uno y hacia otro.



**Figura 13.** Dispositivo experimental empleado en microfluorimetría para el registro de señales de  $\text{Ca}^{2+}$ . (Tomado de Marín A., 1995).

- d) Una unidad denominada controlador que alimenta el fotomultiplicador, procesa la señal procedente de este y controla el movimiento de una rueda donde van ubicados los dos filtros de excitación.
- e) Una interfase (Capitola California, Indec, EE.UU) para la adquisición y conversión digital de la señal analógica, acoplada a un ordenador personal (PC/AT).

Para optimizar la configuración óptica del sistema, se debe lograr la máxima emisión de fluorescencia empleando la mínima intensidad de excitación. Esta respuesta depende de las características de los filtros, además de otros factores ópticos. El método de iluminación es denominado de epifluorescencia o de excitación por luz reflejada. Este método consiste en que la luz excitadora llega a la preparación a través del propio objetivo, que actúa como condensador. El mismo objetivo permitió el paso de la luz emitida por el indicador fluorescente hacia el sistema de detección.

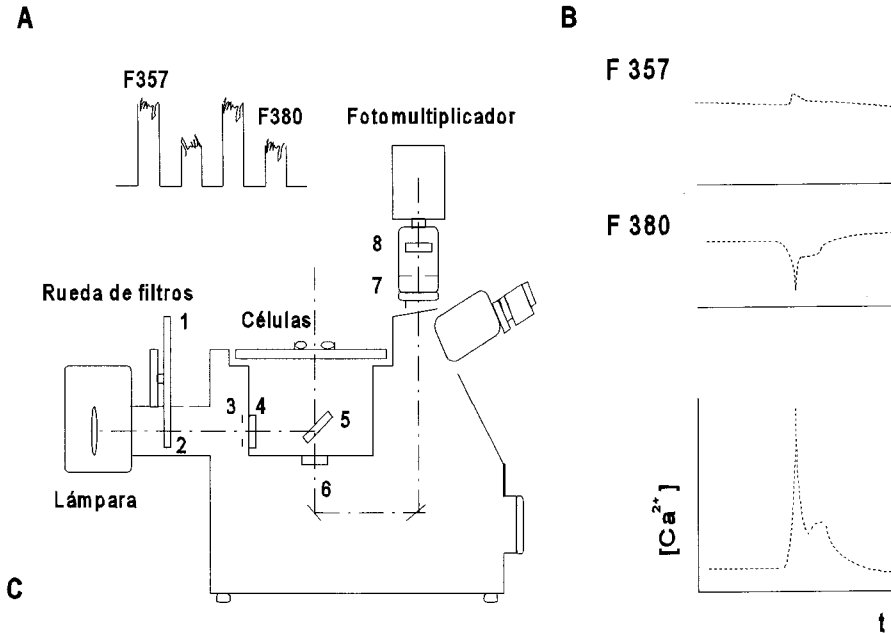
Por medio de un espejo dicróico, situado debajo del objetivo con una inclinación de  $45^\circ$ , se consiguió separar la radiación de emisión y de excitación del colorante. El haz de luz incidente con longitud de onda menor que la de corte del espejo se reflejó, mientras que la de longitud de onda superior a la de corte fue transmitida a través del dicróico. La longitud de onda de corte del dicróico utilizado (BSP 430) fue de 430 nm.

De esta manera la radiación proveniente de la lámpara de excitación que tiene una longitud de onda menor de 430 nm, fue

reflejada y se colocó a través del objetivo en la muestra de estudio. La fluorescencia emitida por la muestra fue, de una longitud de onda mayor que la de excitación, en este caso 510 nm, por lo tanto, es transmitida a través del espejo dicróico y conducida al sistema de registro.

El dispositivo experimental utilizado para la medida de la fluorescencia (**Figura 14**), consta básicamente de una rueda con dos filtros, SPW 357 y BP380/10. La rueda va situada entre la lámpara de xenón y el microscópio, pudiendo generar dos longitudes de onda de excitación, a 357 nm y 380 nm respectivamente. La emisión resultante de la excitación a 380 nm se usó como señal dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . La señal fluorescente necesaria para calcular la razón de fluorescencia se obtuvo a partir de la excitación a la longitud de onda de 357 nm. Adicionalmente, hay un filtro Schott UG1 el cuál proporciona un paso de banda de 380 nm, y está situado entre la rueda y la preparación. El filtro de emisión, LWP 470 es colocado en el porta filtros de epifluorescencia y el filtro SWP 540 a la entrada del fotomultiplicador. Se usó un objetivo Plan-noefluar (Zeiss) x40, con una apertura numérica de 0.75.

La rueda portadora de los filtros de excitación, fue manejada por un controlador, que a su vez recibió la señal eléctrica procedente del fotomultiplicador. El controlador de tres canales de salida, dos de ellos correspondiendo a la señal de cada filtro y otro que midió la “señal de oscuridad” entre el paso de un filtro y otro. El efecto de luz de la habitación, al igual que la autofluorescencia del medio, se cancelaron para cada una de las longitudes de onda, mediante el potenciómetro de cada canal.



**Figura 14.** Dispositivo experimental para la medida de la fluorescencia. **A.** Señal de fluorescencia emitida a dos longitudes de onda de excitación (alrededor de 357 y 380 nm) transducida en señal eléctrica en el fotomultiplicador. **B.** Promedio de la amplitud de cada pulso de voltaje en unidades arbitrarias (salida digital del convertidor A-D) representa la modificación de fluorescencia a 357 nm y 380 nm en función del tiempo tras un estímulo. La intensidad de fluorescencia emitida a 357 nm y 380 nm es directa e inversamente proporcional, respectivamente a la  $[Ca^{2+}]$ . **C.** Vía de iluminación del sistema de epifluorescencia empleado. La rueda de filtros va situada entre la lámpara de xenón y el microscopio y contiene un filtro SWP 357 (1), el filtro BP 380/10 (2) va colocado en la rueda en una posición simétrica a la del filtro SWP 357. El filtro UG 1 va situado en la vía de excitación entre la rueda y la preparación (3). El portafiltros de epifluorescencia es un soporte cúbico que tiene un espejo dicróico (BSP 430), colocado con una inclinación de  $45^\circ$  (5). El filtro de emisión, LWP 470, se localiza en el cubo de filtros de epifluorescencia (6) y otro, SWP 540, a la entrada del fotomultiplicador (7). Se emplearon dos diafragmas, uno en la vía de excitación (4) y otro en la de emisión (8).

### 2.3. Calibración del sistema

El procedimiento utilizado fue la calibración *in vitro*, para el cuál se prepararon soluciones a concentraciones de calcio saturante, medio y bajo, su composición se ilustra en la **Tabla V**. En todos los casos el pH se ajustó a 7.2. La calibración se realizó con fura-2 pentapotasio (Molecular Probes, EE.UU.), a una concentración de 1-10  $\mu\text{M}$ . La relación entre las fluorescencias obtenidas mediante el uso de las dos longitudes de onda excitatorias ( $F^{357} / F^{380}$ ), nos dió como resultado la concentración de calcio citosólico libre de cada célula registrada. Para hallar este valor se empleó el método de la razón de fluorescencia que, obedece a la siguiente ecuación:

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_D \frac{(R - R_{\min})}{(R_{\max} - R)} \beta$$

Las constantes de calibración corresponden a:

$R_{\max}$ : razón de fluorescencia a concentración saturante de  $\text{Ca}^{2+}$

$R_{\min}$ : razón de fluorescencia en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$

R: razón de fluorescencia a una concentración intermedia de  $\text{Ca}^{2+}$

$\beta$ : razón de fluorescencia del fura-2 libre y unido a  $\text{Ca}^{2+}$  a una excitación de 380 nm,  $F_{\min}^{380} / F_{\max}^{380}$ .

$K_D$ : constante de disociación osciló entre 235-265 nM (**Tabla VI**).

**Tabla V.** Soluciones de calibración. Concentraciones en nM.

[Ca <sup>2+</sup> ]	ClK	Cl <sub>2</sub> Ca	EGTA-Ca	EGTA-K <sub>2</sub>	HEPES
Ca <sup>2+</sup> saturante	145	10			10
Ca <sup>2+</sup> 300 nM	145		6.6	3.3	10
0Ca <sup>2+</sup> nominal	145			10	10

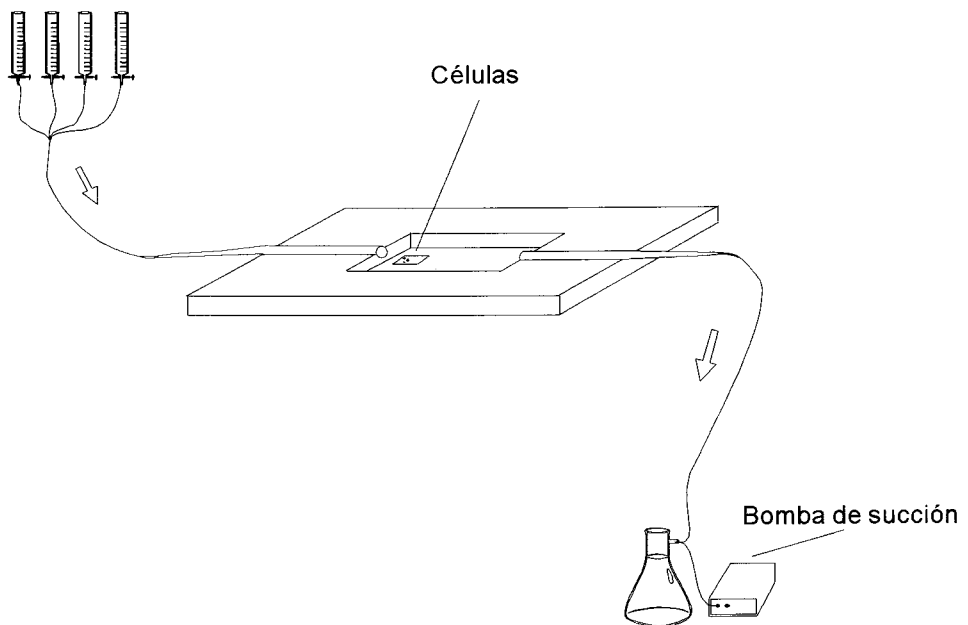
**Tabla VI.** Valores de calibración del sistema.

R <sub>max</sub>	R <sub>min</sub>	R	β	K <sub>D</sub>
2.09	0.1125	0.23	9.09	263
2.3	0.093	0.31	11.53	238.6

#### 2.4. Cámara de registro y sistema de perfusión.

La cámara utilizada en los registros, se construyó a partir de una lámina de metacrilato transparente de 1.5 mm de espesor. Sus dimensiones fueron de 4 X 7 mm, con un volumen de 200 µl. Los fármacos utilizados así como la solución control se mantuvieron en jeringas (50 ml) desde donde eran liberados por medio de la apertura de válvulas conectadas a tubos plásticos (C-flex tubing, T-8413, Sigma) que las transportaban hasta la muestra celular. En la cámara de registro muy cerca de la entrada del tubo que conducía las soluciones, se ubicaba el cubre con las células, opuesto a este sitio se fijó un tubo de drenaje por donde se aspiraba continuamente el líquido sobrante (Figura 15).

Soluciones de registro



**Figura 15.** Esquema de la cámara de registro y del sistema de perfusión empleados en microfluorimetría. Las soluciones control y test fueron continuamente aplicadas por presión hidrostática. El drenaje se realizó por succión hacia un recipiente por medio de una bomba de aspiración. En todos los experimentos se colocó el cubre con las células justo en la entrada del tubo de perfusión.



## **2.5. Proceder experimental**

El primer paso en la preparación del fluoróforo consistió en disolver 1mg de fura-2AM en 1ml de acetona. Posteriormente se distribuyó en alícuotas de 50 $\mu$ l que se introdujeron en una cámara de vacío (GyroVap L, Howe, USA.), donde se evaporó la acetona, quedando el colorante. Este se conservó a -20°C hasta el momento en que se usó dimetilsulfoxido (DMSO) (10  $\mu$ l) para diluirlo.

Previo a cada experimento, las células se incubaron con 2  $\mu$ M de fura-2AM durante 10 minutos. Una vez cargadas las células con el fluoróforo, se tomó el cubre que las contenía y se transportaron a la cámara de registro donde las condiciones de luz fueron compensadas a las longitudes de onda de excitación. Los registros se iniciaron, aplicando alternativamente soluciones control y test, todo a temperatura ambiente.

El transporte de las células hacia la cámara de registro después de la incubación con el fura-2AM, se realizó transfiriéndolas a una solución control donde fueron lavadas y se mantuvieron en esta condición hasta su uso, aproximadamente 10 minutos. Las células restantes permanecieron así durante 1 hora y fueron protegidas de la luz ambiental.

## **2.6. Soluciones de registro.**

La preparación de las soluciones empleadas durante la perfusión celular, se realizó con agua desionizada por osmosis inversa (Milli-Ro

6 Plus, Millipore) en resina de intercambio iónico (Milla-Q Plus, Millipore), con una resistividad de 18 MΩ cm. Las sales fueron suministradas por Sigma.

Después de preparar soluciones concentradas de cada una de las sales, se les midió la osmolalidad con un osmómetro de presión vapor (Weiscor, Utah, EE.UU.), posteriormente, se calculó la concentración real de soluto en cada disolución. A partir de estas soluciones, se obtuvieron las demás soluciones finales y se ajustaron a un pH de 7.3, (MicropH 2002 Crison, Barcelona, España). La osmolalidad de la solución final se mantuvo entre 290 y 310 mOsm/Kg.

La composición iónica de las soluciones empleadas en el registro de las concentraciones de calcio intracelulares se presenta en la **Tabla VII**. Estas soluciones se suplementaron con 5 mM de glucosa (Sigma), y 5 mM de ácido ascórbico (Sigma). En la **Tabla VIII** se presentan los diferentes productos usados en los experimentos y el medio de solubilización empleado.

## **2.7. Adquisición y análisis**

Para el cálculo y representación gráfica de las medidas de calcio libre, se empleó un programa que representa continuamente en la pantalla del ordenador (100 puntos por minuto) las intensidades de las dos longitudes de onda de excitación (unidades arbitrarias) y los valores de  $[Ca^{2+}]_i$  (nM). Estos datos se almacenaron para su posterior medición.

Se utilizó un programa (convert) de análisis para cuantificar la concentración basal de calcio, la amplitud máxima y la duración del transitorio. La aplicación de las sustancias y duración de las mismas (15 s) se indicaron con barras bajo el registro en cada una de las gráficas.

**Tabla VII.** Soluciones de registro. Concentraciones en [mM].

	Control	0Ca <sup>2+</sup> -EGTA	2.5 Ca <sup>2+</sup>	0 Na <sup>+</sup>
<b>CINa</b>	140	140	140	
<b>CIK</b>	2.7	2.7	2.7	2.7
<b>Cl<sub>2</sub>Ca</b>	10		2.5	10
<b>Cl<sub>2</sub>Mg</b>	1	1	1	1
<b>HEPES</b>	10	10	10	10
<b>EGTA</b>		1		
<b>Glucosa</b>	5	5	5	5
<b>Acido Ascórbico</b>	5	5	5	5
<b>Trizma</b>				160

HEPES: ácido 4-[2-hidroxietil]-1-piperacina-etanosulfónico.

**Tabla VIII.** Productos usados en los experimentos.

NOMBRE	ABREVIATURA	DISOLVENTE	REFERENCIA
BENOXATIAN	BENO	AGUA	RBI
BROMOCRIPTINA	BROM	ETOH	RBI
CLOROETILCLONIDINA	CEC	AGUA	RBI
COCAINA	COCA	AGUA	RBI
DESIPRAMINA	DE	AGUA	RBI

NOMBRE	ABREVIATURA	DISOLVENTE	REFERENCIA
DOPAMINA	DA	AGUA / ETOH	SIGMA
ESPIPERONA	ESP	ETOH / AGUA	RBI
ETICLOPRIDA	ETI	AGUA / S. ACIDA	RBI
FENILEFRINA	PE	AGUA	SIGMA
FORSCOLINA	FC	ETOH / DMSO	SIGMA
GBR-12909	GBR	DMSO	RBI
HALOPERIDOL	HALO	ETOH / DMSO	SIGMA
ISOPROTERENOL	ISO	AGUA / ETOH	SIGMA
IMIPRAMINA	IMIP	AGUA	RBI
MELATONINA	MEL	MEOH	RBI
NORADRENALINA	NA	AGUA	RBI
PRAZOSIN	PRAZ	MEOH	SIGMA
PROPRANOLOL	PROP	MEOH / DMSO	RBI
QUINPIROLA	QUINP	SOLUC. ÁCIDA	RBI
RISPERIDONA	RISP	ETOH	RBI
SCH 23390	SCH	AGUA	RBI
SKF38393	SKF	AGUA / ETOH	RBI
TOXINA <i>B. pertussis</i>	PTX	AGUA	RBI
WB-4101	WB	ETOH	RBI

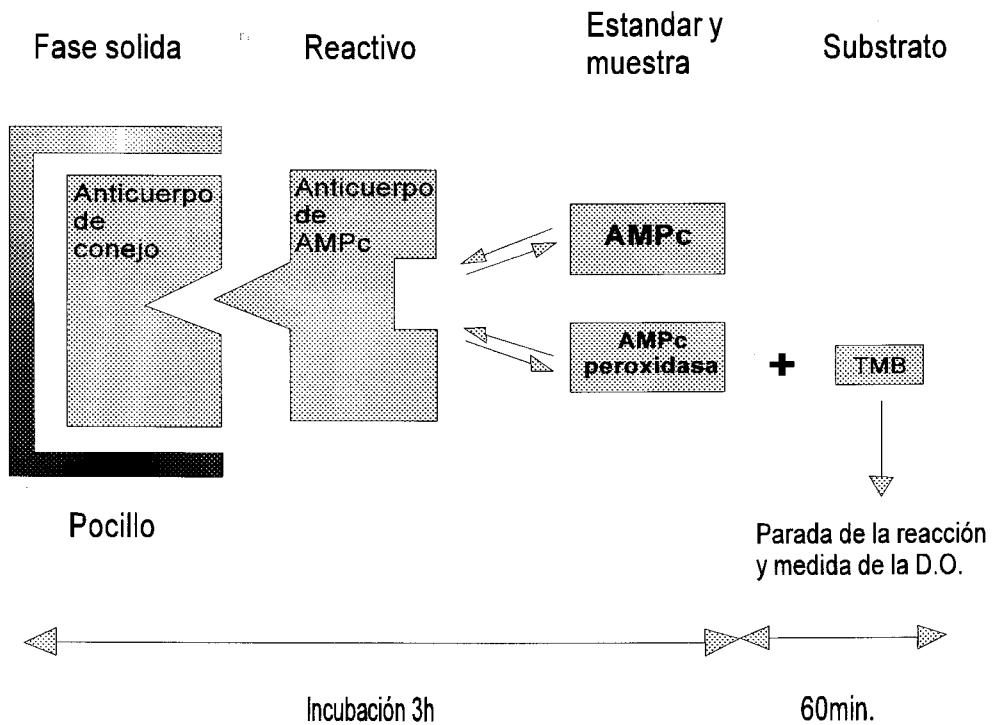
Benoxathian: antagonista  $\alpha_{1c}$   
 Bromocriptina: agonista  $D_2$   
 CEC: bloquea receptores  $\alpha_{1B}$   
 Cocaína: bloquea transportadores de DA  
 Desipramina: bloquea transportadores de norepinefrina.  
 Dopamina: agonista  $D_1/D_2$   
 Espiperona: antagonista  $D_2$   
 Eticloprida: antagonista  $D_2$   
 Fenilefrina: agonista  $\alpha_1 (<1\mu M)$ , agonista  $\alpha$  y  $\beta (>5\mu M)$ .  
 Forscolina: activa la adenilato ciclasa  
 GBR-12909: inhibe transportadores DA  
 Haloperidol: antagonista  $D_1/D_2$

Isoproterenol: agonista  $\beta$   
 Imipramina: bloquea transportadores de serotonina y norepinefrina.  
 Melatonina: activa receptores ML2.  
 Norepinefrina: activa receptores  $\alpha$  y  $\beta$ .  
 Prazosín: antagonista  $\alpha_1$   
 Propranolol: antagonista  $\beta$   
 Quinpirola: agonista  $D_2$   
 Risperidona: antagonista  $D_2$ ,  $5HT_2$  y  $\alpha_{1B}$   
 SKF38393: agonista  $D_1$   
 SCH23390: antagonista  $D_1$   
 Toxina *Pertussis*: bloquea el paso de la forma activa a inactiva de la proteína Gi.  
 WB-4101: antagonista  $\alpha_{1A}$ , agonista  $5HT_{1A}$

### 3. DETERMINACIÓN DE ADENOSINA MONOFOSFATO CÍCLICO (AMPc)

Parte de estos experimentos fueron realizados en el laboratorio del Profesor Alonso Solís en la Universidad de la Laguna, Tenerife, y parte en nuestro laboratorio. El ensayo se basó en la competencia entre AMPc marcado con peroxidasa (AMPc-p) y AMPc no marcado (estandar y muestra) por ocupar un número limitado de sitios de unión de un anticuerpo específico de AMPc. Las cantidades de anticuerpo y AMPc-p fueron constantes, así la cantidad de ligando marcado con peroxidasa unido por el anticuerpo fue inversamente proporcional a la concentración de la muestra o estándar unida por el anticuerpo. Es decir, que a mayor concentración de AMPc-p, menor es la concentración de AMPc presente en la muestra.

El ligando marcado con peroxidasa unido al anticuerpo es inmovilizado sobre los pocillos de la microplaca los cuales traen un segundo anticuerpo (fase sólida) como se ilustra en la **Figura 16**, así los ligandos no unidos pueden ser removidos del pocillo por un simple procedimiento de lavado. La cantidad de AMPc-p unido por el anticuerpo es determinada por la adición de TMB (sustrato de la peroxidasa), cuya reacción genera un color azul, el cuál tras la adición de una solución ácida se torna amarillo, para ser leído a 450 nm en un espectrofotómetro.



**Figura 16.** El ensayo se fundamenta en la reacción antígeno-anticuerpo. El primer anticuerpo permanece inmóvil dentro de los pocillos de la placa (fase sólida o fija) donde se une el segundo anticuerpo específico para AMPc. La cantidad de AMPc-p unido por el anticuerpo es determinada por la adición de TMB y es inversamente proporcional a la concentración de ligando no marcado unido por el anticuerpo.

### **3.1. Medida de AMPc por enzima inmunoensayo (EIE)**

La medida de AMPc se realizó por medio de Enzima-Inmuno Ensayo (EIE) (RPN 225, Biotrak, Amersham). El AMPc se midió en el rango de 12.5 a 3200 fmol/pocillo con el procedimiento no acetilado que permitió elaborar una curva estandar de calibrado y medir 36 muestras por duplicado. El kit lo constituyeron los siguientes elementos:

Microplaca de 96 pocillos, recubiertos con anticuerpos para IgG de conejo (fase sólida).

AMPc marcado con peroxidasa (AMPc-p).

AMPc estandar (AMPc) [32 pmol/ml] para ensayo no acetilado.

Anticuerpos específicos para AMPc.

Sustrato de la enzima TMB (tetrametilbenzidina)/hidrógeno peroxidasa.

Tampón del ensayo (acetato de sodio), y tampón de lavado (fosfato).

La reconstitución de los reactivos y estándares se realizó con agua desionizada, a temperatura ambiente y en todos los casos fueron mezclados antes de ser usados.

### **3.2. Proceder experimental**

En cada experimento se emplearon 36 ratas macho de 25 días de edad de la cepa Wistar, sometidas a un ciclo luz oscuridad 12:12. Se decapitaron sin anestesia y se les extrajo la glándula pineal, que

posteriormente se dispersaron según protocolo (ver apartado 1.3). Se sembraron de 150.000 a 200.000 células por placa, lo que equivale a una relación de 1 a 1,5 glándulas por placa aproximadamente y se llevaron al incubador durante 24 horas, tiempo necesario para la recuperación de sus membranas. Antes de la siembra las placas fueron tratadas con Poly-D-lisina (0.1 mg/ml).

### **3.3. Disposición de grupos experimentales**

El protocolo de estimulación presenta un tiempo cero a partir del cual se adicionó IBMX (3-isobutil-1-metilxantina) a una concentración final en placa de 0.1 mM, para impedir la degradación enzimática del AMPc. La estimulación con drogas se inició 60 min después del IBMX, las placas se mantuvieron a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. En el minuto 95 se inició la recolección de las células, se adicionó 200 µl del tampón del ensayo que contiene ácido acético y timerosal que contribuye a destruir las membranas celulares e inhibir las fosfodiesterasas. Con ayuda de una paleta plástica se removieron todas las células y se depositaron en los eppendorfs correspondientes a cada placa, posteriormente se almacenaron a -80 °C. Transcurridas 24 horas se descongeló el homogenado al baño de maría a 100 °C durante 4 min, para degradar la fosfodiesterasa. Para terminar de romper las membranas celulares, las muestras se sonicaron durante 15 s a 20 KHz (Sonic & Materials Inc. Vibra Cell. Danbury. USA.), teniendo cuidado en mantener limpio el eje del sonicador y lavarlo con agua destilada cada vez que se cambió de muestra.



Los reactivos del ensayo se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15 min aproximadamente, para que su acción fuera óptima en el momento de su uso. Las dos primeras filas de la microplaca (A y B 1-12) permiten la elaboración de la curva de calibrado mediante la preparación de diluciones progresivas (12.5 a 3200 fmol) de AMPc-p a partir de la solución estandar concentrada. Posteriormente, se adicionaron las muestras (100  $\mu$ l) en los pocillos restantes (C-H, 1-12) junto con el antisuero (anti-AMPc) (100  $\mu$ l). Se cubrió la placa, cuidadosamente se mezcló y se incubó de 3-5 °C durante 2 h, tiempo suficiente para la fijación del AMPc de la muestra. Transcurrido este período de incubación, se adicionó el AMPc-p (100  $\mu$ l) (1 h) con el propósito de ocupar los sitios de unión libres. Posteriormente se aspiró el contenido de cada pocillo y se lavaron cuatro veces con 400  $\mu$ l de tampón fosfato para retirar los anticuerpos no unidos a la fase sólida, e inmediatamente se adicionó el TMB sustrato de la peroxidasa (150  $\mu$ l), se incubó a temperatura ambiente, agitando continuamente y durante 1 h, tiempo en el que la reacción con la peroxidasa le confirió un color azul. Tras la adición de ácido sulfúrico [1M] (100  $\mu$ l) cambió su color a amarillo, lo que permitió determinar la densidad óptica de cada pocillo a 450 nm por medio del lector de placa.

### **3.4. Adquisición y análisis**

El equipo utilizado para determinar los valores de densidad óptica (D.O.) a 450 nm, fue el lector de placa Mios, DMPL/CP/0592, software versión 3.7, Merck. Se calculó la media de la densidad optica y el porcentaje de uniones del estandar de cada muestra mediante la

siguiente ecuación:

$$\% \frac{B}{B_0} = \frac{(D.O. \times \text{estandar ó muestra} - D.O. \times \text{NSB})}{(D.O. \times B_0 - D.O. \times \text{NSB})} \times 100$$

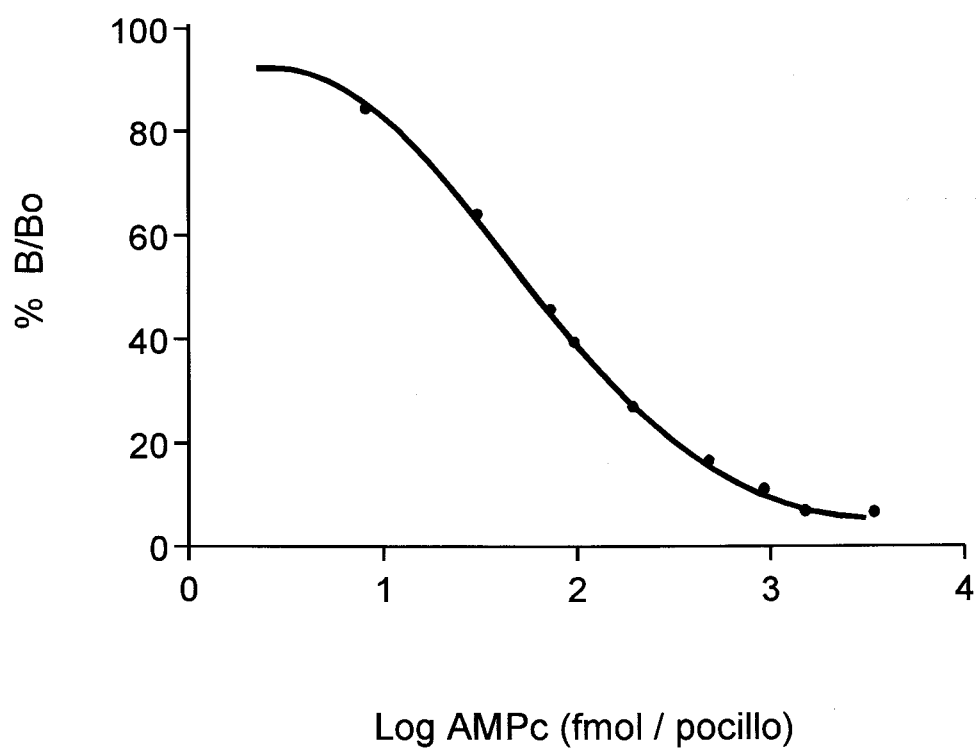
B = uniones de AMPc. (estandar y muestra)

B<sub>0</sub> = uniones de AMPc-p

NSB = non standard binding (uniones no específicas)

D.O. = densidad óptica

La curva estandar fue calculada tomando el porcentaje de B / B<sub>0</sub> en función del logaritmo de la concentración de AMPc. Como los valores de D.O. disminuyen a medida que la concentración de AMPc incrementa, la curva de calibración describe una sigmoide decreciente (Figura 17.).



**Figura 17.** Curva estándar de calibrado para AMPc.

#### 4. DETERMINACIÓN DE INOSITOLES FOSFATOS (IPs)

Estos experimentos se realizaron en el laboratorio del Prof. Alonso Solís en la Universidad de La Laguna, Tenerife. La determinación de inositoles fosfatos totales (IPs) se realizó por medio de inositol marcado con tritio. Las células pineales se incubaron durante 12 horas con *myo*-[2-<sup>3</sup>H]-inositol ([<sup>3</sup>H]-Is) (TRK911 B32, Amersham), el cuál se incorporó al metabolismo celular como fosfatidil [<sup>3</sup>H]-inositol 1,4,5 difosfato ([<sup>3</sup>H]-PIP<sub>2</sub>) de cuya degradación enzimática se obtuvo la acumulación de inositoles fosfatos ([<sup>3</sup>H]-IPs) totales. La emisión de radiaciones beta registradas en cada muestra, indicó la concentración de inositoles fosfatos presentes.

Para la determinación de [<sup>3</sup>H]-IPs se utilizaron columnas de resina de intercambio iónico, un contador de radiaciones beta, líquido de centelleo (fórmula-989, NEF-989, Dupont) y tubos de centelleo (3071401, E&G División Instruments, Barcelona). La medida consistió en determinar el número de cuentas por minuto por placa (Ci/placa) registradas por el contador de radiaciones beta. Una vez programado el equipo de registro se leyeron las muestras durante cinco minutos aproximadamente.

##### 4.1. Proceder experimental

Se usaron 68 ratas macho, Sprague-Dawley de 25 días de edad, sometidas a un ciclo luz-oscuridad 12:12. Se decapitaron y se realizó la extracción y dispersión de las glándulas pineales (ver apartados 1.2 y 1.3.). Las células, una vez adheridas a la superficie de las placas

tratadas con polilisina, se incubaron con [<sup>3</sup>H]-Is de modo que la concentración final fue de 3μCi/placa. El tiempo de incubación que fue de 12 horas, se controló rigurosamente, de lo contrario el [<sup>3</sup>H]-Is podría incorporarse de forma significativa a otras rutas del metabolismo celular, lo que llevaría a una interpretación errónea de los resultados.

Para obtener una alta sensibilidad en el ensayo, se sembró de 250.000 a 300.000 células por placa. Una densidad menor de células daría lugar a que la incorporación de [<sup>3</sup>H]-Is fuera muy baja y, por consiguiente, no se tendría suficiente cantidad de [<sup>3</sup>H]-IPs para ser detectado por el equipo. Igualmente, para obtener la radioactividad de base presente en el medio, se tomó una alícuota de 4 μl de medio de cultivo marcado y se le adicionó 4 ml de líquido de centelleo, el valor resultante se sustrajo de los valores obtenidos de las muestras.

#### **4.2. Estimulación dopaminérgica**

Finalizado el tiempo de incubación con [<sup>3</sup>H]-Is, se llevaron las células a una solución de cloruro de litio [10 mM] donde se mantuvieron durante 10 min, para inhibir la acción de las fosfatasas responsables de la degradación de los [<sup>3</sup>H]-IPs. Posteriormente se estimularon las células con DA (50 μM), fenilefrina (1 μM) y espiperone (10 y 100 nM) durante 60 min. La acumulación de [<sup>3</sup>H]-IPs se midió en función del tiempo de exposición a DA y de su concentración, (ver resultados).

La recolección de las células se realizó colocando las placas en hielo y aspirando el medio de cultivo, se lavaron dos veces con PBS

a 37 °C y se adicionó 1 ml de metanol frío removiendo la superficie de la placa con una paleta plástica, todo esto rápidamente para evitar la evaporación del alcohol. Las células se tomaron con una pipeta de 1 ml y se llevaron a tubos de 3 ml con cierre hermético que se almacenaron a 3 °C.

### **4.3. Extracción y purificación de los [<sup>3</sup>H]-IPs**

El proceso de extracción y purificación de los [<sup>3</sup>H]-IPs, se llevó a cabo separando los fosfolípidos por medio de etanol, para ello se adicionó 0.5 ml de agua ultra pura (pH=7) con 1 ml de cloroformo y se agitó vigorosamente. Luego se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min para conseguir una separación en tres fases, este paso se repitió para eliminar restos de cloroformo con [<sup>3</sup>H]-fosfolípidos, ya que la cantidad de radioactividad presente en los fosfolípidos es muy alta y podría alterar considerablemente los resultados.

Se pasó 2.5 ml de la fase acuosa a través de las columnas de resina de intercambio iónico, en las que se fijaron en su superficie los [<sup>3</sup>H]-IPs. Para su elución se empleó ácido fórmico [0.1 M], formiato amónico [1 M] y se recogieron directamente en los tubos de centelleo. A lo obtenido se le adicionó 10 ml de líquido de centelleo y finalmente se procedió a cuantificar la radioactividad en un contador de radiaciones beta con 5 minutos de lectura por muestra.

## 5. CLONADO DEL ADN COMPLEMENTARIO (ADNc)

Estos ensayos se realizaron en el laboratorio del Profesor López Barneo. En el presente trabajo se emplearon diferentes técnicas básicas de biología molecular. Estas metodologías se usaron con el propósito de aproximarse a las características moleculares de la proteína que media el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  en células pineales de rata, tras la aplicación de dopamina.

La manipulación del ADN por medio de técnicas como la polimerización en cadena, más conocida con la sigla PCR (Polymerase Chain Reaction), permite en algunas horas, ampliar millones de veces cualquier fragmento de material genético. Su utilización requiere conocer previamente los extremos de la secuencia que se desea ampliar.

La obtención del ADNc de células pineales de rata, se logró por medio de Transcriptasa Inversa (RT de la sigla en inglés Reverse Transcriptase) a partir del ARNm, que sirvió de molde para la amplificación por PCR (RT-PCR), (ver mas adelante). En general, el proceso incluyó la selección de oligonucleótidos, amplificación por PCR, transformación en bacterias *Escherichia Coli*, secuenciación y comparación en una base de datos. Los pasos señalados en este proceso son detallados a continuación.

### 5.1. Extracción del ARN

Se utilizaron 25 ratas macho de la cepa Wistar de 100 g de peso

aproximadamente y 25 días de edad. Tras la obtención de las glándulas pineales (ver apartado 1.2) se homogenizó el tejido (Omni International, Inc. Gainesville) y se procedió a la extracción del ARN, mediante el método de tiocianato de guanidina y una purificación posterior con fenol/cloroformo (Sambrook, et al., 1989). El tiocianato [4M] inhibe las ARNasas y la adición de acetato de sodio precipita el ARN mayor de 50 bases. El proceso de lisis se logró mediante agentes alcalinos consiguiendo una separación en tres fases; en la fase superior acuosa precipitó el ARN, en la fase intermedia proteínas y en la fase inferior restos de membrana celular; este paso se realizó dos veces. La concentración de ARN se determinó por medio de un espectrofotómetro (DU 640 Beckman USA) a 260 nm y 280 nm, posteriormente se mantuvo la muestra a -80 °C.

## 5.2. Elección de los oligonucleótidos

El primer paso para la elección de los oligonucleótidos (secuencias cortas unicasenarias de nucleótidos) también llamados primers o cebadores, consistió en comparar las secuencias de tres familias de receptores. Los receptores dopaminérgicos ( $D_{1A}$ ,  $D_{1B}$ ,  $D_{2A}$ ,  $D_3$ ), con los alfa-adrenérgicos ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_{2B}$ ) y los beta-adrenérgicos ( $\beta_1$ ,  $\beta_a$ ), que fueron alineados para determinar las regiones más conservadas de sus segmentos transmembranarios.

Para realizar esta comparación se accedió a la base de datos del Centro Informático Científico de Andalucía (CICA), donde está disponible el programa Wisconsin Package Version 9.1, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc., que almacena las secuencias



de las proteínas clonadas hasta el momento. Las secuencias de interés fueron importadas, y alineadas con la herramienta denominada PileUp. (Ver **Figura 43** en Resultados).

Con base en los aminoácidos conservados entre los segmentos transmembranarios III y VI, se diseñaron dos oligonucleótidos degenerados a los que se les asignó el nombre de DOP-1 y DOP-2 de 29 pares de bases de longitud cada uno. Las dianas para las enzimas de corte (restrictasas) están determinados por la secuencia GAATTC para Eco-RI y ATCGAT para ClaI, (**Figura 18**). Los oligonucleótidos se solicitaron al servicio de síntesis de Pharmacia Biotech.

### **5.3. Amplificación por PCR**

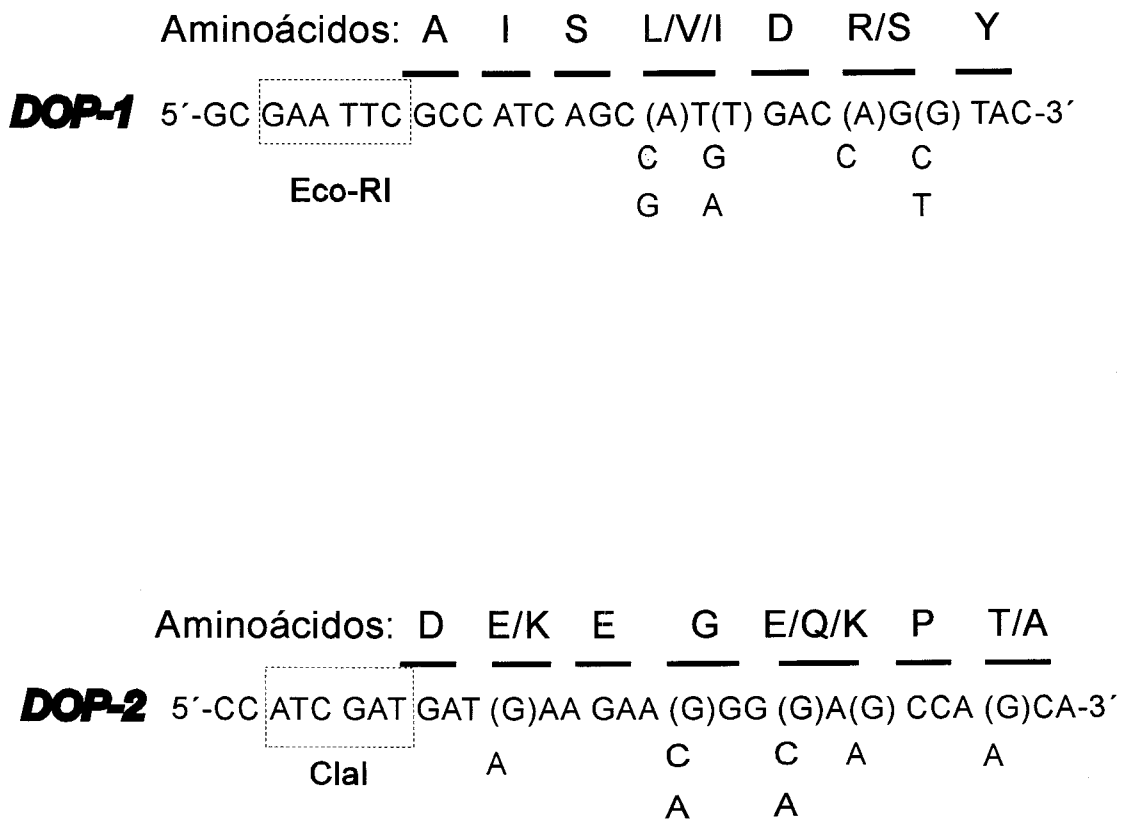
Por medio de PCR, se amplió la muestra de ADNc obtenida del homogenado celular. El procedimiento consistió en la desnaturalización del ADNc aumentando la temperatura de la muestra en presencia de los cebadores en cantidad sobresaturante. Al bajar la temperatura se permitió que los cebadores se unieran al ADNc (de cadena única) y se produjo la replicación de la misma, que tiene lugar desde el extremo 3´OH de cada cebador y siempre en dirección 5´ a 3´. Una vez replicada, se desnaturalizó para permitir de nuevo la unión de los cebadores repitiendo el ciclo. Este proceso se repitió 36 veces durante 3 o 4 horas aproximadamente obteniéndose una alta cantidad de copias de ADNc, (**Figura 19**). El ADN amplificado se analizó por electroforesis en un gel de agarosa para verificar la digestión con enzimas de restricción y determinar el rendimiento de la reacción de PCR (**Figura 20**).

Se comprende que la PCR se efectúe con una polimerasa de ADN resistente al calor, la Taq polimerasa, pues así resiste los sucesivos ciclos a alta temperatura sin perder su actividad. Debe tenerse en cuenta que cuanto más largo es el fragmento a amplificar, mayor es la probabilidad que contenga errores.

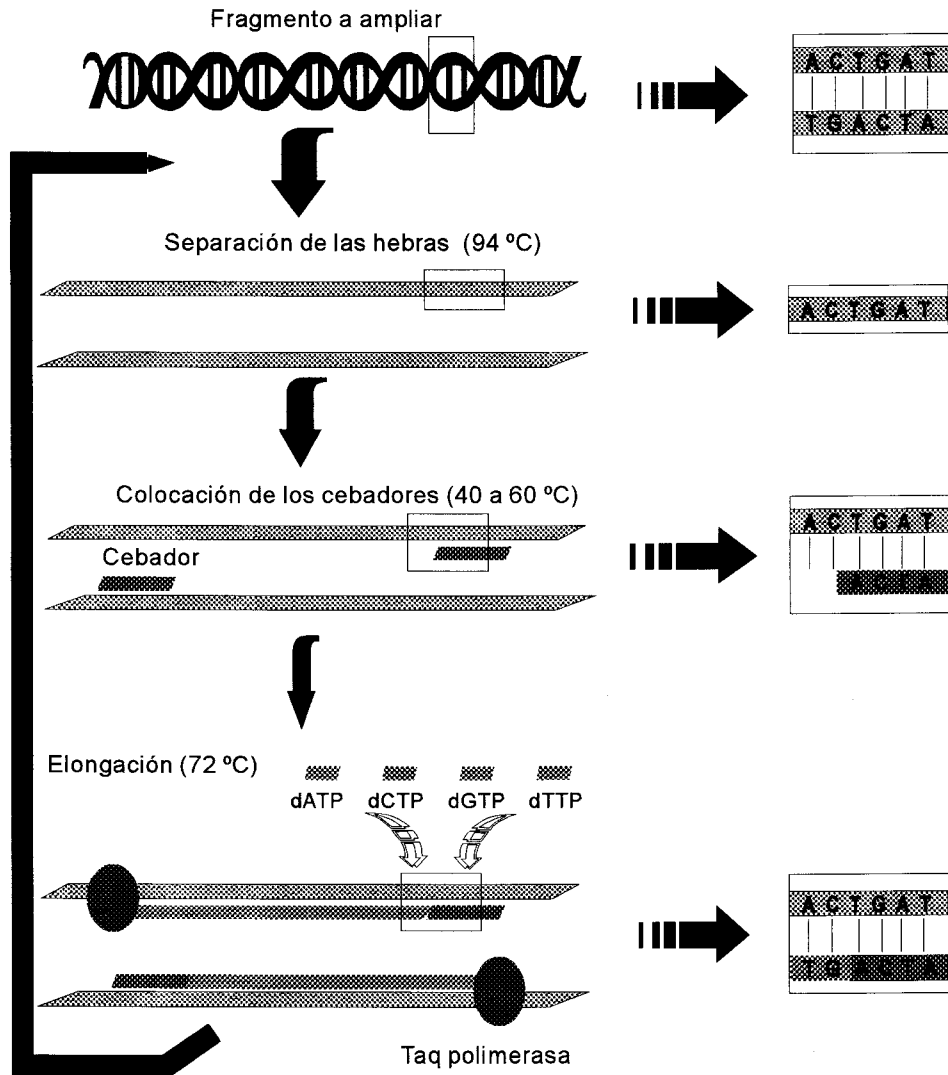
#### 5.4. Subclonado y transformación

El proceso de subclonado en plásmido también llamado de ligazón, se realizó mediante el vector pBluescript SK+/- (PBS) el cuál posee un gen resistente a la ampicilina. El vector se cortó en sitios específicos con enzimas de restricción EcoRI para DOP-1 y ClaI para DOP-2, donde se fijó el ADNc obtenido de la PCR (inserto). La fijación se realizó mediante la acción de enzimas denominadas ligasas, que poseen la capacidad de unir fragmentos de ADN (ADN recombinante), este proceso tardó 1h a temperatura ambiente.

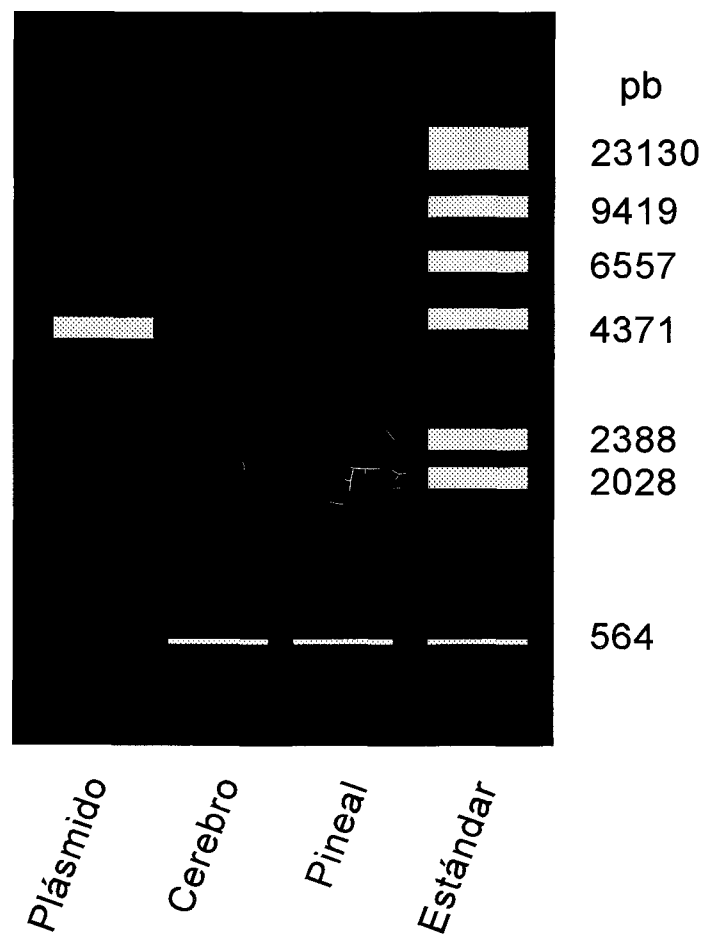
La purificación del ADN amplificado por PCR se realizó mediante las columnas de silica-gel (QIAGEN), donde se excluyeron posibles contaminantes como dímeros de cebadores, cebadores, dNTPs y sales. En la transformación se usó la cepa bacteriana *E. Coli* DH5 $\alpha$  por poseer baja tasa de recombinación genética y un corto ciclo celular. Esta cepa fue competente, es decir que tuvo la capacidad de incorporar el ADN plasmídico cuando se sometió al choque térmico pasando de 4 °C a 42 °C durante 1 min, lo que generó pequeños agujeros en la membrana celular bacteriana por donde ingresó dicho ADN. Las bacterias se cultivaron durante 15 horas en medio con antibiótico, tiempo en el cuál se amplificó el plásmido tras los



**Figura 18.** Esquema de la secuencia de los oligonucleótidos degenerados. Las dianas para las restrictasas Eco-RI (DOP-1) y Clal (DOP-2) son señaladas por los recuadros. Las degeneraciones se indicaron escribiendo dos o más letras para la misma posición.



**Figura 19.** La reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El ADN a ser amplificado se desnaturaliza calentando la muestra. Luego se disminuye la temperatura para que los cebadores se hibriden específicamente a la secuencia blanco. Se aumenta la temperatura hasta tener las condiciones óptimas de trabajo para la ADN polimerasa, la cuál con los deoxinucleótidos (dNTPs) realiza la primera síntesis del ADN. El producto de este primer ciclo se acumula exponencialmente con cada ciclo de amplificación posterior.



**Figura 20.** Resultado de la electroforesis de ADNc amplificado en un gel de agarosa.

sucesivos ciclos de división celular. Por medio de un gel de agarosa se comprobó que estaba presente la banda que correspondía tanto al plásmido (4300 pb) como al inserto (500 pb), (ver resultados).

Las bacterias se sembraron en placas de petri con glucosa y ampicilina donde sobrevivieron aquellas colonias que fueron resistentes al antibiótico, es decir aquellas que incorporaron el vector. Se tomaron muestras de las colonias crecidas (n=10 de pineal y n=10 de corteza cerebral) y se lisó muy suavemente el cultivo mediante tratamiento alcalino, abriendo en la membrana plasmática bacteriana agujeros pequeños que dejaron escapar el ADN plasmídico recombinante de *E. coli*. Para producir una lisis suave, las mezclas se hicieron por inversión para evitar destruir la membrana plasmática. Una vez obtenido, el ADN plasmídico se resuspendió en tampón TE (Tris-HCl, EDTA), comprobando siempre su concentración midiendo la absorbancia a 260 nm así como su limpieza calculando la relación de absorbancias entre 260 nm y 280 nm. La muestra de ADN se almacenó a una temperatura de -80° C.

### 5.5. Secuenciación

En este paso se utilizó el kit de secuenciación de ADN versión 2.0, código US70770 de Amersham. El análisis del ADN ampliado se realizó directamente por electroforesis, que consistió en hacer migrar el ADN en una placa de gel de poliacrilamida bajo la acción de un campo eléctrico, de este modo las moléculas se separaron en función de su tamaño. La secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN amplificado pudo determinarse una vez revelada la placa fotográfica.

La preparación del gel se hizo con una solución de acrilamida al 6.5 %, urea y tampón TBE (Tris, Boric acid y EDTA). Los cristales destinados para la electroforesis se limpiaron a fondo con alcohol al 100 %, este fue un factor crítico para el correcto funcionamiento de la técnica. Una vez polimerizado el gel se procedió a descongelar las muestras de ADN marcadas con azufre radiactivo dATP ( $^{35}\text{S}$ ), y se adicionó de 2 a 3  $\mu\text{l}$  en cada casilla del gel teniendo en cuenta el orden de aparición de los nucleótidos (G A T C) previamente establecido.

El gel con el material genético se expuso a un campo eléctrico mediante una fuente de voltaje (EC600, E-C Apparatus corporation), con lo cual inició el desplazamiento de las muestras hacia el polo positivo de la placa, proceso que tardó aproximadamente dos horas. Una vez concluido este paso se procedió al secado al vacío del gel (Gel Dryer, Model 583, Bio-Rad) durante 1 hora, y a continuación se colocó sobre una placa fotográfica para ser impresionada por las emisiones del isótopo radiactivo ( $^{35}\text{S}$ ) durante las 12 horas siguientes.

La placa se reveló mostrando los sitios de presencia de radioactividad que fueron leídos cuidadosamente, estableciendo el orden de aparición de los nucleótidos. Se transcribieron por triadas a la base de datos del GenBank donde por medio del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) se compararon las secuencias obtenidas con las de receptores dopaminérgicos y adrenérgicos.

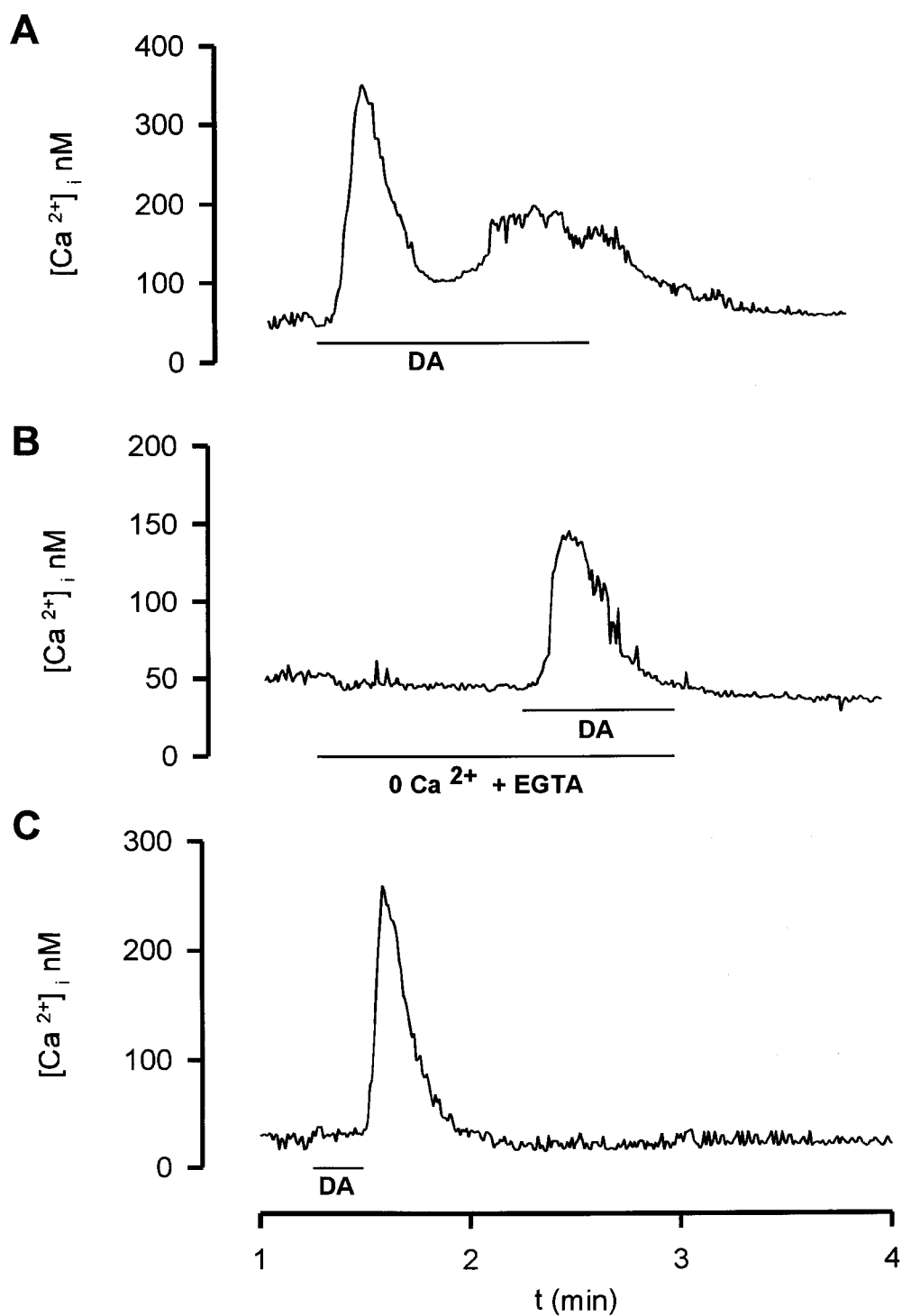
## RESULTADOS

### 1. EFECTO DE CATECOLAMINAS SOBRE EL CALCIO CITOSÓLICO

#### 1.1. La DA induce un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ con un curso temporal bimodal

La aplicación extracelular de DA indujo modificaciones transitorias de los niveles basales del calcio citosólico libre en la célula pineal. En la **Figura 21A** se ilustra un ejemplo representativo del efecto de la aplicación de DA sobre la  $[Ca^{2+}]_i$ , medido en una única célula y utilizando una concentración de  $Ca^{2+}$  extracelular fisiológica. Desde una  $[Ca^{2+}]_i$  en reposo de 50 nM y tras una latencia de ~15 s del comienzo de la aplicación, el nivel de calcio citosólico aumentó hasta alcanzar un valor máximo de 350 nM, tras lo cuál fue decreciendo de forma rápida. Antes de retornar al nivel basal, sin embargo, se produjo una segunda elevación transitoria de  $Ca^{2+}$  citosólico en forma de meseta. La duración de la meseta dependió directamente de la duración de la aplicación del neurotransmisor, no produciéndose con aplicaciones cortas (< 15 s) (**Figura 21C**).





**Figura 21.** Modificaciones de la  $[Ca^{2+}]_i$  tras la aplicación externa de DA ( $5 \mu M$ ). **A.** Registro en presencia ( $2.5 \text{ mM}$ ) de  $Ca^{2+}$  extracelular. **B.** Registro en ausencia de  $Ca^{2+}$  extracelular ( $0 \text{ Ca}^{2+}$ ) con EGTA ( $1 \text{ mM}$ ). **C.** Registro de corta aplicación del estímulo.

## 1.2. Liberación de $\text{Ca}^{2+}$ de almacenes intracelulares y entrada de $\text{Ca}^{2+}$ desde el medio externo

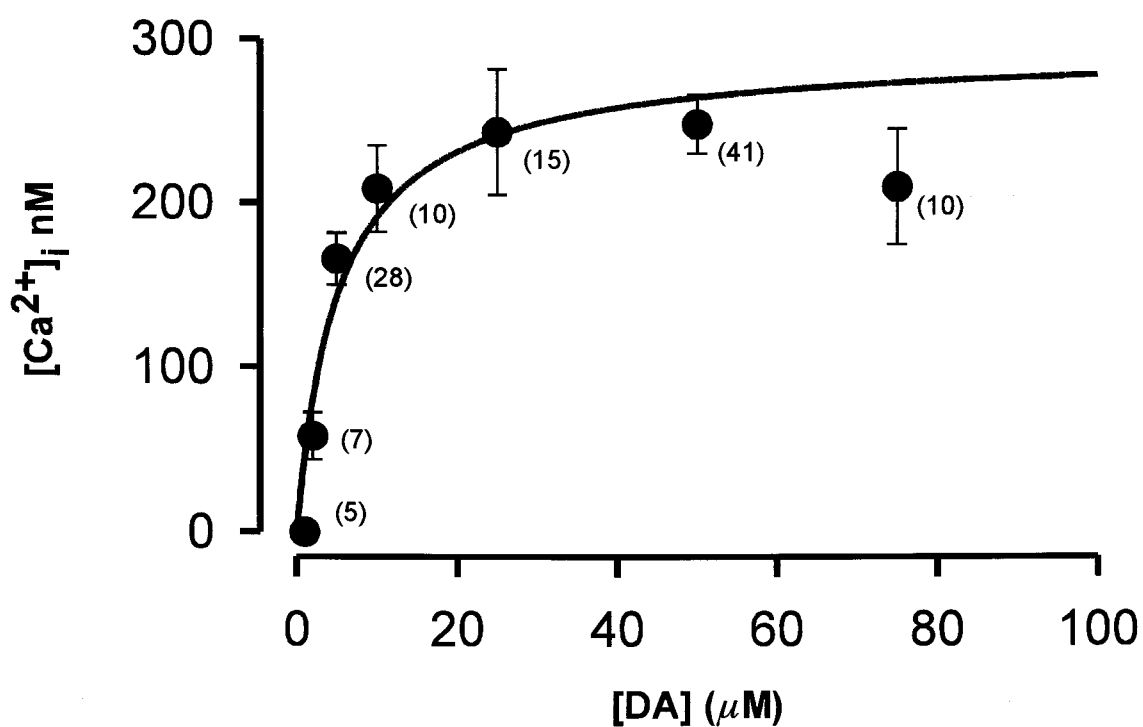
En ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular ( $0 \text{ Ca}^{2+}$ ), la aplicación de DA produjo una elevación transitoria monofásica de los niveles de calcio citosólico ( $n=8$ ) con un curso temporal similar al primer componente de la respuesta en solución control, tal y como se muestra en el ejemplo de la **Figura 21B**. Estos datos sugieren que el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por DA en presencia de calcio extracelular se debe a la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los reservorios intracelulares (primer transiente) y a la entrada de calcio desde el medio externo (fase de meseta).

## 1.3. Curva dosis-respuesta [DA]-[ $\text{Ca}^{2+}$ ]

La amplitud del transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a concentraciones de DA comprendidas entre 2 y 75  $\mu\text{M}$  se estudió en un total de 116 células. Las amplitudes medias de las respuestas obtenidas a las distintas concentraciones de DA se representan en la **Figura 22**. Los valores experimentales se ajustaron a la función de Michaelis-Menten de tipo

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = [\text{Ca}^{2+}]_{i_{\max}} \frac{[\text{DA}]}{[\text{DA}] + K_d}$$

donde  $[\text{Ca}^{2+}]_{i_{\max}}$  representa la amplitud máxima promedio de las espigas a concentraciones saturantes de DA, y  $K_d$  la concentración de DA a la que se alcanzó la mitad de la amplitud máxima.



**Figura 22.** Relación entre la concentración de DA y el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Media y error estándar de las amplitudes de los incrementos de  $[Ca^{2+}]_i$  para concentraciones de 2, 3, 5, 10, 25, 50, 75  $\mu M$  de DA ( $n=116$ ). Los datos se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten, con una  $K_d = 5 \mu M$ .

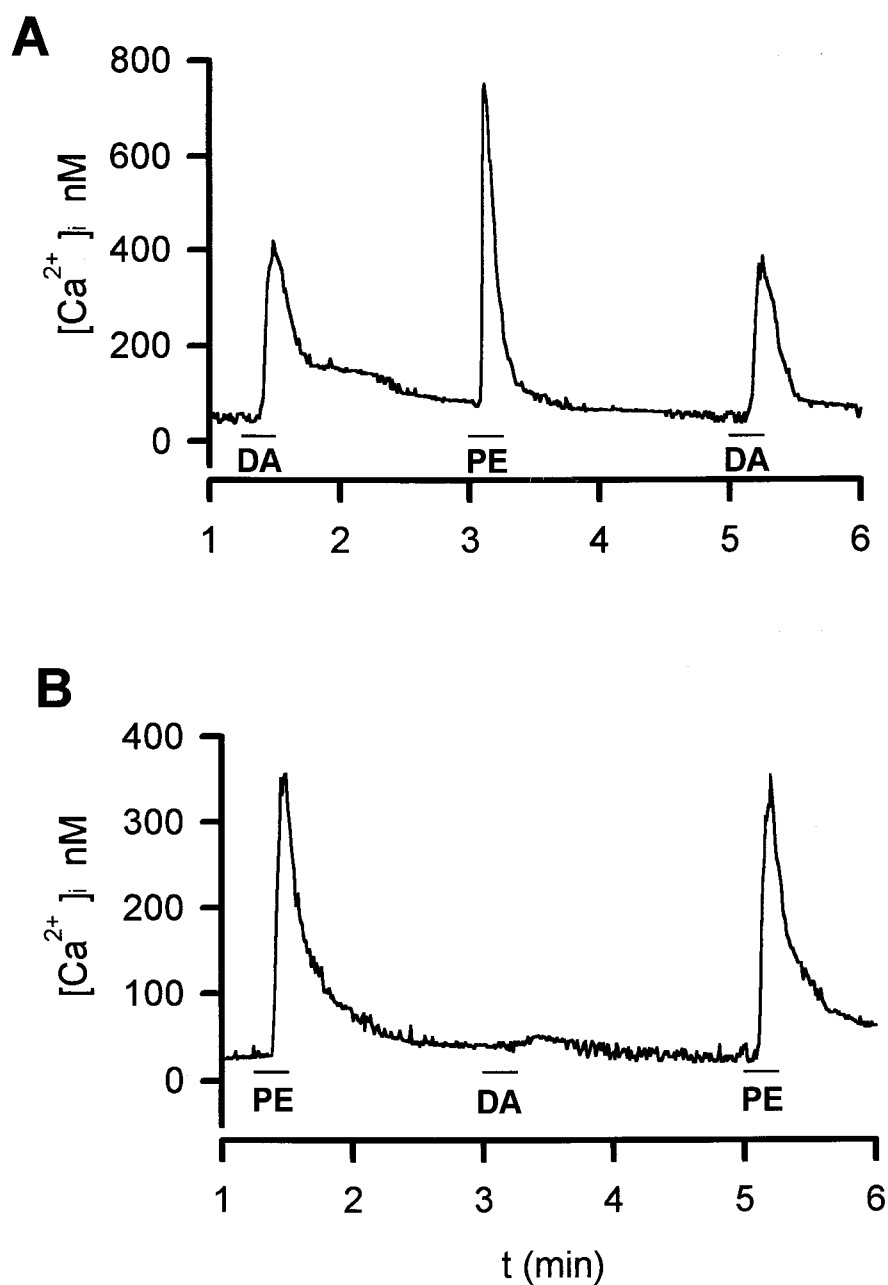
El rango dinámico de concentraciones donde se obtuvo respuesta gradual fue de 3 a 10  $\mu\text{M}$  DA. Concentraciones  $< 3 \mu\text{M}$  fueron con frecuencia ineficaces para inducir transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  mientras que concentraciones  $>10 \mu\text{M}$  produjeron incrementos  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  próximos a niveles máximos. El valor estimado de  $K_d$  fue 5  $\mu\text{M}$ .

#### 1.4. Incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidos por DA y fenilefrina.

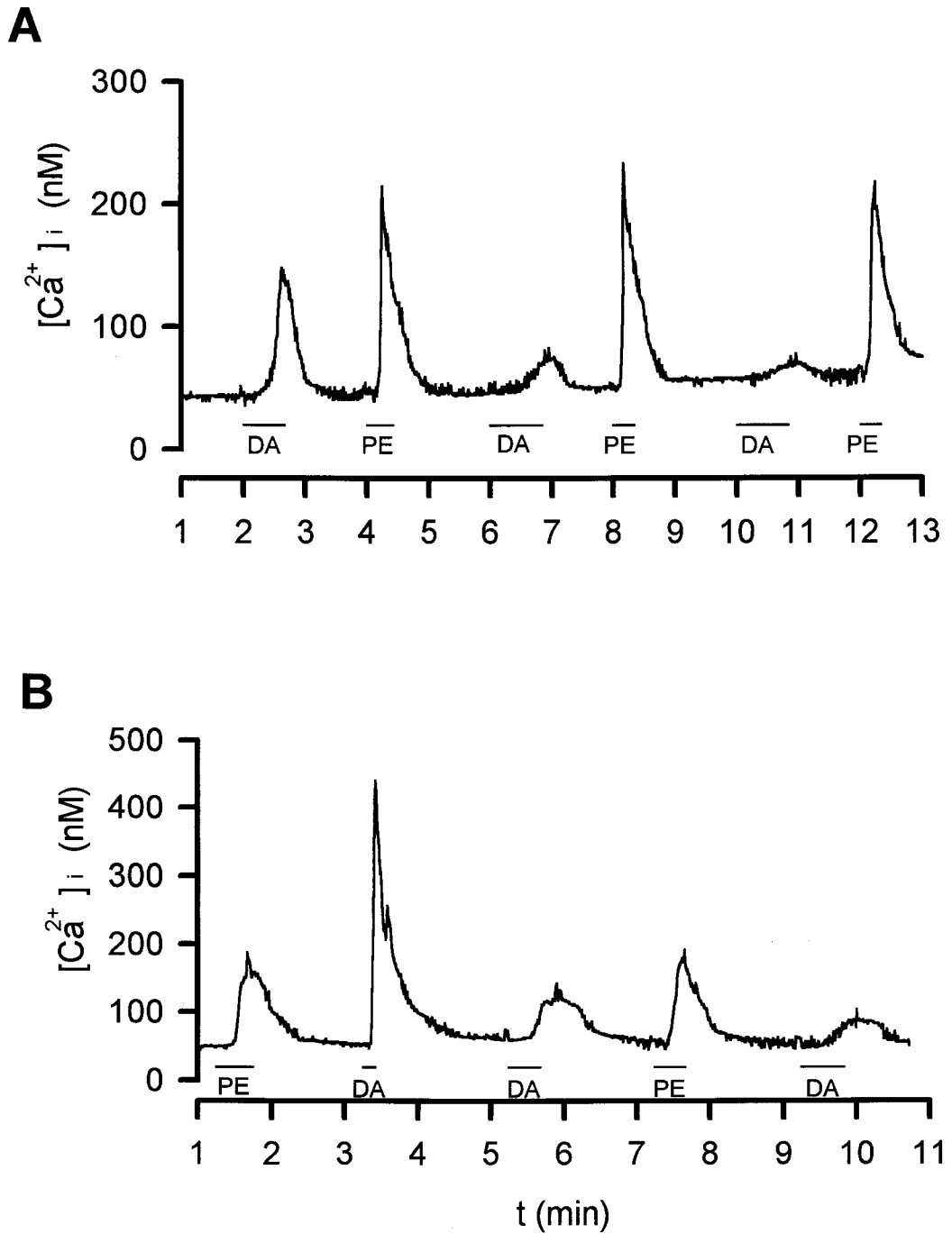
Las características de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por la aplicación de DA fue muy similar a la obtenida en estas mismas células con fenilefrina o noradrenalina (Marín *et al.*, 1996), es decir, un transiente rápido seguido de una fase de meseta de duración variable.

La mayoría de las células respondieron a la aplicación tanto de DA como de fenilefrina (**Figura 23, A**), aunque en aproximadamente el 20% de los experimentos hubo células que fueron sensibles a fenilefrina y no a DA (**Figura 23, B**). El porcentaje de células no sensibles a DA varió entre distintos cultivos llegando a ser en algunos experimentos hasta del 100%.

En las células sensibles a DA y fenilefrina, la aplicación repetida de estos neurotransmisores a concentraciones saturantes tuvo efectos distintos en las sucesivas amplitudes de las respuestas. Mientras que las amplitudes de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  generados por fenilefrina decrecieron ligeramente con las sucesivas aplicaciones de esta droga, las respuestas a DA decrecieron de forma mucho más rápida, independientemente de la secuencia en que se aplicaron los distintos neurotransmisores (**Figura 24, A y B**). Estos resultados muestran una



**Figura 23.** Distinta sensibilidad a la aplicación de DA y fenilefrina en dos células. **A.** Célula sensible a DA (5  $\mu$ M) y fenilefrina (1  $\mu$ M). **B.** Célula sensible a fenilefrina pero no a DA (iguales concentraciones que la célula en A).



**Figura 24.** Desensibilización de las respuestas de  $Ca^{2+}$  ante aplicaciones sucesivas de DA (50  $\mu M$ ) y fenilefrina (1  $\mu M$ ) en dos células (A y B).

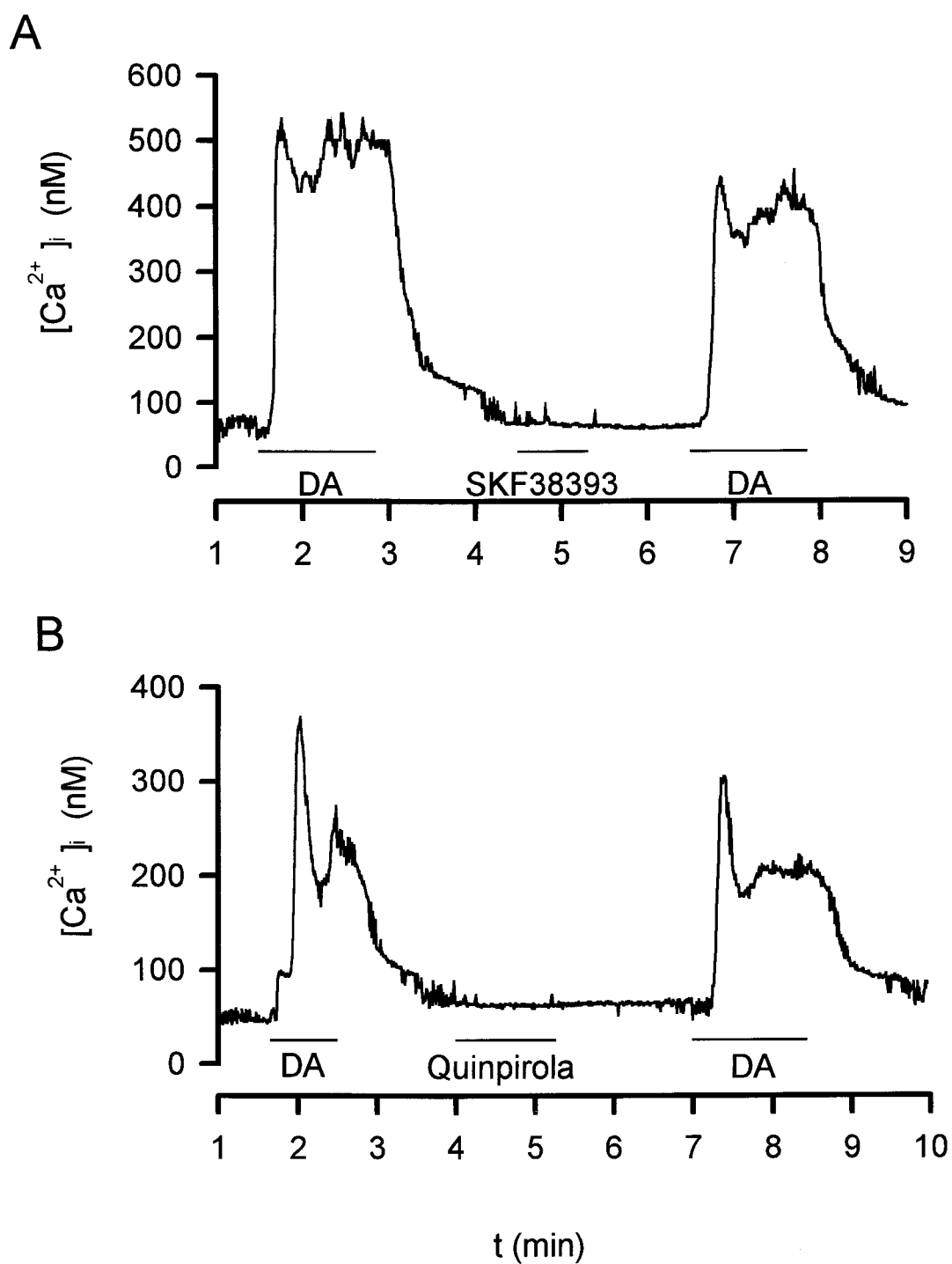
mayor desensibilización de la respuesta ante la aplicación de DA que la obtenida con fenilefrina (véase más adelante apartado de Discusión).

### 1.5. Los agonistas dopaminérgicos no aumentan la $[Ca^{2+}]_i$

Se utilizaron distintos agonistas dopaminérgicos, tanto de la familia  $D_1$  (SKF38393 y apomorfina) como  $D_2$  (bromocriptina y quinpirola) para estudiar su efecto sobre los niveles de  $[Ca^{2+}]_i$ . En la **Figura 25** se muestran dos ejemplos representativos de las respuestas obtenidas. En la parte A de la figura se observa que la estimulación con DA produjo un incremento de  $Ca^{2+}$ , mientras que la estimulación con SKF38893 no provocó ninguna respuesta. En la parte B de la figura se observa que de igual forma al aplicar quinpirola no se evidenció ningún cambio en la  $[Ca^{2+}]_i$ . En la **Tabla IX** se muestra el resumen de los resultados obtenidos en 24 células con la aplicación de los distintos agonistas dopaminérgicos.

**Tabla IX.** Efecto de distintos agonistas de la familia  $D_1$  y  $D_2$  sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  ( $n=24$ ).

Agonistas	Concentración ( $\mu M$ )	Incremento $[Ca^{2+}]_i$	n
<b>Apomorfina</b> (Familia $D_1 / D_2$ )	50	no	4
<b>Bromocriptina</b> (Familia $D_2$ )	50	no	5
<b>Quinpirola</b> (Familia $D_2$ )	100	no	3
<b>SKF38393</b> (Familia $D_1$ )	25 - 200	no	12



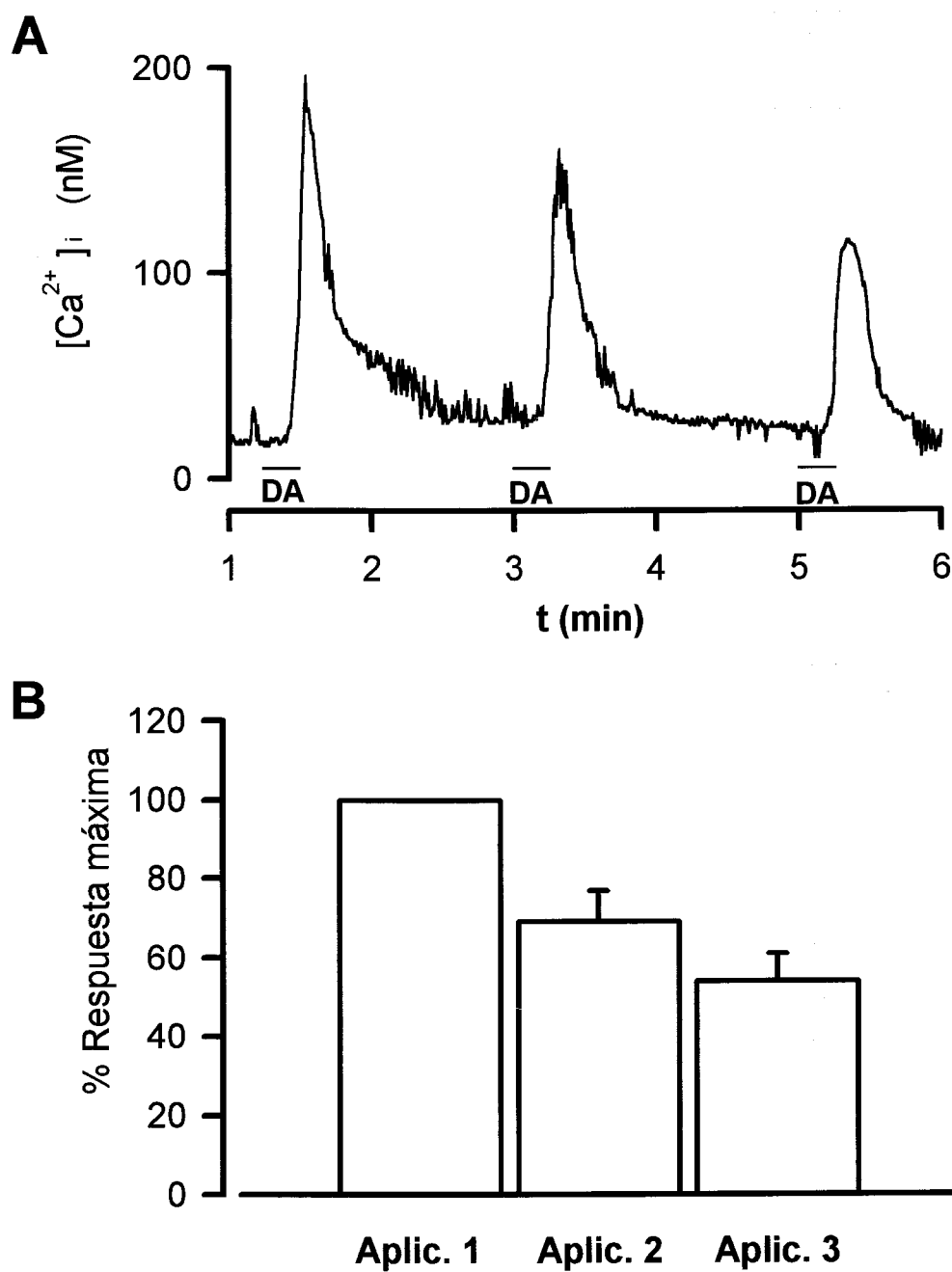
**Figura 25.** Agonistas dopaminérgicos no incrementan el  $Ca^{2+}$  intracelular. **A.** Niveles de  $[Ca^{2+}]_i$  medidos en una célula expuesta a DA (50  $\mu$ M) y SKF38393 (200  $\mu$ M). **B.** Igualmente una célula expuesta a quinpirola (100  $\mu$ M).



Por tanto, se encontró una ausencia total de respuesta, aún cuando las concentraciones de agonistas dopaminérgicos usadas en estos experimentos fueron muy superiores a las reportadas en la literatura para la activación de los receptores tanto de la familia D<sub>1</sub> como D<sub>2</sub>; por ejemplo, los valores de K<sub>i</sub> para quinpirola se encuentran entre 40-14000 nM (ver, en introducción, Tabla III). Estos datos nos indican, por tanto, que las características farmacológicas de los receptores que median el incremento de Ca<sup>2+</sup> en respuesta a DA en células pineales no son compatibles con la de los receptores dopaminérgicos.

#### **1.6. Los antagonistas dopaminérgicos inhiben el incremento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> inducido por DA**

Con el propósito de estudiar el efecto de los distintos antagonistas dopaminérgicos sobre la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> se compararon las amplitudes de las señales obtenidas tras aplicaciones sucesivas de DA en ausencia y presencia de estas drogas. Como se vió anteriormente, la estimulación repetida con DA produjo transitorios de Ca<sup>2+</sup> de amplitudes progresivamente decrecientes (véase Figura 24), fenómeno posiblemente debido a la desensibilización y/o a la depleción progresiva de los reservorios intracelulares de Ca<sup>2+</sup>. A fin de minimizar este factor a la hora de estudiar el efecto de los antagonistas se utilizaron concentraciones relativamente bajas de DA (5 µM) y se emplearon aplicaciones breves (~15 s) (**Figura 26, A**). Con este protocolo se obtuvieron respuestas regulares que sirvieron para estandarizar el porcentaje de disminución de la respuesta debido a desensibilización. En la **Figura 26, B** se han representado los valores

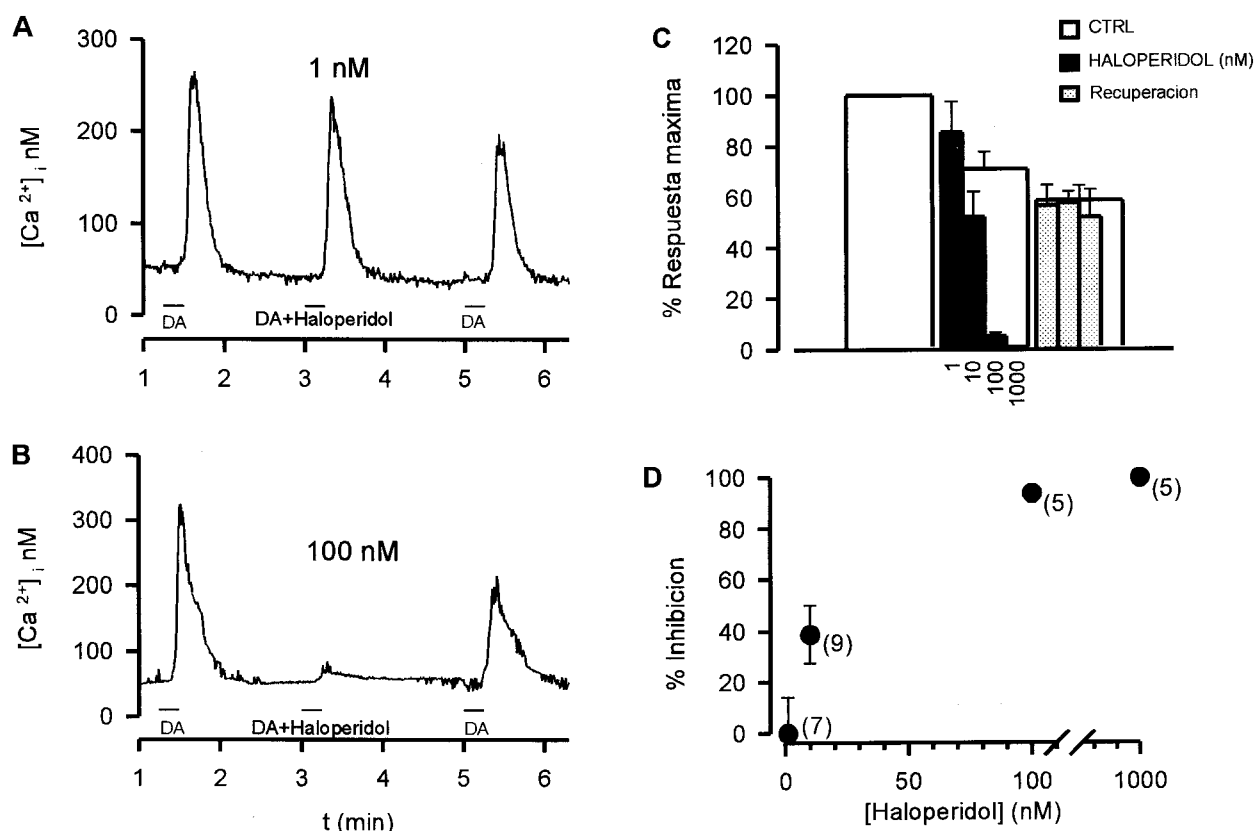


**Figura 26.** Disminución de los incrementos de  $Ca^{2+}$  tras aplicaciones repetidas de DA ( $5 \mu M$ ) en ausencia de antagonistas. **A.** Aplicaciones (15 s) sucesivas de DA en una célula. **B.** Valores normalizados de la amplitud máxima del transitorio de  $Ca^{2+}$  utilizando el protocolo anterior, medido en 6 células.

medios de las amplitudes de los transientes de  $\text{Ca}^{2+}$  obtenidos en 6 células durante tres aplicaciones sucesivas de DA. Normalizando la amplitud de la respuesta de la primera aplicación al 100 %, la amplitud media ( $\pm$  e.e.m) de la segunda respuesta fue del  $71\% \pm 6,76$  y del  $58,6\% \pm 5,79$  la de la tercera. Estos valores se tuvieron en consideración para corregir por este factor la respuesta observada en presencia del antagonista y después del lavado (barras blancas en Figuras 27-33).

A continuación se presentan los resultados obtenidos con los antagonistas dopaminérgicos: haloperidol, espiperona, risperidona y SCH23390. En la **Figura 27** se muestra el efecto sobre la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por DA en presencia de haloperidol (antagonista  $\text{D}_1 / \text{D}_2$ ). En la parte A de la figura, se observa la ausencia de inhibición tras la aplicación de 1 nM de haloperidol en una célula, mientras que, en la parte B de la figura se muestra una inhibición casi total de la respuesta tras la aplicación de 100 nM de haloperidol en otra célula. En el panel C se muestran los resultados obtenidos en 26 células, donde se aplicaron concentraciones de haloperidol comprendidas entre 1 y 1000 nM. La inhibición se hizo aparente a partir de 10 nM, y la recuperación, tras el lavado del antagonista, fue total a concentraciones  $\leq$  de 100 nM. En el panel D se muestra el porcentaje de inhibición de las respuestas una vez corregidas por el decremento debido a la desensibilización. La  $\text{CI}_{50}$  se estimó en 15 nM (ver **TablaX**).

La aplicación de DA junto con espiperona (antagonista de la familia de los receptores  $\text{D}_2$  y  $\alpha_{1B}$ -adrenérgicos) inhibió el incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mediado por DA (5  $\mu\text{M}$ ) de forma concentración



**Figura 27.** Respuesta de Ca<sup>2+</sup> inducida por DA (5 μM) en presencia o ausencia de haloperidol. **A.** y **B.** Aplicaciones sucesivas de DA en presencia de 1 y 100 nM haloperidol, respectivamente, durante la segunda aplicación de DA en dos células. **C.** Amplitud relativa del incremento de Ca<sup>2+</sup> utilizando el protocolo anterior (n=26). **D.** Porcentaje de inhibición en función de la concentración de haloperidol.

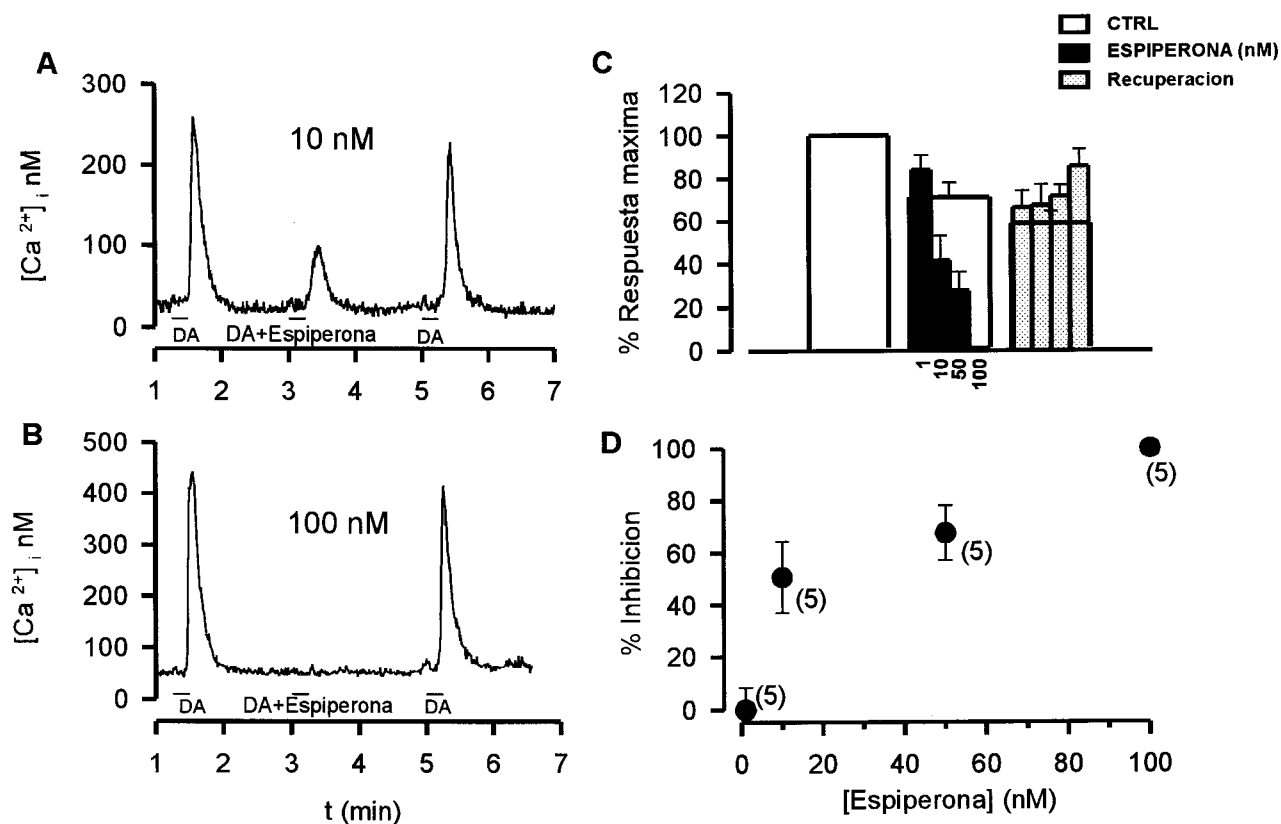
dependiente. La inhibición fue evidente a partir de 10 nM y total a 100 nM, siendo reversible la respuesta a todas las concentraciones utilizadas (**Figura 28**). La  $CI_{50}$  se estimó en 20 nM (ver **Tabla X**).

La aplicación de risperidona (antagonista  $D_2$  y  $5HT_{2A/2C}$ ) (10-1000 nM) inhibió la respuesta a DA (10  $\mu$ M) ( $n=21$ ), con valores de  $CI_{50} < 10$  nM (**Figura 29 A y B**). Para las partes C y D de la figura véase más adelante.

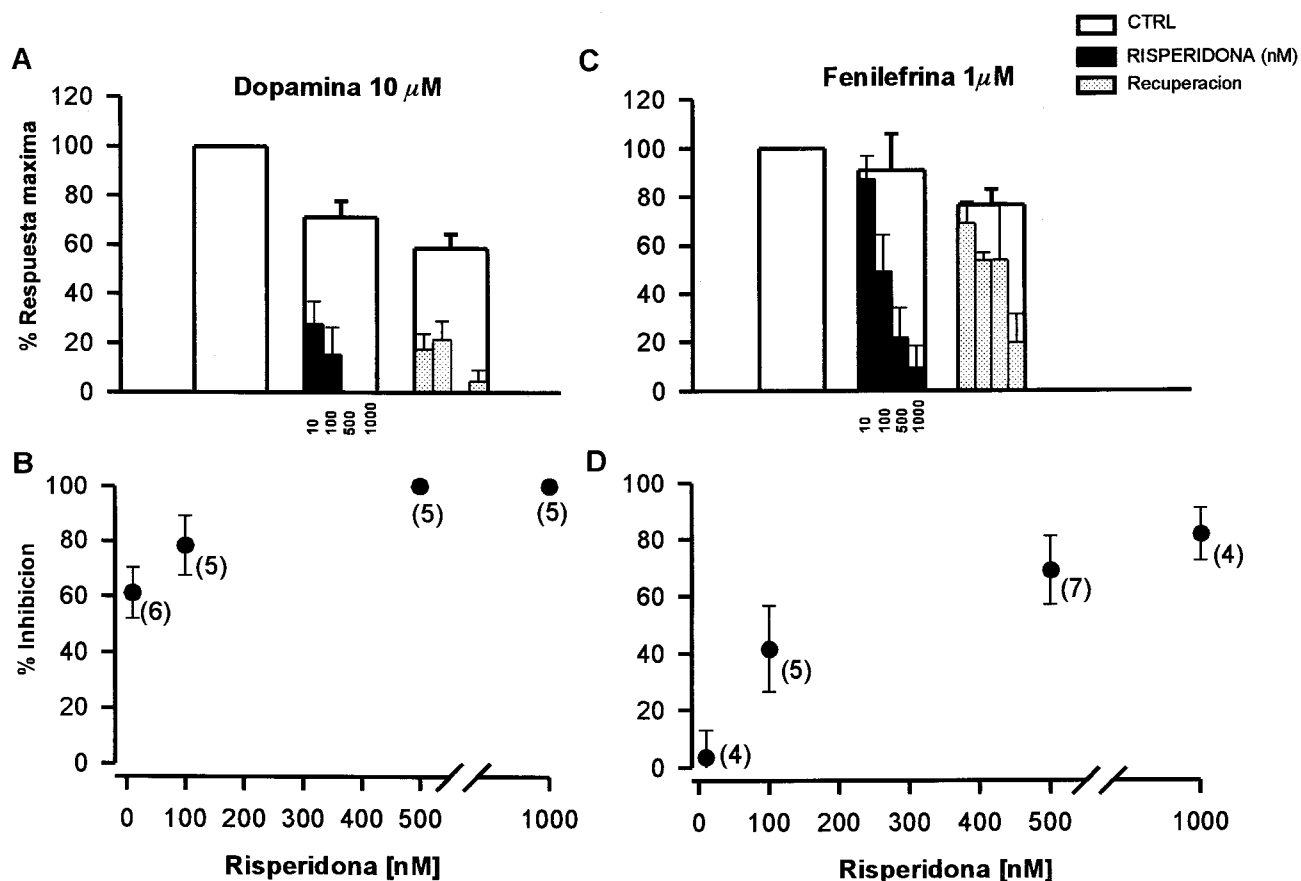
La estimulación con DA en presencia de SCH23390 (1-10000 nM) mostró inhibición a partir de 100 nM, obteniéndose una inhibición total a una concentración de 10  $\mu$ M (datos no mostrados). La  $CI_{50}$  se estimó en 1700 nM, valor similar a la  $CI_{50}$  de este antagonista para los receptores dopaminérgicos de la familia  $D_2$  (véase **Tabla III**). En la **Tabla X** se muestran los valores de concentraciones de los diferentes antagonistas dopaminérgicos utilizados que inhibieron el 50% de la respuesta a DA. El orden de potencia de estas drogas fue risperidona  $\geq$  haloperidol  $>$  espiperona  $>$  SCH23390.

**Tabla X.** Valores de  $CI_{50}$  para diferentes antagonistas dopaminérgicos en células estimuladas con DA.

Antagonistas	$CI_{50}$ (nM)	n
<b>Risperidona</b> (Familia $D_2$ / $5HT_{2A/2B}$ )	<10	21
<b>Haloperidol</b> (Familia $D_2$ / $D_1$ )	15	26
<b>Espiperona</b> (Familia $D_2$ , $\alpha_{1B}$ , $5HT_{1A}$ , $5HT_{1B}$ , $5HT_{2C}$ )	20	20
<b>SCH 23390</b> (Familia $D_1$ / $D_2$ )	1700	22



**Figura 28.** Respuesta de Ca<sup>2+</sup> inducida por DA (5 μM) en presencia o ausencia de espiperona. **A.** y **B.** Aplicaciones sucesivas de DA en presencia de 10 y 100 nM espiperona, respectivamente, durante la segunda aplicación de DA en dos células. **C.** Amplitud relativa del incremento de Ca<sup>2+</sup> utilizando el protocolo anterior (n=20). **D.** Porcentaje de inhibición de la respuesta en función de la concentración de espiperona.



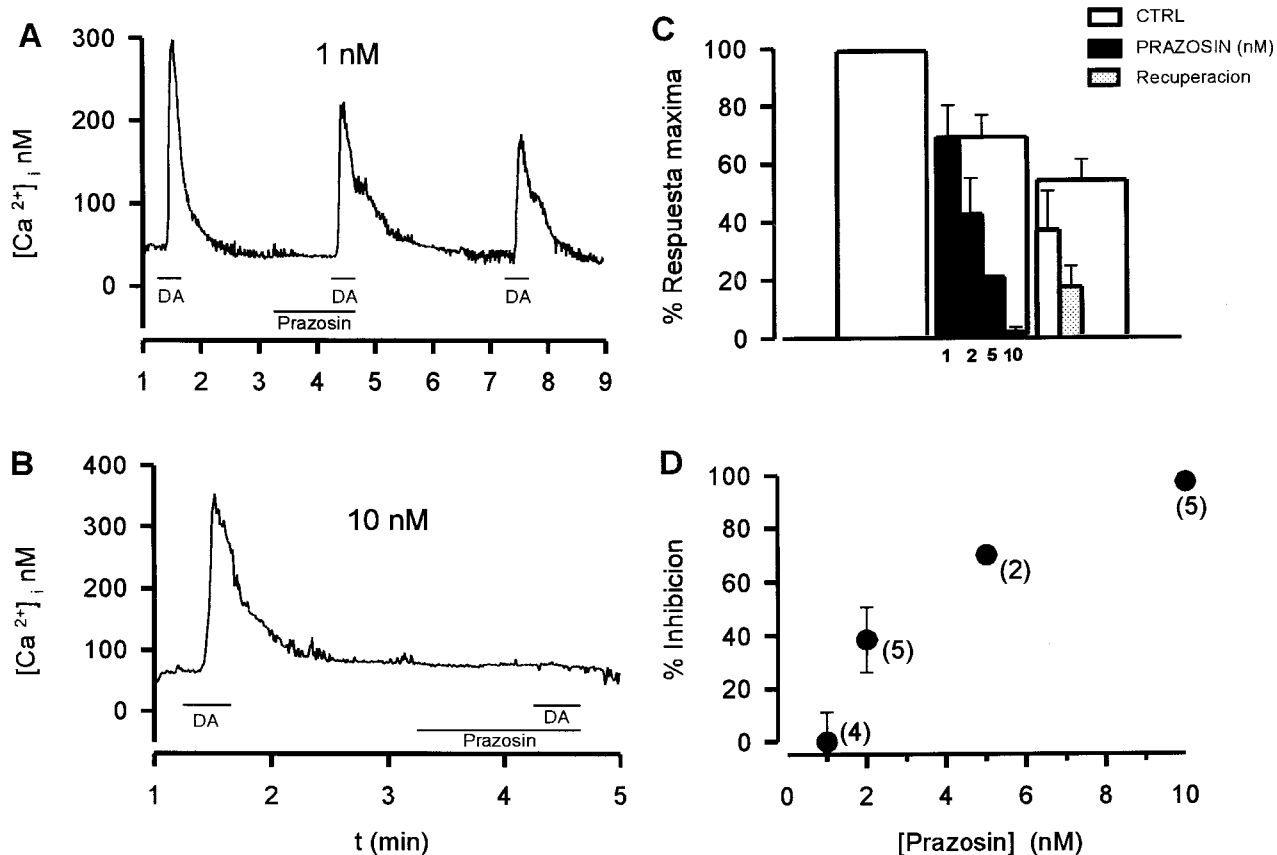
**Figura 29.** Inhibición de la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de risperidona. En **A** y **B** la respuesta de DA ( $10 \mu\text{M}$ ) ( $n=21$ ) es inhibida por risperidona ( $\text{CI}_{50} < 10 \text{ nM}$ ). **B** y **C** muestran la inhibición de la respuesta de fenilefrina ( $1 \mu\text{M}$ ) ( $n=20$ ) tras la aplicación de risperidona ( $\text{CI}_{50} \sim 250 \text{ nM}$ ).

### 1.7. Los antagonistas adrenérgicos inhiben el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por DA

La aplicación de prazosín, antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico, inhibió el incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular inducido por DA a concentraciones aún más bajas que los antagonistas dopaminérgicos (véase Tabla X). Con prazosín se observó una inhibición prácticamente total con 10 nM (Figura 30, B). Concentraciones  $\geq 5$  nM de prazosín hicieron irreversible la inhibición de la respuesta (Figura 30, C). El valor calculado para la  $CI_{50}$  fue de  $\sim 3$  nM (véase Tabla XI). El prazosín, además de ser un antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico, se ha descrito también como un antagonista del receptor de melatonina ML2 (Molinari *et al.*, 1996). En nuestros experimentos, sin embargo, la aplicación de melatonina entre 50-200  $\mu M$  ( $n=5$ ) no produjo variaciones en la  $[Ca^{2+}]_i$ , lo que descarta este hipotético efecto del prazosín sobre autoreceptores de melatonina en estas células (datos no mostrados).

La baja concentración de prazosín para inhibir la respuesta de  $Ca^{2+}$ , junto con la ausencia de efecto de los agonistas dopaminérgicos, sugieren que el hipotético receptor activado por DA pudiera ser de tipo  $\alpha_1$ -adrenérgico. Por otro lado, el que no todas las células sean sensibles a DA y que la desensibilización sea más rápida con DA que con fenilefrina (véase apartado 1.4.) sugiere que las respuestas mediadas por estos agonistas ocurren a través de la activación de, al menos, dos tipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos. Para estudiar esta posibilidad se utilizaron distintos antagonistas “selectivos” de subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos.

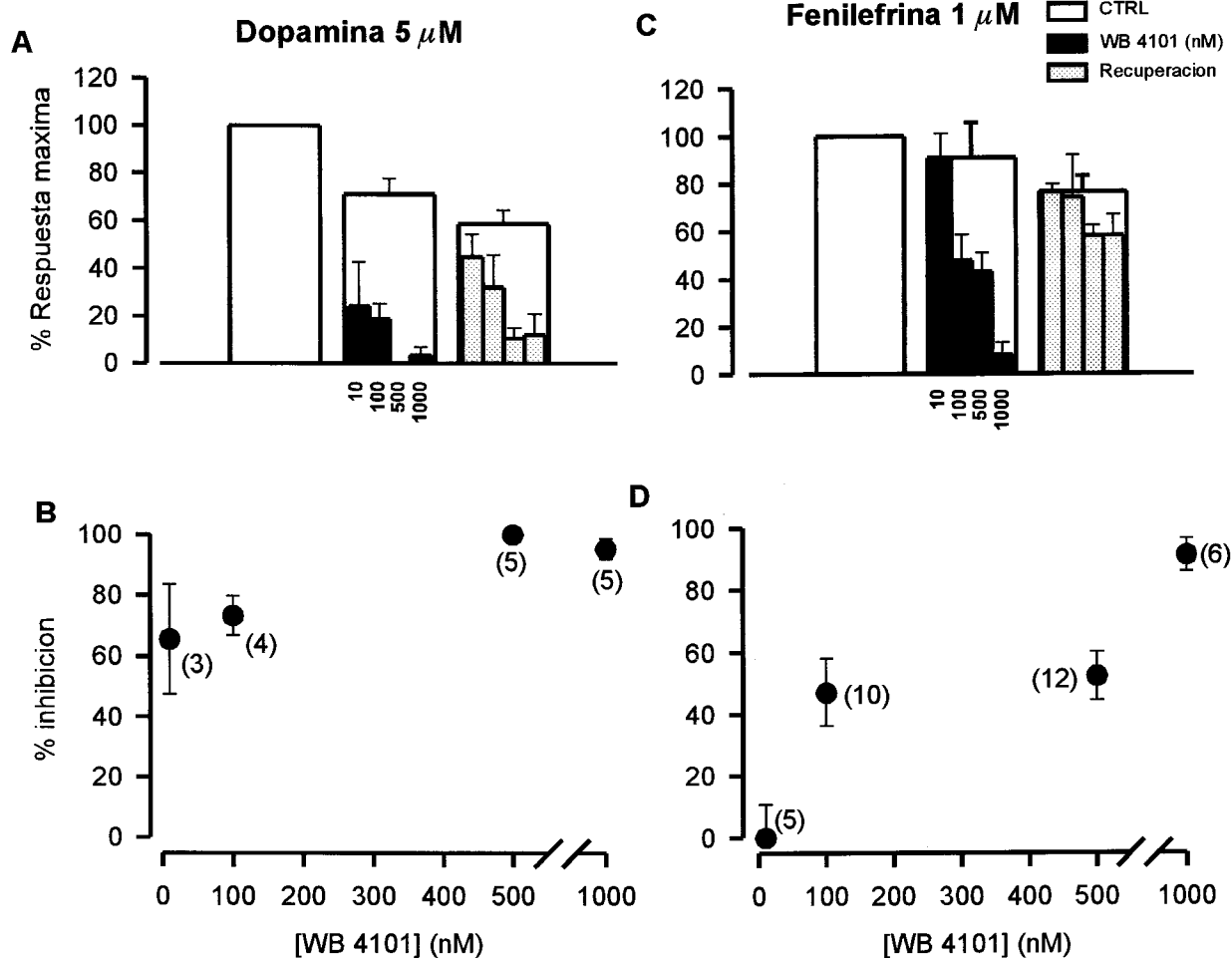




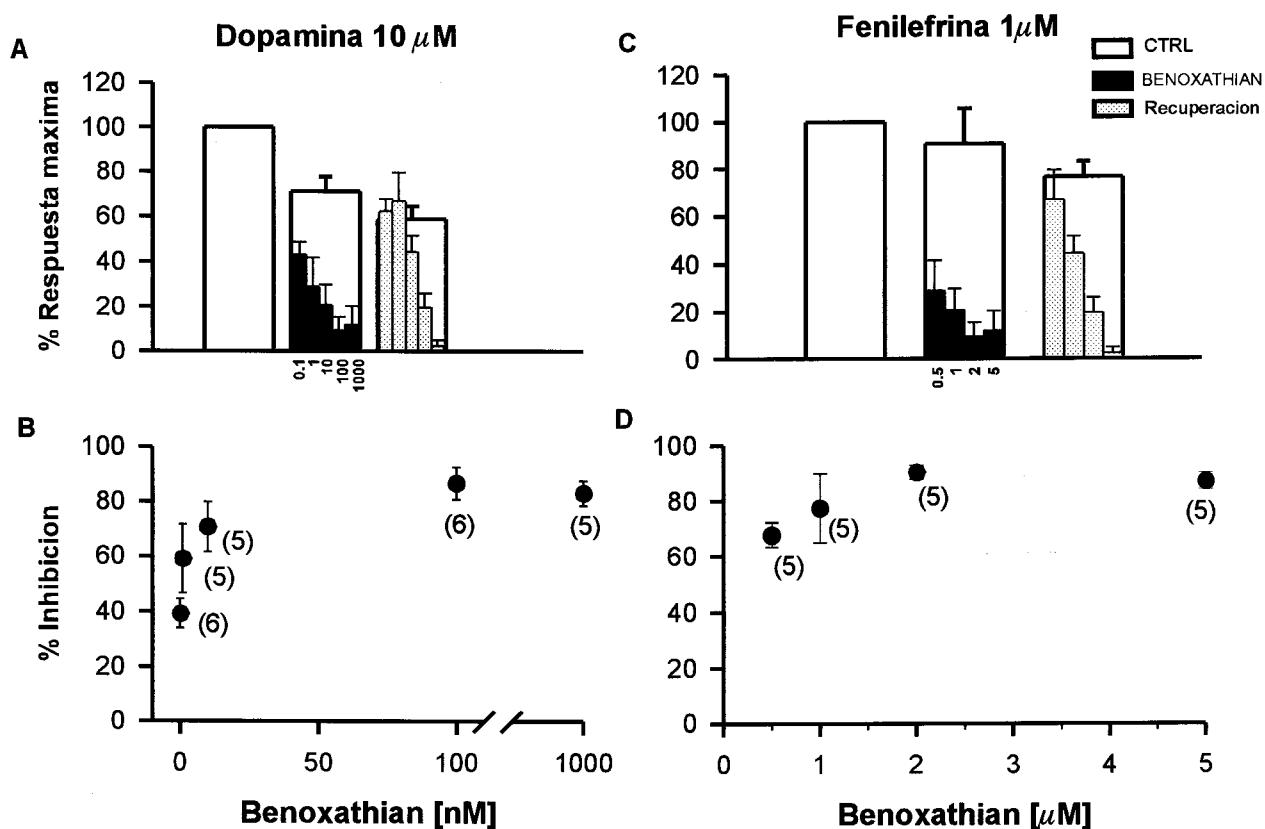
**Figura 30.** Respuesta de Ca<sup>2+</sup> inducida por DA (5 μM) en presencia o ausencia de prazosin. **A.** y **B.** Aplicaciones sucesivas de DA en presencia de prazosin (1 y 10 nM, respectivamente), en 2 células. **C.** Amplitud relativa del incremento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> utilizando el protocolo anterior (*n*=16). **D.** Porcentaje de inhibición de la respuesta en función de la concentración de prazosin.

La aplicación de WB4101 (antagonista selectivo  $\alpha_{1A/1C/1D}$  adrenérgico) a diferentes concentraciones (10-1000 nM) inhibió ( $n=17$ ) la respuesta generada con DA (5  $\mu$ M). La respuesta fue poco reversible a concentraciones  $\geq 500$  nM (**Figura 31, A**). En la parte B de la figura se muestra la relación dosis dependiente entre la concentración de WB4101 y la inhibición de la respuesta ( $CI_{50} < 10$  nM). De igual forma, la aplicación conjunta de fenilefrina (1  $\mu$ M) y WB4101 (10-1000 nM) inhibió la respuesta ( $n=33$ ), pero a concentraciones más altas. A todas las concentraciones a las que se produjo inhibición la reversibilidad fue total. La relación entre la [WB4101] y la inhibición de la respuesta generada con fenilefrina se puede apreciar en la parte D de la figura ( $CI_{50}=100$  nM) (véase más adelante apartado de Discusión).

La respuesta ante la estimulación con DA (10  $\mu$ M) fue inhibida por la aplicación de benoxathian (antagonista  $\alpha_{1A/1D}$ ) en el rango 0.1-100 nM ( $n=22$ ). La inhibición máxima de la respuesta obtenida a concentraciones saturantes fue del 80 %. En la parte A y B de la **Figura 32** se muestra la relación entre la concentración de benoxathian y la inhibición de la respuesta a DA ( $CI_{50} < 1$  nM). La inhibición de la respuesta generada con fenilefrina (1  $\mu$ M) a concentraciones saturantes de benoxathian (0,5-5  $\mu$ M) disminuyó la amplitud de la señal de  $Ca^{2+}$  entre el 70-90 % tal y como se muestra en la parte C y D de la figura.



**Figura 31.** Inhibición de la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de WB4101. **A** y **C** muestran la inhibición de las respuestas a DA ( $5 \mu\text{M}$ ) ( $n=17$ ) y fenilefrina ( $1 \mu\text{M}$ ) ( $n=33$ ), respectivamente, tras la aplicación de WB4101 (10-1000 nM). La relación entre la [WB4101] y la respuesta, indica un mayor efecto sobre la estimulación con DA ( $\text{CI}_{50} < 10 \text{ nM}$ ) que con fenilefrina ( $\text{CI}_{50} = 100 \text{ nM}$ ), parte **B** y **D** de la figura.



**Figura 32.** Inhibición de la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de benoxathian. **A** y **B** muestran la inhibición de la respuesta de DA (10  $\mu\text{M}$ ) ( $n=27$ ) tras la aplicación de benoxathian (0.1-1000 nM) ( $\text{CI}_{50} \leq 1$  nM). **C** y **D** muestran la inhibición de la respuesta de fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ) ( $n=20$ ) tras la aplicación de benoxathian (0.5-5  $\mu\text{M}$ ).

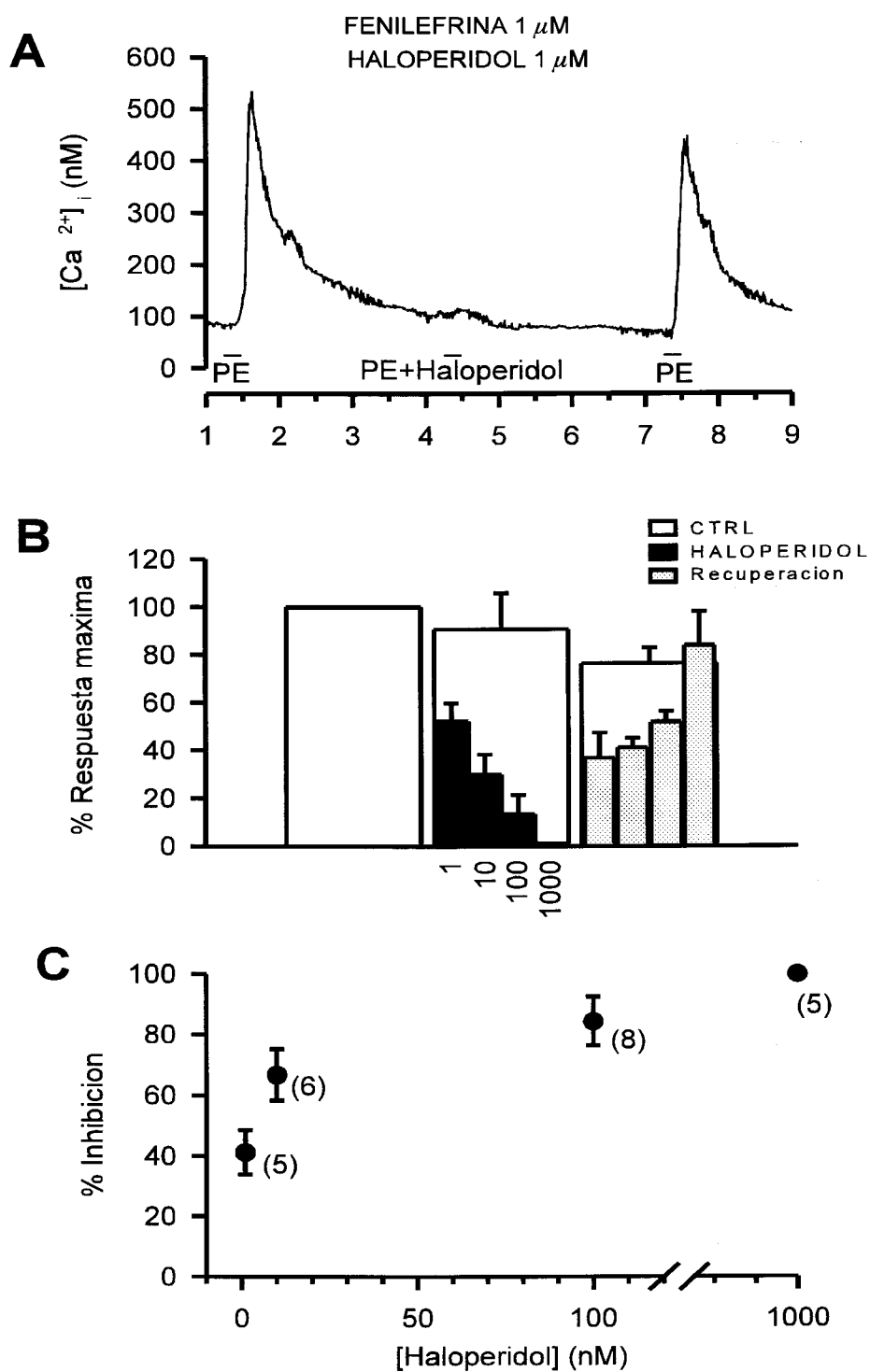
El orden de potencia de los antagonistas  $\alpha_1$ -adrenérgicos con DA como estímulo fue: benoxathian > prazosín > WB4101 (Tabla XI).

**Tabla XI.** Valores de  $CI_{50}$  para diferentes antagonistas adrenérgicos. Los valores están dados en nM.

Antagonistas	DA- $CI_{50}$	PE- $CI_{50}$
Benoxathian ( $\alpha_{1A/1D}$ )	$\leq 1$	-
Prazosín ( $\alpha_1$ )	$\sim 3$	2.5
WB4101 ( $\alpha_{1A/1C/1D}$ )	< 10	100

Estos resultados, por tanto, muestran que la respuesta del incremento de  $Ca^{2+}$  inducida por DA se inhibió tanto por antagonistas dopaminérgicos como por antagonistas  $\alpha_1$ -adrenérgicos. De igual forma, la estimulación con fenilefrina se inhibió no sólo por antagonistas  $\alpha_1$ -adrenérgicos sino también por antagonistas dopaminérgicos. La **Figura 33** muestra la inhibición de la respuesta a fenilefrina por haloperidol a concentraciones incluso aún más bajas ( $CI_{50} < 10$  nM) que las necesarias para inhibir la respuesta de  $Ca^{2+}$  cuando el agonista es la DA (véase Tabla X). La risperidona, antagonista dopaminérgico y  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico, también inhibió la respuesta ante la aplicación de fenilefrina pero a concentraciones aproximadamente 25 veces mayores que las necesarias para inhibir la respuesta a DA (véase Figura 29).

Además, se realizaron experimentos en los que las células se incubaron con cloroetilclonidina (CEC), agente alquilante de receptores

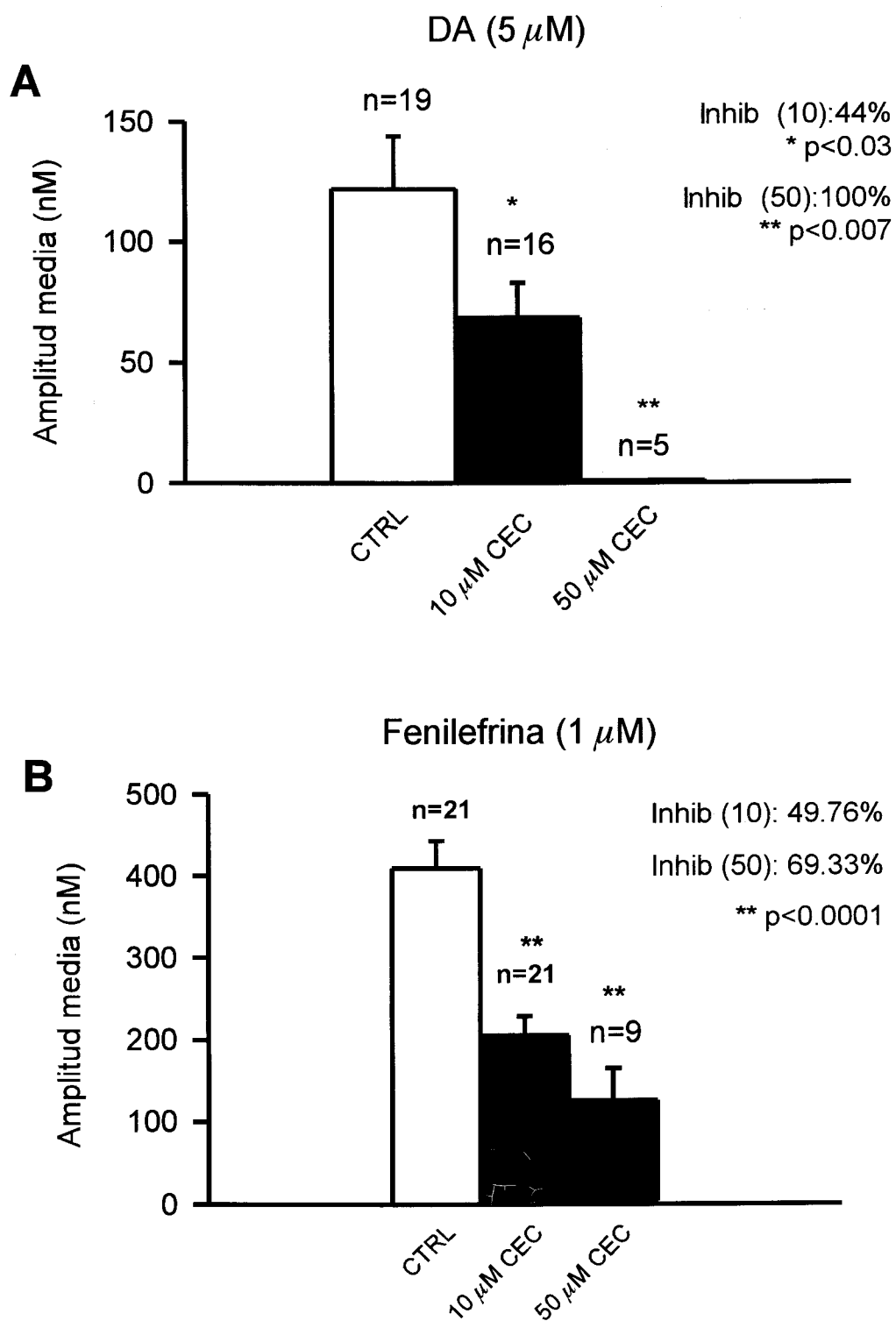


**Figura 33.** Respuesta de Ca<sup>2+</sup> inducida por fenilefrina (1  $\mu$ M) en presencia o ausencia de haloperidol. **A.** Aplicación de fenilefrina en presencia de haloperidol (1  $\mu$ M) en una célula. **B.** Amplitud relativa del incremento de Ca<sup>2+</sup> utilizando el protocolo anterior ( $n=24$ ). **C.** Porcentaje de inhibición en función de la concentración de haloperidol.

preferentemente adrenérgicos  $\alpha_{1B}$ . Este compuesto tiene la capacidad de adicionar un grupo alquilo, ya sea metilo ( $\text{CH}_3$ ) o cloroetilo ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ ) a un grupo hidroxilo ( $\text{OH}$ ) próximo al sitio de unión del ligando al receptor, dando lugar a la inhibición de la respuesta al agonista (Torchilin *et al.*, 1979). Las células se incubaron con CEC (10 y 50  $\mu\text{M}$ ) durante diferentes tiempos (10, 20, 40 y 60 min). En las células estimuladas con DA (5  $\mu\text{M}$ ) la inhibición de la respuesta completa con 50  $\mu\text{M}$  CEC ( $n=5$ ). Concentraciones menores (10  $\mu\text{M}$ ) produjeron una inhibición ( $n=16$ ) del 44% (Figura 34, A). En las células estimuladas con fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ) la inhibición con 10 y 50  $\mu\text{M}$  de CEC fue de 49.76 ( $n=21$ ) y 69.33 % ( $n=9$ ), respectivamente (Figura 34, B). El tiempo de incubación, aparentemente, no afectó las respuestas.

### 1.8. Incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y transportadores de catecolaminas

La DA, además de, o en vez de, ejercer su efecto de incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  a través de la activación de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos pudiera estar incrementando la concentración intracelular de este catión por otros mecanismos. Uno de ellos es a través de la activación de un transportador para catecolaminas, ya sea para DA o para noradrenalina. Las afinidades aparentes para DA de estos transportadores en células de rata en cultivo son de 3.2 y 0.2  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Buck y Amara, 1994). Los transportadores de catecolaminas se consideran electrogénicos y pudieran producir un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  a través de la despolarización asociada al cotransporte de  $\text{Na}^+$  que, a su vez, activase canales de calcio



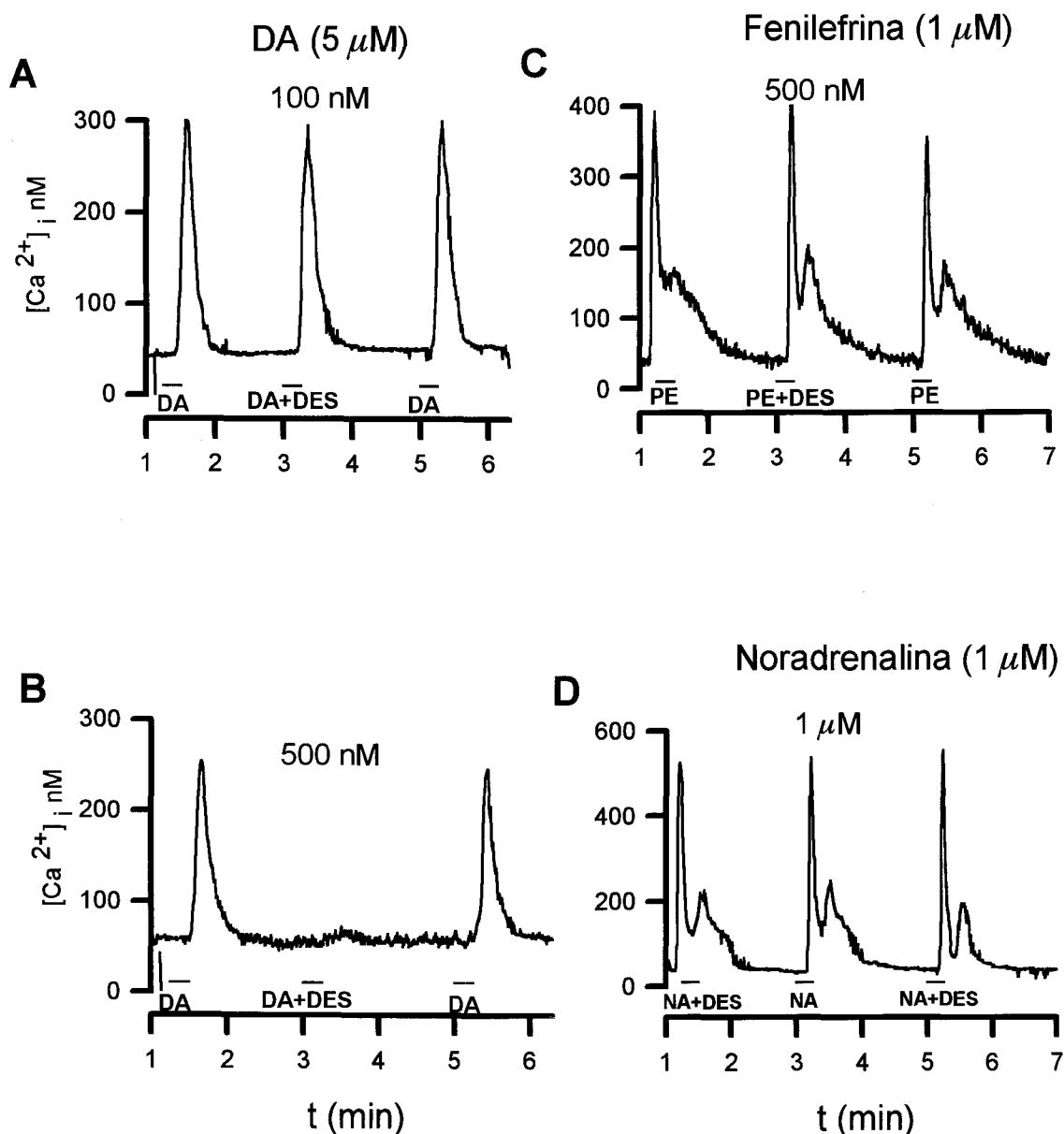
**Figura 34.** La respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por catecolaminas es inhibida por CEC. En la parte **A** de la figura se muestra como tras la incubación con CEC (10 y 50  $\mu$ M) (n=21) las respuestas a DA (5  $\mu$ M) son inhibidas. La estimulación con fenilefrina (1 $\mu$ M) también es afectada por CEC (10 y 50  $\mu$ M) (n=30), parte **B**.



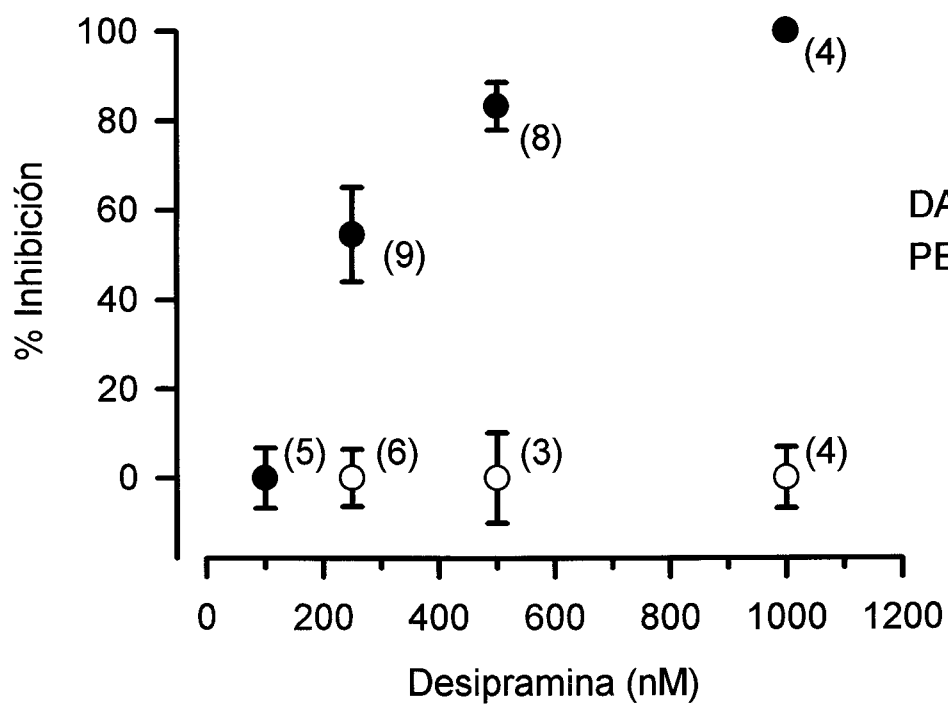
voltaje-dependientes en los pinealocitos. A fin de probar esta hipótesis se comprobó la sensibilidad de la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por DA a distintas drogas bloqueantes como cocaína que actúa sobre los transportadores de DA, noradrenalina y serotonina, o más específicas, como desipramina e imipramina (inhibidores de los transportadores de noradrenalina) y GBR12909 (inhibidor de los transportadores de DA) (**Tabla XII** en Discusión). Así mismo, se realizaron medidas de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en respuesta a DA en ausencia de  $^*\text{Na}$  extracelular. Los resultados obtenidos se presentan a continuación.

La aplicación extracelular de 100 nM desipramina no alteró la respuesta de calcio citosólico inducida con DA (5  $\mu\text{M}$ ) (**Figura 35, A**), mientras que a concentraciones de desipramina de 500 nM la respuesta fue inhibida casi totalmente (**Figura 35, B**). La curva dosis-respuesta del efecto de la desipramina se realizó con un total de 26 células y se obtuvo una  $\text{CI}_{50}$ =250 nM (**Figura 36**, círculos negros). Resultados similares se obtuvieron con imipramina (inhibidor de transportadores de 5-HT y noradrenalina). La aplicación de DA junto con imipramina, a una concentración de 1  $\mu\text{M}$ , inhibió el 90 % de la respuesta. La  $\text{CI}_{50}$  se estimó en <100 nM ( $n=15$ , datos no mostrados).

Por el contrario, los incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a la estimulación con fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ) no se vieron afectados por desipramina (250-1000 nM), (**Figuras 35, C** y **36**, círculos claros), ni por imipramina (1000 nM) ( $n=5$ , datos no mostrados). La estimulación con noradrenalina ( $n=5$ ) tampoco se vió afectada por desipramina (1000 nM) (**Figura 35, D**).



**Figura 35.** A. y B. Respuesta a DA ( $5 \mu\text{M}$ ) en ausencia o presencia de desipramina (DES) (2ª aplicación), a 100 y 500 nM, respectivamente. C. Respuesta a fenilefrina (PE) ( $1 \mu\text{M}$ ) en ausencia o presencia de desipramina (2ª aplicación), a 500 nM. D. Respuesta a noradrenalina (NA) ( $1 \mu\text{M}$ ) en ausencia o presencia de desipramina (1ª y 3ª aplicación), a 1  $\mu\text{M}$ . En todos los casos el tiempo de estimulación fue de 15 segundos.

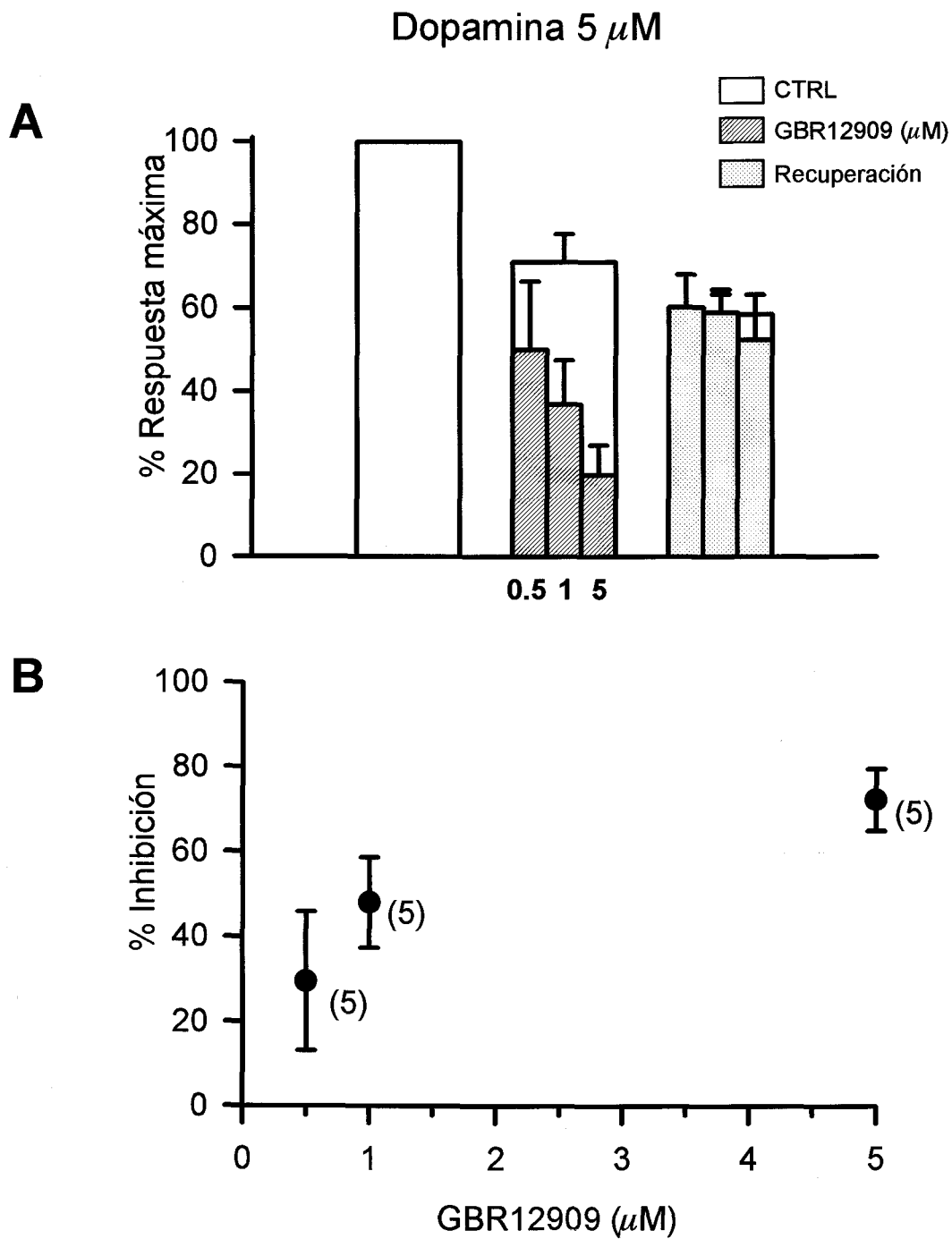


**Figura 36.** Relación entre la concentración de desipramina y la inhibición de la respuesta a catecolaminas. DA (5  $\mu$ M) ( $CI_{50}$  =250 nM) ( $n=26$ ), fenilefrina (1  $\mu$ M) ( $n=13$ ).

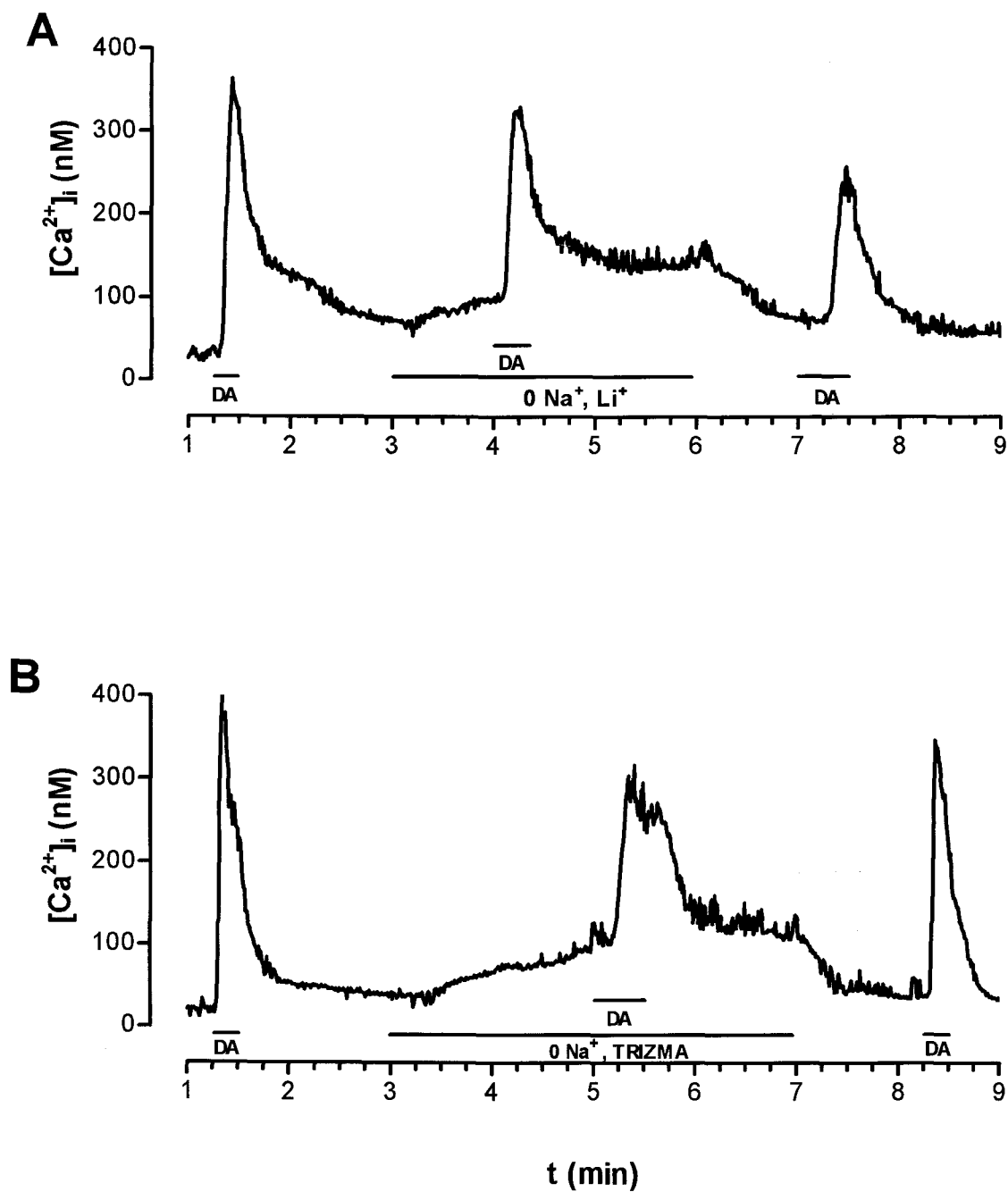
La aplicación de GBR12909 (0.5-5  $\mu\text{M}$ ) junto con DA inhibió la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  con una eficacia cercana al 70 % y una  $\text{Cl}_{50}$  de  $\sim 0.5$   $\mu\text{M}$  (**Figura 37**). La aplicación de cocaína (1  $\mu\text{M}$ ) inhibió en un 10 % la respuesta generada con DA (5  $\mu\text{M}$ ) ( $n=6$ ), mientras que, su efecto fue menor (2.6 %) para la respuesta generada con fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ) ( $n=4$ ) (datos no mostrados).

La sustitución del  $\text{Na}^+$  extracelular por otro ion monovalente ( $\text{Li}^+$ ,  $\text{Tris}^+$  ó N-metil-D-glucamina) produjo un incremento lento y reversible de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , posiblemente debido a la inhibición del intercambiador  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ . La aplicación de DA en ausencia de  $\text{Na}^+$  dió lugar a un incremento en los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  tanto cuando el  $\text{Na}^+$  se sustituyó por  $\text{Li}^+$  (**Figura 38, A**,  $n=6$ ), por  $\text{Tris}^+$  (**Figura 38, B**,  $n=6$ ) ó N-metil-D-glucamina (datos no mostrados,  $n=2$ ).

Estos resultados, por tanto, muestran que los inhibidores de los transportadores de catecolaminas bloquearon las respuestas de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas por DA, aunque a concentraciones relativamente altas en comparación con las necesarias para bloquear la función de los transportadores (véase **Tabla XIV**, apartado de Discusión). Sin embargo, en ausencia de  $\text{Na}^+$  extracelular las respuestas siguieron produciéndose, lo que indica que éstas se generan probablemente a través de la activación de uno o varios receptores catecolaminérgicos, y no como consecuencia de la internalización del neurotransmisor.



**Figura 37.** Inhibición de la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de GBR12909. En **A** y **B** la respuesta de DA (5  $\mu\text{M}$ ) ( $n=15$ ) es inhibida por GBR12909 ( $\text{CI}_{50} \sim 0.5 \mu\text{M}$ ).



**Figura 38.** Incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  en condiciones de bajo  $Na^+$ . Respuesta a DA ( $5 \mu M$ ) tras la sustitución del  $Na^+$  extracelular por  $Li^+$  ( $160 \text{ mM}$ ) ( $n=6$ ) o trizma ( $165 \text{ mM}$ ) ( $n=6$ ) **A** y **B** respectivamente.

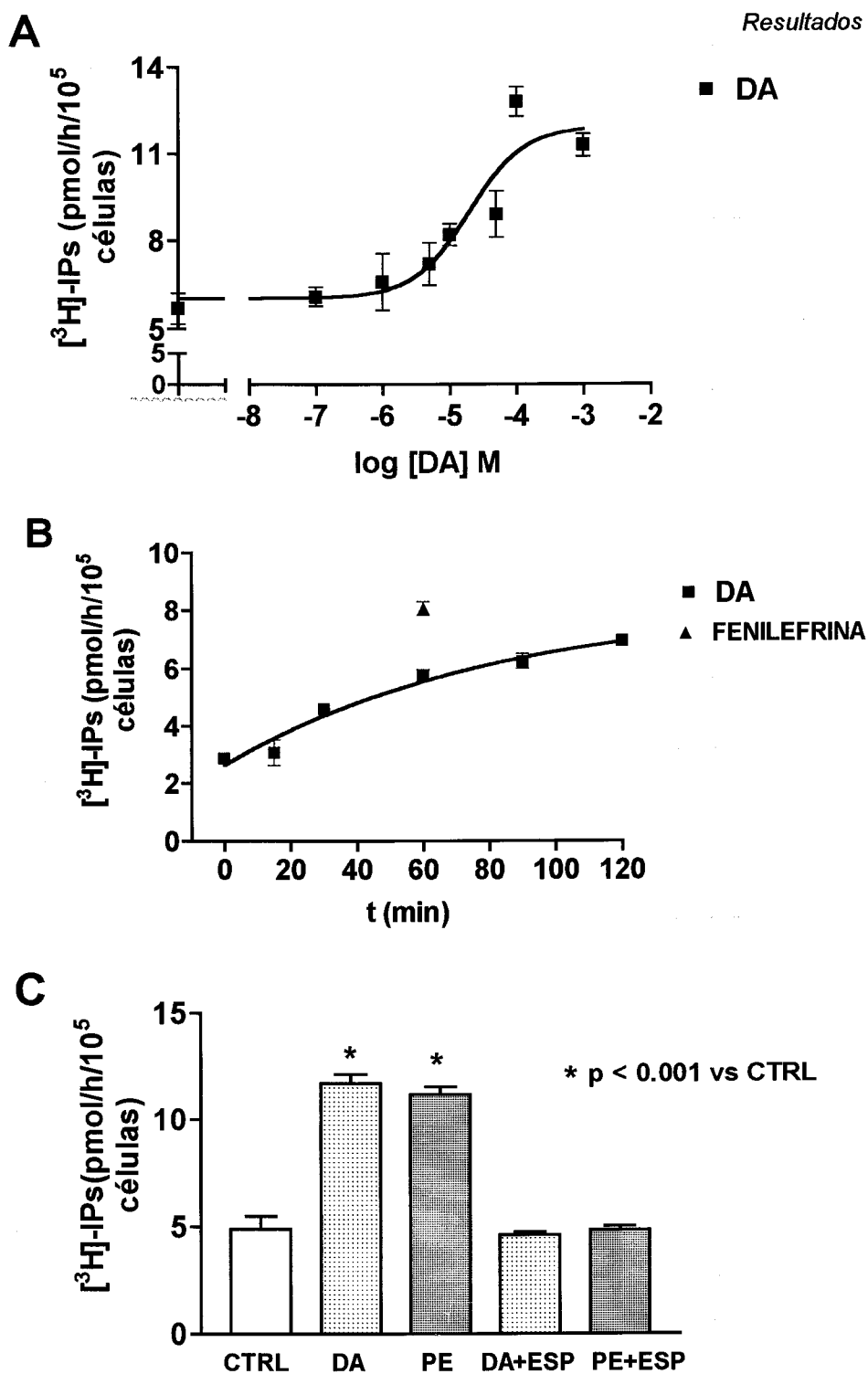
## 2. ACUMULACIÓN DE INOSITOLES FOSFATO (IPs) MEDIADA POR DA

Con el propósito de averiguar la vía de señalización intracelular mediante la cuál ocurre el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  tras la aplicación de DA, se midieron los niveles intracelulares de inositoles fosfato totales (IPs) en células pineales en cultivo primario.

La aplicación de DA produjo un aumento de los niveles intracelulares de IPs de forma concentración dependiente. En la parte A de la **Figura 39** se muestra los valores medios ( $\pm$  eem) de IPs obtenidos ( $n=6$ ) tras aplicaciones de distintas concentraciones de DA, entre 0,1 y 1000  $\mu\text{M}$ . El nivel basal promedio de IPs en este experimento fue de 5.7 pmol/h/ $10^5$  células. Se observó un aumento de la concentración intracelular de IPs con aplicaciones de DA  $> 1\mu\text{M}$ , alcanzandose valores máximos entre 0.1-1 mM DA.

El curso temporal del incremento de los niveles intracelulares de IPs, tras la aplicación de DA (50  $\mu\text{M}$ ), se obtuvo mediante la determinación de IPs a distintos tiempos (**Figura 39, B**). Las concentraciones máximas de IPs se alcanzaron a las 2 horas de incubación ( $n=8$ ). Así mismo, se compararon, los niveles de IPs a los 60 min de la estimulación con DA y fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ,  $n=8$ ). No se observaron diferencias significativas en los niveles de IPs alcanzados con uno u otro agonista.

La aplicación de espiperona (antagonista de los receptores dopaminérgicos  $\text{D}_2$  y  $\alpha_{1\text{B}}$ -adrenérgicos) junto con DA, o fenilefrina,



**Figura 39.** Medida de la acumulación de IPs (media  $\pm$  eem) en células incubadas con [<sup>3</sup>H]-myo-inositol tras la aplicación de DA. **A.** Niveles de IPs a distintas concentraciones de DA (tiempo de exposición 60 min). **B.** Curso temporal del incremento de IPs en presencia de DA (50  $\mu$ M). **C.** Inhibición de la respuesta del incremento de IPs inducida por DA (50  $\mu$ M) y fenilefrina (1  $\mu$ M) por espiperona (ESP) (100 nM).



inhibió de forma significativa la acumulación de IPs ( $n=10$ ) que se produjo en ausencia del antagonista (**Figura 39, C**).

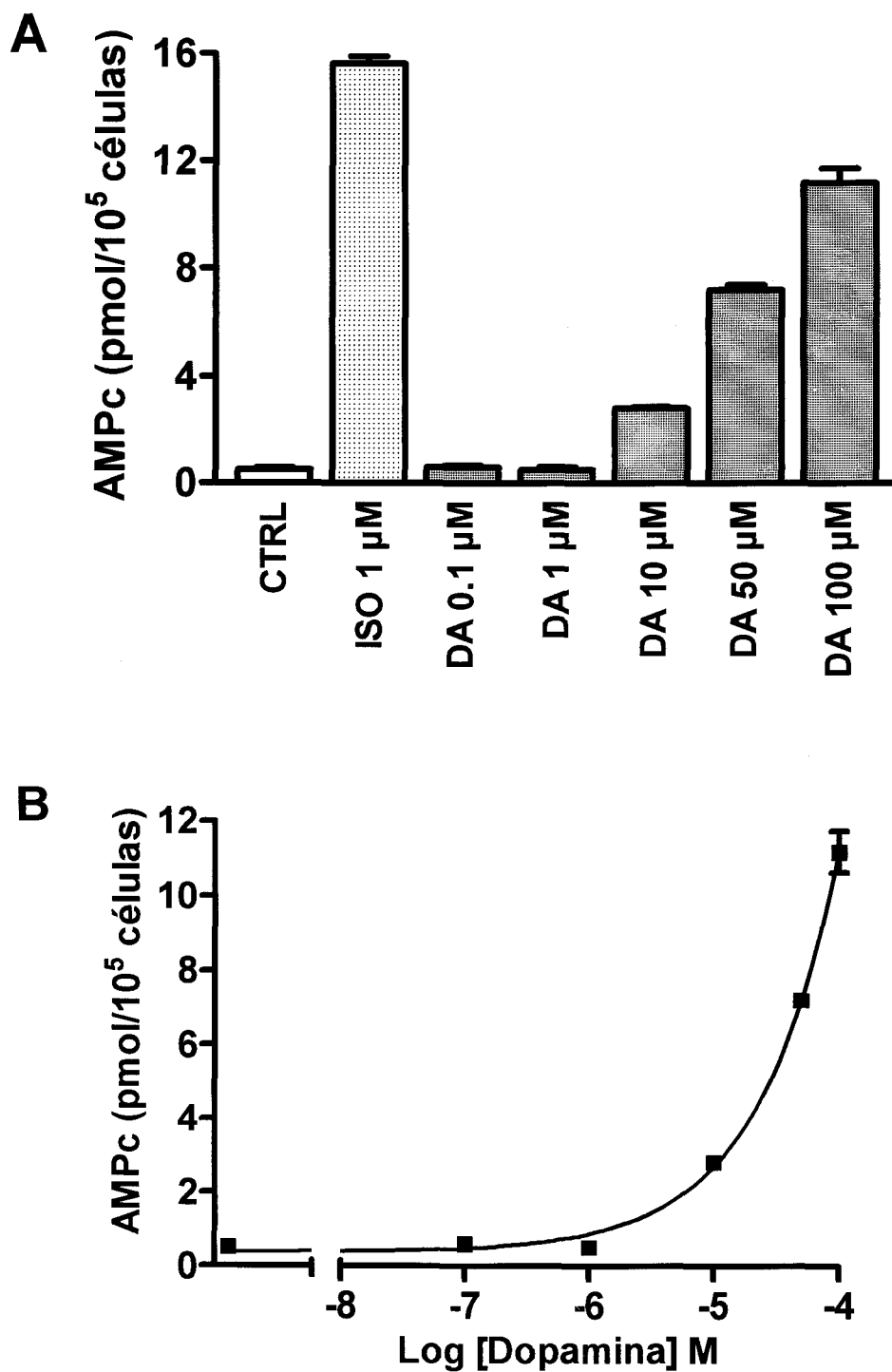
Estos resultados nos indican que la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  tras la estimulación con DA activa la vía de la PLC. El incremento en la hidrólisis de PI está mediado por una proteína del tipo Gq de la que se han descrito varios subtipos ( $\alpha_q$ ,  $\alpha_{11}$ ,  $\alpha_{14}$ ,  $\alpha_{15/16}$ ), con distinta sensibilidad a la toxina *pertussis* (PTX). Así, por ejemplo, los receptores muscarínicos  $m_1$  y  $m_3$  producen incrementos de PI mediante la activación de una proteína G resistente a PTX, mientras que, la activación de receptores  $m_2$  y  $m_4$  tras la incubación con PTX abole totalmente el incremento de la hidrólisis de PI (Ashkenazi *et al.*, 1989). En neuronas y células gliales de rata en cultivo el tratamiento con PTX disminuye la formación de IPs tras la estimulación con noradrenalina, fundamentalmente a través de una proteína G que se acopla preferentemente a receptores adrenérgicos  $\alpha_{1A}$  (Wilson y Minneman, 1990). En el presente trabajo se estudió si el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por DA era afectado por la preincubación de las células con PTX. La concentración utilizada fue de 280 ng/ml durante 19 horas. En todas las células probadas ( $n=5$ ) la amplitud de los incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a DA fue similar a la de los controles, al igual que ocurre con el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por fenilefrina, agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico, que no es sensible a PTX (Marín *et al.*, 1996), lo que sugiere que el incremento de IPs en estas células tiene lugar mediante la activación de una proteína G PTX-insensible.

### 3. INCREMENTO DE LOS NIVELES DE AMPc MEDIADO POR DA

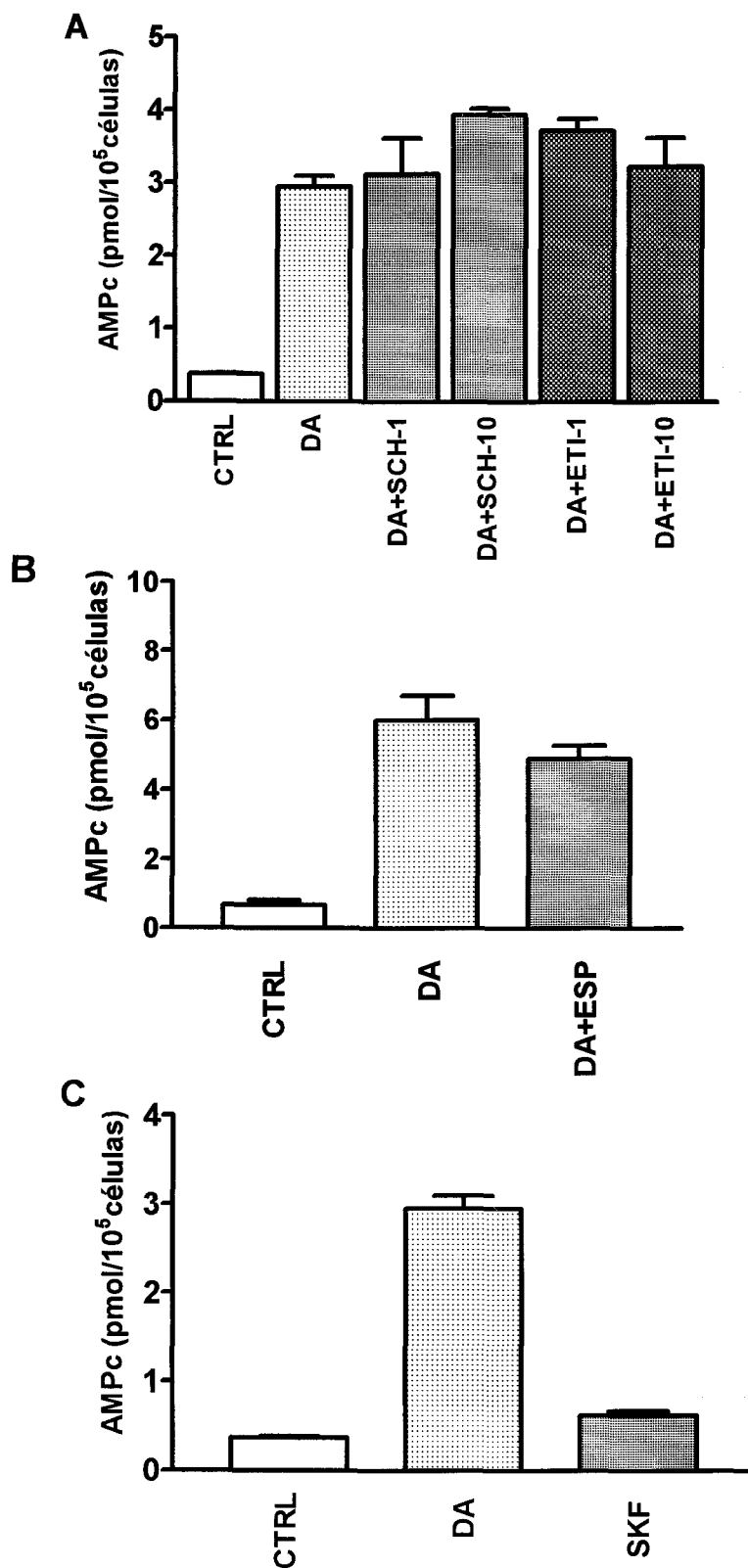
Los niveles intracelulares de AMPc fueron medidos en células en cultivo primario para determinar si esta vía de señalización intracelular se activa tras la exposición de las células a DA.

Los niveles de AMPc intracelulares se determinaron tras la estimulación con DA entre 0.1-100  $\mu\text{M}$  (**Figura 40**). Se produjeron aumentos significativos de la concentración de AMPc intracelular a partir de aplicaciones de DA  $\geq 10 \mu\text{M}$  ( $n=2$ ), lograndose valores máximos a 100  $\mu\text{M}$  DA. Concentraciones de DA  $\leq 1 \mu\text{M}$  ( $n=2$ ) no generaron incrementos en los niveles de AMPc. También se utilizó isoproterenol (agonista de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos) (1  $\mu\text{M}$ ) con fines comparativos. La concentración de AMPc inducida por isoproterenol fue entre 1.6-4 veces mayor que la generada por DA (100  $\mu\text{M}$ ) (3 experimentos).

Para estudiar si el incremento de AMPc en respuesta a DA se debe a la activación de receptores dopaminérgicos se aplicaron diferentes antagonistas de la familia  $D_1$  y  $D_2$ . La aplicación de SCH23390 (antagonista  $D_1$ ), eticloprida (ETI) y espiperona (ESP) (antagonistas  $D_2$ ) no modificó significativamente la concentración de AMPc alcanzada tras la estimulación con DA (**Figura 41, A y B**). Estos experimentos sugieren que el incremento de AMPc que produce la DA no ocurre a través de la activación de receptores dopaminérgicos. Los resultados que se muestran en la parte C de la **Figura 41** apuntan, así mismo, en este sentido. En este experimento se aplicó SKF38393, agonista de los receptores dopaminérgicos del tipo  $D_1$ , receptores que



**Figura 40.** La estimulación con DA induce incremento en la [AMPc] **A.** Valores medios ( $\pm$  eem) de AMPc, en respuesta a la estimulación con DA (0.1, 1, 10, 50 y 100  $\mu$ M) ( $n=26$ ). **B.** Representación semilogarítmica de la producción de AMPc en función de la concentración de DA.



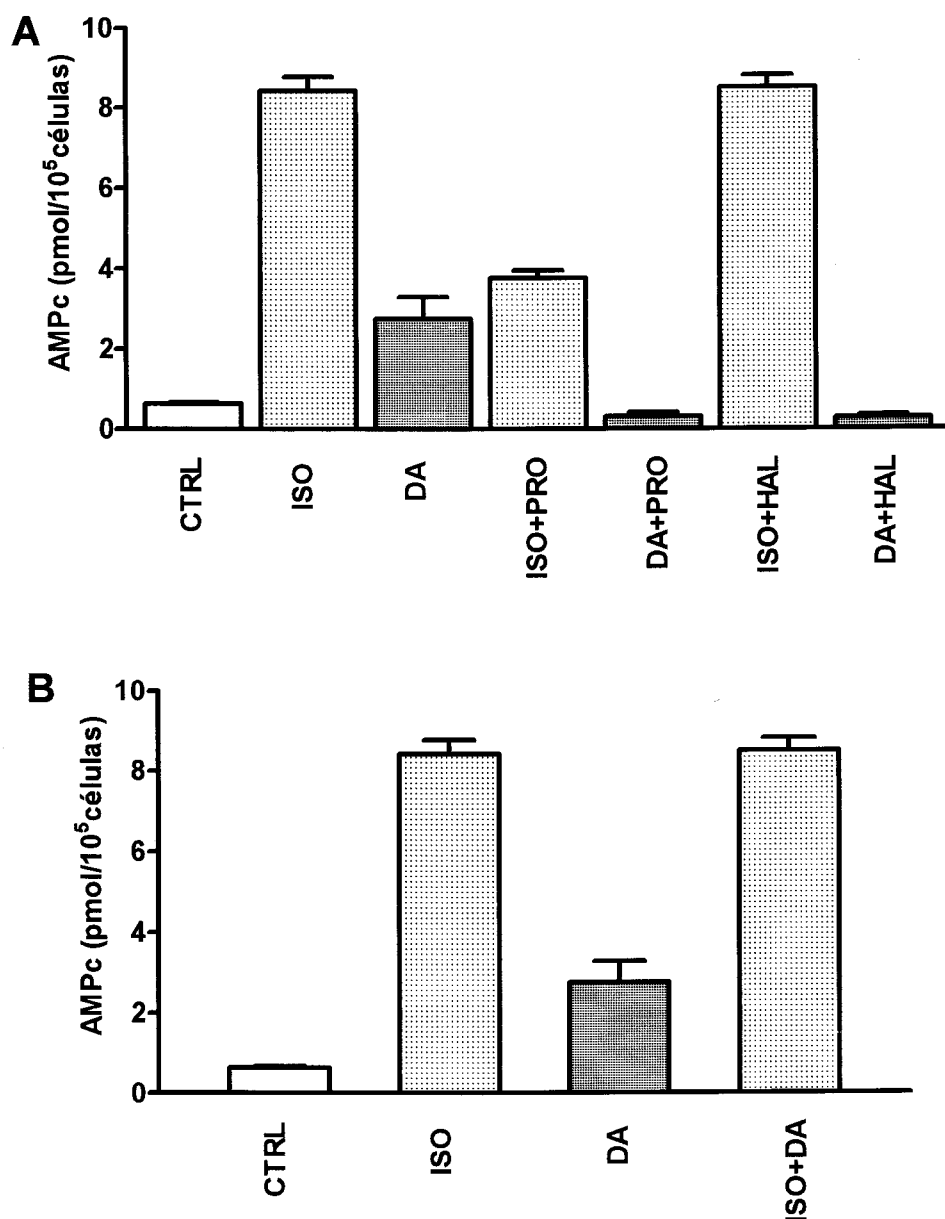
**Figura 41.** A. y B. Efecto de antagonistas dopaminérgicos sobre el incremento de AMPc en respuesta a DA (50  $\mu$ M) en dos experimentos. SCH23390 1 y 10  $\mu$ M ( $n=10$ ). Eticloprida 1 y 10  $\mu$ M ( $n=10$ ). Espiperona 0.1  $\mu$ M ( $n=4$ ). C. Comparación de los niveles de AMPc tras la estimulación con DA (50  $\mu$ M) y SKF38893 (1  $\mu$ M) ( $n=4$ ).

aumentan los niveles intracelulares de AMPc, y no se produjo incremento significativo del segundo mensajero.

El que el incremento de AMPc en respuesta a DA no se inhibiera por SCH23390 y espiperona contrasta con la inhibición que producen estos antagonistas sobre los incrementos de la  $[Ca^{2+}]_i$  (véase Tabla X), lo que sugiere que la DA activa más de una vía de señalización intracelular (véase Discusión).

La aplicación de propranolol (0.5  $\mu$ M), antagonista de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, disminuyó la respuesta a DA un 85 % ( $n=4$ , 2 experimentos) (**Figura 42, A**), efecto similar que el producido por este antagonista tras la estimulación con isoproterenol ( $n=5$ , 1 experimento). Los niveles de AMPc tras la estimulación conjunta de isoproterenol y DA ( $n=5$ , 2 experimentos) no fueron significativamente distintos a los obtenidos con solo isoproterenol (**Figura 42, B**). Estos resultados sugieren que el receptor sobre el que ejerce su acción la DA podría ser de tipo  $\beta$ -adrenérgico.

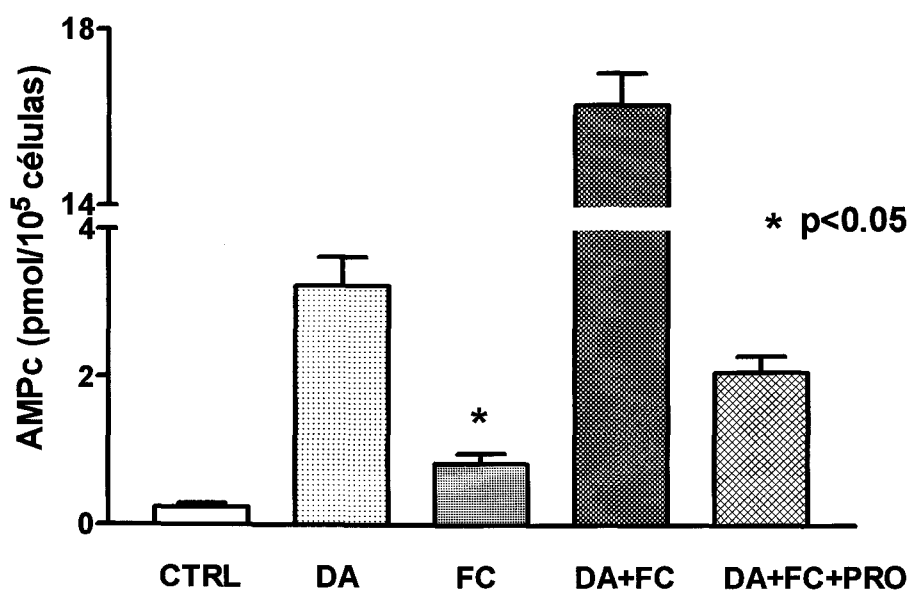
La aplicación de haloperidol (1 $\mu$ M) inhibió totalmente la respuesta a DA ( $n=5$ , 1 experimento) (**Figura 42, A**), mientras que, no disminuyó la respuesta a isoproterenol ( $n=5$ , 2 experimentos).



**Figura 42.** Los niveles de AMPc son inhibidos por antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos y dopaminérgicos. **A.** Incremento de la [AMPc] tras la estimulación con isoproterenol (ISO) ( $1 \mu\text{M}$ ) ( $n=5$ ) y DA ( $50 \mu\text{M}$ ) ( $n=5$ ). La aplicación de propranolol (PRO) ( $0.5 \mu\text{M}$ ) ( $n=9$ ) inhibió ambas respuestas, mientras que con haloperidol (HAL) ( $1 \mu\text{M}$ ) ( $n=9$ ) la respuesta de isoproterenol no es afectada y la respuesta a DA es inhibida totalmente. **B.** La estimulación conjunta de isoproterenol y DA no potenció la respuesta de AMPc.

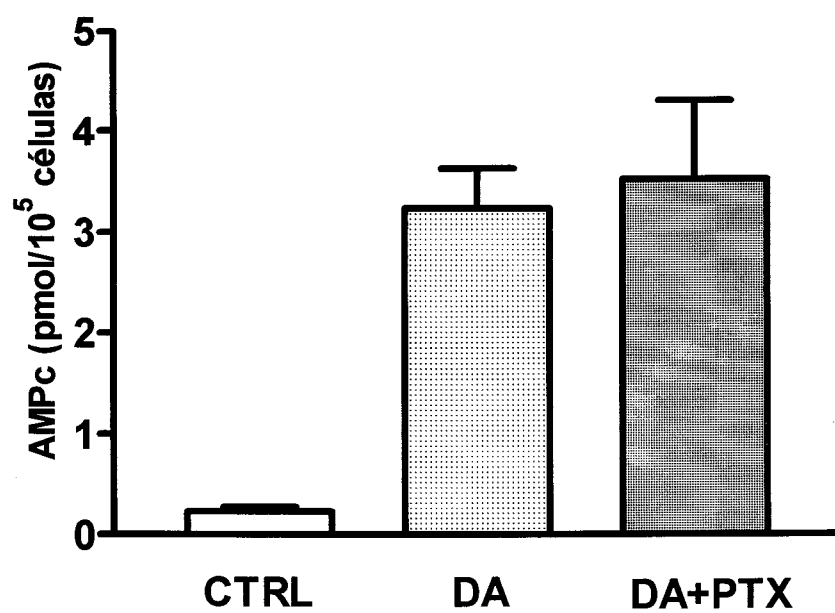
La preincubación de las células con forskolina, activador de la adenilato ciclasa (Laurenza *et al.*, 1989), durante 40 minutos aumentó significativamente los niveles citoplasmáticos de AMPc y potenció el incremento de AMPc hasta 5 veces los valores controles tras la estimulación con DA (50  $\mu$ M) ( $n=4$ ). Esta respuesta, se inhibió al adicionar propranolol (1  $\mu$ M) ( $n=4$ ) (**Figura 43**).

La incubación de las células con PTX (240 ng/ml) (19h), no modificó de forma significativa la producción de AMPc tras la estimulación con DA (50  $\mu$ M) ( $n=8$ ) (**Figura 44**). Este experimento nos sugiere que el incremento de AMPc se produce a través de un receptor acoplado a proteína Gs.



**Figura 43.** Incremento de los niveles de AMPc tras la preincubación con forskolina (FC). DA (50  $\mu$ M), forskolina (10  $\mu$ M), propranolol (PRO) (1  $\mu$ M) ( $n=4$ ).





**Figura 44.** La incubación con toxina *pertussis* (PTX) (240 ng/ml) (19h) ( $n=$ ) no inhibió la producción de AMPc de la respuesta a DA (50  $\mu$ M) ( $n=4$ ).

## 4. AMPLIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DEL ADNc

Con el propósito de establecer la identidad molecular de los receptores catecolaminérgicos que se expresan en los pinealocitos de rata, se empleó la técnica de PCR para amplificar el ADNc obtenido a partir del ARNm extraído de glándulas pineales. Así mismo, se procesó en paralelo ARNm procedente de cerebro de los mismos animales el cuál fue utilizado como control. Los fragmentos amplificados se secuenciaron y compararon en la base de datos del genbank.

### 4.1. Comparación de secuencias y diseño de cebadores

El diseño de los oligonucleótidos (DOP-1 y DOP-2) se realizó tras el alineamiento y comparación de las secuencias de receptores adrenérgicos y dopaminérgicos de rata, humano, *xenopus* y *drosophila*, para determinar secuencias conservadas.

Para el diseño del primer oligonucleótido (DOP-1) se eligieron los aminoácidos más conservados del III STM y se hicieron degeneraciones en dos de los siete aminoácidos que lo componen (ver Figura 8 de Introducción y Figura 45). De igual forma, el segundo oligonucleótido (DOP-2) se diseñó con siete aminoácidos del VI STM y se degeneraron cuatro aminoácidos, este oligonucleótido también es llamado de complemento inverso ya que la dirección de hibridación entre oligonucleótidos debe ser en sentido contrario para amplificar la región comprendida entre ellos (ver apartado 5.2 de Materiales y Métodos). La distancia comprendida entre los oligonucleótidos

elegidos fue de 555 pb. En la región comprendida entre el III STM y VI STM se encuentra el sitio de unión para catecolaminas, además del segundo y tercer lazos intracelulares, que se cree forman parte del sitio de unión a proteínas G en receptores catecolaminérgicos (O'Dowd *et al.*, 1988; Dearry *et al.*, 1990).

#### 4.2. Transformación

Los fragmentos de ADN amplificados mediante PCR obtenidos de glándula pineal y cerebro de rata, fueron de un tamaño aproximado de 560 pb, identificados por medio de un gel de agarosa (**Figura 46, A**). Posteriormente, en el proceso de ligazón se unieron a un plásmido por medio de ligasas. El plásmido utilizado fue el pBluescript SK+/- (PBS), que posee un gen resistente a la ampicilina y dos sitios específicos para restrictasas (Eco-RI y ClaI) donde fue cortado permitiendo el acoplamiento del fragmento de ADN amplificado al plásmido.

El procedimiento de transformación se realizó con bacterias competentes de *E. Coli* que permitieron la entrada del plásmido junto con el fragmento de ADN tras un choque térmico. Posteriormente, se incubaron las bacterias en medio rico en ampicilina, donde sobrevivieron las colonias que contenían el plásmido y por lo tanto les confería resistencia en dicho medio.

**Figura 45.** Tras el alineamiento y comparación de los segmentos transmembranarios III y VI de receptores adrenérgicos y dopaminérgicos, se determinó la secuencia de los oligonucleótidos DOP-1 y DOP-2.

	III STM			VI STM			
$\alpha_{1A}(\mathbf{r})$	CDVWAAVDVL	CCTASILSLC	TISVDRYVGV	KKAAKTLAIV	VGVFVLCWFP	FFFVLP	PLGSL
$\alpha_{1B}(\mathbf{r})$	CDIWAAVDVL	CCTASILSLC	AISIDRYIGV	KKAAKTLGIV	VGMFII	CWLP	FFIALPLGSL
$\alpha_{2g10}(\mathbf{r})$	CGVYLALDVL	FCTSSIVHLC	AISLDRYWSV	KRFTFVLAVV	MGVFVLCWFP	FFF	SYSLYGI
$\alpha_{2g20}(\mathbf{r})$	CEIYLALDVL	FCTSSIVHLC	AISLDRYWSI	KRFTFVLAVV	IGVFVVCWFP	FFF	TYTLIAV
$\alpha_{2B}(\mathbf{r})$	CEVYLALDVL	FCTSSIVHLC	AISLDRYWAV	KRFTFVLAVV	IGVFVVCWFP	FFF	SYSLGAI
$\beta_1(\mathbf{r})$	CELWTSVDVL	CVTASIIETLC	VIALDRYLAI	QKALKTLGII	MGVFTLCWLP	FFL	ANVVKAF
$\beta_2(\mathbf{h})$	CEFWTSIDVL	CVTASIIETLC	VIAVDRYFAI	.....	.....	.....	.....
$\beta_A(\mathbf{r})$	CELWTSVDVL	CVTASIIETLC	ALAVDRYLAV	HRALRTLGLI	MGIFSL	CWLP	FFLANVLRAL
$D_1(\mathbf{h})$	CNIWVAFDIM	CSTASILNLC	VISVDRYWAI	TKVLKTLSVI	MGVFVVCWLP	FFI	LNCILPF
$D_{1A}(\mathbf{r})$	CNIWVAFDIM	CSTASILNLC	VISVDRYWAI	TKVLKTLSVI	MGVFVVCWLP	FFI	SNCMVPF
$D_5(\mathbf{h})$	CDVWVAFDIM	CSTASILNLC	VISVDRYWAI	TKVLKTLSVI	MGVFVVCWLP	FFI	LNCMVFP
$D_{1B}(\mathbf{r})$	CDIWVAFDIM	CSTASILNLC	IISVDRYWAI	TKVFKTLSMI	MGVFVVCWLP	FFI	LNCMVFP
$D_{2A}(\mathbf{h})$	CDIFVTLDIM	MCTASILNLC	AISIDRYTAV	KKATQMLAIV	LGVFII	CWLP	FFITHILNIH
$D_{2A}(\mathbf{r})$	CDIFVTLDVM	MCTASILNLC	AISIDRYTAV	KKATQMLAIV	LGVFII	CWLP	FFITHILNIH
$D_2(\mathbf{x})$	CDIFVTLDVM	MCTASILNLC	AISIDRYTAV	KKATQMLAIV	LGVFII	CWLP	FFI IHILNMH
$D_3(\mathbf{r})$	CDVFVTLDVM	MCTASILNLC	AISIDRYTAV	KKATQMVVIV	LGAFIV	CWLP	FFLTHVLNTH
$D_4(\mathbf{h})$	CDALMAMDVM	LCTASIFNLC	AISVDRFVAV	RKAMRVLPVV	VGAFLL	CWTP	FFVWHITQAL
<b>dopr35ef</b>	CDTWVAFDVM	CSTASILNLC	AISMDRYLHI	HKAAVTVGVI	MGVFLL	CWVP	FFCVNITAAF

DOP-1

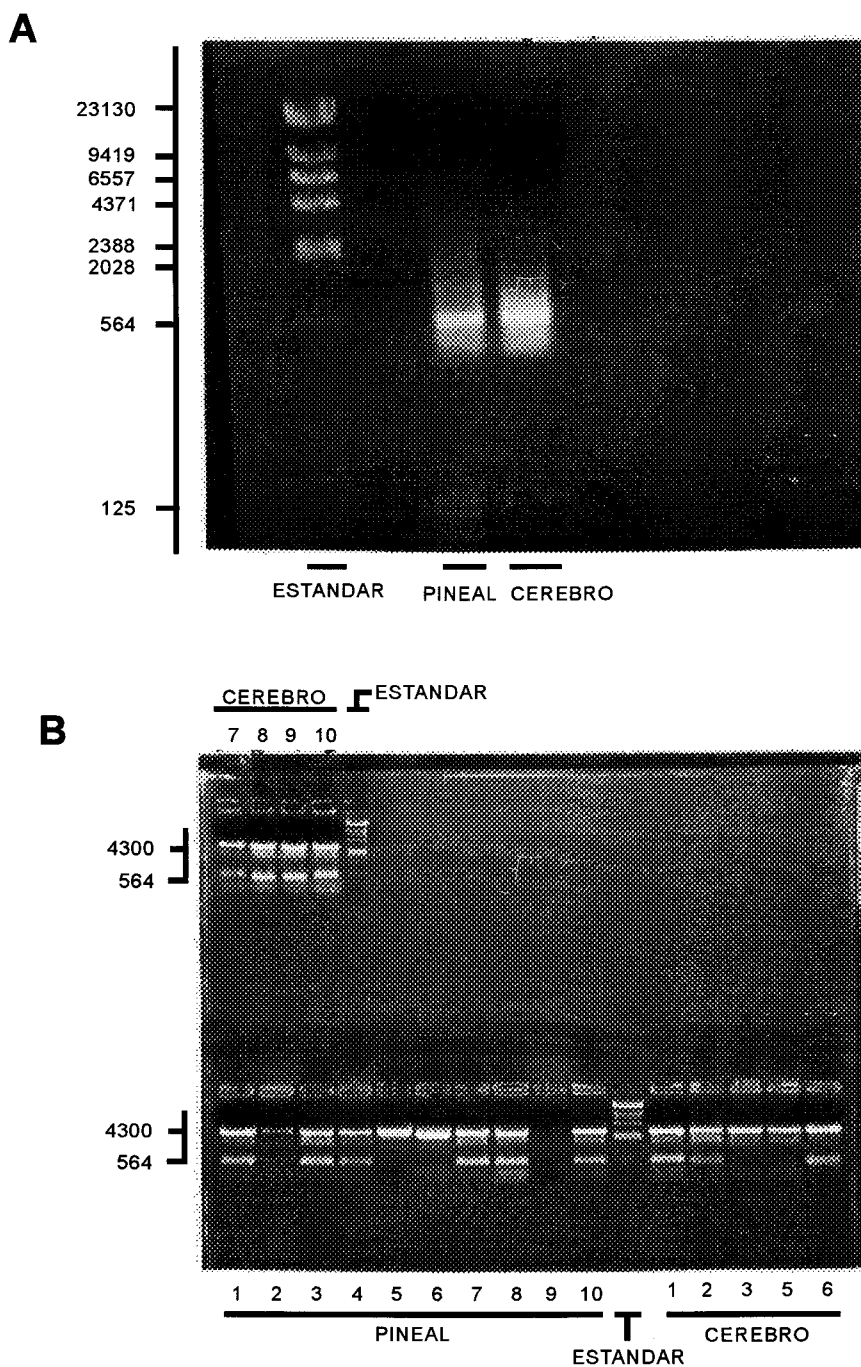
DOP-2

Figura 43. Alineamiento de los STM III y VI.

Una vez seleccionadas las colonias se tomaron 19 muestras, de las cuales 10 correspondían a glándula pineal y 9 a cerebro. De las muestras de glándula pineal, cuatro no presentaron el inserto, mientras que, de las muestras de cerebro solamente dos no lo tenían. La presencia del plásmido (4300 pb) y del inserto (560 pb), cuyo tamaño se correspondió con la distancia comprendida entre los oligonucleótidos utilizados, se evidenciaron por medio de un gel de agarosa (**Figura 46, B**). Estos datos nos indican que el fragmento de ADN amplificado se encuentra en las muestras P1, P3, P4, P7, P8, P10 y C1, C2, C6, C7, C8, C9, C10 procedentes de glándula pineal y cerebro de rata.

#### 4.3. Secuenciación

Se secuenciaron 6 muestras de glándula pineal y dos de cerebro pudiéndose leer en promedio 124 bases nucleicas que se evidenciaron por medio de un gel de poliacrilamida. El orden de aparición de las bases nucleicas presentes en cada muestra, se agruparon por triadas y se transfirieron en riguroso orden de aparición al programa BLAST (basic local alignment search tool). Este programa compara las secuencias de nucleótidos obtenidas tras la secuenciación, con la base de datos del genbank, proporcionando un listado de las secuencias más homólogas. De esta comparación, se obtuvo que la mayoría de las muestras obtenidas de pineal tienen una alta homología con el receptor  $\alpha_{1B}$  adrenérgico de rata con el que comparte entre un 87 % y 97 % de identidad (**Tabla XII**). Las secuencias procedentes de cerebro se identificaron como receptores  $D_1$  y  $5HT_{1B}$  de rata, lo que confirma



**Figura 46.** Fragmento de ADN de glándula pineal y cerebro de rata amplificado mediante PCR. **A.** Banda de ADN de aproximadamente 560 pb presente tanto en las muestras de pineal como de cerebro. **B.** La banda de ADN de 4300 pb corresponde al plásmido y la banda de 560 pb al inserto presentes en las muestras P1, P3, P4, P7, P8, P10 y C1, C2, C6, C7, C8, C9, C10 procedentes de glándula pineal y cerebro de rata.

que con los cebadores utilizados se pueden identificar receptores dopaminérgicos y serotoninérgicos.

**Tabla XII.** Porcentaje de homología de las muestras de ADNc de glándula pineal (P) y cerebro (C) de rata tras ser comparadas sus secuencias en el genbank.

Muestra de ADNc	Bases	Homología	Receptor identificado
P1	166	94%	$\alpha_{1B}$ (r)
P3	63	92 %	$\alpha_{1B}$ (r)
P4	146	87 %	$\alpha_{1B}$ (r)
P7	119	94 %	$\alpha_{1B}$ (r)
P8	146	87 %	$\alpha_{1B}$ (r)
P10	158	90 %	$\alpha_{1B}$ (r)
C1	130	91 %	5HT <sub>1B</sub> (r)
C2	113	97 %	D <sub>1</sub> (r)

Ninguna de las secuencias obtenidas procedentes de glándula pineal se identificaron como correspondientes a receptores dopaminérgicos. Tampoco se encontraron secuencias de los subtipos de receptores adrenérgicos  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1C}$ , ó  $\alpha_{1D}$ . Estos resultados nos indican que el receptor adrenérgico mayoritario en pineal es el subtipo  $\alpha_{1B}$ , aunque hay que tener en cuenta que solamente se realizaron 6 secuenciaciones, lo que no descarta la posible existencia de otros receptores de esta familia en la pineal de rata.

## DISCUSIÓN

El presente trabajo desarrollado por medio de la aplicación de diferentes técnicas como el registro de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular por microfluorimetría, determinación de AMPc por enzima inmuno ensayo (EIA), determinación de inosítoles fosfato (IPs) con tritio radiactivo y la clonación de material genético por medio de técnicas de biología molecular, permitió el estudio de aspectos farmacológicos, bioquímicos y moleculares implicados en los mecanismos de respuesta ante la estimulación con DA en células de glándula pineal de rata. El objetivo de este estudio se centró en la identificación del receptor que media el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en pinealocitos tras la estimulación con DA.

### 1. SEÑAL DE $\text{Ca}^{2+}$ INDUCIDA POR DA

El efecto de la DA sobre la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en pinealocitos de rata no ha sido descrito con anterioridad. Sin embargo, en células pineales de bovino se han encontrado receptores dopaminérgicos de la familia  $D_1$  y  $D_2$  (Govitrapong *et al.*, 1984; Simonneaux, *et al.*, 1990; Simonneaux, *et al.*, 1991) implicados en la regulación y síntesis de melatonina (Govitrapong *et al.*, 1989).



En este trabajo se ha observado que el incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular inducido por DA se debió tanto a la entrada de  $Ca^{2+}$  del medio externo como a la liberación de almacenes intracelulares. En la mayoría de nuestros experimentos, se utilizó 5  $\mu$ M DA, valor de la  $CE_{50}$  obtenida en la curva dosis-respuesta; este valor está en el rango de afinidad de la DA por los receptores dopaminérgicos  $D_1$  y  $D_2$ , es superior al de los receptores  $D_4$  y  $D_5$  (afinidad submicromolar) y mucho mayor que la afinidad para el receptor  $D_3$  (afinidad nanomolar) (Álamo, *et al.*, 1996).

### **Significado funcional de la DA en la glándula pineal**

La DA ha sido implicada en la regulación y síntesis de la melatonina en la glándula pineal de rata (Axelrod *et al.*, 1962) y en la pineal bovina (Govitrapong *et al.*, 1989). En glándula pineal ovina, la DA (10  $\mu$ M) incrementa la producción de AMPc (Morgan *et al.*, 1988). Aunque no existen evidencias claras de inervación dopaminérgica en la glándula pineal, algunos autores han reportado la identificación, en glándulas de rata, de células con actividad tirosina hidroxilasa sin capacidad para sintetizar noradrenalina (Racké *et al.*, 1989). Así mismo, se ha reportado la persistencia de actividad tirosina hidroxilasa en glándulas previamente denervadas de los ganglios cervicales superiores (Hernandez *et al.*, 1994).

La retina comparte numerosas características con la glándula pineal de mamífero (Ebadi *et al.*, 1989). En la retina, donde están presentes tanto receptores dopaminérgicos tipo  $D_1$  (Watling *et al.*, 1979; Makman *et al.*, 1980; Redburn *et al.*, 1989; Watling e Iversen,

1981) como tipo D<sub>2</sub> (Dubocovitch y Weiner, 1981; 1985; Iuvone, 1986), la inhibición de la actividad de la NAT y de la melatonina depende de la activación de receptores dopaminérgicos tipo D<sub>2</sub> (Zawilska e Iuvone, 1989).

Estudios de unión de radioligandos han postulado la existencia de receptores dopaminérgicos tipo D<sub>1</sub> (Simonneaux *et al.*, 1990) y D<sub>2</sub> (Govatirong *et al.*, 1984) en la glándula pineal bovina. Así mismo, la determinación autorradiográfica de la densidad de receptores catecolaminérgicos en la pineal bovina (D<sub>1</sub>>α<sub>1</sub>>D<sub>2</sub>>β<sub>1</sub>) sugiere que no solo los receptores adrenérgicos tienen un papel importante en la función de la pineal sino también los receptores dopaminérgicos (Simonneaux *et al.*, 1991). Un estudio similar no se ha realizado aún en rata.

## **2. EL INCREMENTO DE Ca<sup>2+</sup> MEDIADO POR DA SE PRODUCE A TRAVÉS DE LA VÍA DE LOS IPs**

Los resultados de nuestros experimentos muestran que la estimulación con DA produce incrementos en los niveles de IPs concentración y tiempo dependientes. La espiperona, antagonista dopaminérgico D<sub>2</sub> y α<sub>1B</sub>- adrenérgico, inhibió completamente el incremento de IPs a una concentración de 100 nM, tanto cuando se estimuló con DA como con fenilefrina. A esta concentración de espiperona también se inhibió el 100 % del incremento de Ca<sup>2+</sup> inducido por DA.

Los receptores dopaminérgicos de las familias D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> se acepta clásicamente que producen estimulación ó inhibición de la AC,

respectivamente (Kebabian y Calne, 1979; Stoof y Kebabian, 1981; Onali *et al.*, 1984). Sin embargo, existen algunas evidencias en la literatura de que los receptores dopaminérgicos pueden activar, así mismo, la hidrólisis de PI, a la vez o de forma independiente de su acción sobre la AC. Estudios realizados en membranas de corteza renal y de tubulos renales de rata han mostrado que la aplicación de un agonista de receptores dopaminérgicos tipo D<sub>1</sub> (SKF82526) incrementa la actividad de la PLC y los niveles de IPs en membranas previamente incubadas con [<sup>3</sup>H]-myoinositol, incremento que se bloquea por SCH23390, antagonista D<sub>1</sub>, pero no por fentolamina o prazosín, antagonistas  $\alpha$ -adrenérgicos (Felder *et al.*, 1989). Así mismo se ha demostrado que la estimulación de receptores dopaminérgicos procedentes de núcleo estriado de rata, expresados en ovocitos de *Xenopus*, da lugar a un incremento en la producción de IPs y a la movilización de Ca<sup>2+</sup> intracelular (Mahan *et al.*, 1990). Estos autores mostraron que tras la estimulación con DA se generan corrientes de cloro dependientes de Ca<sup>2+</sup>. Estas corrientes fueron reproducidas por el SKF38393, agonista D<sub>1</sub>, pero no por quinpirola, agonista D<sub>2</sub>. Cuando se incubaron los ovocitos con dbAMPC (1 mM) no se observó efecto sobre los niveles de IPs o Ca<sup>2+</sup>, sugiriéndose que en el estriado de rata hay receptores dopaminérgicos tipo D<sub>1</sub> que estimulan la movilización de Ca<sup>2+</sup> independientemente de la activación de la AC.

El incremento de los niveles de IPs a través de un receptor dopaminérgico se ha estudiado, así mismo, en rodajas de cerebro de rata (Undie *et al.*, 1990). Estos experimentos mostraron que tras la incubación con DA, apomorfina ó SKF38393 se producían acumulaciones significativas de IPs en el estriado, hipocampo y

amígdala. En nuestros experimentos, aunque la DA incrementó los niveles de IPs y la  $[Ca^{2+}]_i$ , los agonistas dopaminérgicos no reprodujeron estas respuestas, lo que sugiere que los receptores activados por la DA en las células pineales de rata no son de tipo dopaminérgico.

### 3. CÉLULAS INSENSIBLES A DA

En nuestros experimentos no todas las células que respondieron a fenilefrina respondieron a DA. El porcentaje de células insensibles a DA varió mucho con cada preparación. Para probar si el tratamiento enzimático afectaba a los receptores que median la respuesta a DA se realizaron una serie de experimentos en los que las células sólo se dispersaron mecánicamente; las respuestas observadas en estos experimentos no difirieron de las obtenidas en las células que habían recibido tratamiento enzimático.

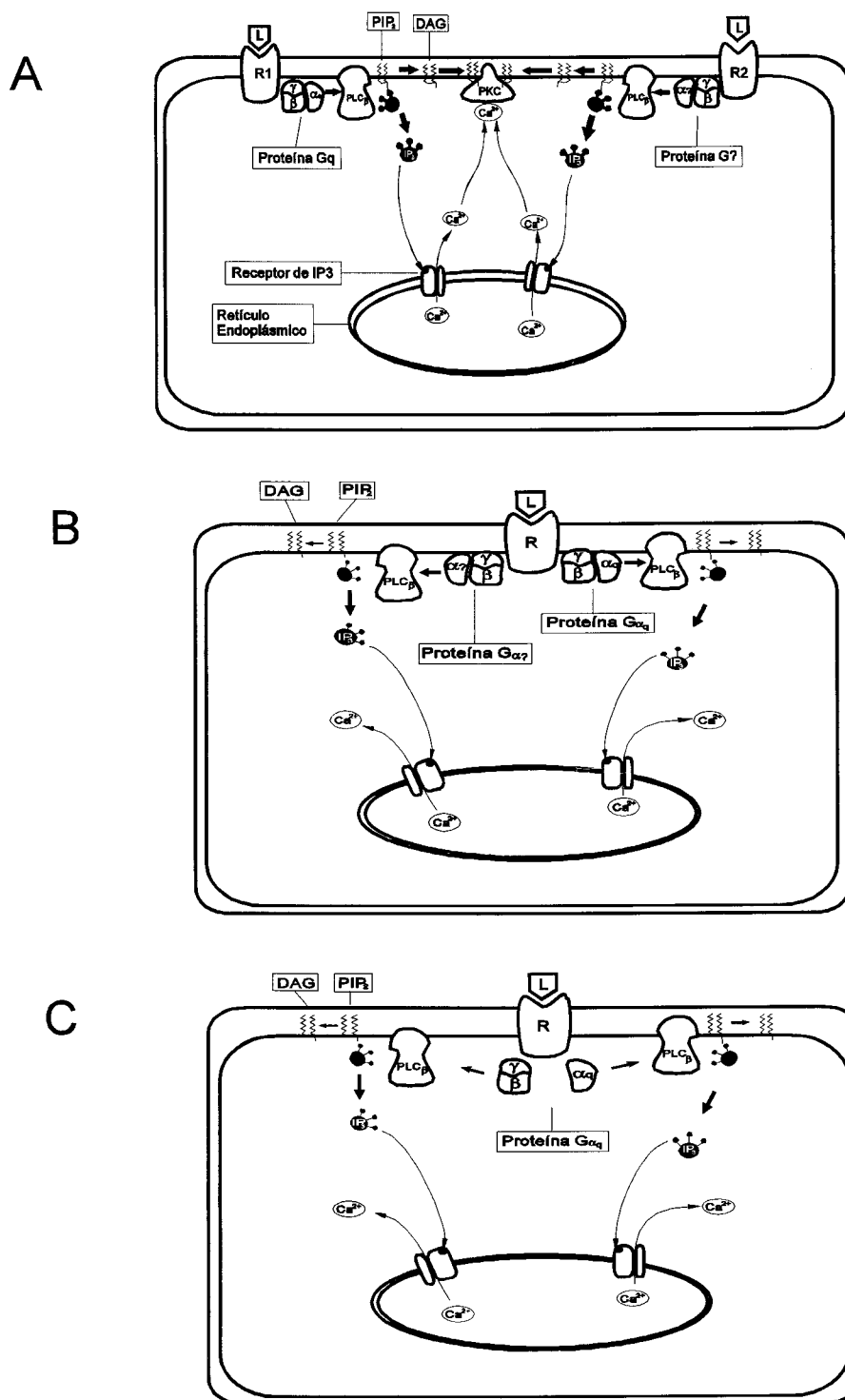
En células que respondieron a DA y fenilefrina la distinta velocidad de desensibilización de las respuestas pudiera deberse a distintas causas. La primera, es que estos neurotransmisores estén actuando sobre receptores distintos que convergen hacia una vía común que finaliza en un incremento transitorio en la  $[Ca^{2+}]_i$  (**Figura 47,A**). La segunda posibilidad, es que estén actuando sobre un único receptor al que se acoplan distintos tipos de proteínas G que, a su vez, activan distintas isoformas de fosfolipasa C (**Figura 47, B**). Alternativamente, una tercera posibilidad, es que actúen sobre un mismo receptor y proteína G, cuyas subunidades ( $\alpha$  y  $\beta\gamma$ ) actúan de forma independiente (**Figura 47, C**). A este respecto, se conoce que

tanto la subunidad  $\alpha$  como la  $\beta\gamma$  de la proteína Gq son capaces de activar distintas isoformas de PLC $\beta$  (Clapham y Neer, 1993). En nuestros experimentos, sin embargo, los resultados farmacológicos apuntan hacia la primera posibilidad.

#### 4. INCREMENTO DE LOS NIVELES DE AMPc POR DA

En nuestros experimentos la DA produjo un incremento concentración dependiente de los niveles intracelulares de AMPc (Figura 40). Este incremento no se debió a la activación de receptores dopaminérgicos ya que no se inhibió por los antagonistas SCH23390, eticloprida o espiperona, ni se reprodujo con SKF38393, agonista de la familia D<sub>1</sub> (Figura 41). Para comprobar si la DA pudiera estar actuando a través de receptores  $\beta$ -adrenérgicos se estudió la respuesta en presencia de propranolol (0.5  $\mu$ M). Este antagonista inhibió el incremento de AMPc inducido por DA, incluso de forma más eficaz que cuando se estimuló con isoproterenol (85% y 59%, respectivamente) (Figura 42, A).

Estos resultados sugieren que el incremento de AMPc inducido por DA se produce a través de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, tal como ocurre cuando se estimula con una alta concentración de fenilefrina, en estas mismas células (Vanecek *et al.*, 1985). En estudios realizados en adipocitos de rata se ha demostrado que la DA activa los receptores  $\beta_3$ -adrenérgicos estimulando la producción de AMPc (Lee *et al.*, 1998). Igualmente, en plaquetas humanas se ha encontrado que la acción de la DA tiene lugar principalmente mediante la activación de receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Anfossi *et al.*, 1993). También es conocido que la DA



**Figura 47.** Modelos de desensibilización que median el incremento de  $Ca^{2+}$  tras la estimulación con DA y fenilefrina. **A.** Dos receptores diferentes acoplados a la misma o distintas proteínas G. **B.** Un mismo receptor acoplado a dos proteínas G distintas que estimulan diferentes isoformas de PLC. **C.** Un mismo receptor acoplado a una proteína G que disocia sus subunidades  $\alpha$  y  $\beta\gamma$  para activar diferentes isoformas de PLC respectivamente.

tiene un efecto ionotrópico positivo en miocardio debido a la activación de receptores  $\beta$ -adrenérgicos. En nuestros experimentos, sin embargo, encontramos que cuando se utilizó como antagonista el haloperidol la inhibición de la respuesta a DA fue total, mientras que, no se vió afectada en el caso del isoproterenol (Figura 42, A). Este resultado pudiera deberse bien a que la afinidad del isoproterenol por el receptor  $\beta$ -adrenérgico es mucho mayor que la del haloperidol ó a que la DA estuviese produciendo el incremento de AMPc a través de un receptor distinto del  $\beta$ -adrenérgico, sensible al bloqueo por haloperidol y propranolol. Es poco probable que la producción de AMPc inducida por DA se produzca a través del mismo receptor que aumenta los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular ya que el propranolol, hasta una concentración de 10  $\mu$ M, no afecta estas últimas respuestas e, inversamente, los antagonistas dopaminérgicos (SCH23390, eticloprida y espiperona) no inhiben la producción de AMPc y si el incremento de  $Ca^{2+}$ .

Estos resultados indican que la DA en las células pineales activa dos vías de señalización intracelular. Por una parte la vía de la AC, dando lugar al incremento en los niveles de AMPc, y por otro la vía de los inositoles fosfatos, que incrementa la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$ .

## 5. FARMACOLOGÍA DE LOS RECEPTORES ACTIVADOS POR DA

El perfil farmacológico de los receptores que median el incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por DA es complejo. Ninguno de los agonistas dopaminérgicos tipo  $D_1$  y  $D_2$  utilizados, SKF38393,

quinpirola, apomorfina y bromocriptina, incrementaron la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Las concentraciones de agonistas utilizadas fueron mucho mayores que las necesarias para activar receptores dopaminérgicos tal y como se deduce de la comparación con los valores publicados en la literatura (**Tabla XIII**).

Los incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular inducidos por DA fueron bloqueados por antagonistas dopaminérgicos tipo  $\text{D}_1/\text{D}_2$ , aunque el perfil farmacológico obtenido no coincide con ninguno de los subtipos de receptores dopaminérgicos. En nuestros experimentos, la  $\text{CI}_{50}$  del haloperidol, clásicamente conocido como antagonista dopaminérgico, fue de 15 nM, valor intermedio a las  $\text{Kd}$  reportadas para los receptores dopaminérgicos  $\text{D}_1$  (27-203 nM) y  $\text{D}_2$  (0.45-9.8 nM) (Gingrich y Caron, 1993). Por el contrario, los valores inhibitorios obtenidos con SCH23390 ( $\text{Kd}=1700$  nM) estuvieron bastante alejados de los reportados para la inhibición de los receptores dopaminérgicos  $\text{D}_1$  ( $\text{Kd}=0.11-0.66$  nM). La  $\text{CI}_{50}$  para espiperona, antagonista de receptores dopaminérgicos  $\text{D}_2$  y  $\alpha_{1\text{B}}$ -adrenérgicos, fue de 20 nM, valor muy superior al reportado para bloquear los receptores dopaminérgicos  $\text{D}_2$  ( $\text{Kd}=0.03-0.6$  nM) (Gingrich y Caron, 1993). Estos datos sugieren fuertemente que la DA no está actuando a través de la activación de receptores dopaminérgicos.

Los experimentos realizados con prazosín, antagonista no selectivo de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, demostraron que este antagonista inhibe las respuestas con mayor potencia aún ( $\text{CI}_{50}\sim 3$  nM) que los antagonistas dopaminérgicos; este valor está próximo a la  $\text{Ki}$  reportada para el bloqueo de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos (0.14-1.2



nM) en diferentes tejidos de rata y humano (O'Malley *et al.*, 1998), lo que sugiere que la DA activa receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos. Este hecho no es sorprendente dada la similitud química entre las distintas moléculas de catecolaminas (Figura 2). En la mayoría de los experimentos hemos comparado el efecto de la DA con el de la fenilefrina, cuya diferencia con la adrenalina es la ausencia de un grupo hidroxilo en el carbono cuatro del anillo bencénico. La potencia de la DA para inducir incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  fue aproximadamente ocho veces menor que la de la fenilefrina (Marín *et al.*, 1996).

Experimentos de autorradiografía en glándula pineal bovina donde se ha reportado la existencia de receptores dopaminérgicos del tipo  $D_1$  y  $D_2$ , muestran valores de Kd para SCH23390 mucho menores (3000 veces) que los encontrados en nuestros experimentos pero compatibles con los valores de inhibición reportados para los receptores dopaminérgicos. De forma similar los valores de Kd para espiperona son 100 veces menores que nuestros resultados, pero muy próximos a los valores reportados para receptores dopaminérgicos  $D_2$ . Por tanto, es probable que la discrepancia entre nuestros resultados y los encontrados en la glándula pineal bovina se deba a diferencia entre especies.

Es de interés el efecto inhibitorio sobre los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos de los antagonistas dopaminérgicos, máxime cuando las concentraciones inhibitorias para algunos de ellos son iguales e incluso menores que para los receptores dopaminérgicos. A este respecto, se ha reportado la influencia inhibitoria del haloperidol sobre los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos en las respuestas de IPs y AMPc generadas

con noradrenalina (Nalepa, 1993) en cerebro de rata. Además, los antipsicóticos son fundamentalmente antagonistas de receptores dopaminérgicos  $D_2$  pero también bloquean con alta afinidad los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos (Gingrich y Caron, 1993); por ejemplo, la olanzapina antipsicótico atípico presenta alta afinidad por receptores dopaminérgicos  $D_1$ ,  $D_2$ ,  $D_4$ , serotoninérgicos  $5HT_{2A}$ ,  $5HT_{2C}$ ,  $5HT_3$ ,  $\alpha_1$ -adrenérgico, histaminérgicos y cinco subtipos de receptores muscarínicos (Bymaster *et al.*, 1996). También el SCH23390 se une a receptores  $\alpha$ -adrenérgicos (Hyttel, 1983),  $D_2$  (Hyttel, 1983; Plantjé, *et al.*, 1984),  $5HT_2$  (Hyttel, 1983; Bischoff *et al.*, 1988) y  $5HT_{2C}$  (Nicklaus *et al.*, 1988).

Para estudiar si la DA es más potente sobre algunos de los subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, se utilizaron distintos antagonistas selectivos de subtipo. Risperidona es 123 veces más selectiva para receptores  $\alpha_{1B}$ -adrenérgicos ( $K_i=2.3$  nM) que para los receptores  $\alpha_{1A}$ -adrenérgicos (Sleight *et al.*, 1993). En nuestros experimentos con esta droga, la  $CI_{50}$  fue  $< 10$  nM cuando la respuesta se generó con DA y  $\sim 25$  veces mayor cuando se estimuló con fenilefrina. WB4101, preferentemente antagonista de los receptores adrenérgicos  $\alpha_{1A/1C/1D}$ , inhibió el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por DA con una  $CI_{50} < 10$  nM, es decir, un valor aproximadamente 500 veces superior a la  $K_i$  para estos subtipos (ver Tabla XIII), pero más próximo al valor de  $K_i$  reportado en pineal de rata (18.2 nM) en experimentos con radioligandos (Sugden *et al.*, 1996). Cuando la estimulación se hizo con fenilefrina la  $CI_{50}$  fue aún mayor (100 nM). Los valores inhibitorios obtenidos con benoxathian, preferentemente antagonista de los receptores adrenérgicos  $\alpha_{1A/1D}$ , fueron  $< 1$  nM, que

a su vez son inferiores comparados con los valores de  $K_i=7.5$  nM reportados en la literatura en pineal de rata (Sugden *et al.*, 1996).

De acuerdo a estos resultados, estaríamos probablemente inhibiendo el subtipo  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico ya que el WB4101 a concentraciones de 0,02 nM ejerce su efecto sobre los receptores  $\alpha_{1A}$  (Yan *et al.*, 1998) mientras que, a concentraciones de 18 nM actúa sobre los receptores  $\alpha_{1B}$  (Sugden *et al.*, 1996). Se ha reportado una mayor densidad del subtipo  $\alpha_{1B}$  que del  $\alpha_{1A}$  en glándula pineal de rata (Sugden, *et al.*, 1996). El subtipo del receptor adrenérgico  $\alpha_{1D}$  no fué encontrado en la pineal de rata, pero se cree que corresponde al subtipo farmacológicamente caracterizado  $\alpha_{1A}$  (Minneman, *et al.*, 1994), por lo tanto, actualmente es denominado  $\alpha_{1AD}$ . Este último tipo de receptor, junto con el receptor  $\alpha_{1B}$  de hamster y  $\alpha_{1C}$  de bovino fueron expresados en células 293 de riñón de embrión humano y tras estimulación con catecolaminas indujeron, en todos los casos, la actividad inositol fosfato (Minneman, *et al.*, 1994).

En la siguiente tabla se comparan los valores de Kd, indicativos de la ocupación del receptor por el ligando, con los valores de  $CI_{50}$  y  $CE_{50}$ , obtenidos de las curvas dosis-respuestas e indicativos de las potencias de los ligandos.

La fenilefrina tiene similar potencia para estimular los subtipos de receptores adrenérgicos  $\alpha_{1B}$  de hamster,  $\alpha_{1C}$  de bovino y  $\alpha_{1AD}$  de rata, pero su respuesta es submáxima para el subtipo  $\alpha_{1B}$ , expresados en células 293 (Minneman *et al.*, 1994).

**Tabla XIII.** Afinidad de receptores para distintos ligandos adrenérgicos y dopaminérgicos (Kd, valores en nM)

	D <sub>1A</sub>	D <sub>1B</sub> (r)	D <sub>5</sub> (h)	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>	α <sub>1A</sub>	α <sub>1B</sub>	*/DA	*/PE
<b><u>AGONISTAS</u></b>										
SKF38393	87-150	100	43-100	9560	5000	1800				
Apomorfina	210-680	240	152-363	24	20	4.1				
Dopamina	2300-12000	3900	228-235	2.8-2490	27	28-450			5000	600
Bromocriptina				5.3-12.6	7.4	340				
Quinpirola				576	5.1	46				
<b><u>ANTAGONISTAS</u></b>										
SCH23390	0.11-0.66	0.11	0.3-0.54						1700	
Haloperidol	27-203	35	48-151	0.45-1	9.8	5.1			15	10
Espiperona	220	2600	4500	0.03-0.07	0.6	0.08			20	
Risperidona	270			1.3-1.7	6.7	7	283	2.3	<10	
Prazosín							0.14-1.2	0.14-1.2	3	2.5
WB4101							0.02	18	<10	100
Benoxathian								7.5	≤1	

\*DA / \*PE: valores obtenidos tras la estimulación con DA y fenilefrina (CE<sub>50</sub>, CI<sub>50</sub>), respectivamente.

## 6. IMPLICACION DE LOS TRANSPORTADORES DE CATECOLAMINAS SOBRE EL INCREMENTO DE $Ca^{2+}$

La aplicación de desipramina e imipramina (antidepresivos tricíclicos), además de otros inhibidores de transportadores de catecolaminas, bloquearon el incremento de  $Ca^{2+}$  en respuesta a DA y no cuando el estímulo fue fenilefrina. Sin embargo, las concentraciones usadas fueron relativamente altas comparadas con las reportadas en la literatura (Tabla XIV). Por ejemplo, la concentración de desipramina utilizada para inhibir la respuesta de  $Ca^{2+}$  generada con DA fue 64 veces superior respecto de la reportada para el transportador de noradrenalina, mientras que, esta misma concentración fue 16 veces inferior que la reportada para el transportador de DA, pero fue similar que la reportada para el transportador de serotonina. Sin embargo, serotonina (1  $\mu$ M) no incrementó los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular ( $n=5$ , experimentos no mostrados).

La concentración de GBR12909 de nuestros experimentos fue 500 veces superior que la reportada para el transportador de DA y aproximadamente 4 veces superior para el transportador de NA. Sin embargo, la concentración de imipramina fue aproximadamente 1.5 veces superior, mientras que, la cocaína inhibió en un 10 % la respuesta.

**Tabla XIV.** Valores de Kd (nM) para distintas sustancias con afinidad por los transportadores de catecolaminas. (h=humano, r=rata)

	TNA(h)	TDA(r)	T5-HT(r)	T5-HT(h)	*DA	*PE
Desipramina	3.88	4000	1680	250	250	>1000
Imipramina	65.4				<100	>1000
GBR12909	133	1			500	
Cocaína	140	336-2000	1080	1000		
Dopamina	139	316	>10000			
Noradrenalina	410	>10000	>10000			
Serorronina	>10000	>10000				

\*DA y \*PE: valores de  $CI_{50}$  y  $CE_{50}$  en nuestros experimentos ante la estimulación con DA y fenilefrina.

En condiciones de 0  $Na^+$  y reemplazando este ion por otros iones monovalentes como  $Li^+$ , Trizma ó N-metil-D-glucamina no se afectó la respuesta de  $Ca^{2+}$  generada con DA. Debido a la naturaleza electrogénica de los transportador catecolaminérgicos y de acuerdo a estos resultados, podemos entender que el incremento de  $Ca^{2+}$  no ocurre a través de transportadores catecolaminérgicos, sino que, por el contrario, pueden estar mediados por receptores catecolaminérgicos.

## CONCLUSIONES

1. La aplicación de dopamina (DA) produce un incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  bifásico consistente en una o varias espigas seguidas de una meseta resultantes respectivamente de la liberación de  $Ca^{2+}$  de almacenes intracelulares y de la entrada de  $Ca^{2+}$  desde el medio externo.
2. El valor de  $CE_{50}$  obtenido de la curva que relaciona la amplitud de la señal de  $Ca^{2+}$  en función de la concentración de DA es de 5  $\mu M$ , mientras que, la saturación de la respuesta ocurre a concentraciones de DA de 50  $\mu M$ .
3. Estímulos repetidos con DA generan una progresiva disminución de la amplitud de las señales de  $Ca^{2+}$ , sin embargo, la estimulación repetida con fenilefrina presentó una menor desensibilización.
4. Los agonistas dopaminérgicos no producen incremento en los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular, incluso a concentraciones saturantes de agonista.
5. La respuesta de  $Ca^{2+}$  a la estimulación con DA es inhibida por antagonistas dopaminérgicos y  $\alpha_1$ -adrenérgicos, siendo estos últimos los de mayor potencia.

6. Las concentraciones de los diferentes antagonistas  $\alpha_1$ -adrenérgicos y dopaminérgicos utilizados que inhibieron el 50 % de la respuesta a DA presentaron el siguiente orden de potencia: benoxathian>prazosín>WB4101=risperidona>haloperidol>espiperona>SCH23390
7. La dopamina activa receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos preferentemente del tipo  $\alpha_{1B}$ , la fenilefrina sin embargo, aunque es 8 veces más potente parece tener una menor especificidad.
8. La aplicación de desipramina e imipramina (antidepresivos tricíclicos), a una concentración de 1  $\mu$ M, bloquearon completamente el incremento de  $Ca^{2+}$  en respuesta a DA y no cuando el estímulo fue fenilefrina.
9. En condiciones de 0  $Na^+$  y reemplazando este ion por otros iones monovalentes como  $Li^+$ , Trizma ó N-metil-D-glucamina no se afectó la respuesta de  $Ca^{2+}$  generada con DA. Debido a la naturaleza electrogénica de los transportadores catecolaminérgicos y de acuerdo a estos resultados, podemos entender que el incremento de  $Ca^{2+}$  no ocurre a través de transportadores catecolaminérgicos, sino que, por el contrario, pueden estar mediados por receptores catecolaminérgicos.
10. La DA genera incrementos dosis-dependiente en los niveles de AMPc los cuales son potenciados por el pretratamiento con forskolina.
11. El incremento en los niveles de inositoles fosfato (IPs) en respuesta a la estimulación con DA es concentración y tiempo dependiente.



12. Los incrementos de AMPc son independientes de la producción de IPs. Por una parte, la DA estaría mediando la activación de AMPc a través de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, mientras que, la producción de IPs tendría lugar a través de uno o varios subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos.

13. Los resultados de la clonación del ADNc mostraron la presencia en pineal de rata del receptor adrenérgico  $\alpha_{1B}$  y no de receptores dopaminérgicos.

14. La activación de receptores adrenérgicos por la DA preferentemente del tipo  $\alpha_1$ -adrenérgicos posiblemente es debido a la similitud entre las moléculas de catecolaminas y la homología estructural entre los receptores catecolaminérgicos.

## BIBLIOGRAFÍA

Álamo, C., Cuenca, E., López-Muñoz, F: Antipsicóticos atípicos: perfil receptorial; en Garcia, C (ed): *Nuevos antipsicóticos atípicos*. Barcelona, Masson, 1ª ed. pp 1-24 (1996).

Anfossi, G., Massucco, P., Mularoni, E., Mattiello, L., Cavalot, F., Burzacca, S., Trovati M. Effect of dopamine on adenosine 3',5'-cyclic monophosphate levels in human platelets. *Gen. Pharmacol.* **24**(2):435-8 (1993).

Ashkenazi, A., Peralta, E., Winslow, J., Ramachandran, J. y Capon, D. Functionally distinct G proteins selectively couple different receptors to PI hydrolysis in the same cell. *Cell.* **56**, 487-493 (1989).

Axelrod, J., Shein, H.M., Wurtman, R.J. Stimulation of C<sup>14</sup>-melatonin synthesis in rat pineal in organ culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **62**:544-549 (1969).

Benovic, J.L., Staniszewski, C., Cerione, R.A., Codina, J., Lefkowitz, R.J., and Caron, M.G. The mammalian  $\beta$ -adrenergic receptor: Structural and functional characterization of the carbohydrate moiety. *Journal of Receptor Research.* **7**, 257-281 (1987).

Bischoff, S., Meinrich, M., Krauss, J., Sills, M.A., Williams, M., Vassout, A. Interaction of the D1 receptor antagonist SCH23390 with the central 5-HT system: radioligand binding studies, measurements of biochemical parameters and effects on L-5-HTP syndrome. *J. Recept. Res.* **8**:107-120 (1988).

Bolos, A.M., Dean, M., Lucas-Derse, S., Ransburg, M., Brown, G.L., Goldman, D. Population and pedigree studies reveal a lack of association between the dopamine D<sub>2</sub> receptor gene and alcoholism. *J. Am. Med. Assoc.* **264**, 3156-3160 (1990).

Buck, K.J. y Amara, S.G. Chimeric dopamine-norepinephrine transporter delineate structural domains influencing selectivity for catecholamines and 1-methyl-4phenylpyridinium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **20**:91(26):12584-8 (1994).

Bunzow, J.R., Van Tol, H.H.M., Grandy, E., Albert, P., Salon, J., Christie, M., Machida, C.A., Neve, K.A., Civelli, O. Cloning and expression of a rat D<sub>2</sub> dopamine receptor cDNA. *Nature* **336**, 783-787 (1988).

Bylund, D.B. Subtypes of  $\alpha$ 1- and  $\alpha$ 2-adrenergic receptors. *FASEB J.* **6**, 832-839 (1992).

Bymaster, F.P., Calligaro, D.O., Falcone, J.F., Marsh, R. D., Moore, N.A., Tye, N.C., Seeman, P., Wong, D.T. Radioreceptor binding profile of the atypical antipsychotic olanzapine. *Neuropsychopharmacology.* **14**(2):87-96 (1996).

Clapham, D.E. Neer, E.J. New roles for G-protein  $\beta\gamma$ -dimers in transmembrane signalling. *Nature.* **365**, 403-406 (1993).

Collin, J.P., Mirshahi, M., Brisson, P., Falcon, J., Guelotte, J. and Faure., J.P. Pineal-retinal molecular relationships: distribution of "S antigen" in the pineal complex. *Neuroscience* **19**(2),657-668 (1986).

Collin, J.P., Arendt, J., Y. Gern W.A. "El tercer ojo". *Mundo Científico* **8**: 1170-1181(1988).

Comings, D.E., Comings, B.G., Muhleman, D., Dietz, G., Shahbahrani, B. The dopamine D<sub>2</sub> receptor locus as a modifying gen in neuropsychiatric disorders. *J. Am. Med. Assoc.* **266**, 1793-1800 (1991).

Dal Toso , R., Sommer, B., Ewert,M., Herb, A., Pritchett, D.B., Bach, A., Shivers, B.D., Seeburg, P.H. The dopamine D<sub>2</sub> receptor: Two molecular forms generated by alternative splicing. *EMBO J.* **8**, 4025-4034 (1989).

Dearry, A., Gingrich, J., Falardeau, P., Caron, M. Molecular cloning and expression of the gene for a human D<sub>1</sub> dopamine receptor. *Nature* **347**, 72-76 (1990).

Deguchi, T., Axelrod, J. Induction and superinduction of serotonin N-acetyltransferase by adrenergic drugs and denervation in rat pineal organ. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **69**:2208-2211 (1972).

Dixon, R.A.F., Sigal, I.S., Candelore, M. R., Register, R.B., Scattergood, W., Rands, E., Strader, C.D. Structural features required for ligand binding to the  $\beta$ -adrenergic receptor. *EMBO J.* **6**, 3269-3275 (1987).

Dohlman, H.G., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. A family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Biochemistry* **26**, 2657-64 (1987).

Dohlman, H.G., Caron, M.G., Strader, C.D., Amlaiky, N., Lefkowitz, R.J. Identification and sequence of a binding site peptide of the  $\beta_2$ -adrenérgic receptor. *Biochemistry.* **27**, 1813-1817 (1988).

Dohlman, H.G., Caron, M.G., DeBlasi, A., Frielle, T., Lefkowitz, R.J. A role of a extracellular disulfide bonded cysteines in the ligand binding function of the  $\beta_2$ -adrenérgic receptor. *Biochemistry.* **29**, 2335-42 (1990).

Doss, R.C., Kramamarcy, N.R., Harden, T.K., Perkins, J. Effects of tunicamycin on the expression of beta adrenergic receptors in human astrocytoma cells during growth and recovery from agonist-induced down-regulation. *Molecular Pharmacology.* **27**, 507-516 (1985).

Dubocovitch, M.L., Weiner, N. Modulation of the stimulation evoked release of [ $^3$ H]dopamine in the rabbit retina. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **219**:701-707 (1981).

Dubocovitch, M.L., Weiner, N. Pharmacological differences between the D-2 autoreceptor and the D-1 dopamine receptor in rabbit retina. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **233**:747-753 (1985).

Eason, M.G., Jacinto, M.T., Theis, C.T., Liggett, S.B. The palmitoylated cysteine of the cytoplasmic tail of the  $\alpha_2$ -adrenergic receptors confers subtype-specific agonist-promoted down-regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 11178-11182 (1994).

- Ebadi, M., Hexum, T.D., Pfeiffer, R.F., Govitrapong, P.: Pineal and retinal peptides and their receptors. *Pineal Res. Rev.* **7**: 1-156, (1989).
- Felder, C., Blecher, M., Jose, P. Dopamine-1-mediated stimulation of phospholipase C activity in rat renal cortical membranes. *The Journal of Biological Chemistry.* **264**(15):8739-8745 (1989).
- Felder, C., Jose, P., Axelrod, J. The dopamine-1 agonist, SKF 82526, stimulates phospholipase-C activity independent of adenylate cyclase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **248**, 171-175 (1989).
- Feng, G., Hannan, F., Reale, V., Yi Hon, Y., Kousky, C.T., Evans, P.D., and Hall, L.M. Cloning and functional characterization of a novel dopamine receptor from *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Neuroscience.* **12**, 3925-3933 (1996).
- Ford, A.P.D.W., Williams, T.J., Blue, R.D. and Clarke, D.E.  $\alpha_1$ -Adrenoceptor classification: sharpening Occam's razor. *Trends Pharmacol. Sci.* **15**, 167-170 (1994).
- Fraser, C. Site-directed mutagenesis of  $\beta$ -adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* **264**, 9266-9270 (1989).
- Freneau, R.J. Jr., Duncan, G.E., Fornaretto, M.G., Dearry, A., Gingrich, J.A., et al. Localization of  $D_1$  dopamine receptor mRNA in brain supports a role in cognitive, affective and neuroendocrine aspects of dopaminergic transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 3772-3776 (1991).
- Fujiwara, M., Inagaki, C., Miwa, S., Takaori, S., Saeki, Y., Nozaki, M. Diurnal variation of dopamine content in the rat pineal gland. *Life Sci.* **26**:71-78 (1980).
- Gelernter, J., Pakstis, A.J., Pauls, D.L., Kurlan, R., Ganther, S.T., et al. No association between an allele at the  $D_2$  dopamine receptor gene (DRD2) and alcoholism. *J. Am. Med. Assoc.* **266**, 1801-1807 (1991).
- Gingrich, J., Caron, M. Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annual Reviews of Neuroscience* **16**, 299-321 (1993).

Giros, B., Sokoloff, P., Martres, M.P., Riou, J.F., Emorine, L.J., Schwartz, J.C. Alternative splicing directs the expression of the two D<sub>2</sub> dopamine receptor isoforms. *Nature* **347**, 923-926 (1989).

Giros, B., Martres, M.P., Pilon, C., Sokoloff, P., Schwartz, J.C. Shorter variants of the D<sub>3</sub> dopamine receptor produced through various patterns of alternative splicing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **176**, 1584-92 (1991)

Govitrapong, P., Murrin, L.C., Ebadi, M. Characterization of dopaminergic receptor sites in bovine pineal organ. *J. Pineal Res.* **1**:215-226 (1984).

Govitrapong, P., Hama, Y., Pfeiffer, R., Ebadi, M. Status of dopamine in bovine pineal glands and the stimulation of N-acetyltransferase activity by D<sub>2</sub>-dopaminergic receptor agonists in the rat pineal glands in culture. *J. Pineal Res.* **6**:17-31 (1989).

Grandy, D.K., Litt, M., Allen, J.R., Bunzow, J.R., Marchionni, M.A., Makam, H., Reed, L., Magenis, R.E., Civelli, O. The human dopamine D<sub>2</sub> receptor gene is located in chromosome 11 at q22-23 and identifies a Taq 1 RFLP. *Am. J. Hum. Genet.* **45**, 778-785 (1989).

Grynkiewicz, C., Poenie, M. and Tsien, R.Y. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of Biological Chemistry* **260**, 3440-3450 (1985).

Hernandez, G., Bello, A.R., Lopez-Coviella, I., Abreu, P., Fajardo, N., Reiter, R.J., Hernandez, H., Alonso, S. Tyrosine hydroxylase activity in peripherally denervated rat pineal gland. *Neurosci Lett.* **15**:177(1-2):131-4 (1994).

Holmes, D., Brynjolfsson, J., Brett, P., Curtis, D., Petursson, H., et al. No evidence for a susceptibility locus predisposing to manic depression in the region of the dopamine (D<sub>2</sub>) receptor gene. *Br. J. Psychiatry.* **158**, 635-641 (1991).

Hoffman, B.B., Lefkowitz, R.J., Taylor, P: Catecholamines, sympathomimetic drugs, and adrenergic receptors; in Goodman & Gilman's: *The pharmacological basis of therapeutics*. New York, McGraw-Hill, 9<sup>a</sup> ed. pp 199-248 (1996).

- Hubbard, S., and Ivatt, R. Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **50**, 555-583 (1981).
- Hutchins, C. Three-dimensional models of the D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopamine receptors. *Endocr. J.* **2**, 7-23 (1994).
- Hyttel, J. SCH23390 The first selective dopamine D-1 antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* **91**:153-154 (1983).
- Hyypä, M. Hypothalamic monoamines and pineal dopamine during the sexual differentiation of the rat brain. *Experientia.* **27**:336-337 (1971).
- Iuvone, P.M. Evidence for a D<sub>2</sub>-dopamine receptor in frog retina that decreases cyclic AMP accumulation and serotonin N-acetyltransferase activity. *Life Sci.* **38**:331-342 (1986).
- Jin, K.L., Shiotani, Y., Kawai, Y., Kiyama, M. Immunohistochemical demonstration of tyrosine hydroxylase (TH)-positive but dopamine  $\beta$ -hydroxylase (DBH)-negative neuron like cells in the pineal gland of golden hamsters. *Neurosci. Lett.* **93**:28-31 (1988).
- Kebabian, J., Calne, D. Multiple receptors for dopamine. *Nature.* **227**:93-96 (1979).
- Klein, D.C., Weller, J.L. Adrenergic-adenosine 3',5'-monophosphate regulation of serotonin N-acetyltransferase activity and the temporal relationship of serotonin N-acetyltransferase activity to synthesis of <sup>3</sup>H-acetylserotonin and <sup>3</sup>H-melatonin in the cultured rat pineal gland. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **186**:516-527 (1973).
- Kobilka, B. K., Daniel, T. S., Regan, J. W., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. Chimeric  $\alpha_2$ -,  $\beta_2$ -adrenérgic receptors: delineation of domains involved in effector coupling and ligand binding specificity. *Science.* **240**, 1310-1316 (1988).
- Krief, S., Lönnqvist, F., Raimbault, S., Baude, B., Van Spronsen, A., Arner, P., Strosberg, A.D., Ricquier, D., and Emorine, L.J. Tissue distribution of  $\beta_3$ -adrenergic receptor mRNA in man. *J. Clin. Invest.* **91**, 344-349 (1993).

Langer, S.Z., Lehmann, J. Presynaptic receptors on catecholamine neurons. In, *Catecholamines I.* (Trendelenberg, U., and Weiner, N., eds) Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 90 Springer-Verlag, Berlín, pp 419-507 (1988).

Lefkowitz, R.J., Hoffman, B. B., Taylor, P: The autonomic and somatic motor nervous system; in Goodman & Gilman's: *The pharmacological basis of therapeutics.* New York, McGraw-Hill, 9ª ed. pp 105-139 (1996).

Lee, T.L., Hsu, C.T., Yen, S.T., Lai, C.W., Cheng, J.T. Activation of beta3-adrenoceptors by exogenous dopamine to lower glucose uptake into rat adipocytes. *J. Auton. Nerv. Syst.* **11**;74(2-3):86-90 (1998).

Liggett, S.B., Ostrowski, J., Chesnut, L.C., Kurose, H., Raymond, J.R., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. Sites in the third intracellular loop of the  $\alpha_2$ -adrenérgic receptor confer short term agonist-promoted desensitization. *J. Biol. Chem.* **267**, 4740-4746 (1992).

Liu, Y.F., Civelli, O., Zhou, Q.Y. and Albert, P.R. Cholera toxin-sensitive 3',5'-cyclic adenosine monophosphate and calcium signals of the human dopamine-D<sub>1</sub> receptor selective potentiation by protein kinase A. *Mol. Endocrinol.* **6**, 1815-1824 (1992).

Lönnqvist, F., Krief, S., Strosberg, A.D., Nyberg, B., Emorine, L.J., Amer, P. Evidence for a functional  $\beta_3$ -adrenergic adrenoceptor in man. *Br. J. Pharmacol.* **110**, 929-936 (1993).

Mahan, L.C., Burch, R.M., Monsma, F.J. y Sibley D.R. Expression of striatal D<sub>1</sub> dopamine receptors coupled to inositol phosphate production and Ca<sup>2+</sup> mobilization in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**:2196-2200 (1990).

Makman, M.H., Dvorkin, B., Horwitz, S.G., Thal, L.J. Properties of dopamine agonist and antagonist binding sites in mammalian retina. *Brain Res.* **194**: 403-418 (1980).

Marín, A., Ureña, J., Tabares, L. Intracellular calcium release mediated by noradrenaline and acetylcholine in mammalian pineal cells. *J. Pineal Res.* **21**:15-28 (1996).



Marín, A. Estudios de la señal de calcio y las corrientes iónicas en el acoplamiento entre el estímulo y la secreción en células pineales en la rata. *Tesis doctoral*. Universidad de Sevilla. España. (1995).

Mengod, G. y Palacios, J.M: Biología y estructura molecular de los receptores asociados a proteínas G; en García-Sevilla, J.A. (ed.): *Receptores para neurotransmisores*. Barcelona, Eds en Neurociencias, 1ª ed. pp 251-271 (1996).

Minneman, K.P., Theroux T.L., Hollinger, S., Han, C., Esbenshade, T.A. Selectivity of agonists for cloned alpha 1-adrenergic receptor subtypes. *Molecular Pharmacology*. **46**(5):929-36 (1994).

Minneman, K.P., Esbenshade, T.A. Alpha 1-adrenergic receptor subtypes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **34**:117-33 (1994).

Moises, H. W., Gelernter, J., Giuffra, L.A., Zarcone, V., Wetterberg, L. No linkage between D<sub>2</sub> dopamine receptor gene region and schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry*. **48**, 643-647 (1991).

Molinari, E.J., North, P.C., Dubocovich, M.L. 2-[125I]iodo-5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine: a selective radioligand for the characterization of melatonin ML2 binding sites. *Eur. J. Pharmacol.* **22**:301(1-3):159-68 (1996).

Molinoff, P.B: Transmisión sináptica, aminas biógenas; en Frazer, A., Molinoff, P.B., Winokur, A., (eds): *Bases biológicas de la función normal y patológica del cerebro*. Barcelona, Espaxs, S.A., 1ªed. pp 107-126 (1995)

Monsma, F.J., Mahan, L.C., McVittie, L.D., Gerfen, C.R., and Sibley D.R. Molecular cloning and expresión of a D<sub>1</sub> dopamine receptor linked to adenylyl cyclase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**, 6723-6727 (1990).

Monsma, F.J. Jr., McVittie, L.D., Gerfen, C.R., Mahan, L.C., Sibley, D.R. Multiple D<sub>2</sub> dopamine receptors produced by alternative RNA splicing. *Nature* **342**, 926-929 (1989).

Morgan, P.J., Williams, L.M., Lawson, W., Riddoch, G. Adrenergic and VIP stimulation of cyclic AMP accumulation in ovine pineals. *Brain Res.* **447**, 279-286 (1988).

Murga, C., Mayor, F. Jr.: Mecanismos de regulación de receptores acoplados a proteínas G; en García-Sevilla, J.A. (ed.): *Receptores para neurotransmisores*. Barcelona, Eds en Neurociencias, 1ª ed. pp 363-390 (1996)

Nalepa, I. The effects of chlorpromazine and haloperidol on second messenger systems related to adrenergic receptors. *Pol. J. Pharmacol.* **45**(4):399-412 (1993).

Nicklaus, K.J., McGonigle, P., Monlinoff, P.B. [<sup>3</sup>H]SCH23390 labels both dopamine-1 and 5-hydroxytryptamine<sub>1C</sub> receptors in the choroid plexus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **247**: 343-348 (1988).

O'Dowd, B.F., Hnatowich, M., Regan, J.W., Leader, W.M., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. Site-directed mutagenesis of the cytoplasmic domains of the human beta 2-adrenergic receptor. Localization of regions involved in G protein-receptor coupling. *J. Biol. Chem.* **263**, 15985-15992 (1988).

O'Dowd, B.F., Hnatowich, M., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., Bouvier, M. Palmitoylation of the human  $\beta_2$ -adrenergic receptor: Mutation of CYS 341 in the carboxyl tail leads to an uncoupled, non-palmitoylated form of the receptor. *J. Biol. Chem.* **264**, 7564-7569 (1989).

O'Dowd, B.F., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G.A. Structure of the adrenérgic and related receptors. *Annual Reviews of Neurosciences* **12**, 67-83 (1989).

O'Malley, S.S., Chen, T.B., Francis, B.E., Gibson, R.E., Burns, H.D., Disalvo, J., Bayne, M.L., Wetzel J.M., Nagarathnam, D., Marzabadi, M., Gluchowski, C., Chang, R.S. Characterization of specific binding of [<sup>125</sup>I]L-762,459, a selective alpha 1A-adrenoceptor radioligand to rat and human tissues. *Eur. J. Pharmacol.* **8**;348(2-3):287-95 (1998).

Onali, P., Olanas, M.C. y Gessa, G.L. Selective blockade of dopamine D<sub>1</sub> receptors by SCH23390 discloses striatal dopamine D<sub>2</sub> receptors mediating the inhibition of adenylate cyclase in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **99**:127-128 (1984).

Ovchinnikov, Y., Abdulaev, N., Bogachuk, A. Two adjacent cysteine residues in the C-terminal cytoplasmic fragment of bovine rhodopsin are palmitylated. *FEBS. Lett.* **230**, 1-5 (1988).

Plantjé, J.F., Daus, F.J., Hansen, H.A., Stoof, J.C. SCH23390 blocks D-1 and D-2 dopamine receptors in rat neostriatum in vitro. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **327**:180-182 (1984).

Racké, K., Krupa, H., Schroder, M., Vollrath, L. In vitro synthesis of dopamine and noradrenaline in the isolated rat pineal gland: day-night variations and effect of electrical stimulation. *J. Neurochem.* **53**:354-361 (1989).

Rands, E., Candelore, M.R., Cheung, A.H., Hill, W.S., Strader, C.D., and Dixon, R.A.F. Mutational analysis of beta-adrenergic receptor glycosylation. *Journal of Biological Chemistry.* **265**, 10759-10764 (1990).

Redburn, D.A., Clement-Cormier, Y., Lam, D.M.K. Dopamine receptors in the goldfish retina: <sup>3</sup>H-spiroperidol and <sup>3</sup>H-dopamine binding and dopamine-stimulated adenylate cyclase activity. *Life Sci.* **27**:23-31 (1989).

Ren, Q., Kurose, H., Lefkowitz, R.J., and Cotecchia. Constitutively active mutants of the  $\alpha_2$ -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **268**, 16483-16487 (1993).

Rosenbaum, M., Malbon, C.C., Hirsch, J., and Leibel, R.L. Lack of  $\beta_3$ -adrenergic effect on lipolysis in human subcutaneous adipose tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **77**, 352-355 (1993).

Saavedra, J.M., Barden, N., Chevillard, C., Fernandez-Pardal, J. Twenty-four-hour rhythm and effects of stress and adrenalectomy on rat pineal dopamine, noradrenaline and adrenaline concentration. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2**:1-10 (1982).

Schwartz, J.-C., Giros, B., Martres, M.-P., Sokoloff, P.: Multiple dopamine receptors as molecular targets for antipsychotics; in Brunello, N., Mendlewicz, J., Racagni, G (eds): *New generation of antipsychotic drugs: novel mechanisms of action*. Int. Acad. Biomed. Drug. Res. Basel, Karger, Vol. 4, pp 1-14 (1993).

Selbie, L.A., Hayes, G., Shine, J. The major dopamine D<sub>2</sub> receptor: Molecular analysis of the human D<sub>2A</sub> subtype. *DNA* 8, 683-689 (1989).

Shoulson, I. Experimental therapeutics of neurodegenerative disorders: unmet needs. *Nature* 282, 1072-1074 (1998).

Simonneaux, V., Murrin L.C., Ebadi M. Characterization of D<sub>1</sub> dopamine receptors in the bovine pineal gland with [<sup>3</sup>H]SCH23390. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253, 214-220 (1990).

Simonneaux, V., Happe, H.K., Ebadi, M., Murrin L.C. Autoradiographic localization of dopaminergic and noradrenergic receptors in the bovine pineal gland. *J. Neurochem.* 57, 5:1796-1802 (1991).

Sleight, A.J., Koek, W., Bigg, D.C. Binding of antipsychotic drugs at alpha 1A- and alpha 1B-adrenoceptors: risperidone is selective for the alpha 1B-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol.* 20;238(2-3):407-10 (1993).

Sokoloff, P., Giros, B., Martres, M.P., Bouthenet, M.L., Schwartz, J.C. Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D<sub>3</sub>) as target for neuroleptics. *Nature* 347, 146-151 (1990).

Stoof, J.C. Keabian, J.W. Opposing roles for D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopamine receptors in afflux of cyclic AMP from rat neostriatum. *Nature.* 294:366-368 (1981).

Strader, C.D., Sigal, F.S., Register, R.B., Candelore, M. R., Rands, E., Dixon, R.A.F. Identification of residues required for ligand binding to the β-adrenérgic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 4384-4388 (1987).

Strader, C.D., Candelore, M. R., Hill, W.S., Sigal, I.S., and Dixon, R.A.F. Identification of two serine residues involved in agonist activation of the β-adrenérgic receptor. *J. Biol. Chem.* 264, 13572-13578 (1989).

Strader, C.D., Fong, T.M., Tota, M.R., Underwood, D. and Dixon, R.A. Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 101-132 (1994).

Sugden, D., Anwar, N., Klein, D.C. Rat pineal  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes: studies using radioligand binding and reverse transcription-polymerase chain reaction analysis. *British Journal of Pharmacology.* **118**, 1246-1252 (1996).

Sugden, A.L., Sugden, D., Klein, D.C.  $\alpha_1$ -adrenoceptor activation elevates cytosolic calcium in rat pinealocytes by increasing net influx. *J. Biol. Chem.* **262**:741-745 (1987).

Sunahara, R.K., Niznik, H.B., Weiner, D.M., Stormann, T.M., Brann, M.R., Kennedy, J.L., Gelemter J.E., Rozmahel, R., Yang, Y., Israel, Y., Seeman, P., and O'Dowd B.F. Human dopamine D<sub>1</sub> receptor encoded by an intronless gene on chromosome 5. *Nature* **347**, 80-83 (1990).

Sunahara, R.K., Guan, Hong-Chang., O'Dowd, B.F., Seeman, P., Laurier, L.G., Ng, G., George, S.R., Torchia, J., Van Tol H.H.M., and Niznik, H.B. Cloning of the gene for a human dopamine D<sub>5</sub> receptor with higher affinity for dopamine than D<sub>1</sub>. *Nature* **350**, 614-619 (1991).

Taussig, R., Gilman, A.G. Mammalian membrane-bound adenylyl cyclase. *Journal of Biological Chemistry.* **270**, 1-4 (1995).

Tiberi, M., Jarvie, K.R., Silvia C., Falardeau, P., Gingrich, J.A., Godinot, N., Bertrand, L., Yang-Feng, T.L., Fremeau, R.T. Jr., Caron, M.G. Cloning, molecular characterization and chromosomal assignment of a gene encoding a novel D<sub>1</sub> dopamine receptor subtype: Differential expression pattern in rat brain compared to the D<sub>1A</sub> receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 8111 (1991).

Torchilin, V.P., Maksimenko A.V., Smirnov, V.N., Berezin, I.V., Klibanov, A.M., Martinek, K. The principles of enzyme stabilization. IV. Modification of "key" functional groups in the tertiary structure of proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **16**;567(1):1-11 (1979).

- Undie, A.S., Friedman, E. Stimulation of dopamine D<sub>1</sub> receptor enhances inositol phosphates formation in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **253**:3, 987-992 (1990).
- Vallar, L., Meldolesi, J. Mechanisms of signal transduction at the dopamine D<sub>2</sub> receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* **10**, 74-77 (1989).
- Van Tol, H.H.M., Bunzow, J.R., Guan, H.C., Sunahara, R.K., Seeman, P., Niznik H.B., Civelli, O. Cloning of the gene for a human dopamine D<sub>4</sub> receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* **350**, 610-614 (1991).
- Vanecek, J., Sugden, D., Weller, J., Klein, C. Atypical synergistic  $\alpha$ 1- and  $\beta$ 1-adrenergic regulation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate in rat pinealocytes. *Endocrinology* **116**(6), 2167-2173 (1985).
- Watling, K.J., Dowling, J.E., Iversen, L.L.: Dopamine receptors in the retina may all be linked to adenylate cyclase. *Nature*. **281**:578-580 (1979)
- Watling, K.J., Iversen, L.L. Comparison of the binding of the <sup>3</sup>H-spiperone and <sup>3</sup>H-domperidone in homogenates of mammalian retina and caudate nucleus. *J. Neurochem.* **37**:1130-1143 (1981).
- Weiner, D.M., Levey, A.I., Sunahara, R.K., Niznik, H.B., O'Dowd, B.F., et al. D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopamine receptor RNAm in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 1859-1863 (1991).
- Wilson, K.M., Minneman, K.P. Pertussis toxin inhibits norepinephrine-stimulated inositol phosphate formation in primary brain cell cultures. *Mol. Pharmacol.* **38**(2):274-81 (1990).
- Yan, M., Zhang, Y., Du, X.J., Han, C. Functional assessment of alpha 1-adrenoceptor subtypes in porcine coronary artery. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **25**(9):682-5 (1998).

Zawilska, J., Iuvone, P.M. Catecholamine receptors regulating serotonin N-acetyltransferase activity and melatonin content of chicken retina and pineal gland: D<sub>2</sub>-dopamine receptors in retina and alpha-2 adrenergic receptors in pineal gland. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **250**:86-92 (1989).

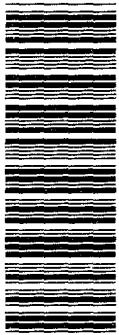
Zatz, M. Pharmacology of the rat pineal gland. *In: The Pineal Gland*, Vol.1, ed. by R. J. Reiter, pp. 229-242, CRC Press, Boca Raton, Fla., (1981).

Zhou, Qun-Yong., Grandy D.K., Thambi, L., Kushner, J.A., Van Tol, H.H.M., Cone, R., Pribnow, D., Salon, J., Bunzow, J.R., Civelli, O. Cloning and expression of human and rat D<sub>1</sub> dopamine receptors. *Nature* **347**, 76-79 (1990).

## ABREVIATURAS

AC	adenilato ciclasa
AMPC	adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
AMPC-p	AMPC marcado con peroxidasa
BLAST	basic local alignment search tool
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	concentración de calcio intracelular
CEC	cloroetilclonidina
DA	dopamina
DAG	diacilglicerol
DMEM	Dulbecco's medium eagle modified
DMSO	dimetilsulfoxido
EGTA	etilén bis[oxietilennitrilo]-tetraacético
EIE	enzima inmuno ensayo
GMPc	guanosina 3',5'-monofosfato cíclico
HEPES	ácido 4-[2-hidroxietil]-1-piperacina-etanosulfónico
III LE	tercer lazo extracelular
III LI	tercer lazo intracelular
IP	inositol fosfato
IP <sub>3</sub>	inositol-1,4,5-trifosfato
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
[ <sup>3</sup> H]-Is	<i>myo</i> -[2- <sup>3</sup> H]-inositol
NA	noradrenalina
NAT	serotonina N-acetiltransferasa
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction)
PKA	proteína quinasa A
PKC	proteína quinasa C
PLC	fosfolipasa C
PI	fosfatidilinositol
PIP <sub>2</sub>	fosfatidil inositol-4,5-difosfato
PTX	toxina <i>pertussis</i>
RT-PCR	reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SBF	suero bovino fetal
STM	segmento transmembranario





600672231

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Carlos EIKIN Rey Gaitán  
Incremento de la concentración de calcio intracelular  
inducida por dopamina en células pineales de rata.

Sobresaliente con laude por Unanimidad

23

Julio

99

*[Signature]*

*[Signature]*

*[Signature]*

*[Signature]*

M. García

*[Signature]*