

Juliana Akinaga

“Investigação da dessensibilização e internalização de
adrenoceptores α_{1A} nativos e recombinantes”

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia de Botucatu – Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
para obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas, área de concentração
Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. André Sampaio Pupo

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Akinaga, Juliana.

Investigação da dessensibilização e internalização de adrenoceptores α_{1A}
nativos e recombinantes / Juliana Akinaga. – Botucatu : [s.n.], 2008.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências, Botucatu, 2008.

Orientador: André Sampaio Pupo

Assunto CAPES: 21000000

1. Farmacologia

CDD 615.1

Palavras-chave: Adrenoceptores α_1 ; Dessensibilização; Feniletilaminas;
Imidazolinas; Internalização; Taquifilaxia

Dedicatória

Aos meus pais, Jorge e Angélica, pela minha existência,
por acompanharem meus passos
e por torcerem pelo meu sucesso
eu dedico esse trabalho.

Agradecimientos



À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
pelo auxílio financeiro na forma de bolsa de estudo
(processo nº 05/57569-9)

Ao mestre, prof. Dr. André Sampaio Pupo, pelos ensinamentos ao longo desses anos. Obrigado por me ajudar a realizar um sonho.

Ao meu namorado Cristiano, por esses muitos anos juntos, pela força e incentivo durante todo esse meu caminho.

Aos meus irmãos Bruno e Rafael e à minha cunhada Rúbia, muito obrigado pelos momentos caseiros, quando voltar pra casa fica melhor.

A todos meus tios, tias e primos, que são muitos, seria injusto lembrar de uns e esquecer de outros quando todos são importantes.

Aos meus avós Takeo e Hirono Takata, Shitsue Akinaga por serem exemplos de vida e ao meu avô Kiyoshi Akinaga (in memoriam), por me olhar sempre lá de cima.

Aos amigos, mais do que companheiros de laboratório, Vanessa, Fernanda, Luiz Ricardo, Ênio e Andrea pela jornada do dia-a-dia e pelos momentos de descontração.

Aos amigos de graduação, pós graduação e do Departamento de Farmacologia pelos muitos momentos ao longo desses anos.

Ao Dr Chris Hague por nos ceder os vetores dos α_1 -ARs conjugados com GFP.

À prof^a Dr^a Maria de Fátima Lázari por nos ceder as células HEK293.

Ao prof. Dr Ivan Maia e seus orientados do Departamento de Genética pelo auxílio na amplificação dos vetores.

À prof^a Dr^a Soraya Smaili, Dr^a Hanako Hirata e Rodrigo Ureshino, da UNIFESP pelo suporte na Microscopia Confocal.

Aos funcionários do departamento, Cris, Luiz, Paulo e Janete, sem vocês a gente não conseguiria.

Agradecimentos

Aos funcionários da sessão de pós-graduação Sérgio, Luciene, Maria Helena e Herivaldo pela atenção e pelas dicas quando a gente precisa.

Sumário

<i>Resumo</i>	2
<i>Abstract</i>	4
<i>Introdução</i>	6
<i>Adrenoceptores α_1 (α_1-ARs)</i>	6
<i>Dessensibilização e Taquifilaxia</i>	8
<i>Dessensibilização e Internalização induzidas por agonistas e vias de sinalização</i> .	9
<i>Linhas gerais sobre a presente pesquisa</i>	12
<i>Objetivos</i>	13
<i>Material e Métodos</i>	14
<i>Estudos de contração</i>	14
<i>Avaliação de parâmetros de contração em curvas concentração-resposta consecutivas</i>	14
<i>Investigação da taquifilaxia cruzada e determinação da menor concentração taquifilática</i>	15
<i>Determinação da duração da taquifilaxia</i>	15
<i>Estudos de inibição da taquifilaxia</i>	16
<i>Cultura de células e transfecção</i>	16
<i>Purificação do plasmídeo em larga escala</i>	17
<i>Microscopia confocal</i>	18
<i>Análise estatística</i>	18
<i>Resultados</i>	20
<i>Parâmetros de contração em curvas concentração-resposta consecutivas</i>	20

<i>Taquifilaxia cruzada e determinação da menor concentração taquifilática</i>	26
<i>Determinação do tempo de taquifilaxia cruzada</i>	29
<i>Inibição da taquifilaxia cruzada pelo prazosin</i>	32
<i>Internalização de α_{1A}-ARs conjugados com GFP</i>	34
<i>Discussão</i>	36
<i>Conclusões</i>	40
<i>Referências Bibliográficas</i>	41
<i>Artigo Publicado</i>	48

Resumo

Resumo

Os α_1 -ARs são membros da superfamília de receptores acoplados à proteína G (GPCR), podendo ser divididos em três diferentes subtipos (α_{1A} -, α_{1B} - e α_{1D} -ARs), sendo todos semelhantemente ativados pela noradrenalina e adrenalina. Os agonistas seletivos de α_1 -ARs podem ser classificados em duas classes químicas, as feniletilaminas e as imidazolininas e são utilizados, por exemplo, para tratamento de hipotensão e também como descongestionantes nasais. O presente estudo investigou a capacidade dos agonistas de α_1 -ARs induzirem taquifilaxia nas contrações do ducto deferente de rato e internalização de α_{1A} -ARs conjugados com proteína fluorescente verde (GFP) expressos em células HEK293. Os resultados mostram que dentre todos os agonistas testados da classe das feniletilaminas (noradrenalina, metoxamina e fenilefrina) e imidazolininas (A61603, nafazolina e oximetazolina) apenas a oximetazolina foi capaz de induzir taquifilaxia em curvas concentração-resposta consecutivas próprias e também em curvas concentração-resposta de noradrenalina feitas em preparações de ducto deferente de rato. A taquifilaxia induzida pela oximetazolina é dependente da ativação de α_{1A} -ARs, uma vez que a incubação concomitante da oximetazolina com o antagonista seletivo de α_1 -ARs, o prazosin, inibiu a taquifilaxia. Estudos feitos com microscopia confocal utilizando α_{1A} -ARs conjugados com GFP mostram que a oximetazolina é capaz de induzir um aumento da fluorescência intracelular já nos primeiros 5 minutos de incubação enquanto que a noradrenalina não é capaz de induzir aumento do mesmo parâmetro mesmo após 30 minutos de incubação. Esse aumento da fluorescência intracelular é um indicativo do processo de internalização dos α_{1A} -ARs conjugados com GFP induzido pela oximetazolina mas não pela noradrenalina e pode estar

relacionado com a taquifilaxia observada nos experimentos funcionais. Entretanto, estudos adicionais mais profundos devem ser feitos para melhor compreensão dos mecanismos de dessensibilização e internalização induzidos pela oximetazolina no presente estudo.

Abstract

Abstract

The α_1 -ARs are G-protein coupled receptors (GPCR) composed by three subtypes (α_{1A} -, α_{1B} - e α_{1D} -ARs), similarly activated by epinephrine and norepinephrine. The selective agonists of α_1 -ARs can be classified into two different chemical classes, the phenylethylamines and imidazolines, which are used for treatment of hypertension and as nasal decongestants. The present study investigated the ability of some α_1 -ARs agonists to induce tachyphylaxis in the contractions of rat vas deferens and internalization of the α_{1A} -ARs target with green fluorescent protein (GFP) expressed in HEK293 cells. It was observed in the rat vas deferens that, among all agonists tested (the phenylethylamines norepinephrine, metoxamine, phenylephrine and imidazolines A61603, naphazoline and oxymetazoline), only oxymetazoline can induce tachyphylaxis in consecutive concentration-response curves and also in concentration-response curves to norepinephrine. The tachyphylaxis induced by oxymetazoline is dependent on α_1 -ARs activation, since it was inhibited in presence of prazosin, a α_1 -ARs selective antagonist. Confocal microscopy studies of HEK 293 cells expressing α_{1A} -ARs target with GFP show that oxymetazoline can induce prompt and time-dependent increase in intracellular fluorescence already after 5 minutes of incubation, whereas norepinephrine was unable to increase intracellular fluorescence even after 30 minutes of incubation. This increase in intracellular fluorescence indicates that oxymetazoline, but not norepinephrine, induces internalization of the α_{1A} -ARs target with the GFP. The internalization of α_{1A} -ARs target with the GFP induced by oxymetazoline may be related to the tachyphylaxis observed in functional experiments. However, other

studies are necessary to understand the mechanisms of tachyphylaxis and internalization induced by oxymetazoline in the present study.

Introdução

Introdução

Adrenoceptores α_1 (α_1 -ARs)

Os α_1 -ARs são receptores farmacológicos pertencentes à família dos receptores acoplados à proteína G (G-protein coupled receptors; GPCRs), uma superfamília de receptores que possui como característica principal a conformação estrutural disposta em 7 domínios transmembrana, a porção amino-terminal (N-terminal) extracelular e a porção carboxi-terminal (C-terminal) intracelular de tamanhos variados. Todos os componentes da família dos GPCRs interagem com proteínas G (proteína heterotrimérica composta por 3 subunidades: α , β e γ), ativando cascatas bioquímicas intracelulares que culminam em suas respostas funcionais.

Através da interação com a proteína G, os α_1 -ARs são responsáveis por respostas fisiológicas importantes como contração de musculatura lisa vascular e não vascular, diferenciação e divisão celular, entre outros (Zhong & Minneman, 1999).

Os α_1 -ARs podem ser divididos em três diferentes subtipos: α_{1A} -, α_{1B} - e α_{1D} -ARs (para revisão ver (Hieble *et al.*, 1995)), codificados por diferentes genes (em humanos localizados nos cromossomos 8, 5 e 20 respectivamente (Schwinn *et al.*, 1990; Yang-Feng *et al.*, 1990; Yang-Feng *et al.*, 1994)), sendo todos semelhantemente ativados pela adrenalina e pela noradrenalina.

Os subtipos de α_1 -ARs são co-expressados em vários tecidos podendo haver a predominância de um subtipo específico nas respostas fisiológicas observadas. Por exemplo, em estudos funcionais observa-se que há a predominância de α_{1A} -ARs em ducto deferente humano (Furukawa *et al.*, 1995; Lima *et al.*, 2005), α_{1B} -ARs em

baço (Han *et al.*, 1987) e fígado de ratos (Garcia-Sainz *et al.*, 1992) e α_{1D} -ARs em aorta de rato (Lima *et al.*, 2005), apesar de combinações de proporções variadas de mRNAs que codificam cada um dos subtipos de α_1 -ARs serem encontradas nestes tecidos.

Apesar dos α_1 -ARs interagirem preferencialmente com a proteína G, as porções C-terminais desses receptores também possuem sítios de interação com outras proteínas (tabela 01), além de serem alvos de fosforilação enzimática.

Tabela 01. Proteínas interagentes com porções C-terminais de α_1 -ARs e suas funções

Proteína	Subtipos de α_1 -ARs interagentes	Função	Referências
gC1qR	α_{1B} ; α_{1D}	Proteína multifuncional; pode modular localização celular do receptor	(Pupo & Minneman, 2003) (Xu <i>et al.</i> , 1999)
nNOS	α_{1A}	Formação de NO (ativação da proteína pelo aumento de Ca^{+2} intracelular)	(Pupo & Minneman, 2002) (Christopoulos & El-Fakahany, 1999)
BMP-1	α_{1A}	Formação de matriz extracelular	(Xu <i>et al.</i> , 2003)
Subunidade μ_2 do complexo AP2	α_{1B}	Internalização do receptor	(Diviani <i>et al.</i> , 2003)
Ezrin	α_{1B}	Mobilização do receptor por vias dependentes de actina	(Stanasila <i>et al.</i> , 2006)
Sintrofina	α_{1D}	Expressão do receptor na superfície celular, importante também na funcionalidade do receptor	(Chen <i>et al.</i> , 2006) (Lyssand <i>et al.</i> , 2008)
Filamina C	α_{1A} ; α_{1B} ; α_{1D}	Localização do receptor e sinalização celular	(Zhang <i>et al.</i> , 2004)
Snapin	α_{1A}	Interação concomitante com canais de Ca^{+2} do tipo TRPC6; influxo de íons	(Suzuki <i>et al.</i> , 2007)

Uma vez que os α_1 -ARs controlam importantes ações fisiológicas, drogas que interagem com esses receptores são úteis em muitas terapêuticas farmacológicas. Por exemplo, agonistas de α_1 -ARs são utilizados na terapêutica farmacológica de hipotensão e choque (Stewart *et al.*, 2002) e também como midriáticos e descongestionantes nasais (Johannssen *et al.*, 1997).

Os agonistas de α_1 -ARs podem ser divididos em dois grupos principais de acordo com sua estrutura química: as feniletilaminas e as imidazolininas. As feniletilaminas, dentre as quais estão as catecolaminas noradrenalina e adrenalina, são, em sua maioria, agonistas totais de alta eficácia em α_1 -ARs e possuem afinidade maior para o subtipo α_{1D} -AR (Minneman *et al.*, 1994). As imidazolininas, por sua vez, são, em grande parte, agonistas parciais, sendo seletivas para o subtipo α_{1A} -AR (Horie *et al.*, 1995; Kamikihara *et al.*, 2005).

Dessensibilização e Taquifilaxia

A perda de resposta funcional como conseqüência de vários estímulos sucessivos de uma mesma droga é particularmente importante para drogas cujo efeito terapêutico é conseqüência da atividade agonista em um sistema receptor. A perda gradual da resposta faz com que sejam necessárias doses maiores para a obtenção do mesmo efeito ou, em usos muito prolongados, até a perda completa do efeito. Por exemplo, em casos de descongestionantes nasais tópicos, cujo efeito terapêutico advém da atividade de um agonista de α_1 -ARs, o uso prolongado ou exacerbado, com a aplicação do composto em intervalos de tempo menores do que o recomendado e sem uma dosagem controlada, resulta na perda gradual do efeito terapêutico (Graf & Juto, 1995; Graf, 1996).

Segundo definição da International Union of Pharmacology (IUPHAR), a perda de resposta funcional gerada por estímulos sucessivos é denominada taquifilaxia e quando a taquifilaxia é uma consequência direta da ativação de receptores, pode ser denominada dessensibilização (Neubig *et al.*, 2003).

Dessensibilização e internalização induzidas por agonistas e vias de sinalização

O processo de dessensibilização e internalização de GPCRs mediadas por agonistas é muito bem descrito na literatura para adrenoceptores β (Broadley, 1999), receptores de angiotensina (Franca *et al.*, 2002) e, no caso dos α_1 -ARs, o processo já foi bem descrito para os α_{1B} -ARs (Garcia-Sainz *et al.*, 2000). Para entender o processo de dessensibilização e internalização de receptores, é fundamental o entendimento das cascatas bioquímicas desencadeadas por eles e as enzimas envolvidas.

Quando estimulados por agonistas, os α_1 -ARs ativam preferencialmente a proteína $G_{q/11}$, resultando na ativação de cascatas bioquímicas intracelulares que resultam em suas respostas funcionais. Uma das principais vias ativadas por α_1 -ARs é a via da fosfolipase C (PLC). Uma outra via ativada por α_1 -ARs é a via da proteína quinase ativada por mitógeno (mitogen-activated protein kinase; MAPK), responsável pela estimulação da síntese protéica e importante nos processos de divisão e diferenciação celular (Koshimizu *et al.*, 2003).

Após a ativação dos α_1 -ARs, a subunidade $\alpha_{q/11}$ da proteína G ativa a PLC que hidrolisa as moléculas de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2) presentes na membrana plasmática, resultando na produção de dois segundos mensageiros: o inositol trifosfato (IP_3), uma molécula solúvel que se difunde no meio intracelular interagindo com receptores específicos no retículo endoplasmático liberando íons

cálcio armazenados, aumentando a concentração citoplasmática desse íon e o diacilglicerol (DAG) molécula hidrofóbica que fica ancorada na membrana e que, juntamente com íons cálcio (Ca^{+2}), ativa a proteína quinase C (protein kinase C; PKC).

É sabido que a ativação de GPCRs também pode ativar um grupo de quinases denominadas quinases de receptores acoplados à proteína G (G-protein coupled receptor kinase; GRK). A GRK, assim como a PKC, é responsável pela fosforilação de resíduos de serina e treonina na porção C-terminal dos receptores. Porém, enquanto a GRK é específica e fosforila apenas resíduos da porção C-terminal de receptores que foram expostos a agonistas (Ferguson, 2001; Premont & Gainetdinov, 2007), a PKC é inespecífica e fosforila resíduos da porção C-terminal de receptores expostos ou não a agonistas (Ferguson, 2001). A fosforilação dos resíduos de aminoácidos na porção C-terminal dos receptores serve de sinalização para ligação de proteínas da família das β -arrestinas que, uma vez ligadas ao receptor, impedem a interação do mesmo com as unidades heterotriméricas da proteína G, mantendo o receptor desacoplado e caracterizando assim a dessensibilização desse receptor (Garcia-Sainz *et al.*, 2000; Premont & Gainetdinov, 2007).

A β -arrestina ligada ao receptor, além de dessensibilizá-lo, pode servir de sinalização para a formação de vesículas de clatrina, um componente do citoesqueleto celular (Krupnick *et al.*, 1997; Padiani *et al.*, 2005). O receptor então é envolto em uma vesícula e internalizado para o citoplasma (figura 01). Uma vez internalizado, o receptor ainda pode sofrer dois processos: desfosforilação dentro da própria vesícula por enzimas específicas (fosfatases) ou digestão por lisossomos.

O complexo receptor-arrestina internalizado ou ainda a própria β -arrestina podem estimular direta ou indiretamente a via da MAPK (Pierce *et al.*, 2001; Luttrell & Lefkowitz, 2002; Tohgo *et al.*, 2003).

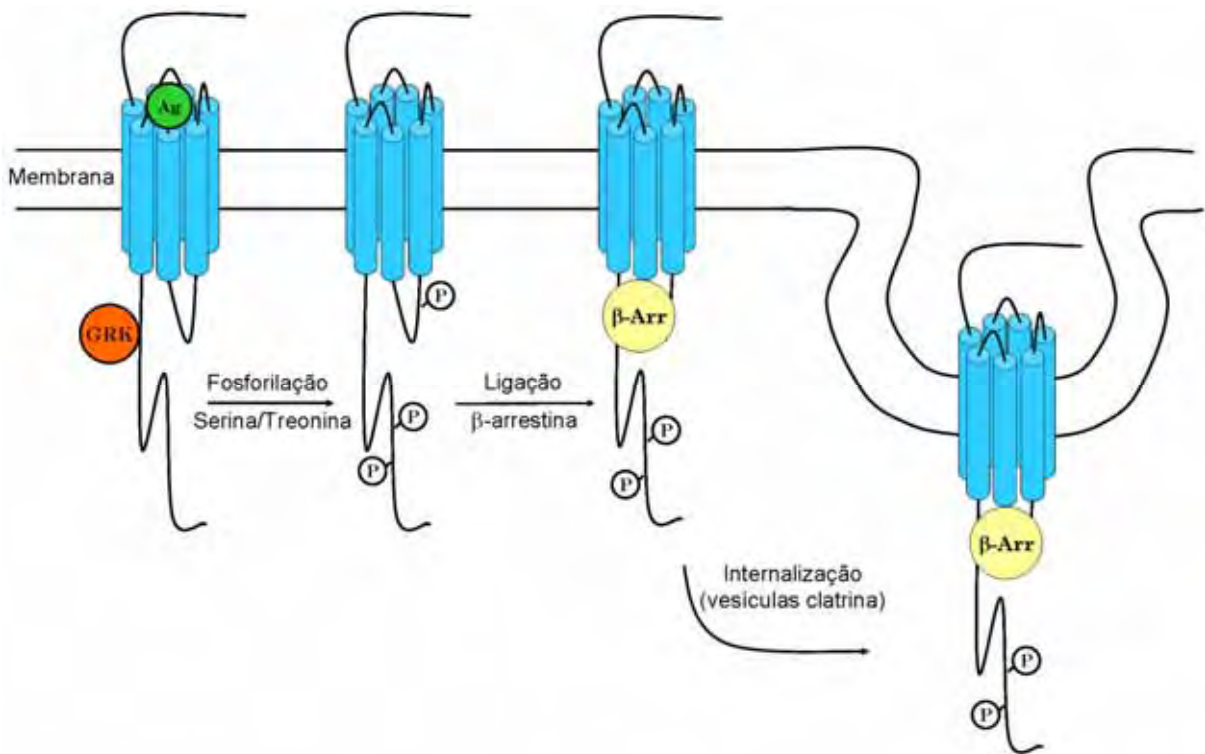


Figura 01. Desenho ilustrativo esquematizando o processo de internalização de GPCRs. Ag: agonista; GRK: quinase de receptores acoplados à proteína G; β -Arr: β -arrestina; P: resíduos fosforilados.

Linhas gerais sobre a presente pesquisa

Estudos anteriores feitos em nosso laboratório e também descritos na literatura mostraram que a oximetazolina, apesar de ser um agonista parcial de baixa eficácia, foi capaz de promover taquifilaxia nas contrações de ducto deferente de rato (Ruffolo *et al.*, 1977), ao passo que, a noradrenalina, um agonista total de alta eficácia, não promoveu perda de sensibilidade do tecido. Uma vez que a taquifilaxia pode ser uma consequência da dessensibilização de receptores mediadas por agonistas, é relevante investigar as causas desse fenômeno.

Não é de nosso conhecimento estudos na literatura que investiguem comparativamente a dessensibilização de α_{1A} -ARs induzida por agonistas de diferentes classes químicas. Esse estudo comparativo é importante principalmente quando os efeitos terapêuticos das drogas estão relacionados com suas atividades agonistas em um mesmo sistema receptor.

Objetivos

Objetivos

- Quantificar e analisar comparativamente a taquifilaxia induzida por agonistas feniletilamínicos e imidazolínicos através da ativação dos α_{1A} -ARs do ducto deferente de rato, determinando-se:
 - a) a menor concentração desses agonistas capazes de promover taquifilaxia.
 - b) a duração da taquifilaxia induzida por esses agonistas.
 - c) se a taquifilaxia é cruzada ou não, isto é, se a exposição prévia às imidazolininas também promove taquifilaxia nas respostas às feniletilaminas.

- Analisar comparativamente a internalização de α_{1A} -ARs recombinantes marcados com GFP expressados em células HEK-293 induzida por agonistas feniletilamínicos e imidazolínicos.

Material e Métodos

Material e Métodos

Experimentos de Contração

Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo *Comitê de Ética para o Uso Animais de Experimentação* da UNESP – Botucatu. Ratos Wistar machos adultos (16 a 20 semanas de idade, 260 a 380g) foram decapitados em guilhotina e os ductos deferentes foram retirados e preparados para o registro digital de contrações isométricas como se segue: os órgãos foram limpos de tecidos aderentes e montados em câmaras musculares de 10 ml sob tensão ótima de 9.8 mN em solução nutriente com a seguinte composição (mM): NaCl 138; KCl 5.7, CaCl₂ 1.8, NaH₂PO₄ 0.36, NaHCO₃ 15, dextrose 5.5, preparada em água destilada e deionizada e mantida a 30°C, pH 7.4, continuamente borbulhada com mistura de 95%O₂/5%CO₂. Todos os experimentos foram feitos na presença de um coquetel de inibidores contendo cocaína (6μM), corticosterona (10μM), ioimbina (0.1μM) e propranolol (0.1μM) para bloquear a captação neuronal, extraneuronal, α₂- e β-adrenoceptores, respectivamente.

Avaliação de parâmetros de contração em curvas concentração-resposta consecutivas

Para investigar possíveis alterações nos parâmetros pEC₅₀ (-log concentração efetiva 50%) e resposta máxima em curvas concentração-resposta consecutivas, foram construídas três curvas concentração-resposta para cada agonista com 30 minutos de intervalo entre as curvas. As curvas concentração-resposta foram construídas pelo método cumulativo com a adição de concentrações crescentes dos

agonistas feniletilamínicos (noradrenalina, fenilefrina e metoxamina) e imidazolínicos (A61603, oximetozalina e nafazolina). Foi utilizado apenas um agonista por preparação.

Investigação da taquifilaxia cruzada e determinação da concentração taquifilática

A construção de curvas concentração-resposta consecutivas para os agonistas mostrou que apenas as contrações induzidas pela oximetazolina apresentavam taquifilaxia. Assim, foi investigada a capacidade da oximetazolina promover taquifilaxia cruzada nas contrações induzidas pela noradrenalina, o agonista de referência. Para observar a indução da taquifilaxia cruzada e a concentração mínima de oximetazolina capaz de induzir esse fenômeno, após a construção de uma curva concentração-resposta controle de noradrenalina os ductos deferentes foram incubados por 5 minutos com quatro diferentes concentrações de oximetazolina correspondentes a 0.1, 1, 10 e 30 vezes a pEC_{50} , lavados e após 30 minutos, uma nova curva concentração-resposta de noradrenalina foi determinada.

Determinação da duração da taquifilaxia

Para determinar a duração da taquifilaxia induzida pela oximetazolina $10\mu\text{M}$ por 5 minutos (correspondente a 30 vezes a pEC_{50}), foram construídas curvas concentração-resposta cumulativas de noradrenalina após 30, 60, 120 e 180 minutos da aplicação do protocolo taquifilático, com troca da solução nutritiva a cada 20 minutos. Estes experimentos foram acompanhados de controles temporais

paralelos nos quais curvas concentração-resposta de noradrenalina foram determinadas em ductos deferentes que não foram submetidos ao protocolo taquifilático.

Estudos de inibição da taquifilaxia

Para os estudos de inibição da taquifilaxia foi utilizado o antagonista competitivo de α_1 -ARs prazosin. Nestes experimentos os ductos deferentes foram incubados previamente com prazosin 10nM por 30 minutos e, sem a remoção do antagonista, foram submetidos ao protocolo taquifilático, com a incubação de oximetazolina 10 μ M por 5 minutos. Após o tratamento, os tecidos foram lavados pelo menos 30 vezes e, após 30 minutos, foi determinada a curva concentração-resposta de noradrenalina.

Cultura de Células e Transfecção

Células derivadas do rim embrionário humano (HEK293) foram mantidas em DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) com 1 mM piruvato de sódio, suplementado com 10% de soro fetal bovino (v/v), 10 mg/l de estreptomicina e 100 U/ml de penicilina a 37° C em atmosfera umidificada (5% CO₂). Células HEK293 foram transfectadas com os vetores pEGFP-N3 contendo a seqüência que codifica α_{1A} -ARs conjugados com GFP em sua porção N-terminal por precipitação com fosfato de cálcio (20 μ g de DNA/4X10⁵ células).

Purificação do plasmídeo em larga escala

A purificação em larga escala do plasmídeo foi realizada com o kit *UltraClean™ - 250 to 500 ml Plasmid Prep Kit* (MO BIO Laboratories Inc., USA) seguindo instruções recomendadas pelo fabricante.

Uma colônia de bactérias *E.coli* DH5 α competentes transformadas com o plasmídeo codificador de α_{1A} -AR conjugado com a proteína fluorescente verde (GFP) foi selecionada e inoculada em 500 ml de meio LB líquido contendo antibiótico canamicina (100 μ l/ml). Após incubação overnight a 37°C, as bactérias foram separadas do meio de cultura por centrifugação a 3500 x g por 15 minutos. Descartado o sobrenadante, foram adicionados 5 ml da Solução P1 (Tris, EDTA, RNase A) e as bactérias foram ressuspensas por agitação até homogeneização. Posteriormente, foram adicionados 10 ml de solução P2 (SDS e NaOH) deixando agir por 30 segundos para lise celular alcalina. A seguir para promover neutralização, 30 ml da solução P3 (Acetato de Potássio) foram acrescentados e misturados por inversão. Para separação de debris celulares, o conteúdo foi transferido para um tubo de 50 ml e centrifugado a 3500 x g por 10 minutos. Com cuidado para não transferir o precipitado de debris celulares, 20 ml do sobrenadante foram transferidos para um tubo com filtro e este foi centrifugado durante 5 minutos a 3500 x g. O sobrenadante restante foi adicionado no mesmo tubo e a centrifugação foi repetida. Nesta etapa o DNA se liga à membrana de sílica branca do filtro e impurezas não desejadas como RNA ou debris celulares atravessam o filtro. Depois, o filtro foi lavado pela adição de 20 ml da Solução P4 (Tris, NaCl e etanol 50%) e centrifugado por 5 minutos a 3500 x g. A seguir, o filtro foi removido, colocado em um novo tubo e 1.0 ml de água milliQ autoclavada a 65°C foram adicionados ao filtro e centrifugados por 5 minutos a 3500 x g para a coleta do DNA.

A quantificação do DNA extraído foi determinada por espectrofotometria através da leitura da absorbância nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

Microscopia confocal

Os experimentos de microscopia confocal foram realizados no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de São Paulo (INFAR/UNIFESP).

As células HEK293 transientemente transfectadas e expressando α_{1A} -ARs conjugado com GFP foram cultivadas em lamínulas de quartzo tratadas com poli-D-lisina para os experimentos. As imagens foram capturadas em tempo real por microscópio confocal (LSM510, Carl Zeiss) a cada 5 minutos a partir da incubação dos agonistas noradrenalina (10 μ M) e oximetazolina (10 μ M) até o tempo total de 30 minutos. Todas as imagens foram feitas em imersão em óleo utilizando objetivas (Plan-Neofluar) em aumento de 40X. A excitação foi feita por laser de argônio e filtro HFT em comprimentos de onda de 488nm e a emissão captada por filtro LP em comprimento de onda de 505nm.

A mensuração da fluorescência foi feita com o auxílio do software ImageJ 1.38x (National Institutes of Health - NIH, Estados Unidos). A fluorescência foi determinada como média de intensidade em áreas circulares selecionadas em regiões adjacentes à membrana plasmática.

Análise Estatística

Os dados serão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) de n experimentos. Diferenças entre valores médios serão investigadas pelo teste t de

Student ($p < 0.05$) pareado ou não, ou Anova seguido de Newman-Keuls para comparações múltiplas.

Resultados

Resultados

Parâmetros de contração em curvas concentração-resposta consecutivas

A figura 02 mostra curvas concentração-resposta consecutivas das imidazolininas nafazolina, A61603 e oximetazolina no ducto deferente.

Não houve diferença significativa entre as três curvas concentração-resposta consecutivas de nafazolina. Os valores de contração máxima e pEC_{50} foram semelhantes para as três curvas (figura 02a, tabela 02).

As três curvas concentração-resposta consecutivas de A61603 no ducto deferente apresentaram contrações máximas e pEC_{50} semelhantes (figura 02b, tabela 02).

Não foi possível a construção de curvas concentração-resposta consecutivas para a oximetazolina, pois após a primeira curva concentração-resposta foi observada intensa taquifilaxia e mesmo altas concentrações de oximetazolina não induziram contrações no ducto deferente (figura 02c, tabela 02).

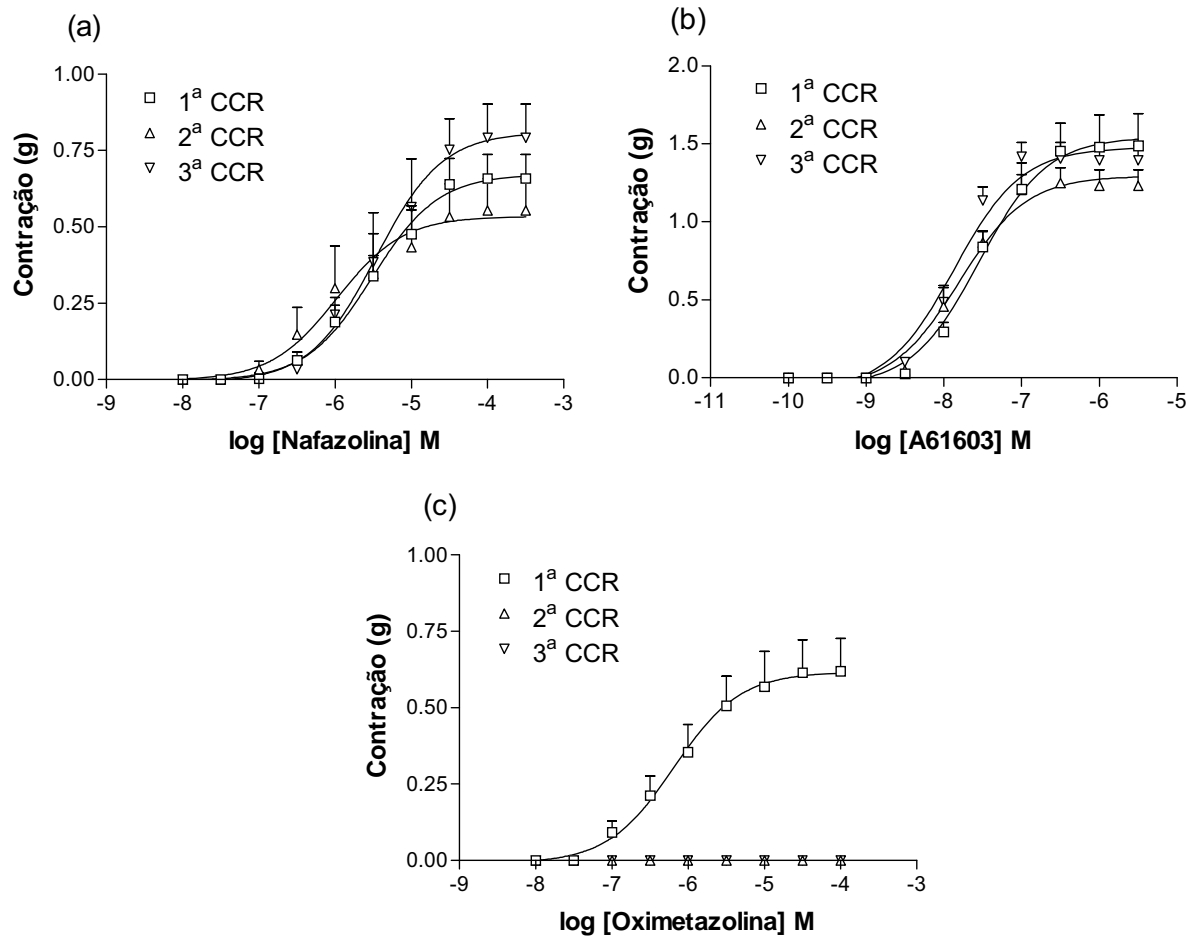


Figura 02. Curvas concentração-resposta (CCR) consecutivas das imidazolininas nafazolina (a), A61603 (b) e oximetazolina (c) no ducto deferente de rato. Cada símbolo representa a média e a linha vertical, quando maior que o símbolo, o erro padrão da média de 4 a 6 experimentos.

Tabela 02. Valores médios de pEC₅₀ e contração máxima (gramas de tensão) encontrados em três curvas concentração-resposta consecutivas para os agonistas imidazolínicos nafazolina, A61603 e oximetazolina.

	pEC ₅₀			Contração máxima (g)		
	1ª CCR	2ª CCR	3ª CCR	1ª CCR	2ª CCR	3ª CCR
Nafazolina	5.51 ± 0.13	5.98 ± 0.27	5.47 ± 0.17	0.66 ± 0.08	0.55 ± 0.10	0.79 ± 0.11
A61603	7.55 ± 0.12	7.80 ± 0.09	7.86 ± 0.09	1.48 ± 0.21	1.23 ± 0.11	1.39 ± 0.10
Oximetazolina	6.19 ± 0.21	n.d.	n.d.	0.62 ± 0.05	0	0

Os valores representam a MÉDIA ± EPM de 4 a 6 experimentos. CCR: curva concentração-resposta.
n.d= não-determinado

A figura 03 mostra curvas concentração-resposta consecutivas das feniletilaminas noradrenalina, fenilefrina e metoxamina no ducto deferente.

As curvas concentração-resposta consecutivas para a noradrenalina apresentaram pEC_{50} e contração máxima semelhantes (figura 03a, tabela 03). Já as curvas concentração-resposta consecutivas de fenilefrina não diferiram em relação ao parâmetro pEC_{50} , porém as contrações máximas da segunda e da terceira curva concentração-resposta consecutivas foram maiores que aquela determinada na primeira (figura 03b, tabela 03). As três curvas concentração-resposta consecutivas de metoxamina não diferiram quanto à pEC_{50} e contração máxima (figura 03c, tabela 03).

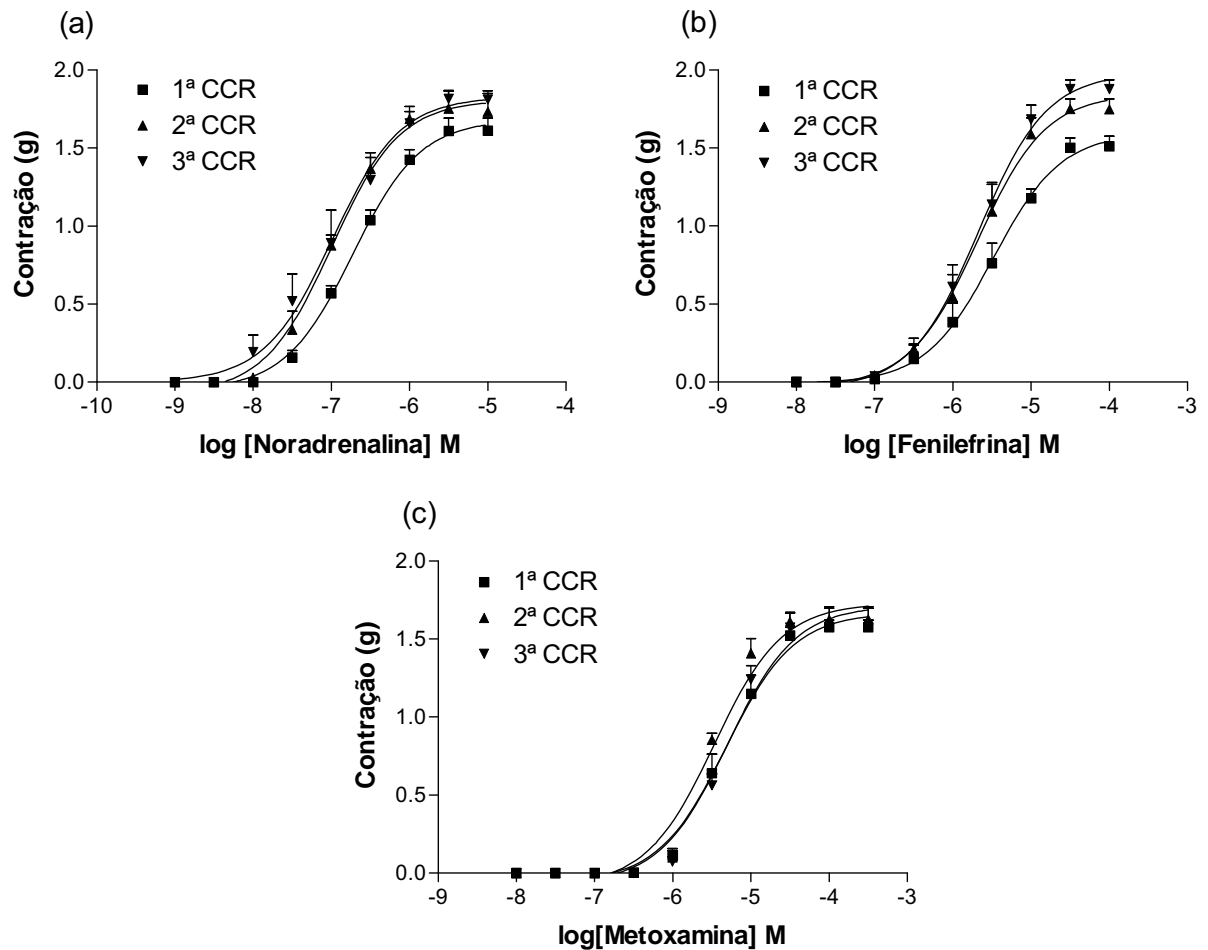


Figura 03. Curvas concentração-resposta (CCR) consecutivas das feniletilaminas noradrenalina (a), fenilefrina (b) e metoxamina (c) no ducto deferente de rato. Cada símbolo representa a média e a linha vertical, quando maior que o símbolo, o erro padrão da média de 4 a 6 experimentos.

Tabela 03. Valores médios de pEC₅₀ e contração máxima (gramas de tensão) encontrados em três curvas concentração-resposta consecutivas para as feniletilaminas noradrenalina, fenilefrina e metoxamina.

	pEC ₅₀			Contração máxima (g)		
	1 ^a CCR	2 ^a CCR	3 ^a CCR	1 ^a CCR	2 ^a CCR	3 ^a CCR
Noradrenalina	6.73 ± 0.05	6.99 ± 0.07	6.99 ± 0.11	1.61 ± 0.08	1.73 ± 0.12	1.81 ± 0.05
Fenilefrina	5.60 ± 0.09	5.63 ± 0.08	5.69 ± 0.07	1.51 ± 0.06	1.73 ± 0.07*	1.88 ± 0.06*
Metoxamina	5.32 ± 0.06	5.47 ± 0.06	5.30 ± 0.07	1.57 ± 0.04	1.62 ± 0.07	1.59 ± 0.11

Os valores estão expressos como MÉDIA ± EPM de 4 a 6 experimentos. CCR: curva concentração-resposta. * diferença significativa entre as curvas no respectivo parâmetro determinado para o mesmo agonista (p<0.05).

Taquifilaxia cruzada e determinação da concentração taquifilática

As contrações induzidas pela oximetazolina no ducto deferente apresentaram intensa taquifilaxia. Assim, foi investigado se a oximetazolina é capaz de promover taquifilaxia cruzada nas contrações induzidas pela noradrenalina, o agonista de referência.

A figura 04 mostra curvas concentração-resposta de noradrenalina antes (controle) e após a incubação de diferentes concentrações de oximetazolina por 5 minutos (30nM, 300nM, 3 μ M e 10 μ M). A incubação de oximetazolina 10 μ M/5min reduziu a potência da noradrenalina, indicando que a oximetazolina causa taquifilaxia cruzada nas contrações induzidas pela noradrenalina (tabela 4).

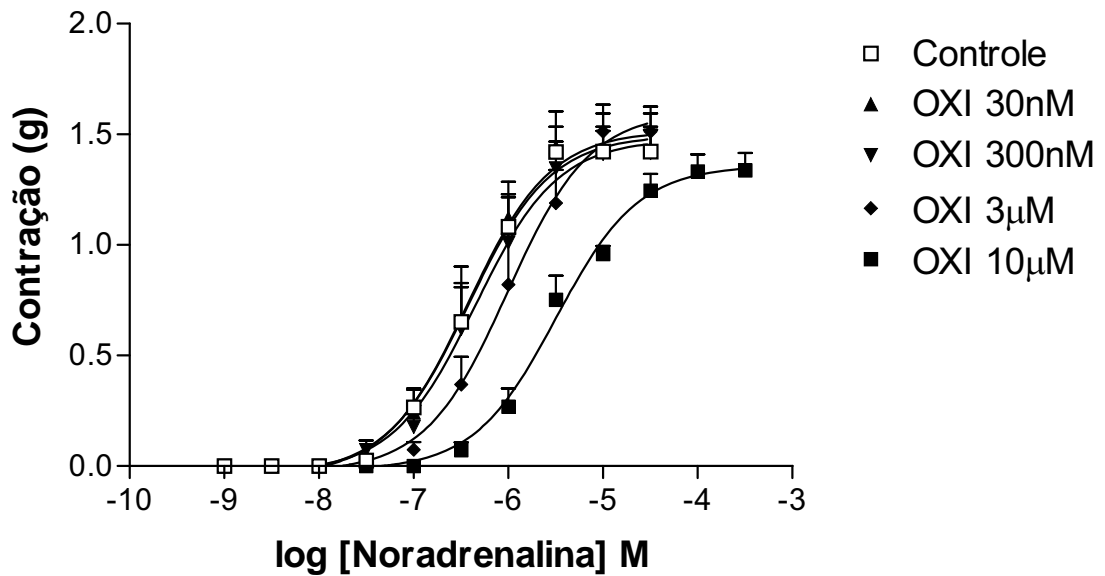


Figura 04. Curvas concentração-resposta de noradrenalina antes (controle) e após incubação com diferentes concentrações de oximetazolina por 5 minutos. Cada símbolo representa a média e a linha vertical, quando maior que o símbolo, o erro padrão da média de 4 a 5 experimentos.

Tabela 04. Valores médios dos parâmetros pEC₅₀ e contração máxima (gramas de tensão) para a noradrenalina antes (controle) e após a incubação de diferentes concentrações de oximetazolina.

	pEC ₅₀	Contração Máxima (g)
Controle	6.42 ± 0.10	1.42 ± 0.11
Após OXI 30nM/5 min	6.43 ± 0.12	1.43 ± 0.16
Após OXI 300nM/5 min	6.35 ± 0.12	1.41 ± 0.11
Após OXI 3μM/5 min	6.01 ± 0.11	1.51 ± 0.11
Após OXI 10μM/5 min	5.50 ± 0.06*	1.34 ± 0.08

Os valores estão expressos como MÉDIA ± EPM de 4 a 5 experimentos. *diferença significativa em relação ao controle no respectivo parâmetro determinado para os diferentes tratamentos (p<0.05).

Determinação do tempo de duração da taquifilaxia cruzada

A oximetazolina promoveu taquifilaxia cruzada nas contrações induzidas pela noradrenalina. A duração da taquifilaxia cruzada foi investigada pela construção de curvas concentração-resposta de noradrenalina após 30, 60, 120 e 180 minutos da aplicação do protocolo taquifilático (oximetazolina 10 μ M/5 min). As curvas concentração-resposta de noradrenalina foram comparadas a seus respectivos controles temporais determinados em ductos deferentes que não foram tratados com oximetazolina 10 μ M/5 min.

Após 30 minutos da aplicação do protocolo taquifilático, houve deslocamento à direita da curva concentração-resposta de noradrenalina (figura 05a, tabela 05), caracterizando a taquifilaxia cruzada induzida pela oximetazolina. A curva concentração-resposta de noradrenalina determinada após 60 minutos da aplicação do protocolo taquifilático também se apresentou deslocada à direita da curva concentração-resposta controle (figura 05b, tabela 05), indicando que a taquifilaxia cruzada induzida pela oximetazolina é duradoura, perdurando por pelo menos 60 minutos. Já as curvas concentração-resposta de noradrenalina determinadas após 120 e 180 minutos da aplicação do protocolo taquifilático (figuras 05c e 05d respectivamente), não diferiram de seus respectivos controles temporais, indicando que a taquifilaxia cruzada foi revertida (tabela 05).

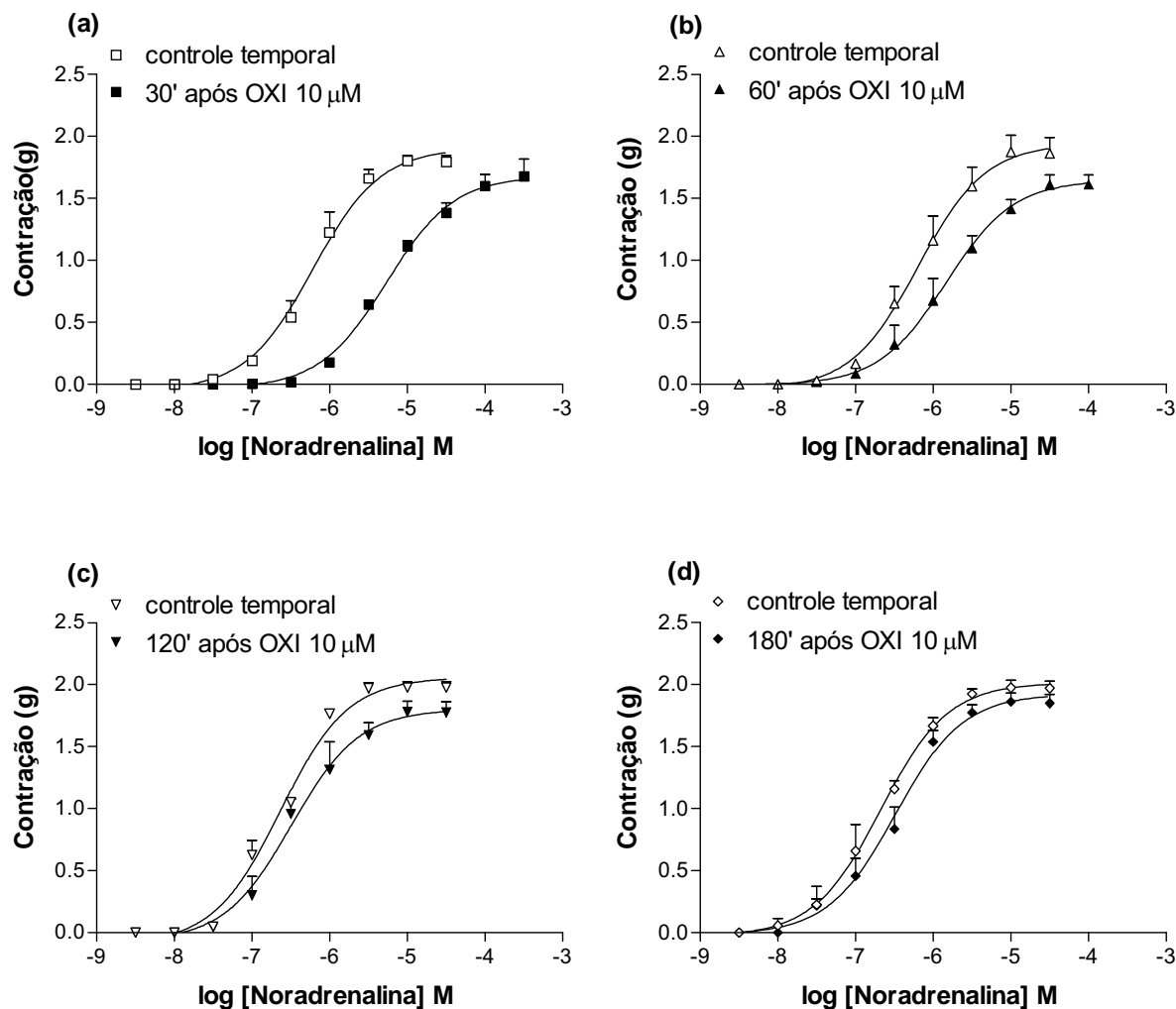


Figura 05. Gráficos das curvas concentração-resposta de noradrenalina após incubação com 10μM de oximetazolina. Cada gráfico apresenta uma curva controle temporal (símbolos abertos) e uma curva feita com diferentes intervalos após a incubação (símbolos fechados) para avaliação do tempo de duração da taquifilaxia induzida pela oximetazolina. Cada símbolo representa a média e a linha vertical, quando maior que o símbolo, o erro padrão da média de 4 experimentos.

Tabela 05. Valores de pEC₅₀ obtidas após diferentes intervalos da aplicação do protocolo taquifilático (oximetazolina 10μM/5min) e seus respectivos controles temporais.

	Após 30'	Após 60'	Após 120'	Após 180'
Controle	6.22 ± 0.07	6.20 ± 0.09	6.64 ± 0.05	6.68 ± 0.06
Incubado	5.27 ± 0.05*	5.83 ± 0.10*	6.49 ± 0.09	6.49 ± 0.09

Os valores estão expressos como MÉDIA ± EPM de 4 experimentos. * diferença significativa entre os grupos (p<0.05).

Tabela 06. Valores de contrações máximas (em gramas de tensão) obtidas após diferentes intervalos da aplicação do protocolo taquifilático (oximetazolina 10μM/5min) e seus respectivos controles temporais.

	Após 30'	Após 60'	Após 120'	Após 180'
Controle	1.80 ± 0.05	1.86 ± 0.13	1.97 ± 0.05	1.97 ± 0.06
Incubado	1.61 ± 0.11	1.61 ± 0.08	1.78 ± 0.08	1.85 ± 0.07

Os valores estão expressos como MÉDIA ± EPM de 4 experimentos.

Inibição da taquifilaxia cruzada pelo prazosin

Para investigar se a taquifilaxia cruzada promovida pela oximetazolina depende da ativação de α_1 -ARs, os ductos deferentes foram incubados com oximetazolina 10 μ M/5 min na presença ou ausência de prazosin 10 nM, um antagonista seletivo de α_1 -ARs. A figura 06 mostra curvas de noradrenalina em preparações de ducto deferente controle (sem a aplicação do protocolo taquifilático) e em preparações onde o protocolo taquifilático foi aplicado na ausência e na presença de prazosin 10nM. Na ausência de prazosin, o tratamento com oximetazolina 10 μ M/5 min promoveu um deslocamento à direita da curva concentração-resposta de noradrenalina. Porém, quando a oximetazolina 10 μ M/5 min foi incubada na presença de prazosin 10 nM, o deslocamento à direita na curva concentração-resposta de noradrenalina foi menos acentuado, indicando que o prazosin inibe, pelo menos parcialmente, a taquifilaxia cruzada induzida pela oximetazolina.

Para investigar se a inibição apenas parcial da taquifilaxia cruzada pelo prazosin resulta da lavagem incompleta deste antagonista lipofílico, uma curva concentração-resposta de noradrenalina foi determinada em ductos deferentes que haviam sido incubados apenas com prazosin 10 nM/35 min e lavados sucessivamente durante 30 min. A curva concentração-resposta de noradrenalina determinada nos ductos deferentes tratados apenas com prazosin 10 nM não diferiu daquela determinada em tecidos que receberam o protocolo taquifilático (oximetazolina 10 μ M/5 min) na presença de prazosin 10 nM. Tal resultado indica que a lavagem do prazosin foi incompleta e que a taquifilaxia cruzada promovida pela oximetazolina depende da ativação de α_1 -ARs

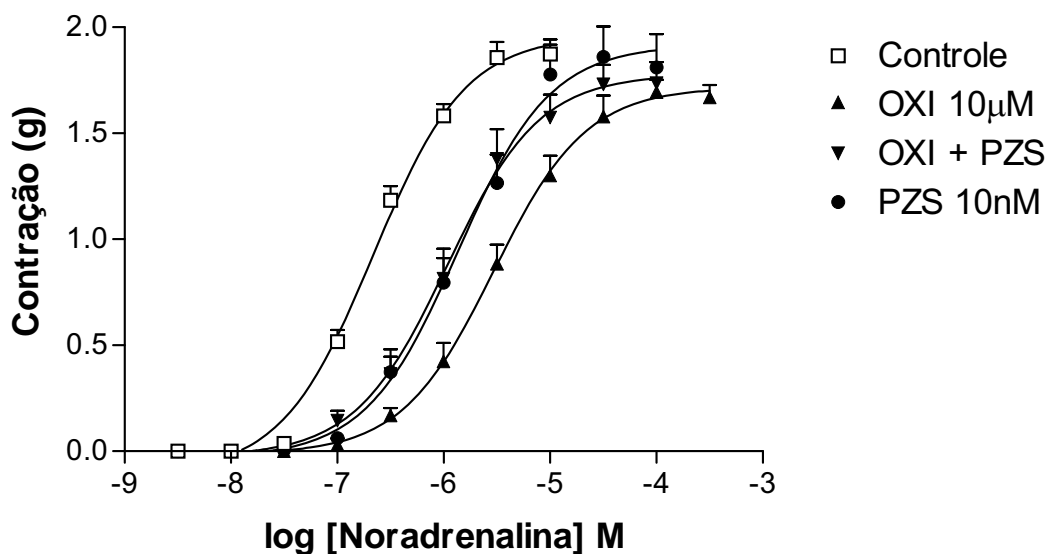


Figura 06. Curvas concentração-resposta (CCR) de noradrenalina controle (□); após incubação prévia de oximetazolina 10µM/5min (▲); após incubação de prazosin 10nM concomitante com a oximetazolina (▼); após incubação apenas com prazosin (●). Cada símbolo representa a média e a linha vertical, quando maior que o símbolo, o erro padrão da média de 4 a 6 experimentos.

Tabela 07. Valores médios de pEC₅₀ e contração máxima (em gramas de tensão) encontrados nas curvas concentração-resposta de noradrenalina feitas após tratamentos específicos.

	Controle	OXI	OXI+PZS	PZS
pEC ₅₀	6.66±0.05 ^a	5.53±0.06 ^b	5.97±0.08 ^c	5.86±0.09 ^c
Contração máxima (g)	1.87±0.07	1.70±0.06	1.73±0.10	1.87±0.14

Os valores representam a MÉDIA ± EPM de 4 a 6 experimentos. Letras superescritas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos em relação ao respectivo parâmetro (p<0.05).

Internalização de α_{1A} -ARs conjugados com GFP

Estudos de microscopia confocal foram realizados em células HEK293 transfectadas com o gene codificador de α_{1A} -AR conjugado com GFP. Nas imagens de microscopia confocal, as células apresentaram marcação fluorescente tanto na região da membrana plasmática como em regiões perinucleares. Essa marcação indica a presença do receptor tanto na membrana plasmática como em regiões intracelulares.

A figura 07 mostra imagens representativas de microscopia confocal de células tratadas com noradrenalina (10 μ M) ou oximetazolina (10 μ M) durante os primeiros 20 minutos de experimento. A célula tratada com noradrenalina não apresenta aumento da fluorescência intracelular durante o período experimental, já a célula tratada com oximetazolina apresenta um aumento evidente da fluorescência intracelular.

O gráfico apresentado na figura 07 mostra o aumento da fluorescência intracelular, em relação ao basal, nos experimentos com oximetazolina. O aumento da fluorescência já se mostrou significativo nos primeiros 5 minutos de experimento, sendo esse aumento tempo-dependente em todos os 30 minutos de experimento. Já nos experimentos com noradrenalina, não houve aumento na fluorescência intracelular.

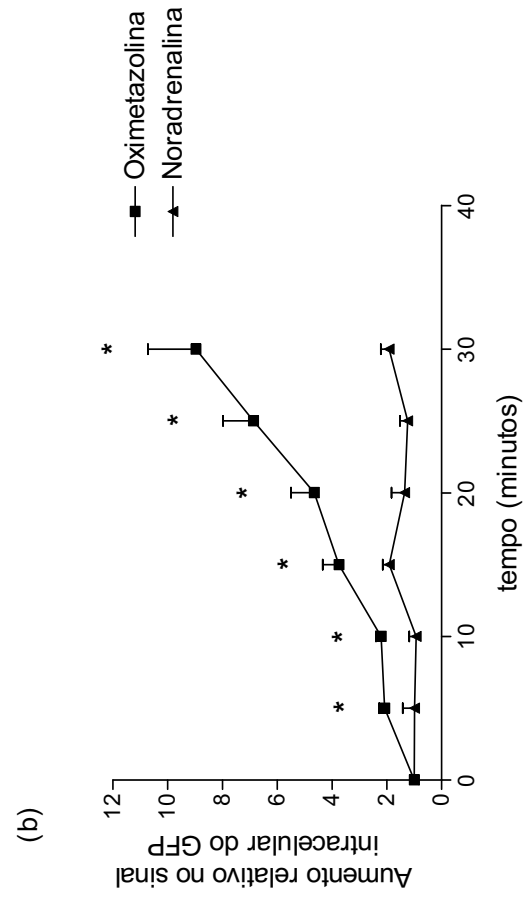
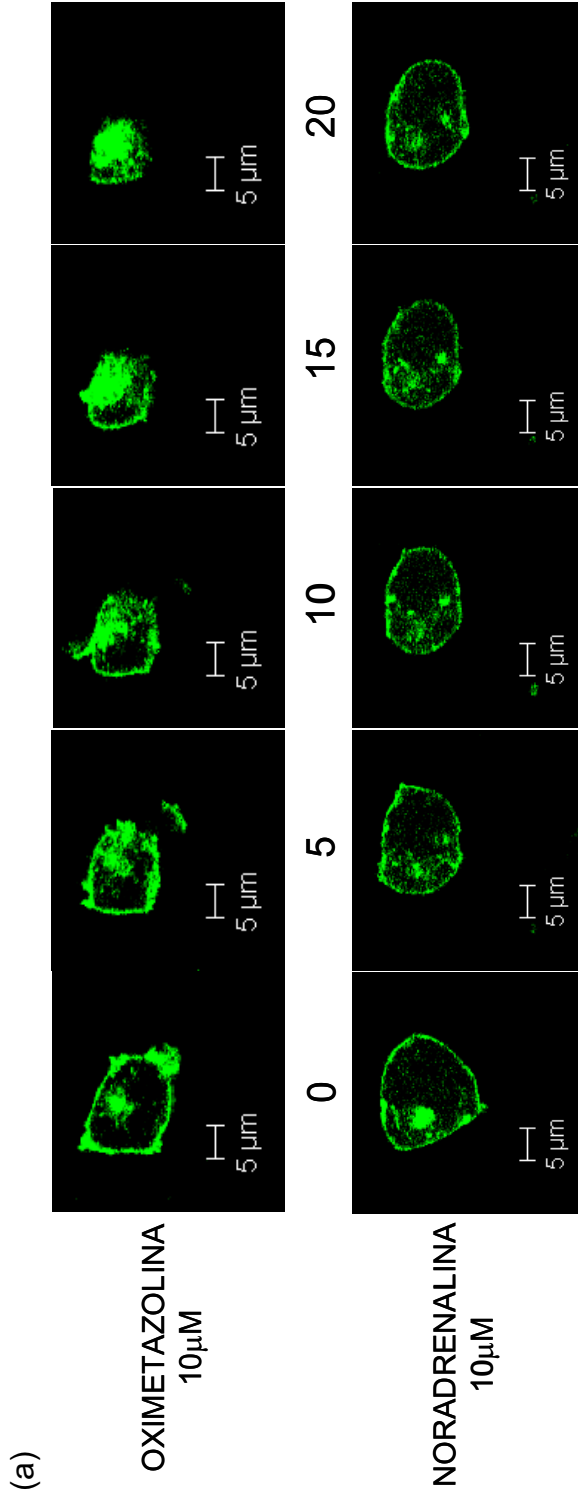


Figura 07. (a) Imagens representativas de microscopia confocal das células tratadas com oximetazolina (10µM) ou noradrenalina (10µM); (b) gráfico representando a fluorescência intracelular relativa mensurada em 3 experimentos. *diferença significativa com relação à intensidade basal ($p<0.05$).

Discussão

Discussão

O presente estudo investigou a taquifilaxia nas contrações resultantes da ativação de α_{1A} -ARs em ducto deferente de rato e a internalização de α_{1A} -ARs conjugados com a proteína fluorescente verde (GFP) em células HEK293.

A taquifilaxia é um fenômeno fisiológico descrito como a perda de resposta funcional após estimulações sucessivas (Neubig *et al.*, 2003). A perda da capacidade de resposta pode estar relacionada a várias causas, como redução do número de receptores na membrana por internalização através de vesículas recobertas de clatrina (Krupnick *et al.*, 1997; Krupnick & Benovic, 1998; Ferguson, 2001; Kohout & Lefkowitz, 2003; Pediani *et al.*, 2005), alterações de eventos posteriores à sua ativação (ex. produção de segundos mensageiros; (Lamers *et al.*, 1993)) ou fosforilação do receptor, diminuindo sua afinidade pela proteína G (Krupnick *et al.*, 1997; Vazquez-Prado *et al.*, 2000).

No presente estudo, as curvas concentração-resposta consecutivas determinadas para vários agonistas no ducto deferente de rato como a noradrenalina, fenilefrina, metoxamina, A61603 e nafazolina não diferiram entre si, sugerindo que as contrações induzidas por essas drogas não apresentam taquifilaxia. Interessantemente, apenas as contrações induzidas pela oximetazolina apresentaram intensa taquifilaxia tanto em contrações induzidas por ela mesma como em contrações induzidas por outros agonistas como a noradrenalina. De fato, alguns estudos sugerem que derivados imidazolínicos, em especial a oximetazolina, induzem taquifilaxia em contrações de ducto deferente de rato induzidas por outros agonistas. Foi observado que a administração repetitiva de oximetazolina 10 μ M no ducto deferente de rato induziu taquifilaxia nas contrações induzidas por outras

imidazolinas (Ruffolo *et al.*, 1977) e nas contrações induzidas pela adrenalina (Rice *et al.*, 1991).

O presente estudo observou que o tempo de duração da taquifilaxia induzida pela oximetazolina é longo, perdurando por pelo menos 60 minutos. Dados obtidos na literatura especulam que a oximetazolina possa atuar como um antagonista “pseudo-irreversível”, apresentando uma baixa taxa de dissociação do receptor (Rice *et al.*, 1991). Essa hipótese poderia explicar o longo tempo de duração da taquifilaxia observado no presente experimento. Porém, é sabido que a oximetazolina comporta-se como um antagonista competitivo reversível contra as contrações induzidas pela noradrenalina no ducto deferente de rato, uma vez que a inclinação da reta no gráfico de Schild não diferiu da unidade teórica (Campos *et al.*, 2003). Caso a hipótese de “pseudo-irreversibilidade” da interação da oximetazolina com os α_{1A} -ARs fosse correta, a inclinação da reta no gráfico de Schild deveria ser maior que a unidade teórica uma vez que o efeito de uma concentração de oximetazolina sofreria um efeito aditivo da concentração anterior, promovendo assim um deslocamento à direita da curva concentração-resposta maior do que o teoricamente previsto.

A taquifilaxia induzida pela oximetazolina no ducto deferente se mostrou dependente da ativação de α_{1A} -ARs uma vez que a incubação concomitante do antagonista prazosin preveniu o deslocamento à direita na curva concentração-resposta de noradrenalina. A dependência da ativação de α_{1A} -ARs juntamente com o descarte de um efeito de “pseudo-irreversibilidade” indicam que processos relacionados a dessensibilização e internalização de α_{1A} -ARs possam estar envolvidos na taquifilaxia induzida pela oximetazolina no ducto deferente de rato. No entanto, é difícil estudar os processos envolvidos na dessensibilização e

internalização de α_{1A} -ARs nativos principalmente em razão da ausência de anticorpos suficientemente específicos que permitam, por exemplo, a detecção de receptores fosforilados em ensaios de imunoprecipitação ou de receptores internalizados em ensaios de imunohistoquímica. Por outro lado, a utilização de α_{1A} -ARs recombinantes conjugados à GFP permite que a localização do receptor em compartimentos celulares diferentes seja determinada com resolução temporal através de estudos de microscopia confocal.

Experimentos de microscopia confocal utilizando células HEK293 transfectadas com α_{1A} -ARs conjugados à GFP em sua porção N-terminal foram realizados para investigar a capacidade da oximetazolina de induzir internalização desses receptores. Os resultados observados na microscopia confocal são claros em relação ao aumento de fluorescência intracelular induzido pela oximetazolina 10 μ M, sendo este aumento significativo em relação ao basal após apenas 5 minutos de incubação da oximetazolina, indicando internalização dos α_{1A} -ARs conjugados à GFP. Interessantemente, o tratamento das células HEK293 transfectadas com α_{1A} -ARs conjugados à GFP com noradrenalina 10 μ M não foi capaz de promover aumento de fluorescência intracelular, sugerindo que esse agonista não é capaz de promover internalização dos α_{1A} -ARs, mesmo após 30 minutos de incubação. Tais resultados são surpreendentes, pois a oximetazolina é um agonista parcial de baixa eficácia relativa nos α_{1A} -ARs. Estima-se que a eficácia intrínseca relativa da oximetazolina nos α_{1A} -ARs é cerca de 30 a 100 vezes menor que a da noradrenalina (Minneman & Abel, 1984; Minneman *et al.*, 1994). Alguns estudos sugerem que a fenilefrina, uma feniletilamina que é um agonista seletivo de α_1 -ARs, induz

internalização de α_{1A} -ARs somente após 50-60 minutos de incubação (Chalothorn *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2007).

É tentador sugerir que a internalização dos α_{1A} -ARs induzida pela oximetazolina está relacionada com a taquifilaxia observada nas contrações do ducto deferente. Porém, é importante reconhecer que as características particulares de cada sistema de estudo (receptores nativos versus receptores recombinantes heterologamente expressados num sistema celular) impedem o estabelecimento de uma relação direta entre os dois fenômenos observados para a oximetazolina e os α_{1A} -ARs. Sendo assim, experimentos adicionais devem ser feitos para um melhor esclarecimento acerca dos processos de taquifilaxia e internalização observados no presente estudo.

Conclusões

Conclusões

- dentre os agonistas testados (imidazolinas e feniletilaminas), apenas a oximetazolina foi capaz de promover taquifilaxia em curvas concentração-resposta consecutivas;
- a oximetazolina também é capaz de promover taquifilaxia cruzada, diminuindo a resposta contrátil do ducto deferente induzida pela noradrenalina;
- a taquifilaxia apresentada pela oximetazolina é dependente da ativação de α_{1A} -ARs, uma vez que o antagonista prazosin foi capaz de reverter a taquifilaxia;
- a oximetazolina, mas não a noradrenalina, induz intensa e rápida internalização de α_{1A} -ARs em células HEK293.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- BROADLEY, K.J. (1999). Review of mechanisms involved in the apparent differential desensitization of beta1- and beta2-adrenoceptor-mediated functional responses. *J Auton Pharmacol*, **19**, 335-45.
- CAMPOS, M., DE LUCENA MORAIS, P. & PUPO, A.S. (2003). Functional characterisation of alpha(1)-adrenoceptors in denervated rat vas deferens. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **368**, 72-8.
- CHALOTHORN, D., MCCUNE, D.F., EDELMANN, S.E., GARCIA-CAZARIN, M.L., TSUJIMOTO, G. & PIASCIK, M.T. (2002). Differences in the cellular localization and agonist-mediated internalization properties of the alpha(1)-adrenoceptor subtypes. *Mol Pharmacol*, **61**, 1008-16.
- CHEN, Z., HAGUE, C., HALL, R.A. & MINNEMAN, K.P. (2006). Syntrophins regulate alpha1D-adrenergic receptors through a PDZ domain-mediated interaction. *J Biol Chem*, **281**, 12414-20.
- CHRISTOPOULOS, A. & EL-FAKAHANY, E.E. (1999). The generation of nitric oxide by G protein-coupled receptors. *Life Sci*, **64**, 1-15.
- DIVIANI, D., LATTION, A.L., ABUIN, L., STAUB, O. & COTECCHIA, S. (2003). The adaptor complex 2 directly interacts with the alpha 1b-adrenergic receptor and plays a role in receptor endocytosis. *J Biol Chem*, **278**, 19331-40.
- FERGUSON, S.S. (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev*, **53**, 1-24.
- FRANCA, L.P., CORREA, S.A., BARBOSA, A.M., FERREIRA, A.T., HAN, S.W., SHIMUTA, S.I. & PAIVA, A.C. (2002). Evidence for changes in the tachyphylactic property of

- recombinant angiotensin II AT(1) receptor expressed in CHO cells. *Eur J Pharmacol*, **439**, 13-9.
- FURUKAWA, K., ROSARIO, D.J., SMITH, D.J., CHAPPLE, C.R., UCHIYAMA, T. & CHESSEWILLIAMS, R. (1995). Alpha 1A-adrenoceptor-mediated contractile responses of the human vas deferens. *Br J Pharmacol*, **116**, 1605-10.
- GARCIA-SAINZ, J.A., ROMERO-AVILA, M.T., ALCANTARA HERNANDEZ, R., MACIAS-SILVA, M., OLIVARES-REYES, A. & GONZALEZ-ESPINOSA, C. (1992). Species heterogeneity of hepatic alpha 1-adrenoceptors: alpha 1A-, alpha 1B- and alpha 1C-subtypes. *Biochem Biophys Res Commun*, **186**, 760-7.
- GARCIA-SAINZ, J.A., VAZQUEZ-PRADO, J. & DEL CARMEN MEDINA, L. (2000). Alpha 1-adrenoceptors: function and phosphorylation. *Eur J Pharmacol*, **389**, 1-12.
- GRAF, P. (1996). Long-term use of oxy- and xylometazoline nasal sprays induces rebound swelling, tolerance, and nasal hyperreactivity. *Rhinology*, **34**, 9-13.
- GRAF, P. & JUTO, J.E. (1995). Sustained use of xylometazoline nasal spray shortens the decongestive response and induces rebound swelling. *Rhinology*, **33**, 14-7.
- HAN, C., ABEL, P.W. & MINNEMAN, K.P. (1987). Alpha 1-adrenoceptor subtypes linked to different mechanisms for increasing intracellular Ca²⁺ in smooth muscle. *Nature*, **329**, 333-5.
- HIEBLE, J.P., BYLUND, D.B., CLARKE, D.E., EIKENBURG, D.C., LANGER, S.Z., LEFKOWITZ, R.J., MINNEMAN, K.P. & RUFFOLO, R.R., JR. (1995). International Union of Pharmacology. X. Recommendation for nomenclature of alpha 1-adrenoceptors: consensus update. *Pharmacol Rev*, **47**, 267-70.

- HORIE, K., OBIKA, K., FOGLAR, R. & TSUJIMOTO, G. (1995). Selectivity of the imidazoline alpha-adrenoceptor agonists (oxymetazoline and cirazoline) for human cloned alpha 1-adrenoceptor subtypes. *Br J Pharmacol*, **116**, 1611-8.
- JOHANNSEN, V., MAUNE, S., WERNER, J.A., RUDERT, H. & ZIEGLER, A. (1997). Alpha 1-receptors at pre-capillary resistance vessels of the human nasal mucosa. *Rhinology*, **35**, 161-5.
- KAMIKIHARA, S.Y., MUELLER, A., LIMA, V., SILVA, A.R., DA COSTA, I.B., BURATINI, J., JR. & PUPO, A.S. (2005). Differential distribution of functional alpha1-adrenergic receptor subtypes along the rat tail artery. *J Pharmacol Exp Ther*, **314**, 753-61.
- KOHOUT, T.A. & LEFKOWITZ, R.J. (2003). Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Mol Pharmacol*, **63**, 9-18.
- KOSHIMIZU, T.A., TANOUE, A., HIRASAWA, A., YAMAUCHI, J. & TSUJIMOTO, G. (2003). Recent advances in alpha1-adrenoceptor pharmacology. *Pharmacol Ther*, **98**, 235-44.
- KRUPNICK, J.G. & BENOVIC, J.L. (1998). The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **38**, 289-319.
- KRUPNICK, J.G., GOODMAN, O.B., JR., KEEN, J.H. & BENOVIC, J.L. (1997). Arrestin/clathrin interaction. Localization of the clathrin binding domain of nonvisual arrestins to the carboxy terminus. *J Biol Chem*, **272**, 15011-6.
- LAMERS, J.M., DE JONGE, H.W., PANAGIA, V. & VAN HEUGTEN, H.A. (1993). Receptor-mediated signalling pathways acting through hydrolysis of membrane phospholipids in cardiomyocytes. *Cardioscience*, **4**, 121-31.

- LIMA, V., MUELLER, A., KAMIHARA, S.Y., RAYMUNDI, V., ALEWOOD, D., LEWIS, R.J., CHEN, Z., MINNEMAN, K.P. & PUPO, A.S. (2005). Differential antagonism by conotoxin rho-TIA of contractions mediated by distinct alpha1-adrenoceptor subtypes in rat vas deferens, spleen and aorta. *Eur J Pharmacol*, **508**, 183-92.
- LUTTRELL, L.M. & LEFKOWITZ, R.J. (2002). The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci*, **115**, 455-65.
- LYSSAND, J.S., DEFINO, M.C., TANG, X.B., HERTZ, A.L., FELLER, D.B., WACKER, J.L., ADAMS, M.E. & HAGUE, C. (2008). Blood pressure is regulated by an alpha 1D-adrenergic receptor/dystrophin signalosome. *J Biol Chem*.
- MINNEMAN, K.P. & ABEL, P.W. (1984). Relationship between alpha 1-adrenoceptor density and functional response of rat vas deferens. Studies with phenoxybenzamine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **327**, 238-46.
- MINNEMAN, K.P., THEROUX, T.L., HOLLINGER, S., HAN, C. & ESBENSHADE, T.A. (1994). Selectivity of agonists for cloned alpha 1-adrenergic receptor subtypes. *Mol Pharmacol*, **46**, 929-36.
- NEUBIG, R.R., SPEDDING, M., KENAKIN, T. & CHRISTOPOULOS, A. (2003). International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol Rev*, **55**, 597-606.
- PEDIANI, J.D., COLSTON, J.F., CALDWELL, D., MILLIGAN, G., DALY, C.J. & McGRATH, J.C. (2005). Beta-arrestin-dependent spontaneous alpha1a-adrenoceptor endocytosis causes intracellular transportation of alpha-blockers via recycling compartments. *Mol Pharmacol*, **67**, 992-1004.

- PIERCE, K.L., LUTTRELL, L.M. & LEFKOWITZ, R.J. (2001). New mechanisms in heptahelical receptor signaling to mitogen activated protein kinase cascades. *Oncogene*, **20**, 1532-9.
- PREMONT, R.T. & GAINETDINOV, R.R. (2007). Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annu Rev Physiol*, **69**, 511-34.
- PUPPO, A.S. & MINNEMAN, K.P. (2002). Interaction of neuronal nitric oxide synthase with alpha1-adrenergic receptor subtypes in transfected HEK-293 cells. *BMC Pharmacol*, **2**, 17.
- PUPPO, A.S. & MINNEMAN, K.P. (2003). Specific interactions between gC1qR and alpha1-adrenoceptor subtypes. *J Recept Signal Transduct Res*, **23**, 185-95.
- RICE, P.J., HARDIN, J.C., HAMDI, A. & ABRAHAM, S.T. (1991). Imidazoline desensitization of epinephrine responses in rat vas deferens. *J Pharmacol Exp Ther*, **259**, 1182-7.
- RUFFOLO, R.R., TUROWSKI, B.S. & PATIL, P.N. (1977). Lack of cross-desensitization between structurally dissimilar alpha-adrenoceptor agonists. *J Pharm Pharmacol*, **29**, 378-80.
- SCHWINN, D.A., LOMASNEY, J.W., LORENZ, W., SZKLUT, P.J., FREMEAU, R.T., JR., YANG-FENG, T.L., CARON, M.G., LEFKOWITZ, R.J. & COTECCHIA, S. (1990). Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel alpha 1-adrenergic receptor subtype. *J Biol Chem*, **265**, 8183-9.
- STANASILA, L., ABUIN, L., DIVIANI, D. & COTECCHIA, S. (2006). Ezrin directly interacts with the alpha1b-adrenergic receptor and plays a role in receptor recycling. *J Biol Chem*, **281**, 4354-63.

- STEWART, J.M., MUNOZ, J. & WELDON, A. (2002). Clinical and physiological effects of an acute alpha-1 adrenergic agonist and a beta-1 adrenergic antagonist in chronic orthostatic intolerance. *Circulation*, **106**, 2946-54.
- SUZUKI, F., MORISHIMA, S., TANAKA, T. & MURAMATSU, I. (2007). Snapin, a new regulator of receptor signaling, augments alpha1A-adrenoceptor-operated calcium influx through TRPC6. *J Biol Chem*, **282**, 29563-73.
- TOHGO, A., CHOY, E.W., GESTY-PALMER, D., PIERCE, K.L., LAPORTE, S., OAKLEY, R.H., CARON, M.G., LEFKOWITZ, R.J. & LUTTRELL, L.M. (2003). The stability of the G protein-coupled receptor-beta-arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation. *J Biol Chem*, **278**, 6258-67.
- VAZQUEZ-PRADO, J., MEDINA, L.C., ROMERO-AVILA, M.T., GONZALEZ-ESPINOSA, C. & GARCIA-SAINZ, J.A. (2000). Norepinephrine- and phorbol ester-induced phosphorylation of alpha(1a)-adrenergic receptors. Functional aspects. *J Biol Chem*, **275**, 6553-9.
- WANG, S.Y., SONG, Y., XU, M., HE, Q.H., HAN, Q.D. & ZHANG, Y.Y. (2007). Internalization and distribution of three alpha1-adrenoceptor subtypes in HEK293A cells before and after agonist stimulation. *Acta Pharmacol Sin*, **28**, 359-66.
- XU, Q., ZHANG, T., HAN, Q.D. & ZHANG, Y.Y. (2003). [Binding between alpha 1A-adrenergic receptor and segment of bone morphogenetic protein-1 in human embryonic cell 293]. *Sheng Li Xue Bao*, **55**, 692-8.
- XU, Z., HIRASAWA, A., SHINOURA, H. & TSUJIMOTO, G. (1999). Interaction of the alpha(1B)-adrenergic receptor with gC1q-R, a multifunctional protein. *J Biol Chem*, **274**, 21149-54.

- YANG-FENG, T.L., HAN, H., LOMASNEY, J.W. & CARON, M.G. (1994). Localization of the cDNA for an alpha 1-adrenergic receptor subtype (ADRA1D) to chromosome band 20p13. *Cytogenet Cell Genet*, **66**, 170-1.
- YANG-FENG, T.L., XUE, F.Y., ZHONG, W.W., COTECCHIA, S., FRIELLE, T., CARON, M.G., LEFKOWITZ, R.J. & FRANCKE, U. (1990). Chromosomal organization of adrenergic receptor genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 1516-20.
- ZHANG, T., XU, Q., CHEN, F.R., HAN, Q.D. & ZHANG, Y.Y. (2004). Yeast two-hybrid screening for proteins that interact with alpha1-adrenergic receptors. *Acta Pharmacol Sin*, **25**, 1471-8.
- ZHONG, H. & MINNEMAN, K.P. (1999). Alpha1-adrenoceptor subtypes. *Eur J Pharmacol*, **375**, 261-76.

Artigo Publicado

α_1 -Adrenoceptors in proximal segments of tail arteries from control and reserpinised rats

Susana Y. Kamikihara · André Mueller ·
Vanessa Lima · Juliana Akinaga ·
Fernanda D. Nojimoto · Anthony Castilho ·
José Buratini Jr. · André S. Pupo

Received: 12 April 2007 / Accepted: 28 June 2007 / Published online: 4 August 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract It has been recently shown that the supersensitivity of distal segments of the rat tail artery to phenylephrine after chemical sympathectomy with reserpine results from the appearance of α_{1D} -adrenoceptors. It is known that both α_{1A} - and α_{1D} -adrenoceptors are involved in the contractions of proximal portions of the rat tail artery. Therefore, this study investigated whether sympathectomy with reserpine would induce supersensitivity in proximal segments of the rat tail artery, a tissue in which α_{1D} -adrenoceptors are already functional. Proximal segments of tail arteries from reserpinised rats were three- to sixfold more sensitive to phenylephrine and methoxamine than were arteries from control rats ($n=6-2$; $p<0.05$). The imidazolines *N*-[5-(4,5-Dihydro-1*H*-imidazol-2-yl)-2-hydroxy-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-1-yl]methanesulfonamide hydrobromide (A-61603) and oxymetazoline, which activate selectively α_{1A} -adrenoceptors, were equipotent in tail arteries from control and reserpinised rats ($n=4-2$; $p<0.05$), whereas buspirone, which activates selectively α_{1D} -adrenoceptor, was ≈ 4 -fold more potent in tail arteries from reserpinised rats ($n=4-6$; $p<0.05$). Prazosin (nonselective) and 5-methylurapidil (α_{1A} -selective), were competitive antagonists of contractions induced by phenylephrine and were equipotent in tail arteries from control and reserpinised rats ($n=4-6$). The selective α_{1D} -adrenoceptor antagonist 8-[2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-8-azaspiro

[4.5]decane-7,9-dione dihydrochloride (BMY-7378) presented similar complex antagonism in tail arteries from control and reserpinised rats, with Schild slopes much lower than 1.0 ($p<0.05$, $n=4-6$). Semiquantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) revealed that mRNA encoding α_{1A} - and α_{1B} -adrenoceptors are similarly distributed in tail arteries from control and reserpinised rats, whereas mRNA for α_{1D} -adrenoceptors is twice more abundant in the tail artery from reserpinised rats. In conclusion, the supersensitivity induced by reserpine is related only to α_{1D} -adrenoceptors, even in tissues where this receptor subtype is already present and functional. Only the use of subtype-selective α_1 -adrenoceptor agonists detected the increased α_{1D} -adrenoceptor component after reserpinisation, as the antagonists behaved similarly in tail arteries from control and reserpinised rats.

Keywords α_1 -adrenoceptors · α_{1D} -adrenoceptors · α_1 -adrenoceptor agonists · Rat tail artery · Reserpine · Sympathectomy

Introduction

Important actions of norepinephrine and epinephrine result from the activation of α_1 -adrenoceptors, including the contractions of vascular and nonvascular smooth muscle and the control of glycogenolysis, neuronal excitability, glandular secretion and cell growth, division and differentiation. There are three different α_1 -adrenoceptors, named α_{1A} -, α_{1B} - and α_{1D} -adrenoceptors, and separate genes encode each of these subtypes (Koshimizu et al. 2003). All three α_1 -adrenoceptors are members of the subfamily 1A of the G protein-coupled receptors, which means that the binding site for the endogenous catecholamines is in a

S. Y. Kamikihara · A. Mueller · V. Lima · J. Akinaga ·
F. D. Nojimoto · A. S. Pupo (✉)
Department of Pharmacology, Instituto de Biotecnologias,
UNESP, Botucatu, SP 18618-000, Brazil
e-mail: aspupo@ibb.unesp.br

A. Castilho · J. Buratini Jr.
Department of Physiology, Instituto de Biotecnologias,
UNESP, Botucatu, SP 18618-000, Brazil

hydrophilic cavity and shares residues located at the membrane level of the third to the sixth transmembrane α -helices (Bockaert and Pin 1999). The α_1 -adrenoceptors couple preferentially to a $G_{q/11}$ protein, and the activation of these receptors leads to the activation of phospholipase C β and formation of diacylglycerol and inositol phosphates (Koshimizu et al. 2003).

Drugs that activate α_1 -adrenoceptors are currently used as local vasoconstrictors, nasal decongestants, mydriatics, antihypotensives and to revert atrial paroxysmal tachycardia. In addition, α_1 -adrenoceptor agonists are promising candidates for the treatment of migraine (Willems et al. 2003). Great effort has been dedicated to the identification of the predominant α_1 -adrenoceptor subtype(s) involved in each of the therapeutic actions of the α_1 -adrenoceptor agonists, as the use of subtype-selective compounds would be advantageous.

The α_1 -adrenoceptor agonists can be classified according to their chemical structures into two main classes as phenethylamine derivatives and imidazoline-containing compounds. The selectivity of the commonly used phenethylamines (phenylephrine and methoxamine) for any of the α_1 -adrenoceptors is unclear, although some studies indicate that methoxamine is a poor agonist of α_{1B} -adrenoceptors (Marucci et al. 2005; Oshita et al. 1993). On the other hand, the imidazolines *N*-[5-(4,5-Dihydro-1*H*-imidazol-2-yl)-2-hydroxy-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-1-yl]methanesulfonamide hydrobromide (A-61603) and oxymetazoline show considerable selectivity for α_{1A} -adrenoceptors (Knepper et al. 1995; Minneman et al. 1994). The azaspirone buspirone is a partial agonist at 5-HT $_{1A}$ receptors that has been shown to present selective agonism at α_{1D} -adrenoceptor (Eltze et al. 1999; Yamamoto and Koike 2001).

The contractions of the rat tail artery in response to α_1 -adrenoceptor agonists are predominantly mediated by α_{1A} -adrenoceptors (Lachnit et al. 1997; Villalobos-Molina and Ibarra 1996). However, depending on the segment of the tail from which the arterial preparation is isolated, either α_{1B} - or α_{1D} -adrenoceptors can be found to coparticipate with α_{1A} -adrenoceptors in the contractions induced by adrenoceptor agonists (Kamikihara et al. 2005). Significant coparticipation has been observed of α_{1D} -adrenoceptors in rings taken from proximal segments and α_{1B} -adrenoceptors in rings from distal segments (Jahnichen et al. 2004; Kamikihara et al. 2005). These features make the rat tail artery an interesting model for the study of the pharmacological properties of selective and nonselective α_1 -adrenoceptor agonists in tissues with heterogeneous receptor populations.

It is well known that chemical sympathectomy with reserpine induces supersensitivity of the rat tail artery to some adrenoceptor agonists. Interestingly, it has been recently shown that the supersensitivity to phenylephrine induced by reserpine is due to the specific expression of α_{1D} -

adrenoceptors, as 8-[2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-8-azaspiro[4.5]decane-7,9-dione dihydrochloride (BMY-7378) at 30 nM, a concentration that antagonises selectively α_{1D} -adrenoceptors, inhibited the supersensitivity to phenylephrine but was ineffective in tail arteries from nonreserpinised rats (Taki et al. 2004).

It is unknown what effects of reserpine are in proximal segments of the tail artery where α_{1D} -adrenoceptors are already present and functional. In addition, it remains to be determined what the effects of reserpine are on the actions of subtype-selective agonists, as the study by Taki et al. (2004) employed only phenylephrine as the agonist. Therefore, this study investigated the actions of the phenethylamines phenylephrine and methoxamine, the imidazolines A 61603 and oxymetazoline, and the azaspirone buspirone in proximal segments of the tail artery from control and reserpine-treated rats to determine what the effects of reserpine are in arterial segments where α_{1D} -adrenoceptors are already present and functional. The effects of reserpine on the expression of α_1 -adrenoceptors transcripts were also determined.

Methods

Animals and treatment with reserpine

Male Wistar rats weighing between 250 and 380 g (16–20 weeks old) were kept in a controlled environment with temperature at $25 \pm 1^\circ\text{C}$; humidity $55 \pm 5\%$; 12-h light/dark cycle (lights on at 6:00 A.M.) and free access to regular lab chow and tap water. Some animals received daily intraperitoneal injections of reserpine (5 mg Kg^{-1}) for 7 days and were killed by decapitation in a guillotine 24 h after the last injection. The experimental procedures were approved by the ethics committee for the Use of Experimental Animals from UNESP-Botucatu and are in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [National Institutes of Health (NIH)].

Functional studies

Proximal segments of the ventral artery of the tail (located within the initial 4 cm of the tail) from control and reserpine-treated rats were removed carefully, cleaned of adhering tissue and endothelium by gentle rubbing with a stainless steel wire, cut into 3- to 4-mm rings and mounted under 19.6 mN of optimal tension in 10 ml organ baths containing a physiological solution of the following composition (mM): NaCl 119; KCl 4.7; CaCl_2 2.5; MgSO_4 1.2; KH_2PO_4 1.2 and dextrose 11, prepared in glass-distilled, deionised water, maintained at 37°C and bubbled with 5% $\text{CO}_2/95\% \text{O}_2$. Changes in tail artery tension were recorded using FORT10 isometric force

transducers (WPI, USA) connected to Transbridge 4M Transducer Amplifier (WPI, USA) connected to a PC-based MP100 system and analysed off-line using AcqKnowledge version 3.5.7 software. (Biopac Systems Inc., USA). A cocktail containing cocaine (6 μM), corticosterone (10 μM), yohimbine (0.1 μM) and propranolol (0.1 μM), was included in all experiments to block neuronal uptake, extraneuronal uptake, α_2 -adrenoceptors and β_1 - and β_2 -adrenoceptors, respectively. The effectiveness of the chemical sympathectomy with reserpine was checked by the absence of contractile response to the indirect sympathomimetic agent tyramine (30 μM) and was higher than 85% in the sense that less than 15% of the tail arteries from reserpinised rats contracted to tyramine. Only unresponsive organs were used. After an equilibration period of 60 min with adjustments of basal tension and changes of physiological solution at each 20 min, the arteries were repeatedly challenged with phenylephrine 10 μM at 20 min intervals until contractions of similar magnitude were obtained (usually three times). Then, concentration response-curves to α_1 -adrenoceptor agonists were obtained in the absence or presence of increasing concentrations of the α_1 -antagonists prazosin, BMY-7378 and 5-methylurapidil previously incubated for at least 45 min. Not more than four consecutive concentration-response curves were obtained from each preparation, as preliminary experiments showed that after the fourth concentration-response curve, there are significant changes in the sensitivity of the tail artery.

The pA_2 values for competitive antagonists were calculated by Schild regression analysis (Arunlakshana and Schild 1959). The ratios between the half-maximal concentrations of agonists (concentration ratios, r) were calculated only when the maximal amplitude of the concentration-response curve in the presence of the competitive antagonists was similar to that obtained in its absence. Data were plotted as log-antagonist concentrations (M) vs. log ($r-1$). For calculation purposes, the slope parameter was constrained to 1.0 when statistically not different from unity. When the slope parameter differed from the theoretical unity, the antagonist affinity was estimated as pK_B calculated through the formula $pK_B = -\log$ [lowest effective concentration of the antagonist (M)] + log ($r-1$).

Curve fitting and pD_2 calculation was performed with the software package GraphPad Prism version 3.00, San Diego, CA, USA. All values are shown as means \pm standard error of mean (SEM) of n experiments. Differences between mean values were tested for statistical significance ($p < 0.05$) using Student's paired or unpaired t tests or analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls for multiple comparisons.

Drugs were obtained from the following sources: A-61603, Tocris Cookson Ltd, UK, cocaine (Cocainum Hydrochloricum puriss.) C.H. Boehringer, Germany; buspirone hydro-

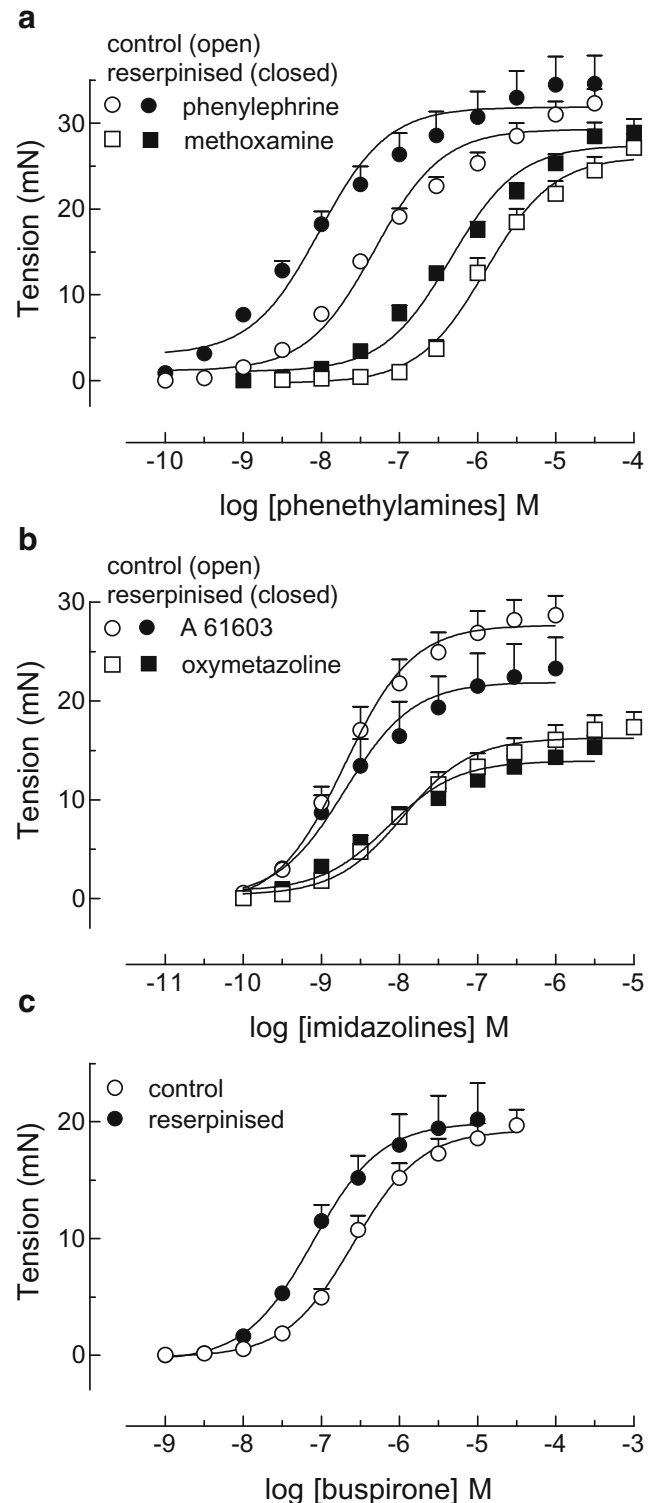


Fig. 1 Concentration-response curves obtained for phenethylamine (a, phenylephrine and methoxamine) and imidazoline (b, A-61603 and oxymetazoline) agonists and buspirone (c) in rings from proximal segments of the tail artery of control and reserpinised rats. Each symbol represents the mean, and the vertical line, when greater than the symbol, represents the standard error of mean of four to 14 experiments

chloride, corticosterone, phenylephrine and methoxamine from Sigma Chemical Co, USA; BMY-7378, oxymetazoline HCl, prazosin HCl, (\pm)-propranolol HCl and yohimbine HCl from Research Biochemicals Inc. (RBI/SIGMA), USA.

Total RNA extraction

A proximal segment of the ventral artery of the rat tail (taken from the initial 4 cm of the tail, corresponding to those isolated for functional studies) was rapidly dissected, cleaned of connective and fat tissue in ice-cold saline (0.9% NaCl), and the endothelium was removed by gentle rubbing with stainless steel wire in the lumen. These segments of the tail artery were homogenised in TRIzol (Invitrogen, São Paulo, Brazil) with a Polytron, and total RNA was extracted according to the recommended protocol from a pool of samples composed by tissues from four animals. Total RNA concentration was measured by absorbance at 260 nm (BioPhotometer-Eppendorf).

Semiquantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

The sequence of the specific primers were described by Queiroz et al. (Queiroz et al. 2002) as follow: α_{1a} sense, GTA GCC AAG AGA GAA AGC CG (628–647) and α_{1a} antisense, CAA CCC ACC ACG ATG CCC AG (820–839); α_{1b} sense, GCT CCT TCT ACA TCC CGC TCG (629–649), and α_{1b} antisense, AGG GGA GCC AAC ATA AGA TGA (908–928); α_{1d} sense, CGT GTG CTC CTT CTA CCT ACC (759–779), and α_{1d} antisense, GCA CAG GAC GAA GAG ACC CAC (1042–1062); GAPDH sense, CGG GAA GCT TGT GAT CAA TGG (258–277) and GAPDH antisense, GGC AGT GAT GCC ATG GAC TG (614–595). The size expected for the amplified products are 212, 300, 304 and 357 base pairs for α_{1a} , α_{1b} , α_{1d} and GAPDH genes, respectively. The GAPDH gene was used as an internal control for data normalisation.

To remove contaminating genomic DNA, 1 μ g of total RNA was treated with DNase I (Invitrogen, São Paulo,

Brazil), and reverse transcription was then performed with 8 μ l of the DNase-treated RNA solution using a SUPER-Script III RT kit (Invitrogen, São Paulo, Brazil) according to manufacturer's instructions.

Polymerase chain reaction (PCR) was performed on 2 μ l (each of the α_1 -adrenoceptors subtypes) or 0.5 μ l (for GAPDH) of cDNA in a PCR mastermix containing 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM deoxyribonucleotides (dNTPs), 0.4 μ M (for α_1 -adrenoceptors subtypes) or 1.6 μ M (for GAPDH) specific primers, 1.25 units Taq DNA polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brazil) and H₂O in a total volume of 25 μ l. PCR conditions for α_1 -adrenoceptors subtypes were adapted from (Queiroz et al. 2002) as follow: one cycle of denaturation 96°C, 30 s, followed by 29 cycles of denaturation 96°C, 10 s; annealing 58°C (α_{1a}) or 55°C (α_{1b} , α_{1d}), 10 s; extension 74°C, 40 s (α_{1b} , α_{1d}) or 15 s (α_{1a}). A final extension of 74°C, 2 min was performed for all samples. GAPDH was amplified under one cycle of denaturation 94°C, 3 min; followed by 33 cycles of denaturation 94°C, 45 s; annealing 60°C, 45 s; extension 70°C, 1 min.

PCR products (15 μ l) were separated in 1.5% agarose gel, stained with ethidium bromide and visualised under ultraviolet light and digitalised with Image Master VDS (Pharmacia Biotech, D&R, Israel). Band intensities were measured by computerised densitometry using the Image Gauge V.3.12 software (FujiFilm) and were expressed as arbitrary units (AU). Semiquantitative RT-PCR was validated by choosing the number of PCR cycles and amount of RNA within the linear range of the amplification curve for each gene. Experiments were performed on three independent pools, and the mean \pm SEM were compared.

Results

General effects of reserpine

The rats treated with reserpine presented the characteristic reduction in locomotor activity, ptosis, piloerection, diarrhoea and reduction of body weight (27%, $n=24$, $p<0.05$).

Table 1 Parameters of agonist action in rings isolated from proximal segments of the tail artery from control and reserpinised rats

		Phenethylamines		Imidazolines		
		Phenylephrine ($n=8-12$)	Methoxamine ($n=6-7$)	A-61603 ($n=4$)	Oxymetazoline ($n=8-14$)	Buspirone ($n=4-6$)
pD ₂	Control	7.3 \pm 0.1	5.8 \pm 0.1	8.7 \pm 0.1	8.0 \pm 0.1	6.5 \pm 0.1
	Reserpinised	8.1 \pm 0.1*	6.3 \pm 0.1*	8.7 \pm 0.1	8.1 \pm 0.1	7.1 \pm 0.1*
E _{max} (millinewtons)	Control	32.3 \pm 1.6	27.1 \pm 1.6	28.7 \pm 1.9	17.1 \pm 1.5	19.7 \pm 1.3
	Reserpinised	34.7 \pm 3.3	28.9 \pm 1.6	23.2 \pm 3.1	15.3 \pm 1.1	20.2 \pm 3.1

Values are mean \pm standard error of mean of n independent experiments

*Different from the respective pD₂ found in rings from control rats ($p<0.05$).

The mortality rate in the group of rats treated with reserpine was 14% (six deaths in 44 rats), whereas during the same period, there was no mortality in the control group (treated with vehicle, $n=24$).

Effects of selective and nonselective agonists in the tail arteries from control and reserpinised rats

Figure 1 shows concentration-response curves obtained in rings from proximal segments of tail arteries from control and reserpinised rats in response to the phenethylamines phenylephrine and methoxamine (Fig. 1a), to the selective α_{1A} -adrenoceptor agonists A-61603 and oxymetazoline (Minneman et al. 1994; Knepper et al. 1995) (Fig. 1b),

and to the selective α_{1D} -adrenoceptor agonist buspirone (Eltze et al. 1999; Yamamoto and Koike 2001) (Fig. 1c). The pD_2 and maximal contractions (in mN) are shown in Table 1. Phenylephrine and methoxamine were approximately three to six times more potent in tail arteries from reserpinised rats than in control rats (Fig. 1a, Table 1), whereas the imidazolines A-61603 and oxymetazoline were equipotent in rings from arteries of both control and reserpinised rats (Fig. 1b, Table 1). Buspirone was approximately four times more potent in the tail artery from reserpinised rats (Fig. 1c, Table 1). The maximal contractions induced by the agonists in rings from control rats were not different from those induced in rings from reserpinised rats ($p>0.05$, Table 1).

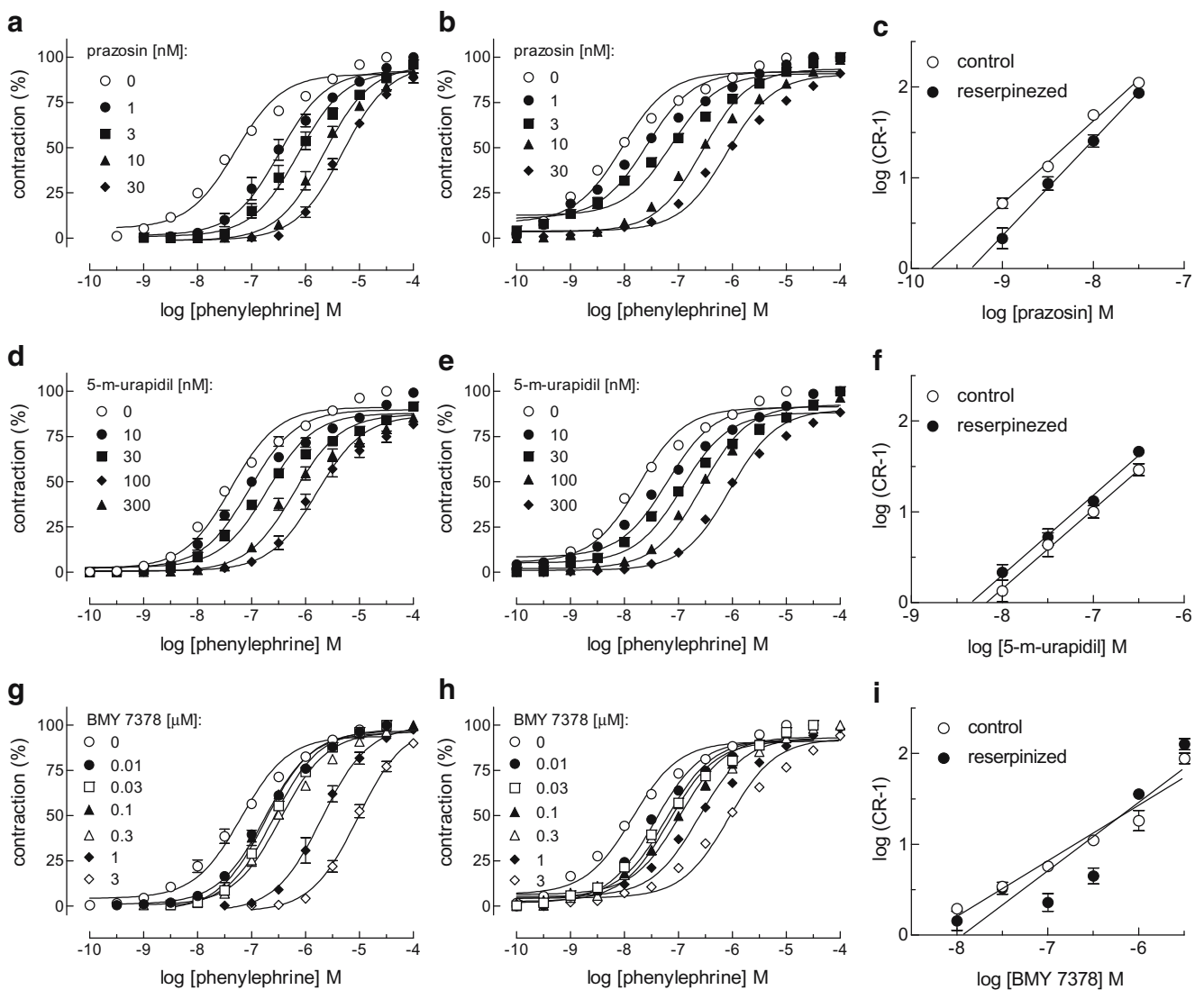


Fig. 2 Effects of increasing concentrations of prazosin (**a**, **b**), 5-methylurapidil (**d**, **e**) and BMY-7378 (**g**, **h**) on concentration-response curves to phenylephrine in rings from proximal segments of the tail artery of control (**a**, **d**, **g**) and reserpinised (**b**, **e**, **h**) rats. Each symbol represents the mean, and the vertical line, when greater than the symbol, the standard error of mean (SEM) of four experiments. Schild

plots for the antagonism of contractions induced by phenylephrine by prazosin (**c**), 5-methylurapidil (**f**) and BMY-7378 (**i**) in rings from proximal segments of the tail artery of control and reserpinised rats. Each symbol represents the mean, and the vertical line, when greater than the symbol, the SEM of four to six individual experiments

Table 2 Parameters of antagonist action against contractions induced by phenylephrine in rings isolated from proximal segments of the tail artery from control and reserpinised rats

	Prazosin		5-methylurapidil		BMY-7378	
	pA ₂	Slope	pA ₂	Slope	pK _{BA}	Slope
Control	9.7±0.2	0.9±0.1	8.2±0.1	0.9±0.1	8.3±0.2	0.6±0.1*
Reserpinised	9.3±0.2	1.1±0.1	8.3±0.2	0.9±0.1	8.2±0.2	0.7±0.1*

Values are mean ± standard error of mean of four to six independent determinations

*Different from the theoretical unity ($p < 0.05$). ^a When the slope was different from 1.0, the potency of the antagonist was estimated through the formula $pK_B = \log(r - 1) - \log[\text{lowest effective molar concentration of the antagonist (M)}]$.

Effects of adrenoceptor antagonists on contractions induced by phenylephrine in tail arteries from control and reserpinised rats

The actions of prazosin, 5-methylurapidil and BMY-7378 were investigated against the contractions induced by phenylephrine in rings from proximal segments of tail arteries from control and reserpinised rats. Prazosin behaved as a competitive antagonist against the contractions induced by phenylephrine, showing similar affinities in tail arteries from control and reserpinised rats (Fig. 2a,b, and Table 2). Similarly, 5-methylurapidil, a selective antagonist of α_{1A} -adrenoceptors, also behaved as a competitive antagonist and was equipotent in tail arteries from control and reserpinised rats (Fig. 2d and e). However, the α_{1D} -adrenoceptor-selective antagonist BMY-7378 presented complex antagonism of the contractions of tail arteries from both control and reserpinised rats in response to phenylephrine (Fig. 2g,h). These complex antagonisms were characterised by the effectiveness of the low concentrations of BMY-7378 (10–300 nM), which induced rightward shifts in the concentrations-response curves to phenylephrine that were concentration dependent but not linearly related; i.e. in this concentration range, a threefold increase in BMY-7378 did not result in a threefold reduction in the potency of phenylephrine, as predicted by the dynamics of the competitive antagonism at a single receptor. The Schild plots resulted in lines with slopes much lower than 1.0 (Fig. 2i, Table 2). Similar results were obtained with methoxamine (data not shown).

Effects of BMY-7378 on contractions induced by selective adrenoceptor agonists

The effects of BMY-7378 on contractions induced by A-61603, oxymetazoline and buspirone in tail arteries from control and reserpinised rats were determined to further investigate the α_1 -adrenoceptor subtypes activated by the selective agonists. In contrast to what was observed with phenylephrine, the contractions induced by the imidazolines A-61603 (Fig. 3a,b for tail arteries from control and

reserpinised rats, respectively) and oxymetazoline (Fig. 3c,d for tail arteries from control and reserpinised rats, respectively) were competitively antagonised by BMY-7378 with low pA₂ values (≈ 6.5 , Table 3). On the other hand, the contractions induced by buspirone were also competitively antagonised by BMY-7378 (Fig. 3e, f for tail arteries from control and reserpinised rats, respectively), but with affinity approximately 80-fold higher (pA₂ ≈ 8.4 , Table 3).

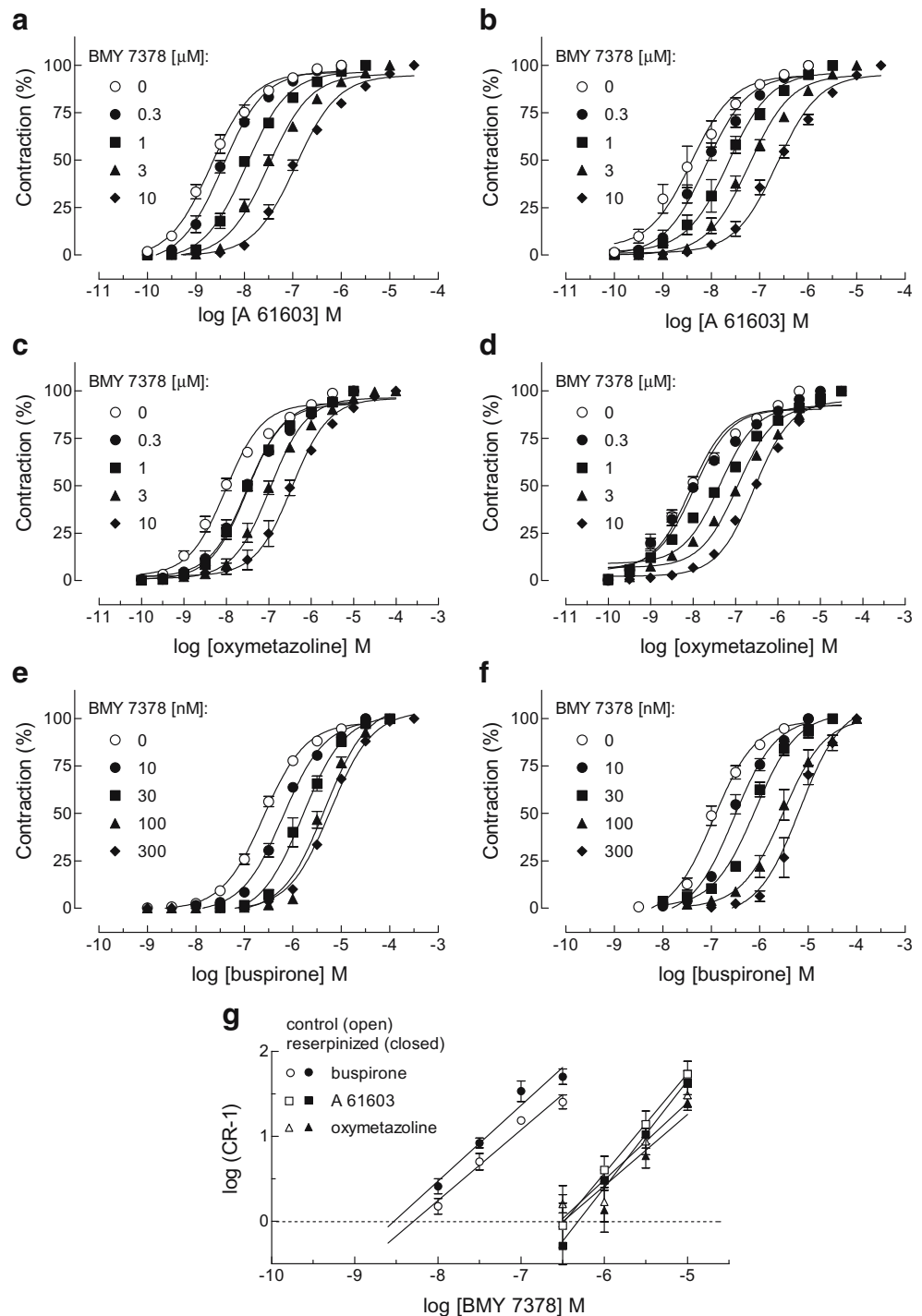
Expression of mRNA for α_1 -adrenoceptor subtypes in different segments of the rat tail artery

The mRNA encoding each of the α_1 -adrenoceptor subtypes was amplified by RT-PCR from total RNA extracted from proximal segments of tail arteries of control and reserpinised rats using specific primers for each subtype. The amplified products were separated by agarose gel electrophoresis, quantified by densitometry and compared with the mRNA encoding GAPDH. This semiquantitative procedure allows convenient comparisons of the expression levels of mRNA for the same receptor subtype in arteries from control and reserpinised rats. However, this procedure does not allow comparisons of the expression levels among different receptor subtypes. Figure 4 shows that the relative expressions of transcripts for α_{1A} - and α_{1B} -adrenoceptors in the rat tail artery are not affected by reserpinisation. However, the relative expression of α_{1D} -adrenoceptor mRNA in proximal segments of tail arteries from reserpinised rats was approximately twice as high as that in control rats ($p < 0.05$).

Discussion

This study investigates the effects of subtype-selective and nonselective α_1 -adrenoceptor agonists in proximal segments of tail arteries from control and reserpinised rats. We recently showed that contractions of the tail artery in response to α_1 -adrenoceptor agonists are predominantly mediated by α_{1A} -adrenoceptors, but depending on the segment of the tail from which the arterial preparation is

Fig. 3 Effects of increasing concentrations of BMY-7378 on concentration-response curves to A-61603 (**a, b**), oxymetazoline (**c, d**) and buspirone (**e, f**) in rings from proximal segments of the tail artery of control (**a, c, e**) and reserpinised (**b, d, f**) rats. The Schild plot for the antagonism of these contractions by BMY-7378 is presented in (**g**). Each *symbol* represents the mean, and the *vertical line*, when greater than the symbol, the standard error of mean of four to 12 experiments



isolated, either α_{1B} - or α_{1D} -adrenoceptor can be found to coparticipate with α_{1A} -adrenoceptors (Jahnichen et al. 2004; Kamikihara et al. 2005). There is significant coparticipation of α_{1D} -adrenoceptors in rings taken from proximal segments and α_{1B} -adrenoceptors in rings from distal segments.

It has been shown that chemical sympathectomy with reserpine induces specific expression of α_{1D} -adrenoceptors in this artery (Taki et al. 2004). In our experiments, the

arterial rings taken from proximal segments of the tail artery from reserpinised rats were three- to fivefold more sensitive to phenylephrine and methoxamine than rings taken from control rats. However, A-61603 and oxymetazoline were equipotent in tail arteries from control and reserpinised rats. These results show that the supersensitivity induced by chemical sympathectomy with reserpine is not a phenomenon that can be generalised to all α_1 -adrenoceptors agonists. In addition, the supersensitivity

Table 3 Antagonism of contractions induced by different agonists in proximal segments of the tail artery from control and reserpinised rats by BMY-7378

	A-61603		Oxymetazoline		Buspirone	
	pA ₂	Slope	pA ₂	Slope	pA ₂	Slope
Control	6.6±0.1	1.2±0.1	6.4±0.1	0.9±0.1	8.3±0.2	0.8±0.1
Reserpinised	6.5±0.1	1.2±0.2	6.5±0.1	0.9±0.2	8.5±0.2	0.9±0.1

Values are mean ± standard error of mean of four to six independent determinations

induced by reserpine does not involve α_{1A} -adrenoceptors, as A-61603 and oxymetazoline are selective agonists of α_{1A} -adrenoceptors (Knepper et al. 1995; Minneman et al. 1994). The fact that the tail artery from reserpinised rats was more sensitive to the selective α_{1D} -adrenoceptor agonist buspirone than the tail artery from control rats also supports the specific involvement of α_{1D} -adrenoceptors in the supersensitivity induced by reserpine.

The effects of subtype-selective and nonselective α_1 -adrenoceptor antagonists in proximal segments of tail arteries from control and reserpinised rats were also investigated to check whether these compounds would be useful to identify the α_1 -adrenoceptors involved in the supersensitivity induced by reserpine. The contractions induced by phenylephrine in tail arteries from control and reserpinised rats were similarly antagonised by prazosin. These were not unexpected results, as prazosin is a nonselective antagonist of α_1 -adrenoceptors subtypes. Interestingly, 5-methyl urapidil, a selective antagonist of α_{1A} -adrenoceptors, also presented similar antagonism of the contractions induced by phenylephrine in tail arteries from control and reserpinised rats. One would expect that 5-methyl-urapidil should detect the increased participation of

α_{1D} -adrenoceptors in the contractions of tail arteries from reserpinised rats. The similar antagonism presented by 5-methyl urapidil in tail arteries from control and reserpinised rats may result from the relatively low selectivity of this drug for α_{1A} - over α_{1D} -adrenoceptors. Whereas the affinity of 5-methyl urapidil for α_{1A} -adrenoceptors is approximately 30- to 100-fold higher than for α_{1B} -adrenoceptors, its affinity for α_{1D} -adrenoceptors is only three- to tenfold lower than that for α_{1A} -adrenoceptors. On the other hand, the participation of α_{1D} -adrenoceptors in the contractions of tail arteries from both control and reserpinised rats is promptly detected by the effects of the α_{1D} -selective antagonist BMY-7378. This selective antagonist discriminated two different components in the contractions of proximal segments of tail arteries from both control and reserpinised rats in response to phenylephrine: the first component was blocked by “low” concentrations of BMY-7378 (10–300 nM), whereas the second was competitively antagonised by higher concentrations (1–10 μ M); the pK_B estimated from the lowest effective concentration of BMY-7378 (10 nM) through the formula $pK_B = -\log [BMY - 7378 (M)] + \log (r - 1)$ in tail arteries from control (8.2±0.1, *n*=4) and reserpinised rats (8.5±0.1, *n*=4) indicates that part of the contractions of proximal segments of tail arteries from both control and reserpinised rats results from the activation of α_{1D} -adrenoceptors. Conversely, if only the effects of 0.3–10 μ M are used to construct the Schild plots, the slopes are not different from unity (1.2±0.1 in tail artery from control rats and 1.2±0.1 in tail artery from reserpinised rats), but the derived pA₂ (6.9±0.1 in tail artery from control rats and 6.8±0.1 in tail artery from reserpinised rats) is much lower than that expected for the involvement of α_{1D} -adrenoceptors. It is important to note that although the antagonism presented by BMY-7378 allowed the prompt detection of α_{1D} -adrenoceptors, this antagonist was unable to uncover the increased involvement of α_{1D} -adrenoceptors in the contractions of tail arteries from reserpinised rats.

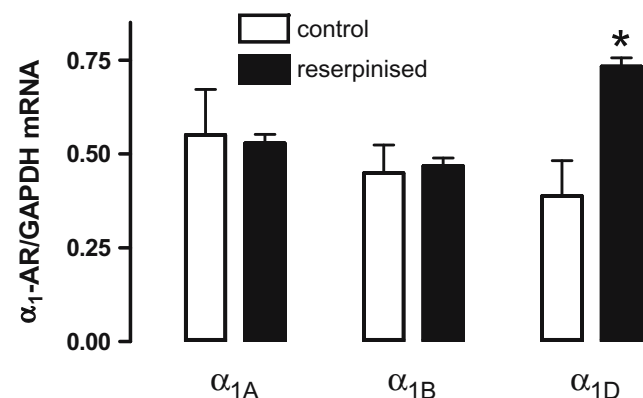


Fig. 4 Expression of mRNA encoding each of the α_1 -adrenoceptors in relation to that for GAPDH in rings from proximal segments of the tail artery of control and reserpinised rats. * *p*<0.05 in relation to the respective mRNA expression found in proximal segments of tail arteries from control rats

The actions of BMY-7378 on the contractions induced by the selective agonists A-61603, oxymetazoline (α_{1A} -selective) and buspirone (α_{1D} -selective) further support the involvement of multiple α_1 -adrenoceptors in the contractions

of the tail artery. BMY-7378 was a competitive antagonist of the contractions induced by these selective agonists in tail arteries from both control and reserpinised rats and was approximately 50-fold more potent against buspirone ($pA_2 \approx 8.3$) than it was against A-61603 and oxymetazoline ($pA_2 \approx 6.6$), supporting the conclusion that the contractions induced by buspirone result from activation of α_{1D} -adrenoceptors, whereas those induced by A-61603 and oxymetazoline result from the predominant activation of α_{1A} -adrenoceptors.

Our semiquantitative RT-PCR shows that the relative expression of mRNA encoding α_{1D} -adrenoceptor in proximal segments of tail arteries from reserpinised rats is at least twice as abundant as in the same segments of arteries from control rats, whereas the expression of species encoding both α_{1A} - and α_{1B} -adrenoceptor is similar. Similar results were found by Taki et al. (2004), who observed a threefold increase in of mRNA. However, these authors did not specify whether the segments of tail artery were taken from proximal or distal parts of the tail; this information is important because mRNA species for α_{1D} -adrenoceptors are differentially distributed along the tail artery (Kamikihara et al. 2005), and the increase induced by reserpinisation is much more pronounced in distal segments than in proximal ones (A. Castilho, unpublished observations).

It is known that there is a positive relationship between the presence of adrenergic nerves and α_{1A} -adrenoceptors in rat arteries, as this subtype predominates in tissues receiving dense adrenergic innervation (Stassen et al. 1998). Furthermore, this same study showed that this relationship is reversible, as chemical sympathectomy with 6-hydroxydopamine changed this relationship by increasing the proportion of one or both the other two subtypes. The pharmacological analysis performed in that study did not allow the authors to conclude whether α_{1B} -, α_{1D} -adrenoceptor, or both, were involved in this regulation. The authors proposed that a high neurogenic input is required to induce and maintain the expression of α_{1A} -adrenoceptors. Interestingly, it was recently suggested that after chemical sympathectomy with 6-hydroxydopamine, the number of α_{1D} -adrenoceptors increases in the junctional region of the postjunctional membrane in the rat vas deferens, or that these receptors spread to other areas of the smooth muscle (Cleary et al. 2004). This was suggested based on the fact that α_{1D} -adrenoceptors are predominantly involved in nerve-evoked contractions of this organ, and their involvement in the contractions to exogenously applied agonists is only detected after chemical sympathectomy. In conjunction, these data point that the expression of specific α_1 -adrenoceptor subtypes in vascular and nonvascular smooth muscles is under the control of the adrenergic innervation.

It is difficult to stress the importance of the combined use of subtype-selective agonists and antagonists for identification of α_1 -adrenoceptors in functional studies. Several tissues coex-

press mRNA species encoding all three α_1 -adrenoceptors, and the use of only one agonist or single concentrations of antagonists favours identification of predominant subtypes and precludes detection of the participation of the other two subtypes. This is particularly the case for the rat tail artery, which expresses mRNA for all three α_1 -adrenoceptors at different proportions along the artery. Therefore, it is not surprising that studies employing single agonists to investigate the α_1 -adrenoceptors in the rat tail artery identify the α_{1A} -adrenoceptors as being responsible for the contraction (Piascik et al. 1995; Taki et al. 2004; Villalobos-Molina and Ibarra 1996), whereas others that combine subtype-selective agonists and antagonists observe that all three α_1 -adrenoceptors may participate in the contractions depending either on the segment of the artery chosen for the study or the age of the rat (Jahnichen et al. 2004; Kamikihara et al. 2005; Lachnit et al. 1997; Pares-Hipolito et al. 2006).

In conclusion, the present study shows that the supersensitivity induced by reserpine is related only to α_{1D} -adrenoceptors, even in tissues in which this subtype is already present and functional, as α_{1A} -selective agonists were equipotent in arteries from control and reserpinised rats. It is also concluded that although the actions of the α_{1D} -selective antagonist BMY-7378 allowed clear identification of responses mediated by multiple α_1 -adrenoceptor subtypes, the increased role of α_{1D} -adrenoceptors in proximal segments of arteries from reserpinised rats was only detected by the actions of subtype-selective and nonselective α_1 -adrenoceptor agonists. Therefore, only the combined use of subtype-selective and nonselective α_1 -adrenoceptor agonists and antagonists will provide more profound conclusions about the roles of individual α_1 -adrenoceptor subtypes in contractions of the rat tail artery.

Acknowledgements This research was supported by FAPESP (02/10315-4 to AS Pupo). V. Lima, J. Akinaga and A. Castilho are MSC students recipients of fellowships from FAPESP. F.D. Nojimoto is an undergraduating student. The authors wish to thank Ms. Ana Maria Seraphim for technical assistance.

References

- Arunlakshana O, Schild HO (1959) Some quantitative uses of drug antagonists. *Br J Pharmacol* 14:48–58
- Bockaert J, Pin JP (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Embo J* 18:1723–1729
- Cleary L, Slattery J, Bexis S, Docherty JR (2004) Sympathectomy reveals alpha 1A- and alpha 1D-adrenoceptor components to contractions to noradrenaline in rat vas deferens. *Br J Pharmacol* 143:745–752
- Eltze M, Konig H, Ullrich B, Grebe T (1999) Buspirone functionally discriminates tissues endowed with alpha-1-adrenoceptor subtypes A, B, D and L. *Eur J Pharmacol* 378:69–83
- Jahnichen S, Eltze M, Pertz HH (2004) Evidence that alpha(1B)-adrenoceptors are involved in noradrenaline-induced contractions of rat tail artery. *Eur J Pharmacol* 488:157–167

- Kamikihara SY, Mueller A, Lima V, Silva AR, da Costa IB, Buratini J Jr, Pupo AS (2005) Differential distribution of functional alpha-1-adrenergic receptor subtypes along the rat tail artery. *J Pharmacol Exp Ther* 314:753–761
- Knepper SM, Buckner SA, Brune ME, DeBernardis JF, Meyer MD, Hancock AA (1995) A-61603, a potent alpha 1-adrenergic receptor agonist, selective for the alpha 1A receptor subtype. *J Pharmacol Exp Ther* 274:97–103
- Koshimizu TA, Tanoue A, Hirasawa A, Yamauchi J, Tsujimoto G (2003) Recent advances in alpha 1-adrenoceptor pharmacology. *Pharmacol Ther* 98:235–244
- Lachnit WG, Tran AM, Clarke DE, Ford AP (1997) Pharmacological characterization of an alpha 1A-adrenoceptor mediating contractile responses to noradrenaline in isolated caudal artery of rat. *Br J Pharmacol* 120:819–826
- Marucci G, Angeli P, Buccioni M, Gulini U, Melchiorre C, Sagratini G, Testa R, Giardina D (2005) (+)-Cyclazosin, a selective alpha-1B-adrenoceptor antagonist: functional evaluation in rat and rabbit tissues. *Eur J Pharmacol* 522:100–107
- Minneman KP, Theroux TL, Hollinger S, Han C, Esbenshade TA (1994) Selectivity of agonists for cloned alpha 1-adrenergic receptor subtypes. *Mol Pharmacol* 46:929–936
- Oshita M, Kigoshi S, Muramatsu I (1993) Pharmacological characterization of two distinct alpha 1-adrenoceptor subtypes in rabbit thoracic aorta. *Br J Pharmacol* 108:1071–1076
- Pares-Hipolito J, Gomez-Zamudio JH, Gallardo-Ortiz IA, Lopez-Guerrero JJ, Santamaria-Ortiz J, Ibarra M, Villalobos-Molina R (2006) Selective agonists reveal alpha(1A)- and alpha(1B)-adrenoceptor subtypes in caudal artery of the young rat. *Auton Autacoid Pharmacol* 26:371–378
- Piasecik MT, Guarino RD, Smith MS, Soltis EE, Saussy DL Jr, Perez DM (1995) The specific contribution of the novel alpha-1D adrenoceptor to the contraction of vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 275:1583–1589
- Queiroz DB, Mendes FR, Porto CS, Avellar MC (2002) Alpha1-adrenoceptor subtypes in rat epididymis and the effects of sexual maturation. *Biol Reprod* 66:508–515
- Stassen FR, Maas RG, Schiffers PM, Janssen GM, De Mey JG (1998) A positive and reversible relationship between adrenergic nerves and alpha-1A adrenoceptors in rat arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 284:399–405
- Taki N, Tanaka T, Zhang L, Suzuki F, Israilova M, Taniguchi T, Hiraizumi-Hiraoka Y, Shinozuka K, Kunitomo M, Muramatsu I (2004) Alpha-1D adrenoceptors are involved in reserpine-induced supersensitivity of rat tail artery. *Br J Pharmacol* 142:647–656
- Villalobos-Molina R, Ibarra M (1996) Alpha 1-adrenoceptors mediating contraction in arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats are of the alpha 1D or alpha 1A subtypes. *Eur J Pharmacol* 298:257–263
- Willems EW, Valdivia LF, Villalon CM, Saxena PR (2003) Possible role of alpha-adrenoceptor subtypes in acute migraine therapy. *Cephalalgia* 23:245–257
- Yamamoto Y, Koike K (2001) Characterization of alpha-1-adrenoceptor-mediated contraction in the mouse thoracic aorta. *Eur J Pharmacol* 424:131–140