

98
2ej



**Universidad Nacional Autónoma
de México**

**FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento de Biología**

**ACCION ALFA₁ ADRENERGICA HEPATICA:
EFECTO DE LA TOXINA PERTUSSIS, BROMURO DE
BROMOFENACILO Y ANTAGONISTAS.**

T E S I S

**Que para obtener el Título de
BIOLOGO**

p r e s e n t a

Jorge Alberto Lúñez Lluhi

México, D. F.

1987



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE:

	Pág.
I. INTRODUCCION -----	2
1.1. Generalidades -----	2
1.2. Epinefrina -----	8
1.3. Mecanismos de acción de las hormonas adrenérgicas. -----	9
1.4. Posible existencia de dos mecanismos de acción alfa ₁ adrenérgica hepática. -----	25
II. OBJETIVOS -----	31
III. MATERIALES Y METODOS -----	32
IV. RESULTADOS Y DISCUSION -----	36
4.1. Efecto de la estimulación de los receptores alfa ₁ adrenérgicos sobre la acumulación de AMPc en animales hipotiroideos. -----	36
4.2. Efecto de la toxina pertussis sobre la respuesta alfa ₁ adrenérgica en ratas hipotiroideas. -----	38
4.3. Efecto del bromuro de bromofenacilo sobre la respuesta alfa ₁ adrenérgica en ratas hipotiroideas. -----	41
4.4. Efecto de antagonistas sobre las respuestas celulares analizadas. -----	44
4.5. Discusión de resultados. -----	49
VI. CONCLUSIONES -----	54
VII. LITERATURA CITADA -----	55

I INTRODUCCION:

1.1. GENERALIDADES:

1.1.1. COMUNICACION INTERCELULAR:

Una de las características más notables de los seres vivos consiste en su capacidad para detectar cambios en las características del medio que los rodea, procesar la información recabada y de reaccionar a estos estímulos mediante una respuesta concreta que les permite sobrevivir .

Todos los organismos, desde los unicelulares hasta los más complejos, son capaces de establecer una comunicación con su entorno. El valor adaptativo de este intercambio de información es evidente ya que mientras más precisa y completa sea la percepción del medio, mayor será la capacidad de respuesta del organismo y por ende sus probabilidades de realizar un ajuste adecuado.

Los cambios en el entorno de un organismo unicelular no sólo pueden ser producto de factores abióticos sino que pueden ser generados por otras células o la célula misma; de manera que, además de haber una comunicación célula - medio, existe también la posibilidad de una comunicación intercelular. Este hecho se confirma de manera evidente en la organización de los animales pluricelulares donde surge además del entorno, un "medio interno" con el cual están en contacto todas las células de un organismo. Así, los cambios en las características de este medio interno pueden funcionar como señales de comunicación entre las células del propio individuo.

En la medida en que se desarrollaron los mecanismos y vías de enlace entre los diferentes elementos de una comunidad celular, fue posible la división del trabajo y el inicio de la diferenciación y especialización celulares. Esto a su vez, trajo consigo la posibilidad de refinar y optimizar los mecanismos de comunicación intercelular. El resultado evolutivo de esta retroalimentación lo constituyen los complejos organismos multicelulares que son capaces de reaccionar como un todo sutilmente coordinado ante los cambios de su entorno y de mantener un alto grado de homeostasis interna.

En los animales superiores, existen dos sistemas de coordinación principales: el nervioso y el humoral (1). Sin embargo, a pesar de sus diferencias aparentes, estos dos sistemas se encuentran íntimamente entrelazados y poseen muchas similitudes tanto en su origen como en su modo de acción molecular por lo que es más apropiado hablar de un sistema neuroendócrino (2).

Las células de los animales superiores han adoptado diversos mecanismos de comunicación intercelular que pueden ser directos o a distancia, de efecto muy local o generalizado y que se caracterizan por una muy alta especificidad.

- COMUNICACION DIRECTA:

La comunicación directa entre células se da a través de la interacción de moléculas expuestas en la superficie celular como en el caso de las uniones comunicantes (3) o en el de ciertas respuestas del sistema inmune.

- COMUNICACION A DISTANCIA:

Las vías de comunicación a distancia no requieren de la interacción física entre las células sino que algunas sustancias químicas difundibles son utilizadas como señal. La célula blanco reconoce el mensaje debido a que posee los sistemas de detección adecuados.

Estos mensajeros químicos pueden agruparse en dos grandes tipos de acuerdo a sus características fisicoquímicas :

- MENSAJEROS HIDROFILICOS: los cuales pueden ser de naturaleza peptídica como la insulina, el glucagon y la vasopresina, o aminas como la epinefrina, la dopamina y la histamina.

- MENSAJEROS HIDROFOBICOS: son de estructura lipídica como las prostaglandinas y los esteroides, o bien moléculas con función amino pero que por su estructura son apolares como las hormonas tiroideas .

El radio de acción de estos mensajeros químicos es muy variable (2). Así, las sustancias liberadas por una, o por un grupo de células pueden actuar sobre ellas mismas (acción autócrina) o sobre un grupo de células cercanas (acción parácrina). El ejemplo más notable de esta comunicación local es la transmisión sináptica de las señales nerviosas. En este caso, los mensajeros químicos sólo tienen que recorrer distancias muy pequeñas para ejercer su acción por lo que la comunicación es sumamente rápida. Otro caso de mensajes que actúan a corta distancia son los autacoides como la histamina y los factores de

crecimiento, los cuales actúan sólo sobre las células cercanas al lugar de liberación.

Sin embargo, la comunicación química puede ser de largo alcance (acción endócrina). Las hormonas liberadas al torrente sanguíneo pueden recorrer grandes distancias antes de interactuar con las células blanco. Por esta razón, deben ser capaces de actuar aún a concentraciones muy bajas en la sangre (1). Este mecanismo es más lento que la comunicación nerviosa pero permite producir efectos globales sobre todo el organismo. Además, la especificidad de los sistemas de detección para estas sustancias permite que muchos mensajes circulen simultáneamente sin que exista confusión.

1.1.2 RECEPTORES:

El hecho de que una célula sea capaz o no de reaccionar a un mensajero químico en particular, depende de la presencia o ausencia en la misma de moléculas capaces de reconocer y unir al mensajero químico con una alta especificidad y afinidad. El resultado de esta interacción es la formación de un complejo hormona - receptor, similar al que forma una enzima con su sustrato.

Ya desde 1905, Langley (4) introdujo el concepto de una "sustancia receptiva" específica. Esta idea le permitió explicar el antagonismo entre la nicotina y el curare en la unión neuromuscular como un desplazamiento mutuo o competencia de estos agentes por un sitio común de interacción.

A pesar de haber sido utilizado desde entonces como fundamento para la explicación de la acción de las hormonas y fármacos, sólo recientemente se ha podido materializar este concepto con el aislamiento y purificación de estas "substancias receptoras" o receptores.

Las substancias capaces de unirse al receptor y de causar un cambio conformacional que conduzca a su activación, se denominan agonistas, mientras que aquellas que se unen al receptor, pero son incapaces de producir el cambio conformacional adecuado se denominan antagonistas. De manera general, la actividad intrínseca de un agente indica la proporción de eventos de unión al receptor que conducen a la activación del mismo; de suerte que existen entre los agonistas y antagonistas totales, compuestos que tienen actividades intrínsecas intermedias y se denominan agonistas o antagonistas parciales (5).

Dependiendo de la naturaleza del mensajero químico, los receptores pueden estar localizados ya sea en la membrana plasmática de la célula, como sucede para los mensajeros hidrofílicos o en el citoplasma en el caso de las hormonas hidrofóbicas; para estas últimas, la membrana plasmática no constituye una barrera de permeabilidad (6). Sin embargo, para que una célula responda a un estímulo, debe de poseer además del receptor, un sistema de acoplamiento que transmita la información desde el receptor activado hasta el sistema efector final. El resultado es la alteración de la velocidad de un proceso celular o vía metabólica preestablecida. La existencia de estos pasos intermedios o sistema de transducción permiten la posibilidad de amplificar y regular la señal (6) (fig. 1.1).

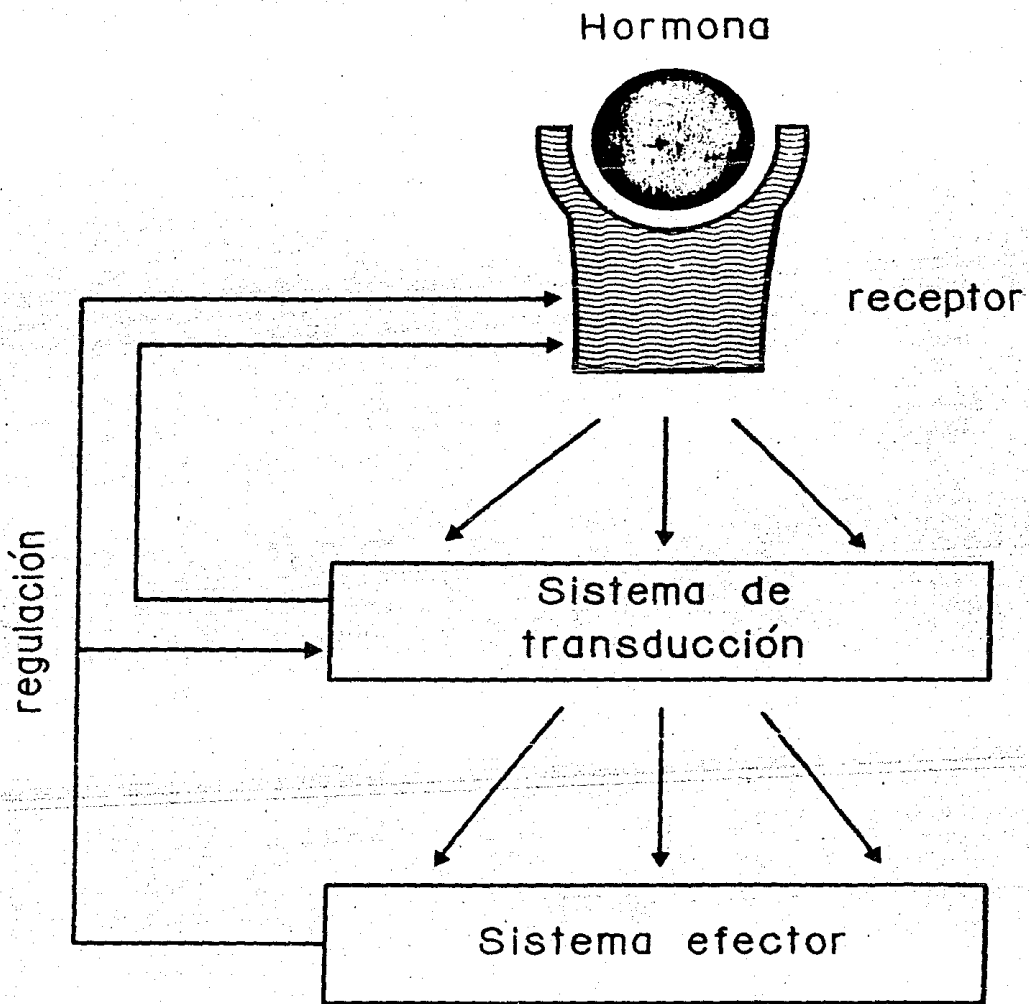


Figura 1.1:

Elementos básicos para la detección de un mensajero químico.

A pesar de la diversidad de mensajeros químicos que se conocen, el número de mecanismos de transducción parece ser pequeño, de manera que varios receptores pueden producir efectos distintos utilizando el mismo sistema de transducción en diferentes células. El tipo de respuesta celular depende entonces de los sistemas enzimáticos presentes en la célula y de su capacidad de ser modulados por el sistema de transducción.

1.2. EPINEFRINA:

1.2.1. EPINEFRINA Y AGENTES ADRENERGICOS:

Uno de los mensajeros químicos más conocidos es la epinefrina o adrenalina. Esta hormona es producida y liberada al torrente sanguíneo bajo influencia nerviosa por las células cromafines de la parte medular de las glándulas suprarrenales. El origen embriológico de estas células es homólogo al de los ganglios laterovertebrales simpáticos del sistema nervioso autónomo (7). De hecho, la norepinefrina, precursor biosintético de la epinefrina, es el neurotransmisor del sistema nervioso simpático.

La epinefrina se considera como la hormona de las grandes emergencias; es liberada en condiciones de tensión o peligro y produce en el organismo reacciones dramáticas que lo preparan para la lucha o la huida.

Entre los efectos que produce esta hormona podemos señalar: dilatación de las pupilas, piloerección, incremento en la rapidez de coagulación, un aumento en el ritmo y fuerza de contracción cardíacos, vasoconstricción cutánea, reducción de la peristalsis

intestinal, relajación de la musculatura lisa de los bronquios, un incremento en la ureogénesis hepática así como un aumento en la movilización de reservas energéticas al incrementarse la glucogenólisis y gluconeogénesis hepáticas y la lipólisis en el tejido adiposo (5).

La epinefrina pertenece a la clase de hormonas hidrosolubles con función amina; fué aislada por primera vez por Takamine y Aldrich en 1901. Su fórmula fué establecida en 1906 por Friedmann y fué sintetizada independientemente por Stolz y Dakin (7). La estructura de esta hormona y su vía de síntesis a partir del aminoácido tirosina se presentan en la figura 1.2.

La epinefrina, la norepinefrina y los análogos sintéticos de estos mensajeros químicos son inactivados principalmente a través de las enzimas monoamino oxidasa y catecol-O-metil transferasa a compuestos que posteriormente son eliminados por vía renal (5).

1.3. MECANISMOS DE ACCION DE LAS HORMONAS ADRENERGICAS:

1.3.1. RECEPTORES ADRENERGICOS:

Como en el caso de las demás hormonas hidrosolubles, la epinefrina es incapaz de penetrar directamente al citoplasma de la célula blanco. Para llevar a cabo sus efectos, interactúa con receptores de naturaleza protéica que se encuentran anclados en la membrana plasmática. Estos receptores han sido el tema de un gran número de estudios farmacológicos y más recientemente moleculares (8-21).

El estudio sistemático de una serie de agentes adrenérgicos en distintos órganos realizado por Ahlquist en 1948 (8), mostró

que el orden de potencias de los agentes dependía del órgano examinado. Esto lo llevó a postular la existencia de dos tipos de receptores adrenérgicos con sensibilidades diferentes a estas sustancias y los denominó alfa y beta. Ahlquist observó que en general, los receptores alfa estaban asociados a eventos estimulatorios mientras que los beta a los inhibitorios. Posteriormente Lands et al., en 1967 (9) propusieron la subdivisión de los receptores beta en dos sub-tipos: beta₁ y beta₂ en función de su sensibilidad a la epinefrina y la norepinefrina y su distribución tisular. Mientras que los receptores beta₁ son igualmente sensibles a epinefrina y norepinefrina, los receptores beta₂ son más sensibles a epinefrina que a norepinefrina. A diferencia de los receptores beta₁ que predominan en el tejido cardíaco, los beta₂ se localizan principalmente en las fibras musculares lisas y en las células glandulares. Los receptores beta, tanto beta₁ como beta₂ han sido purificados a partir de diferentes fuentes (10) y se cuentan entre los receptores mejor conocidos. Recientemente se ha deducido la estructura primaria del receptor beta₂ adrenérgico de mamíferos a partir de la secuencia de DNA que lo codifica y se ha encontrado una gran homología con la proteína rodopsina, pieza clave en el sistema de transducción visual (11). Aunque farmacológicamente distintos, los receptores beta₁ y beta₂ parecen ser estructuralmente muy similares como lo indica un estudio reciente (12). Ambos receptores están acoplados de manera estimulatoria a la enzima adenilato ciclasa por lo que se consideran isorreceptores.

De manera similar, los receptores alfa fueron subdivididos por Langer (13) con base en su localización en las sinapsis. Mientras que los receptores alfa₁ se localizan en las células blanco, sitios post-sinápticos, los receptores alfa₂ se localizan en las terminales nerviosas o sitios pre-sinápticos donde desempeñan un papel autorregulador al inhibir la liberación del neurotransmisor. Esta clasificación anatómica ha sido complementada con criterios farmacológicos basados en el uso de antagonistas selectivos, prazosina para los receptores alfa₁ y yohimbina para los receptores alfa₂. La tabla I muestra el orden de potencia de algunos agonistas y antagonistas para cada tipo de receptor adrenérgico.

En 1971 Robinson *et al.* (14), propusieron que los receptores alfa estaban acoplados de manera inhibitoria a la adenilato ciclasa mientras que Jones y Michell en 1978 (15) asociaron la activación de estos receptores a una estimulación del recambio de fosfoinosítidos y a un incremento en la concentración de calcio citoplásmico. Fue sin embargo en 1980 cuando Fain y García-Sáinz (16) demostraron que los receptores alfa₁ y alfa₂ no sólo difieren en su farmacología sino también en su modo de acción. Estos autores asocian los receptores alfa₂ a una inhibición de la adenilato ciclasa y los alfa₁ a una estimulación en el recambio de fosfoinosítidos así como a un aumento en los niveles de calcio citoplásmico.

Los receptores alfa₁ y alfa₂ han sido purificados (17,18) y no parecen estar relacionados estructuralmente ya que existen diferencias importantes en los mapas peptídicos de ambos receptores.

TABLA I:

Orden de potencias de agonistas y antagonistas para los receptores adrenérgicos.

RECEPTOR	AGONISTAS	ANTAGONISTAS
BETA ₁	ISO >> EPI = NOREPI	METOPROLOL > ISOPROTERENOL
BETA ₂	ISO = EPI >> NOREPI	ISOPROTERENOL = METOPROLOL
ALFA ₁	EPI = NOREPI >> ISO	PRAZOSINA >> YOHIMBINA
ALFA ₂	EPI = NOREPI >> ISO	YOHIMBINA >> PRAZOSINA

ISO: Isoproterenol, EPI: epinefrina, NOREPI: norepinefrina.

Uno de los mecanismos mediante los cuales la célula puede regular su sensibilidad es alterando tanto el número como la afinidad de los receptores que expone al medio extracelular. Un mecanismo de regulación que parece ser común consiste en modificar a los receptores a través de fosforilaciones. En este sentido, se ha descrito una proteína capaz de fosforilar al receptor beta adrenérgico (19), y estudios recientes señalan que la fosforilación del receptor alfa₁ adrenérgico parece estar involucrada en su inactivación e internalización (20,21).

La presencia en una célula de un tipo de receptor adrenérgico no excluye la posibilidad de que posea receptores de otro tipo, de manera que la respuesta global de la célula depende del tipo y densidad de receptores adrenérgicos que posea.

1.3.2. SISTEMAS DE TRANSDUCCION DE LOS RECEPTORES ADRENERGICOS:

Una vez que un agonista o mensajero primario ha interactuado con sus receptores membranales, estos son los responsables de transmitir la señal al interior de la célula y de estimular la acumulación de mensajeros químicos intracelulares o segundos mensajeros, los cuales transmiten la señal hasta el sistema efector.

Para los receptores adrenérgicos, se han descrito dos vías principales de transducción: La primera a través de la regulación de la enzima adenilato ciclasa, que cataliza la transformación del trifosfato de adenosina (ATP) en el segundo mensajero 3'5' adenilato cíclico (AMPC). La segunda involucra una estimulación en el recambio de fosfoinosítidos y alteraciones en los niveles de calcio intracelular y que denominaremos sistema IP_3, Ca^{++}, DG .

1.3.3. SISTEMA DE LA ADENILATO CICLASA:

Este fue el primer mecanismo de transducción en ser descrito, y en la actualidad se ha alcanzado un conocimiento muy detallado de sus componentes y su posible mecanismo de acción.

Fueron Sutherland y Rall en 1958 quienes propusieron al AMPc como la molécula mediadora de la activación de la fosforilasa del glucógeno por epinefrina en el hígado (22). Posteriormente, el mismo grupo observó que este efecto era mediado a través de los receptores beta los cuales estimulan a la adenilato ciclase localizada en la membrana plasmática. Como se mencionó, Fain y García-Sáinz asociaron la activación de los receptores alfa₂ a una inhibición de esta enzima (16).

El grupo de Rodbell, en 1980 (23) demostró que la interacción de los receptores tanto estimulatorios como inhibitorios con la adenilato ciclase no era directa sino que se llevaba a cabo a través de proteínas capaces de unir nucleótidos de guanina.

De esta manera, el sistema de la adenilato ciclase consta de cinco elementos: 1) receptores estimuladores (Rs), 2) receptores inhibitorios (Ri), 3) proteína acopladora estimuladora (Ns), 4) proteína acopladora inhibitoria (Ni) y 5) el componente catalítico (ver fig. 1.3.).

Tanto Ns como Ni están constituidas por tres subunidades, alfa, beta y gama. Mientras que las subunidades beta y gama (PM 35 y 5 a 8 Kd respectivamente) (24,25) parecen ser comunes para estas dos proteínas (26), las subunidades alfa difieren en su peso molecular (42 a 45 Kd para la subunidad alfa_S y 39 a 41 para

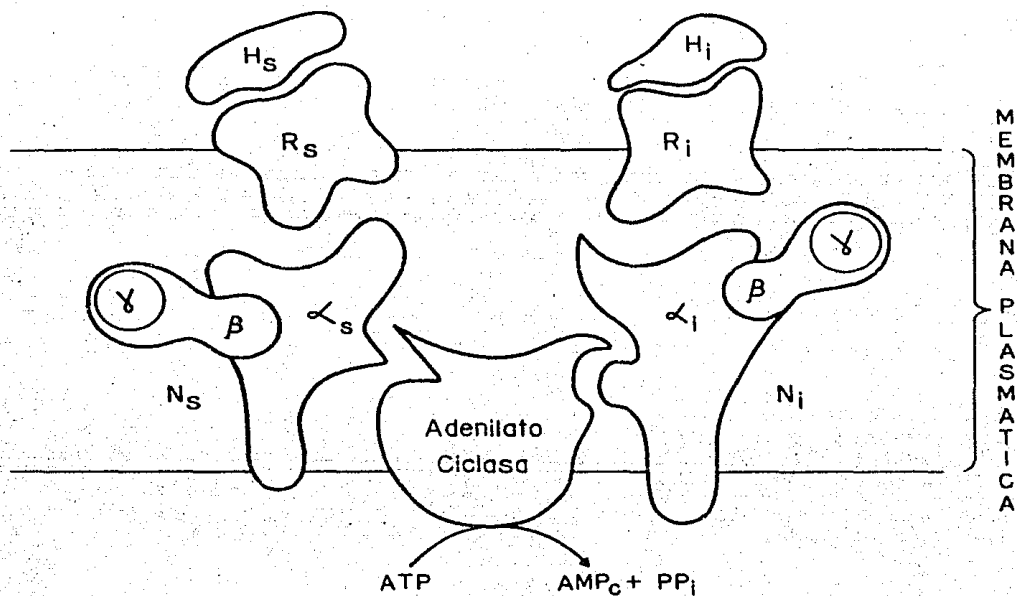


Figura 1.3.:

Sistema de transducción de la adenilato ciclasa: Hs, hormona estimuladora; Hi, hormona inhibitoria; Rs, receptor estimulador; Ri, receptor inhibitorio; Ns proteína acopladora activadora; Ni, proteína acopladora inhibitoria.

alfa₁). El sitio de unión para nucleótidos de guanina reside en las subunidades alfa de estos componentes y son las que parecen participar en la interacción con el componente catalítico.

El modelo actual de la acción de Ns es el siguiente:

-La proteína Ns con difosfato de guanina (GDP) unido, (Ns-GDP) forma un complejo con el Rs haciendo que aumente la afinidad del receptor por su agonista. La formación del complejo hormona-Rs-Ns-GDP estimula el recambio de GDP por trifosfato de guanina (GTP) en Ns. Esto trae como consecuencia su activación que consiste en un cambio conformacional y en la disociación del complejo beta-gama de la subunidad alfa_g-GTP. Es precisamente alfa_g-GTP la forma que es capaz de activar al componente catalítico. La hidrólisis del GTP a GDP debido a la actividad de GTPasa de alfa_g constituye el paso de inactivación después del cual el complejo beta-gama se reasocia con alfa_g-GDP para regenerar a Ns-GDP (27), (ver fig. 1.4.).

El mecanismo de acción de Ni parece ser muy similar, aunque inicialmente se propuso que Ni ejercía su efecto inhibitorio aumentando la concentración del complejo beta-gama libre, desplazando así el equilibrio de disociación de Ns hacia la forma no disociada e inactiva (28). Sin embargo, recientemente se ha puesto en evidencia que alfa₁-GTP es capaz de inhibir directamente la actividad del componente catalítico (29).

Debido a que la activación e inhibición de la adenilato ciclasa no son competitivas, se piensa que el componente catalítico posee dos sitios de interacción independientes para cada proteína N (29) (ver fig. 1.4.).

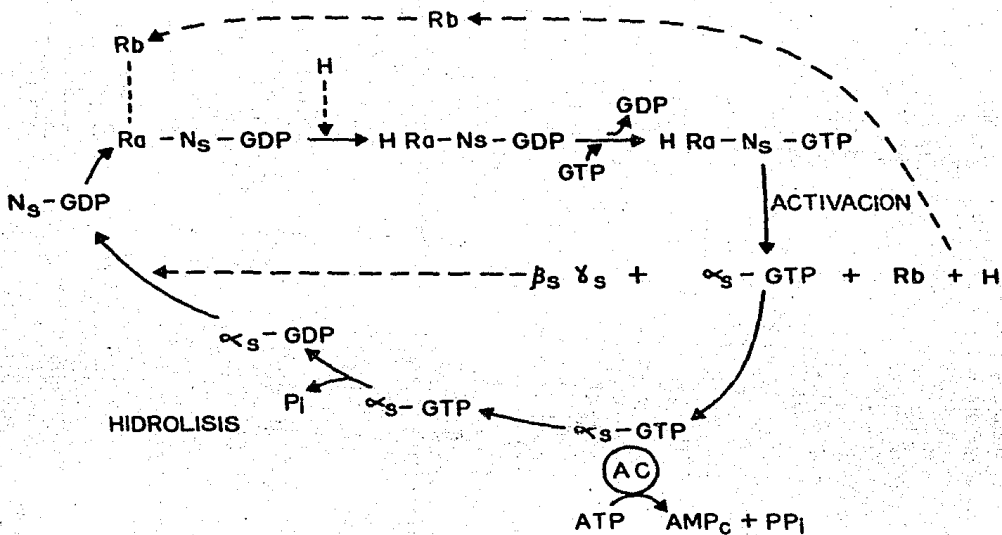


Figura 1.4.:

Ciclo catalítico de N_s : R_b , forma de baja afinidad del receptor; R_a , forma de alta afinidad del receptor; N_s , proteína acopladora activatoria; H , hormona; GTP , trifosfato de guanina; GDP , difosfato de guanina; AC , componente catalítico de la adenilato ciclasa.

De esta manera, la actividad de la adenilato ciclasa es el resultado del balance entre las influencias excitatorias e inhibitorias. El AMPc producido por este sistema es continuamente degradado a AMP por una fosfodiesterasa (30).

Dos toxinas bacterianas han desempeñado un papel muy importante En el estudio del sistema de la adenilato ciclasa: La toxina del cólera y la toxina pertussis, producidas respectivamente por los bacilos gram-negativos Vibrio cholerae y Bordetella pertussis. Ambas toxinas, después de penetrar al interior de la célula, son capaces de modificar covalentemente a las proteínas N. Esta modificación consiste en la transferencia de un grupo ADP-ribosa del NAD⁺ a las proteínas acopladoras, siendo N_s el sustrato para la toxina del cólera y N_i el de la toxina pertussis (31).

La ADP-ribosilación de N_s trae como consecuencia la inhibición de su actividad de GTPasa, de tal manera que queda permanentemente activada y por ende también el componente catalítico de la adenilato ciclasa (32).

A pesar de que la modificación de N_i por la toxina pertussis produce también una inhibición en su capacidad para hidrolizar GTP, la forma resultante es incapaz de inhibir a la adenilato ciclasa y produce una disminución en la afinidad de los receptores inhibitorios por sus agonistas (33,34). El resultado es la supresión de las influencias inhibitorias sobre la adenilato ciclasa. Estas dos toxinas tienen por lo tanto efectos sinérgicos sobre la producción de AMPc.

1.3.4. SISTEMA IP₃, Ca⁺⁺, DG:

Muchas hormonas, entre ellas la epinefrina a través de sus receptores alfa₁, la vasopresina y la angiotensina II producen sus efectos en la célula blanco aumentando la concentración de calcio citoplásmico. Sin embargo hasta hace algunos años se desconocía cual era el mecanismo que acoplaba los receptores a este aumento de los niveles de calcio.

A pesar de que Hokin y Hokin (35), habían descrito que ciertas hormonas eran capaces de estimular la incorporación de ³²P a un grupo de lípidos menores, los fosfoinosítidos, fue Michell en 1975 quien propuso que la degradación y resíntesis de fosfoinosítidos era un evento inicial común para la movilización de calcio mediada por hormonas (36). Además el hecho de que el recambio de fosfoinosítidos es independiente del calcio extracelular (37) apoyaba esta idea. Actualmente se sabe que en la parte interna de la membrana plasmática, las tres formas de estos lípidos, el fosfatidilinositol (PI), fosfatidilinositol 4 fosfato (PIP) y el fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂) son rápidamente interconvertibles mediante la acción de cinasas y fosfatasas. La forma que es principalmente atacada bajo estimulación hormonal es el PIP₂. El PIP y PI funcionan como reserva para la resíntesis de PIP₂ (38), (ver fig. 1.5.).

La enzima que cataliza la degradación del PIP₂ es una fosfomonodiesterasa o fosfolipasa C membranar aunque inicialmente fue descrita una forma citoplásmica. Los productos resultantes de su acción son el inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) y el diacilglicerol (DG).

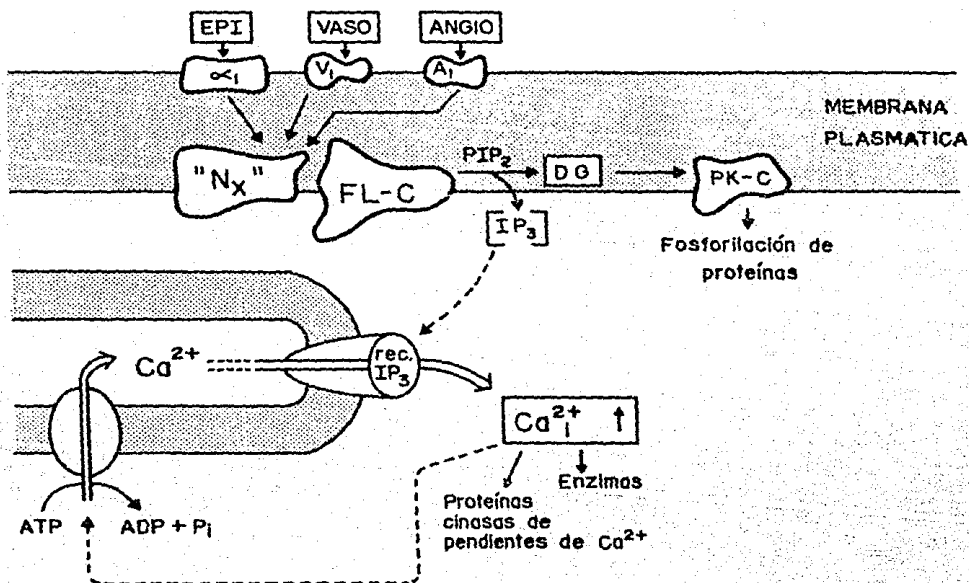


Figura 1.5.:

Sistema de transducción IP₃, Ca⁺⁺, DG: α_1 , receptor alfa 1 adrenérgico; V_1 , receptor para vasopresina; A_1 , receptor para angiotensina; Nx, proteína acopladora; FL-C, fosfolipasa C; PIP₂, fosfatidilinositol 4,5, bifosfato; DG, diacilglicerol; PK-C, proteína-cinasa C; IP₃, inositol 1,4,5 trisfosfato.

La capacidad del GTP y de análogos no hidrolizables, para activar a la fosfolipasa C (39,40,41) ha sugerido la posibilidad de la existencia de una proteína acopladora N_x similar a N_s o N_i del sistema de la adenilato ciclasa, capaz de mediar la interacción del receptor y esta enzima. De manera similar, el flúor, el cual al formar un complejo con el aluminio (AlF)⁴⁻ es capaz de estimular a N_s y por ende a la adenilato ciclasa, es también capaz de estimular la hidrólisis de fosfoinosítidos (42,43). Además, la hidrólisis de fosfoinosítidos puede ser bloqueada en algunas células por la toxina pertussis (44,45) aunque en otras no. Esto sugiere que en ciertos sistemas la proteína acopladora pudiese ser N_i o una forma muy similar, (ver fig. 1.5.).

Berridge (46) propuso que el IP_3 era el segundo mensajero encargado de producir el aumento de calcio intracelular. Esta idea fue apoyada por la existencia de una buena correlación temporal entre la producción de IP_3 y el aumento de calcio citoplásmico (47). La fuente de calcio parece ser inicialmente intracelular ya que la adición de IP_3 a células permeabilizadas provoca una liberación rápida de calcio (48). El depósito intracelular sensible a IP_3 parece ser el retículo endoplásmico y no la mitocondria (49). De hecho, se ha descrito un receptor específico para IP_3 en la fracción microsomal (50). Las características del mecanismo de liberación de calcio sugieren que este proceso se lleva a cabo mediante la apertura de canales bajo la influencia de IP_3 (51), (ver fig. 1.5.).

El aumento de calcio citoplásmico producido por activación hormonal es transitorio y regresa después de algunos minutos a un

valor un poco superior al basal (52). Sin embargo, la cinética de la concentración de calcio citoplásmica parece ser más compleja ya que recientemente se ha observado en células individuales que la estimulación hormonal produce una serie de aumentos transitorios en los niveles de calcio y que la frecuencia de estos es dependiente de la concentración del agonista (53).

El otro producto de la hidrólisis de PIP_2 es el diacilglicerol. Esta molécula, por sus características hidrofóbicas permanece en la membrana plasmática. La composición en ácidos grasos, ácido esteárico en la posición 1 y ácido araquidónico en la posición 2 es característica de esta molécula y de los fosfoinosítidos de donde proviene. El DG puede ser fosforilado a ácido fosfatídico, para después generar PI o ser degradado en sus componentes por una diacilglicerol lipasa, por lo que puede constituir una fuente de ácido araquidónico.

El descubrimiento en 1980 por el grupo de Nishizuka (54) de una proteín-cinasa C dependiente de calcio y fosfolípidos que era estimulable por DG permitió asignar un valor como segundo mensajero al DG generado por estimulación hormonal, (ver fig. 1.5.). Las funciones de esta enzima han podido ser estudiadas con la ayuda de los ésteres de forbol. Estos compuestos diterpénicos, entre los cuales el 12 tetradecanoilforbol-13 acetato (TPA) es el más activo, son potentes promotores de tumores, y por su estructura similar al DG son capaces de activar directamente a la proteín-cinasa C.

El TPA es capaz de estimular la fosforilación de un número importante de proteínas entre las cuales se encuentra la proteína ribosomal S₄ (55) y la glucógeno sintetasa (56). En algunos sistemas, se ha demostrado que existe un sinérgismo entre el IP₃ y DG de manera que ambos son necesarios para producir un efecto máximo. En plaquetas, el tratamiento simultáneo con un ionóforo de calcio como el A23187 y el TPA reproduce los efectos de la estimulación hormonal (57), sin embargo en las células del hígado, la estimulación de la proteína-quinasa C por TPA no sólo no reproduce los efectos alfa₁ adrenérgicos sino que es capaz de inhibirlos (58,59). De manera general se piensa que esta enzima participa en los fenómenos de desensibilización ya que es capaz de fosforilar al receptor para insulina (60), factor de crecimiento epidérmico (61) así como a los receptores alfa₁ y beta adrenérgicos (20,21).

Aunque este sistema difiere del de la adenilato ciclasa por producir simultáneamente dos segundos mensajeros, estos mecanismos de transducción son similares ya que ambos utilizan como precursores compuestos fosforilados y parecen estar regulados de manera similar por proteínas N capaces de unir nucleótidos de guanina.

1.3.5. REGULACION ADRENERGICA DEL METABOLISMO HEPATICO:

Las células hepáticas poseen tres tipos de receptores adrenérgicos, los beta₂, alfa₁ y alfa₂ (62), acoplados a los mecanismos de transducción señalados. En el hígado, la estimulación a través de los receptores beta₂ y alfa₁ a pesar de utilizar mecanismos de señalización independientes confluyen para

producir las mismas respuestas fisiológicas: estimulación de la glucogenólisis, la gluconeogénesis y la ureogénesis. Sin embargo el grado de participación de cada vía puede variar dependiendo de diversas condiciones. Así la respuesta adrenérgica hepática de la rata cambia a través del desarrollo de ser predominantemente beta durante las etapas fetales y juveniles, a ser alfa₁ en el estado adulto (63,64). Se observa un efecto similar durante el proceso de regeneración hepática (65). En el estado hipotiroideo, la respuesta adrenérgica se ve alterada ya que aumenta el componente beta debido principalmente a un número mayor de receptores de este tipo (66).

Estos cambios ponen en evidencia una regulación dinámica tanto a corto plazo como durante el desarrollo de los receptores adrenérgicos en este tejido.

1.4. POSIBLE EXISTENCIA DE DOS MECANISMOS DE ACCION ALFA₁ ADRENERGICA HEPATICA:

Como se mencionó anteriormente, los receptores alfa₁ adrenérgicos se encuentran acoplados al sistema de transducción que incluye un aumento en el recambio de fosfoinosítidos, un incremento en la concentración de calcio citoplásmico y la activación de la proteína-cinasa C. Este mecanismo lo comparten también otras hormonas como la vasopresina y la angiotensina II. Sin embargo, un número creciente de evidencias señalan que puede existir en el hígado un segundo mecanismo exclusivo para los receptores alfa₁ adrenérgicos. Las evidencias son las siguientes:

Las respuestas alfa₁ adrenérgicas se observan en ausencia de calcio extracelular o en hepatocitos depletados de calcio, mientras que este tratamiento abate los efectos producidos por los péptidos presores vasopresina o angiotensina II (67,68).

El hipotiroidismo reduce significativamente los efectos producidos por vasopresina, angiotensina II o el ionóforo A23187, mientras que los efectos alfa₁ persisten (69,70).

La adrenalectomía sensibiliza las respuestas alfa₁ adrenérgicas a la ausencia de calcio extracelular, volviéndolas semejantes a las producidas por los péptidos presores (71).

La insulina es capaz de inhibir la glucogenólisis producida por epinefrina, pero no la provocada por vasopresina o angiotensina II. Este efecto de la insulina es más marcado en células incubadas en ausencia de calcio o provenientes de animales hipotiroideos, que en células control y es inexistente en células de animales adrenalectomizados (72,68).

En forma similar, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) es capaz de inhibir la ureogénesis producida por epinefrina a través de los receptores alfa₁ sólo en células de animales hipotiroideos (73).

Los efectos alfa₁ adrenérgicos producidos por la cicloheximida y el 2-(2-metil-indazol-4-imino)-imidazolina (SGD 101/75) son sensibles a la concentración de calcio extracelular pero no a la inhibición por insulina. Los efectos de estos agentes se observan en células de animales adrenalectomizados pero no si provienen de animales hipotiroideos (74,75).

La epinefrina, a través de los receptores α_1 , es capaz de estimular la gluconeogénesis a partir de dihidroxiacetona mientras que la vasopresina y la angiotensina II no. Esta estimulación es independiente del calcio extracelular y se observa en hepatocitos de animales hipotiroideos pero no de adrenalectomizados (76).

Esta serie de evidencias apoyan la idea propuesta por el grupo de García-Sáinz que existen dos mecanismos de acción α_1 adrenérgica en el hígado. De acuerdo con estas ideas, una de las vías es: (ver fig. 1.6.)

- Compartida con los péptidos presores.
- Dependiente de la concentración de calcio extracelular.
- Modulada por hormonas tiroideas.
- Insensible a insulina o EGF.
- Estimulable por SGD 101/75 o cicloheximida.

En cambio, la segunda:

- No es compartida con los péptidos presores.
- Es independiente de la concentración extracelular de calcio.
- Es modulada por glucocorticoides.
- Es sensible a inhibición por insulina o EGF.
- No es estimulable por SGD 101/75 ni por cicloheximida.

Mientras que la primera vía parece corresponder al mecanismo de transducción IP_3 , Ca^{++} , DG, los mediadores de la segunda vía permanecen aún sin aclarar.

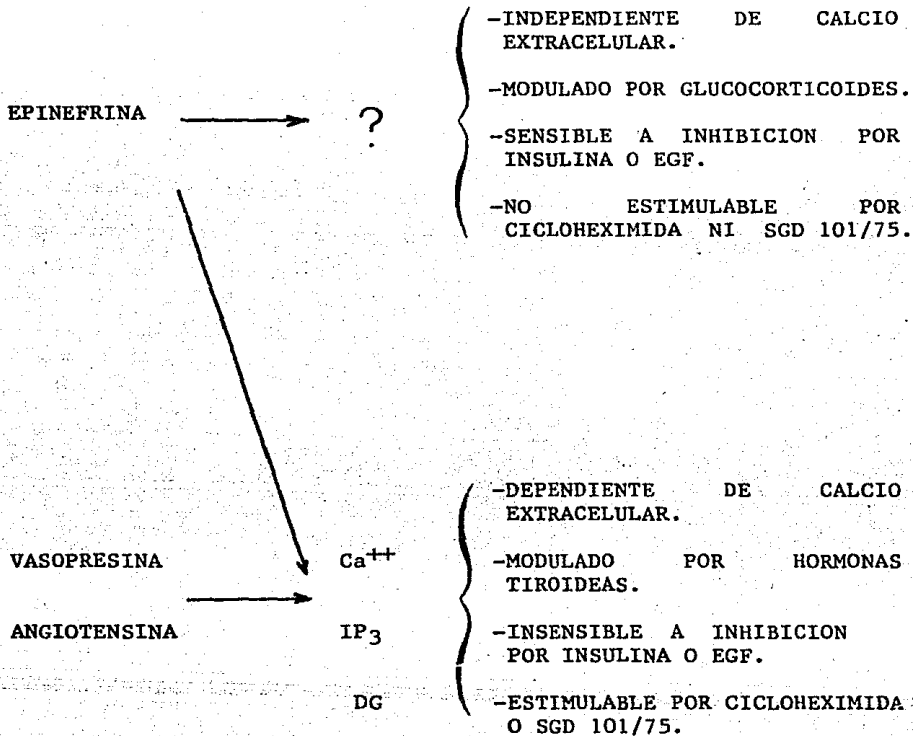


Figura 1.6.:

Esquema de los dos posibles mecanismos de acción α_1 adrenérgica hepática: IP₃, inositol 1,4,5 trisfosfato; DG, diacilglicerol; EGF, factor de crecimiento epidérmico; SGD 101/75, 2-(2-metil-indazol-4-imino)-imidazolina.

Para explicar la independencia de calcio de los efectos alfa₁ adrenérgicos en ciertas condiciones como en ausencia de calcio extracelular o edad avanzada; El grupo de Exton ha propuesto que en estos casos, los receptores alfa₁ adrenérgicos producen sus efectos a través de un aumento pequeño de AMPc (77,78).

De manera similar, Minneman et al., han sugerido que en tejido cerebral, la estimulación de los receptores alfa₁ conduce a un modesto incremento en los niveles de AMPc además de producir una estimulación del metabolismo de fosfoinosítidos (79,80).

Por otro lado, varios autores (81,82) han mostrado que los receptores alfa₁ no sólo estimulan la degradación de fosfoinosítidos, sino que también producen una liberación de ácido araquidónico, el cual puede ser metabolizado por la vía de la ciclooxigenasa a compuestos bioactivos como las prostaglandinas. En estos sistemas, los receptores alfa₁ parecen estimular tanto a una fosfolipasa A₂ como a una fosfolipasa C.

Estos eventos parecen ser paralelos y no secuenciales, como lo sugiere un estudio cinético de estos fenómenos en una línea celular de riñón, realizado recientemente por Slivka e Insel (82). Además Burch et al. (83) han sugerido que en una línea celular de tiroides estas enzimas están acopladas al receptor por proteínas N distintas, ya que la liberación de ácido araquidónico es sensible a la toxina pertussis mientras que la hidrólisis de fosfoinosítidos no.

Parece ser evidente que los receptores alfa₁ adrenérgicos, tanto en hígado como en otros sistemas pueden estar acoplados a más de un sistema de transducción. De manera alternativa, es

posible que existan sub-poblaciones de receptores alfa₁ acoplados de manera independiente a cada sistema. En este sentido, se ha propuesto una heterogeneidad en los receptores alfa₁ en tejido cerebral (84) y en músculo vascular liso (85) con base en experimentos de unión de ligandos.

Aunque, como se señaló, el ácido araquidónico puede mediar algunas respuestas alfa₁ adrenérgicas, su posible papel como mediador de la vía alterenativa propuesta para el hígado por el grupo de García-Sáinz no ha sido evaluado.

A pesar que la evidencia a favor de la existencia de por lo menos dos mecanismos de acción alfa₁ adrenérgica es muy amplia, el o los mecanismos de transducción diferentes a la vía IP₃, Ca⁺⁺, DG, permanecen sin aclarar.

II OBJETIVOS:

El objetivo general del presente trabajo consiste en profundizar en el estudio de los posibles mecanismos de transducción alfa₁ adrenérgicos alternativos al sistema IP₃, Ca⁺⁺, DG en el tejido hepático de ratas hipotiroideas analizando el efecto de la toxina pertussis así como evaluando el posible papel de la fosfolipasa A₂ y del AMPc como mediadores de las respuestas alfa₁ adrenérgicas. Con base en esto, se plantea los siguientes objetivos específicos:

- Determinar si la activación de los receptores alfa₁ adrenérgicos provocan o no un aumento de AMPc intracelular.
- Analizar el efecto de la toxina pertussis sobre las respuestas alfa₁ adrenérgicas en estas células.
- Determinar si la ureogénesis alfa₁ adrenérgica es capaz de ser bloqueada por un inhibidor de la fosfolipasa A₂.
- Analizar el efecto de antagonistas sobre estas respuestas.

III MATERIALES Y METODOS:

3.1. AGENTES, REACTIVOS Y COMPUESTOS RADIOACTIVOS:

Las sustancias utilizadas fueron: (l)-epinefrina, (dl)-propranolol, 1-metil-3-isobutilxantina, yohimbina, glutamina, ornitina, ureasa, 6-n-propil-2-tiouracilo, bromuro de bromofenacilo de Sigma Chem.Co., prazosina de Pfizer y colagenasa de Worthington. El resto de los reactivos fueron de la más alta calidad posible. el [³H] AMPc fue obtenido de New England Nuclear y el [³²P] Pi de ICN Radiochemicals.

La toxina pertussis fue purificada según el método de Sekura et al., (86) a partir de un concentrado de vacuna pertussis.

3.2. ANIMALES:

Se utilizaron ratas hembra de la cepa Wistar, de 200 a 250 gramos de peso, alimentadas "ad libitum". Los experimentos fueron llevados a cabo en animales hipotiroideos ya que en esta condición predomina la vía alternativa al sistema IP₃, Ca⁺⁺, DG.

El hipotiroidismo se indujo administrando 6-n-propil-2-tiouracilo (0.03%) en el agua de beber durante 30 a 40 días antes del experimento. Este tratamiento produce una disminución muy marcada en los niveles de hormonas tiroideas (65) y alteraciones asociadas al estado hipotiroideo como hipertrofia y coloración rojiza de la tiroides, resequedad del pelaje y disminución en la ganancia de peso además de alteraciones funcionales del tejido hepático y adiposo.

En los experimentos en los que se utilizaron ratas tratadas con toxina pertussis, el tratamiento consistió en inyectar intraperitonealmente 50 µg de toxina por animal en un plazo de 3 a 5 días previo a la realización del experimento.

3.3. AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS:

Las células del parénquima hepático se aislaron de acuerdo con la técnica de Berry y Friend (87) modificada por Tolbert et al. (88). Brevemente: después de producir anestesia, se procedió a canular la vena porta hepática y a perfundir el hígado con amortiguador Krebs-Ringer bicarbonato (AKRB) a 37⁰ C, carente de calcio y equilibrado a pH 7.4 por burbujeo con carbógeno (95%O₂ / 5%CO₂). Una vez aislado y lavado, el hígado fue digerido, perfundiendo con AKRB adicionado de calcio (1.2 mM) y colagenasa. Las células se dispersaron en una caja de Petri y la suspensión resultante se filtró a través de una malla de nylon. Las células fueron lavadas tres veces, descartando el sobrenadante y resuspendiendo el paquete en AKRB adicionado de calcio. La densidad final de la suspensión fluctuó entre 20 y 30 mg peso húmedo/ml. La viabilidad de las células se evaluó por la prueba de exclusión del azul tripán examinando al microscopio óptico.

3.4. RESPUESTAS CELULARES:

Los parámetros evaluados como respuestas celulares fueron: Ureogénesis, acumulación de AMPc y marcaje de fosfoinosítidos. En todas las incubaciones se utilizó 1 ml de suspensión de células y se incluyó, salvo donde se indique, propranolol 10 μM para bloquear el efecto mediado a través de los receptores beta adrenérgicos.

Para la medición de ureogénesis, los hepatocitos fueron incubados durante 60 minutos bajo atmósfera de carbógeno en presencia de los distintos agentes. El medio de incubación fue complementado con glutamina 10 mM y ornitina 2 mM. La urea producida fue cuantificada por el método de Gutman y Bergmeyer (89). Los resultados se expresan como porciento de estimulación sobre el valor basal.

La acumulación de AMPc se evaluó incubando a las células durante 2 minutos en presencia de 100 μM 1-metil-3-isobutilxantina para bloquear la actividad de la fosfodiesterasa del AMPc (5) y de los distintos agentes. La cantidad de AMPc en el sobrenadante fue cuantificada por el método de Gilman (90). Los datos se expresan como pmolas AMPc/mg peso húmedo.

Con el fin de evaluar el marcaje de fosfoinosítidos se incubaron a las células durante 60 minutos en presencia de 10 $\mu\text{Ci/ml}$ [^{32}P] Pi y de los distintos agentes bajo una atmósfera de carbógeno. La extracción de los lípidos celulares se realizó con cloroformo/metanol (2:1) V/V y los fosfolípidos se separaron por cromatografía en capa fina unidimensional. La radioactividad incorporada se determinó por centelleo líquido (91). Los datos

obtenidos se expresan como porcentaje de la incorporación basal.

3.5. ANALISIS ESTADISTICO:

La prueba estadística utilizada para la comparación de promedios fue la t de Student.

IV RESULTADOS Y DISCUSION:

4.1. EFECTO DE LA ESTIMULACION DE LOS RECEPTORES ALFA₁ ADRENERGICOS SOBRE LA ACUMULACION DE AMPc EN ANIMALES HIPOTIROIDEOS.

Como ya se indicó, varios autores han propuesto que los receptores alfa₁ adrenérgicos pueden producir un incremento en los niveles intracelulares de AMPc (77,79). De esta manera, este nucleótido cíclico podría constituir el segundo mensajero del mecanismo alternativo a la vía (IP₃,Ca⁺⁺,DG) propuesto por el grupo de García-Sáinz. Con base en estos antecedentes, se procedió a analizar el efecto alfa₁ adrenérgico sobre los niveles de AMPc en células de ratas hipotiroideas.

Como se muestra en la figura 1, la epinefrina en presencia de propranolol 10 µM, es capaz de producir un incremento en los niveles de AMPc intracelulares. A pesar de que el propranolol es un antagonista selectivo para los receptores beta, debido a la naturaleza competitiva de este bloqueo, es posible que a la concentración de epinefrina 10⁻⁴M, parte del efecto observado se deba a una interacción con los receptores beta. A esta concentración de propranolol, los efectos observados con concentraciones más bajas de epinefrina difícilmente se pueden deber a una acción beta adrenérgica.

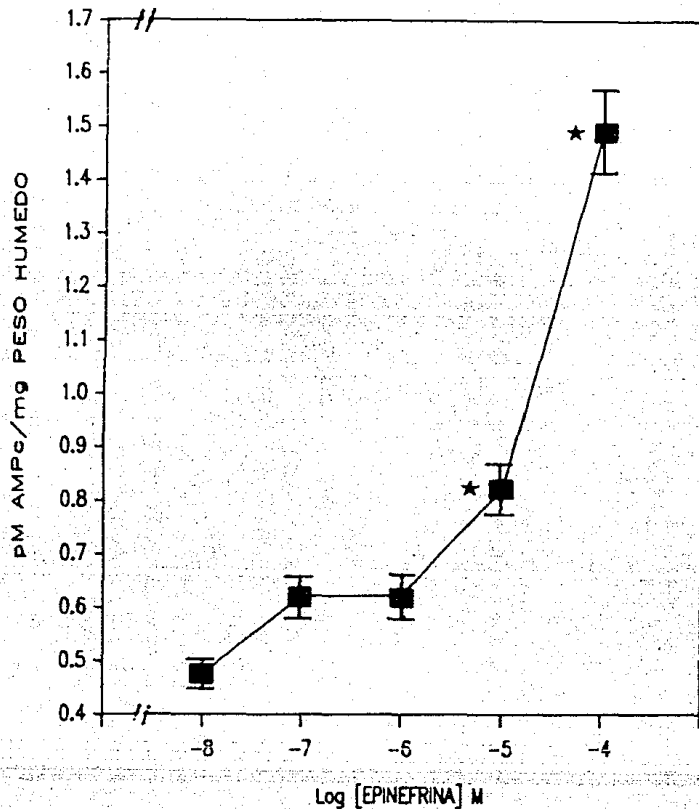


Fig. 1: CURVA DOSIS-RESPUESTA PARA LA ACUMULACION DE AMPc PRODUCIDA POR EPINEFRINA EN PRESENCIA DE PROPRANOLOL EN CELULAS DE ANIMALES HIPOTIROIDEOS.

Los hepatocitos de ratas hipotiroideas, fueron incubados en presencia de propranolol 10 μ M y de diferentes concentraciones de epinefrina. Los datos representan el promedio (+/-) error estandar de determinaciones por duplicado de 11 preparaciones de células incubadas por duplicado. El nivel basal en ausencia de epinefrina fue de 0.507 +/- 0.024 pmolas de AMPc/mg peso húmedo.

* p < 0.005 con respecto al basal.

4.2. EFECTO DE LA TOXINA PERTUSSIS SOBRE LA RESPUESTA ALFA₁ ADRENERGICA EN RATAS HIPOTIROIDEAS:

4.2.1. EFECTO SOBRE LA UREOGÉNESIS:

Con el fin de establecer si la estimulación de la ureogénesis, por la activación de los receptores alfa₁ adrenérgicos en estas células es o no sensible a la toxina pertussis, se realizaron los experimentos resumidos en la figura 2. Como se observa, la epinefrina es capaz de estimular la ureogénesis tanto en células de animales hipotiroideos como en las de hipotiroideos tratados con toxina pertussis. Aunque en estas últimas, la estimulación máxima es un poco inferior, las diferencias no son estadísticamente significativas ($p < .05$) lo que indica que esta respuesta metabólica es insensible a dicha toxina.

4.2.2. EFECTO SOBRE EL MARCAJE DE FOSFOINOSITIDOS:

A pesar de que la respuesta metabólica analizada es insensible a la toxina pertussis, otros eventos asociados a la estimulación de los receptores alfa₁ podrían serlo, por lo que se analizó el efecto de esta toxina sobre la estimulación en el recambio de fosfoinosítidos producido por estimulación alfa₁ adrenérgica.

En la figura 3 se muestran los resultados obtenidos, los cuales señalan que la toxina pertussis es incapaz de bloquear la estimulación en el marcaje de fosfoinosítidos producida por epinefrina en presencia de propranolol. Estos datos sugieren que en estas células, la proteína N que acopla a los receptores alfa₁ con la fosfolipasa C es insensible a la toxina pertussis.

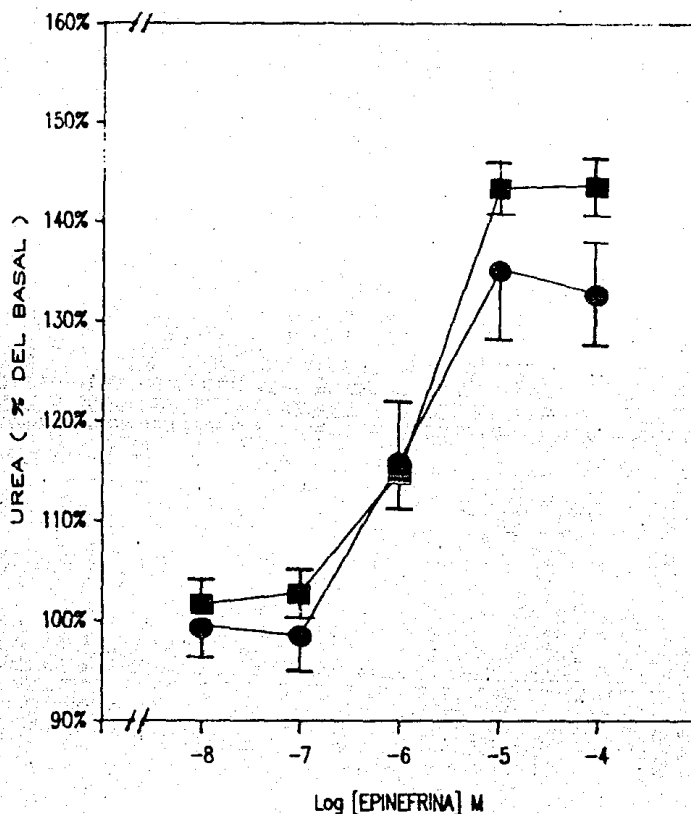


Fig. 2: EFECTO DE LA TOXINA PERTUSSIS SOBRE LA ESTIMULACION ALFA₁ DE LA UREOGENESIS EN CELULAS DE RATAS HIPOTIROIDEAS.

Los hepatocitos de ratas hipotiroideas (■) o hipotiroideas tratadas con toxina pertussis (●), fueron incubados en presencia de propranolol 10 μ M y de diferentes concentraciones de epinefrina. La producción basal de urea fue de 39.3 y 33.3 nM/peso húmedo respectivamente. Los datos representan el promedio (+/-) error estandar de 15 y 3 preparaciones de células respectivamente, incubadas por duplicado.

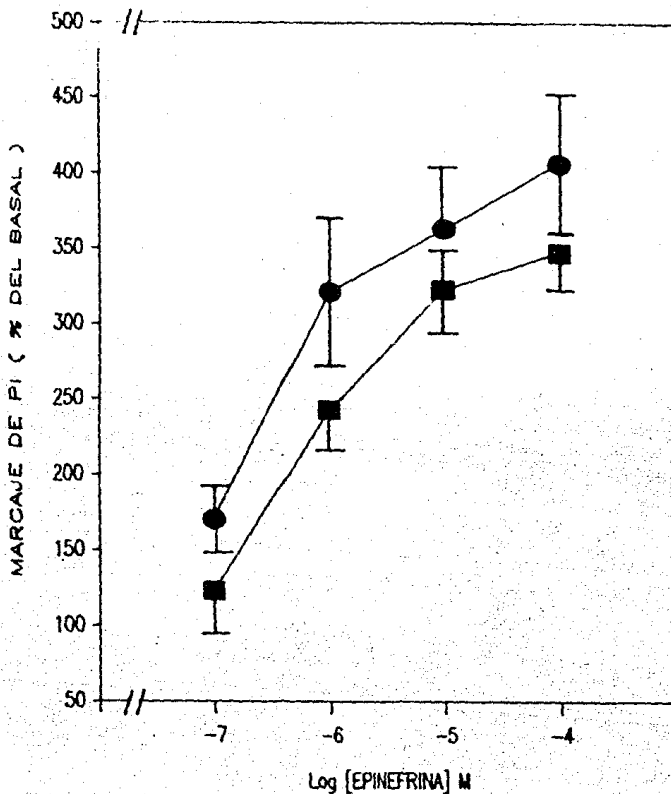


Fig. 3: EFECTO DE LA TOXINA PERTUSSIS SOBRE EL MARCAJE DE FOSFOINOSITIDOS ALFA₁ ADRENERGICO EN HEPATOCITOS DE ANIMALES HIPOTIROIDEOS.

Los hepatocitos de ratas hipotiroideas (■) o hipotiroideas tratadas con toxina pertussis (●) fueron incubados como se señala en materiales y métodos, con concentraciones crecientes de epinefrina en presencia de propranolol 10 μ M. Los datos representan el promedio (+/-) error estandard de 3 y 4 preparaciones de células respectivamente, incubadas por duplicado.

4.2.3. EFECTO SOBRE LA ACUMULACION DE AMPc:

Como se mencionó, la epinefrina, en presencia de propranolol 10 μ M, es capaz de producir un pequeño incremento en los niveles de AMPc intracelulares. La sensibilidad de este efecto a la toxina pertussis se presenta en la figura 4. Al igual que la respuesta metabólica y el marcaje de fosfoinosítidos, la acumulación de AMPc observada no es bloqueable por un tratamiento con toxina pertussis.

4.3. EFECTO DEL BROMURO DE BROMOFENACILO SOBRE LA RESPUESTA ALFA₁ ADRENERGICA EN RATAS HIPOTIROIDEAS:

Si como en otros sistemas, la epinefrina es capaz de producir la activación de una fosfolipasa A₂ a través de los receptores alfa₁, la estimulación de la ureogénesis observada en estas células podría estar mediada por un metabolito del ácido araquidónico. Con base en esto, se analizó el efecto del bromuro de bromofenacilo (BPB), potente inhibidor de la fosfolipasa A₂, sobre la estimulación de la ureogénesis alfa₁ adrenérgica.

En la figura 5, se muestra el efecto que tiene el BPB sobre la ureogénesis basal y estimulada por una concentración submáxima de epinefrina en presencia de propranolol. Como se observa, este compuesto no altera significativamente per se la ureogénesis y es incapaz de inhibir el efecto que produce la epinefrina. Sólo a concentraciones muy altas (10^{-4} M) el BPB reduce parcialmente el efecto de la epinefrina, debido probablemente a acciones inespecíficas producidas por este agente a altas concentraciones.

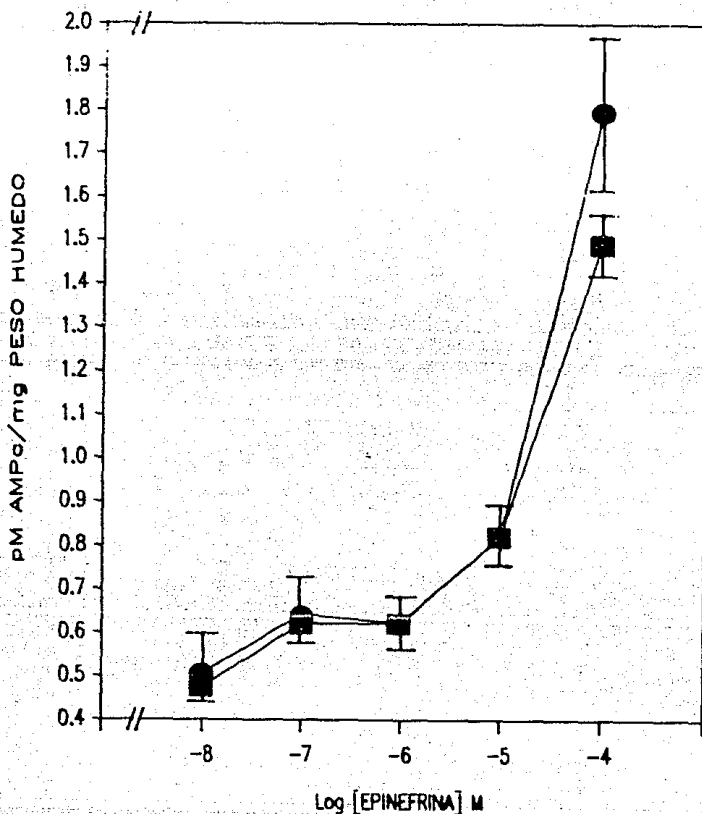


Fig. 4: EFECTO DE LA TOXINA PERTUSSIS SOBRE LA ACUMULACION DE AMPc PRODUCIDA POR EPINEFRINA EN PRESENCIA DE PROPRANOLOL, EN HEPATOCITOS DE ANIMALES HIPOTIROIDEOS.

Los hepatocitos de ratas hipotiroideas (■) o hipotiroideas tratadas con toxina pertussis (●) fueron incubadas en presencia de propranolol 10 μ M y de concentraciones crecientes de epinefrina. Los datos representan el promedio (+/-) error estandard de determinaciones por duplicado de 11 y 3 preparaciones de células respectivamente, incubadas por duplicado. El nivel basal en ausencia de epinefrina fue de 0.507 +/- 0.024 y 0.477 +/- .073 pmoles de AMPc/mg peso húmedo respectivamente.

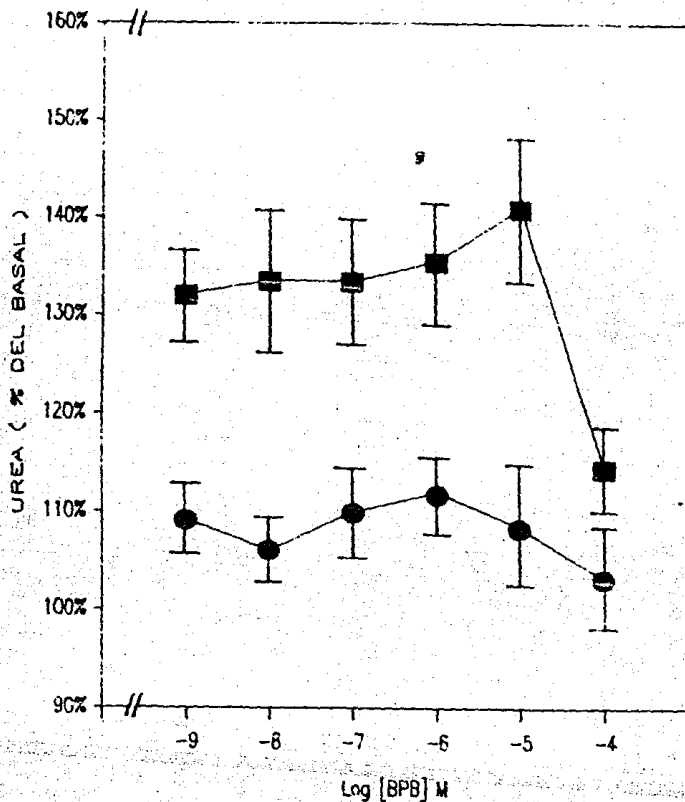


Fig. 5: EFECTO DEL BROMURO DE BROMOFENACILO SOBRE LA UROGENESIS BASAL Y ESTIMULADA POR EPINEFRINA EN HEPATOCITOS DE ANIMALES HIPOTIROIDEOS.

Los hepatocitos de ratas hipotiroideas fueron incubados con distintas concentraciones de bromuro de bromofenacilo en ausencia (●) o en presencia (■) de epinefrina y propranolol ambos a una concentración de 10 μ M. Los resultados representan el promedio (+/-) error estandar de 4 preparaciones de células incubadas por duplicado. Otras indicaciones ver figura 2.

4.4. EFECTO DE ANTAGONISTAS SOBRE LAS RESPUESTAS CELULARES ANALIZADAS.

4.4.1. EFECTO DEL ANTAGONISTA PRAZOSINA SOBRE LA ESTIMULACION ALFA₁ ADRENERGICA EN HEPATOCITOS DE ANIMALES HIPOTIROIDEOS.

La prazosina es un antagonista específico para los receptores alfa₁ adrenérgicos y constituye un arma farmacológica para la caracterización de los efectos mediados por estos receptores. El efecto de este antagonista sobre la estimulación alfa₁ de la ureogénesis, se presenta en la figura 6. Como se observa, la prazosina provoca tanto un desplazamiento hacia la derecha de la curva dosis-respuesta, como una reducción en el efecto máximo producido. Se deduce de esto que la inhibición producida por este agente es competitiva pero posee un componente no competitivo, posiblemente debido a una disociación lenta de este agente de los receptores lo que causa un efecto pseudo-irreversible. La Kd aparente de la prazosina, calculada según la fórmula de Cheng y Prusoff (92), para bloquear el efecto de epinefrina deducida de esta figura es de 23 nM.

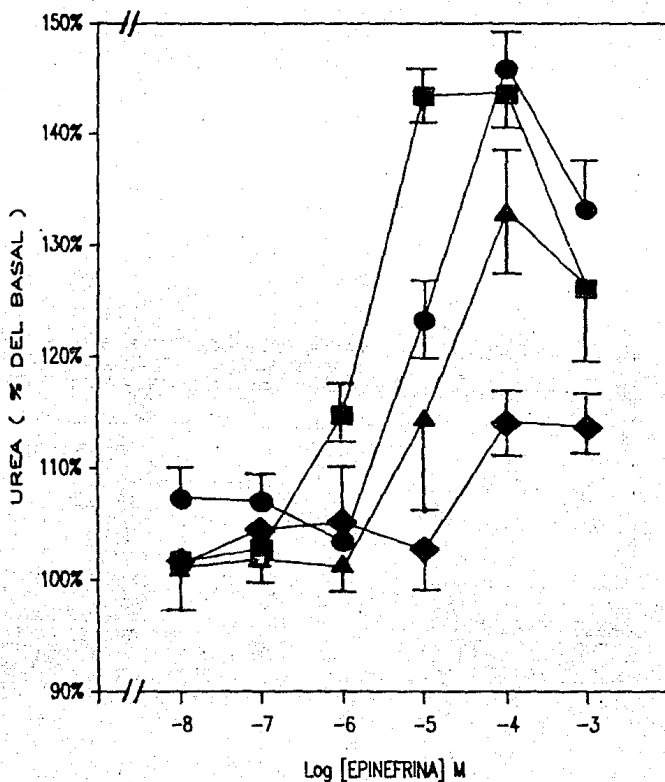


Fig. 6: DESPLAZAMIENTO DE LA CURVA DOSIS-RESPUESTA PARA EL EFECTO α_1 DE LA EPINEFRINA SOBRE LA UREOGENESIS EN HEPATOCITOS DE RATAS HIPOTIROIDEAS.

Los hepatocitos de ratas hipotiroideas fueron incubados con concentraciones crecientes de epinefrina y $10 \mu\text{M}$ de propranolol en ausencia (■) o en presencia de 10^{-7}M (●), 10^{-6}M (▲) y 10^{-5}M (◆) de prazosina. Los datos representan el promedio (+/-) error estandar de 7 a 15 preparaciones de células incubadas por duplicado. Otras indicaciones ver figura 2.

4.4.2. EFECTO DE LA PRAZOSINA SOBRE EL MARCAJE DE FOSFOINOSTIDOS ALFA₁ ADRENERGICO EN RATAS HIPOTIROIDEAS:

La figura 7 muestra la inhibición del efecto alfa₁ adrenérgico provocada por prazosina en el marcaje de fosfoinosítidos. En este caso la prazosina, a una concentración de 1 μM , es capaz de abatir totalmente el efecto de epinefrina.

Este parámetro, es más sensible a la inhibición por prazosina que el efecto metabólico pues la Kd aparente de la prazosina, para la inhibición del marcaje de fosfoinosítidos deducida de la figura 7 es de 73.5 pM.

4.4.3. INHIBICION POR PRAZOSINA Y YOHIMBINA DE LA ACUMULACION DE AMPc PROVOCADA POR EPINEFRINA EN PRESENCIA DE PROPRANOLOL:

Con el objetivo de caracterizar farmacológicamente el incremento en los niveles de AMPc producidos por epinefrina en presencia de propranolol, se estudió el efecto de los antagonistas prazosina y yohimbina. Los resultados de los experimentos correspondientes se presentan en la figura 8. Como se observa, la prazosina es capaz de inhibir la acumulación de AMPc producida por epinefrina 10 μM en una manera dependiente de la concentración. En cambio, la yohimbina no tiene prácticamente ningún efecto. Este perfil farmacológico es característico de los receptores alfa₁ adrenérgicos. En este caso no es posible estimar la Kd con precisión pues no es posible evaluar el efecto alfa₁ adrenérgico máximo por sobreposición de la acción beta (ver fig. 1). Sin embargo, resulta claro que la inhibición ocurre a bajas concentraciones de prazosina (fig. 8).

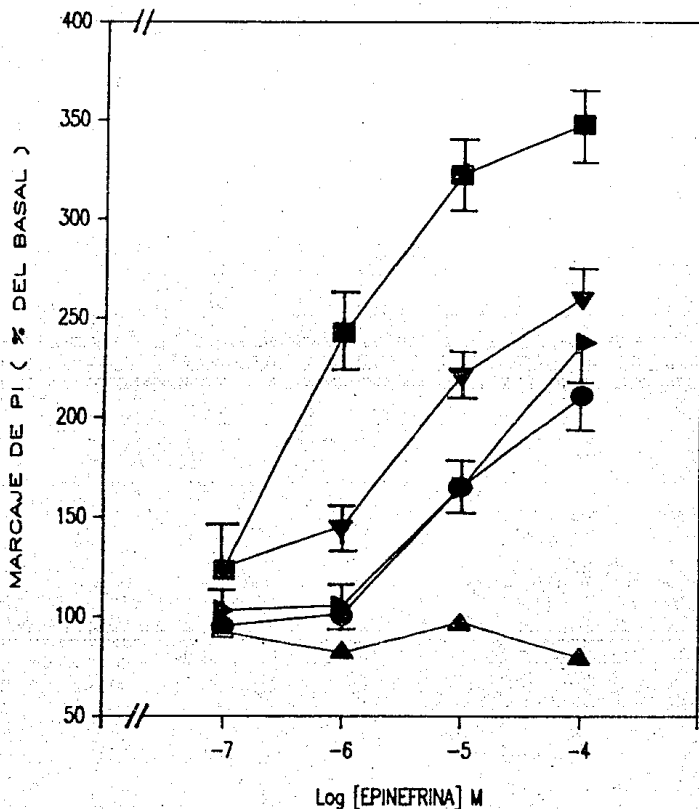


Fig. 7: DESPLAZAMIENTO DE LA CURVA DOSIS-RESPUESTA PARA EL EFECTO α_1 DE LA EPINEFRINA SOBRE EL MARCAJE DE FOSFOINOSITIDOS POR PRAZOSINA.

Los hepatocitos de animales hipotiroides fueron incubados con propranolol 10 μ M y concentraciones crecientes de epinefrina en ausencia (■) o en presencia de 10^{-9} M (▼), 10^{-8} M (►), 10^{-7} M (●) o 10^{-6} M (▲) de prazosina. Los datos representan el promedio (+/-) error estandar de 3 preparaciones de células incubadas por duplicado o triplicado, menos los correspondientes a la concentración de prazosina 10^{-6} M que provienen de una sola preparación de células.

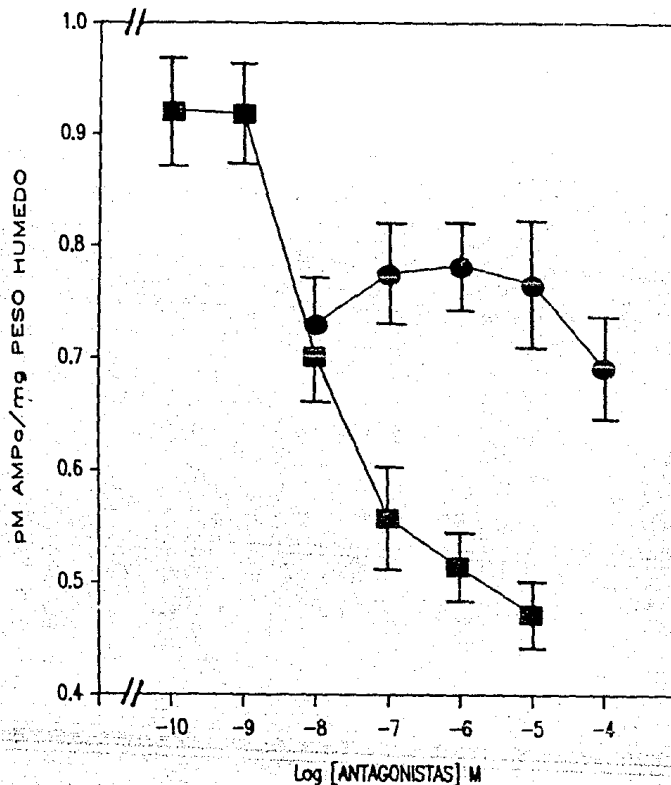


Fig. 8: INHIBICIÓN DEL EFECTO DE LA EPINEFRINA EN PRESENCIA DE PROPRANOLOL SOBRE LOS NIVELES DE AMPc POR PRAZOSINA Y YOHIMBINA.

Los hepatocitos de animales hipotiroideos fueron incubados en presencia de epinefrina y propranolol, ambos a una concentración de 10 μ M y con concentraciones crecientes de prazosina (■) o yohimbina (●). Los datos representan el promedio (+/-) error estándar de determinaciones por duplicado de 11 y 12 preparaciones de células respectivamente, incubadas por duplicado.

4.5. DISCUSION DE RESULTADOS:

4.5.1. EFECTO ALFA₁ ADRENERGICO SOBRE LOS NIVELES DE AMPc EN ANIMALES HIPOTIROIDEOS:

A pesar de que varios autores han señalado que tanto en tejido cerebral, (79,80) como en el hígado en ausencia de calcio extracelular, o en animales de edad avanzada, (77,78) la estimulación de los receptores alfa₁ pueden producir un incremento en los niveles de AMPc, estos resultados no habían podido ser reproducidos en nuestro laboratorio. Sin embargo, los datos de la presente tesis y la reciente observación de un ligero incremento en los niveles del nucleótido cíclico en hepatocitos incubados en ausencia de calcio (Christ y García-Sáinz, datos no publicados) apoyan esta hipótesis.

El hecho de que en animales hipotiroideos la respuesta beta adrenérgica se vea acrecentada, y debido al carácter competitivo de su inhibición por propranolol, podría sugerirse que el efecto observado se debe a una estimulación de los receptores beta. Sin embargo, el perfil farmacológico de la inhibición de este proceso por prazosina y yohimbina está en acuerdo con un carácter alfa₁ adrenérgico para el mismo, ya que la prazosina suele ser al rededor de tres órdenes de magnitud más potente que la yohimbina (93).

Cabe señalar que el efecto observado es relativamente pequeño y difícil de detectar si se compara con las respuestas provocadas por epinefrina en ausencia de propranolol, (efecto beta) o por dosis sub-máximas de glucagon las cuales pueden alcanzar valores de 7 a 10 pmolas AMPc/mg peso húmedo.

Aunque en términos generales, el pico de acumulación de AMPc se sitúa al rededor de los 2 minutos de estimulación, es posible que la cinética sea diferente para este fenómeno por lo que los valores obtenidos pueden estar subestimados. Queda por evaluar si esta modesta estimulación es capaz de provocar una respuesta metabólica. En este sentido, no parece ser necesario que la concentración de AMPc alcance valores muy elevados para producir un efecto metabólico ya que se ha reportado que un aumento al doble en los niveles de este nucleótido cíclico es capaz de estimular significativamente a la enzima fosforilasa A (77).

El mecanismo mediante el cual se produce este aumento de AMPc permanece sin aclarar. Una primera alternativa consiste en suponer que los receptores alfa₁ pueden estar acoplados de manera estimulatoria a la adenilato-ciclase, aunque con una eficiencia considerablemente menor que los receptores beta. De ser así, esto mostraría que los receptores alfa₁ no están acoplados únicamente con el sistema de transducción IP₃, Ca⁺⁺, DG sino que bajo ciertas condiciones (ausencia de calcio, hipotiroidismo), estos receptores pueden producir sus efectos a través del sistema de la adenilato-ciclase. Sin embargo debe tenerse en consideración que los receptores alfa₁ adrenérgicos pueden no constituir un grupo homogéneo (84,85).

De manera alternativa, este aumento de AMPc podría ser el resultado de una alteración indirecta en el metabolismo de este nucleótido cíclico. De cualquier manera, es evidente que es necesario profundizar en el conocimiento de este efecto para establecer si el AMPc es o no el mediador de la vía alternativa ya propuesta.

4.5.2. EFECTO DE LA TOXINA PERTUSSIS SOBRE LAS RESPUESTAS ALFA₁ ADRENERGICAS ANALIZADAS:

La vía de transducción IP₃, Ca⁺⁺, DG para los receptores alfa₁ adrenérgicos en hepatocitos de ratas normales es insensible a la toxina pertussis. Sin embargo, en otros sistemas, las respuestas alfa₁ adrenérgicas pueden ser bloqueadas por esta toxina (44,45), por lo que la vía de transducción alternativa al sistema IP₃, Ca⁺⁺, DG podría involucrar una proteína N sensible a la toxina pertussis. De esta manera, esta toxina podría distinguir funcionalmente ambos mecanismos de transducción, como en el caso de la línea celular de tiroides FTRL-5 en la que la toxina pertussis bloquea la liberación alfa₁ adrenérgica de ácido araquidónico pero no la hidrólisis de fosfoinosítidos (81).

Sin embargo, la ausencia de efecto de la toxina pertussis para bloquear las tres respuestas celulares analizadas, indica que la(s) proteína(s) N que acoplan los receptores alfa₁ a estas respuestas es (son) insensibles a dicha toxina. Sin embargo, esto no implica que la toxina pertussis no pueda bloquear otros procesos provocados por la estimulación de estos receptores que utilicen mecanismos de transducción diferentes.

En este sentido, Christ y García Sáinz (datos no publicados) han descrito que los niveles de AMPc producidos por glucagon, pueden ser disminuidos mediante la estimulación de los receptores alfa₁ y que este efecto puede ser bloqueado por la toxina pertussis.

4.5.3. EFECTO DE LA INHIBICION DE LA FOSFOLIPASA A₂ SOBRE LA UREOGENESIS ALFA₁ ADRENERGICA:

El hecho de que la ureogénesis alfa₁ adrenérgica no pueda ser bloqueada por el bromuro de bromofenacilo sugiere que, si la estimulación de los receptores alfa₁ provoca la activación de una fosfolipasa A₂, este evento no tiene ninguna influencia sobre la estimulación de la ureogénesis. Estos resultados, señalan que la vía alternativa para los receptores alfa₁ no parece involucrar una activación de esta enzima.

La posibilidad de que los receptores alfa₁ estén acoplados a una fosfolipasa A₂ en este tejido, no puede ser descartada. De existir, este mecanismo podría mediar otros efectos independientes de los metabólicos, quizás a más largo plazo, por ejemplo la síntesis de DNA como en el caso de la línea celular de tiroides FTRL-5 (81).

4.5.4. INHIBICION POR PRAZOSINA DE LAS RESPUESTAS EVALUADAS:

El análisis de la sensibilidad a prazosina de las tres respuestas consideradas muestra que son el resultado de la activación de los receptores alfa₁. Sin embargo, la estimulación del recambio de fosfoinosítidos en mayor grado, y la acumulación de AMPc, son más sensibles a la inhibición por este agente que el efecto metabólico. Así, mientras que a una concentración de prazosina de 1 µM el marcaje de fosfoinosítidos se abate, la respuesta metabólica persiste. Aunque esto parece sugerir que el recambio de fosfoinosítidos no es indispensable para que se lleve

a cabo la estimulación de la ureogénesis, debe tenerse en cuenta que el marcaje de fosfoinosítidos es un evento cercano a la interacción de la hormona con su receptor mientras que el efecto metabólico está alejado por varios pasos enzimáticos y por lo tanto es susceptible de amplificación. De manera alternativa, la menor sensibilidad del efecto metabólico podría deberse a que está mediado por una población de receptores α_1 con menor afinidad por la prazosina.

V CONCLUSIONES:

Las conclusiones que se desprenden de este trabajo son que en hepatocitos de ratas hipotiroideas:

- La epinefrina, a través de los receptores α_1 es capaz de provocar un incremento en los niveles de AMPc intracelulares, por lo que este nucleótido cíclico puede tener un papel importante en los efectos metabólicos en estas células.

- La toxina pertussis es incapaz de bloquear la estimulación α_1 adrenérgica de la ureogénesis, el recambio de fosfoinosítidos, o la acumulación de AMPc.

- La fosfolipasa A_2 no parece intervenir en la vía alternativa propuesta para los receptores α_1 adrenérgicos en estas células.

VI LITERATURA CITADA:

- 1) - Alberts, B., Bray, D. Lewis, J., Roberts, K., Watson, J.D. (1983) Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing Inc. N.Y. U.S.A. 717-750.
- 2)- García-Sáinz, J. A. (1987) Hormonas, Mensajeros Químicos y Comunicación Celular, Fondo de cultura económica, México.
- 3) - Bennet, M. V. L., Spray, D. C. Eds. (1985) Gap Junctions Cold Spring Harbor Laboratory.
- 4) - Langley, J. N. (1905) J. Physiol. (Lond.) 33, 374.
- 5) - Goodman, A., Goodman, L. S., Gilman, A. Eds. (1980) The Pharmacological Basis of Therapeutics, 6th. Ed. Macmillan Publ. Co.
- 6)- Ariens, E. J. (1983) Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition, 5, 121-127.
- 7) - Bresse, G. (1968) Morphologie et physiologie animales, Larrousse, Paris.
- 8) - Ahlquist, R. P. (1948) Am. J. Physiol. 153, 586-600.
- 9) - Lands, A. M., Arnold, A. M., McAuliff, J. P., Brown, T. G. (1967) Nature 214, 597-598.
- 10)- Lefkowitz, R. J., Stadel, J. M., Caron, M. G. (1983) Ann. Rev. Biochem. 52, 159-186.
- 11)- Dixon, R. A. F., Kobilka, B. K., Strader, D. J., Benovic, J. L., Dohlman, H. G., Frielle, T., Bolanowski, M. A., Bennett, C. D., Rands, E., Diehl, R. E., Mumford, R. A., Slater, E. E., Sigal, I. S., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., Strader, C. D. (1986) Nature. 321, 75-79.

- 12)- Moxham, C. P., George, S. T., Graziano, M. P., Brandwein, H. J., Malbon, C. C. (1986) J. Biol. Chem. 261, 14562-14570.
- 13)- Langer, S. Z. (1977) Br. J. Pharmacol. 60, 481-497.
- 14)- Robinson, G. A., Butcher, R. W., Sutherland, E. W. (1967) Ann. N. Y. Acad. Sci. 139, 703-723.
- 15)- Jones, L. M., Michell, R. H. (1978) Biochem. Soc. Trans. 6, 672-688.
- 16)- Fain, J. N., Garcia-Sáinz, J. A. (1980) Life Sci. 26, 1183-1194.
- 17)- Lomasney, J. W., Fredrik Leeb-Lundberg, L. M., Coteccia, S., Regan, J. W., DeBernardis, J. F., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. J. Biol. Chem. 261, 7710-7716.
- 18)- Regan, J., Nakata, H., De Marinis, Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. (1986) J. Biol. Chem. 261, 3894-3900.
- 19)- Strasser, B. J., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 2797-2801.
- 20)- Fredrik Leeb-Lundberg, L. M., Benovik, J. L., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. (1987) J. Biol. Chem. 262, 3098-3105.
- 21)- Bouvier, M., Fredrik Leeb-Lundberg, L. M., Benovic, J. L., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. (1987) J. Biol. Chem. 262, 3106- 3113.
- 22)- Sutherland, E. W. (1972) Science, 177, 401-408.
- 23)- Rodbell, M. (1980) Nature 284, 17-22.
- 24)- Codina, J., Hildebrandt, J. D., Sekura, R. D., Birnbaumer, M., Bryan, J., Manclark, R., Iyengar, R., Birnbaumer, L. (1984) J. Biol. Chem. 259, 5871-5886.
- 25)- Hildebrandt, J. D., Codina, J., Risinger, R., Birnbaumer, L. (1984) J. Biol. Chem. 259, 2039-2042.

- 26)- Katada, T., Bokoch, G. M., Northrup, J. K., Ui, M., Gilman, A. G. (1984) J. Biol. Chem. 259, 3568-3577.
- 27)- Birnbaumer, L., Codina, J., Mattera, R., Cerione, R. A., Hildebrandt, J. D., Sunyer, T., Rojas, F., Caron, M., Lefkowitz, R. J., Iyengar, R. (1985) en Molecular Mechanisms of Transmembrane Signalling. Cohen, P., Houslay, M. D. Eds. Elsevier, 131-182.
- 28)- Katada, T., Northrup, J. K., Bokoch, G. M., Ui, M., Gilman, A. G. (1984) J. Biol. Chem. 259, 3578-3585.
- 29)- Hildebrandt, J. D., Codina, J., Birnbauer, L. (1984) J. Biol. Chem. 259, 13178-13185.
- 30)- Evreux, C., Van Sande, J., Miot, F., Cochaux, P., Decoster, C., Dumont, J. E. (1985) Mol. Cell Endocrinol. 43, 123-134.
- 31)- García-Sáinz, J. A. (1985) Ciencia 36, 97-103.
- 32)- Cassel, D., Selinger, Z. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3307-3311.
- 33)- Boyer, J. L., Posadas, C., García-Sáinz, J. A. (1984) J. Biol. Chem. 259 8076-8079.
- 34)- García-Sáinz, J. A., Boyer, J. L., Michel, T., Sawyer, D., Stiles, G. L., Dohlman, H., Lefkowitz, R. J. (1984) FEBS Lett. 172, 95-98.
- 35)- Hokin, M. R., Hokin, L. E. (1953) J. Biol. Chem. 203, 967-977.
- 36)- Michell, R. H. (1975) Biochem. biophys. Acta. 415, 81-147.
- 37)- Tolbert, M. E. M., White, A. C., Aspary, K., Cutts, I., Fain, J. N. (1980) J. Biol. Chem. 55, 1938-1944.

- 38)- Downes, C. P., Michell, R. H. (1985) en Molecular Mechanisms of Transmembrane Signalling. Cohen, P., Houslay, M. D. Eds. Elsevier, 3-56.
- 39)- Uhing, R. H., Prpic, V., Jiang, H., Exton, J. H. (1986) J. Biol. Chem. 261, 2140-2146.
- 40)- Litosh, I., Fain, J. N. (1985) J. Biol. Chem. 260, 16052-16055.
- 41)- Cockcroft, S., Gompertz, B. D. (1985) Nature 314, 534-536.
- 42)- Blackmore, P. F., Bocckino, S. B., Waynick, L. E., Exton, J. E. (1985) J. Biol. Chem. 260, 14477-14483.
- 43)- Cockcroft, S., Taylor, J. A. (1987) Biochem. J. 241, 409-414.
- 44)- Gonzales, R. A., Crews, F. T. (1985) Biochem. J. 232, 799-804.
- 45)- Pfeilshifter, J., Bauer, C. (1986) Biochem. J. 236, 289-294.
- 46)- Berridge, M. K., (1983) Biochem. J. 212, 849-858.
- 47)- Thomas, A. P., Alexander, J., Williamson, J. R. (1985) J. Biol. Chem. 259, 5574-5584.
- 48)- Berridge, M. J., Irvine, R. J., (1985) en Inositol and phosphoinositides. Bleasdale, J. E., Eichberg and Hauser, G. 351-366.
- 49)- Joseph, S. K., Thomas, A. P., Williams, R. J., Irvine, R. F., Williamson, J. R. (1984) J. Biol. Chem. 259, 3077-3081.
- 50)- Spat, A., Fabralo, A., Rubin, R. P. (1986) Biochem. J. 233, 929-932.
- 51)- Suresh, K. J., Williamson, J. R. (1986) J. Biol. Chem. 261, 14658-14664.

- 52)- Joseph, S. J., Coll, K. E., Thomas, A. P., Rubin, R., Williamson, J. R. (1985) J. Biol. Chem. 260, 12508-12515.
- 53)- Woods, N. M., Cuthbertson, R., Cobbold, P. H. (1986) Nature. 319, 600-602.
- 54)- Kishimoto, A., Takai, Y., Mori, T., Kikkawa, V., Nishizuka, Y. (1980) J. Biol. Chem. 255, 2273-2276.
- 55)- Trenllyon, J. M., Kulkarni, R. K., Byus, C. V. (1984) J. Biol. Chem. 259, 897-902.
- 56)- Ahmad, Z., Lee, F. T., De Paoli-Roach, A., Roach, P. J. (1984) J. Biol. Chem. 259, 8743-8747.
- 57)- Murayama, T., Ul, M. (1983) J. Biol. Chem. 258, 3319-3326.
- 58)- García-Sáinz, J. A., Tussió-Luna, M. I., Hernández-Sotomayor, S. M. T. (1986) Biochem. Biophys. Acta. 887, 69-72.
- 59)- García-Sáinz, J. A., Hernández-Sotomayor, S. M. T., Tussió-Luna, M. I. (1986) Biochem. Biophys. Acta. 887, 73-79.
- 60)- Haring, H., Kirsch, D., Obermaier, B., Ermel, B., Machicao, F. (1986) J. Biol. Chem. 261, 3869-3875.
- 61)- Davis, R. J., Czech, M. P. (1984) J. Biol. Chem. 259, 8545-8549.
- 62)- Goodhard, M., Ferry, N., Aggerbeck, M., Hanoune, J. (1984) J. Biochem. Pharmacol. 33, 863-868.
- 63)- Corvera, S., Huerta-Bahena, J., García-Sáinz, J. A. (1982) Eur. J. Pharmacol. 82, 89-91.
- 64)- Paras, T. (1987) Tesis de licenciatura, Departamento de Biología, Fac. Ciencias UNAM.
- 65)- García-Sáinz, J. A., Nájera-alvarado, A. (1986) Biochem. Biophys. Acta. 885, 102-109.

- 66)- Malbon, C. C. (1980) J. Biol. Chem. 255, 8692-8699.
- 67)- Corvera, S., García-Sáinz, J. A. (1982) Life Sci. 31, 2493-2498.
- 68)- Strikland, W. G., Blackmore, P. F., Exton, J. H. (1980) Diabetes 29, 617-622.
- 69)- Corvera, S., García-Sáinz, J. A. (1983) FEBS Lett. 153, 366-368.
- 70)- Corvera, S., Hernández-Sotomayor, S. M. T., García-Sáinz, J. A. (1984) Biochem. Biophys. Acta 803, 95-105.
- 71)- Hernández-Sotomayor, S. M. T., García-Sáinz, J. A. (1984) FEBS Lett. 166, 385-388.
- 72)- Pushpendran, C. K., Corvera, S., García-Sáinz, J. A. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 118, 451-459.
- 73)- García-Sáinz, J. A., Tussié-Luna, M. I., Hernández-Sotomayor, S. M. T. (1986) Biochem. Biophys. Acta. 889, 266-269.
- 74)- García-Sáinz, J. A., Contreras, J. L. (1986) Eur. J. Pharmacol. 125, 103-106.
- 75)- Huerta-Bahena, J., García-Sáinz, J. A. (1985) Biochem. Biophys. Acta 845, 131-137.
- 76)- García-Sáinz, J. A., Hernández-Sotomayor, S. M. T. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6727-6730.
- 77)- Morgan, N. G., Blackmore, P. F., Exton, J. (1983) J. Biol. Chem. 258, 5103-5109.
- 78)- Morgan, N. G., Waynick, L. E., Exton, J. (1983) Eur. J. Pharmacol. 96, 1-10.
- 79)- Johnson, R. D., Minneman, K. P. (1986) Eur. J. Pharmacol. 129, 293-305.

- 80)- Johnson, R. D., Minneman, K. P. (1986) Mol. Pharmacol. En prensa.
- 81)- Burch, R. M., Luini, A., Mais, D. E., Corda, D., Vanderhoek, J. Y., Kohn, L. D., Axelrod, J. (1986) J. Biol. Chem. 261, 11236-11241.
- 82)- Slivka, S., Insel, P. A. (1987) J. Biol. Chem. 262, 4200-4207.
- 83)- Burch, R. M., Luini, A., Axelrod, J. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 7201-7205.
- 84)- Morrow, A. L., Creese, I. (1986) Mol. Pharmacol. 29, 321-330.
- 85)- Flavahan, N. A., Vanhoutte, P. M. (1986) TIPS 7, 347-349.
- 86)- Sekura, F. F., Manclark, C. R., Meade, B., Zhang, K. L. (1983) J. Biol. Chem. 258, 14647-14651.
- 87)- Berry, M. N., Friend, D. S. (1969) J. Cell Biol. 43, 506-520.
- 88)- Tolbert, M. E. M., White, A. C., Aspry, K., Cutts, J., Fain, J. N. (1980) J. Biol. Chem. 255, 1938-1944.
- 89)- Gutman, I., Bergmeyer, H. U. (1974) en: Methods of Enzymatic Analysis, Bergmeyer, H. U. ed., 1791-1793.
- 90)- Gilman, A. G. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67, 305-312.
- 91)- García-Sáinz, J. A. (1983) Eur. J. Pharmacol. 87, 159-161
- 92)- Cheng, Y., Prussoff, W. H. (1973) Biochem. Pharmac. 22, 3099.
- 93)- Corvera, S., García-Sáinz, J. A. (1981) Eur. J. Pharmacol. 72, 387-390.