

35
20j

RECEIVED
UNIVERSITY OF MEXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

U. N. A. M.

" CATECOLAMINAS PLASMATICAS Y RECEPTORES
ALFA₂-ADRENERGICOS EN PLAQUETAS DE
SUJETOS NORMOTENSOS "

Tesis para obtener el titulo de

B I O L O G O

Presenta

GUILLERMO C. CARDOSO SALDANA

México D. F. 1988.



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

	Pag.
1.- INTRODUCCION.	
1.1 Catecolaminas.....	3
1.4 Receptores adrenérgicos.....	7
1.7 Mecanismos adrenérgicos de acción hormonal	15
1.11 Importancia del estudio de los receptores adrenérgicos....	17
2.- MATERIAL Y METODOS.	
Sujetos y protocolo de estudio	21
2.1 Medición de las Catecolaminas	22
2.4 Obtención y preparación de las membranas de plaquetas	26
2.5 Ensayo de unión del radioligando a los receptores alfa ₂ -adrenérgicos	27
2.6 Medición de la actividad de la enzima Adenilciclase	31
2.7 Análisis estadístico	35
3.- RESULTADOS.	
3.1 Catecolaminas	38
3.3 Número y afinidad de los receptores alfa ₂ -adrenérgicos	41
3.4 Actividad de la enzima adenilciclase	42
4.- DISCUSION Y CONCLUSIONES.	44
5.- BIBLIOGRAFIA	55

INTRODUCCION

Los organismos unicelulares realizan varias funciones para mantenerse vivos, asimilan los nutrientes que toman directamente del medio que les rodea, sintetizan nuevos nutrientes que les serán útiles en su desarrollo, son capaces de transportar en su interior diferentes compuestos y excretar las sustancias que ya no les serán útiles. En los organismos pluricelulares éstos eventos se llevan a cabo de manera más compleja ya que son grupos de células algunas altamente especializadas, las encargadas de realizar cada una de las funciones que mantienen con vida al organismo del que forman parte. La coordinación de las diferentes funciones se lleva a cabo por mecanismos que comunican entre si las células, los tejidos, y los diferentes órganos.

En los vertebrados, existen principalmente dos formas importantes de comunicación celular: mediante sistemas hormonales y por sistemas neuronales. En ambos casos la comunicación se lleva a cabo mediante mensajeros químicos (1), entre los cuales se encuentran las hormonas, las fitohormonas y las feromonas.

Esta división de los mensajeros químicos tiene algunos inconvenientes ya que los límites entre las diferentes categorías no están definidos con precisión, por lo que las divisiones se establecen con la finalidad de facilitar su estudio.

a) Las hormonas, son sustancias sintetizadas en estructuras especializadas, generalmente glándulas, que vierten su contenido a la circulación. La acción de las hormonas se lleva a cabo por un mecanismo autocrino o por un mecanismo paracrino. El primer término hace referencia a un proceso en el cual la hormona actúa en las mismas células que la liberaron y el segundo se refiere a la acción de la hormona en células distantes del lugar en que se liberó, este último mecanismo es el más frecuente en la

comunicación hormonal.

b) Los neurotransmisores son compuestos de bajo peso molecular los cuales son sintetizados y secretados por las neuronas, tienen la capacidad de interaccionar con otras neuronas participando de ésta manera en la transmisión de los impulsos nerviosos.

Existen diferencias importantes entre la comunicación hormonal y la neuronal. Los neurotransmisores actúan por regla general a distancias más cortas y sus efectos se llevan a cabo en milisegundos. Por el contrario la acción de las hormonas se lleva a cabo en células u órganos distantes en cualquier parte del organismo y dependiendo de la hormona, su acción puede llevarse a cabo en minutos o en algunas horas.

Por otra parte es difícil separar los componentes hormonales de los neuronales en varios procesos reguladores ya que en el sistema nervioso de todos los animales existen células con la capacidad de funcionar como glándulas (2), tal es el caso de la neurohipófisis de los vertebrados donde varios factores como las neurohormonas, regulan las secreciones de la adenohipófisis. Otro ejemplo son las catecolaminas (CA), compuestos que se liberan en las células cromafines de las glándulas suprarrenales y de las neuronas simpáticas.

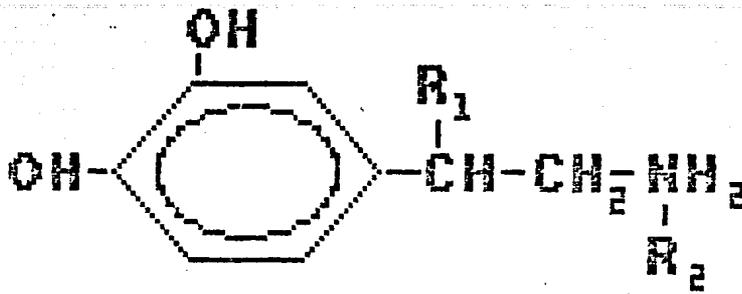
1.1 CATECOLAMINAS

El término CA se aplica en forma genérica a la epinefrina (E), norepinefrina (NE), y a la dopamina (D). Los pesos moleculares de éstas aminas son de: 183.2, 169.2, 153.15 respectivamente. Su estructura consiste en un grupo catecol (anillo de benceno con dos hidroxilos en posición adyacente) unido a una cadena alifática aminada Fig. 1

Como se puede observar, existe una gran similitud en la composición de las tres CA, diferentes únicamente por los radicales R_1 y R_2 que le dan a cada una propiedades muy particulares.

1.2 BIOSÍNTESIS DE LAS CATECOLAMINAS

La biosíntesis de las CA se inicia con el aminoácido esencial fenilalanina, el cual es oxidado por la enzima fenilalanina hidroxilasa. Esta reacción requiere la presencia de cofactores como la pteridina, oxígeno, y de iones Fe^{++} para formar la tirosina, la cual a su vez, por la acción de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) y en presencia de oxígeno molecular y pteridina es convertida a dihidroxifenilalanina (DOPA). La TH se encuentra únicamente en el citosol de las células cromafines de las glándulas suprarrenales y en las terminaciones nerviosas simpáticas, la hidroxilación de la tirosina es uno de los pasos limitantes en la síntesis de las CA. La DOPA es descarboxilada por la enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AAD) la cual también se encuentra en el citosol y requiere de fosfato de piridoxal como cofactor para formar la dopamina (D), que mediante la participación de la dopamina-beta-hidroxilasa (DBH), forma la L-norepinefrina (NE). La DBH a diferencia de las otras enzimas



R ₁	R ₂	NOMBRE
H	H	DOPAMINA
OH	H	NOREPINEFRINA
OH	CH ₃	EPINEFRINA

Fig.1 Estructura química de las catecolaminas.

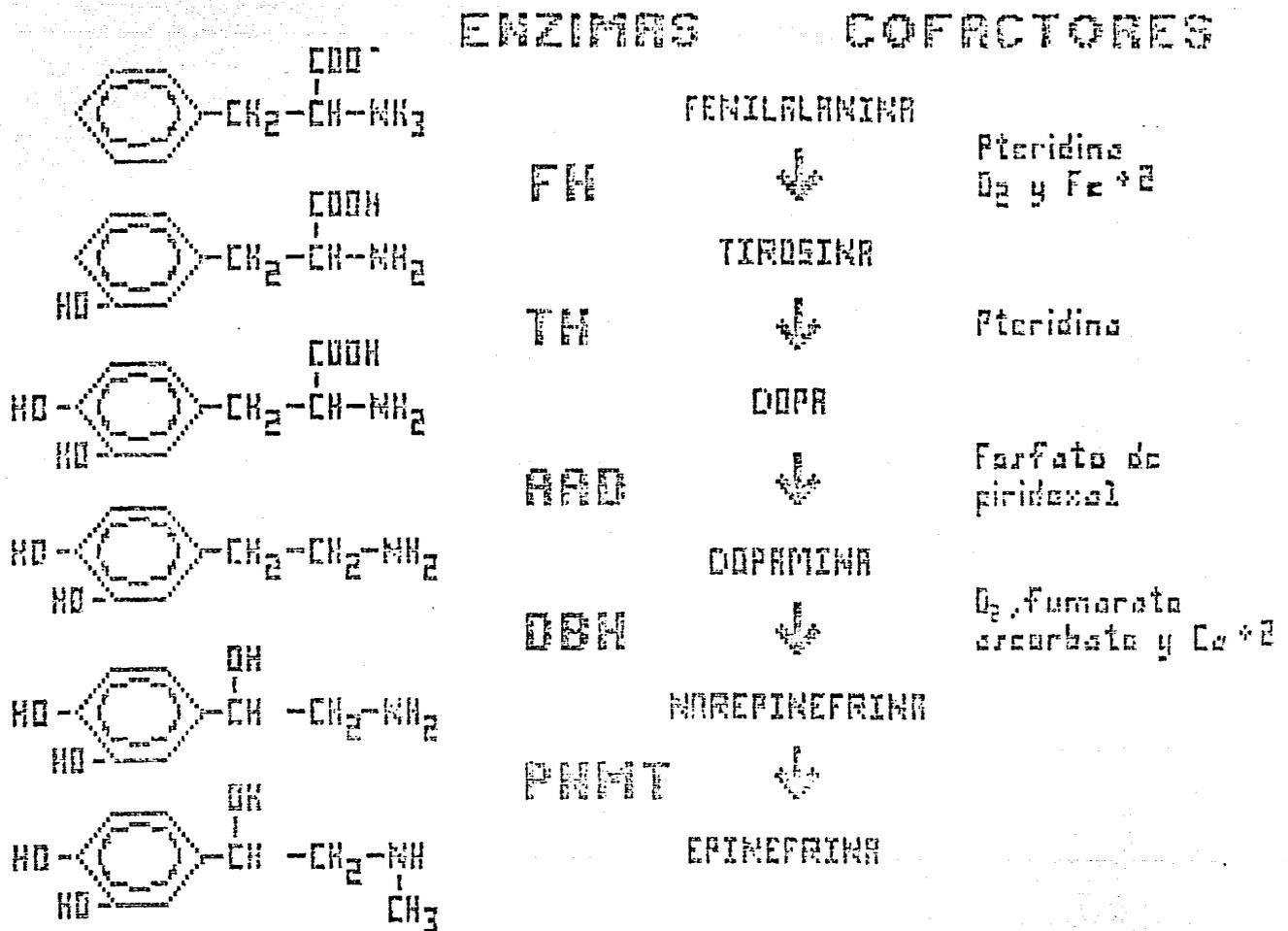


Fig. 2 biosíntesis de las catecolaminas.

que participan en la biosíntesis se encuentra en las vesículas de secreción de las terminaciones nerviosas simpáticas, así como en en los gránulos cromafines de la médula suprarrenal. En éstas células también se encuentra la enzima feniletanolamina-N-metiltransferasa (PMNT), que convierte la NE en E. La PMNT se encuentra en muy bajas cantidades en las neuronas del sistema nervioso central (3). En la fig. 2 se representa la biosíntesis de las CA.

La biosíntesis, almacenamiento y liberación de NE en los axones de la terminaciones nerviosas, se lleva acabo de manera similar a los procesos observados en la médula de las glándulas suprarrenales.

En los gránulos cromafines las CA se unen al trifosfato de adenosina (ATP), asociandose además con las proteínas cromograninas "A" (4).

La composición química de los gránulos cromafines es la siguiente: 21% de CA, 35% de proteínas, 22% de lípidos y 15% de ATP. Las elevadas concentraciones de CA en las vesículas simpáticas y en los gránulos se mantienen gracias a un gradiente de pH generado por una ATPasa dependiente de iones Mg^{++} .

La liberación de las CA se lleva acabo mediante una despolarización de las membranas de las células cromafines, aumentando así la permeabilidad a los iones Na^+ y Ca^{++} (6), de ésta manera el incremento intracelular de los iones induce la liberación de las CA.

La NE liberada por las terminaciones nerviosas puede tomar una de las siguientes vías: a) unirse a los receptores de las células efectoras, ó b) recapturarse por la misma terminación nerviosa presináptica para ser almacenada en vesículas de secreción o bien en estructuras en las que su disponibilidad para la liberación no es inmediata, por ejemplo en las mitocondrias,

c) una parte del neurotransmisor, aproximadamente el 10%, es metabolizado principalmente por las enzimas catecol-o-metiltransferasa (COMT) o por la monoaminooxidasa (MAO) fig.3 y por último d) parte de la NE liberada puede difundir a la circulación sanguínea y ser transportada hasta diferentes órganos blanco. Se cree que la captación presináptica es el principal mecanismo por el que la NE es recuperada de manera rápida y económica para la célula (7). Por otra parte, el tamaño del espacio sináptico determina en mayor o menor grado la ruta a seguir por el neurotransmisor, en los grandes vasos donde el espacio sináptico es mayor, predomina la difusión de NE a la circulación y en los vasos pequeños predomina la recaptación (8).

La MAO está asociada principalmente con las mitocondrias del hígado y de las varicosidades del sistema nervioso simpático (SNS), mediante una desaminación ésta enzima inactiva la NE recapturada por la presinápsis. La COMT que se encuentra en varios tejidos, principalmente en el hígado y en los riñones, en presencia de iones Mg^{++} y S-adenosilmetionina, metila las CA. Ya sea con la metilación o con la oxidación se pueden iniciar los eventos para degradar las CA en la circulación Fig.3.

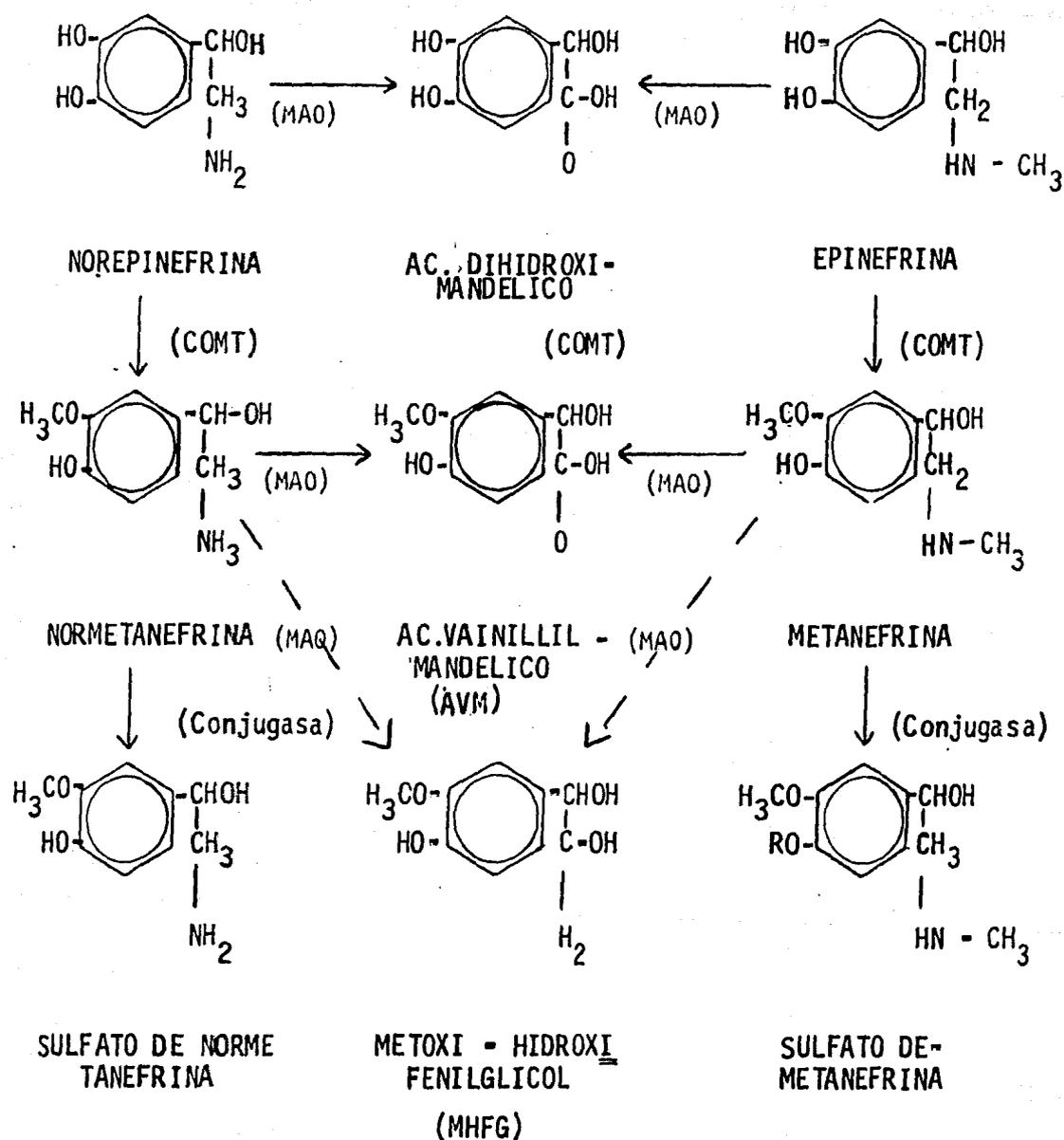


Fig.3 Vías catabólicas de la Epinefrina y la Norepinefrina
 MAO=Monoaminooxidasa; COMT= Catecol o-metil-N-transferasa.

Las líneas punteadas indican la disminución oxidativa de la Normetanefrina y la Metanefrina para formar el MHFG el cual subsecuentemente se puede oxidar para formar el AVM o bien excretarse en la orina (9).

1.3 CONJUGACION DE LAS CATECOLAMINAS

La conjugación de las CA es otra de las vías importantes para la inactivación y excreción, la conjugación es un proceso que comprende dos mecanismos; 1) la unión de las CA al ácido glucurónico, catalizada por la enzima UDP-glucuroniltransferasa, cuya acción está plenamente demostrada en el tejido hepático de varias especies (10), 2) la unión de las CA con los sulfatos, ésta reacción es catalizada por la enzima fenolsufotransferasa, cuya función ha sido demostrada en varios tipos celulares (hígado, riñón, cerebro, glándulas suprarrenales etc.) así como en varias especies animales (11), en cada caso existe un patrón de conjugación diferente, en roedores como la rata predomina la conjugación con ácido glucurónico y en el hombre y el perro predomina la conjugación con sulfatos. Aproximadamente un 99% de la D y un 80% de la NE y E se conjugan con sulfatos (12), éste tipo de conjugación probablemente también ocurre en la orina donde un 70% de las CA conjugadas están unidas a sulfatos (13).

La NE y la E comparten propiedades similares, diferenciándose, algunas veces, únicamente por la naturaleza del efecto inducido o por la magnitud de éste, por ejemplo: ambas hormonas incrementan la frecuencia cardíaca pero el efecto de la E es más potente, ambas CA también elevan la presión arterial sistólica en forma similar. Por otra parte cada amina tiene funciones particulares, la E aumenta el flujo sanguíneo del músculo esquelético, del hígado y del cerebro, mientras que la NE induce el efecto contrario en los mismo órganos.

En la tabla 1 se señalan algunas de las principales acciones de la E y de la NE (14).

TABLA 1

Algunas funciones de la Epinefrina y Norepinefrina en diferentes sistemas. (Modificada de Turner y Bagnara (14).

SISTEMA	FUNCION	EPINEFRINA	NOREPINEFRINA
C	Resistencia periférica.	Disminución	Aumento
a	Presión diastólica.	Aumento	Aumento
r	Presión sistólica.	Aumento	Aumento
d	Frecuencia cardíaca.	Aumento	Aumento
i	Vasos coronarios.	Dilatación	Dilatación
o	Efecto vascular peri-		
v	férico.	Dilatación	
a			
s	FLUJO SANGUINEO:		
c	Muscular.	Aumento	Disminución
u	Hepático	Aumento	Disminución
l	Cerebral.	Aumento	Disminución
a	Renal.	Disminución	Disminución
r			
Respiratorio	Músculo bronquial	Inhibición	Inhibición
Metabolismo			
de	Glucemia	Aumento	Aumento
carbohidratos			

1.4 RECEPTORES ADRENERGICOS

Durante más de 70 años se han investigado los mecanismos mediante los cuales las CA ejercen sus efectos en los diferentes sistemas. En 1906, Dale (15) observó que algunas de las acciones de las CA se modificaban por la presencia de alcaloides del Ergot, mientras que otras no cambiaban.

En base a éstas observaciones se sugirió que los efectos de las CA sobre los tejidos responsivos podrían ser de más de un tipo. En 1926 (16), se postuló que la acción de la acetilcolina y otras drogas, eran iniciadas mediante su interacción con sitios específicos localizados en la membrana celular, a los cuales se les denominó "RECEPTORES". Este término se hizo extensivo y en 1948 (17) y los años siguientes se desarrollaron estudios sobre las respuestas de varios tejidos a diferentes análogos de las CA, la metilnorepinefrina, metilepinefrina e isoproterenol, demostrándose que de acuerdo al orden de potencia para provocar las respuestas debería de haber dos tipos de receptores para las CA a los que se denominó como "ALFA" y "BETA". El orden de potencia de los agonistas alfa-adrenérgicos, para producir una respuesta específica, es el siguiente: E > NE > Isoproterenol.

Para las respuestas reguladas por los receptores beta-adrenérgicos el orden de potencia de los agonistas es el siguiente: Isoproterenol > E >= NE. Posteriormente ambos grupos de respuestas fueron subdivididas en alfa₁, alfa₂, beta₁ y beta₂.

Los compuestos que interaccionan con los receptores, pueden clasificarse en dos grandes grupos: 1) los que al interaccionar con el receptor promueven una respuesta fisiológica por el tejido y que se denominan agonistas, y 2) los que al interaccionar con el receptor no provocan respuesta por el tejido y que se denominan antagonistas.

Los receptores adrenérgicos también se pueden clasificar en base a la selectividad que presentan a los diferentes antagonistas para poder bloquear una respuesta. El orden relativo de selectividad por los agonistas y antagonistas que interaccionan con los receptores alfa y beta adrenérgicos se muestra en la tabla 2.

TABLA 2

Principales agonistas y antagonistas de los receptores adrenérgicos.

RECEPTOR	AGONISTA	ANTAGONISTA
Alfa-adrenérgico	Epinefrina	Fentolamina
	Norepinefrina	Fenoxibenzamina
	Isoproterenol	Dihidroergocriptina
Beta-adrenérgico	Isoproterenol	Propranolol
	Epinefrina	Practolol
	Norepinefrina	Alprenolol

1.5 RECEPTORES ALFA-ADRENERGICOS

El interés por el estudio de los receptores alfa-adrenérgicos se ha incrementado notoriamente en los últimos 10 años. Las diferencias funcionales y farmacológicas entre los receptores presinápticos de las neuronas simpáticas postganglionares y los receptores alfa-adrenérgicos de las células efectoras originalmente permitieron clasificar como

alfa₁, los receptores postsinápticos y como alfa₂ los receptores presinápticos (18,19). Esta clasificación resultó confusa y poco precisa ya que como se demostró posteriormente, varios reportes señalaron la presencia de receptores alfa-adrenérgicos localizados postsinápticamente (20-22).

Como consecuencia, la clasificación de éstos receptores en alfa₁ ó en alfa₂-adrenérgicos se empleo indistintamente de su localización o de su función. Actualmente la clasificación se basa en la afinidad relativa del receptor por los agonistas y antagonistas (23-27). En las tablas 3 y 4 se muestra la especificidad farmacológica de los receptores alfa₁ y alfa₂ (28).

TABLA 3

Bases farmacológicas para la clasificación de los receptores alfa-adrenérgicos, con base en la selectividad por los agonistas.

Alfa ₁ ↓ Alfa ₂	Metoxamina.
	Amidefrina.
	Cirazolina.
	Fenilefrina.
	Norepinefrina.
	Epinefrina.
	Alfa-CH ₃ -norepinefrina.
	6-F-Norepinefrina.
	Clonidina.
	Guanfacina.
	Para-amino-clonidina.
	Azepexol (BHT-933).
	M-7.
	BHT-920.
K-14304.	

TABLA 4

Subclasificación de los receptores alfa-adrenérgicos con base en la selectividad del receptor por los antagonistas.

Alfa₁



Alfa₂

- Prazosina.
 - Corinantina.
 - Labetalol
 - Alfuzosina.
 - WB-4101

 - Ifenprodil.
 - Fentolamina.
 - Tolazolina.
 - Piperoxan.
 - Mianserina.

 - Yohimbina.
 - RS-21361.
 - WY-2670.
 - Idazoxan.
-
-

En los últimos años algunos de estos compuestos se han utilizado como herramientas en el estudio de los receptores alfa-adrenérgicos y algunos otros se han empleado, con fines terapéuticos en individuos con problemas cardiovasculares como la hipertensión arterial.

Los receptores alfa-adrenérgicos están involucrados en una gran variedad de respuestas fisiológicas como la contracción muscular, la activación de vías metabólicas como la glucólisis, la gluconeogénesis y el metabolismo del tejido adiposo. En la tabla 5, se enlistan algunos de los efectos fisiológicos clásicos de la estimulación de los subtipos de receptores alfa-adrenérgicos.

TABLA 5

Efectos fisiológicos producidos por la estimulación de los receptores alfa-adrenérgicos.

Alfa₁

Contracción del músculo liso (29).
Gluconeogénesis (30).
Glucogenólisis (31,32).

(34,35).

Liberación y captación
postsináptica de NE (33).
Estimulación de la secreción
y agregación de las plaquetas

Alfa₂

Disminución de la lipólisis (36).
Disminución de la liberación
de insulina (36).

1.6 RECEPTORES BETA-ADRENERGICOS

Ahlquist en 1948 (17) hizo la distinción entre los receptores alfa y beta adrenérgicos, subsecuentemente en 1967 Lands y col. (37) fundamentaron la existencia de dos subtipos de receptores beta adrenérgicos a los que llamaron beta₁ y beta₂. Estos receptores se definieron en base a la afinidad relativa por la E y por la NE, los receptores beta₁ tienen afinidad similar por ambas CA, mientras que los receptores beta₂ tienen mayor afinidad por la NE. Actualmente existe una gran variedad de drogas con diferente afinidad por cada subtipo de receptor beta-adrenérgico (37,38) tabla 6.

Los receptores beta-adrenérgicos se encuentran en varios tejidos relacionados con la regulación del sistema cardiovascular, por ejemplo en células musculares de los capilares, donde su activación produce vasodilatación y con ella una reducción en la presión arterial, en terminaciones nerviosas postsinápticas donde al ser activados producen una vasodilatación con la consecuente disminución de la presión arterial, en la presinápsis modulan la liberación de NE, en algunas estructuras del sistema nervioso central también regulan la presión arterial y como receptores expuestos a la circulación en las membranas del miocardio regulan las respuestas inotrópica y cronotrópica positivas. Los receptores beta-adrenérgicos también regulan eventos metabólicos como la lipólisis y la liberación de insulina. En la tabla 7 se enlistan otros ejemplos.

TABLA 6

Bases farmacológicas para la clasificación de los receptores
Beta-adrenérgicos. Selectividad por los antagonistas.

ARILOXIETANOLAMINAS:

Beta₁-adrenérgicos

Hidroxicilpindolol.

Alprenolol.

Dihidroalprenolol.

Propranolol.

Oxprenolol.

Practolol.

FENILETANOLAMINAS:

Beta₂-adrenérgicos

Isoxipurina.

Nilidrina.

Ritodrina.

Eutoxamina.

Dicloroisoproterenol.

TABLA 7

Efectos inducidos por los receptores Beta-adrenérgicos en diferentes órganos.

RECEPTOR	ORGANO	EFEECTO
B ₁ -adrenérgico	Corazón	Velocidad de la descarga seno-auricular (40). frecuencia cardiaca y fuerza de contracción(40). Velocidad de conducción(40).
	Efectos metabólicos	Lipólisis (43). Liberación de insulina (44). Prroducción de AMPc (45).
B ₂ -adrenérgicos	Músculo esquelético	Glucogenólisis (46).
	Pulmón	Broncodilatación (47).
	Vasos sanguíneos	Vasoconstricción (48).
	SNS	Liberación presináptica de NE (49,50).

1.7 MECANISMO DE ACCION HORMONAL

El mecanismo de acción de una hormona, comprende su interacción con el sitio receptor específico en la membrana plasmática de la células blanco y la generación de un segundo mensajero que en el interior de la célula, inicia una cascada de eventos bioquímicos que generan una respuesta fisiológica.

En la actualidad se sabe que la E y la NE interaccionan específicamente en mayor o menor grado con cuatro tipos de receptores: los α_1 , α_2 , β_1 y los β_2 . Los cuatro subtipos de receptores son diferentes entre si desde el punto de vista molecular y se ha observado que transducen el mensaje de la hormona a través de tres mecanismos diferentes (51): los receptores β_1 y los β_2 transducen la señal de la hormona mediante la activación de la enzima AC, incrementando la producción de AMPc, los receptores α_2 lo hacen inhibiendo la actividad de la AC y por consiguiente disminuyendo la producción del AMPc y los receptores α_1 -adrenérgicos transducen la señal mediante un aumento en la hidrólisis de trifosfatidilinositol (PIP_2) dando lugar a un incremento de la concentración intracelular de calcio.

En la transducción del mensaje por los mecanismos acoplados a la AC, participan al menos tres entidades moleculares diferentes: el receptor, una proteína reguladora N formada por las subunidades alfa-beta-gama y por último la enzima AC. La señal química recibida por el receptor es transducida por la proteína N a la AC. La proteína N que participa en la estimulación y en la inhibición de la AC es diferente (52).

La subunidad alfa de N_s y de N_i (alfa-s y alfa-i) son diferentes; alfa-s pesa 45000 d. y alfa-i pesa 41000 d. Las sub-

unidades beta y gama de ambas proteínas son idénticas con pesos de 35000 y 10000 respectivamente (53-55). La subunidad alfa de Ns y de Ni posee un sitio de unión para GTP y tiene actividad de GTPasa (56).

1.8 ESTIMULACION DE LA ADENILCICLASA POR LOS RECEPTORES BETA-ADRENERGICOS.

En los efectos biológicos de las CA mediados por los receptores beta₁ y beta₂, la interacción de la hormona con el receptor provoca un cambio conformacional que le permite interaccionar con la proteína Ns favoreciendo el recambio de GDP por GTP en ésta proteína. La interacción de la subunidad alfa-s con GTP induce un aumento en la actividad de la AC, cuando el GTP es hidrolizado por la actividad de GTPasa de la subunidad, ésta se asocia con las subunidades beta y gama, la AC vuelve al estado basal y el sistema está en condiciones de iniciar un nuevo ciclo de activación (56).

1.9 INHIBICION DE LA ADENILCICLASA POR LOS RECEPTORES ALFA₂-ADRENERGICOS

La interacción de las CA con el receptor alfa₂-adrenérgico induce un cambio conformacional que promueve el recambio de GDP por GTP en la subunidad alfa-i de la proteína reguladora Ni y la disociación de las subunidades beta y gama (57). En éstas condiciones alfa-i con GTP interacciona con la AC provocando la inhibición de la enzima. La hidrólisis de GTP por la subunidad alfa-i, permite el desacoplamiento de la AC y la unión con las otras dos subunidades.

Algunos autores han propuesto que la inhibición de la AC por

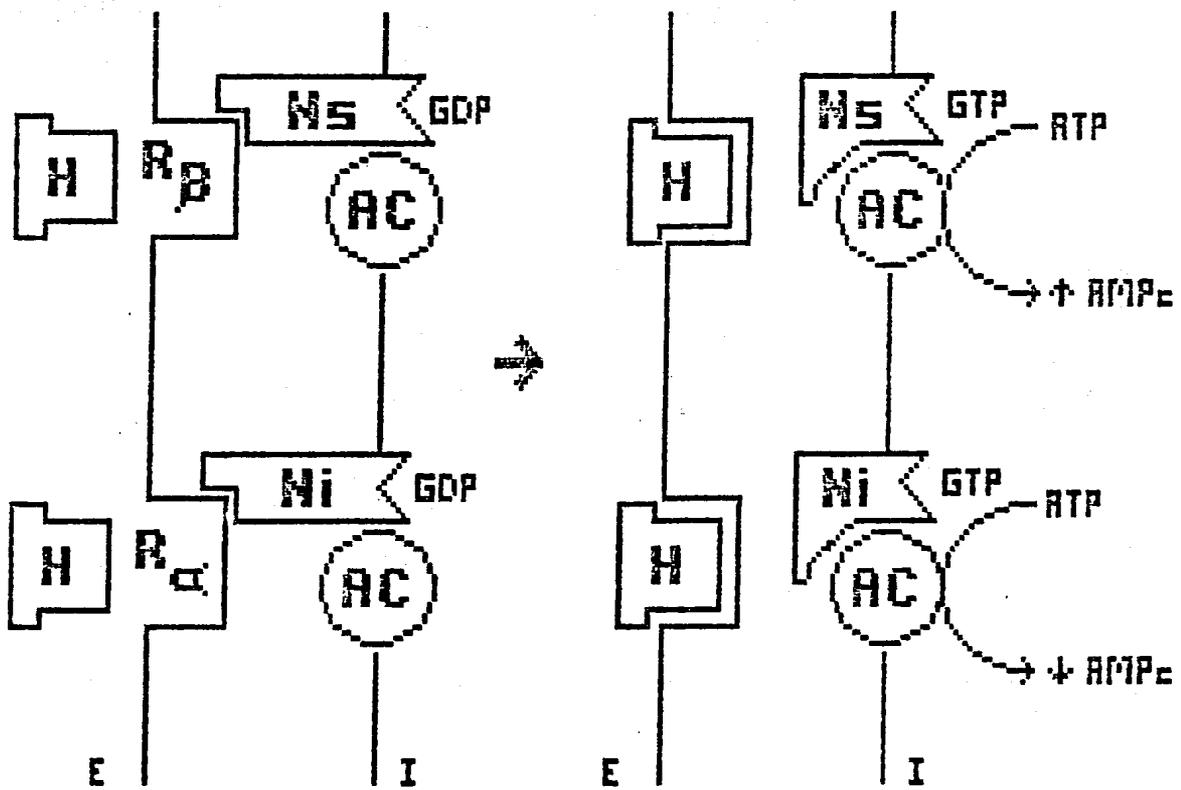


Fig.4 Mecanismos de acción hormonal mediante la acción de los receptores adrenérgicos

los receptores alfa₂-adrenérgicos y posiblemente por algunos otros receptores se debe a la disociación de la subunidad alfa-i de la subunidad beta y gama pero éstas últimas interactúan con la forma activa alfa-s dando origen al complejo beta y gama inactivo, (56).

1.10 HIDROLISIS DE FOSFATIDILINOSITOL BIFOSFATO

La unión de las CA al receptor alfa₁-adrenérgico permite la interacción de éste con una proteína N dependiente de GTP diferente a las proteínas reguladoras N descritas previamente (58). Esta proteína activa una fosfolipasa "C" que cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol bifosfato de la membrana celular obteniéndose como productos el inositol trifosfato (IP₃), y el diacilglicerol (DG). EL IP₃ posee propiedades ionofóricas para el calcio (se ha demostrado que promueve la liberación del calcio, principalmente del retículo endoplásmico) (59), aumentando así las concentraciones intracelulares del ion. El calcio es el segundo mensajero de las señales químicas recibidas por éste tipo de receptores. El DG estimula la proteína cinasa C la cual participa en forma sinérgica con el IP₃ en la liberación del calcio.

1.11 IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LOS RECEPTORES ADRENERGICOS

Durante los últimos diez a quince años ha sido posible el estudio de los efectos bioquímicos de la activación de los receptores adrenérgicos debido al desarrollo de compuestos marcados radiactivamente y con un alto grado de especificidad. Por otra parte el desarrollo de métodos de unión de los radioligandos a los receptores, ha permitido avanzar en el conocimiento de la estructura y función de los diferentes subtipos de receptores,

lograndose también analizar aspectos como su distribución, acoplamiento con las diferentes respuestas bioquímicas y los mecanismos de regulación del receptor, esto a su vez, ha permitido comparar las características de los receptores en condiciones normales y bajo diferentes estados patológicos como; el asma bronquial, la depresión, la insuficiencia cardiaca, y la hipertensión arterial, ente otras enfermedades en las que de una u otra forma el SNS tiene un papel en su etiopatogénia y/o fisiopatología, (61,62).

TABLA 8.

Principales aplicaciones de los estudios de unión de los radioligandos a los receptores adrenérgicos.

- 1.- Estudio de los mecanismos de acción de hormonas y fármacos.
 - 2.- Estudiar la regulación del número y afinidad de los receptores.
 - 3.- Estudio de las alteraciones en las características "normales" de los receptores bajo determinadas circunstancias patológicas.
 - 4.- Estudiar la eficacia y toxicidad de un fármaco.
 - 5.- En la predicción de la respuesta individual a una droga.
-
-

Desde hace varios años y bajo diferentes enfoques se ha estudiado la participación del SNS en enfermedades como las citadas previamente (63-65). Estos estudios se han realizado tanto en animales de laboratorio y en diferentes tejidos, en los que se ha analizado la respuesta a diferentes fármacos. En el humano por razones éticas los estudios de unión de radio-ligandos a los receptores adrenérgicos solo se pueden realizar en células de la sangre.

Otro aspecto muy interesante que ha sido considerado recientemente por algunos autores, son los factores y mecanismos mediante los cuales se regula la función de los receptores.

Existen evidencias de que tanto el número como la afinidad de los receptores adrenérgicos se modifica con la edad, la ingesta de sodio, y con los niveles de CA, entre otros factores. Aunque en varios informes se señala el papel de los receptores adrenérgicos en distintas enfermedades en muy pocos casos se ha demostrado con claridad alteraciones en el número o en la afinidad del receptor, tal es el caso de pacientes con trombocitosis, en los que el número de receptores alfa₂-adrenérgicos está disminuido así como la capacidad de las plaquetas para agregarse (66), y en el feocromocitoma que se caracteriza por una elevación crónica muy importante de los niveles de CA, se ha observado una disminución en el número de los receptores beta-adrenérgicos (68,69,70).

Otras patologías en las que también se sospecha una alteración en los receptores adrenérgicos son: la diabetes mellitus, en varias enfermedades renales, en alteraciones neuropsiquiátricas y en la hipertensión arterial.

Considerando la importancia que tiene el disponer de una metodología adecuada para la cuantificación del número y afinidad de los receptores alfa₂-adrenérgicos, así como de la metodología

para determinar la capacidad de respuesta de los mismos receptores a la estimulación por los agonistas, los objetivos del presente trabajo son:

- 1.- Determinar los niveles de CA en plasma y en orina de un grupo de jóvenes sanos.
- 2.- Estimar el número y afinidad de los receptores alfa₂-adrenérgicos de las plaquetas, obtenidas en el mismo grupo de jóvenes sanos.
- 3.- Correlacionar las concentraciones de CA del plasma y de la orina con el número de receptores alfa₂-adrenérgicos encontrado en cada sujeto estudiado
- 4.- Medir la capacidad de respuesta de la AC acoplada a los receptores alfa₂-adrenérgicos por medio de la producción de AMPc.

Con la metodología disponible y la información obtenida en el estudio, se contará con las bases para realizar otros estudios en los que se correlacionen los parámetros aquí analizados con los datos clínicos y bioquímicos de sujetos con padecimientos en los que el sistema adrenérgico se encuentre involucrado, por ejemplo en la hipertensión arterial.

MATERIAL Y METODOS

Materiales: [Metil- 3 H]-yohimbina con actividad específica de 70-90 Ci/mmol (New England Nuclear Co.), [3'-5'- 3 H]-monofosfato de adenosina con actividad específica de 33.5 Ci/mmol (New England Nuclear), filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C.

Los siguientes compuestos se adquirieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis MO.): 3-Isobutil-1-Metil-Xantina (IBMX), Adenina-5'-trifosfato (ATP), Guanosina-5'-trifosfato (GTP), Fosfo-enol-piruvato (PEP), Piruvato Cinasa (PK), Prostaglandina E₁ (PGE₁) y Epinefrina (E).

Equipo: Contador de centelleo líquido BETAZINT-5000/300, centrifuga refrigerada International mod. CRU-5000, espectrofotómetro AMINCO-BOWMAN mod. TMJ-8960.

Sujetos estudiados:

En el estudio intervinieron veinte sujetos sanos del sexo masculino con una edad de 19 ± 1 años ($\bar{X} \pm \text{Sx}$), los cuales luego de ser informados de la finalidad y de las características del estudio, aceptaron participar voluntariamente. Todos ellos fueron estudiantes de la carrera de medicina de la Escuela Médico Militar de la ciudad de México, por lo que la actividad cotidiana, así como la dieta general fueron muy similares entre cada uno de los participantes.

Protocolo de estudio:

Durante los quince días previos al estudio ninguno de los participantes ingirió medicamento alguno. El día del estudio a las 6:00 AM y después de permanecer en reposo durante al menos 8 hrs se colectaron muestras de sangre a través de un cateter

colocado en la vena antecubital de uno de los brazos, el cateter se mantuvo permeable con una solución salina heparinizada y se colectaron 120 ml. de sangre para realizar las siguientes determinaciones:

- a) Catecolaminas en plasma.
- b) Número y afinidad de los receptores alfa₂-adrenérgicos en las plaquetas.
- c) Actividad de la enzima adenilciclasa en las membranas de las plaquetas.

Cada uno de los sujetos estudiados colectó la orina de las 24 hs previas a la obtención de las muestras de sangre con la finalidad de llevar a cabo las siguientes determinaciones:

- a) Cuantificación de la creatinina urinaria.
- b) Medición de la excreción de sodio y de potasio.
- c) Cuantificación de las CA en la orina.

2.1 CATECOLAMINAS EN PLASMA

La determinación de las CA en el plasma se realizó de acuerdo al método descrito por Valori y col.(71), con algunas modificaciones. Se colectaron 20 ml de sangre en un tubo a 4°C con 100 U.I. de heparina y 100 ul de metabisulfito de sodio al 0.52 M, la muestra se centrifugó a 400 X g durante 30 min. a 4°C

en una centrifuga refrigerada. El plasma se almacenó a -20°C hasta su análisis.

A seis u ocho ml. de plasma se agregaron 200 μl . de metabisulfito de sodio 0.52 M y 5 ml de etilendinitrilotetraacetato de sodio (EDTA) 134 mM pH 8.3. La mezcla se diluyó con agua destilada hasta un volumen de 25 ml, se agregaron 0.5 g de óxido de aluminio neutro (alumina) el cual previamente fué lavado con HCl 2M, según el método descrito por Nai-Siang (72) se ajustó el pH a 8.4-8.5 con carbonato de sodio 0.5N, los tubos se agitaron durante 7 min y después de 5 min en reposo, la alumina se pasó a columnas de vidrio. Las CA adsorbidas en la alumina se eluyeron con 5 ml de una solución de ácido perclórico 0.0009N-ácido ascórbico 144 mM.-

Se prepararon columnas con 0.75g de resina de intercambio catiónico tipo IV de Merck, las cuales se ajustaron a pH 6 con carbonato de sodio 0.2N, luego las muestras se pasaron a través de ellas y se eluyeron de nuevo con 0.5 ml de ácido bórico 0.66N a pH de 7.0.

A los 0.5 ml del extracto se agregaron 50 μl de una solución de CuCl_2 2.2 mM y 50 μl de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 7.5 mM, tres min. después se agregaron 250 μl de una solución de beta-mercaptoetanol 4.1 mM, formaldehído 0.25 M, NaOH 410 N y por último se adicionaron 150 μl de ácido acético glacial. Diez min después se midió la fluorescencia desarrollada por cada muestra en un espectrofluorómetro a 410 nm de excitación y a 510 nm de emisión.

Paralelamente a las muestras se hizo la oxidación de una curva estandar de NE en HCl 0.1 N. Las concentraciones de la curva incluyeron valores de 0.2 a 10 ng/dl.

La determinación de ácido vainillil-mandélico se llevó a cabo en una alícuota de orina acidificada a pH 1. En un tubo cónico se colocó 1 ml de HCl al 37%, 10 ml de la orina

acidificada y 750 mg de silicato de magnesio, enseguida los tubos se agitaron durante 10 s. cada minuto. durante 10 minutos, se centrifugaron a 400 X g durante 5 min y el sobrenadante se pasó a través de un papel filtro Whatman No.1.

Se tomaron 2 ml del filtrado a los cuales se añadieron 20 ml de acetato de etilo, se agitó durante 30 s y se centrifugó a 400 X g durante 3 min. La fase acuosa (parte inferior) se desechó y se agregaron 2.5 ml de carbonato de sodio 2.44%, se agitó y se centrifugó en la misma forma que en la etapa anterior. 2 ml de la fase acuosa (carbonato de sodio) se colocaron en tubos cónicos limpios y se añadieron 100 ul de una solución de nitrito de sodio 5% y paranitroanilina 2% (1:9) y 6 ml de acetato de etilo, se agitó durante 20 s y se centrifugó a 400 X g durante 1-2 min. La fase acuosa se desechó y al sobrenadante se agregó 1 ml de una solución de hidróxido de sodio 16.7%, se agitó durante 20 s y se centrifugó de nuevo a 400 X g durante 1-2 min desechándose enseguida la fase acuosa. Finalmente a la fase orgánica se añadieron 2 ml de metanol, se mezcló suavemente y 5 min después se hizo la lectura de la absorbancia a 530 nm en un espectrofotómetro. En cada ensayo se procesaron un blanco de agua bidestilada y una curva patrón de AVM con concentraciones de 0.5-14 mg/ml. Los valores normales en una orina de 24 hs con ésta metodología son de 0.5-12.5 mg/24 hs.

2.2 CATECOLAMINAS EN ORINA

Se midió el volumen de la orina colectada durante las 24 hs por cada sujeto y una alícuota de 100 ml se acidificó a pH 1 con HCl 128 mM. LA E y la NE se midieron por el método descrito por

Sourkes y Mutphy (73) y la D por el método descrito por Atack y col. (74).

A una alícuota de 10 ml. de orina acidificada se agregó 1 ml de ácido ascórbico 5.6 mM, 2.5 ml de EDTA 264 mM, 0,75 g de alumina y una gota de fenoftaleina 314 mM. Enseguida se ajustó el pH de la muestra a 8.0-8.2 con NaOH 5 N y se agitó durante 10 min. El sobrenadante se desechó y la alumina se lavó con 20 ml de agua bidestilada. Las CA adsorbidas en la alumina se eluyeron agitando la muestra con 5 ml. de ácido acético 0.5 N.

La oxidación de la E se llevó a cabo en un medio con tampón de glicina pH 3 y la de NE en un medio con tampón de acetato pH 6, añadiendo a los tubos respectivos 0.5 ml de iodo 0.009 N, 0.5 ml de tiosulfato de sodio 0.01 N y 1.0 ml de una solución de ác. ascórbico en NaOH 5N (2mg/ml).

El desarrollo de fluorescencia en la NE y E se realizó en 45 y 60 min respectivamente y se cuantificó en un espectrofluorómetro a 405 nm de excitación y 505 de emisión.

Para cuantificar la D, el extracto obtenido se dividió en dos alícuotas, la muestra y el blanco interno para cada muestra, se ajustaron a pH 6.0 con una solución amortiguadora de acetato de sodio. Los reactivos para la oxidación se agregaron a cada tubo a intervalos de tres min en el siguiente orden:

REACTIVO	DOPAMINA MUESTRA (ml)	BLANCO INTERNO (ml)
Iodo 0.009 N	0.5	0.5
Sulfato de sodio	0.5	-
Ac. ascórbico/ sulfato de sodio	-	0.5
Ac. ascórbico/HCl 5N	-	1.0

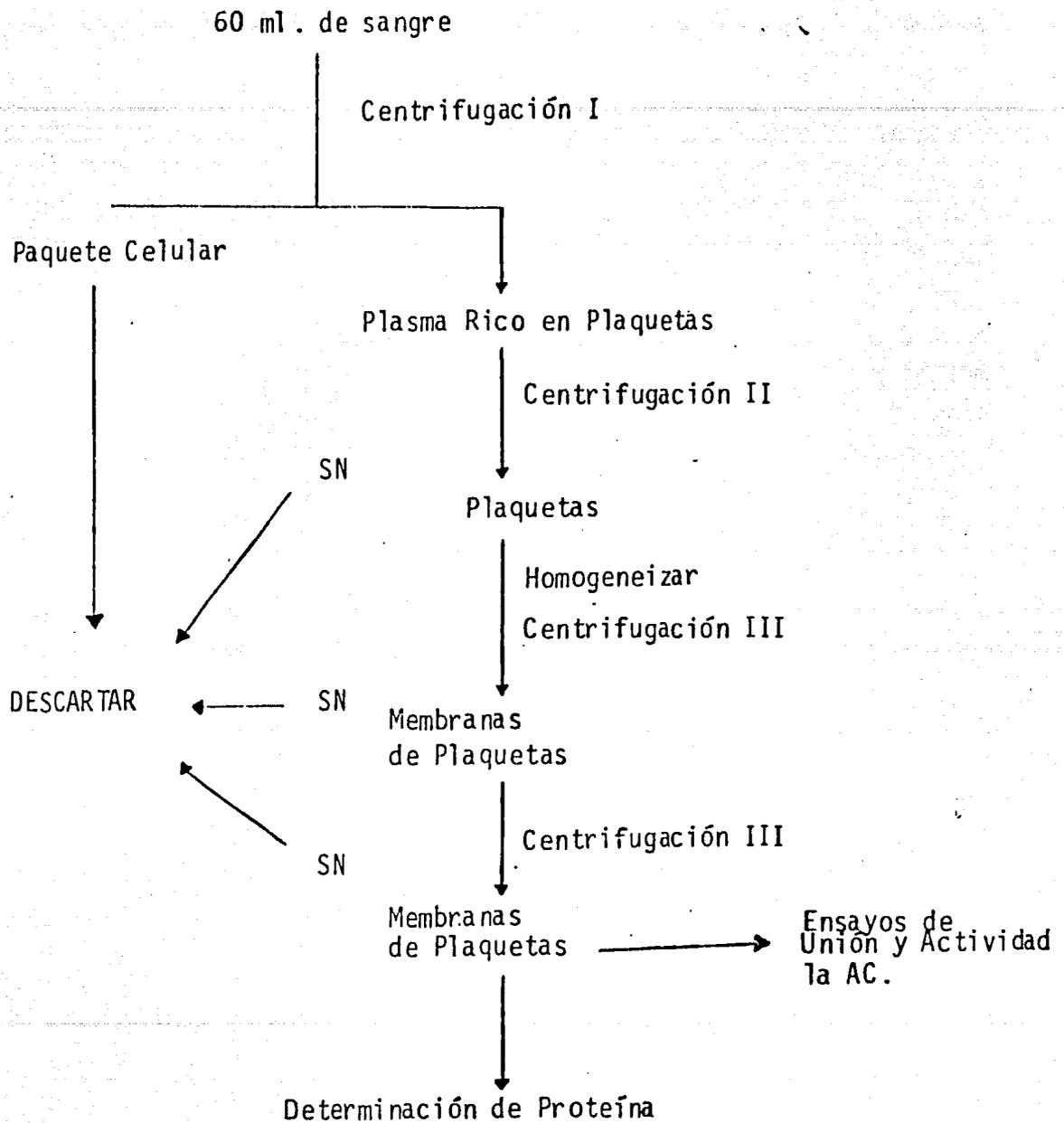
La máxima fluorescencia de la D se desarrolló en 45 min. y se cuantificó en el espectrofotómetro a 330 nm de excitación y 375 nm de emisión. La D blanco se leyó 30 min después de agregar los reactivos.

2.3 CALCULOS

Para calcular la cantidad de CA excretadas en 24 hs. se procesó una curva patrón de cada una de las aminos, en la que se interpolaron las lecturas de la fluorescencia de cada muestra. Esta curva estandar consistió en adicionar a 10 ml. de orina de una muestra de valores conocidos, diferentes cantidades de las tres CA. Los resultados se corrigieron por el porcentaje de recuperación obtenido en la extracción y por el volumen de orina de 24 hs.

2.4 PREPARACION DE LAS MEMBRANAS DE PLAQUETAS

Se colectaron 60 ml de sangre en tubos de vidrio previamente siliconizados conteniendo 2 ml de citrato de sodio 128 mM por cada 18 ml de sangre. La obtención y preparación de las membranas



CENTRIFUGACION I: 140 x g. durante 15 min. a 4⁰c.

CENTRIFUGACION II: 1500 x g. durante 15 min. a 4⁰c.

HOMOGEINIZACION : EN TRIS 5mM - EDTA 5mM pH 7.5 con potter de vidrio-Teflón a 4⁰c.

CENTRIFUGACION III: 3000 x g. durante 15 min. a 4⁰c.

de plaquetas se realizó como se muestra en el esquema de la siguiente página.

Las membranas se resuspendieron en tris 50mM-MgCl₂ 10 mM pH 7.5 hasta obtener una concentración de 200 mg de proteína por cada ml. La determinación de la proteína se realizó por el método de Lowry y col. (75), usando para la curva patrón albumina sérica bovina fracción V.

2.5 ENSAYO DE UNIÓN DEL RADIOLIGANDO A LOS RECEPTORES DE LAS MEMBRANAS

Principio del método:

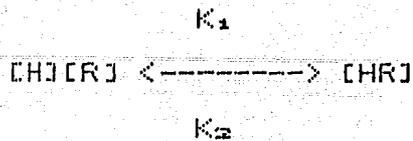
El ensayo isotérmico de saturación, se realiza incubando varias concentraciones del radioligando con una cantidad constante de una preparación de células o de membranas plasmáticas, para posteriormente determinar la unión del radioligando en el equilibrio. Para definir la unión no específica, se incubó la misma preparación en presencia de un compuesto con alta afinidad por los receptores, pero en concentraciones mucho mayores a las del radioligando (63).

Dos parámetros importantes se pueden estimar con este tipo de experimentos: la constante de disociación al equilibrio (K_d) y el número de sitios de unión ($B_{máx.}$). Como medida de la afinidad del radioligando por el receptor, la K_d se puede definir como la concentración de radioligando necesaria para ocupar el 50% de los receptores. La $B_{máx.}$ es una medida del número de receptores y se expresa como la cantidad de radioligando por célula o por mg de proteína.

Ensayo de saturación

Las membranas de las plaquetas (200 mg de proteína), se incubaron con diferentes concentraciones de [³H]-Yohimbina (0.9-17 nM) en un volumen final de 500 ul en un medio compuesto de tris 50 mM-MgCl₂ 10mM pH 7.5 durante 25 min a 37°C, en estas condiciones el radioligando se incorpora a los receptores aproximándose a un valor máximo (E_{máx}), que representa el número de receptores en el tejido. Al final de la incubación el radioligando unido y el libre se separaron mediante una rápida filtración de la mezcla de incubación diluida con 5 ml. de tris-MgCl₂ pH 7.5 frío, a través de filtros de fibra de vidrio.

Ya que la disociación de la [³H]-Yohimbina unida a los receptores es lenta, comparada con el tiempo requerido para la dilución y la filtración (menos de 10 segundos.), éste procedimiento permite medir con buena precisión la cantidad de radioligando unido a la proteína (76). Inmediatamente después de la filtración, los filtros se lavaron con 15 ml de tris-MgCl₂ pH 7.5 se secaron y la radiactividad se contó en líquido de centelleo. La cantidad de radiactividad en el filtro es la suma del radioligando unido a los receptores alfa₂-adrenérgicos, a otros componentes de la membrana que pudieron no haberse filtrado y al mismo filtro, razón por la cual se le llama unión total (UT). La unión no específica (UI) se determinó incubando las membranas de las plaquetas y el radioligando en presencia de fentolamina a una concentración de 10⁻⁶M, la unión específica (UE) se calculó restando la UI de la UT. El protocolo que se siguió con cada sujeto estudiado para llevar a cabo el ensayo de saturación se presenta a continuación. Todos los reactivos se prepararon en tris-MgCl₂ pH 7.5 a 4°C y se añadieron según el orden indicado en el protocolo.



En esta ecuación [H] es la concentración de ligando libre, [HR] la de el ligando unido y [R] es el número de receptores. K_1 es la constante de velocidad de asociación para formar el complejo hormona-receptor y K_2 es la constante de velocidad del proceso inverso. El equilibrio de la interacción se logra cuando ambas velocidades son iguales obteniéndose la constante de disociación en el equilibrio:

$$\frac{\text{[H] [R]}}{\text{[HR]}} = \frac{K_2}{K_1} = K_d$$

ó

$$K_d = \frac{\text{[H] \cdot [R]}}{\text{[HR]}}$$

entonces

$$\text{UE/L} = \frac{B_{\text{máx}}}{K_d} - \frac{1}{K} \times \text{[UE]}$$

Grificando la UE/L en función de la UE se obtiene una línea recta con pendiente negativa que indica la presencia de una sola clase de receptores, el inverso negativo de la pendiente (-1/m)

es una estimación de la K_d y el intercepto con las abscisas es la estimación de la $E_{máx}$, fig. 5b.

Aunque la naturaleza físico-química de la interacción de las hormonas con sus receptores es semejante al de una enzima con su substrato, el mecanismo no está del todo dilucidado, sin embargo la aplicación de los principios termodinámicos que rigen la interacción de las enzimas y su substrato han permitido el desarrollo de análisis matemáticos para estudiar tales interacciones, llegando a la conclusión de que la k_d y la $E_{máx}$ son términos análogos a la K_m y a la $V_{máx}$ usados en la caracterización de la cinética enzimática fig 5.

2.6 ACTIVIDAD DE LA ENZIMA ADENILCICLASA EN MEMBRANAS DE FLAQUETAS

Principio del método

La medición del AMPc se realizó de acuerdo al método descrito por Gilman (78), el cual se basa en la competencia del AMPc frío y del marcado radiactivamente ($[^3H]$ -AMPc), por los sitios de unión de una proteína cinasa dependiente de AMPc, la cual se obtiene de suprarrenales de bovino. Este método es sensible hasta el orden de los picogramos como lo demuestran estudios previos (79).

Determinación de la actividad de la adenilciclasa:

La actividad de la enzima AC en las membranas de las plaquetas está regulada principalmente por dos mecanismos, uno estimulatorio y otro inhibitorio de la actividad de la AC. En las plaquetas la estimulación de la enzima se lleva a cabo por receptores como los de PGE_1 y la inhibición a través de los receptores alfa₂-adrenérgicos (66). El ensayo para determinar la actividad

Figura 5a

CURVA ISOTERMICA
DE SATURACION

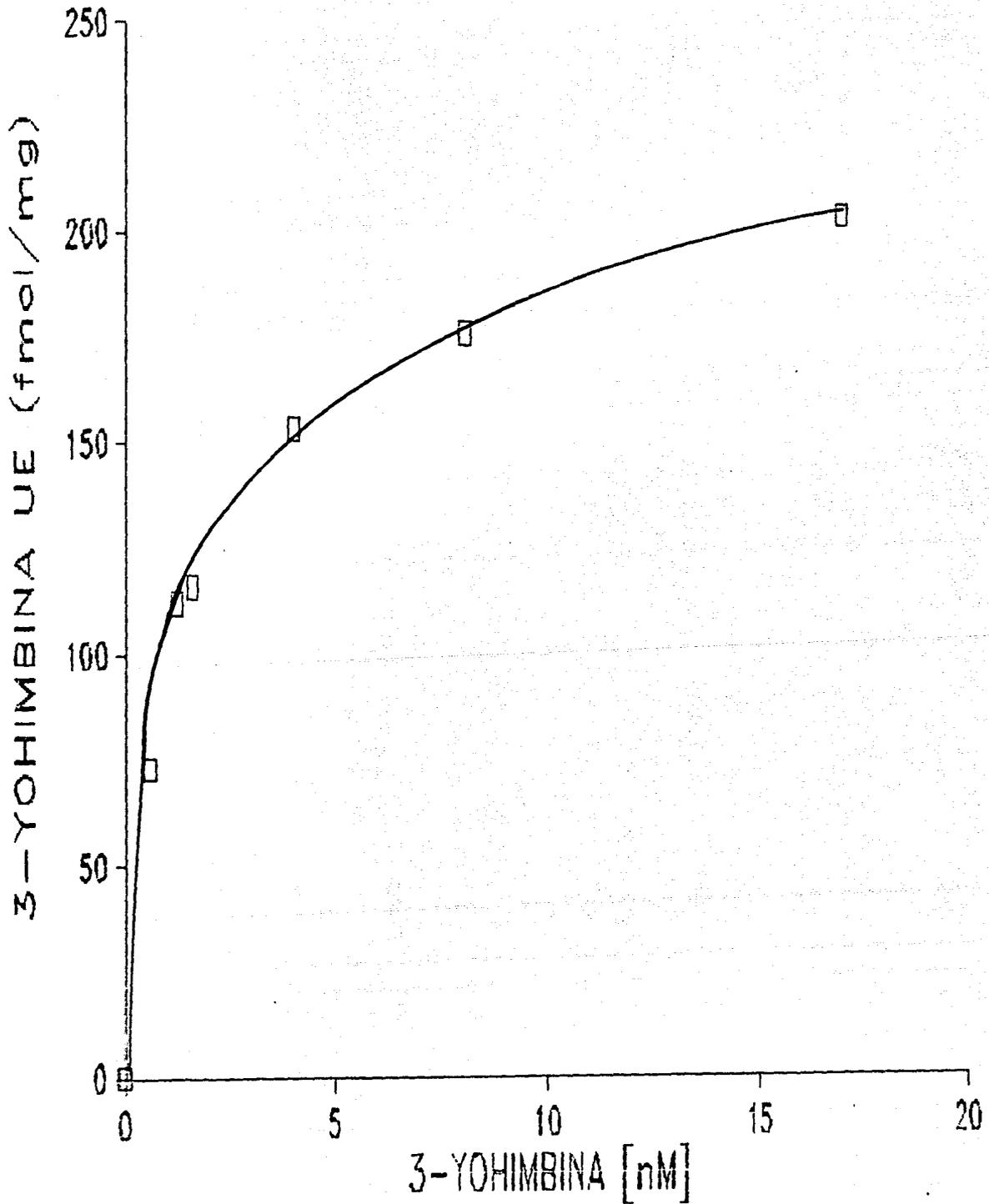
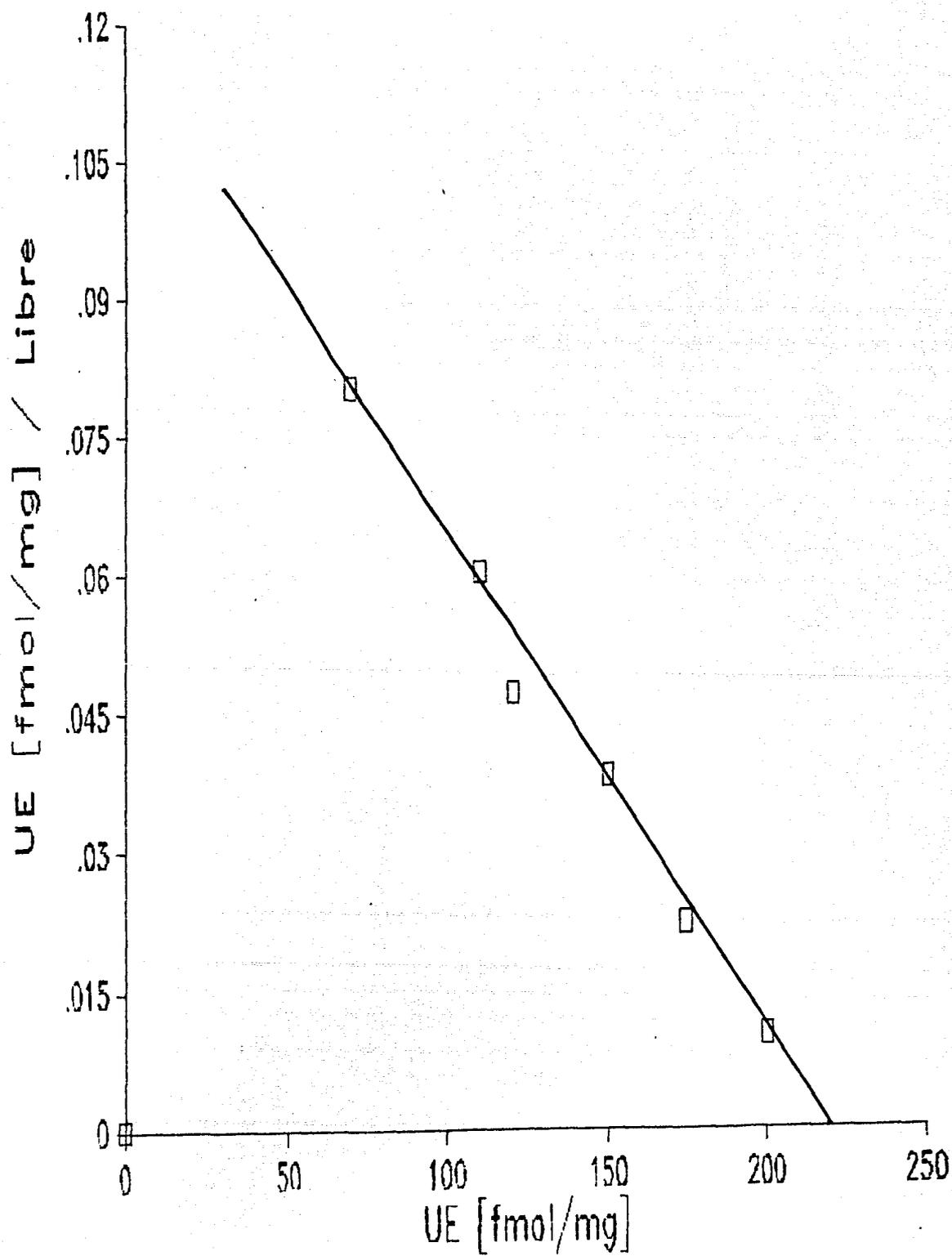


Figura 5b

ANALISIS DE SCATCHARD



de la AC midiendo la producción de AMPc se realizó en un medio constituido por tris 50 mM-MgCl₂ 15 mM pH 7.5, EGTA 1mM, IBMX 1mM y NaCl 160 mM. A cada tubo también se le agregaron 40 ul un sistema regenerador fomado de: ATP 1.5 mM, GTP 10 mM, FEP 290mM y Piruvato Cinasa, para un volumen total de 110 ul. La reacción se inició con la adición de la preparación de las membranas de plaquetas (20 ug de proteína por 40 ul) y de acuerdo al siguiente protocolo:

GENERACION DE AMPc EN MEMBRANAS DE PLAQUETAS

	Sistema					
	Tris-MgCl ₂ (ul)	regenerador (ul)	E (ul)	PGE ₁ (ul)	NaF (ul)	Prot. (ul)
Basal	20	50	-	-	-	40
E (10 ⁻⁷ -10 ⁻⁴ M)	10	50	10	-	-	40
PGE ₁ (10 ⁻⁷ -10 ⁻⁴ M)	10	50	-	10	-	40
PGE ₁ +E (10 ⁻⁷ -10 ⁻⁴ M)	10	50	10	-	-	40
NaF (10 ⁻⁵ M)	10	50	-	-	10	40

La generación del AMPc se llevó a cabo durante 10 min a 37°C, al final de la incubación los tubos se colocaron en un recipiente con agua en ebullición durante tres min y posteriormente se pasaron a un baño a 4°C, una vez frios se centrifugaron a 3500 X g durante 15 min a 4°C, para luego separar dos alicuotas de 20 ul del sobrenadante en las que cuantificó el AMPc generado.

El protocolo para ésta determinación se presenta enseguida:

PROTOCOLO PARA LA DETERMINACION DEL AMPc GENERADO POR LAS
MEMBRANAS DE PLAQUETAS

	Tampón de fosfatos ul	Estandar ul	Muestra ul	[³ H]AMPc ul	P.K. activado ul	Carbón ul
Total	520	-	-	10	10	-
Blanco	520	-	-	10	10	-
"0" Est.	20	-	-	10	10	500
Estandar (0.5-10pmol)	-	20	-	10	10	500
Muestras	-	-	20	10	10	500

Todos los reactivos se agregaron en frío y en el orden que se sigue en el protocolo, la incubación se llevó a cabo durante 1 hr a 4°C. Al final de la incubación se añadieron 500 ul de una solución de carbón activado-albumina para separar el [³H]-AMPc unido a la P.K. del [³H]-AMPc libre. Los tubos se centrifugaron a 1500 x g durante 20 min, la fracción unida a la proteína permaneció en el sobrenadante, el cual se transfirió a viales para contar radiactividad. Cada estandar y cada muestra se ensayaron por duplicado.

Cálculo del AMPc generado.

Se obtuvo un promedio de las CPM de los duplicados y se le restaron las CPM del blanco, la relación x_0/x se calculó de la siguiente manera:

$$x_0/x = \frac{\text{CPM del "0" estandar.}}{\text{CPM de Est. ó Muestra.}}$$

En seguida se graficó la relación x_0/x vs. [pmol/tubo] de AMPc.

<u>DESCRIPCION</u>	<u>*CPM</u>	<u>x_0/x</u>	<u>pmol/tubo</u>
Estandar 1	10477	1	---
Estandar 2	8818	1.18	0.5
Estandar 3	7638	1.37	1.0
Estandar 4	5579	1.87	2.0
Estandar 5	4784	2.18	3.0
Estandar 6	3945	2.65	4.0
Estandar 7	3333	3.14	5.0
Muestra	4299	2.43	<u>3.5</u>

Interpolando en la curva patrón la relación x_0/x de cada una de las muestras se obtuvo la concentración de AMPc por tubo, Los resultados finales se expresaron como fmol/mg/min de incubación.

2.7 ANALISIS ESTADISTICO

La prueba estadística utilizada en este trabajo fué la de "t" de "student". Con esta prueba se compararon los promedios y las desviaciones estandar de grupos de datos para determinar si entre los diversos parámetros, las diferencias son estadísticamente significativas. En el caso de muestras iguales, la fórmula utilizada fué la siguiente:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{S_1^2 + S_2^2}{n}}}$$

Donde:

\bar{x}_1 = media de la muestra 1

\bar{x}_2 = media de la muestra 2

S_1^2 = varianza de la muestra 1

S_2^2 = varianza de la muestra 2

n = tamaño de la muestra.

El valor que se obtiene de la "t", junto con los grados de libertad se buscan en la tabla de distribución. La "p" obtenida representa la probabilidad de que las diferencias entre las muestras sean debidas al azar. Si el valor de "p" excede al de la tabla, entonces la diferencia es significativa.

RESULTADOS

La creatinina en la orina constituye uno de los principales productos de desecho del metabolismo de compuestos nitrogenados, su concentración en la orina de veinticuatro horas es similar en cada persona, sin embargo la cantidad de creatinina excretada depende de factores tales como el sexo, el peso, la dieta y la actividad física del sujeto, entre otras variables. Considerando el sexo y el peso de la persona, se puede obtener un índice de creatinina (I.C.) el cual se calcula de la siguiente manera:

$$\text{I. C.} = \frac{\text{mg de creatinina / día}}{\text{Kg de peso corporal}}$$

De ésta forma se ha establecido que para los varones el I.C. excretada es de 20-26. Es importante hacer notar, que éstas observaciones han hecho posible que mediante la determinación de la creatinina en la orina de veinticuatro horas el clínico detecte cuando un sujeto tiene algún problema renal o simplemente asegurarse de que la colección de la orina es efectivamente de un periodo de veinticuatro horas, dato importante si consideramos que en él se basan muchos de los cálculos para determinar los niveles de diferentes sustancias excretadas en la orina.

En el grupo de sujetos estudiados la excreción promedio de creatinina fué de 1.26±0.31 g/día. y el índice de creatinina de 19.0±4.4. Estos resultados se encuentran en el límite inferior del índice de creatinina esperado. En tres de los 20 participantes la excreción de creatinina fué menor de la esperada, razón por la que la orina se descartó de los análisis, posteriores (Tabla 2).

La excreción de los electrolitos Na^+ y K^+ tuvo un rango de 81.23 a 174.04 y de 14.5 a 65.8 mEq/24 hrs respectivamente y los valores promedio fueron de 127.9 ± 11.26 y 41.38 ± 3.28 mEq/24 hrs, tabla 9. No obstante el amplio rango en la excreción de los electrolitos, el valor promedio es aproximadamente igual al obtenido en otros trabajos con una dieta normosódica (120).

3.1 CATECOLAMINAS URINARIAS

La excreción de las CA ha sido considerada por algunos autores como un índice de la actividad simpática (61). Esta idea se basa en el hecho de que parte de las CA liberadas en la sinápsis, posiblemente menos del 10 %, pasa a la circulación contribuyendo así con los niveles de CA en el plasma y consecuentemente con los de la orina.

En este estudio los resultados de la determinación de las CA fueron: E de 10.4-26.3, NE de 29-98.3 y D de 128-431 ug/24 hrs. En la tabla 9 se muestra el promedio y el error estandar para cada una de las aminas.

Recientemente en pacientes con depresión, se observó que existe una alta correlación entre la NE urinaria y sus metabolitos primarios la normetanefrina, el ácido vainillilmandélico (AVM) y el metoxihidroxifenilglicol, ya que ésta correlación probablemente también se presenta en sujetos sanos, la medición de alguno de los tres metabolitos también puede considerarse como un índice de la actividad simpática. El resultado de las determinaciones del AVM en los sujetos estudiados tuvo un rango de 1.7-5.5 y un promedio de 3.55 mg/24 hrs. Estos resultados se presentan en la tabla 9.

TABLA 9

	Creatinina (g/24hrs.)	Na ⁺ (mEq/24 hrs.)	K ⁺	E (ug / 24 hrs.)	NE	D	AVM (mg/24hs)
\bar{x}	1.26	127.9	41.4	14.4	50	266.1	3.55
S \bar{x}	0.31	11.26	3.28	20.4	20.4	77.1	0.29
n	17	17	15	15	15	15	18

3.2 NIVELES PLASMATICOS DE CATECOLAMINAS

Los niveles de la CA en plasma pueden reflejar con buena precisión la actividad del SNS, únicamente cuando su análisis se realiza bajo ciertos criterios y dando la atención adecuada a numerosas variables que lo modulan, algunas de ellas son: la medicación, el consumo de alcohol, tabaco y café, la ingesta de sal, la edad, la hora del día en que se toman las muestras, la hospitalización de los sujetos para su estudio, el ejercicio etc. Por otra parte, para que las CA reflejen fielmente la actividad del SNS es necesario considerar también las tasas de liberación, de difusión, de captación, la inactivación y metabolismo de las CA, es decir, el equilibrio entre cada uno de estos eventos a la hora de llevar a cabo las determinaciones de las CA. Bajo las condiciones en que se realizó nuestro estudio, se encontró que las CA en el plasma variaron de 5 a 22 ng/dl, con un promedio de 13.5, tabla 10.

TABLA 10

	Na ⁺ (mEq / 24 hrs)	K ⁺	Catecolaminas en plasma. (ng / dl)
\bar{x}	149.25	3.99	13.5
S \bar{x}	4.07	1.5	1.5
n	18	18	18

En todos los sujetos analizados, los niveles de CA en plasma estuvieron dentro de los valores normales de nuestro laboratorio, los cuales van de 2 a 32 ng/100 ml.

Los resultados de sodio y de potasio en el plasma fueron de 149.25 y 3.99 mEq/l, valores que indican que la ingesta de estos electrolitos en la dieta fué normal (aproximadamente 150 mEq de sodio y 4 mEq de potasio).

Por otro lado, la presión arterial media (presión diastólica + 1/3 de la diferencia entre sistólica y diastólica) obtenida en posición de decúbito dorsal en los sujetos estudiados fué de 68 a 103 con un promedio de 77.7 mmHg y un S \bar{x} de 1.9. Una presión artereial media de 60 y 105 se considera en la clínica como indicador de presión arterial baja o alta respectivamente. Estos resultados demuestran que los sujetos estudiados tuvieron una presión arterial normal.

3.3 NUMERO Y AFINIDAD DE LOS RECEPTORES ALAFA₂-ADRENERGICOS

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio, se demostró que el radioligando [³H]-Yohimbina se une a los receptores de las plaquetas en forma saturable, reversible y específica, alcanzando el equilibrio rápidamente. Estas características concuerdan con los resultados obtenidos con anterioridad en el mismo modelo por otros autores (80,81).

En cada uno de los sujetos estudiados se realizó una curva de saturación con el radioligando [³H]-Yohimbina, para cuantificar en forma individual el número de receptores y la afinidad de los mismos por el radioligando.

El análisis de Scatchard fué lineal con una r de -0.90 a -0.99, lo cual indica que la unión del radioligando ocurre con solamente un tipo de receptores, los cuales se encuentran también en un solo estado de afinidad. La K_d se calculó a partir del inverso negativo de la pendiente y la B_{máx} haciendo una extrapolación de la regresión hasta encontrar el intercepto con las abscisas, fig. 6 y 7.

En éste estudio la K_d fué de 1.8 a 4.0 nM, el número de receptores fué de 221 a 427 fmol/mg de proteína. Los valores promedio de la B_{máx} y de la K_d para los 18 sujetos incluidos en el análisis se presentan en la tabla 11.

Figura 6

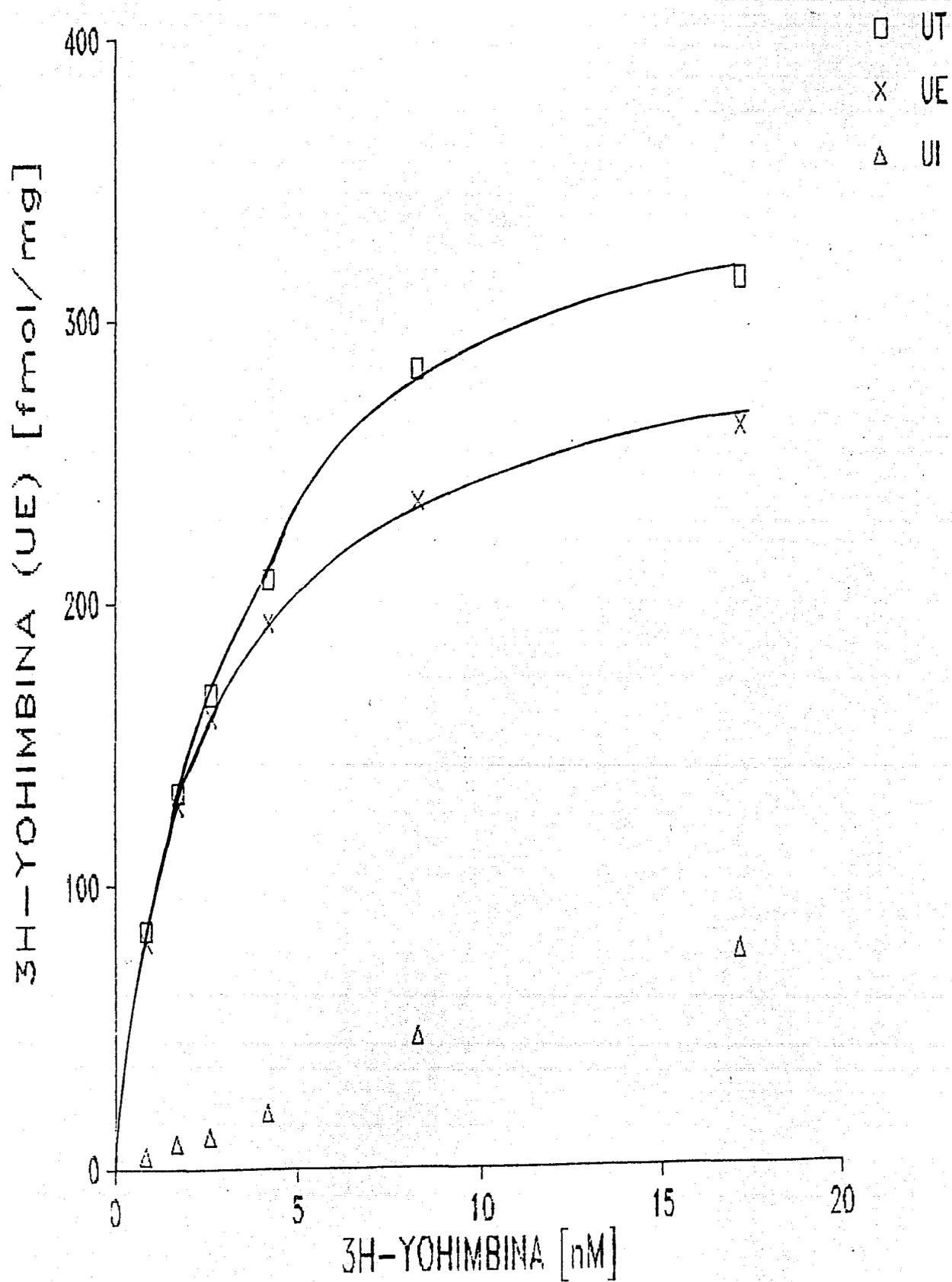


Fig. 7

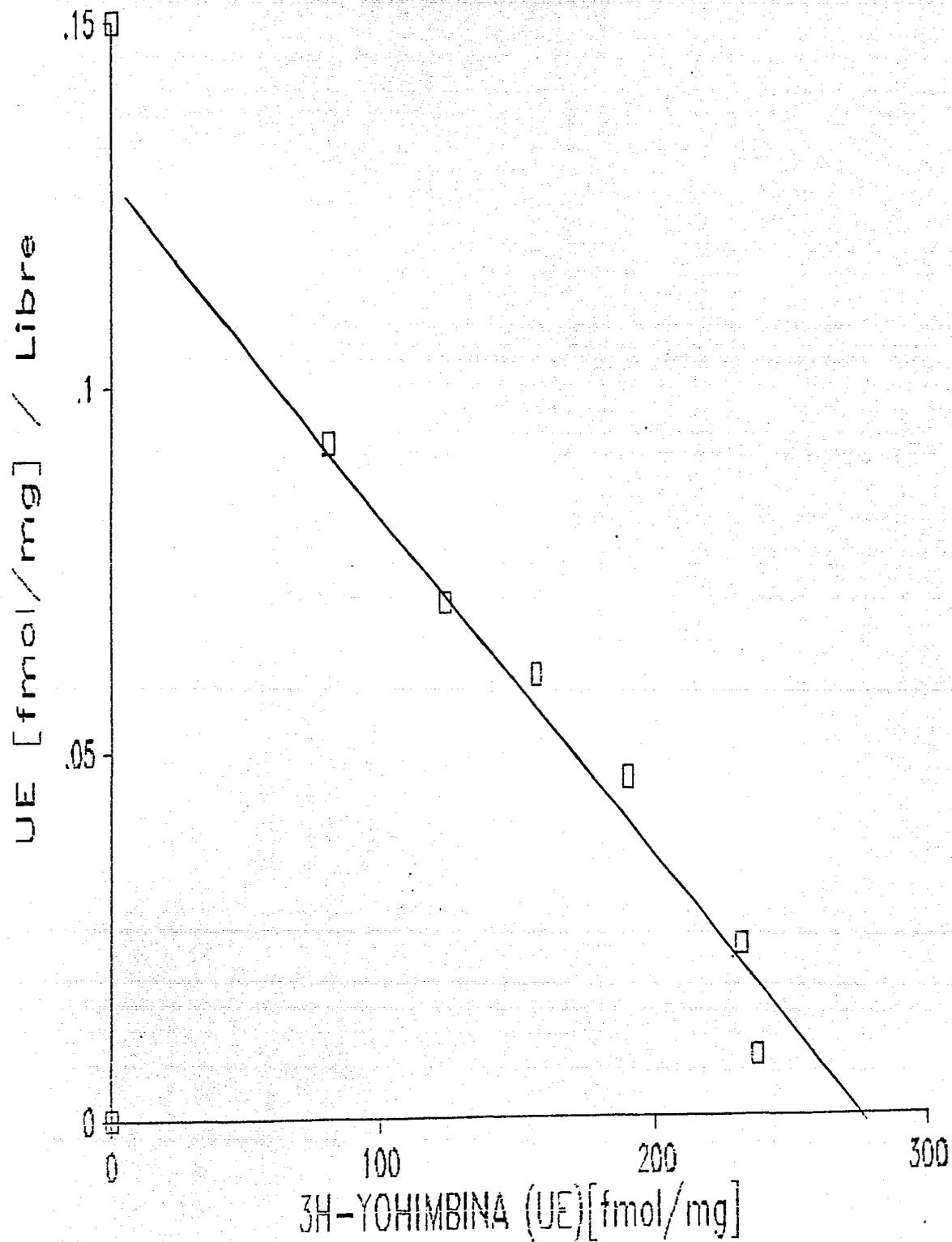


TABLA 11

Receptores alfa₂-adrenérgicos en membranas de plaquetas de sujetos sanos.

	<u>n</u>	<u>\bar{x}</u>	<u>Sx</u>	<u>Intervalo 95 %</u>
Bmáx.	18	278	17.11	200-320
Kd	18	2.6	0.12	2.0-3.7

3.4 ACTIVIDAD DE LA ADENILCICLASA

La actividad de ésta enzima se midió en preparaciones de membranas de plaquetas como la descrita para los ensayos de unión, mediante la cuantificación de AMPc en condiciones basales, en presencia de E y/o de PGE₁.

La actividad basal de la AC, es decir en ausencia de E y de PGE₁ fué de 8.85 ± 0.05 pmol/mg/min ($\bar{x} \pm Sx$). La incubación de las membranas con E, inhibió la actividad de la AC disminuyendo la producción de AMPc. Esta disminución fué dependiente de la dosis de E empleada (0.3-300 μ M) alcanzando significancia estadística con una $p < 0.05$, a partir de 3 μ M, fig. 8. La máxima inhibición en la actividad de la AC se logró con una dosis de 100 μ M, la producción de AMPc en éstas condiciones fué de 4.85 ± 0.61 pmol/mg/min, $p < 0.005$. En otra serie de ensayos se incubaron las membranas de las plaquetas con PGE₁ 10^{-5} M, la cual estimula la AC. El porcentaje de la inhibición de la actividad de la AC por E en presencia de PGE₁ fué menor que la inhibición de la actividad basal, 42 % vs. 25 % fig. 9.

Fig. 8

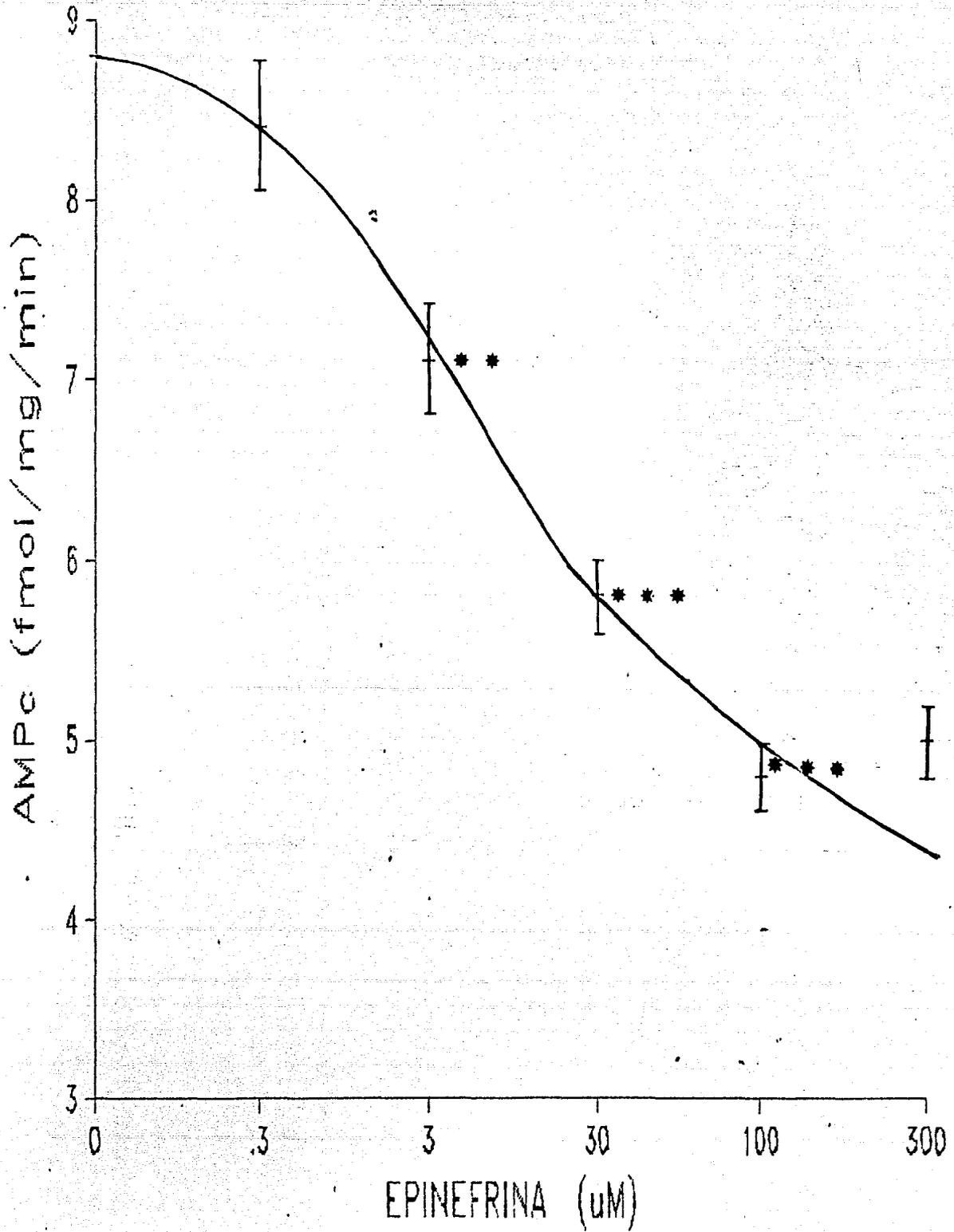
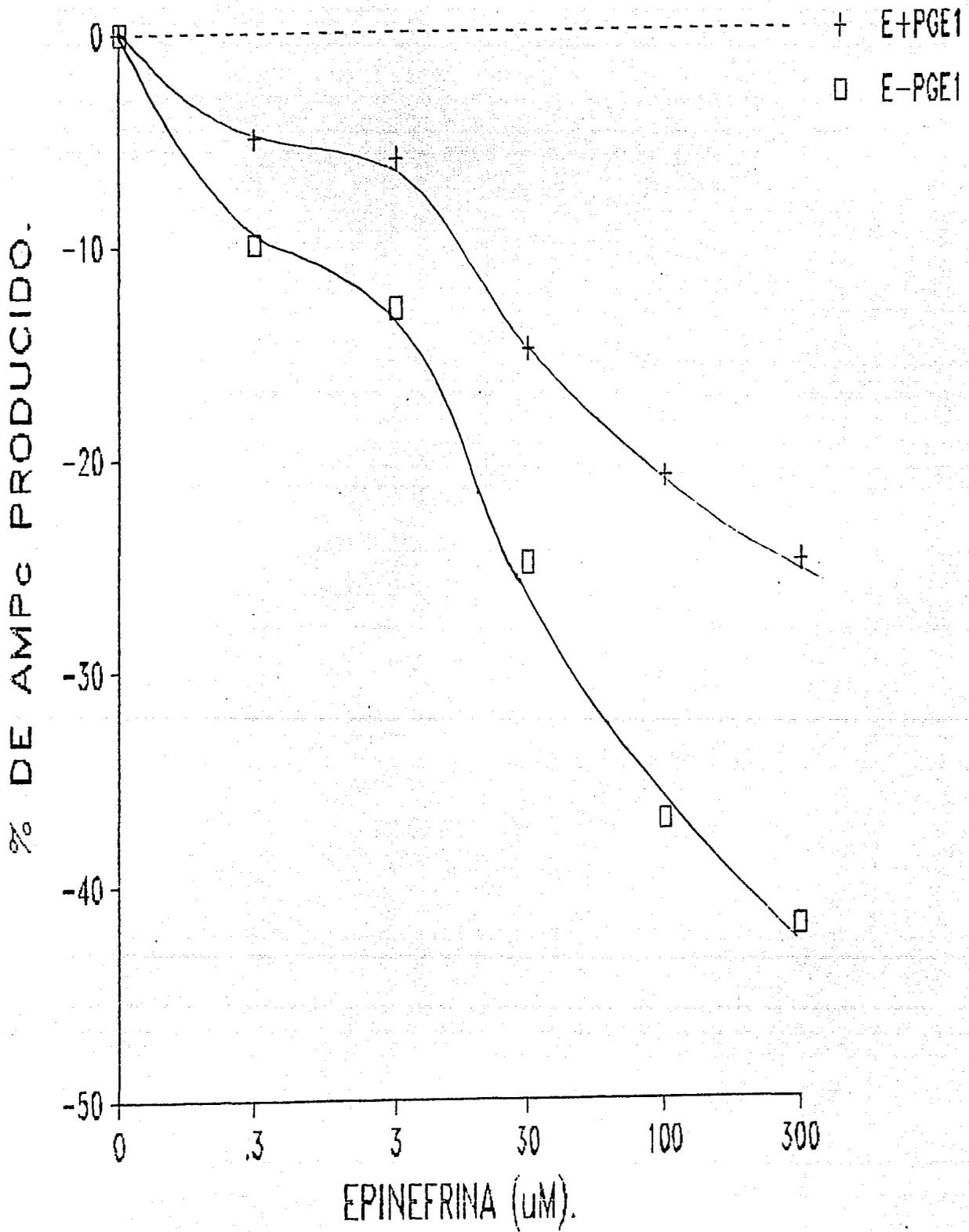


Figura 9

INHIBICION DE LA ADENILCICLASA



3.5 CORRELACION ENTRE LAS CATECOLAMINAS Y LOS RECEPTORES ALFA₂-ADRENERGICOS

Las respuestas fisiológicas de la células a una hormona o a un neurotransmisor, frecuentemente disminuyen durante una exposición prolongada al agonista, éste fenómeno ha sido denominado como tolerancia, taquifilaxis o desensibilización. El fenómeno comunmente se acompaña de una pérdida en la afinidad o en el número de receptores, fenómenos a los que se les conoce como desacoplamiento y regulación a la baja respectivamente. Con la finalidad de conocer la relación entre las CA y el número de receptores alfa₂-adrenérgicos en las membranas de las plaquetas de los sujetos estudiados, se realizó un estudio de correlación entre estos parámetros. Para la E y NE en la orina de 24 hrs, no se encontró una correlación estadísticamente significativa, la "r" para la E fué de 0.146 y para la NE de 0.086, figuras 10 y 11 respectivamente.

En el caso de las CA en plasma se obtuvo una correlación positiva y estadísticamente significativa, $p < 0.05$. Estos resultados se muestran en la fig.12.

Figura 10

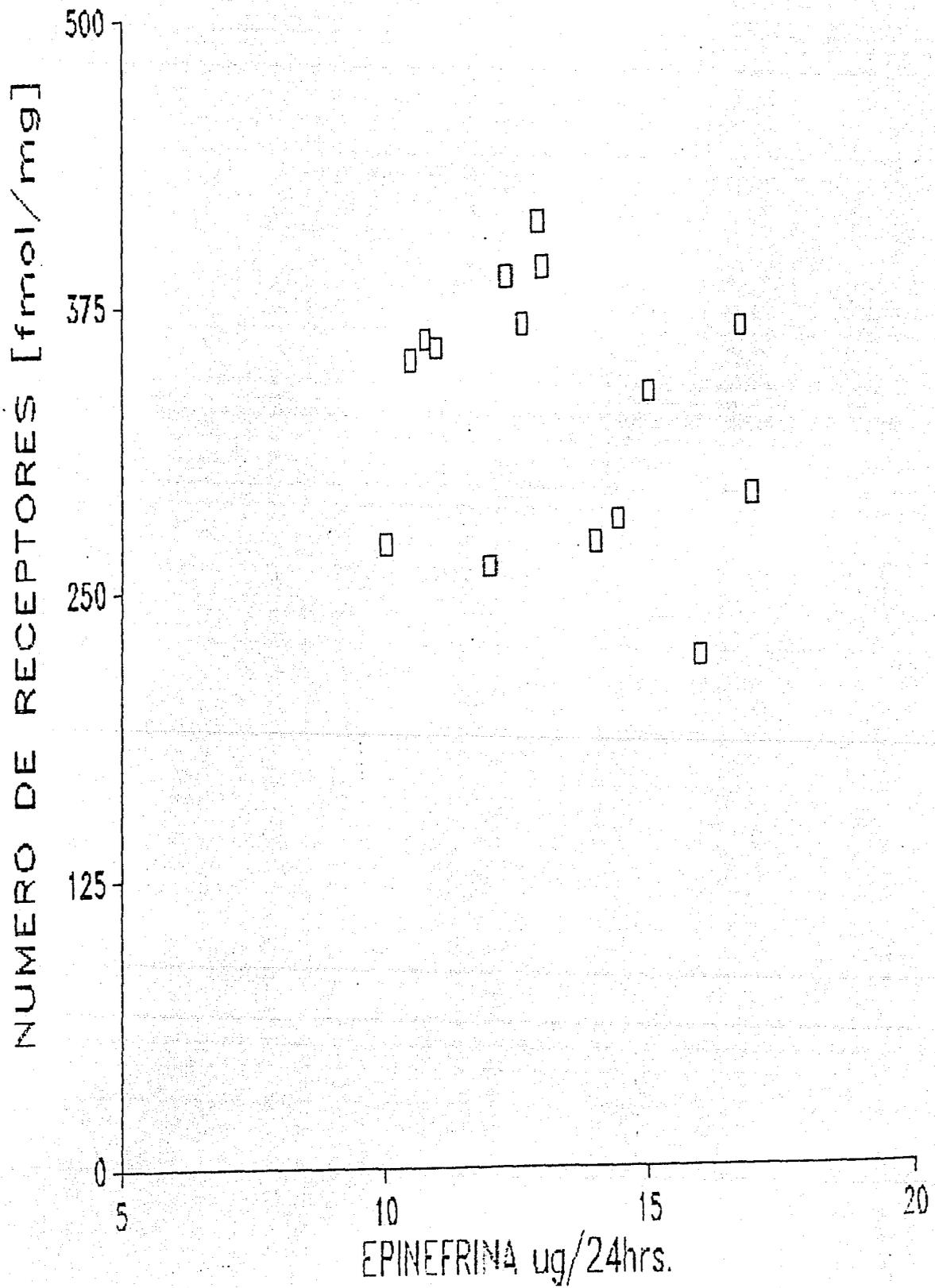
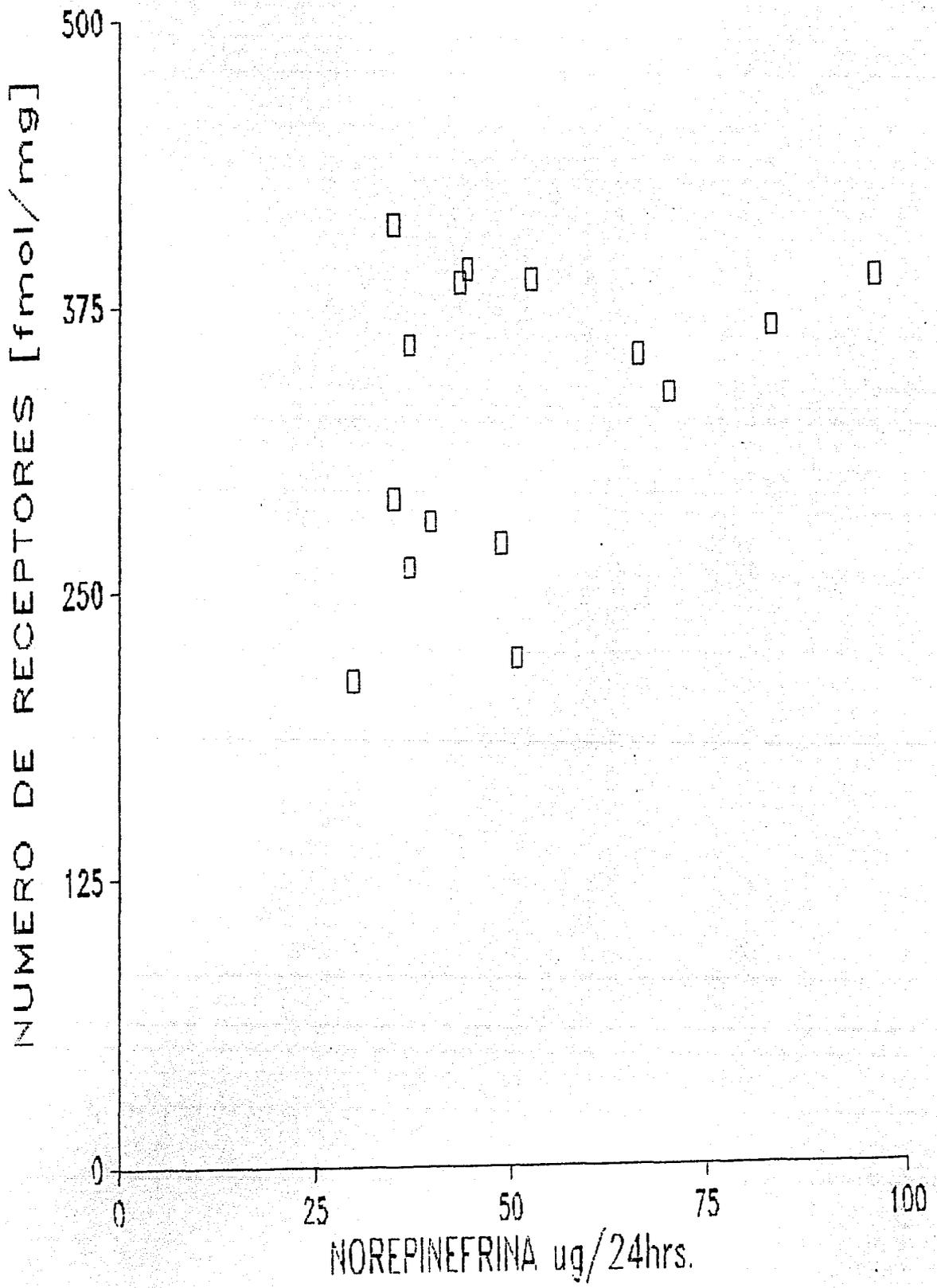


Figura 11



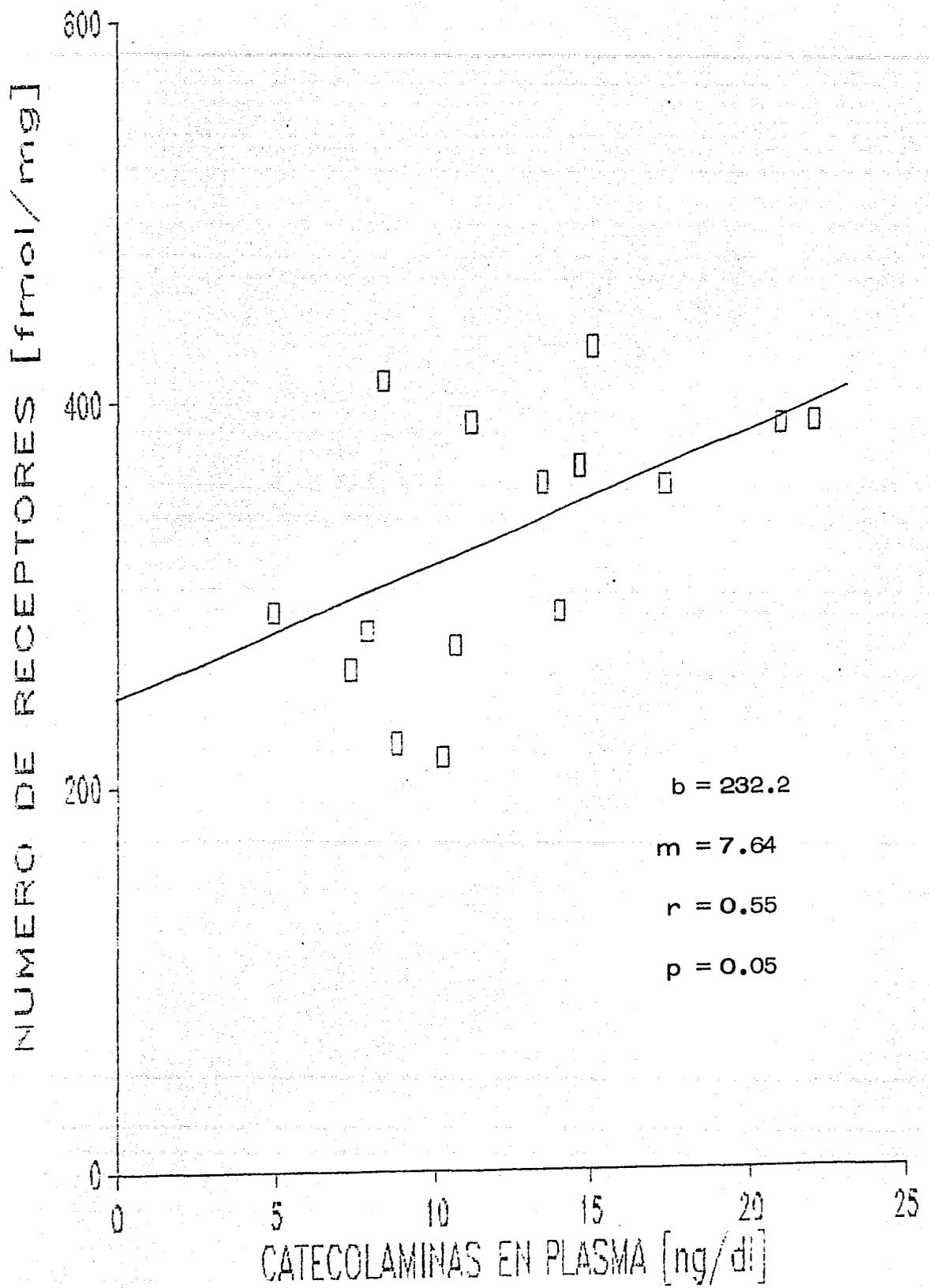


Fig. 12 Correlación entre CA plasmáticas y el número de receptores.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

El importante papel del SNS en la modulación de la presión arterial fué estudiado por Brown-sequard desde 1854 (83), al estimular una cadena de nervios simpáticos induciendo una vasoconstricción arterial, y por Claud Bernard en 1862 (84), al seccionar los nervios simpáticos del cuello, observando también una vasoconstricción.

En 1897 Abel y Crawford (85) propusieron a la E como el compuesto responsable tanto de la vasoconstricción como de la vasodilatación, 50 años después Von Euler (86) comprobó que la NE es el principal neurotransmisor del SNS.

En el hombre la evidencia más directa sobre la relación entre el SNS y las CA, la obtuvo Wallin y col (87,88) quienes demostraron una correlación significativa entre los niveles de CA y la actividad simpática, sugiriendo que un sobreflujo de NE de las terminaciones nerviosas puede contribuir con los niveles de CA en el plasma. Estos resultados apoyaron la hipótesis de que los niveles plasmáticos de CA, principalmente E y NE son un reflejo de la actividad simpática (89).

A su vez estos hallazgos fundamentaron la hipótesis en la que se postula que un incremento en la actividad adrenérgica puede participar en el desarrollo y/o mantenimiento de la hipertensión arterial.

En este sentido varios autores han realizado estudios en los que se comparan los niveles de CA entre grupos de sujetos con presión arterial normal y pacientes con hipertensión arterial, sin embargo existe controversia en los datos informados en la literatura, aproximadamente en un 80%, se reportan valores promedio más elevados en grupos de hipertensos que en los normotensos y de los cuales en solo un 40% de los casos se han encontrado diferencias estadísticamente significativas (90).

Recientemente Golstein (91), revisó los datos de 32 estudios publicados por diferentes investigadores, con la finalidad de determinar la causa de las discrepancias observadas. En los estudios positivos, es decir en los que se informan niveles más altos de CA en hipertensos, observó que:

a) En los estudios positivos la concentración de CA en el plasma de sujetos normotensos fué más baja que lo reportado en estudios negativos, observándose también menos variabilidad.

b) Los niveles de CA en los hipertensos fueron similares en los estudios positivos y los negativos, observándose también que los niveles de CA en normotensos jóvenes son más bajos que los de los hipertensos de la misma edad.

c) No hubo correlación entre la edad y los niveles de NE en el plasma de pacientes con hipertensión arterial.

El primer y segundo factor se pueden explicar por una selección, no adecuada del grupo control de normotensos, y el tercer factor puede ser el resultado de una preponderancia de pacientes hipertensos jóvenes, con niveles altos de NE en el plasma.

La literatura disponible adolece de una adecuada atención a variables como la edad, el sexo y la medicación, así como al número y la afinidad de los receptores alfa y beta adrenérgicos. Para poder hacer una generalización en cuanto a la relación del SNS y la presión arterial, es necesario conciderar la participación de factores como los mencionados previamente.

Con el desarrollo de los métodos de unión de radioligandos a los receptores en células intactas y en fracciones de membranas,

actualmente es posible la cuantificación de el número y afinidad de los receptores por diferentes ligandos. En estudios realizados en animales de laboratorio (81) empleando ésta metodología, se han sugerido alteraciones en los receptores para las CA, las cuales posiblemente estén relacionadas con el desarrollo o persistencia de enfermedades alérgicas como: asma, eczema y la fibrosis quística (113), en padecimientos psiquiátricos como la esquizofrenia y la depresión (114,115) así como en enfermedades del sistema cardiovascular como la hipotensión arterial (116), el infarto del miocardio (117) y la hipertensión arterial (118), en neoplasias como la trombocitopenia y la leucemia (119).

Dada la importancia de estudiar y conocer más ampliamente el papel que juegan los receptores adrenérgicos en la hipertensión arterial, varios investigadores han enfocado su atención a la exploración de las posibles alteraciones en los receptores adrenérgicos (92-95). Ya que en el humano por razones éticas, no es posible estudiar los receptores en órganos como el corazón, el pulmón, el riñón y los vasos sanguíneos, las células de la sangre han sido la opción, como fuente de tejido para llevar a cabo tales estudios. Tres características principales han hecho que éstas células sean utilizadas cada vez con mayor frecuencia:

- 1) Las plaquetas y los linfocitos del hombre se pueden obtener con relativa facilidad.

- 2) Cada entidad celular se puede aislar libre de otros componentes del tejido sanguíneo, lo cual permite estudiar las características de un solo tipo celular, éste tipo de preparación es difícil de obtener cuando se trabaja con un órgano humano.

3) Los receptores adrenérgicos de la células sanguíneas son un modelo experimental que en algunas especies animales han mostrado tener las mismas características que los receptores de órganos no accesibles.

Actualmente los leucocitos y las plaquetas, son las células del humano que se emplean como modelo en el estudio de los receptores adrenérgicos. Se ha demostrado que éstas células y en particular las plaquetas, tienen una gran similitud desde el punto de vista fisiológico, con tejidos como el SNS y el tejido cromafin de las glándulas suprarrenales. Algunas de éstas semejanzas son:

a) Las plaquetas captan iones hidrógeno contra un gradiente de concentración, por lo tanto el pH del interior de la plaqueta es ácido con respecto al del plasma.

b) Las plaquetas captan, almacenan y transportan activamente aminoácidos (97), carbohidratos (98), polipéptidos de bajo peso molecular (99) y otros compuestos orgánicos.

c) Sustancias como la serotonina (120), histamina (101), E, NE (102), y D (103) también son captadas, almacenadas y transportadas por las plaquetas.

d) El mecanismo de transporte de las aminas en la plaqueta se realiza contra un gradiente de concentración. Este proceso se lleva a cabo en dos etapas: 1) El acarreador que transporta las aminas a través de la membrana celular requiere de iones sodio, tal como lo sugieren en su modelo para las terminaciones nerviosas Bogdansky y Brodie (104) y también ha sido observado para la serotonina en las plaquetas por Flastcher (105). La absorción de aminas por los fosfolípidos de la membrana

plaquetaria es realizado en forma similar a lo encontrado para la NE y la 5-hidroxitriptamina en la médula adrenal (106).

2) Durante esta etapa la amina es captada por los gránulos subcelulares, en el caso de la 5-hidroxitriptamina se ha demostrado que se une en forma reversible con agregados de trifosfonucleótidos y cationes bivalentes como el Ca^{++} y Mg^{++} hasta alcanzar un estado de equilibrio. Es posible que la formación de agregados de alto peso molecular, sea un principio generalizado para almacenar aminas biogénicas, ya que existen evidencias de tales eventos para las CA y el ATP en los gránulos cromafines de la médula suprarrenal.

e) La velocidad inicial en la captación de aminas a través de la membrana, sigue una cinética de Michaelis-Menten (108).

f) La captación de éstas sustancias involucra un mecanismo acarreador de capacidad limitada dependiente de pH (108) y temperatura (109), el cual es afectado por diferentes inhibidores metabólicos (110). Es posible que una ATPasa dependiente de Na^+/K^+ esté involucrada en estos eventos (111).

g) La serotonina y la D son captadas por las plaquetas en cantidad y velocidad muy importantes, mientras que la histamina, E y NE son captadas a velocidades menores (106).

h) El tratamiento de las plaquetas con litio, aumenta la captación de monoaminas, tal como ocurre en los sinaptosomas (112).

i) La captación de D, NE y serotonina, es disminuida o inhibida en las plaquetas por la ouabaina, la desipramina y la cocaína, el mismo efecto que éstas drogas tienen en las células cromafines.

fines y en las terminaciones nerviosas (106).

Estas semejanzas con el tejido cromafín y las terminaciones nerviosas, son la base en la que se apoya el uso de las plaquetas como modelo en el estudio de los receptores alfa₂-adrenérgicos.

Considerando que es muy probable que las discrepancias observadas en los informes de la literatura, en relación a la participación del SNS en el desarrollo o persistencia de algunas patologías se deba a diferencias importantes en las características de los grupos estudiados, en el presente trabajo se tuvo particular cuidado en la selección de los sujetos a estudiar, de tal manera que factores tales como la edad (93), el peso, el sexo (122), las condiciones del muestreo, el estado físico, el stress asociado con la hospitalización (91) y la dieta (121) no participaran como fuentes de variación en los resultados.

En cada sujeto se analizaron simultáneamente varios parámetros indicadores de la actividad del SNS; la excreción de CA y sus niveles en plasma, el número y la afinidad de los receptores alfa₂-adrenérgicos así como la actividad de la AC acoplada a estos receptores. Tanto los niveles de CA en el plasma como sus concentraciones en la orina de 24 hs, estuvieron dentro del rango normal de nuestro laboratorio, aunque los coeficientes de variación fueron de 37.9 % para las CA en plasma y de 12 % para las CA en la orina de 24 hs.

En los últimos años el interés en el estudio del SNS se ha enfocado sobre la regulación del número y la afinidad de los receptores adrenérgicos. En este trabajo éstos parámetros en los receptores de las plaquetas fueron de 278 fmol/mg y de 2.6 nM de B_{máx} y de K_d respectivamente, resultados muy similares a los informados para una población de sujetos sanos (80,81,92,95).

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

En 1984 Motulsky y col. (63) realizaron un análisis de los receptores adrenérgicos de células sanguíneas de sujetos sanos y encontraron que la variación tanto en la B_{\max} como en la K_d era de 40%, el análisis de nuestros datos muestra un C.V. de 20% en el número de receptores y de 14.6 % en la afinidad de éstos, lo cual refleja que la población estudiada bajo las condiciones antes señaladas es bastante homogénea.

Se ha sugerido (127) que los receptores α_2 -adrenérgicos de las plaquetas son regulados por las CA en forma similar a los receptores beta-adrenérgicos de los leucocitos (82). La sobre estimulación adrenérgica provoca que el número de receptores disminuya, probablemente debido a una primera etapa del proceso de desensibilización. A este fenómeno se le ha llamado regulación a la baja o "Down regulation".

En este estudio no se encontró correlación entre las CA en la orina y el número de receptores α_2 -adrenérgicos de las plaquetas, posiblemente debido a que los niveles de CA fueron normales en cada sujeto, no obstante la variación observada.

En la literatura se informa de una correlación negativa entre éstas dos variables, únicamente cuando existe un incremento o una disminución importante en los niveles de CA, tal como ocurre en pacientes con feocromocitoma (70,127). Los resultados obtenidos en el presente estudio concuerdan con los obtenidos por Motulsky (81) y por Boon (124) quienes tampoco encontraron una regulación a la baja al estudiar sujetos sanos y pacientes con hipertensión arterial, aun cuando los niveles de CA presentaron una variabilidad mayor a la observada en este estudio.

Con relación a las CA en el plasma y los receptores α_2 -adrenérgicos se encontró una correlación positiva con una $p < 0.05$, es posible que ésta relación indique una regulación fisiológica normal, mediante la cual el organismo mantiene una respuesta fisiológica adecuada cuando la CA varían dentro de los

límites normales, si los niveles de CA se incrementan o disminuyen anormalmente como ocurre en los casos de feocromocitoma o de pacientes con degeneración del SNS (síndrome de Shy-Drager), se observa un proceso de "protección" de los tejidos en el cual el número de receptores aumenta o disminuye, según el caso, manteniéndose así una respuesta adecuada a la estimulación adrenérgica.

Recientemente (92) se demostró que el número de receptores alfa₂-adrenérgicos en las plaquetas de sujetos sanos no se modifica después de una infusión aguda de E, sin embargo la actividad de la AC se encuentra disminuida significativamente. Estos resultados señalan, que los cambios en la función del receptor pueden ocurrir sin que necesariamente se observen cambios en el número de éstos.

Por lo tanto la medición del número de sitios de unión de las CA en forma aislada, no proporciona la información suficiente sobre el grado de actividad adrenérgica. En este sentido, se han encontrado alteraciones a nivel postreceptor en padecimientos endócrinos como el pseudohipoparatiroidismo (128,129), enfermedad que se caracteriza por una resistencia a la hormona paratiroidea y a otras hormonas cuyo segundo mensajero es el AMFc. También se ha observado que en ésta enfermedad existe una deficiencia en la actividad de la proteína Ns de hasta un 50 %.

La funcionalidad de los receptores adrenérgicos está regulada dinámicamente por el grado de estimulación alcanzado bajo determinadas circunstancias, en el hombre la administración de isoproterenol induce una disminución en la respuesta de la AC (130-132).

Para poder evaluar de manera integral la actividad del SNS y establecer su relación con las diferentes entidades patológicas en las que participa, es necesario que en trabajos posteriores se

consideren los factores que de alguna forma modifican la actividad simpática, entre ellos es necesario hacer énfasis en el sexo, la edad, el peso, el consumo de café, alcohol y cigarrillos en la medicación previa recibida por los sujetos a estudiar, el tiempo de reposo antes de la toma de las muestras, así como la actividad física y el stress psicológico asociado con la hospitalización, por mencionar algunos de los factores que se pueden controlar con relativa facilidad.

Un diseño en el que se controlen las variables propuestas, permitirá realizar experimentos en los que los resultados sean más consistentes y permitirá conocer y comprender ampliamente el papel del SNS y los sistemas con él relacionados en enfermedades como las ya mencionadas.

Por otra parte el análisis aislado de los diferentes componentes del sistema adrenérgico, con la finalidad de obtener información sobre la actividad del SNS, no es suficiente, por lo que es necesario realizar un análisis de cada uno de los componentes, de preferencia en el mismo sujeto, ya que de ésta manera la información que se obtenga permitirá establecer los mecanismos normales a través de los cuales se lleva a cabo la regulación de las respuestas fisiológicas controladas por los mensajeros químicos, sean estos hormonas o neurotransmisores.

En la medida en que los avances metodológicos lo permitan éstas observaciones podrán extenderse para estudiar aspectos como:

- 1) En qué medida las alteraciones de las respuestas de los tejidos a la estimulación hormonal y a los fármacos, se debe a una regulación de los receptores involucrados?

- 2) En qué forma se regula el número y afinidad de los receptores adrenérgicos en las entidades patológicas en las que están involucrados?

3) ¿Cuál es el significado fisiológico de la variación en el número y la afinidad de los receptores ?

4) ¿Cuál el significado de un estado de alta y de baja afinidad en los receptores adrenérgicos?

5) ¿Cuáles son las alteraciones en los componentes del sistema de transducción involucrados en el desarrollo o persistencia de una enfermedad?

6) ¿Cuál es el ciclo de vida de los receptores adrenérgicos?

7) En qué forma los iones como el Na^+ influyen en la unión de los agonistas a los receptores alfa₂-adrenérgicos?

Posiblemente uno de los usos prácticos más importantes de la unión de radioligandos a los receptores en el humano es su empleo como herramienta en el estudio de la farmacología clínica. Algunos agonistas y antagonistas adrenérgicos son utilizados extensivamente en la clínica, lo cual puede desencadenar los mecanismos de regulación del receptor. Comúnmente estos compuestos se usan sin una caracterización previa de sus receptores. La unión de radioligandos ofrece una alternativa que permitirá determinar las propiedades de los receptores antes de un tratamiento y predecir la dosis requerida por el paciente, también hará posible la observación de cambios en los receptores durante el tratamiento y quizá ayudará en la detección de los niveles plasmáticos de una droga.

El estudio de los receptores mediante la técnica descrita también se puede utilizar en la predicción de efectos benéficos ó nocivos de la interacción de las drogas con los receptores adrenérgicos, lo cual puede ayudar al clínico en la prescripción

del fármaco más adecuado.

En resumen éste estudio señala la importancia de los diferentes parámetros que se deben considerar en la evaluación del SNS en diferentes entidades patológicas y debido a que un solo parámetro de la actividad simpática no es suficiente para estudiar adecuadamente la relación entre éste y el sistema adrenérgico, proponemos la realización de un estudio integral en el que se analicen el aspecto hormonal, el molecular y el bioquímico de los mecanismos adrenérgicos que intervienen en la modulación del SNS, tanto en condiciones normales como en los padecimientos en los que éste sistema se encuentre involucrado.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Parkes, A.S. and Buce, H.M., (1961) Olfactory stimuli in mamalian reproduction. *Science* 134: pag. 1049.
- 2.- Lentz, T.L., (1965) Hydra: Induction of supernumerary heads by isolated neurosecretory granules. *Science* 150: pag. 633.
- 3.- Landsberg L. Young. J.B.; (1985) Catecholamines and adrenal medula in: Wilson JD. and Foster D.W. eds. *Williams Textbook of Endocrinology* 7a. Ed. W.B. Sanders Co. pag. 891.
- 4.- Smith, A.D. and Winkler H, (1976) Fundamental Mechanisms in the release of catecholamines. *Neuroscience* 1: pag. 65.
- 5.- Tull, L. and Howards, B.D. (1978). Role of Mg^{+2} - ATPase and pH gradient in the storage of catecholamines in synaptic vesicles. *Biochem.* 17: pag. 2517.
- 6.- Dowglas, W.W. (1968). Stimulus-Secretion Coupling: The concept and clues from chromatin and other cells. *Br. J. Pharmacol.* 34: pag. 51.
- 7.- Axelrod, J., Kopin, I.J. (1969) The Uptake, storage, release and metabolism of noradrenaline in sympatetic nerves. *Prog. Brain. Res.* 31: pag. 21.
- 8.- Bevan, J.A. (1977). Some functional concecuences of variation in adrenergic sympatetic cleft with and in nerve density and distribution. *Fed. Proc. USA* 36: pag. 2439.

- 9.- Lake, C.R., Chernow, B. Feverstein, G., Goldstein, S.D. and Ziegler, M.G. (1984), The sympathetic nervous system in man: its evaluation and the measurement of plasma NE. In: Ziegler, M.G. and Lake, C.R. Eds. Norepinephrine, Cap. 1 pag. 1.
- 10.- Wong, K.P. (1976). Species differences in the conjugation of 4-hydroxy-3-methoxyphenylethanol with glucuronic acid and sulfuric acid. *Biochem. J.* 158: pag. 33.
- 11.- Kuchel, O. and Thanh, N (1984). Conjugation of norepinephrine and other catecholamines. In: Ziegler, M.G. and Lake, C.R. Eds. Norepinephrine Cap. 17 pag. 250.
- 12.- Buu, N.T. , Kuchel, O. (1977). A new method for the hydrolysis of conjugated catecholamines. *J. Labs. Clin. Med.* 90: pag 680.
- 13.- Goodal, M.C. and Alton, H. (1972). Metabolism of 3-4-dihydro-phenylalamina (L-dopa) in human subjects. *Biochem. Pharmacol.* 21: pag. 2401.
- 14.- Turner, C.D. and Bagnara, J.T. (1976). *General Endocrinology.* 6a. Eds. Edit W.B. Saunders Co. New York USA. pag. 13.
- 15.- Dale, H.H. (1906). Some physiological Action of Ergot. *J. Physiol. (Lond).* 34: pag. 163.
- 16.- Clark, A.J. (1926). The reaction between acetylcholine and muscle cells. *J. Physiol. (London).* 61: pag. 531.

- 17.- Ahlquist, R.P. (1948). Study of adrenotropic receptors. Am. J. Physiol. 153: pag. 586.
- 18.- Langer, S.Z. (1974). Presynaptic regulation of catecholamine release. Biochem. Pharmacol. 23: pag. 1793.
- 19.- Berthelsen, S. and Pettinger, W.A. (1977). A functional basis for classification of adrenergic receptors. Life Sci. 21: pag. 595.
- 20.- Grahlin, K. and Spaff, B. (1978) Differences in postsynaptic alfa-adrenoreceptor populations between isolated cat uretra and various other tissues. Acta Pharmacol.Toxicol. 43: supl. II; pag. 48.
- 21.- Javerning, R.A., Moulds, R.F.W., Shaw, J. (1978). The action of prazosin in human vascular preparations. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 231: pag. 81.
- 22.- Harper, B., Hughes, I.E., Scott, J. (1979) Possible differences in alfa-adrenoreceptors in rat, guinea pig and rabbit spleen. J. Pharmacol. 31: pag. 105.
- 23.- Bentley, S.M., Drew, G.M., Whiting, S.B. (1977). Evidence for two distinct types of postsynaptic alfa-adrenoreceptors. Brith. J. Pharmacol. 61: pag. 116.
- 24.- Docherty, J.R., Mac Donald, A., MacGreth, J.C. (1979). Further subclassification of alfa-adrenoreceptors in the cardiovascular system, vas deferens and anococcygenus of the rat. Brith. J. Pharmacol. 67: pag. 421.

- 25.- Kobinger, W. and Pichler, L. (1980). Investigation into different types of post and presynaptic alfa-adrenoreceptors at cardiovascular sites in rats. Eur. J. Pharmacol. 65: pag. 393.
- 26.- Timmermans, P.B.W.M. and Van Zwieten, P.A. (1980). Postsynaptic alfa₁ and alfa₂-adrenoreceptors in the circulatory system of the pithed rat: Selective stimulation of the alfa₂ type by BHT 933. Eur. J. Pharmacol. 63: pag.199.
- 27.- Starke, K. and Langer, R.Z. (1981). A note on terminology for presynaptic receptors. In: Presynaptic Receptors. Adv. in Bioscience 18: 1-3 Oxford Pergamon Press.
- 28.- Labger, S.Z. and Hicks, P.E. (1984). Alfa-adrenergic receptors subtypes: Pharmacological and therapeutic implications. In: Adrenergic Receptors: molecular properties and therapeutic implications. Lefkowitz RJ and Lindenlaub. Editors. F.K. Schattaver Verlag. New York. pag. 519.
- 29.- Cryer, P.E. (1981). Diseases of the adrenal medulle and sympathetic nervous system. In: Endocrinology and Metabolism. Felig, P., Baxter, J.D., Broadus, A.E. and Frohman L.A. Edits. McGraw Hill, New York USA. pag. 511.
- 30.- Exton, H.J. (1982). Molecular mechanism involved in alfa-adrenergic responses. Trends. Pharmacol. Sci. 3: pag. 111.

- 31.- Sutherland, E.W., Robinson, G.A. and Butcher, R.W. (1968).
Some aspects of the biological role of adenosine 3',5'
-monophosphate (cyclic AMP). Circulation. 37: pag. 279.
- 32.- Thomas, A.P., Martin-Requero, A., Williamson, J.R.(1985). Inte-
ractions between insulin and α_1 -adrenergic agents in the
regulation of glycogen metabolism in isolated hepatocytes. J.
Biol. Chem. 260: pag. 5963.
- 33.- Timmermans, P.B.M.W.M. and Van Zwieten, P.A. (1981).
The postsynaptic α_2 -adrenoreceptors. Mini-review.
Auton. Pharmacol. 1: pag. 171.
- 34.- Grant, J.A. and Scrutton, M.C. (1979). Nobel α_2 -adrenore-
ceptors primarily responsible for inducing human platelet
aggregation. Nature. 277: pag. 659.
- 35.- Vargattig, B.B., Chignara, M. and Benveniste, J. (1981).
Present concepts on the mechanism of platelet aggregation
Biochem. Pharmacol. 30: pag. 263.
- 36.- Siees, W. Reinhard, L. Roth P. and Weber, P.C. (1982)
Plasma catecholamines, platelet aggregation and associated
thromboxane formation after physical exercise, smoking or
norepinephrine infusion. Circulation 66: pag. 44.
- 37.- Lands, A.M., Arnold, A., McAuliff, J.P., Luduena, F.P. and
Brown, T.C. (1967). Diferentiation of receptor system
activated by sympatomimetic amines. Nature. 214: pag. 597.

- 38.- Karl E.A. (1980). Adrenoreceptors classification, activation and blockade by drugs. Postgrad. Med. J. 56: pag. 7.
- 39.- Steer, L.M. (1977). Adrenergic receptors. J. Clin. Endocrinol. Metab. 6: pag. 577.
- 40.- Blashko, H., Smith A.D. (eds.), 1975. Handbook of Physiology. Washington, D.C., American Physiological Society, sec 7, vol. VI, part II pag. 283.
- 43.- Harms, H.H., De Vente, J. and Zagsma J. (1982). beta-adrenoreceptor binding agents and lipolysis. Brit. J. Clin. Pharmacol. 13: pag. 1815.
- 44.- McDonald, I.A., Bennett, T. and Fellows, I.W. (1985). Catecholamines and the control of metabolism in man. Clin. Sci. 68: pag. 613.
- 45.- Sutherland, E.W. and Rall, T.W. (1960). The relation of adenosine 3'-5'-phosphate and phosphorilase to the actions of catecholamines and other hormones. Pharmacol. Rev. 12: pag. 265.
- 46.- Corroll, R.J.M., Frier, B.M., Davison, N. AND Frech, E.B. (1981). Hormonal; end substrate responses durin recovery from hipoglycemia in man during beta₁-selective and non selective beta adrenergic blockade. Eur. J. Clin. Invest. 11: pag. 279.
- 47.- Jenne, J.W., Chick, T.N., Strikland, R.D. (1977). Subsensitivity of beta responses during therapy with a long-acting beta₂ reparation. J. Aler. Clin. Immunol. 59: pag. 393.

- 48.- Landberg, L. (1977) Catecholamines. Clin. Endocrinol. Metab. pag. 523.
- 49.- Stark, K., Tube, H.D., Borowski, E. (1977). Presynaptic receptor systems in catecholaminergic transmission. Biochem. Pharmacol. 26: pag. 259.
- 50.- Axelrod, J. and Weinshilboun, R. (1972). Catecholamines. N Engl. J. Med. 287: pag. 237.
- 51.- Fain, J.N. and Garcia-Sáins, J.A. (1980). Role of P.I. turnover in α_1 and adenylyate cyclase inhibition in α_2 affects of catecholamines. Life Sci. 26: pag. 1183.
- 52.- Rodbell, M. (1980). The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. Nature 284: pag. 17.
- 53.- Bokoch, G.M., Katada, M. Northup, J.K., Heweltt, E.L. and Gilman, A.G. (1983). Identification of the predominant substrate for ADP-ribosylation by islet-activating protein. J. Biol. Chem. 258: pag. 2072.
- 54.- Hildebrandt, J.D., Sekura, R.D., Colina, J., Iyengar, R., Manclarck, C.R. and Birnbaumer, L. (1983). Stimulation and inhibition of adenylyl cyclases mediated by distinct regulatory proteins. Nature 302: pag. 706.

- 55.- Smith, S.K. and Limbird, L.E. (1982). Evidence that human platelet alfa-adrenergic receptors coupled to inhibition of adenylate cyclase are not associated with the subunit of adenylate cyclase ADP-Ribosylated by cholera toxin. J. Biol. Chem. 257: pag. 10471.
- 56.- Colina, J., Hidelbrandt, J. Iyengar, R., Birnbaumer, L., Sekura, R.D. and Mancklark, C.R. (1983). Pertussis toxin substrate, the putative Ni component of adenylyl cyclases, is an alfa-beta heterodimer regulated by guanine nucleotide and magnesium. Proc. Natl. Sci. USA 80: pag. 4276.
- 57.- Michel, T., Lefkowitz, R.J. (1982). Inhibition of adenylate cyclase. J. Biol. Chem. 257: 13557.
- 58.- Berridge, M.J. and Irvine, R.F. (1984). Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. Nature. 312: pag. 315.
- 59.- Puntney, J.W., Weiss, S.J., Van de Walle, C.M. and Haddas, R.A. (1980). Is phosphatidic acid a calcium ionophore under neurohumoral control?. Nature. 284: pag. 345.
- 60.- Michell, R.H. and Bone, E.A. (1984). Inositol lipid hidrolisis as a signal generator in synpathetic ganglia and in peripheral cells responding to catecholamines or vasopresin. In: Adrenergic receptors: Molecular properties and therapeutic implications. Symposium St. Paul-de-Venece, France. Lefkowitz RJ and Lindenlaub E. Edits. F.K. Schattauer Verlag, New York. pag. 399.

- 61.- Kafka, M.S., Lake, C.R., Gullner, H.G., Tallman, J.F., Bartter, F.C. and Fujita, T. (1979). Adrenergic receptors function is diferent in male and in female patients with essential hypertension. Clin. Exp. Hypertens. 1: pag. 613.
- 62.- Conolly, M.E., Greenacre, J.K. (1976). The lymphocyte beta-adreno-receptor in normal subjects and patients with brochial asthma. J. Clin. Invest. 58: pag. 1307.
- 63.- Motulsky, J.H., Insel, P.A. (1984). Radioligand binding to adrenergic receptors in human. In: Norepinephrine. Ziegler MG and Lake CR Edits. Cap.18 pag. 271.
- 64.- Motulsky, J.H. and Insel, P.A. (1982). Adrenergic receptors in man. New Engl. J. Med. 307: pag. 18.
- 65.- Yu, S.K. and Latour, J.G. (1977). Potentiation by alfa -adrenergic receptors and inhibition by beta-adrenergic stimulations of rat platelets aggregation. A comparatrive study with human and rat platelets. Thromb. Haemost. 37: pag. 413.
- 66.- Kaywin, P., McDonough M., Insel, P.A. and Shattil, S.J. (198). Platelet function in essential thrombocythemia. N. Engl. Med. 299: pag. 505.
- 67.- Galant, S.P., Duriseti, L., Underwood, S. and Allerd, S. (1980). beta-adrenergic receptors of polymorphonuclear particulates in bronchial asthma. J. Clin. Invest. 65: pag. 577.

- 68.- Bravo, E.L., Trazi, R.C., Gifford, R.W. and Steward B.H. (1979). circulating and urinary catecholamines in pheocromocytoma. Diagnostic and Pathophysiology implications. New Engl. J. Med. 301: pag. 682.
- 69.- Conolly, M.E. and Greenacre J.K. (1978). Desensitization of beta-adrenergic receptors of lymphocytes from normal subjects and patients with pheocromocytoma: Studies in vivo. Br. J. Clin Pharmacol. 5: pag. 191.
- 70.- Ratge, D. and Wisser, H. (1986). alfa and beta-adrenergic receptors activity in circulating blood cells of patients with pheocromocytoma: effects of adrenalectomy. Acta Endocrinol. 111: pag.80.
- 71.- Valori, C., Renzini, V. and Brunori, C.A. (1969). An improved procedure for separation of catecholamines from plasma. Ital. J. Bioch. 18: pag. 394.
- 72.- Nai-siang, J., Machacek, D., Wadel, P.O. (1976). Further study on the two column plasma catecholamines assay. Mayo Clin. Proc. 51: pag. 112.
- 73.- Sourkes, T.L., Murphy, G.F. (1962). Determination of catecholamines and catecholamin acids. In: Methods in medical research. Quastel JL Edits. Year Book Medical Publishers, Chicago USA pag. 147.

- 74.- Atack, C.V. (1973). The determination of dopamine by a modification of the dihydroxide fluorometric assay. *Br. J. Pharmacol.* 48: pag. 699.
- 75.- Lowry, O.H., Rusebrough, N.J., Farr, A.L. and Rondall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: pag. 265.
- 76.- Williams, L.T. and Lefkowitz, R.J. (1978). Receptor binding studies in adrenergic pharmacology. Eds. Raven Press New York, pag. 53.
- 77.- Scatchard, G. (1949). The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51: pag. 660.
- 78.- Gilman, A.G. (1970). A protein binding assay for adenosine 3'-5'-cyclic monophosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 67: pag. 305.
- 79.- Stig, N.H. (1982). Measurement of cyclic AMP in clinical investigation. *Acta Endocrinol.* 111: supl.(249) pag. 1.
- 80.- Motulsky, H.J., Shatill, S.J., Insel, P.A. (1980). Characterization of α_2 -adrenergic receptors on human platelets using [3 H]-Yohimbine. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 74: pag. 1562.
- 81.- Motulsky, H.J., O'connor, D.T., Insel, P.A. (1983). Platelet α_2 -adrenergic receptors in treated and untreated essential hypertension. *Clin. Sci.* 64: pag. 265.
- 82.- Fraser, J., Nadeau, J. Robertson, D. and Wood, A.J.J. (1981). Regulation of human leucocyte beta receptors by endogenous

catecholamines. Relationship of leukocyte beta-receptor density to the cardiac sensitivity to isoproterenol. *J. Clin. Invest.* 67: pag. 1777.

- 83.- Brown-Sequard, C.E. (1854). On the results of the section the galvanization (electrical stimulation) of the great sympathetic nerve at the neck. *Gazette Medicale de Paris.* pag. 1
- 84.- Bernard, C. (1862). Experimental research on the vascular and heart producing nerves of great sympathetic. *Extrait des Comptes Rendues des Seances de l'Academie des Sciences.* LV: pag. 1.
- 85.- Abel, J.J. and Crawford, A.C. (1897). On the blood pressure raising constituent of the suprarenal capsule. *Bull. Johns. Hopkins. Hops.* 8: pag. 151.
- 86.- Euler, U.S.V. (1948). Identification of the sympathomimetic argone in adrenergic nerve of cattle (sympathin N) with L-noradrenaline. *Acta. Physiol. Scand.* 16: pag. 63.
- 87.- Sundlof, G. and Wallin, G.B. (1977). The variability of muscle nerve sympathetic activity in restin recumbent man. *J. Physiol.* 272: pag. 383.
- 88.- Wallin, B.G., Sundlof, G., Eriksson, B.H., Dominiak, P., Grobecker, H., Lindbad, L.E. (1981). Plasma noradrenaline correlates to sympathetic muscle nerve actyvity in normotensive man. *Acta Physiol. Scand.* 111: pag. 69.
- 89.- Lake, C.R. (1979). Relationship of sympathetic nervous system tone and blood pressure. *Nephron.* 23: pag. 84.

- 90.- Lake, C.R., Chernow, B., Goldstein, D.S., Glass, D.G., Coleman, M. and Ziegler, M.G. (1984). Plasma catecholamine levels in normal subject and in patients with secondary hypertension. Fed. Proc. 43: pag. 52.
- 91.- Goldstein, D.S. (1981). Plasma norepinephrine in essential hypertension. 3: pag. 48.
- 92.- Jones, C.R., Giembycz, M., Hamilton, C.A., Rodger, I.W., Whyte, K., Deighton, N., Elliott, H.L. and Reid, J.L. (1984). Desensitization of platelet α_2 -adrenoreceptors after short term infusion of adrenoreceptor agonist in man. Clin. Sci. 70: pag. 147.
- 93.- Elliott H.L., Sumner, J.D., McLean, K., Rubin, C.F. and Reid, J.L. (1982). Effect of age on vascular α -adrenoreceptor responsiveness in man. Clin. Sci. 63: pag. 305s.
- 94.- Farel, Z., Iania, A., Eliahou, H., Cohen, Z. (1984). Receptor-cyclase couplin protein in eritrocytes of patients with essential hypertension. Clin. Sci. 67: pag. 111.
- 95.- Brodde, O-E., Anlauf, M., Graben, N., and Bock, K.D. (1982). Age-dependent decrease of α_2 -adrenergic receptor number in human platelets. Eur. J. Pharmacol. 81: pag. 345.
- 96.- Zieve, P.D., Solomon, H.M. (1966). The intracelular pH the human platelet. J. Clin. Invest. 45: pag. 1251.

- 97.- Zieve, P.D., Solomon, H.M. (1968). Uptake of aminoacids by human platelet. *Amer. Physiol.* 214: 58.
- 98.- Puszkin, E., Aledort, L. Puszkin, S. (1970). The labeling of decarboxilic aminoacids and their amides by acetate in human platelets. *J. Lab. Clin. Med.* 75: pag. 234.
- 99.- Boulin, D.J. (1974). Mechanism by wich human blood platelets acumulate glycine, GABA and aminoacids precursors of putative neurotransmitters. *Br. J. harmacol.* 45: pag. 83.
- 100.- Born, G.V.R. (1972). Relative activitiess and uptake in human blood platelets of 5-HT and several analogues. *Br. J. Pharmacol.* 44: pag. 117.
- 101.- Solanturri, E., Paasonen, M.K. (1966). Intracelular distribution of monoamin oxidase, 5-HT and histamin in blood platelets of rabbit. *Amer. Med. Exp. Fenn.* 44: pag. 427.
- 102.- Abrams, W.B., Solomon H.M., (1969). The human platelet as a model for the adrenergic neuron. The uptake and release of norepinephrine. *Clin. Pharmac. Ther.* 10: pag. 702.
- 103.- Boullin, D.J. (1970). Uptake of dopamine by platelets in vivo. *Br. J. Pharmacol.* 40: pag. 522.
- 104.- Bogdanski, D.F., Brodie, B.B. (1969). The effects of inorganic ions on the storage and uptake of 3A-norepinephrine by rat hart elices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 165: pag. 181.

- 105.- Platcher, A. (1967). Two sites of 5-hydroxytryptamine uptake in blood platelets. Life Sci. 6: pag. 273.
- 106.- Paasonen, M.D., Ather, L., Solanturri, E. (1971). Blood platelets as a model for monoaminergic neurons. Progr. Brain Res. 34: pag. 269.
- 107.- Pletscher, A. Prado, M.D. Bernies, K.M. Tranzer, J.P. (1971). New Storage of 5-hydroxytryptamine by blood platelets. Experientia 27: pag. 993.
- 108- Born, G.V.R. (1959). Studies on the uptake of 5-hydroxytryptamine by blood platelets. J. Physiol. 146: pag. 491.
- 109.- Stacey, R.S. (1961). Uptake of 5-hydroxytryptamine by platelets. Br. J. Pharmac. Chemother 16: pag. 284.
- 110.- Mustard, J.F. Packam, M.A. (1970). Factors influencing platelet action: adhesion, release and aggregation. Pharmacol. Rev. 22: pag. 97.
- 111.- Sneddon, J.M. (1969). Sodium dependent accumulation of HT by rat blood platelets. Br. J. Pharmacol. 37: pag. 680.
- 112.- Dra Prada, M. Pletscher, A. (1968). Intracellular distribution of platelet 5-hydroxytryptamine Life Sci. 8: pag. 65.
- 113.- Szentivay, A. Haim, O. Schultze, P.: Changes in adrenoceptor densities in membranes of lung tissue and lymphocytes from patients with atopic disease. Ann. N.Y. Acad. Sci. 332:

pag. 295.

- 114.- Kafka, M.S. Von Kammen, D.P. Bunney, W.E. (1979). Reduced cyclic AMP production in blood platelets from schizophrenic patients. Am. J. Psychiatry. 136: pag. 685.
- 115.- Garcia-Sevilla J.A. Hoffman. B.B. Li, S.Y., Lefkowitz, R.J., Fain, J.N. (1981). Role of alpha₁-adrenoreceptors in the turnover of phosphatidyl-inositol in the regulation of cyclic AMP accumulation in hamster adipocytes. Life Sci. 27: pag. 933.
- 116.- Ziegler, M.G., Lake, C.R., Kopin, I.J. (1977). The sympathetic nervous system defect in primary orthostatic hypotension. N. Engl. J. Med. 296: pag. 293.
- 117.- Anderson, K.E. (1986). Adrenergic mechanisms in congestive heart failure. Acta Med. Scand. 707: pag. 37.
- 118.- Lake, C.R., Ziegler, M.G., Coleman, M.D., Kopin, I.J. (1977). Age-adjusted plasma norepinephrine levels are similar in normotensive and hypertensive subjects. New Engl. J. Med. 296: pag. 208.
- 119.- Goldstein, D.S., Lake, C.R., Chernow, B., Ziegler, M.G., Coleman, M.D., Taylor, A.A., Mitchell, J.R., Kopin, I.J., Keiser, H.R. (1983). Age dependence of hypertensive-normotensive differences in plasma norepinephrine. Hypertension 5: pag. 100.

- 120.- Iimura, O., Kijima, T., Kikuschi, F., Akiyoshi, M., Toshiaki, A., Takashi, N., Yoshiichi, T. (1981) Studies on the hypotensive effect of high potassium intake in patients with essential hypertension 61: pag. 77s
- 121.- Nara, Y., Kihara, M., Nabika, T., Mano, M., Horie, R., Yamori, Y. (1984). Dietary effect on platelets aggregation in man with and without a family history of essential hypertension. 6: pag. 339.
- 122.- Mishra, N., Hamilton, C.A., Jones, C.R., Leslie, C. and Reid, J.L. (1985). Alfa-adrenoreceptor changes after oestrogen treatment in platelet and other tissues in female rabbits. 69: pag. 235.
- 123.- Kjarlier, J.S., Motulsky, H.J., and Insel P.A. (1981). Apparent "Down-regulation" of human platelets alfa₂-adrenergic receptor is due to retained agonist. Mol. Pharmacol. 21: pag. 36.
- 124.- Boon, N.A., Elliott, C.L., Davies, Fonway, J.V., Jones, D.G., Grahaam, S. and Sleight, P. (1983). Platelet alfa-adrenoreceptors in borderline and established essential hypertension. Clin. Sci. 65: 207.
- 125.- Lenox, R.H., Ellis, J., Van Riper, D. and Eherlich, Y.H. (1984). Alfa₂-adrenergic receptors-mediated regulation of adenylate cyclase in the intact human platelet. Mol. Pharmacol. 27: pag. 1.
- 126.- Limbird, L.E., Speck, J.L. and Smith, S.K. (1982). Sodium ion modulates agonist and antagonist interactions with the human.

platelet α_2 -adrenergic receptors in membranes and solubilized preparations. *Mol. Pharmacol.* 21: 609.

- 127.- Davies, I.B., Sudera, D. and Sever, P.S. (1981). Endogenous agonist regulation of α -adrenoreceptor in man. *Clin. Sci.* 61: 207s.
- 128.- Farfel, Z. Brickman, A.S., Kaslow, H.R., Brothers, V.M. and Boure, H.R. (1980). Defect of cyclase coupling protein in pseudohypoparathyroidism. *New Engl. J. Med.* 8: pag. 227.
- 129.- Farfel, Z., Brothers, V.M., Brickman, A.S., Conte, F., Neer, R. and Bourne, H.R. (1981). Pseudohypoparathyroidism inheritance of deficient receptor cyclase coupling activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: pag. 3098.
- 130.- Felman, R.D., Limbird, L.E., Nadeau, J.H., Fitzgerald, S.A. Robertson, D. and Wood, A.J.J. (1983). Dynamic regulation of leukocyte beta-adrenergic receptor-agonist interactions by physiological changes in circulating catecholamines. *J. Clin. Invest.* 72: pag. 164.
- 131.- Krall, J.F., Connelly, M. and Tuck, M.L. (1980). Acute regulation of beta adrenergic catecholamine sensitivity in human lymphocytes. *J. Pharmacol. Exper. Ther.* 214: pag. 554.
- 132.- Molinoff, P.B., and Aarons, R.D. (1983). Effects of drugs on the beta adrenergic receptors on human lymphocytes. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 5: pag. 563.