



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MEXICO

**UACP y P del CCH**

DESENSIBILIZACION HOMOLOGA DE LA RESPUESTA  
BETA ADRENERGICA EN HEPATOCITOS DE  
RATAS HIPOTIROIDEAS.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
LICENCIADO EN INVESTIGACION  
BIOMEDICA BASICA

**P R E S E N T A**

BERTHA PAULA MICHEL GONZALEZ

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **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.

Esta tesis fue realizada en el Instituto de Fisiología Celular bajo la Dirección del Dr. J. A. García Sáinz a quien agradezco profundamente su enseñanza, sus consejos, sus críticas y su apoyo durante la realización de este trabajo.

Este trabajo se realizó con financiamiento parcial de un donativo de la Fundación "Miguel Alemán".

## INDICE

I. INTRODUCCION.....	4
1.1. GENERALIDADES.....	4
1.1.a. Comunicación Intercelular.....	4
1.1.b. Receptores.....	7
1.1.c. Sistema Endócrino.....	9
1.2. ADRENALINA Y SUS RECEPTORES.....	11
1.2.a. Importancia Fisiológica de la Acción Simpática y Adrenal en el Organismo.....	11
1.2.b. Receptores Adrenérgicos y Transducción de las Señales Adrenérgicas.....	13
1.2.b.1. Clasificación Farmacológica de los Adrenor- receptores.....	13
1.2.b.2. Transducción de las Señales Adrenérgicas.....	17
1.2.c. Modulación de la Respuesta Adrenérgica.....	26
1.3. DESENSIBILIZACION.....	27
II. OBJETIVO.....	31
III. MATERIAL Y METODOS.....	32
IV. RESULTADOS.....	33
4.a. Caracterización de la Desensibilización.....	34
4.b. Consecuencias Metabólicas.....	34
4.c. Participación del AMPc en la Desensibilización.....	35
4.d. Participación de Ni en la Desensibilización.....	35
4.e. Reversibilidad de la Desensibilización.....	36
V. DISCUSION.....	37
VI. CONCLUSIONES.....	47
BIBLIOGRAFIA.....	48

## I. INTRODUCCION

### 1.1. GENERALIDADES

#### 1.1.a. Comunicación intercelular

Las células son unidades semiautónomas de los tejidos que pueden sobrevivir durante largos periodos en un medio de cultivo que mimetiza su entorno natural. El entorno intracelular es diferente del extracelular y sin embargo, entre ambos ocurre un continuo flujo e intercambio. Este intercambio tiene implicaciones evolutivas importantes ya que a partir de él, las células y los organismos uni y/o pluricelulares pueden efectuar respuestas adaptativas ajustándose adecuadamente a su entorno.

La evolución de los organismos pluricelulares ha dependido en gran medida de la habilidad que las células tienen para comunicarse entre sí. Se requiere de comunicación entre las células para regular su desarrollo y organización en tejidos, para controlar su crecimiento y división y para coordinar diversas actividades. Es entonces gracias a un variado y complejo sistema de comunicación intercelular finamente regulado que los organismos multicelulares pueden reaccionar a grandes cambios en su entorno, conservando un alto grado de homeostasis interna.

En los animales superiores, la capacidad de los tejidos especializados de funcionar de una manera integrada en un organismo se debe a dos sistemas de control, que son 1-) el sistema nervioso, el cual transmite señales electroquímicas bidireccionales entre el cerebro y los tejidos periféricos en circuitos reflejos, y 2-) el sistema endócrino, el cual libera mediadores químicos, u hormonas, dentro de la circulación para tener una acción alejada

de su sitio original de liberación. De hecho, no existen grandes diferencias entre ambos sistemas. El sistema nervioso libera agentes químicos que pueden actuar como mediadores locales u hormonas circulantes verdaderas, y varias hormonas también actúan como mediadores neurogénicos dentro del sistema nervioso central. Además, existe una unión íntima entre los sistemas nervioso y endócrino a nivel del hipotálamo y de la hipófisis, misma que sirve para integrar los dos sistemas dentro de una unidad de control funcional. Dadas las similitudes que existen entre ambos sistemas, la teoría neuroendócrina unifica tanto la evolución como el funcionamiento de los sistemas nervioso y endócrino, en donde las diferencias parecen esencialmente cuantitativas (2,3).

#### Formas de Comunicación

Las células de los animales superiores se comunican ya sea directa o indirectamente; nos referimos a la comunicación indirecta como comunicación a distancia (1).

**Comunicación directa:** este tipo de comunicación se lleva a cabo mediante moléculas de superficie en la membrana plasmática. Esto influye a otras células mediante un contacto físico. Este tipo de comunicación célula-célula es común entre las células del sistema inmune (presentación del antígeno, reconocimiento restringido al Complejo Mayor de Histocompatibilidad). Otro tipo de comunicación directa lo constituyen las uniones tipo nexos, que comunican directamente los citoplasmas de dos células adyacentes.

**Comunicación a distancia:** este tipo de comunicación ocurre mediante la secreción de mensajeros químicos que actúan a distan-

cia, sin requerir un contacto físico célula-célula. Por un lado, estos mensajeros químicos pueden tener un efecto local en la misma célula que lo sintetiza, o en células adyacentes (como ocurre para la regulación de la espermatogénesis por la testosterona, o para la regulación de la producción de glucagón por la insulina), constituyendo una forma de comunicación autócrina y parácrina, respectivamente. Por otro lado, las células endócrinas especializadas secretan hormonas al torrente sanguíneo e influyen en células blanco ampliamente distribuidas en el organismo. Y finalmente, las células nerviosas que forman uniones especializadas (sinapsis) con las células blanco y secretan mediadores químicos llamados neurotransmisores, y que sólo van a afectar a la célula blanco adyacente. En la fig.1 se ilustra de manera esquemática tres tipos de comunicación a distancia, que son el parácrino, el endócrino y el nervioso.

#### Mensajeros intercelulares y mecanismos de acción

Las sustancias que participan como mensajeros celulares presentan una naturaleza química variada. Estas se agrupan en dos grupos con base en sus propiedades fisicoquímicas, las cuales se reflejan en sus mecanismos de acción (4): .

-Mensajeros hidrofílicos : son en su mayoría de naturaleza polipeptídica, como el glucagón, la insulina, la hormona anti-diurética , la oxitocina, etc.. Otro tipo de mensajeros hidrofílicos son las aminas; entre éstas están la adrenalina y la dopamina.

-Mensajeros hidrofóbicos: son de naturaleza lipídica, como los esteroides, las hormonas tiroideas y las prostaglandinas.

Todos los neurotransmisores, al igual que la mayoría de las

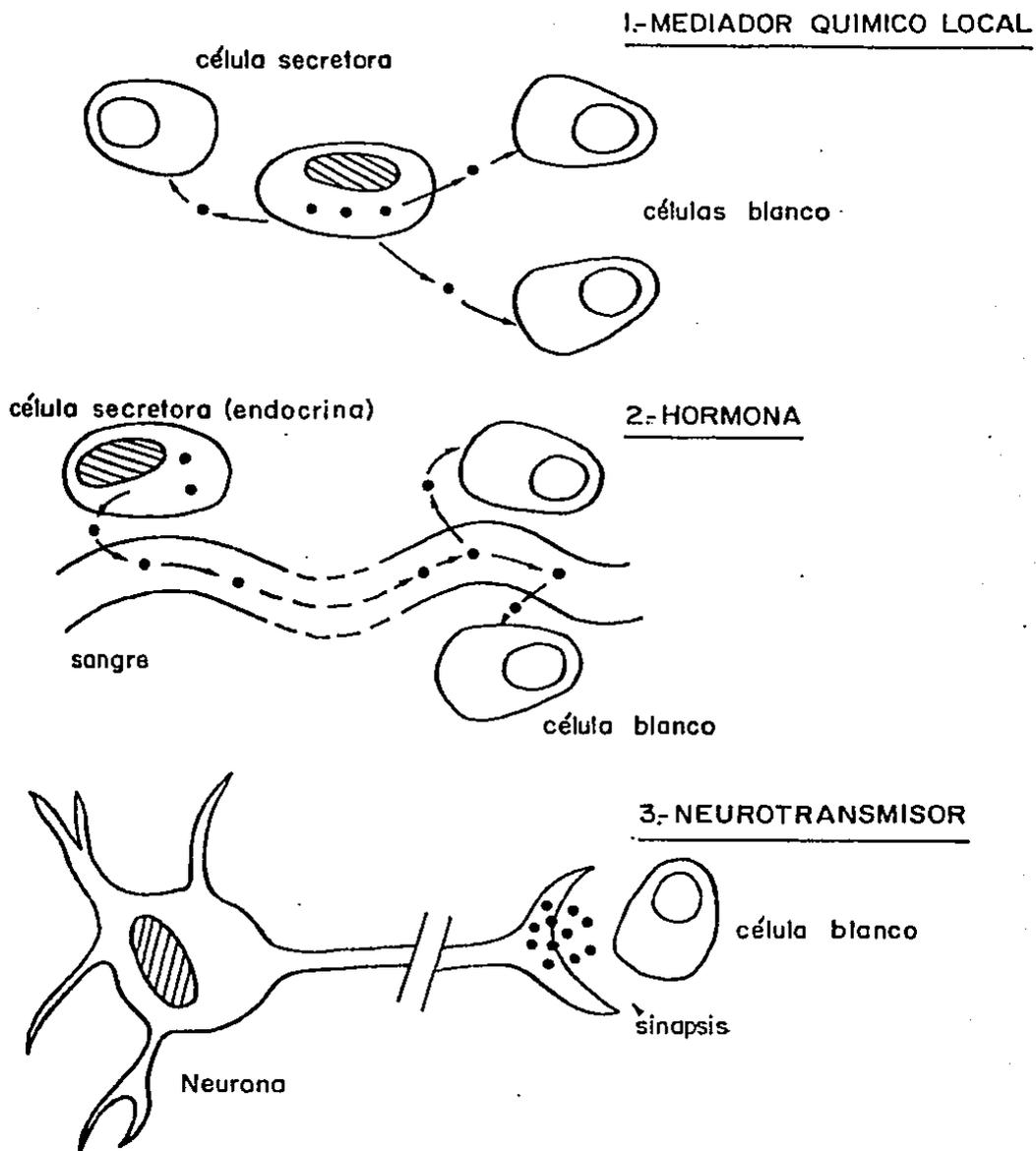


FIG. 1. SE ILUSTRAN TRES TIPOS DIFERENTES DE COMUNICACIÓN A DISTANCIA, QUE SON: 1- PARÁCRINO, 2- HORMONAL Y 3- NERVIOSO.

hormonas y mediadores químicos locales, son solubles en agua. La excepción la constituyen las hormonas tiroideas y esteroides, que son hidrofóbicas, y que se transportan en la circulación mediante su unión a proteínas acarreadoras. Esta diferencia en solubilidad entre mensajeros hidrofóbicos e hidrofílicos se refleja en los mecanismos de acción en las células blanco. Los mensajeros solubles en agua no pueden atravesar la bicapa lipídica que forma la membrana plasmática; se unen entonces a proteínas receptoras específicas en la superficie de la célula. Las hormonas tiroideas y las esteroides son hidrofóbicas, y una vez liberadas de sus proteínas acarreadoras pueden atravesar libremente la membrana de sus células blanco. Los receptores de estas hormonas son intracelulares (4). Otra diferencia importante entre estos dos tipos de mensajeros es la vida media dentro del torrente sanguíneo o dentro del espacio extracelular. Por lo general, las hormonas hidrosolubles se eliminan y/o degradan en minutos después de entrar a la circulación y los mediadores químicos locales y los neurotransmisores aún más rápido, en segundos o milisegundos después de entrar al espacio extracelular. Sin embargo, la vida media de las hormonas lipofílicas es más larga, de horas o días en algunos casos, aunque existen excepciones (1,4).

#### 1.1.b. Receptores

La habilidad de una célula para responder al estímulo de moléculas señaladoras o a mensajeros depende de la presencia de una sustancia capaz de reconocer e interactuar con el mensajero. El concepto de "sustancia receptiva" tiene su origen en los

trabajos de Ehrlich y Langley en 1906, quienes notaron que el veneno curare inhibía la contracción inducida por nicotina del músculo esquelético. La competencia entre estas dos sustancias los llevó a concluir que "el mutuo antagonismo del curare y la nicotina sobre el músculo sólo se puede explicar satisfactoriamente si se supone que ambos se combinan con una misma sustancia receptora, la cual recibe el estímulo, y al transmitirlo causa la contracción del músculo" (5).

No fue sino hasta en las últimas décadas que se habló de receptores como entidades químicas concretas. Son por lo general proteínas de alto peso molecular, algunas de las cuales han sido purificadas, clonadas y secuenciadas.

La atención de este trabajo está dirigida a los receptores membranales, por lo que la información que a continuación se presenta sólo concierne a estos últimos.

Los receptores membranales detectan entonces la llegada de una hormona y activan una ruta de transducción que, en última instancia, regula procesos celulares como la secreción, la contracción, el metabolismo o el crecimiento. La respuesta celular a un estímulo hormonal involucra por lo menos tres componentes que son: un receptor que reconoce a la hormona, un componente que va a acoplar el receptor al sistema generador de mensajes (sistema transductor), y un tercer componente que va a efectuar la respuesta celular activando las enzimas correspondientes (efector interno) (6, fig.2). La participación de varios intermediarios en la transmisión de las señales (o sistema de transducción) permite por un lado, una amplificación de la señal y por otro lado, una regulación fina de la respuesta de la célula a una señal determi-

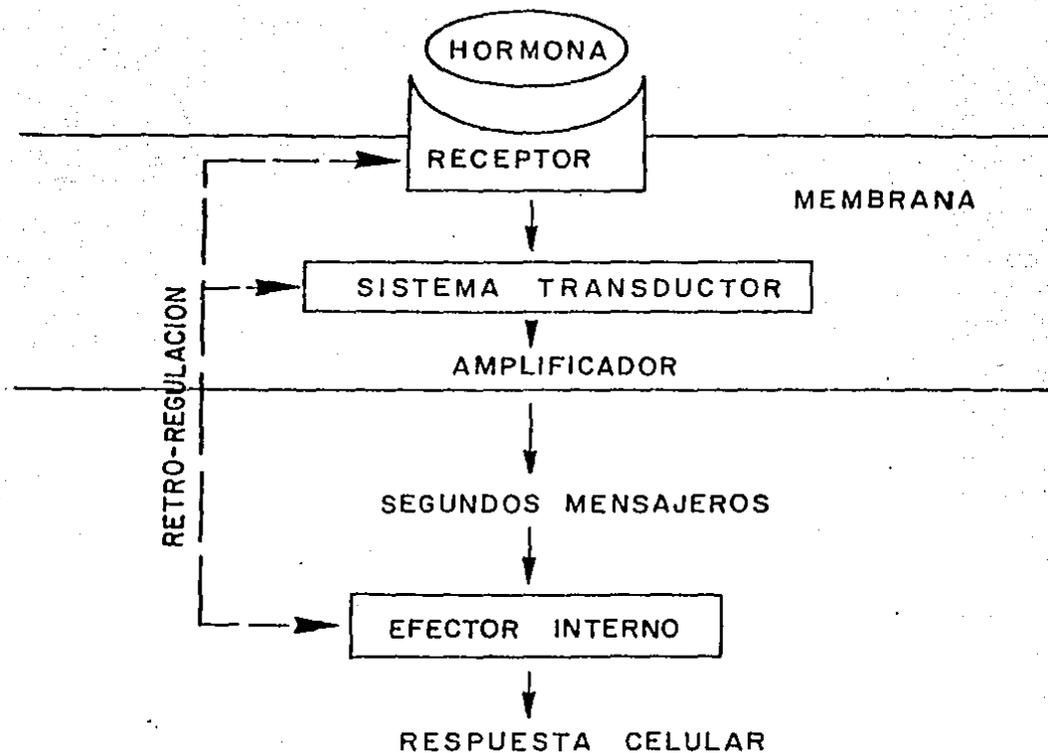


FIG. 2. SE ILUSTRAN LOS COMPONENTES INVOLUCRADOS EN LA RESPUESTA CELULAR A UN ESTÍMULO HORMONAL HIDROFÍLICO, QUE SON: 1- UN RECEPTOR, 2- UN SISTEMA TRANSDUCTOR, Y 3- UN EFECTOR INTERNO.

nada fundamentada en un circuito de retroalimentación. Se dice que una droga es agonista cuando su interacción con el receptor provoca una activación similar a la que se manifiesta con el ligando endógeno. Los compuestos químicos que no ejercen una actividad farmacológica intrínseca pero que causan un efecto mediante la inhibición de la acción de un agonista específico (compitiendo por el sitio de unión del mismo) son antagonistas (2).

En los animales superiores, la mayoría de las células están especializadas en realizar funciones específicas y presentan un arreglo característico de receptores que les permite responder a diferentes mensajeros. La mayoría de estos receptores al ser activados, van a iniciar o a modular esa función. La influencia de estas señales químicas en sus células blanco va a ser, ya sea la de alterar las propiedades o las velocidades de síntesis de proteínas existentes, o la de iniciar la síntesis de proteínas nuevas. Existen varios casos en donde el mismo mensajero se une a sus receptores induciendo respuestas diferentes en diferentes células blanco; esto tiene dos implicaciones: la primera es que las células poseen un tipo especial de receptores con el fin de responder a un tipo particular de mensajeros químicos y la segunda, es que están programadas para responder a cada señal de manera característica (8).

#### 1.1.c. Sistema endócrino

El sistema endócrino comprende una serie de tejidos especializados que conforman las glándulas distribuidos en el cuerpo. Filogenéticamente, es un sistema antiguo, ya que todas las glán-

dulas excepto la paratiroides y la placenta están presentes y funcionales en toda clase de vertebrados. En contraste con otras glándulas secretoras, las secreciones de las glándulas endócrinas se liberan al torrente sanguíneo; de allí el nombre "endócrino" : endon-dentro, krinein-aparte (7).

Una hormona es un producto secretado por una glándula endócrina. El término fue originalmente acuñado y aplicado por Bayliss y Starling en 1900 al descubrir la secretina, la cual se libera en la sangre por la mucosa duodenal y estimula la secreción pancreática. En la actualidad se define a una hormona como una sustancia química que se libera a la sangre en pequeñas cantidades y que va a evocar una respuesta fisiológica específica en otras células, denominadas células blanco. La restricción "en pequeñas cantidades" excluye a sustancias como la glucosa, ácidos grasos libres, iones, CO<sub>2</sub>, que podrían englobarse dentro de esta definición. Incluye sin embargo, a las "hormonas locales", como a la acetilcolina, la norepinefrina o la histamina, que alcanzan a sus células blanco por difusión a través del líquido extracelular, y no por transporte a través de la circulación general (7).

Es necesario enfatizar que en los organismos superiores , las hormonas de una variedad de glándulas operan en concierto para realizar el control de los procesos vitales fundamentales. La interrelación entre las hormonas, ya sea de manera cooperativa o antagonista, confiere flexibilidad y la posibilidad de graduaciones sutiles que son muy importantes en el control homeostático. Las interrelaciones funcionales entre las diversas glándulas justifican el considerarlas como sistema fisiológico.

## 1.2. ADRENALINA Y SUS RECEPTORES

1.2.a. Importancia fisiológica de la acción simpática y adrenal en el organismo.

La acción integrativa del sistema nervioso autónomo (SNA) tiene una importancia vital en el organismo. En general, el SNA regula las funciones de las estructuras que no se encuentran bajo el control voluntario, y que por ende, no se hacen conscientemente. Por lo tanto la respiración, la circulación, la digestión, la temperatura corporal, la sudoración y la secreción de algunas glándulas endócrinas están reguladas en parte o enteramente, por el SNA y por sus conexiones centrales (7,2). El SNA está compuesto por el sistema nervioso simpático (SNS) y por el sistema nervioso parasimpático (SNP). Ambos tienen funciones que podrían considerarse, por lo general, opuestas en la regulación del medio interno. El SNS se encuentra vitalmente involucrado en la regulación homeostática de muchas funciones centrales y periféricas, entre las cuales se encuentran la frecuencia cardíaca, la fuerza de contracción del miocardio, el tono vasomotor, la presión venosa y arterial y el metabolismo de lípidos y carbohidratos. El sistema simpático se encuentra activo en todo momento, y el grado de actividad varía de momento a momento y de órgano a órgano. El sistema simpato-adrenal también puede funcionar como unidad. Esto ocurre especialmente en la llamada "reacción o respuesta general de alarma", durante la cual las estructuras inervadas por el sistema simpático se estimulan simultáneamente, preparando al organismo para un estado de "lucha o huida". Todas estas acciones del SNS y de la médula adrenal se

llevan a cabo por las aminas adrenérgicas, la epinefrina, la norepinefrina y la dopamina. Las acciones de estos compuestos van desde acciones periféricas excitatorias y/o inhibitorias en ciertos tipos de músculos lisos, acciones cardiacas excitadoras, acciones metabólicas como un aumento en la glucogenólisis y la gluconeogénesis hepáticas y un aumento en la lipólisis en el tejido adiposo, acciones endócrinas, como modulación de la secreción de diferentes hormonas y acciones en el sistema nervioso central, como estimulación respiratoria, aumento en el estado de alerta y en la actividad psicomotora y una disminución en el apetito (7).

El principio activo del efecto presor de los extractos adrenales fue nombrado epinefrina por Abel en 1899 y fue sintetizado independientemente por Stolz y Dakin (ver Harking, 9). La ruta biosintética de la epinefrina fue propuesta en 1939 por Blasko en 1939 (10) y se presenta en la fig 3. En el transcurso de la síntesis, la hidroxilación de la tirosina a dopa, y la descarboxilación de la dopa a dopamina (paso 2 y 3) ocurren en el citoplasma. La dopa entra entonces a gránulos citoplásmicos, en donde es convertida a norepinefrina por una beta-hidroxilasa de dopamina (paso 4). En la médula suprarrenal, la mayor parte de la norepinefrina se libera de los gránulos, y en el citoplasma se metila formando la epinefrina (paso 5) y entra a un grupo diferente de gránulos intracelulares, en donde se almacena hasta su liberación. En el adulto normal, el 80% de las catecolaminas de la médula suprarrenal está constituido por la epinefrina y el 20% restante por la norepinefrina. Las acciones de la norepinefrina y de la epinefrina terminan ya sea por su recaptación en

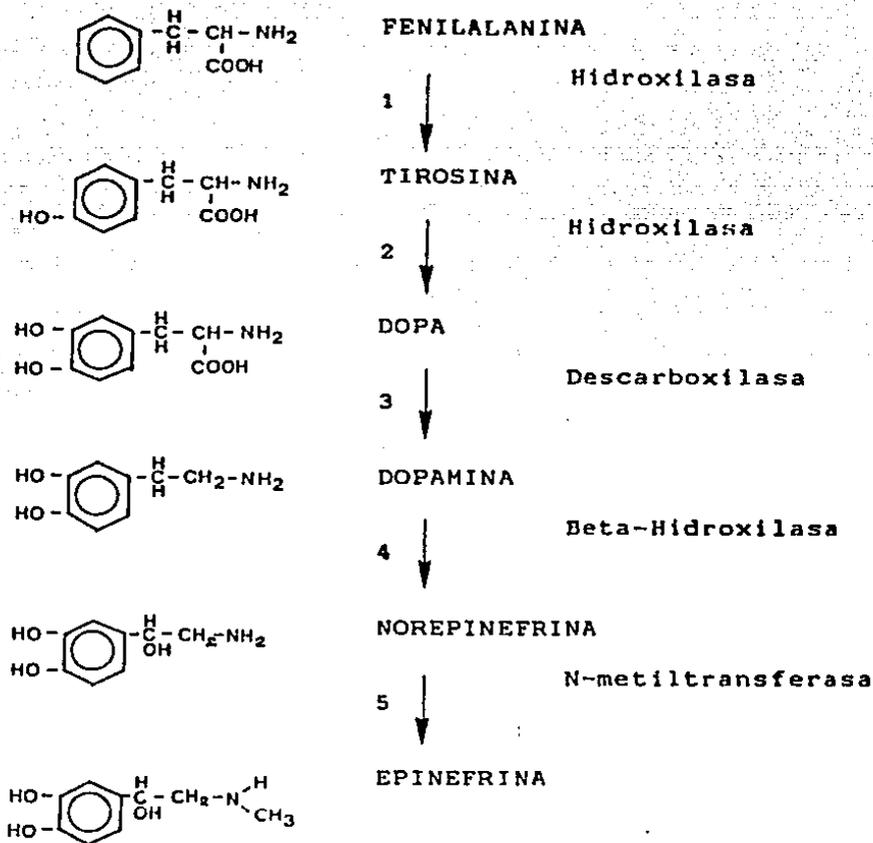


Fig. 3. Biosíntesis Enzimática de la Dopamina, Norepinefrina y Epinefrina. En la médula suprarrenal, los pasos 1,2 y 3 ocurren en el citoplasma, y los pasos 4 y 5 son intravesiculares.

las terminales sinápticas, por difusión en el espacio intercelular o por transformaciones metabólicas. La monoaminoxidasa (MAO) y la catecol-o-metil transferasa (COMT) son las principales enzimas involucradas en los pasos iniciales de la transformación metabólica de las catecolaminas, los cuales se ilustran en la fig.4. La epinefrina y la norepinefrina pueden inicialmente desaminarse oxidativamente por la MAO a los aldehídos correspondientes (los cuales no se muestran en la figura), y oxidarse al ácido 3,4 dihidroximandélico. Alternativamente, pueden metilarse primero por la COMT hasta la normetanefrina y la metanefrina, respectivamente. Ambos productos de cualquier reacción se metabolizan entonces por la MAO o por la COMT alternativamente hasta formar el ácido 3 metoxi 4 hidroximandélico (VMA), el cual constituye el metabolito principal de las catecolaminas que se excreta en la orina. Aquellas catecolaminas que se liberan dentro de las terminales nerviosas se metabolizan por la MAO; la COMT se encarga de metabolizar las catecolaminas circulantes, particularmente en el hígado (2).

#### 1.2.b. Receptores adrenérgicos y transducción de las señales

##### 1.2.b.1. Clasificación farmacológica de los adrenerreceptores

Como ya se mencionó anteriormente, el concepto de sustancia receptiva fue introducido por Langley en 1905 para explicar las acciones del curare en el músculo esquelético. Dale en 1906 (11) clasificó las diferentes respuestas a extractos de glándula suprarrenal o a estimulaciones del nervio simpático en "motoras" (excitatorias) e inhibitorias, y observó que la ergotamina interfería sólo con las respuestas excitatorias. Concluyó que cada

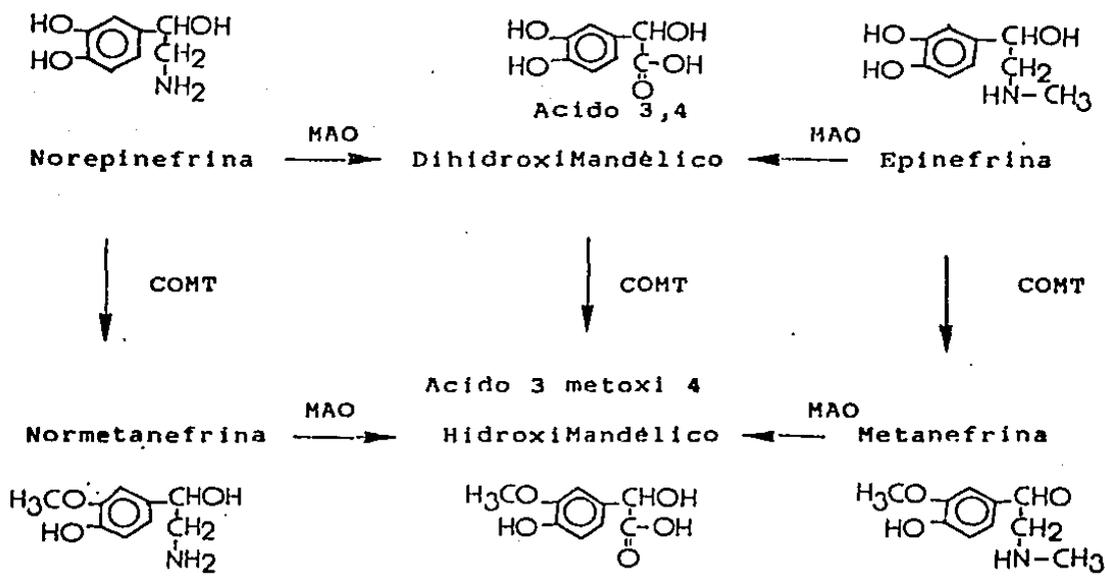


Fig.4. Disposición Metabólica de las Catecolaminas

tipo de respuesta podía estar relacionada con un tipo diferente de "sustancia receptiva" y que ciertos tipos de tejidos podían presentar uno o ambos tipos de receptores. La clasificación de Dale fue retomada 40 años después por Alquist (12), quien comparando la potencia relativa de 6 diferentes agentes simpato-miméticos (incluyendo la epinefrina, la norepinefrina y el isoproterenol) en varios sistemas fisiológicos in vitro e in vivo observó que pese a que podían observarse 2 tipos de respuestas, éstas no podían clasificarse meramente como excitatorias o inhibitorias, ya que cada tipo de receptor podía tener cualquier acción dependiendo de su localización. Sugirió entonces que los receptores adrenérgicos debían clasificarse de acuerdo al orden de potencia con que se afectan por los diferentes agentes adrenérgicos. De acuerdo con esta clasificación, los receptores que se estimulan por las catecolaminas con un orden de potencia de: epinefrina > norepinefrina > isoproterenol (aquellos que por ejemplo median vasoconstricción) fueron llamados receptores alfa. Aquellos que median efectos como vasodilatación en músculo esquelético responden a catecolaminas con un orden de potencia de: isoproterenol > epinefrina > norepinefrina fueron llamados receptores beta. Alquist consideró que los alcaloides ergotamínicos eran antagonistas alfa específicos. Sin embargo, la falta de disponibilidad de bloqueadores beta no permitió que la clasificación de Alquist fuera del todo aceptada. La clasificación de Alquist se validó 9 años después con el descubrimiento de un bloqueador beta específico, el dicloroisoproterenol, por Slater y Powell en 1957 (13). En 1967 se propuso la subdivisión de los receptores beta en beta 1 y beta 2 con base en sus respuestas

relativas a epinefrina y a norepinefrina (14).

Los receptores alfa también muestran heterogeneidad (15). Aquellos designados como alfa 1 predominan en sitios efectores postsinápticos de músculo esquelético y de células glandulares; los alfa 2 se localizan en parte en las terminales presinápticas; la activación de éstos resulta en una inhibición de la liberación del transmisor, por lo que parecen estar involucrados en una retroalimentación presináptica negativa de la liberación nerviosa del neurotransmisor. Sin embargo, la localización de los receptores alfa 2 en las terminales nerviosas colinérgicas en el tracto gastrointestinal se responsabilizan probablemente de los efectos inhibitorios de los agonistas alfa adrenérgicos en ese sitio. Esta clasificación de los receptores adrenérgicos alfa y beta en alfa 1 y alfa 2 y en beta 1 y beta 2 respectivamente, se corroboró con el descubrimiento tanto de agonistas como de antagonistas específicos para cada tipo de receptor. Existen diferencias importantes en las habilidades relativas de los agentes alfa-bloqueadores para antagonizar los efectos de las aminas adrenérgicas en los 2 subtipos de receptores alfa adrenérgicos (2). La fenoxibenzamina y la prazosina, por ejemplo, muestran selectividad para bloquear a los receptores alfa 1, en contraste con la yohimbina, la cual inhibe selectivamente a los receptores alfa 2 adrenérgicos. La fentolamina en cambio, sólo es de 3 a 5 veces más eficiente para bloquear los receptores alfa 1 que los alfa 2. Para los receptores beta adrenérgicos existen agentes beta bloqueadores no selectivos como el propranolol, el alprenolol y etc, agentes beta selectivos para los recep-

tores beta 1 como el metoprolol y para los beta 2 como la butoxamina. La tabla 2 muestra una recapitulación de las propiedades farmacológicas y de las funciones fisiológicas de los subtipos de receptores adrenérgicos.

Tabla 2. Receptores Adrenérgicos

RECEPTORES ALFA		
Agonistas	Epi, NE, PE, Iso *	
Potencia de agonistas	Epi > NE > PE > Iso	
Antagonistas	Fentolamina, Fenoxibenzamina	
Subtipos	Alfa 1	Alfa 2
Agonistas selectivos	PE	Clonidina
	Metoxamina	Alfa metil NE
Segundos Mensajeros	Ca++, recambio de fosfatidilinositol	AMPC
Respuestas representativas	Vasoconstricción Relajación intestinal Contracción uterina Dilatación de la pupila	Liberación presináptica de NE Agregación plaquetaria
Antagonistas selectivos	Prazosina	Yohimbina
RECEPTORES BETA		
Potencia de Agonistas	I > E > NE > PE	
Antagonistas	Propranolol, Alprenolol, Nodolol, Timolol	
Subtipos	Beta 1 (E=NE)	Beta 2 (E>NE)
Agonistas selectivos	Dubotamina	Metaproterenol Albuterol Terbutalina Isoetarina
Segundos mensajeros	AMPC	AMPC
Respuestas representativas	Estimulación cardiaca Lipólisis Relajación intestinal	Broncodilatación Vasodilatación Relajación uterina Liberación presináptica de NE

\*Isoproterenol (Iso), Epinefrina (Epi), Norepinefrina (NE) y fenilefrina (PE). Wilson, J.D. y Foster, D.W. (1985) Williams Textbook of Endocrinology 7th Ed. W.B. Saunders Company.

Los receptores beta adrenérgicos han sido purificados a partir de diferentes fuentes (16) y pertenecen al grupo de receptores mejor estudiados. Se cuenta con el cDNA que codifica para el receptor beta 2 adrenérgico y a partir de éste se conoce la estructura primaria de este receptor (17). Estudios de digestión proteolítica de los receptores beta 1 y beta 2 muestran que existen regiones extensas de homología entre estas dos proteínas (18). Además de compartir un alto grado de homología estructural, comparten propiedades fisiológicas y funcionales. Ambas unen catecolaminas y ambas están acopladas de manera estimuladora a la enzima adenilato ciclasa. Se consideran por lo tanto isorreceptores. También se ha logrado purificar los receptores alfa 1 y alfa 2 (19,20). Los mapas peptídicos de los receptores alfa 1 y alfa 2 muestran que existe poca homología estructural entre los subtipos de receptores alfa adrenérgicos, misma que se refleja funcionalmente, ya que cada uno está asociado a un mecanismo de transducción diferente (21). Estudios posteriores han demostrado que el subtipo alfa 2 adrenérgico no es totalmente homogéneo y se postula la existencia de 2 subtipos, los alfa 2a y los alfa 2b (22). Por otro lado, existen evidencias de una respuesta alfa 1 heterogénea, aunque aún resulta prematuro hacer una subdivisión (23).

#### 1.2.b.2: Transducción de las señales adrenérgicas.

Los sistemas señaladores están constituidos alrededor de un tema común de tres componentes que interactúan entre sí. Estos son: 1- una subunidad de reconocimiento o receptiva (R)

2- una proteína transdutora o de acoplamiento (N o G)

regulada por nucleótidos de guanina

3- una enzima efectora (C).

Los eventos que ocurren desde la interacción hormona-receptor hasta la generación de un segundo mensajero forman parte de la transducción. Los procesos que ocurren desde la generación del segundo mensajero hasta el efecto final se agrupan en lo que se denomina propagación de la señal. Cuatro ejemplos de tales sistemas son los siguientes:

-receptores que estimulan a la adenilato ciclasa (Ac)

-receptores que inhiben a la Ac

-el sistema de transducción de la luz visual que involucra a la rodopsina

-receptores que promueven la hidrólisis de fosfoinosítidos mediante la activación de la fosfolipasa C.

En cada caso, el receptor está funcionalmente asociado una proteína regulada por nucleótidos de guanina y a una enzima efectora, la cual va a controlar el nivel intracitoplásmico del segundo mensajero.

La transmisión de las señales adrenérgicas al interior de la célula involucra dos vías principales:

- la primera afecta los niveles intracelulares del AMPc a través de la activación o inhibición de la Ac

- la segunda afecta el recambio de fosfoinosítidos y la concentración del Ca intracelular a través de la activación de la fosfolipasa C.

#### SISTEMA DE LA ADENILATO CICLASA

Tres de los receptores adrenérgicos interactúan con la Ac para

ejercer su efecto biológico, los beta 1, los beta 2 y los alfa 2.

El papel del AMPc como segundo mensajero de las acciones de la epinefrina en el hígado fue descubierto por Sutherland y col (24). El AMPc se genera por la activación de una enzima membranal, la Ac, a partir del ATP. La concentración intracitoplásmica del AMPc se altera en segundos después de la interacción de algunas hormonas con sus receptores y alcanza niveles máximos minutos después de iniciarse la acción hormonal. La activación de los receptores beta adrenérgicos (beta 1 y beta 2) se asocia con una elevación de los niveles del AMPc a través de la activación de la Ac (25), mientras que la activación de los receptores alfa 2 se asocia con una disminución en los niveles del AMPc a través de la inhibición de la Ac (21).

Aunque inicialmente se pensó que la interacción de los receptores y del ion fluoruro con la subunidad catalítica de la Ac era directa, los trabajos de Rodbell en 1971 demostraron que el GTP era un activador esencial de la Ac (26). Este nucleótido es capaz por sí sólo de activar a la Ac, aunque sólo en forma parcial, pero amplifica notablemente la respuesta a las hormonas. Se sabe ahora que las acciones de las hormonas y de los iones fluoruro están mediadas a través de proteínas moduladas por GTP, las cuales son llamadas proteínas N (por nucleótidos), o G (por guanina), o G/F (por guanina/fluoruro)(27). En trabajos recientes se ha demostrado que la proteína N involucrada en la activación de la Ac es diferente de la que inhibe a la Ac (27,28-30). Estas proteínas se han denominado Ns a la que estimula y Ni a la que inhibe a la Ac (fig.5).

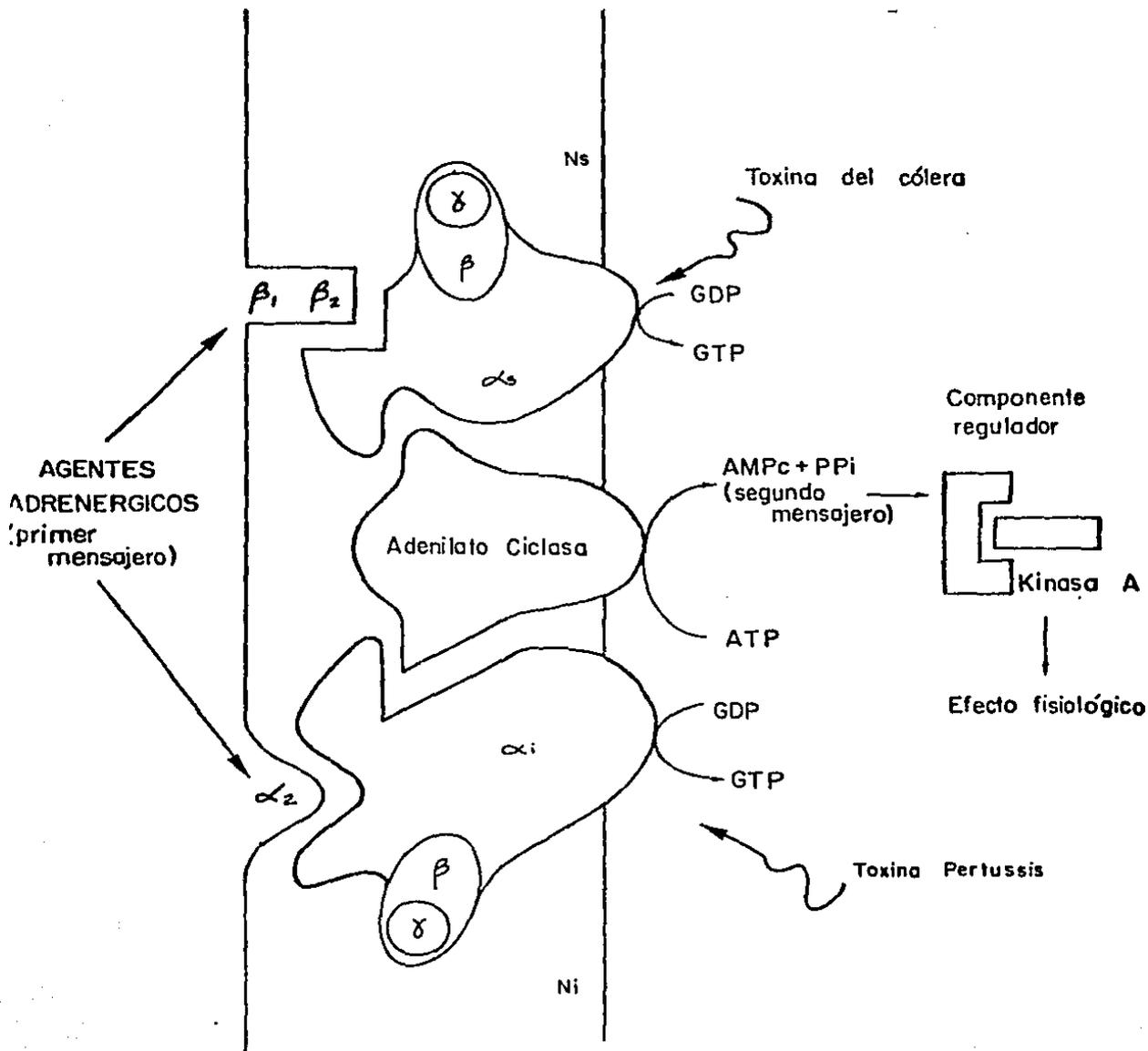


FIG. 5. SE ILUSTRAN LOS COMPONENTES DEL SISTEMA TRANSDUCTOR ACOPLADO A LA ADENILATO CICLASA.

Se ha demostrado que la proteína N tiene actividad de GTPasa, la cual hidrolizando el GTP a GDP+Pi, termina cada ciclo de activación de la Ac (31,32). De esta manera, los análogos no hidrolizables del GTP como el GppNHp o el GTP $\gamma$ S conducen a una activación persistente de la enzima, ya que sólo son lentamente hidrolizables.

Los nucleótidos de guanina no sólo modulan la actividad catalítica de la Ac, sino que ejercen también efectos regulatorios específicos sobre la unión de agonistas a los receptores beta-adrenérgicos (33,34). El GTP disminuye la afinidad general de los agonistas acoplados a la Ac por sus receptores, llevándolos a un estado de baja afinidad (34). Esto indica que los receptores pueden encontrarse en dos formas en la membrana, una forma de alta afinidad y otra de baja afinidad, que éstas son interconvertibles y que dicha interconvertibilidad está regulada por GTP a través de la proteína acopladora N (26,35). En la fig 6 se presenta un modelo de las acciones del GTP en el componente catalítico de la Ac y en la modulación de la afinidad del receptor por su agonista. La asociación del receptor en un estado de baja afinidad Rb con la proteína N unida al GDP (N\*GDP) provoca un cambio del receptor a un estado de alta afinidad (Ra) por su agonista, formando así un complejo Ra\*N\*GDP. La interacción de la hormona (H) con el Ra induce un recambio del GDP por el GTP en la proteína N lo cual conduce por un lado a una disociación del complejo H\*R\*N en donde el R vuelve a adquirir su forma de baja afinidad, liberando a la hormona; por otro lado, la proteína N queda en su forma activa y es capaz de activar a la Ac .

Las proteínas N (Ns y Ni) son heterodímeros los cuales, bajo

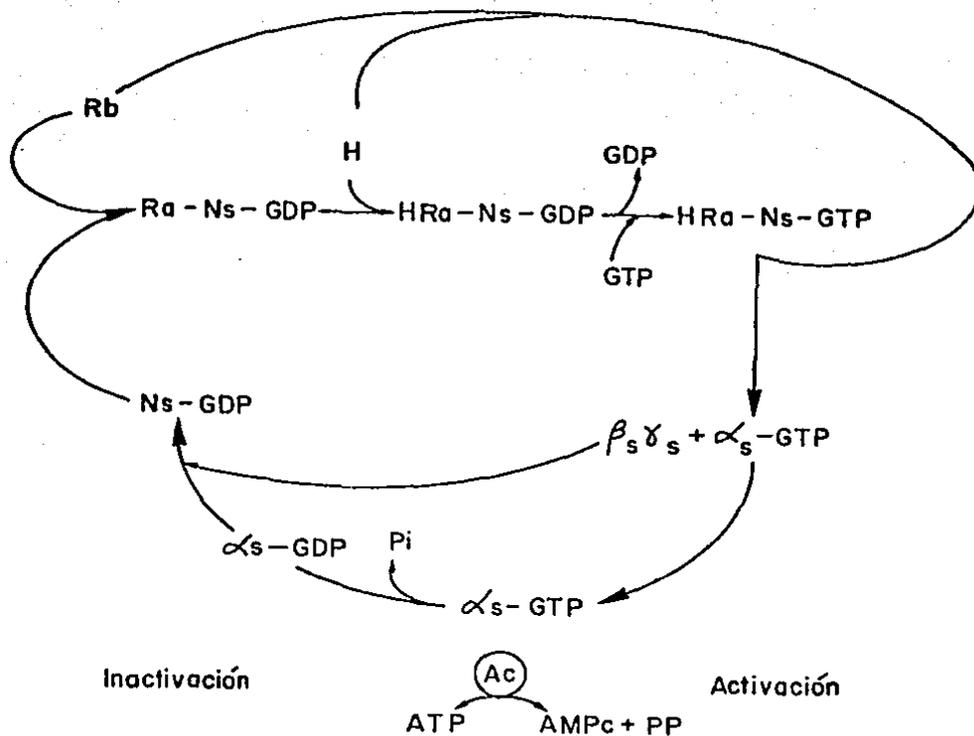


FIG. 6. MODELO CINÉTICO DE LA ACTIVACIÓN DE LA ADE-  
NILATO CICLASA (AC). RA, RECEPTOR EN ESTADO DE ALTA  
AFINIDAD; RB, RECEPTOR EN ESTADO DE BAJA AFINIDAD;  
 $\alpha$ ;  $\beta$  Y  $\delta$  SON LAS SUBUNIDADES DE NS, Y H ES LA HORMO-  
NA.

la estimulación inducida por la hormona se disocian en las subunidades alfa y beta-gama. Las subunidades beta-gama parecen ser comunes para las dos proteínas, Ns y Ni, y tienen un peso molecular aproximado de 35 y 5-8 Kd respectivamente. Las subunidades alfa sin embargo, difieren en sus pesos moleculares: 42-45 Kd para alfa-s y 39-41 Kd para alfa-i. Estas subunidades alfa son las que tienen actividad de GTPasa y las que van a modular a la Ac (36, 37 y 38). Dos toxinas han sido extremadamente útiles para definir la interacción de estas proteínas reguladoras con otros componentes del sistema de la Ac; éstas son la toxina del cólera y la toxina pertussis, producidas respectivamente por los bacilos Gram negativos *Vibrio cholerae* y *Bordetella pertussis*. La toxina del cólera activa irreversiblemente a Ns (41), mientras que la toxina pertussis actúa sobre Ni, bloqueando la atenuación hormonal de la Ac (29,39). Ambas toxinas tienen entonces un efecto sinérgico sobre la producción del AMPc. Es interesante el hecho que ambas toxinas actúen uniéndose covalentemente la fracción de ADP ribosa del NAD<sup>+</sup> a la subunidad alfa de sus sustratos respectivos, la subunidad alfa de 45 Kd de Ns (41) o a la subunidad de 41 Kd de Ni (39, 40); la ADP-ribosilación de Ni altera su interacción con el sistema de la ciclase bloqueando su habilidad de inhibir la unidad catalítica activada (39, 40) e interrumpiendo su asociación con receptores para ligandos inhibitorios (42).

#### SISTEMA FOSFOINOSITIDOS-CALCIO

Durante los años 50 se reportaron las primeras observaciones de un aumento en la incorporación de <sup>32</sup>P a los fosfoinosítidos de

la membrana plasmática secundarios a una estimulación con hormonas y neurotransmisores en varios sistemas celulares (ver revisión histórica, 43). No fue hasta 1975 cuando Michell asoció el recambio de fosfoinosítidos, secundario a una activación hormonal, con un cambio en la concentración del calcio (Ca) citosólico (44). Michell propuso que el recambio de fosfatidil inositol involucraba una alteración en el Ca citosólico.

En 1980 Fain y Garcia-Sáinz observaron que la activación de los receptores alfa 1 adrenérgicos correlacionaba con un recambio del fosfatidilinositol asociado a la membrana, que este recambio era capaz a su vez de modificar la concentración del Ca intracitoplásmico y que estos iones per se desempeñaban un papel muy importante en la transducción de la señales adrenérgicas (21). En contraste con el sistema transductor acoplado a la Ac, el avance en el conocimiento del sistema acoplado al recambio de fosfoinosítidos se ha dado en los últimos diez años, y tan sólo recientemente empezamos a entenderlo mejor.

En estos momentos, el sistema de los fosfoinosítidos se entiende de la manera siguiente. Un lípido de inositol, el fosfatidil- inositol4,5bifosfato (PtdIns4,5P2) localizado dentro de la membrana plasmática es el precursor utilizado por la activación del receptor para liberar el inositol 1,4,5 trifosfato (Ins1,4,5P3) al citosol, dejando el diacil-glicerol (DG) dentro de la membrana. La función primaria del Ins1,4,5P3 es la de modificar la concentración Ca citoplásmica a partir de fuentes intracelulares y constituir así una ruta Ins1,4,5P3/Ca. La otra rama esta constituida por el DG, el cual activa a la proteína cinasa C (pKC) formando una ruta DG/pKC (45,fig.7).

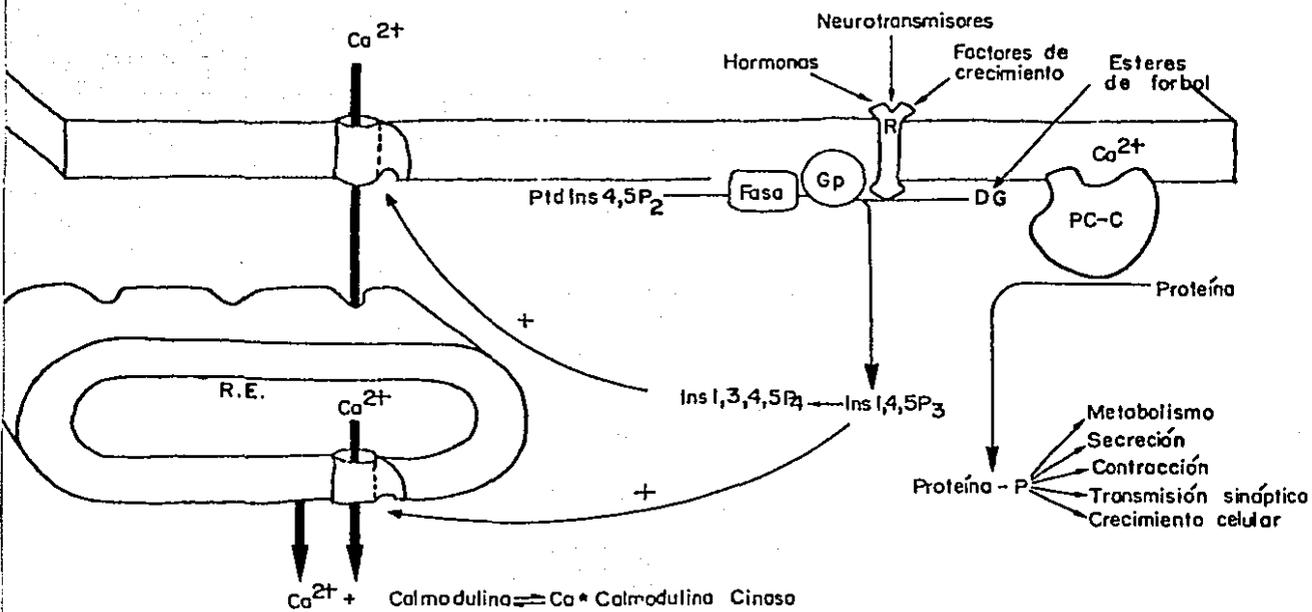


FIG. 7. COMPONENTES DEL SISTEMA TRANSDUCTOR ACOPLADO AL RECAMBIO DE FOSFOINOSÍTIDOS. LA SEÑAL EMPIEZA CON LA HIDRÓLISIS DEL PTDINS<sub>4,5P<sub>2</sub></sub> HASTA EL DG Y EL INS<sub>1,3,4,5P<sub>4</sub></sub>. EL AGONISTA ESTIMULA AL RECEPTOR (R), ACTIVA UNA PROTEÍNA G (GP) QUE UNE ENTONCES GTP Y ESTIMULA A LA FOSFOINOSITASA (FASA).

El mecanismo de transducción que involucra a los lípidos de inositol es otro ejemplo en donde una proteína G (Gp, p por fosfolípidos) acopla los receptores a la fosfoinositasa (46,47). (Downes y Michell introdujeron el término de fosfoinositasa para referirse a la enzima que hidroliza el PtdIns4,5P2, y así evitar confusiones con la fosfodiesterasa del AMPc, 48). No se conoce sin embargo, la identidad de la proteína G. Las evidencias de la participación de la proteína G en el sistema de transducción acoplado a los fosfoinosítidos son las siguientes:

- la afinidad para agonistas de los receptores acoplados a este sistema se modula por nucleótidos de guanina, en forma similar a lo que ocurre con los acoplados a la Ac (42)
- el GTP y sus análogos no hidrolizables son capaces de estimular a la fosfolípasa C (49)
- el ión fluoruro es capaz de activar a la proteína Gp y así promover la formación del Ins1,4,5P3 in vivo e in vitro (50,51). Tal formación de Ins1,4,5P3 inducida por fluoruro se asoció con un aumento en el Ca intracelular (51)
- Algunos receptores acoplados a este sistema son capaces de desencadenar una actividad de GTPasa en la membrana plasmática (52).

El fosfatidil- inositol es un fosfolípido particular ya que puede fosforilarse. Una cinasa de fosfatidil inositol (PtdIns) transfiere un grupo fosfato del ATP al PtdIns hasta dar el fosfatidil inositol 4 fosfato. Otra cinasa añade otro grupo fosfato y se forma el PtdIns4,5P2, el cual es sustrato para generar el Ins1,4,5P3 (fig 7). De todos los fosfatos de inositol, el

Ins1,4,5P3 es el único al que se le ha encontrado una función de segundo mensajero: la de liberar Ca del retículo endoplásmico (RE). Fue Berridge quien demostró el papel del Ins1,4,5P3 como segundo mensajero (53). Se propone que el Ins1,4,5P3 interactúa con un receptor específico en el RE (54), el cual está conectado o forma parte integral de un canal de Ca. En apoyo a esto, se han identificado sitios de unión específicos intracelulares al Ins1,4,5P3 en varias células (55,56).

El Ins1,4,5P3 puede metabolizarse a través de dos rutas independientes. Puede defosforilarse a inositol libre o puede entrar a la ruta de inositol tris/tetrakis hasta formar un polifosfolípido de inositol recientemente identificado, el cual puede tener también una función de mensajero. Así entonces, se ha demostrado que la fosforilación del Ins1,4,5P3 conduce a la formación del inositol1,3,4,5tetra-kis fosfato (Ins1,3,4,5P4), el cual parece estar involucrado en el control de la entrada de Ca a través de la membrana plasmática (57,58). De alguna manera, parece que la acción del Ins1,3,4,5P4 requiere la liberación previa de Ca de fuentes intracelulares; se propone entonces que la liberación de Ca del RE es la que inicia la respuesta, pero que este Ca liberado es rápidamente captado por diversos organelos y además expulsado de la célula por una ATPasa membranar. La acción del Ins1,3,4,5P4 permitiendo la entrada de Ca del exterior de la célula, explica entonces una respuesta sostenida por un tiempo prolongado.

Por otro lado, el segundo producto de la hidrólisis del PtdIns4,5P2, el DG, permanece dentro de la membrana plasmática y funciona como segundo mensajero activando a la pKC, la cual fue

descubierta por Nishizuka (59,60). La activación de la pKC depende no sólo del DG, sino también de Ca y de la fosfatidil serina (45). En la mayoría de las células, la activación involucra ambas ramas de mensajeros, y así entonces el DG y el Ca actúan sinérgicamente en la activación de la enzima. Un aspecto importante del proceso de activación es la translocación física de la enzima del citosol a la membrana, la cual puede deberse a la acción del Ca (61). Esta translocación mediada por Ca a la membrana prepara a la enzima a las acciones estimuladoras del DG. Se sabe que la pKC participa en la propagación de la señal hormonal, y sobre todo, parece estar involucrada en la regulación de la respuesta hormonal.

Lo distinto del sistema de señales de los lípidos de inositol es que existe una bifurcación en el flujo de información. Así, surge la hipótesis de la señal dual, la cual concierne la forma en que las rutas del Ins1,4,5,P3/Ca y del DG/pKC cooperan entre sí para llevar a cabo una enorme variedad de procesos celulares. En la mayoría de las células, las dos rutas parecen actuar sinérgicamente; ésto se ha demostrado utilizando agentes farmacológicos capaces de estimular cada ruta independientemente. Se han utilizado el A23187 o la ionomicina para aumentar el Ca intracelular y ésteres de forbol para estimular a la pKC, y así estimular diferentes respuestas celulares. En la figura 8 se ilustra la hipótesis de la señal dual, en donde se muestra el papel de ambas rutas en el control de la actividad celular.

Se propone que la ruta del Ins1,4,5P3/Ca juega un papel directo y principal en el inicio de las respuestas celulares.

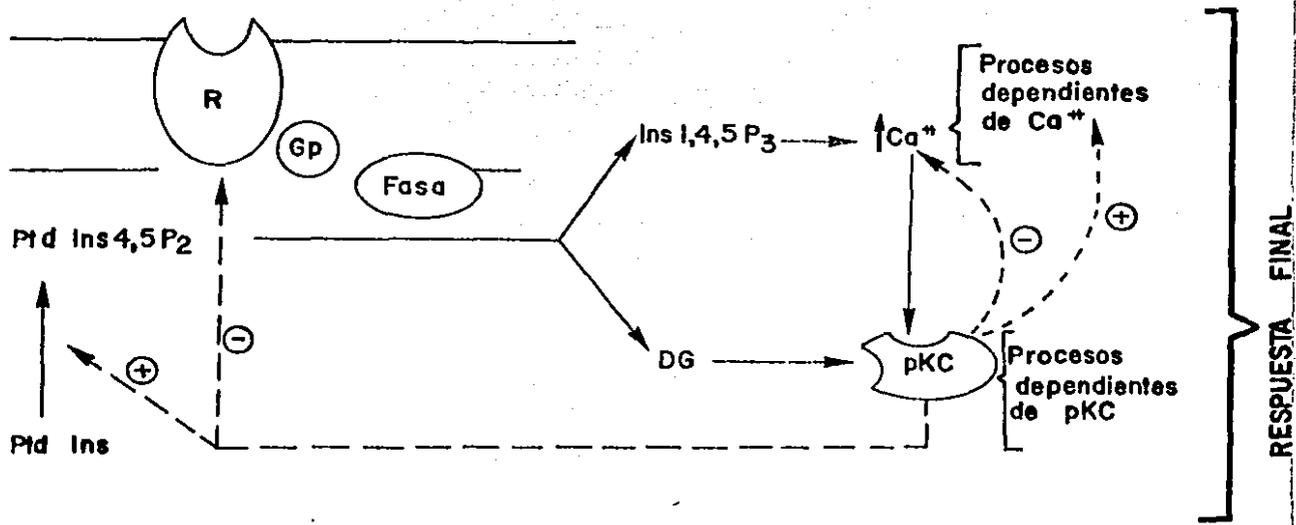


FIG. 8. HIPÓTESIS DE LA SEÑAL DUAL. LAS LÍNEAS PUNTEADAS REPRESENTAN INTERACCIONES HOMÓLOGAS ENTRE LA RUTA DEL INS 1,4,5 P<sub>3</sub>/CA Y EL DG/pKC.

Pese a que la ruta DG/pKC contribuye directamente a las respuestas finales, su función primaria en muchas células parece ser la de modulación o regulación tanto en el sistema de los lípidos de inositol (interacción homóloga) como en otros sistemas de transducción, en particular en el del AMPc (interacción heteróloga). Así, se ha observado que la activación farmacológica de la pKC inhibe las acciones alfa-1 adrenérgicas en hepatocitos (62) y conduce a una desensibilización alfa-1 adrenérgica (63); de igual forma el forbol miristato acetato (PMA) es capaz de inhibir la acumulación de AMPc inducida por glucagon o por isoproterenol (64). La existencia de interacciones de retroalimentación entre segundos mensajeros conduce a un sistema de señales altamente integrado y sintonizado capaz de responder rápidamente a señales externas con los cambios apropiados en la actividad celular (45).

#### 1.2.c. Modulación de la respuesta adrenérgica

Las hormonas tiroideas y los glucocorticoides son capaces de modular la respuesta de una gran variedad de células a las acciones de otras hormonas, incluyendo las de las catecolaminas (65). Se le conoce a esto como efecto permisivo.

Nos referiremos aquí exclusivamente al efecto permisivo que tienen las hormonas tiroideas y los glucocorticoides en el hígado de la rata. En algunas condiciones fisiológicas ocurre un cambio en las contribuciones relativas de los receptores alfa y beta adrenérgicos a la respuesta neta de las catecolaminas. El hígado de la rata se ha convertido en un modelo atractivo para estudiar los mecanismos de esta aparente interconversión de la respuesta alfa 1 a beta. Así por ejemplo, la respuesta glucogenolítica a catecolaminas en el hígado depende de la especie del animal (66),

de diferencias sexuales (67), de la edad (68), y de la función de las glándulas tiroideas (69,70), y adrenales (71). En la rata adulta, la respuesta adrenérgica hepática está mediada por receptores alfa 1 (72,73), pero se convierte en un evento mediado por receptores beta en condiciones de hipotiroidismo (69), de deficiencia de glucocorticoides (71), de hepatectomía parcial (74) y de colestasis (75). También se ha observado la adquisición de una respuesta beta adrenérgica importante (con una reducción recíproca en la respuesta alfa 1) en hepatocitos cultivados in vitro como monocapas primarias (76).

Se desconocen los mecanismos de las modulaciones en la respuesta adrenérgica. Se ha reportado un aumento en la densidad de los receptores beta adrenérgicos asociado al aumento en la respuesta beta adrenérgica en condiciones de hipotiroidismo (73) al igual que en hepatocitos en cultivo (76). Existen por otro lado estudios que sugieren que alteraciones en el acoplamiento del receptor a su mecanismo efector pueden ser importantes en la regulación de la respuesta beta adrenérgica hepática tanto in vivo como in vitro (77-79). En hepatocitos cultivados en monocapas, se ha observado una función reducida de la proteína Ni junto con un aumento en la respuesta beta adrenérgica (79). Por otro lado, en hepatocitos de ratas adultas normales, ocurrió un cambio en el control adrenérgico de la glicogenólisis de alfa 1 a beta, aparentemente relacionado a alteraciones en la fosfolipasa A2, sin un aumento en el número de receptores beta (78).

### 1.3. DESENSIBILIZACION.

Uno de los aspectos más sorprendentes de los receptores en

general y de los receptores beta adrenérgicos en particular es la naturaleza dinámica de su regulación por una enorme variedad de influencias. Hemos mencionado por ejemplo los efectos permisivos de ciertas hormonas sobre la respuesta a catecolaminas.

Otro aspecto extensamente estudiado de la regulación de los receptores beta adrenérgicos es el fenómeno de desensibilización, conocido también como tolerancia o taquifilaxis. El fenómeno de desensibilización se observa en sistemas tan simples como son los procariontes, por ejemplo para la estimulación quimiotáctica de las bacterias, al igual que en los organismos más complejos, como son los mamíferos. Los fenómenos sensoriales se desensibilizan frecuentemente. La desensibilización del efecto de una droga es un factor importante que limita la eficacia y la duración de la acción de muchos agentes terapéuticos, y prevalece de forma importante para los agonistas beta adrenérgicos .

Se dice que hay desensibilización cuando la exposición prolongada a una hormona, a un neurotransmisor, a un autacoide o en general a un estímulo externo conduce a una disminución en la respuesta celular a tal estímulo.

Un problema importante en cualquier discusión mecanística es aquel de la nomenclatura. La desensibilización inducida por hormonas se ha dividido en dos categorías generales, referidas como específica del agonista o desensibilización homóloga y agonista-inespecífica o desensibilización heteróloga. La desensibilización de las respuestas celulares mediadas por AMPc podría ocurrir a través de una reducción en la velocidad de síntesis del AMPc o de un aumento en la degradación del AMPc o en la expulsión del AMPc fuera de la célula. Pese a que se han observado los dos

últimos eventos en algunos sistemas , parece que el factor de regulación principal es la modulación en la velocidad de síntesis del AMPc estimulada por el receptor. Así, para los receptores acoplados a la Ac, el término de desensibilización homóloga se refiere a aquella forma de desensibilización en donde la respuesta subsecuente de la célula a catecolaminas disminuye sólo ante la exposición previa de estos agonistas , mientras que la respuesta de la enzima a otros efectores, activados por distintos receptores, como las prostaglandinas o el ion fluoruro no se ven afectadas. La desensibilización heteróloga, en cambio, ocurre cuando la estimulación con un agonista conduce a una disminución más generalizada en la respuesta de la célula a una serie de agonistas estructuralmente no relacionados que operan a través de distintos receptores (80,81).

Existen dos mecanismos que alteran al receptor beta adrenérgico y que conducen a una desensibilización de la respuesta (80). La primera ruta involucra una internalización del receptor mediada por la acción del agonista sobre el receptor mediante un proceso endocítico. Ha sido extensamente estudiado en eritrocitos de rana al igual que en distintos tipos de células en cultivo, en particular en astrocitomas (81-85). En eritrocitos de pavo , se ha descrito en una forma totalmente distinta de alteración en el receptor promovida por el agonista y que conduce a desensibilización (84,85). En este caso no hay disminución del número de receptores en la membrana celular; permanecen en ella, pero se encuentran estructuralmente alterados y por ende, desacoplados de la enzima efectora, la Ac.

Existe información controversial en cuanto a la existencia de desensibilización de las acciones beta-adrenérgicas en el hígado de la rata. Por un lado los trabajos de Gurr y Ruh (86) y de Noda y col. (87) reportan una desensibilización del tipo homólogo de la formación del AMPc inducida por el isoproterenol en cultivos primarios de células parenquimatosas de hígado de rata. De igual forma, el grupo de Reilly y Blecher (88) describió una desensibilización homóloga de la Ac por isoproterenol en una línea celular de hepatocitos diferenciados, la línea RLPR-C. Sin embargo, los resultados obtenidos en el estudio de la regulación adrenérgica en el hígado perfundido contradicen los datos anteriores. Morgan y col. (89) observaron que la respuesta glucogenolítica en el hígado perfundido no se desensibilizó aún después de estimulaciones beta-adrenérgicas sucesivas. Así entonces, la existencia de mecanismos reguladores del tipo refractario o taquifiláctico de la respuesta beta-adrenérgica hepática que operen en un sistema fisiológico no está del todo clara.

## II. OBJETIVO

El objetivo de la presente tesis fue profundizar en el estudio de un aspecto de la regulación beta adrenérgica, la desensibilización, en el hígado de la rata. Para esto, utilizamos hepatocitos frescos aislados de ratas hipotiroideas en donde el componente beta-adrenérgico participa de manera importante en las acciones de las catecolaminas.

### III. MATERIAL Y METODOS

La parte correspondiente a materiales y métodos se da en el trabajo anexo.

#### IV. RESULTADOS

Los resultados de esta tesis han sido publicados en el trabajo: "Homologous beta-adrenergic desensitization in isolated rat hepatocytes." J.Adolfo GARCIA-SAINZ y Bertha MICHEL, Biochem.J.(1987) 246,331-336

##### RESUMEN DE RESULTADOS

( El número de las figuras que se presentan en esta sección corresponde al número de las figuras del trabajo anexo.)

En la fig 1 se presenta el curso temporal de la desensibilización beta-adrenérgica inducida por el isoproterenol a una concentración de  $100\mu\text{M}$ . El panel a muestra una disminución en la acumulación de AMPc (aproximadamente del 20-25%) inducida por el isoproterenol en las células preincubadas en ausencia del agonista, lo cual se debe por lo menos en forma parcial a una disminución en la viabilidad de los hepatocitos. Sin embargo, en las células preincubadas en presencia del agonista beta específico, la disminución en la acumulación del AMPc inducida por el isoproterenol fue mucho más rápida e impresionante. En el panel b se muestran los datos normalizados como porcentaje de la respuesta de las células incubadas sin el agonista. La preincubación con el isoproterenol reduce aproximadamente un 50% la respuesta de la célula a este agonista. La desensibilización ocurre rápidamente, con un T  $1/2$  de 3 min y alcanza niveles máximos al cabo de 15 min.; los siguientes experimentos se efectuaron preincubando 15 min en presencia o en ausencia del isoproterenol. La fig 2 presenta la desensibilización beta adrenérgica en función de la concentración de isoproterenol durante el periodo de prein-

cubación. Se observa que la magnitud de la desensibilización depende de la dosis de isoproterenol; hay una desensibilización máxima con una concentración de isoproterenol en el rango de 10-100 $\mu$ M, y la CE50 es aproximadamente de 50nM.

Los experimentos posteriores fueron realizados con el fin de definir: A. el tipo de desensibilización

B. su repercusión metabólica

C. si la desensibilización depende de la activación de la ciclasa o resulta solamente de la ocupación del receptor por el agonista

D. si Ni está involucrada en la desensibilización

#### 4.a. Caracterización de la desensibilización

La fig 3 muestra que la preincubación con isoproterenol reduce (aprox. 50%) la acumulación máxima de AMPc inducida por este agonista, sin afectar la CE50 del isoproterenol. La acumulación del AMPc inducida por glucagón no se altera por una exposición previa al agonista beta-adrenérgico. Esto indica que la desensibilización es específica para el isoproterenol (homóloga) y que la disminución en la acumulación del AMPc no se debe a un deterioro ni del hepatocito en general ni en el complejo de la Ac en particular.

#### 4.b. Consecuencias metabólicas de la desensibilización

En la fig 4 se observa que la desensibilización tiene consecuencias metabólicas, ya que la exposición previa al isoproterenol desensibiliza también la ureagénesis estimulada por el agonista beta específico, sin alterar aquella estimulada por el glucagon. También para la ureagénesis, la desensibilización apa-

rece como homóloga.

#### 4.c. Participación del AMPc en la desensibilización

Cuando las células se preincubaron en presencia de 10 $\mu$ M de propranolol con o sin isoproterenol no se desensibilizaron las acciones beta-adrenérgicas ni sobre la acumulación de AMPc ni sobre la ureagénesis. Estos datos indican que la simple ocupación del receptor por un antagonista no es suficiente para desencadenar la desensibilización beta adrenérgica. Estos resultados no se muestran en el trabajo anexado.

En la fig.5 y en la fig 6 se muestra el efecto de una preincubación de 15 min en presencia de glucagon, el cual activa efectivamente a la Ac, sobre la acumulación de AMPc y sobre la ureagénesis, respectivamente. Se observa que la preincubación con glucagon no desensibiliza la respuesta a isoproterenol (panel a de ambas figuras) ni altera la respuesta a este péptido (panel b de ambas figuras).

#### 4.d. Participación de Ni en la desensibilización

En la fig 7 se observa que el tratamiento de las ratas hipotiroideas con la Toxina Pertussis no altera la desensibilización beta adrenérgica inducida por el isoproterenol. Es necesario recalcar que en estos hepatocitos los valores basales de AMPc están altos con respecto a los valores obtenidos en hepatocitos de ratas hipotiroideas no tratadas con la toxina (3.68 $\pm$ 0.21 vs 1.14 $\pm$ 0.16 pmol/mg de peso húmedo, respectivamente). Si estos datos se normalizan y se expresan como porcentaje de la respuesta de las células preincubadas sin el agonista, la respuesta beta - adrenérgica en los hepatocitos preincubados en presencia del isoproterenol aparece francamente desensibilizada. Se estudió la

razón de la obtención de valores basales altos de AMPc en los hepatocitos de las ratas tratadas con la toxina y preincubados con el isoproterenol. Para esto, se estudió comparativamente el curso temporal de la acumulación de AMPc (en ausencia de metil-sobutilxantina, un inhibidor de la fosfodiesterasa del AMPc) inducida por la estimulación beta adrenérgica en células de ratas hipotiroideas controles y tratadas con Toxina Pertussis. Los resultados se muestran en la Fig 8. La conformación de ambas curvas fue esencialmente la misma. Aparecen ciertas diferencias en la parte descendiente de las curvas: en los animales tratados con la toxina la disminución en la acumulación de AMPc fue más lenta que en los animales controles y muestran una tendencia a estabilizarse, al cabo de los 60 min, sobre concentraciones de AMPc de 2 a 3 veces más altas que las que concentraciones de AMPc iniciales, en el tiempo 0.

#### 4.e. Reversibilidad de la desensibilización

En cuanto a la reversibilidad de la desensibilización, se estudiaron periodos de recuperación hasta de 150 min, en donde la respuesta adrenérgica permaneció disminuida con respecto a la respuesta de las células controles. No se estudiaron periodos más largos porque la viabilidad de los hepatocitos disminuyó notablemente ( a menos del 75% de viabilidad).

## V. DISCUSION

Los resultados de este trabajo indican que una activación breve del receptor beta adrenérgico en hepatocitos de ratas hipotiroideas conduce a una desensibilización. Esta desensibilización se reflejó tanto en la acumulación de AMPc como en un parámetro metabólico, la generación de urea, estimulados por el isoproterenol. El fenómeno resultó ser específico del agonista, u homólogo, es decir que no alteró la respuesta de otras hormonas - en este caso del glucagon- que operan a través del mismo sistema de transducción.

Estos datos están de acuerdo con los resultados publicados por un lado, por el grupo de Lam y Bar (90), quienes observaron que la incubación de rebanadas de hígado de rata con adrenalina por un periodo corto de 30 min desensibilizaba marcadamente la actividad de la Ac estimulada por agentes beta adrenérgicos, sin afectar la actividad enzimática estimulada por el glucagon. Por otro lado, el grupo de Gurr y Ruh (86) y el de Noda y col (87) reportaron que en cultivos primarios de hepatocitos de rata la activación beta-adrenérgica inducía una desensibilización del tipo homólogo. En estos trabajos, el agonista indujo una desensibilización con un componente inicial rápido (< 1 hr), seguido por una progresión más lenta del fenómeno, que se estabilizó al cabo de las 3 horas de exposición al agonista. El grupo de Gurr y Ruh reportó que el fenómeno fue pobremente reversible, lo cual está de acuerdo con lo que se presenta en este trabajo. Y finalmente, los resultados de esta tesis apoyan los de Reilly y Blecher (88)

quienes describieron el mismo fenómeno secundario a 1 hr de exposición al agonista beta-especifico sobre la activación de la Ac en una línea celular clonada (los hepatocitos RL-PR-C).

Estos resultados y los anteriores contradicen los que reportaron Morgan y col. (89), quienes trabajaron en hígado perfundido de ratas jóvenes. No observaron desensibilización de la respuesta glucogenolítica estimulada por un agonista beta-especifico, aún después de estimulaciones beta-adrenérgicas sucesivas. Estas diferencias en los resultados podrían explicarse por la utilización de diferentes modelos; aún cuando el hígado perfundido represente un buen sistema fisiológico, podría estar contaminado por hormonas endógenas u otros factores y por células no parenquimatosas que podrían influenciar el proceso. También es posible que en el modelo utilizado por Morgan y col. (hígado perfundido) exista una gran reserva de receptores para efectuar la respuesta final (glicogenólisis). Los hepatocitos frescos son un buen sistema fisiológico; son morfológica y funcionalmente idénticos a los del animal integro, en contraste con el cultivo de hepatocitos en monocapa y con la línea RL-PR-C.

Se ha demostrado que el AMPc puede inducir una desensibilización en algunas células (80); en particular, para la desensibilización heteróloga de las acciones beta-adrenérgicas se ha demostrado la participación de una proteína cinasa dependiente de AMPc (la proteína cinasa A), la cual fosforila y desactiva al receptor beta-adrenérgico (92). Los resultados de la fig 5 muestran que el glucagon es capaz de estimular la acumulación de AMPc de forma similar al isoproterenol; esto a través del mismo mecanismo de transducción que el agonista beta-especifico, es decir a través

de Ns. Sin embargo, la exposición previa de los hepatocitos al glucagon no alteró la respuesta de las células al isoproterenol. Este resultado excluye entonces a la proteína cinasa A, al AMPc, a la subunidad catalítica de la ciclasa y a Ns como posibles responsables de la desensibilización descrita en este trabajo. Es interesante recordar que el propranolol no indujo desensibilización beta-adrenérgica, lo cual indica que la simple ocupación del receptor no es suficiente y que se requiere la activación del receptor para disparar el proceso. Strasser y col (91) y Benovic y col (93) demostraron la fosforilación del receptor beta-adrenérgico catalizada por una proteína cinasa recientemente caracterizada, independiente de AMPc, asociada con la forma homóloga de la desensibilización. Benovic y col (93) lograron identificar, aislar y caracterizar esta cinasa y la llamaron "cinasa del receptor beta-adrenérgico", o beta-ARK (por las siglas en inglés). La beta-ARK tiene una especificidad de sustratos restringida, ya que no fosforila sustratos de otras cinasas como son las histonas. Esta enzima tiene como propiedad única la de fosforilar al receptor beta-adrenérgico sólo cuando está ocupado por el agonista. La forma libre del receptor, o el receptor ocupado por un antagonista no es sustrato de la enzima. La fosforilación del receptor disminuye la actividad funcional del receptor (99). Parece que esta cinasa tiene un papel importante en la regulación de la función del receptor beta-adrenérgico, al igual que de otros receptores acoplados a la Ac, que se desensibilizan de forma homóloga. La existencia de esta cinasa habla de un mecanismo general involucrado en la función del receptor - que sólo el

receptor ocupado por el agonista es sustrato de las enzimas reguladoras. La posible participación de esta cinasa en la desensibilización que se describe en este trabajo es muy atractiva; sin embargo, la fosforilación del receptor, su inactivación y la participación de esta u otras cinasas queda por demostrarse específicamente en este sistema.

Un mecanismo sorprendentemente similar opera en los bastones del segmento externo para conducir a una serie de reacciones disparadas por la luz y que van a provocar una disminución en el acoplamiento funcional de la rodopsina a la transducina; este fenómeno se conoce como adaptación luminosa (94). La rodopsina activada por la luz es el sustrato de una enzima llamada cinasa de rodopsina. Esta enzima fosforila la rodopsina, disminuyendo así su capacidad de interacción con la transducina (95). Se ha demostrado que la beta-ARK puede fosforilar a la rodopsina, pero únicamente en su forma activada por la luz, y que la cinasa de rodopsina puede a su vez fosforilar el receptor beta-adrenérgico sólo en su forma activada por el agonista (96). Cada cinasa muestra sin embargo preferencia por su sustrato homólogo. Esto sugiere que la beta-ARK y la cinasa de rodopsina pueden ser miembros relacionados de una familia de cinasas de receptores, que tienen como función la de modular la actividad celular de éstos. De hecho, se ha observado que la estimulación de la Ac por prostaglandina E2, bajo condiciones que conducen a una desensibilización homóloga ( del receptor de prostaglandina E2), también conduce a la traslocación de la beta-ARK del citosol a la membrana plasmática (97). Esto sugiere fuertemente que la beta-ARK es capaz de fosforilar receptores acoplados a la Ac, diferentes a

los receptores beta-adrenérgicos. Convendría entonces referirse a la beta-ARK como "cinasa de receptores acoplados a la Ac"; su función en la desensibilización homóloga se explicaría pensando que sólo los receptores activados por el agonista son sustratos de la cinasa. Así entonces, la beta-ARK sólo fosforilaría aquellos receptores que han sido ocupados y por ende activados por sus agonistas, dejando el resto de los receptores acoplados a la Ac intactos. Se propone como mecanismo clave un cambio conformacional promovido por el agonista, el cual va a exponer sitios de fosforilación previamente escondidos en el receptor. Tales receptores acoplados a la Ac deberán compartir un dominio homólogo en donde se encuentran los sitios de fosforilación.

El grupo de Heyworth y Houslay (98) demostró que la incubación de hepatocitos intactos con glucagon conducía a una desensibilización dependiente de la dosis o a un "desacoplamiento" de la estimulación de la Ac membranal por el glucagon. Sugirieron entonces que la desensibilización se debía a una lesión en la proteína regulada por nucleótidos de guanina, o  $N_s$ , la cual está involucrada en mediar las acciones estimulatorias del glucagon, y no en el receptor ni en la unidad catalítica de la Ac. En un trabajo posterior (99), el mismo grupo demostró que la habilidad del glucagon para desensibilizar la actividad de la Ac en hepatocitos intactos se bloqueaba con un pretratamiento con la toxina Pertussis o IAP. La IAP intensificó la respuesta de los hepatocitos a la acción del glucagon, esto mediante una inhibición de la expresión de la desensibilización y mediante una eliminación de la entrada inhibitoria residual sobre la Ac expresada en presen-

cia del glucagon. En el trabajo que aquí se presenta, un tratamiento con glucagon no alteró la respuesta subsecuente ni a glucagon ni a isoproterenol. La desensibilización reportada por Heyworth y Houslay fue rápida y breve, ya que se manifestó a los 5 min y desapareció gradualmente. Los experimentos de esta tesis se hicieron preincubando 15 min con el glucagon, seguidos de un lavado de 3-4 min. Es posible que la ausencia de una desensibilización en la respuesta a glucagon se deba al tipo de condiciones que se utilizaron en los experimentos. Otros autores han descrito que las acciones del glucagon se desensibilizan en células enteras después de varias horas de exposición al agonista (100,87).

Los resultados de esta tesis muestran que la toxina Pertussis no alteró la desensibilización inducida por el isoproterenol; este resultado excluye a Ni como mediadora de la desensibilización inducida por el agonista beta-adrenérgico. También indica que el proceso que aquí se describe es distinto al que reportan Heyworth y Houslay (99). Clark y col (101) reportaron que la desensibilización beta-adrenérgica en células de linfoma no se alteró mediante un tratamiento con toxina Pertussis, lo cual está de acuerdo con lo que se reporta en esta tesis. En un trabajo posterior, el grupo de García-Sáinz y col. observó que la activación farmacológica (PMA) o fisiológica (vasopresina) de la pKC inhibía la acción de los agentes acoplados de forma estimulatoria a la Ac, como son el isoproterenol y el glucagon en hepatocitos de ratas hipotiroideas, induciendo así una desensibilización heteróloga de la Ac (102); la lesión en ese caso parece localizarse a nivel de la proteína Ms. La desensibilización beta-adrenérgica heteróloga y la homóloga, que se aquí se describe,

resultaron ser aditivas, lo cual indica que estos procesos operan a través de rutas diferentes y que posiblemente involucran diferentes sitios de acción. La homóloga parece involucrar una alteración a nivel del receptor beta-adrenérgico, mientras que la heteróloga parece alterar a  $N_s$ . Es interesante mencionar que la desensibilización heteróloga de la Ac se redujo notablemente mediante un tratamiento con toxina Pertussis (102). El grupo de Heyworth y col. (99) demostró que la desensibilización inducida por glucagon se bloquea con la toxina Pertussis. Este dato enfatiza las similitudes en los mecanismos de acción que existen entre tal desensibilización y el tipo heterólogo descrito por García-Sáinz y col (102). No se conoce el mecanismo mediante el cual la toxina Pertussis bloquea la desensibilización de la Ac inducida por la activación de la pKC. Los resultados de ese trabajo (102) constituyen evidencias fuertes para indicar que la pKC ejerce una retroregulación sobre otros sistemas señaladores, en este caso sobre el receptor beta-adrenérgico y sobre el receptor de glucagon, ambos acoplados de manera estimuladora a la Ac, mediante una interacción heteróloga. La dinámica de la regulación de estas respuestas en donde operan interacciones homólogas y heterólogas tiene una gran importancia para lograr una respuesta celular precisa e integrada.

Se están estudiando las bases bioquímicas que participan en el fenómeno de desensibilización. Así, por ejemplo, parece que los mecanismos que conducen a una desensibilización homóloga son distintos a aquellos que conducen a una desensibilización heteróloga; se acepta generalmente que la desensibilización heteró-

loga ocurre después de la rápida desensibilización homóloga. En un trabajo reciente, el grupo de Clark y col. (103) modificaron la hipótesis que concernía los mecanismos de desensibilización beta- adrenérgicos en las células S49WT. Observaron que la desensibilización de las células S49WT fue heteróloga en respuesta a bajas concentraciones de (-)epinefrina (50nM) y homóloga en respuesta a concentraciones mayores de (-)epinefrina (10uM). Sugirieron entonces que la desensibilización de la estimulación hormonal de la Ac inducida por el agonista involucra dos rutas diferentes, que se muestran en la fig 9. La ruta heteróloga requiere AMPc y una proteína cinasa dependiente de AMPc y se activa cuando las células S49WT se pretratan con concentraciones bajas de epinefrina, PGE<sub>2</sub>, o forskolina. No se sabe si existen otros pasos en una cascada análoga a la de la proteína cinasa dependiente de AMPc, como regulación de una fosforilasa mediante la activación de una cinasa fosforilasa o mediante la inactivación de una fosfatasa a través de la activación de un inhibidor. La segunda ruta, que conduce a una desensibilización homóloga, es independiente de AMPc o de una cinasa dependiente de AMPc, y requiere niveles más altos de hormonas, con el fin de saturar a los receptores. Si los datos presentados en el trabajo de Clark y col. se corroboran en otros sistemas logran aclararse ciertas discrepancias que existen en cuanto a los mecanismos que conducen a ambos tipos de desensibilizaciones. En la fig. 10 se muestra de forma esquemática los mecanismos que podrían estar involucrados en la desensibilización homóloga. Inmediatamente después de la estimulación del receptor por el agonista ocurren cambios conformacionales que conducen no sólo a la estimulación de los



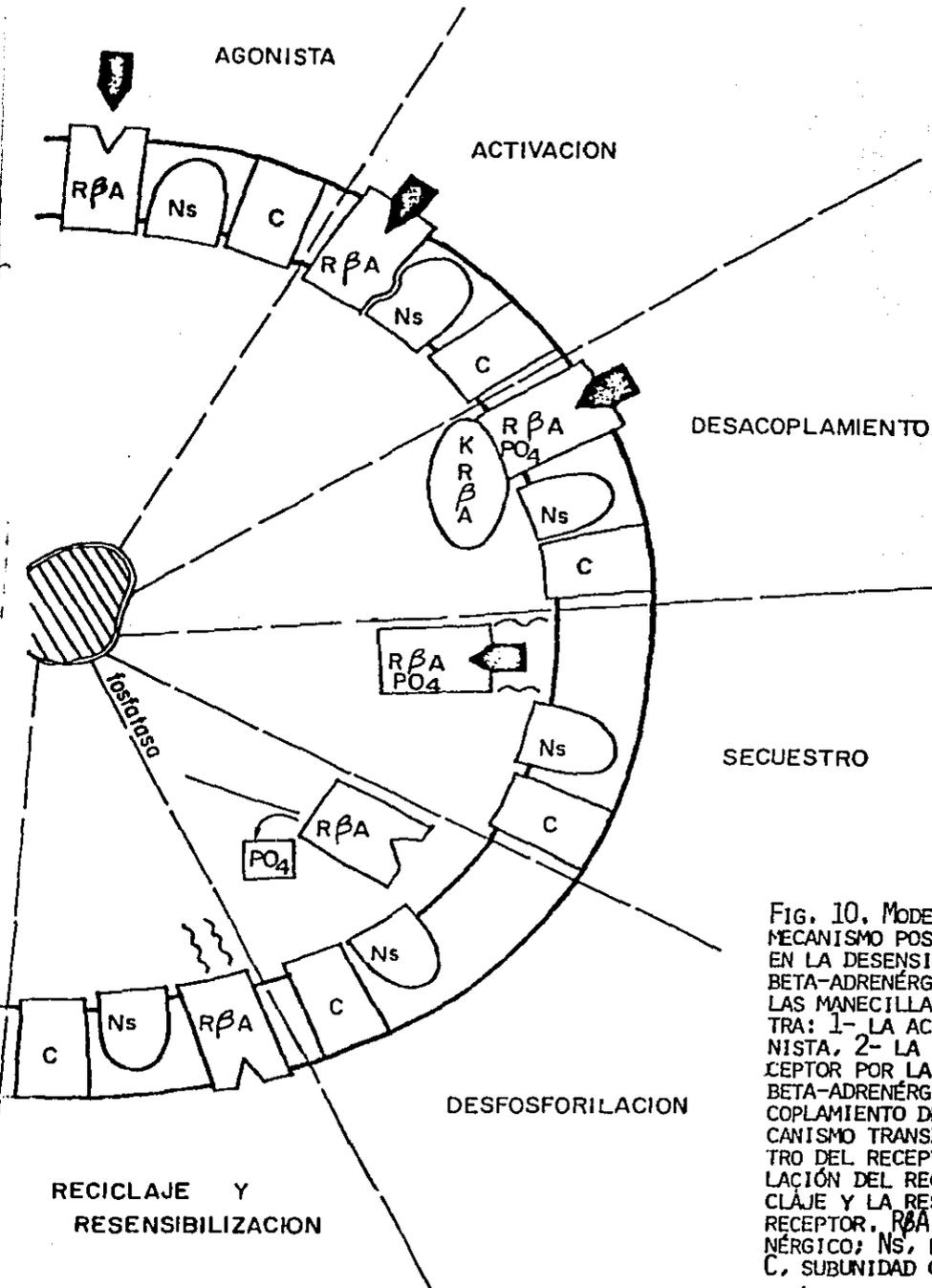


FIG. 10. MODELO ESQUEMÁTICO DE UN MECANISMO POSIBLEMENTE INVOLUCRADO EN LA DESENSIBILIZACIÓN HOMÓLOGA BETA-ADRENÉRGICA. EN EL SENTIDO DE LAS MANECILLAS DEL RELOJ, SE MUESTRA: 1- LA ACTIVACIÓN POR EL AGONISTA, 2- LA FOSFORILACIÓN DEL RECEPTOR POR LA CINASA DEL RECEPTOR BETA-ADRENÉRGICO (KRβA) Y EL DESACOPPLAMIENTO DEL RECEPTOR DE SU MECANISMO TRANSDUCTOR, 3- EL SECUESTRO DEL RECEPTOR, 4- LA DEFOSFORILACIÓN DEL RECEPTOR Y 5- EL RECICLAJE Y LA RESENSIBILIZACIÓN DEL RECEPTOR. RβA, RECEPTOR BETA-ADRENÉRGICO; Ns, PROTEÍNA ACOPLADORA; C, SUBUNIDAD CATALÍTICA.

LEFKOWITZ Y COL. (1986) TIPS

mecanismos efectores sino también a la translocación de la beta-ARK del citosol a la membrana plasmática. Esta translocación favorece la unión de la enzima a sitios de fosforilación previamente escondidos y que se exponen durante la activación. Ocurre entonces la fosforilación del receptor, la cual conduce a una pérdida en la habilidad de acoplamiento del receptor con la proteína regulada por nucleótidos de guanina. En algún punto después del desacoplamiento del receptor con su mecanismo transductor, el receptor es secuestrado dentro de la célula y es transferido a vesículas intracelulares, las cuales pueden separarse de la membrana plasmática mediante ultracentrifugación. Se ha demostrado que el desacoplamiento funcional y el secuestro del receptor son dos pasos distintos (104,105). En estas vesículas, no se encuentran presentes ni Gs, ni Gi, ni la Ac (106). El ligando hidrofóbico pindolol marcado con iodo radioactivo puede penetrar dentro de la célula, y utilizarse entonces para determinar el número total de receptores beta- adrenérgicos tanto en membrana plasmática como en las vesículas intracelulares. El antagonista beta- adrenérgico hidrofílico GCP12177 tritiado puede utilizarse para monitorear la pérdida de receptores de superficie, ya que no puede atravesar la membrana plasmática. El receptor beta- adrenérgico desensibilizado, desacoplado, y libre tiene una menor afinidad para sus agonistas que los receptores acoplados funcionalmente a la Ac (107). Aparentemente durante el proceso de desensibilización no ocurren daños irreversibles en el receptor. Se ha observado que al eliminar al agonista beta- adrenérgico del entorno de las células desensibilizadas, los

receptores secuestrados regresan a la membrana celular y se acoplan funcionalmente al resto de los componentes de la Ac (108). Parece que dentro del compartimento secuestrado, el receptor se defosforila, se reactiva y se prepara para reciclarse nuevamente a la superficie de la célula. Se sugiere la participación de una fosfatasa específica como responsable de eliminar el o los grupos fosfato del receptor beta- adrenérgico. Mientras que los pasos de fosforilación y desactivación del esquema parecen análogos a lo que ocurre en la adaptación de la luz/ fosforilación de la rodopsina, el secuestro del receptor no presenta una analogía obvia en la ruta de la adaptación de la luz. En realidad podría pensarse que la fosforilación por la beta-ARK involucra sitios diferentes en el receptor que los que utiliza la cinasa dependiente de AMPC, y que la fosforilación por la beta- ARK constituye una señal que conduce al secuestro-internalización.

Resulta de gran interés aclarar los mecanismos bioquímicos y moleculares que participan en las desensibilizaciones homóloga y heteróloga, y así ayudar a explicar un gran número de procesos en la biología. La fotoadaptación al igual que la tolerancia a agentes terapéuticos, como a la insulina y al glucagon, constituyen ejemplos de desensibilizaciones. Varios grupos de investigación siguen estudiando este fenómeno en diferentes sistemas, en particular el grupo de R.J. Lefkowitz, de C.C. Malbon, de R.B. Clark en los Estados Unidos y el grupo del Dr J.A. García-Sáinz, entre otros, en México.

## CONCLUSIONES

Las conclusiones que se desprenden de esta tesis son las siguientes:

En hepatocitos de ratas hipotiroideas,

1. La estimulación beta-adrenérgica conduce a una desensibilización homóloga.

2. La desensibilización parece depender de la ocupación y activación del receptor por el agonista y no de la estimulación de la acumulación del segundo mensajero AMPc

3. La acción del glucagon no se desensibiliza en este tipo de experimentos

4. El proceso de desensibilización no parece involucrar a Ni, ya que es insensible a la toxina Pertussis

5. La desensibilización se evidencia tanto en la acción inmediata (AMPc), como en el efecto metabólico (ureogénesis).

## BIBLIOGRAFIA

- 1- Alberts, B., Bray, B., Lewis, J., Roberts, K., Watson, J.D. (1983) *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing Inc NY USA, 717-780
- 2- Goodman, A., Goodman, L.S., Gillman, A. Eds (1980) *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 6th Ed. Macmillan Publ. Co
- 3- García-Sáinz, J.A. (1987) *Hormonas, Mensajeros Químicos y Comunicación Celular*. Fondo de Cultura Económica, México.
- 4- Williams, R.H. Ed. (1974) *Textbook of Endocrinology*, 5th Ed, Philadelphia.Saunders.
- White, A. et al..(1978) *Principles of Biochemistry*, 6th Ed. pp 1187-1317. NY Mc Graw Hill.
- 5- Langley, J.N. (1905), *J. Physiol. (Lond.)* 33,374.
- 6- Berridge, M.J.(1986) *Sc. American*, 112
- 7- Mountcastle, V.B. (1980), *Medical Physiology*, 14th Ed., The C.V. Mosby Co.
- 8- Bradshaw, R.A., Frazier, W.A. (1977), *Curr. Top. Cell. Regul.* 12:1-37
- 9- Harking, W.H. (1931), *Chem. Rev.* 9:389-465
- 10- Blasko, H. (1952), *Pharmacol. Rev.* 4:415-458
- 11- Dale, H.H. (1906), *J. Physiol. (Lond.)*, 34:163-206
- 12- Alquist, R.P. (1948), *Am. J. Physiol.* 153:586-600
- 13- Staler, I.H., Powell, C.E. (1957) *Fed. Proceedings* 16:336
- 14- Lands, A.M., Arnold, A., McAuliff, J.P., Luduena, F.P., Brown, T.G. (1967) *Nature*, 214:597-598
- 15- Langer, S.Z. (1977) *Br. J. Pharmacol.* 60, 481-497
- 16- Lefkowitz, R.J., Stadel, J.M., Caron, M.G. (1983) *Ann. Rev.*

Biochem. 52, 159-186

17- Dixon, R.A.F., Kobilka, B.K., Strader, D.J., Benovic, J.L., Dohlman, H.G., Frielle, T., Bolanowski, M.A., Bennett, C.D., Rands, E., Diehl, R.E., Mumford, R.A., Slater, E.E., Sigal, I.S., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., Strader, C.D. (1986) Nature, 321, 75-79

18- Moxham, C.P., George, S.T., Graziano, M.P., Brandwein, H.J., Malbon, C.C. (1986) J. Biol. Chem., 261, 14562-14570

19- Lomasney, J.W., Fredrick Leeb Lundberg, L.M., Coleccia, S., Regan, J.W., deBernardis, J.F., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1986) J. Biol. Chem. 261, 7710-7716

20- Regan, J., Nakata, H., De Marinis, B.M., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1986) J. Biol. Chem. 261, 3894-3900

21- Fain, J.N., Garcia-Sáinz, J.A. (1980) Life Sci. 26, 1183-1194

22- Petrash, A.C., Bylund, B.D. (1986) Life Sci. 38, 2129

23- Garcia-Sáinz, J.A., Hernandez-Sotomayor, S.M.T. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci USA 82,6727

24- Sutherland, E.W., Robinson, G.A., Butcher, R.W. (1968) Circulation, 37, 279-289

25- Sutherland, E.W. (1972) Science, 177, 401-408

26- Rodbell, M., Birnbaumer, L., Pohl, S.L., Krans, H.M.J. (1971) J. Biol. Chem., 246, 1877-1882

27- Rodbell. M. (1980) Nature, 284, 17-22

28- Pedraza-Chaverri, J., Alatorre González, M.C., Pena, J.C., Garcia-Sáinz, J.A. (1986) Life Sci. 38, 1005

29- Garcia-Sáinz, J.A. (1981) Febs Lett 126,306

30- Martinez Olmedo, M.A., Garcia-Sáinz, J.A. (1984) Eur. J. Pharmacol. 99,115

- 31- Cassel, D., Selinger, Z. (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, 452, 538-545
- 32- Cassel, D., Eckstein, F., Larve, M., Selinger, Z. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 9835-9841
- 33- Maguire, M.E., Van Arsdale, T.M., Gilman, A.G. (1976) *Molec. Pharmacol.*, 42, 335-338
- 34- Garcia-Sáinz, J.A., Boyer, J.L., Michel, T., Sawyer, D., Stiles, G.L., Dohlman, H., Lefkowitz, R.J. (1984) *Febs Lett.*, 172, 95
- 35- Cerione, R.A., Strulovici, B., Benovic, J.L., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G. (1983) *Nature*, 306, 562
- 36- Gilman, A.G. (1984) *J. Clin. Invest.*, 73, 1
- 37- Spiegel, A.M., Gierschick, P., Levine, M.A., Downs, R.W. jr (1985) *The New England Journal of Medicine*, 312, 26
- 38- Spiegel, A.M. (1987) *Mol. Cell Endocrinology*, 49, 1
- 39- Malbon, C.C., Rapiejko, P.J., Garcia-Sáinz, J.A. (1984) *Febs. Lett.* 176, 301
- 40- Ui, M. (1984) *Trends Pharmacol. Sci.*, 5, 277-279
- 41- Vaughan, M. (1983) *Harvey Lect.* 77, 43-62
- 42- Boyer, J.L., Garcia, A., Posadas, C., Garcia-Sáinz, J.A. (1984) *J. Biol. Chem.*, 259, 8076-8079
- 43- Hokin, L.E. (1987) *Trends Pharm. Sci.*, 8, 53
- 44- Michell, R.H. (1985) *Biochim. Biophys. Acta*, 415, 81
- 45- Berridge, M.J. (1987) *Ann. Rev. Biochem.*, 56, 159-193
- 46- Litosch, F., Fain, J.N. (1986) *Life Sci.*, 39, 187-194
- 47- Taylor, C.W., Merrit, J.E. (1986) *Trends Pharmacol. Sci.*, 7, 238-242

- 48- Downes, C.P., Michell, R.H. (1985) In Molecular Mechanisms of Transmembrane Signaling, Ed P. Cohen, M Houslay, pp3-56 NY Elsevier
- 49- Wakelam, C.J., Davies, S.A., Houslay, M.D., McKay, I., Marshall, C.J., Hall, A. (1986) Nature, 323, 173-176
- 50- Blackmore, P.F., Bocckino, S.B., Waynick, L.E., Exton, J.H. (1985) J. Biochem., 260, 144, 77-83
- 51- Shand, C.F., Wong, K. (1985) Biochem. Biophys. Res. Commun., 133, 161-167
- 52- Crockcroft, S., (1987) Trends Pharmacol. Sci., 12, 75
- 53- Berridge, M.J., Irvine, R.F. (1984) Nature, 312, 315
- 54- Prentki, M., Biden, T.J., Janjic, D., Irvine, R.F., Berridge, M.J., Wollhein, C.B. (1984) Nature, 309, 562-564
- 55- Spat, A., Bradfort, P.G., McKinney, J.S., Rubin, R.P., Putney, J.W. (1986) Nature, 319, 514
- 56- Spat, A., Fabiato, A., Rubin, R.P. (1986) Biochem. J., 233, 929-932
- 57- Hansen, C.A., Mah, S., Williamson, J.R. (1986) J. Biol. Chem., 261, 8100-8103
- 58- Houslay, M.D., (1987) Trends Pharmacol. Sci., 12, 1
- 59- Nishizuka, Y. (1984) Nature, 308, 693-698
- 60- Nishizuka, Y. (1986) Science, 233, 305-312
- 61- May, W.S., Sahyoun, N., Wolf, M., Cuatrecasas, P. (1985) Nature, 317, 549-551
- 62- Corvera, S., Garcia-Sáinz, J.A. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 119, 1128-1133
- 63- Garcia-Sáinz, J.A., Hernandez-Sotomayor, S.M.T., Tussie-Luna, M.I. (1986) Biochim. Biophys. Acta 887, 73

- 64- Garcia-Sáinz, J.A., Mendlovic, F., Martinez-Olmedo, M.A. (1985) *Biochem. J.* 228, 277
- 65- Fain, J.N. (1981) *Life Sci.* 28, 1745
- 66- Kawai, Y., Arinse, I.J. (1983) *J. Biol. Chem.*, 258, 4364-4371
- 67- Studer, J.B., Borle, A.B. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 7987-7993
- 68- Blair, J.B., James, M.E., Foster, J.L. (1978) *J. Biol. Chem.* 254, 7579-7584
- 69- Corvera, S., Garcia-Sáinz, J.A. (1983) *Febs Lett.* 153, 366
- 70- Corvera, S., Hernandez-Sotomayor, S.M.T., Garcia-Sáinz, J.A. (1984) *Biochim. Biophys. Acta*, 803, 95
- 71- Hernandez-Sotomayor, S.M.T., Garcia-Sáinz, J.A. (1984) *Febs. Lett.*, 166, 385
- 72- Malbon, C.C., Li, S., Fain, J.N. (1978) *J. Biol. Chem.*, 253, 8820-8825
- 73- Malbon, C.C. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255, 8692
- 74- Huerta-Bahena, J., Villalobos Molina, R., Garcia-Sáinz, J.A. (1983) *Biochim. Biophys. Acta*, 763, 112-119
- 75- Aggerbeck, M., Ferry, N., Zafrani, E.S., Billon, M.C., Barouki, R., Hanoune, J. (1983) *J. Clin. Invest.*, 71, 476-486
- 76- Nakamura, T., Tomomura, A., Noda, C., Shimoji, M., Ichihara, A. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 9283-9289
- 77- Kunos, G., Hirata, F., Ishac, E.J.N., Tchakarov, L. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 6178-6182
- 78- Ishac, E.J.N., Kunos, G. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 53-57
- 79- Itoh, H., Okahima, F., Ui, M. (1984) *J. Biol. Chem.*, 259,

15464-15473

- 80- Sibley, D.R., Lefkowitz, R.J. (1985) *Nature*, 317, 124-129
- 81- Harden, K.T. (1983) *Pharmacol. Rev.*, 35, 5
- 81- Lefkowitz, R.J., Stadel, J.M., Caron, M.G. (1985) *Ann. Rev. Biochem.*, 52, 159-186
- 82- Chuang, D.M., Costa, E. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 3025-3028
- 83- Chuang, D.M., Kinnier, W.J., Farber, L., Costa, E. (1980) *Molec. Pharmacol.*, 18, 342-355
- 84- Su, Y.F., Harden, T.K., Perkins, J.P. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255, 7410-7419
- 85- Lefkowitz, R.J., Wewssels, M., Stadel, J.M. (1980) *Curr. Top. Cell. Regul.*, 17, 205-230
- 86- Gurr, J.A., Ruh, T.A. (1980) *Endocrinology*, 107, 1309-1319
- 87- Noda, C., Shinjyo, F., Tomomura, A., Kato, S., Nakamura, T., Ichihara, A. (1984) *J. Biol. Chem.*, 259, 7747-7754
- 88- Reilly, T.M., Blecher, M. (1982) *Biochim. Biophys. Acta*, 720, 126-132
- 89- Morgan, N.G., Shuman, E.A., Exton, J.H., Blackmore, P.F. (1982) *J. Biol. Chem.*, 257, 13907-13910
- 90- Lam, V., Bar, H.P. (1976) *Biochem. Pharmacol.*, 25, 2103-2104
- 91- Strasser, R.H., Sibley, D.R., Lefkowitz, R.J. (1986) *Biochem. J.*, 25, 1371-1377
- 92- Benovic, J.L., Pike, L.J., Cerione, R.A., Staniszewski, C., Yashimasa, T., Codina, J., Caron, M.C., Lefkowitz, R.J. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 7094-7101
- 93- Benovic, J.L., Strasser, R.H., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J.

- (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 83, 2797-2801
- 94- Wilden, V., Hall, S.W., Kuhn, H. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 1174-1178
- 95- Strichi, H., Yamamoto, K., Somers, R.L. (1984) Vision Res., 24, 1523-1531
- 96- Benovic, J.V., Mayor, F.Jr, Somers, R.L., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1986) Nature, 321, 869-872
- 97- Strasser, R.H., Benovic, J.L., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 83,
- 98- Heyworth, C.M., Houslay, M.D. (1983) Biochem. J., 214, 93-98
- 99- Heyworth, C.M., Hanski, E., Houslay, M.D. (1984) Biochem. J., 222, 189-194
- 100- Plas, C., Nunez, J. (1975) J. Biol. Chem., 250, 5304-5311
- 101- Clark, R.B., Goka, T.J., Proll, M.A., Friedman, J. (1986) Biochem. J., 235, 399-405
- 102- Hernandez-Sotomayor, S.M.T., Macias-Silva, M., Plevanski, M., Garcia-Sainz, J.A. , en prensa.
- 103- Clark, R.B., Kunkell, M.W., Friedmann, J., Goka, T.J., Johnson, J.A. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 1442
- 104- Waldo, G.L., Northup, J.K., Perkins, J.P., Harden, T.K. (1983) J. Biol. Chem., 258, 13900-13908
- 105- Sibley, D.R., Strasser, R.H., Daniel, K., Lefkowitz, R.J. (1986) FASEB, 45(4) 798A
- 106- Harden, T.K. et al, (1980) Science 210, 441; Waldo, G.L., Northrup, J.P., Perkins, T.K., Harden, T.K. (1983) J. Biol. Chem., 258, 13900
- 107- Su, F.Y., Harden, T.K., Perkins, J.P., (1980) J. Biol. Chem., 255, 7410

# Homologous $\beta$ -adrenergic desensitization in isolated rat hepatocytes

J. Adolfo GARCÍA-SÁINZ\* and Bertha MICHEL

Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-248, 04510 México D.F., México

Hepatocytes from hypothyroid rats have a marked  $\beta$ -adrenergic responsiveness. Preincubation of these hepatocytes with isoprenaline induced a time-dependent and concentration-dependent desensitization of the  $\beta$ -adrenergic responsiveness without altering that to glucagon (homologous desensitization). The desensitization was evidenced both in the cyclic AMP accumulation and in the stimulation of ureagenesis induced by the  $\beta$ -adrenergic agonists. Under the same conditions, preincubation with glucagon induced no desensitization. Propranolol was also unable to induce desensitization, but blocked that induced by isoprenaline. Pertussis-toxin treatment did not alter the homologous  $\beta$ -adrenergic desensitization induced by isoprenaline.

## INTRODUCTION

Desensitization is a widespread regulatory phenomenon in which cell exposure to a hormone, neurotransmitter, autacoid, or in general to external stimuli, results in a decreased cell responsiveness. Two major types of desensitization have been described: (1) homologous desensitization, when the cell sensitivity to the desensitizing agent is decreased, whereas that to other agents remains unchanged; and (2) heterologous desensitization, when the stimulation by one agonist results in a more general effect decreasing cell responsiveness to several structurally unrelated agents, working through different receptors.

The  $\beta$ -adrenergic-receptor-linked adenylate cyclase has been one of the most widely studied systems, and both homologous and heterologous types of desensitization have been described [reviewed by Harden (1983) and Sibley & Lefkowitz (1985)].

Rat hepatocytes from normal adult rats scarcely respond to  $\beta$ -adrenergic agonists. However, there are a number of normal and pathological conditions in which  $\beta$ -adrenoceptors play an important role in the actions of catecholamines in hepatocytes; they include fetal-rat liver (Sherline *et al.*, 1974), juvenile rats (Blair *et al.*, 1979), hepatic hyperplasia after surgical or chemical partial hepatectomy (Aggerbeck *et al.*, 1983; Huerta-Bahena *et al.*, 1983), hypothyroidism (Malbon *et al.*, 1978; Corvera *et al.*, 1984), adrenalectomy (Bitsensky *et al.*, 1970) and cholestasis (Aggerbeck *et al.*, 1983). Furthermore, acquisition of a  $\beta$ -adrenergic response by adult rat hepatocytes during primary culture has also been observed (Nakamura *et al.*, 1983).

Using primary cultures of rat liver parenchymal cells, Gurr & Ruh (1980) and Noda *et al.* (1984) observed that isoprenaline induces  $\beta$ -adrenergic desensitization. Similarly, Reilly & Blecher (1982) observed that cultured differentiated RL-PR-C hepatocytes are desensitized to isoprenaline after exposure to this  $\beta$ -adrenergic agonist. On the contrary, using perfused rat liver, Morgan *et al.* (1982) observed no  $\beta$ -adrenergic desensitization even

after successive  $\beta$ -adrenergic stimulations. We further examined the phenomenon of  $\beta$ -adrenergic desensitization, using fresh hepatocytes from hypothyroid rats. Our results indicate that short-term exposure to isoprenaline leads to an homologous desensitization of the  $\beta$ -adrenoceptor.

## MATERIALS AND METHODS

6-*N*-Propyl-2-thiouracil, methylisobutylxanthine, (-)-isoprenaline, ( $\pm$ )-propranolol, urease, L-glutamine and L-ornithine were obtained from Sigma Chemical Co. Cyclic [<sup>3</sup>H]AMP (32 Ci/nmol) was obtained from New England Nuclear. Pertussis toxin was purified from vaccine concentrates, generously provided by the National Institute of Hygiene (México), by the method of Sekura *et al.* (1983). Glucagon was generously given by Eli Lilly.

Female Wistar rats (approx. 250 g) fed *ad libitum* were used. Hypothyroidism was induced by giving the rats water containing 0.015% propylthiouracil for 40-50 days; hypothyroidism was assessed by decreased weight gain, dryness of the fur and decreased blood concentrations of tri-iodothyronine (Corvera *et al.*, 1984). Pertussis toxin (25  $\mu$ g/100 g, intraperitoneally) was administered 3 days before the experiment was performed. Angiotensin II produces a 30-45% decrease in the accumulation of cyclic AMP induced by glucagon in hepatocytes; administration of this dose of toxin completely blocked the ability of angiotensin II to decrease glucagon-induced cyclic AMP accumulation (see Pobiner *et al.*, 1985; Lynch *et al.*, 1986).

Hepatocytes were isolated by the method of Berry & Friend (1969). Isolation, washings and incubation of the cells were done in Krebs-Ringer bicarbonate buffer (120 mM-NaCl, 5 mM-KCl, 1.3 mM-CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM-MgSO<sub>4</sub>, 10 mM-NaHCO<sub>3</sub>) saturated with O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (19:1), pH 7.4 at 37 °C.

To induce desensitization, the cells (40 mg/ml) were preincubated in the absence or presence of agonists; after

\* To whom reprint requests should be addressed.

this preincubation, the cells were washed by centrifugation and resuspension three times with Krebs-Ringer bicarbonate buffer at 37 °C. and the effects of the agents were tested. The washing procedure took 3-4 min. In all the experiments, the cells obtained from a liver were divided into two groups (control and experimental), and they were processed in parallel. To determine the rate of ureagenesis, the cells were incubated in buffer supplemented with 10 mM-glutamine and 2 mM-ornithine for 60 min; urea was quantified enzymically (Gutman & Bergmeyer, 1974) in the cell supernatants. Cyclic AMP accumulation 2 min after the addition of the agents was quantified in cells plus medium by the method of Gilman (1970) as modified by Brown *et al.* (1971). In the cyclic AMP experiments 100  $\mu$ M-methylisobutylxanthine was present to inhibit phosphodiesterase activity.

## RESULTS

To examine whether  $\beta$ -adrenergic activation in fresh hepatocytes leads to desensitization, liver cells were incubated for different times in the absence or presence of 100  $\mu$ M-isoprenaline; after this preincubation, the cells were washed three times and incubated for 2 min in the presence of 1  $\mu$ M-isoprenaline and 100  $\mu$ M-methylisobutylxanthine, the reaction was stopped and cyclic AMP accumulation determined. Fig. 1(a) shows that during prolonged incubation there was some decrease (approx. 20-25%) in the accumulation of cyclic AMP induced by isoprenaline in cells preincubated in the absence of any agent; this was at least partially due to a decrease in viability ( $\sim 10\%$ ), as evidenced by Trypan Blue exclusion and lactate dehydrogenase release; such

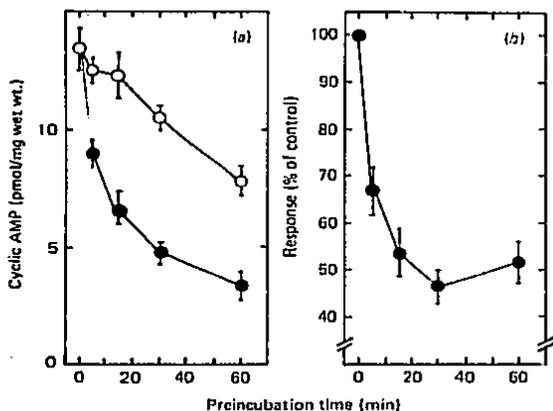


Fig. 1. Time course of the isoprenaline-induced desensitization in hepatocytes

Hepatocytes were preincubated without (○) or with (●) 100  $\mu$ M-isoprenaline; the cells were washed and re-challenged with 1  $\mu$ M-isoprenaline in the presence of 100  $\mu$ M-methylisobutylxanthine at the times indicated. (b) presents the normalization of the data expressed as percentages of control (preincubated without agonist) response. Mean values are plotted, and vertical lines represent the S.E.M. for four experiments using different cell preparations.

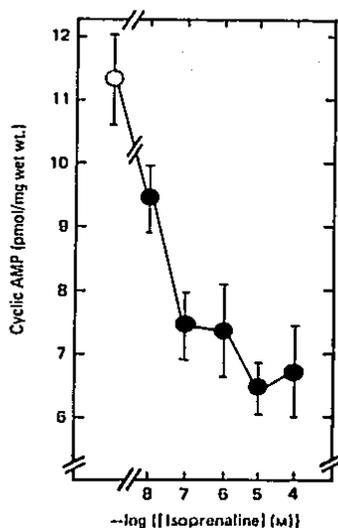


Fig. 2.  $\beta$ -Adrenergic desensitization as a function of isoprenaline concentration during preincubation

Hepatocytes were incubated for 15 min with the concentrations of isoprenaline indicated (○, control), washed, and challenged with 1  $\mu$ M-isoprenaline in the presence of 100  $\mu$ M-methylisobutylxanthine. Mean values are plotted, and vertical lines represent the S.E.M. for four determinations using different cell preparations.

decrease in cell viability was identical in the control and desensitized group. However, much faster and more impressive was the diminution observed in the cells preincubated with the  $\beta$ -adrenergic agonist. The magnitude of the desensitization and the time course of the process can be more clearly observed if the data are normalized as the percentage of the response of cells preincubated without agonist (Fig. 1b). Preincubation with the agonist produced a decrease in the response of approx. 50%; it took place rather rapidly, with a  $t_{1/2}$  of approx. 3 min, and reached a near-maximal desensitization at 15 min. This time of preincubation was used in all the following studies.

The effect of the concentration of agonist during the preincubation was next studied, and the results are presented in Fig. 2. The desensitization induced by isoprenaline was concentration-dependent, with a maximal desensitization observed in the range of 10-100  $\mu$ M-isoprenaline and an  $EC_{50}$  (concn. giving 50% of maximum effect) of approx. 50 nM. To obtain the maximal desensitization, 100  $\mu$ M-isoprenaline was used during the preincubation in all the following studies.

Further experiments were performed in order to define (A) the type of desensitization, (B) its metabolic repercussion, (C) if cyclic AMP accumulation, i.e. cyclase activation, was required or if the desensitization was due to receptor occupation or activation, and (D) if the guanine-nucleotide-binding regulatory protein ('Ni') was involved in the desensitization process.

The accumulation of cyclic AMP induced by different concentrations of isoprenaline or glucagon in cells

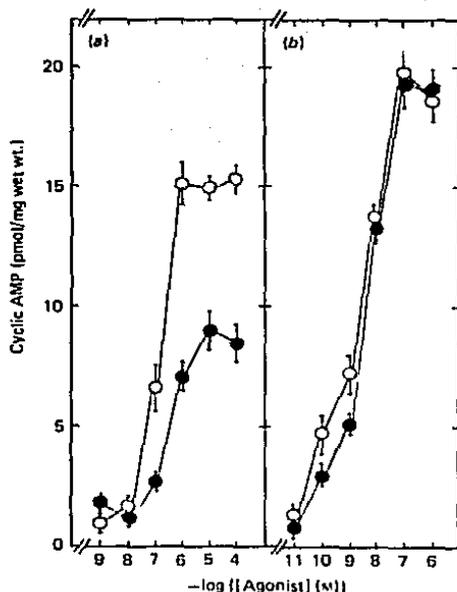


Fig. 3. Effect of preincubation with isoprenaline on the accumulation of cyclic AMP induced by isoprenaline or glucagon

Hepatocytes were incubated in the absence (○) or presence (●) of 100  $\mu$ M-isoprenaline, washed and incubated with different concentrations of isoprenaline (a) or glucagon (b). Mean values are plotted, and vertical lines represent the S.E.M. for four experiments using different cell preparations.

preincubated in the absence or presence of 100  $\mu$ M-isoprenaline was studied. The data presented in Fig. 3 show that preincubation with the  $\beta$ -adrenergic agonist markedly decreased ( $\sim 50\%$ ) the maximal cyclic AMP accumulation induced by isoprenaline, but that there was no change in the  $EC_{50}$  ( $\sim 300$  nM). Interestingly, the accumulation of cyclic AMP induced by glucagon was almost identical in cells preincubated in the absence or presence of isoprenaline (Fig. 3b). The data clearly indicate that the desensitization induced is homologous and not due to a general deleterious effect on the cells or the adenylate cyclase complex.

To determine if the preincubation with the  $\beta$ -adrenergic agonist has metabolic consequences, the ability of isoprenaline and glucagon to stimulate ureagenesis was studied (Fig. 4); both did so in a concentration-dependent fashion. The effect of isoprenaline was markedly diminished in cells preincubated with the  $\beta$ -adrenergic agonist, as reflected by both a diminished effect in the range of concentrations 100 nM–100  $\mu$ M and a flat concentration–response curve as compared with the control (Fig. 4a). In contrast, preincubation with isoprenaline affected neither the magnitude nor the  $EC_{50}$  of the concentration–response curve for glucagon (Fig. 4b).

When the cells were preincubated with 10  $\mu$ M-propranolol in the absence or presence of isoprenaline, no desensitization of the  $\beta$ -adrenergic actions on cyclic

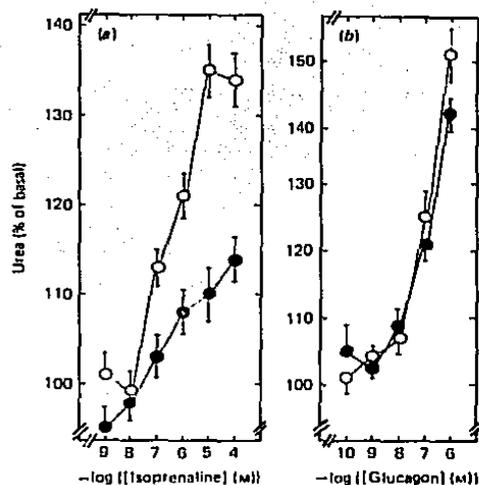


Fig. 4. Effect of preincubation with isoprenaline on the effects of isoprenaline (a) and glucagon (b) on ureagenesis

Results are expressed as the percentage of basal urea synthesis, which was  $35 \pm 2$  and  $40 \pm 3$  nmol/mg wet wt. of cells in cells preincubated in the absence (○) and presence (●) of isoprenaline respectively. For other information see Fig. 3.

AMP accumulation or on ureagenesis was detected (results not shown). The data indicate that receptor occupation (by the antagonist) was not sufficient to elicit desensitization and that activation was required, as reflected by the ability of the agonist to desensitize and that of the antagonist to block the desensitization.

Glucagon can markedly activate adenylate cyclase in these cells (Fig. 3). Therefore, the effect of preincubation with a maximally effective concentration of glucagon (100 nM) for 15 min was studied. It was observed that preincubation with glucagon did not induce  $\beta$ -adrenergic desensitization, as reflected by cyclic AMP accumulation (Fig. 5) or ureagenesis (Fig. 6). Interestingly, the effects of glucagon on both parameters were not affected by preincubation with the peptide.

Results from several laboratories have indicated that pertussis toxin can block some desensitization processes, suggesting a role of 'Ni' (Heyworth *et al.*, 1984; Wilson *et al.*, 1986). Therefore, we studied the effect of pertussis-toxin treatment on the  $\beta$ -adrenergic desensitization. Hepatocytes from pertussis-toxin-treated hypothyroid rats were incubated in the absence or presence of 100  $\mu$ M-isoprenaline, washed, and re-challenged with different concentrations of the  $\beta$ -adrenergic agonist for the determination of cyclic AMP accumulation (Fig. 7). In spite of the treatment with the toxin, exposure to the  $\beta$ -adrenergic agonist blunted the second response (Fig. 7). Another observation was that in these cells the basal cyclic AMP concentrations were consistently higher in cells preincubated with the  $\beta$ -adrenergic agonist than those of cells preincubated without any agent (see legend to Fig. 7). Therefore, on a fold-over-basal basis, the response was markedly desensitized. To study the reason for these high basal concentrations of cyclic AMP, the

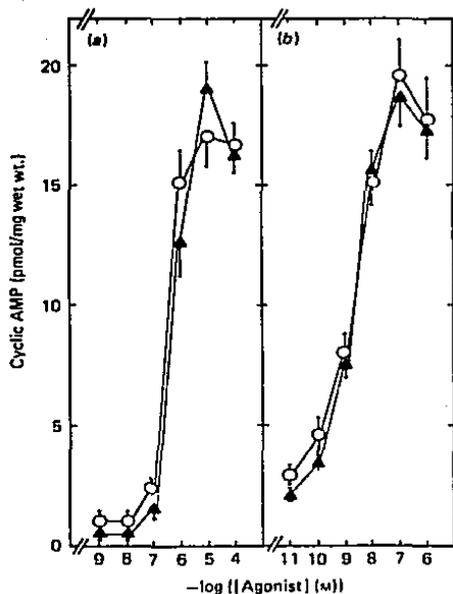


Fig. 5. Effect of preincubation with glucagon on the accumulation of cyclic AMP induced by isoprenaline or glucagon

Hepatocytes were preincubated in the absence (○) or presence (▲) of 100 nM-glucagon for 15 min, washed, and incubated with different concentrations of isoprenaline (a) or glucagon (b). Mean values are plotted, and vertical lines represent the s.e.m. for eight or nine experiments using different cell preparations.

time course of cyclic AMP accumulation (in the absence of methylisobutylxanthine) induced by  $\beta$ -adrenergic stimulation was studied comparatively in cells from pertussis-toxin-treated rats and the control hypothyroid rats. The ascending part of the curves was very similar; in both conditions the maximal cyclic AMP accumulation was reached at 2 min (Fig. 8). However, some differences were observed in the descending part of the curves. The decrease in cyclic AMP accumulation was fast in the controls and returned to basal values at 60 min. In contrast, with cells from toxin-treated animals the decrease was slower, and a tendency to reach a plateau at concentrations 2–3-fold higher than the initial basal value (zero time) was observed (Fig. 8).

The desensitization induced by short-term  $\beta$ -adrenergic action was long-lived. We incubate the cells for as long as 150 min without observing that the desensitized cells recover the  $\beta$ -adrenergic responsiveness to values comparable with those of control cells incubated in parallel (results not shown). Longer incubations were not attempted, since the viability after this long incubation decreased to 75% or less.

## DISCUSSION

The present results indicate that short-term  $\beta$ -adrenergic activation leads to desensitization in hepatocytes. Our results are in agreement with those of Lam & Bar

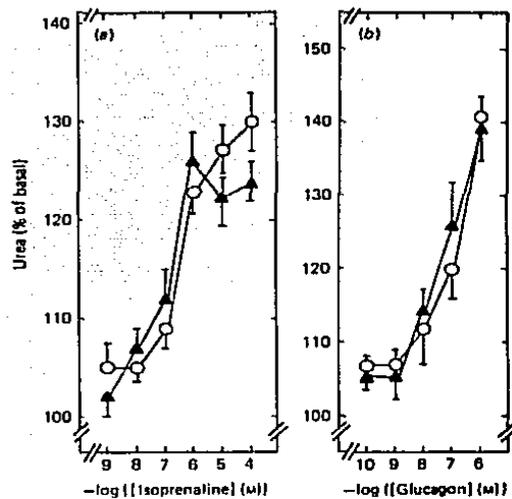


Fig. 6. Effect of preincubation with glucagon on the effects of isoprenaline (a) and glucagon (b) on ureagenesis

Results are expressed as percentage of basal urea synthesis, which was  $40 \pm 2$  and  $38 \pm 3$  nmol/mg wet wt. in cells preincubated in the absence (○) and presence (▲) of glucagon respectively. For other details see Fig. 5.

(1976), who observed that incubation of rat liver slices with adrenaline for as little as 30 min markedly desensitizes  $\beta$ -adrenergic stimulation of membrane adenylate cyclase activity, but does not affect glucagon-stimulated activity. Similarly, Gurr & Ruh (1980) and Noda *et al.* (1984) observed that in primary cultures of rat hepatocytes  $\beta$ -adrenergic activation induces homologous desensitization. In these studies using cultured cells, the agonist induced a rapid initial desensitization (in less than 1 h) (Gurr & Ruh, 1980), followed by a slower progress of the process (several hours) (Gurr & Ruh, 1980; Noda *et al.*, 1984). This desensitization after a long exposure to agonist is associated with a marked decrease in the number of membrane  $\beta$ -adrenoceptors (Noda *et al.*, 1984). Also in agreement with our data is the finding of Gurr & Ruh (1980) that the desensitization induced by adrenaline was poorly reversible. Reilly & Blecher (1982), using a cloned cell line (RL-PR-C hepatocytes), also observed that 1 h exposure to isoprenaline induces marked desensitization of  $\beta$ -adrenergic-stimulation adenylate cyclase activity.

In contrast with all these data are the findings of Morgan *et al.* (1982), who observed that the glycogenolytic response of perfused liver does not become desensitized even after successive short-term  $\beta$ -adrenergic stimulation. It is difficult to compare our results with those of Morgan *et al.* (1982); it is possible that in their model (perfused liver) a large receptor reserve may exist for the final response (glycogenolysis) or that other factors or non-parenchymal cells could play a role in the effects. In our study the desensitization was reflected both in cyclic AMP accumulation and in a metabolic parameter (ureagenesis).

It has been observed that cyclic AMP can induce in

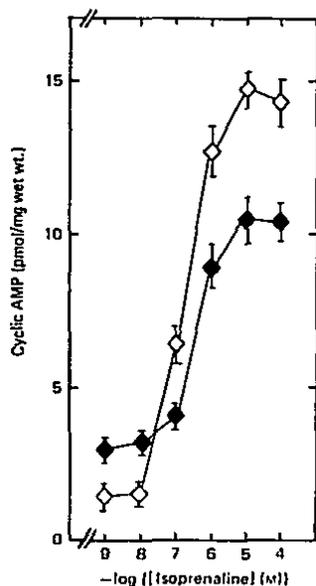


Fig. 7. Effect of pertussis-toxin treatment on the  $\beta$ -adrenergic desensitization induced by isoprenaline

Hepatocytes were preincubated in the absence ( $\diamond$ ) or presence ( $\blacklozenge$ ) of  $100 \mu\text{M}$ -isoprenaline, washed and re-challenged with different concentrations of isoprenaline. Basal cyclic AMP accumulations were  $1.14 \pm 0.16$  and  $3.68 \pm 0.21$  pmol/mg wet wt. of cells ( $P < 0.001$ ) in cells preincubated in the absence or presence of isoprenaline respectively. Mean values are plotted, and vertical lines represent the S.E.M. for six experiments using different cell preparations.

some cells  $\beta$ -adrenergic desensitization (Sibley & Lefkowitz, 1985), and the possibility that the cyclic AMP-dependent protein kinase (protein kinase A) could be involved has also been suggested (Benovic *et al.*, 1985). However, in our system glucagon stimulates adenylate cyclase through a process similar to that of the  $\beta$ -adrenoceptor (i.e. through 'Ns', the guanine-nucleotide-binding regulatory protein involved in adenylate cyclase activation) and to a similar extent as does isoprenaline in these cells. The inability of glucagon to induce  $\beta$ -adrenergic desensitization indicates that none of these factors (protein kinase A, cyclic AMP, the catalytic subunit of adenylate cyclase or 'Ns') is involved in the process of desensitization observed in this study. Propranolol does not induce  $\beta$ -adrenergic desensitization, which indicates that simple occupation of the receptor is not enough to trigger the process and that receptor activation is required. Benovic *et al.* (1986) reported the identification of a novel  $\beta$ -adrenergic receptor kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor and which could probably be involved in the homologous types of desensitization. The possibility that this kinase could be involved in the effect here described is considered as a very attractive possibility. However,

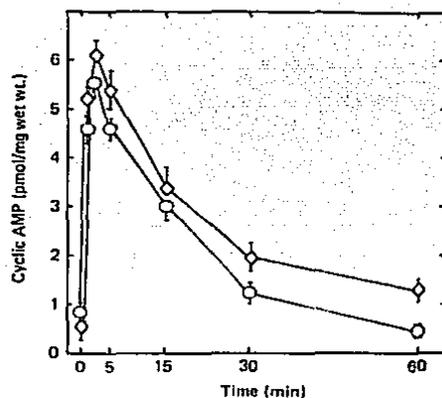


Fig. 8. Effect of pertussis-toxin treatment on isoprenaline-induced cyclic AMP accumulation

Hepatocytes from control ( $\circ$ ) or pertussis-toxin-treated ( $\diamond$ ) hypothyroid rats were incubated for the times indicated with  $1 \mu\text{M}$ -isoprenaline (in the absence of methylisobutylxanthine). Mean values are plotted, and vertical lines represent the S.E.M. for five experiments using different cell preparations.

receptor phosphorylation and the role of this or any other protein kinase remains to be specifically demonstrated.

Heyworth & Houslay (1983) have observed that glucagon triggers a rapid decrease of adenylate cyclase activity in hepatocyte membranes; they suggested that the desensitization occurs at the level of 'Ns'. This desensitization is blocked by pertussis toxin (Heyworth *et al.*, 1984). We observed no desensitization induced by glucagon. The desensitization observed by Heyworth & Houslay (1983) is very rapid (5 min) and gradually disappears. In our experiments a preincubation of 15 min with glucagon, followed by washing (3–4 min), was used; therefore it is highly probable that our failure to observe any desensitization induced by glucagon could be due to the conditions employed. The fact that pertussis toxin does not block the homologous  $\beta$ -adrenergic desensitization here presented further indicates that the process involved differs from that reported by Heyworth *et al.* (1984). Clark *et al.* (1986) reported that the homologous desensitization of the  $\beta$ -adrenoceptor in lymphoma cells is not altered by pertussis-toxin treatment, which is consistent with our findings in hepatocytes. Other authors have reported desensitization by glucagon in whole cells, but a much longer exposure (several hours) is required (Plas & Nunez, 1975; Noda *et al.*, 1984).

We thank Ms. Guadalupe Ramirez for skilfully typing the manuscript. This research was partially supported by a Grant from 'Fundación Miguel Alemán'.

## REFERENCES

- Aggerbeck, M., Ferry, N., Zafrani, E. S., Billon, M. C., Barouki, R. & Hanoune, J. (1983) *J. Clin. Invest.* **71**, 476–486  
 Benovic, J. L., Pike, L. J., Cerione, R. A., Staniszewski, C., Yashimasa, T., Codina, J., Caron, M. C. & Lefkowitz, R. J. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 7094–7101

- Benovic, J. L., Strasser, R. H., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 2797-2801
- Berry, M. N. & Friend, D. S. (1969) *J. Cell Biol.* **43**, 506-520
- Bitensky, M. W., Russel, V. & Blanco, M. (1970) *Endocrinology (Baltimore)* **86**, 154-159
- Blair, J. B., James, M. E. & Foster, J. L. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 7579-7584
- Brown, B. L., Albano, J. D. M., Ekins, P. & Sgherzi, A. M. (1971) *Biochem. J.* **121**, 561-562
- Clark, R. B., Goka, T. J., Prohl, M. A. & Friedman, J. (1986) *Biochem. J.* **235**, 399-405
- Corvera, S., Hernández-Sotomayor, S. M. T. & García-Sáinz, J. A. (1984) *Biochem. Biophys. Acta* **803**, 95-105
- Gilman, A. G. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **67**, 305-312
- Gurr, J. A. & Ruh, T. A. (1980) *Endocrinology (Baltimore)* **107**, 1309-1319
- Gutman, I. & Bergmeyer, H. U. (1974) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. U., ed.), vol. 4, pp. 1791-1793, Academic Press, New York
- Harden, T. K. (1983) *Pharmacol. Rev.* **35**, 5-32
- Heyworth, C. M. & Houslay, M. D. (1983) *Biochem. J.* **214**, 93-98
- Heyworth, C. M., Hanski, E. & Houslay, M. D. (1984) *Biochem. J.* **222**, 189-194
- Huerta-Bahena, J., Villalobos-Molina, R. & García-Sáinz, J. A. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **763**, 112-119
- Lam, V. & Bar, H.-P. (1976) *Biochem. Pharmacol.* **25**, 2103-2104
- Lynch, C. J., Prpic, V., Blackmore, P. F. & Exton, J. H. (1986) *Mol. Pharmacol.* **29**, 196-203
- Malbon, C. C., Li, S. & Fain, J. N. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 8820-8825
- Morgan, N. G., Shuman, E. A., Exton, J. H. & Blackmore, P. F. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 13907-13910
- Nakamura, T., Tomura, A., Noda, C., Shimkoji, N. & Ichihara, A. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 9283-9289
- Noda, C., Shinjyo, F., Tomomura, A., Kato, S., Nakamura, T. & Ichihara, A. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 7747-7754
- Plas, C. & Nunez, J. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 5304-5311
- Pobiner, B. F., Hewlett, E. L. & Garrison, J. C. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 16200-16209
- Reilly, T. M. & Blecher, M. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* **720**, 126-132
- Sekura, R. D., Fish, F., Manclark, C. R., Meade, B. & Zhang, Y.-L. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 14647-14651
- Sherline, P., Eisen, H. & Glinsmann, W. (1974) *Endocrinology (Baltimore)* **94**, 935-939
- Sibley, D. R. & Lefkowitz, J. R. (1985) *Nature (London)* **317**, 124-129
- Wilson, P. D., Dixon, B. S., Dillingham, M. A., García-Sáinz, J. A. & Anderson, R. J. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 1503-1506

---

Received 29 December 1986/25 March 1987; accepted 11 May 1987