

2 ej 6



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"RESPUESTA BETA 1-ADRENERGICA Y DESENSIBILIZACION EN CELULAS DEL HEPATOMA AS-30D DE RATA."

TESIS DE LICENCIATURA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A I
ROCIO ALCANTARA HERNANDEZ

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE.

	página
1. Introducción	1
a) Generalidades	1
b) Receptores adrenérgicos	5
c) El Sistema de la adenilato ciclasa	8
d) El Sistema de fosfoinosítidos-calcio	11
e) Desensibilización de la respuesta celular	13
f) Sistemas celulares estudiados	15
2. Objetivos	18
3. Materiales y métodos	19
4. Resultados	26
5. Discusión	35
6. Conclusiones	43
7. Bibliografía	44

I. INTRODUCCION.

a) GENERALIDADES.

Una de las características esenciales de todos los seres vivos tanto unicelulares como pluricelulares es su capacidad de dar una respuesta a un estímulo externo, respuesta que además de ser global es coordinada, lo que les permite adaptarse a su ambiente con el que mantienen un continuo intercambio de información.

En los organismos superiores, la regulación de esta información se efectúa por mecanismos de comunicación intercelular. Ya en los eucariontes unicelulares, en particular en algunas amibas (1) existen mecanismos de atracción química entre las células que se presentan a lo largo de su ciclo de vida, siendo más evidente durante los estados de agregación y de reproducción que durante los primeros estados de su desarrollo.

En los organismos más complejos, la regulación de la información se realiza a través de mecanismos de comunicación intercelular más sofisticados, por medio del sistema endócrino u hormonal y/o del sistema neural. Ambos conocidos actualmente como un solo sistema neuroendócrino.

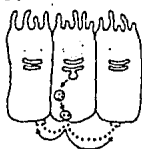
Existen cinco formas en las que se lleva a cabo la comunicación celular: (Esquema 1).

a) La comunicación endócrina u hormonal que se realiza cuando las glándulas de secreción interna como la hipófisis, los

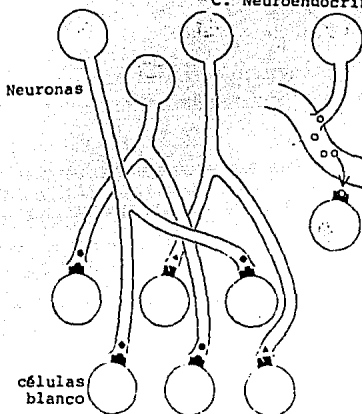
E. Autócrina



D. Parácrina

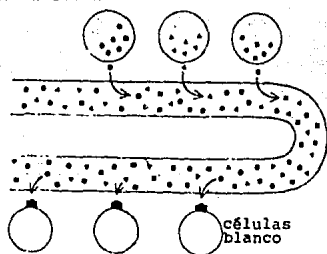


B. Neurotransmisión



C. Neuroendócrina

A. Endócrina



ESQUEMA 1. FORMAS DE COMUNICACION CELULAR EN EL SISTEMA NEUROENDOCRINO. A) Secreción de moléculas hormonales que viajan en el torrente sanguíneo, hasta ponerse en contacto con sus células blanco, B) Comunicación a través de neurotransmisores, C) Secreción de sustancias por las neuronas que actúan como hormonas directamente en la sangre, D) hormonas que actúan sobre células adyacentes y E) hormonas que actúan sobre las mismas células que las producen.

ovarios o los testículos, vierten sus mensajeros químicos u hormonas al torrente sanguíneo y éstos viajan hasta llegar a sus células blanco.

b) La neurotransmisión que se efectúa a través de células nerviosas llamadas neuronas, las cuales vierten sus neurotransmisores que cruzan el espacio sináptico e interaccionan con las células postsinápticas que responden al estímulo.

c) La secreción neuroendócrina en donde las células de tejido nervioso secretan una neurohormona que viaja por el torrente circulatorio hasta que interacciona con sus células blanco.

d) La comunicación parácrina que ocurre entre células relativamente cercanas y sin que haya ninguna estructura especializada como en el caso de la sinápsis, y además es local, y

e) La comunicación autócrina en la cual el mensajero liberado actúa sobre la misma célula que lo secreta, como en el caso de las células que liberan factores de crecimiento y proliferación, y que actúan sobre ellas mismas favoreciendo la multiplicación (2).

La comunicación celular se realiza a través de moléculas "mensajeras" que al actuar sobre sus células blanco específicas, transmiten la información del exterior hacia el interior de la célula.

Estos mensajeros son de naturaleza química variada, se dividen en tres clases principales: los lípidos que se sintetizan

en diversas glándulas, entre ellos se encuentran los esteroides y las prostaglandinas; los de naturaleza peptídica, formados por aminoácidos unidos por enlaces peptídicos como por ejemplo la vasopresina, el glucagon y la insulina; y las aminas, compuestos que contienen nitrógeno unido a dos hidrógenos (-NH₂) como el ácido glutámico, el ácido aspártico, la epinefrina, la norepinefrina y la dopamina.

Los mensajeros químicos son las señales que inician la transducción del "mensaje" en las células blanco, y su efecto final es producir una respuesta fisiológica en las células. El primer paso importante en la transmisión de la información es precisamente la interacción de los mensajeros (hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento, etc.) con moléculas capaces de reconocerlos específicamente e iniciar el efecto. A estas moléculas las conocemos como receptores.

El término receptor permaneció abstracto durante mucho tiempo ya que no se tenían pruebas experimentales claras acerca de su estructura. Langley en 1906 (citado en 3) observó que los efectos de la nicotina y el curare sobre la preparación neuromuscular son antagonísticos, es decir que compiten por un solo sitio receptor para producir la contracción celular. En 1913, Paul Erlich (citado en 4) formuló su postulado "corpora non agunt nisi fixata": las sustancias no actúan a menos que se fijen, lo que significa que la interacción mensajero-receptor que se realiza por fuerzas moleculares es la causa de la transmisión del mensaje y la subsecuente respuesta celular.

Actualmente los receptores ya se han materializado (2). Se conoce la naturaleza química de muchos de ellos, se han purificado y reconstituído (5 y 6).

Los receptores en general son glucoproteínas de alto peso molecular codificados por genes específicos (7), tienen un sitio de reconocimiento al mensajero al cual se acopla perfectamente con una determinada afinidad (medida de la facilidad de interacción entre el receptor y el mensajero) y una determinada actividad (capacidad del mensajero para producir el efecto).

Si el mensajero químico al interactuar con el receptor produce una respuesta en la célula se le llama agonista. Si es una sustancia que al interactuar con su receptor, por sí misma no produce ningún efecto en la célula, pero evita la interacción receptor-agonista, le llamamos antagonista.

Existen dos tipos de receptores celulares: los receptores internos y los receptores externos.

Los receptores internos se encuentran en el citosol o parte soluble de la célula. Estas proteínas, al igual que los receptores externos, no son moléculas estáticas, sino que se encuentran en continuo movimiento (2).

Los receptores internos captan a su mensajero específico que ha entrado a la célula a través de la membrana plasmática, ya sea por difusión libre, un proceso no específico, ó con ayuda de proteínas transportadoras que se encuentran en la membrana (8). El acoplamiento hormona-receptor produce una señal que se

transmite finalmente a otro u otros sitios intracelulares, donde provocan una o varias respuestas.

Los receptores para esteroides, por ejemplo, son receptores internos cuyas moléculas mensajeras son las hormonas esteroides (andrógenos, progestágenos, estrógenos, mineralcorticoides y glucocorticoides). Al formarse el complejo hormona-receptor llevan la información al núcleo de la célula, favoreciéndose la transcripción de genes específicos y la síntesis de novo de algunas proteínas.

Por otra parte, los receptores externos se encuentran embebidos en la membrana plasmática de la célula, la cara exterior del receptor es la que contiene el sitio de reconocimiento del mensajero, la otra parte del receptor procesa y transmite la información al interior de la célula.

Un gran número de evidencias (3 y 4) señalan que los receptores son específicos para cada hormona, neurotransmisor, autacoide, etc; no obstante un solo mensajero puede en la misma célula unirse a más de un tipo de receptor, como en el caso de la epinefrina, una hormona que se acopla a diversos receptores adrenérgicos en algunos sistemas celulares (9).

b) RECEPTORES ADRENERGICOS.

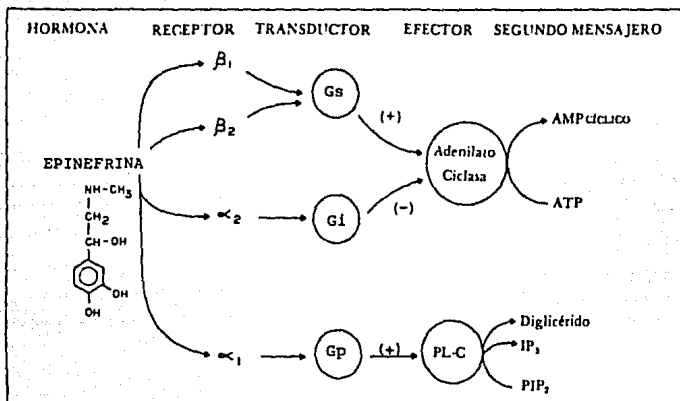
Fue R. Alquist en 1948 (10), quien propuso originalmente que las catecolaminas tienen efectos por interacción con receptores alfa o beta adrenérgicos, dependiendo de la respuesta que observó para fenilefrina e isoproterenol en células de

músculo liso. Posteriormente, los dos tipos de receptores adrenérgicos se dividieron en subtipos.

Los receptores alfa adrenérgicos se clasificaron como alfa1 y alfa2, los cuales están acoplados a elementos efectores de distintos sistemas de transducción de la señal hormonal. Los receptores alfa1 adrenérgicos se acoplan a la enzima fosfolipasa C y estimulan su actividad, mientras que los receptores alfa2 se acoplan a la enzima adenilato ciclasa e inhiben su actividad (Esquema 2).

En 1967, Lands y cols. (11) fueron los primeros en sugerir la clasificación de los receptores beta adrenérgicos en dos subtipos: betal y beta2, subdivisión que hicieron con base al orden de potencia de dos catecolaminas sobre la respuesta observada en los tejidos cardíaco y respiratorio en donde fueron clasificados como betal, y en músculo liso bronquial y vascular, donde se designaron como beta2. Se sabe que para los receptores betal, la epinefrina y la norepinefrina son activadores equipotentes, mientras que los receptores beta2 son activados preferentemente por la epinefrina (12). Posteriormente esta clasificación fue apoyada con el empleo de antagonistas beta adrenérgicos tales como el practolol, el atenolol y el metoprolol (13) que bloquean la respuesta a las catecolaminas en tejido cardíaco y respiratorio.

Los receptores beta adrenérgicos son los más estudiados y por lo tanto los mejor caracterizados en muchos sistemas celulares. Son productos de genes distintos (14), aunque



ESQUEMA 2. RECEPTORES ADRENERGICOS. Los receptores adrenérgicos se acoplan a los dos mecanismos de transducción de la señal hormonal. Los receptores beta 1 y beta 2 adrenérgicos están acoplados a la adenilato ciclasa de manera estimulatoria a través de una proteína Gs, mientras que los receptores alfa 2 adrenérgicos se acoplan a esta enzima de manera inhibitoria a través de una proteína Gi. Los receptores alfa 1 se acoplan de forma estimulatoria a la fosfolipasa C a través de una proteína no bien caracterizada aun, conocida como Gp.

presentan gran similitud estructural (15 y 16). Están constituidos por siete cadenas transmembranales de 20 a 28 aminoácidos hidrofóbicos, de las cuales la primera y la segunda (CI y CII) son regiones bastante conservadas en su secuencia, mientras que las otras son muy variables y el dominio CIII probablemente participa en la unión del ligando. El extremo amino del receptor se encuentra en la cara externa de la membrana plasmática y el extremo carboxilo se encuentra en el interior de la célula (17). Los pesos moleculares de los receptores beta1 y beta2 de mamífero están en un intervalo de 62,000 a 65,000 daltones, dependiendo del tipo celular del que se trate (15 y 16).

Una característica que comparten los dos subtipos de receptores beta adrenérgicos, es que tanto los beta1 como los beta2 se acoplan a la adenilato ciclasa y estimulan su actividad de tal manera que se elevan los niveles de AMPc en el interior de la célula (Esquema 2).

Durante los últimos diez años, el estudio de los receptores beta adrenérgicos, y en general de todos los tipos de receptores, se ha realizado no sólo con métodos farmacológicos, sino además con técnicas bioquímicas que consisten en el "marcaje" de los receptores con ligandos radiactivos, que permite la cuantificación precisa de la densidad de los subtipos de receptores en un tejido. La desventaja es que no pueden observarse, al mismo tiempo, los acontecimientos intracelulares que ocurren como consecuencia de su ocupación por las hormonas.

La acción de las hormonas sobre sus células blanco se inicia con el acoplamiento de la hormona a su receptor específico, sobre la membrana plasmática o en el interior de la célula (18). La activación de los receptores y la subsecuente respuesta celular se efectúa en dos fases: la transducción y generación de los segundos mensajeros, y la propagación intracelular de la señal hormonal (4), sucesos que al integrarse constituyen los mecanismos de comunicación intercelular.

En los organismos superiores existen varios mecanismos de transducción de la señal hormonal que permiten la comunicación célula-célula. Sin embargo, sólo dos de estos mecanismos son los mejor caracterizados: el sistema de la adenilato ciclasa y el sistema de fosfoinosítidos-calcio.

c) EL SISTEMA DE LA ADENILATO CICLASA.

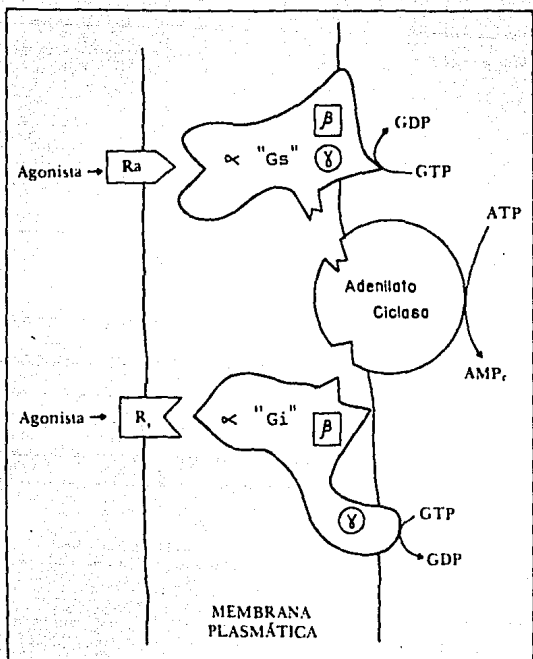
Earl, W. Sutherland, en 1958 (19) descubrió al adenosín monofosfato cíclico (AMPC), un nucleótido que se genera y acumula en el citoplasma celular. Observó posteriormente, en 1965 (citado en 20) que en el hígado, el AMPC es producido bajo la acción de la epinefrina y del glucagon, como una sustancia intermediaria en la transformación del glucógeno a glucosa 1-fosfato. Este descubrimiento llevó al concepto del segundo mensajero, o mensajero intracelular que participa en la acción hormonal.

La adenilato ciclasa (AC), enzima que sintetiza al AMPc a partir de adenosín trifosfato (ATP), también descubierta por Sutherland (19), se localiza en la membrana plasmática hacia el interior de la célula. Se ha demostrado que un gran número de receptores están acoplados a esta enzima (21) ya que aumentan o disminuyen los niveles de AMPc después de la activación de los receptores (Esquema 3).

Martin Rodbell y Lutz Birnbaumer (22) descubrieron que existe otro elemento en el sistema de la adenilato ciclasa; una proteína llamada G o N por requerir Nucleótidos de Guanina (GTP) para funcionar. Las proteínas G, que igualmente se encuentran en la membrana plasmática, acoplan al receptor con la enzima efectora en el proceso de transducción de la señal. Estas proteínas están formadas por tres subunidades (la alfa, la beta y la gamma). La subunidad alfa (39,000-54,000 daltones) posee actividad de GTPasa, une GTP en un sitio de alta afinidad y además tiene por lo menos un sitio que se ADP-ribosila por reacciones catalizadas por toxinas bacterianas (23).

Las subunidades beta y gamma (35,000-36,000 y 8,000-10,000 daltones respectivamente), forman un complejo (beta-gamma) cuya función no se conoce. Sin embargo, se ha propuesto (24) que este complejo interviene en la regulación de varios fenómenos celulares, como la inhibición de la AC y la activación de canales de potasio, pero todavía no se tienen pruebas suficientes que aclaren cual es su función en la transducción de la señal.

La regulación de la actividad de la AC, en respuesta a



ESQUEMA 3. MODELO DEL SISTEMA DE LA ADENILATO CICLASA

Un agonista al acoplarse a sus receptores específicos, ya sean estimuladores (R_a) o inhibidores (R_i) inducen un cambio conformacional del receptor que le permite interactuar con su respectiva proteína G (G_s o G_i). Los R_a formarán el complejo A- R_a - G_s , mientras que los R_i formarán el complejo A- R_i - G_i . Las proteínas G en este momento se encuentran en su forma activada e interactúan con la adenilato ciclasa (AC).

los agentes estimuladores como la epinefrina, las gonadotropinas o la hormona adrenocortrónica (ACTH) ó a agentes inhibitorios, como los agonistas alfa₂ adrenérgicos y los muscarínicos, está mediada por distintas proteínas G, designadas como "G_s" (estimuladoras) y "G_i" (inhibitorias) (25) (Esquema 3). Las proteínas G en estado basal tienen unido GDP a la subunidad alfa, la cual está asociada al receptor que se encuentra en alta afinidad para los agonistas (hormonas). Al cambiarse el GDP por el GTP se libera la hormona y el receptor pasa a un estado de baja afinidad. Las proteínas G al activarse con GTP se disocian en sus subunidades alfa y beta-gamma, lo que al parecer permite que se transmita la señal a la enzima efectora. Estos hechos de interacción entre el receptor, la proteína G_s y los nucleótidos de guanina ocurren de forma cíclica, al asociarse GDP nuevamente a la subunidad alfa, se integra otra vez el complejo R-G_s-GDP. De manera similar sucede con G_i, sólo que en este caso la actividad de la AC se inhibe. Se ha propuesto que la activación hormonal de G_i igualmente provoca la disociación de sus subunidades, lo que incrementa la concentración del complejo beta-gamma libre en la membrana, de tal manera que interacciona con las subunidades alfa de G_s inhibiendo así indirectamente a la AC (22).

Es razonable pensar que el acoplamiento receptor-proteína G-AC produce la modificación conformacional de los elementos que integran este sistema (26).

El estudio de las proteínas G_s y G_i, y por lo tanto

del sistema de la AC ha sido apoyado por el empleo de dos toxinas bacterianas: la toxina pertussis producida por la Bordetella pertussis y la toxina del cólera producida por el Vibrio cholerae. Ambas toxinas modifican a las proteínas G porque ADP ribosilan su subunidad alfa. El sustrato de la toxina pertussis es la proteína Gi, mientras que el de la toxina del cólera es la proteína Gs (27).

d) EL SISTEMA DE FOSFOINOSITIDOS-CALCIO.

En 1953, Hokin y Hokin (citado en 28) observaron en acinos pancreáticos que existen hormonas que tienen efectos sobre el metabolismo de fosfoinosítidos de membrana. Demostraron que la acetilcolina induce una rápida incorporación de ^{32}P al fosfatidil inositol (PIP) y al ácido fosfatídico, y sugirieron que la incorporación se debe a un incremento en el recambio de los fosfolípidos de inositol en las células estimuladas. R. H. Michell propuso, en 1975 (citado en 28) que la hidrólisis de los fosfoinosítidos es responsable de la movilización de calcio intracelular, luego se demostró que no necesariamente aumentan los niveles de calcio como consecuencia del recambio de los fosfoinosítidos. Ahora se sabe que el calcio es uno de los mensajeros intracelulares ya que varios procesos celulares dependen de la presencia de este ión.

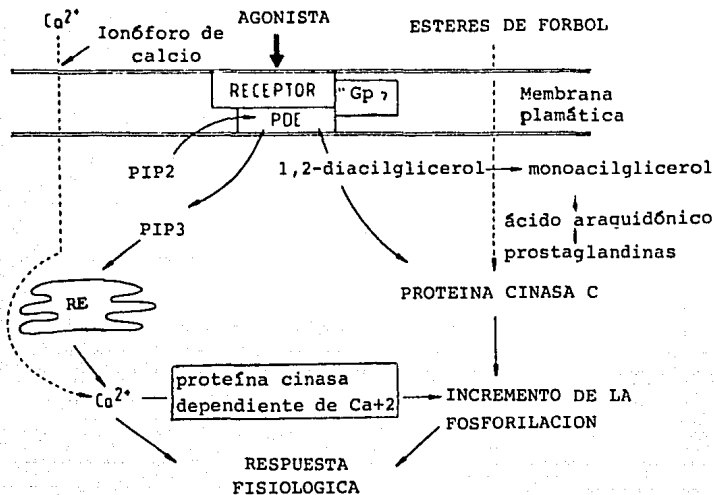
Años después, en 1983, Michael J. Berridge (28) y su grupo demostraron que el inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3) uno de los

primeros productos de la hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP2) sirve como un mediador de la movilización de calcio de almacenes internos, probablemente del retículo endoplásmico. Razón por la cual se le consideró un segundo mensajero dependiente de la activación por agonistas (Esquema 4).

Yasutomi Nishizuka, por otra parte, había proporcionado evidencias desde 1977 (29) de que el 1,2-diacilglicerol (DAG), el otro producto de la hidrólisis del PIP2 activa una proteína cinasa, la proteína cinasa C, involucrada en el proceso de propagación y amplificación de la señal en este sistema de transducción. Esta proteína cinasa parece además tener alguna función en la proliferación celular, en la secreción y en la modulación de la conductancia de iones por la fosforilación de proteínas de membrana tales como canales, bombas y proteínas de intercambio iónico; además de fosforilar receptores como por ejemplo el receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (30), (Esquema 4).

Una herramienta bioquímica que se ha utilizado en el estudio del sistema de fosfoinosítidos-calcio es el uso de los ésteres activos del forbol, ya que por tener en su molécula una parte muy similar al DAG activa directamente a la proteína cinasa C tanto in vitro como in vivo (31 y 32).

Los ésteres de forbol son compuestos extraídos de plantas de la familia Euphorbiaceae, su aislamiento y estructura química fueron obtenidas por Heckel en 1968; fecha a partir de la cual se



ESQUEMA 4. MODELO DEL SISTEMA DE FOSFOINOSITIDOS-CALCIO. La unión del agonista a su receptor estimula la actividad de la fosfodiesterasa (PDE) o fosfolipasa C. Hay evidencias recientes de la existencia de una proteína reguladora que une nucleótidos de guanina, designada como Gp que acopla al receptor con la PDE. Los productos de la hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5-bifosfato (PIP2) son el inositol 1,4,5-trisfosfato (PIP3), el cual induce la salida de Ca²⁺ de retículo endoplásmico, y el 1,2-diacilglicerol, el cual activa a la proteína cinasa C. Se ilustra la estimulación directa de la proteína cinasa C por los ésteres de forbol.

inició la investigación bioquímica de estos compuestos que son promotores de tumores. El tetradecanoil forbol-12-miristato-13-acetato, fue el primero en obtenerse en forma pura y es el activador más eficaz de la proteína cinasa C (32).

e) DESENSIBILIZACION DE LA RESPUESTA CELULAR.

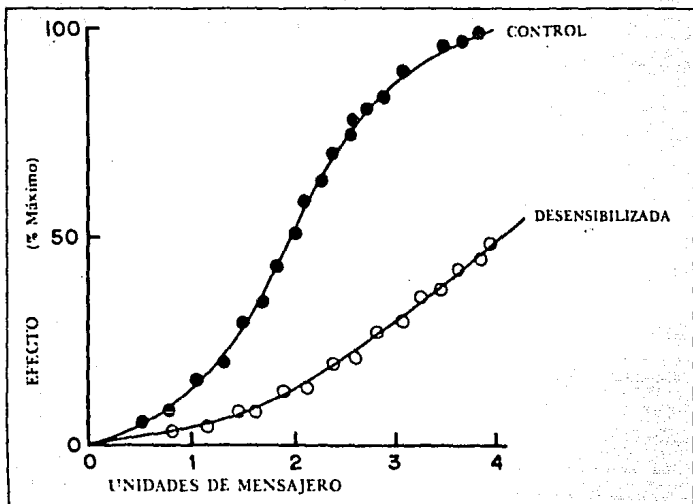
Un mecanismo general de adaptación celular y por lo tanto de los organismos que reciben un estímulo prolongado es la disminución de la respuesta celular al mensajero (Esquema 5). Este fenómeno conocido como desensibilización, taquifilaxia o tolerancia (33) es importante tanto fisiológicamente como en condiciones fisiopatológicas (15), como en el caso del asma bronquial.

Se han definido dos tipos de desensibilización: la desensibilización homóloga (34) y la desensibilización heteróloga (35).

a) Desensibilización homóloga. Es cuando la disminución de la respuesta celular se debe a la exposición por tiempo prolongado al mismo agente que generó la respuesta.

Este tipo de desensibilización ocurre en numerosos sistemas celulares. En nuestro laboratorio hace poco tiempo se demostró que en hepatocitos de rata hay una desensibilización homóloga de la respuesta beta adrenérgica estimulada por catecolaminas (36).

De manera similar ocurre en otros sistemas celulares; en



ESQUEMA 5. DESENSIBILIZACION DE LA RESPUESTA CELULAR. Dosis-respuesta a un mensajero en células controles (●) y en células desensibilizadas (○). El efecto en la célula estimulado por un mensajero (hormona, neurotransmisor, autacoide) es disminuido debido a la exposición previa al mismo mensajero.

macrófagos de la línea celular J774 (37), en células de astrocitoma humano de la línea celular 1321NI (38), en hepatocitos de rata mantenidos en cultivo celular (39), en células de linfoma S49 de ratón (40), así como en otros sistemas celulares de mamífero.

b) Desensibilización heteróloga. Es cuando la respuesta celular disminuye a otras hormonas, neurotransmisores, etc, que se acoplan a receptores diferentes a los que ocasionan la desensibilización homóloga, como sucede en hepatocitos de rata (41). La desensibilización heteróloga se ha observado también en otros sistemas celulares (38 a 40), es al parecer un mecanismo más general en donde intervienen componentes del sistema de transducción distantes al receptor.

La desensibilización homóloga puede estar mediada por uno de los siguientes mecanismos: disminución del número de receptores en la membrana plasmática (42), cambio en la afinidad de los receptores al agonista, fosforilación de los receptores por una proteína cinasa (44), modificación conformacional y/o secuestro de los receptores hacia el interior de la célula (45), secuestro de los receptores en compartimentos de la membrana plasmática, en los cuales el receptor no tiene contacto con la proteína Gs (45 y 46).

En el caso de la desensibilización heteróloga el mecanismo participante puede ser alguna modificación de la proteína Gs que impida que esta transduzca la señal a la AC, y por tanto que la

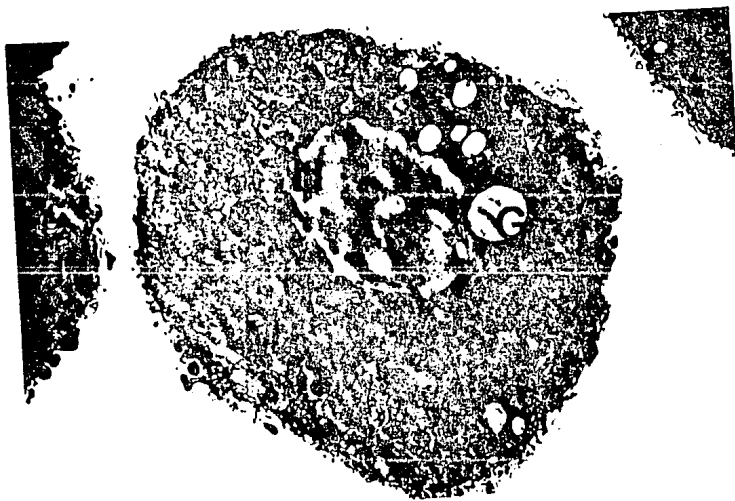
actividad de esta disminuya (47). Se ha visto que la actividad de la AC estimulada por glucagon en células pretratadas con esta hormona disminuye, y que esto es acompañado por una disminución en la respuesta de Gs a la toxina del cólera. En otro mecanismo de desensibilización heteróloga, interviene la actividad de la proteína cinasa C, activada por los ésteres de forbol, ya que bajo éstas condiciones se ha observado que la afinidad de los receptores beta adrenérgicos a agonistas disminuye, probablemente debido a que los receptores son fosforilados por esta cinasa (38).

f) SISTEMAS CELULARES ESTUDIADOS.

HEPATOCITOS DE RATA.

Los hepatocitos constituyen el parénquima del hígado (glándula endócrina y exócrina). Son células epiteliales de origen endodérmico. Miden entre 40 y 50 micrómetros de diámetro.

El citoplasma de los hepatocitos posee cantidades importantes de carbohidratos y de grasa, además de diversos orgánulos (ver microfotografías). Las mitocondrias son muy numerosas, se estima que cada célula tiene 1000 o más de ellas, tienen ribosomas libres y unidos a las membranas, retículo endoplásmico rugoso y liso y cisternas de Golgi, en el citoplasma almacenan glucógeno y en él se encuentran microcuerpos que contienen diversas enzimas. El núcleo situado en el centro es



MICROFOTOGRAFIA. a) HEPATOCITO AISLADO DE HIGADO DE RATA (x 16,000). Numerosas mitocondrias (M), numerosas gotas de grasa (G), el núcleo situado en el centro de forma regular (N).

denso. La membrana celular de los hepatocitos tiene innumerables microvellosidades que sobresalen en el espacio extracelular, lo cual permite que cada célula cuente con una enorme superficie de absorción de sustancias que están en la corriente sanguínea. Entre las microvellosidades hay sitios por donde los hepatocitos secretan sustancias al plasma.

Los hepatocitos son uno de los sistemas celulares en los cuales más se han estudiado los mecanismos que permiten la comunicación celular, debido a que desempeñan muchas funciones celulares. Como antecedentes del presente trabajo se sabe que la estimulación de los receptores beta₂ adrenérgicos por la epinefrina y por otras catecolaminas, aumenta la acumulación de AMPc por la activación de la AC en membranas plasmáticas. En ratas hipotiroideas (48 y 49), la respuesta beta adrenérgica incluso es mayor que en ratas normales, y lo mismo sucede bajo otras condiciones patológicas; por ejemplo, en ratas adrenalectomizadas (50) el número de receptores beta adrenérgicos aumenta de dos a cuatro veces; y en la carcinogénesis, la sensibilidad a las catecolaminas se modifica incrementando la actividad de la AC (51 a 53).

HEPATOMA DE RATA.

El tumor ascítico de rata de la línea celular AS-30D, derivado del hepatoma 30D fue establecido de un hepatoma inducido



MICROFOTOGRAFIA. b) CELULA DEL HEPATOMA DE RATA DE LA LINEA CELULAR AS-30D (x 20,000). Mitochondrias y gotas de grasa menos numerosas que en el caso de los hepatocitos, el núcleo de forma irregular ocupa gran parte del citoplasma de la célula, la membrana celular con un gran número de prolongaciones.

por el 3-metil-4-dimetilaminoazobenceno (54). Se clasifica como un hepatocarcinoma.

El tumor AS-30D crece principalmente como grumos sobre la piel o como células aisladas en el líquido de ascitis de la cavidad abdominal del organismo.

Las células de hepatoma miden de 11 a 23 micrómetros de diámetro (ver microfotografías). Son células de origen epitelial que tienen la apariencia general de los hepatocitos, aunque es notable que contienen menor número de mitocondrias y menor cantidad de grasa. El núcleo de forma irregular ocupa gran parte del citoplasma. Su membrana celular tiene numerosas prolongaciones que le sirven en cultivo para adherirse a las superficies.

2. OBJETIVOS.

Los objetivos del presente trabajo fueron:

1. Investigar si las células del hepatoma A5-30D de rata acumulan AMPc en respuesta a la estimulación adrenérgica.

2. Caracterizar farmacológicamente con base al orden de potencia a agonistas y a antagonistas los receptores adrenérgicos de las células de hepatoma, midiendo como parámetro la producción de AMPc.

3. Hacer la comparación de la respuesta celular con hepatocitos de ratas hipotiroideas.

4. Caracterizar por un método directo (pegado específico del ligando radiactivo) a los receptores beta adrenérgicos de las células del hepatoma.

5. Estudiar si las células del hepatoma manifiestan el fenómeno de desensibilización adrenérgica observada en hepatocitos.

3. MATERIALES Y METODOS.

MATERIALES.

El 1-isoproterenol, la 1-epinefrina, la 1-norepinefrina, el 1-propranolol, el GTP, el guanilil-imidodifosfato (Gpp(NH)p), la teofilina, el ATP, la fosfocreatina, la creatina cinasa, el forbol 12-miristato-13-acetato (TPA), el ácido N-2-etanol sulfónico 2-N-hidroxi-etilpiperazina (HEPES), el 6-N-propil-2-tiouracilo, y el 1-metil-3-isobutil xantina (MIX), se obtuvieron de Sigma Chemical Co. La forskolina (7-beta-acetoxi-8-12-epoxi, 6 beta, 9 alfa trihidroxilabadi-14-en-11-uno) se obtuvo de Calbiochem. El glucagon fue generosamente donado por Eli Lilly. El atenolol y el ICI 118551 fueron donados por Imperial Chemical Industries. El [α -³²P] ATP (28.7 Ci mmol), el [3H] AMPc (32 Ci/mmol) y el dihidroalprenolol ([3H] DHA) se obtuvieron de New England Nuclear (Boston MA.). El percoll se obtuvo de Pharmacia.

METODOS.

HEPATOMA.

El tumor AS-30D fue transplantado de una rata a otra como se describe en el informe original (54). Las células de hepatoma

(3 ml) se inyectaron en la cavidad abdominal de ratas Wistar hembras o machos, con un peso de 250 a 300 g, se mantuvo el trasplante de 5 a 8 generaciones.

Para cada experimento de determinación de AMPc se obtuvieron de 6 a 8 ml de líquido de ascitis, y para aislar membranas de 20 a 40 ml cada vez. El líquido de ascitis se lavó 4 veces por centrifugación con una solución Krebs-Ringer bicarbonato HEPES (NaCl 120 mM, KCl 4.75 mM, CaCl₂ 1.3 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, MgSO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 20 mM y HEPES 10 mM), pH 7.4, a 37° C y bajo una atmósfera de O₂ 95% / CO₂ 5%, para quitar los componentes no tumorales. La viabilidad de las células se determinó por exclusión de azul de tripano al 0.1%.

HEPATOCITOS.

Las células de hígado usadas para la comparación de la respuesta celular se obtuvieron de ratas hipotiroides por el método de Berry y Friend (55) que consiste en perfundir el hígado con una solución amortiguadora Krebs-Ringer bicarbonato, saturada con O₂ 95% / CO₂ 5%, a pH 7.4, a 37 °C, y la digestión con colagenasa.

Las células se lavaron 3 veces por centrifugación y se resuspendieron finalmente en la misma solución Krebs-Ringer bicarbonato HEPES. La viabilidad de las células se midió por exclusión de azul de tripano al 0.1%.

El hipotiroidismo se indujo dando de beber a los animales

agua que contenía 6-N-propil-2-tiouracilo al 0.03% durante 40 a 50 días, antes de aislar los hepatocitos (49).

ACUMULACION DE AMPc.

Las células (10 mg/ml de peso fresco de las células de hepatoma y 30 mg/ml de hepatocitos) se incubaron durante 2 minutos a 37 °C, en la misma solución amortiguadora Krebs-Ringer HEPES que contenía MIX 250 μ M (que es un inhibidor de la fosfodiesterasa del AMPc), y los agentes a probar.

El AMPc se determinó por el método de Brown y cols. (56), modificado de Gilman (57), se utilizó [3H] AMPc y AMPc no marcado. El ensayo se basa en la competencia de ambas moléculas por el mismo sitio de unión a la proteína cinasa dependiente de AMPc. El AMPc no pegado a esta proteína se precipita con carbón activado y el AMPc del sobrenadante se cuenta en un contador de centelleo líquido. El AMPc acumulado se determinó tomando como referencia una curva patrón.

MEMBRANAS CELULARES.

Las membranas, tanto de células de hepatoma como de hepatocitos, se aislaron por el método de Loten y Redshaw-Loten (58). Para ello se homogenizaron a 4 °C (en un homogenizador Dounce) de 2 a 2.5 ml de células en 12.5 ml de una solución amortiguadora de sacarosa 250 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM, a

pH 7.5. El homogenado se centrifugó a 3,500 rpm durante 15 minutos y el precipitado resultante se resuspendió con 12.5 ml de la misma solución, más 3.4 ml de percoll y 0.5 ml de una solución de sacarosa 2M y se homogenizó nuevamente. Este homogenado se centrifugó a 17,000 rpm por 20 minutos. La fracción de membranas se observó claramente en la superficie del tubo de ensayo y la capa de membranas se extrajo y se lavó con una solución de Tris-HCl 25 mM y MgCl₂ 5 mM, pH 7.5. Finalmente se centrifugó a 15,000 rpm durante 5 minutos. El precipitado resultante se homogenizó en la misma solución anterior. La preparación de membranas se fraccionó en alícuotas para congelarlas en nitrógeno líquido. La cantidad de proteína se determinó por el método de Lowry y cols. (59) utilizando albúmina de suero de bovino como estándar.

DESENSIBILIZACION.

Para inducir la desensibilización de la respuesta celular, las células de hepatoma (10 mg/ml) se preincubaron en presencia o ausencia de isoproterenol, TPA, o de ambos agentes. La preincubación fue de 15 minutos a 37 °C, en la misma solución amortiguadora empleada anteriormente y bajo una atmósfera de O₂ 95% / CO₂ 5%.

Después de la preincubación, las células se lavaron 3 veces por centrifugación con la solución Krebs-Ringer bicarbonato HEPES a 37 °C. Luego se determinó la acumulación de AMPc en

respuesta a diferentes concentraciones de isoproterenol, de 1 nM a 100 μ M, y a forskolina 100 μ M.

ADENILATO CICLASA.

Para medir la actividad de la adenilato ciclasa empleamos el método de Salomon y cols.(60). El ensayo se hizo en una mezcla que contenía Tris-HCl 25 mM pH 7.5, ATP 0.4 mM; conteniendo 1-2 x 10⁶ cpm de [α -³²P-ATP], MgCl₂ 5 mM, teofilina 10 mM, 7.4 mg de fosfocreatina, 1 mg/ml de creatina cinasa, y los agentes y hormonas a probar.

La reacción se inició por la adición de 150 μ g de la proteína de membrana en un volumen total de 0.1 ml, se incubó 20 minutos a 30 °C. La reacción se paró con 2 ml de SDS al 0.1% y luego se agregó [3H] AMPc para medir la eficiencia de recuperación de AMPc en la cromatografía. El [32P] AMPc producido se determinó en un contador de centelleo líquido.

PEGADO ESPECIFICO DEL LIGANDO RADIOACTIVO.

Las membranas descongeladas se homogenizaron antes de cada experimento. Los receptores beta adrenérgicos se cuantificaron por medio del [3H] DHA (antagonista beta adrenérgico no selectivo).

Se utilizaron aproximadamente 300 μ g de proteína de

membranas de células de hepatoma, incubadas con concentraciones de 1 a 8 nM de [3H] DHA (95 mCi/ml), en una solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM y MgCl₂ 10 mM, pH 7.5, durante 30 minutos a 25 °C. La reacción se detuvo por filtración al vacío en filtros de fibra de vidrio GF/C (Whatman). Los filtros se lavaron inmediatamente 4 veces con 12 ml de una solución amortiguadora fría de Tris-HCl 50 mM y MgCl₂ 10 mM, pH 7.5. La cuantificación del pegado del ligando radiactivo a los receptores se determinó en un contador de centelleo líquido. Cada experimento se hizo por triplicado.

El pegado específico se determinó por la diferencia en el pegado del [3H] DHA en presencia o ausencia de propanolol 10 μ M (antagonista beta adrenérgico no selectivo).

La cantidad de receptores beta1 y beta2 adrenérgicos de las células AS-30D se obtuvo analizando las curvas de inhibición del pegado específico del ligando radiactivo, utilizando los dos antagonistas beta adrenérgicos selectivos: el ICI 118551 y el atenolol (61).

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.

El análisis de los resultados de los ensayos de pegado específico de [3H] DHA a los receptores, se describe en otros trabajos (62 y 63).

Los valores de B_{max} (número máximo de receptores) y de K_d (constante de disociación) para el pegado específico de [3H] DHA

fue estimado por el análisis de Scatchard de los resultados de saturación con 1 a 8 nM de [3H] DHA. Se determinó la capacidad de las drogas para inhibir el pegado específico de [3H] DHA calculando la constante de inhibición (K_i) con el programa de computadora "LIGAND" (64). Los porcentajes y afinidades de cada subtipo de adrenoceptor se determinaron también utilizando este programa. En los experimentos en donde se determinó AMPc se presentan los valores promedio y el error estándar de determinaciones por triplicado de 6 a 10 experimentos.

4. RESULTADOS.

La acumulación de AMPc en las células de hepatoma de rata de la línea celular AS-30D está regulada por la estimulación beta adrenérgica. En estas células el isoproterenol $1 \mu\text{M}$, un agonista beta adrenérgico, aumentó los niveles de AMPc de 4 a 6 veces con respecto al valor basal, el incremento máximo se observó a un tiempo de 2 minutos, seguido por una disminución lenta hasta los 20 minutos (Figura 1). La forskolina (sustancia que activa directamente a la subunidad catalítica de la AC) incrementó los niveles de AMPc en las células, de 15 a 16 veces, con un curso temporal similar al de isoproterenol (Figura 1).

En comparación, en hepatocitos aislados de ratas hipotiroides, la acumulación de AMPc estimulada con isoproterenol $1 \mu\text{M}$, o forskolina $100 \mu\text{M}$ se incrementó 5 y 15 veces respectivamente, sobre el valor basal. El curso temporal mostró un máximo a los 2 minutos seguido de una disminución lenta (datos que no se muestran).

En la figura 2 (panel izquierdo) se muestra la acumulación de AMPc de las células AS-30D en respuesta a tres agonistas beta adrenérgicos. El isoproterenol incrementó los niveles de AMPc de 6 a 7 veces con respecto al valor basal. Notablemente la potencia para la norepinefrina y para la epinefrina fueron similares. Ambas hormonas provocaron una respuesta máxima a concentraciones cercanas, $10 \mu\text{M}$ y $100 \mu\text{M}$ respectivamente.

El orden de potencia en estas células para los agonistas fue isoproterenol ($\text{EC}_{50} \approx 40 \text{ nM}$) > norepinefrina ($\text{EC}_{50} \approx 300 \text{ nM}$)

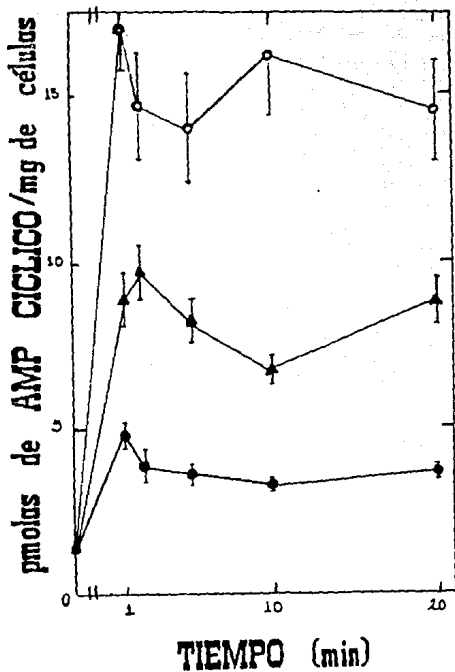


Fig.1 . CURSO TEMPORAL DE LA ACUMULACION DE AMPc EN CELULAS DEL HEPATOMA AS-30D DE RATA. La acumulaci3n de AMPc en c3lulas completas se determin3 a diferentes tiempos de incubaci3n (1, 2, 10 y 20 minutos) bajo tres condiciones: basales (●) y estimulando con isoproterenol 1 μ M (▲) o con forskolina 100 μ M (□). Se muestran los valores promedio de 4 a 6 experimentos \pm el error est3ndar.

> epinefrina ($EC_{50} \approx 1 \mu M$). Este orden de potencia nos indica sorprendentemente que se trata de receptores beta1 adrenérgicos en las células AS-30D, ya que la epinefrina y la norepinefrina activan con la misma potencia a estos receptores (65).

Observamos además, (Figuras 2 y 3; paneles izquierdos) que la estimulación de la AC por las catecolaminas naturales en células de hepatoma está claramente disminuída con respecto a la estimulación inducida por isoproterenol, probablemente como consecuencia de la acción alfa adrenérgica sobre la actividad de la AC en estas células. El Isoproterenol provocó una respuesta máxima en la producción de AMPc, tanto en células de hepatoma como en hepatocitos, a una concentración de $1 \mu M$, por lo que usamos esta concentración en los experimentos posteriores.

En hepatocitos de rata (Figura 3; panel izquierdo) la respuesta fue similar a la observada en las células AS-30D cuando se estimuló con isoproterenol, es decir, que la acumulación de AMPc en las células aumentó de 6 a 7 veces. Sin embargo, el orden de potencia para los agonistas naturales en hepatocitos cambió, la epinefrina fue 100 veces más potente que la norepinefrina. Observamos entonces que el orden de potencia para los agonistas en hepatocitos fue diferente : isoproterenol ($EC_{50} \approx 100 \text{ nM}$) > epinefrina ($EC_{50} \approx 1 \mu M$) >> norepinefrina. Esto nos indica que en hepatocitos son los receptores beta2 adrenérgicos los que modulan la producción de AMPc, ya que para este subtipo de receptor beta la epinefrina es mucho más potente que la norepinefrina (66), a diferencia de lo que se observó en las células AS-30D.

HEPATOMA AS-300

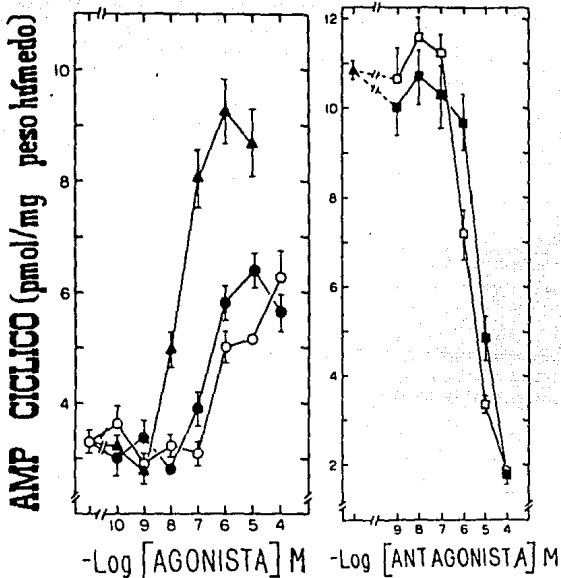


FIG. 2. ACCION BETA ADRENERGICA EN CELULAS DEL HEPATOMA AS-300 DE RATA. Panel izquierdo: las células se incubaron en presencia de diferentes concentraciones de isoproterenol (▲), norepinefrina (●) o epinefrina (○). Panel derecho: las células fueron incubadas con isoproterenol $1 \mu\text{M}$ y en presencia de concentraciones diferentes de ICI 118551 (■) o de atenolol (□). Las incubaciones fueron durante 2 minutos a 37°C , en una solución amortiguadora con MIX $250 \mu\text{M}$. Los puntos son los valores promedio \pm el error estándar de 6 a 10 experimentos.

HEPATOCITOS

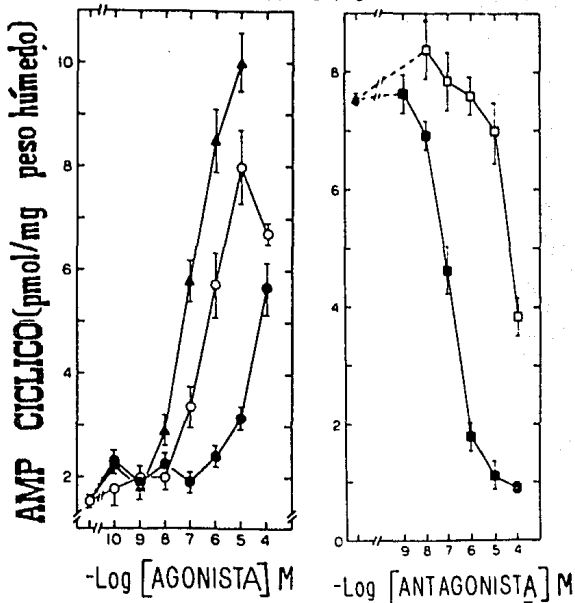


FIG.3. ACCION BETA ADRENERGICA EN HEPATOCITOS. Panel izquierdo: las células se incubaron en presencia o ausencia de concentraciones diferentes de tres agonistas beta adrenérgicos: isoproterenol (▲), norepinefrina (●) o epinefrina (○). Panel derecho: incubación de las células en presencia de isoproterenol 1 μ M y de diferentes concentraciones de ICI 118551 (□) o de atenolol (■). Se muestran los valores promedio de una serie de 6 a 10 experimentos \pm el error estándar de cada uno.

Para confirmar estos resultados, utilizamos los antagonistas selectivos; el atenolol (antagonista betal adrenérgico) y el ICI 118551 (antagonista beta2 adrenérgico).

Los resultados obtenidos son los siguientes, (Figura 2; panel derecho), observamos que en células de hepatoma tanto el atenolol como el ICI 118551 tuvieron efectos inhibitorios sobre la acumulación de AMPc estimulada por isoproterenol $1 \mu\text{M}$.

El orden de potencia para los antagonistas en estas células fue atenolol ($\text{EC}_{50} \approx 2 \mu\text{M}$) > ICI 118551 ($\text{EC}_{50} \approx 7 \mu\text{M}$). Claramente el atenolol inhibió la acumulación de AMPc hasta un 40% desde una concentración de $1 \mu\text{M}$, mientras que el ICI 118551 a esta misma concentración sólo inhibió la respuesta en un 15%. El atenolol fue el antagonista más potente, hizo evidente que la acumulación de AMPc en las células de hepatoma está regulada por receptores betal adrenérgicos.

Por otra parte, la acumulación de AMPc en hepatocitos (Figura 3; panel derecho), estimulada por isoproterenol $1 \mu\text{M}$ fue antagonizada por el ICI 118551 ($\text{EC}_{50} \approx 200 \text{ nM}$) > atenolol. En este caso fue el antagonista beta2 adrenérgico el que inhibió con mayor potencia la acumulación de AMPc; desde concentraciones tan bajas como $0.1 \mu\text{M}$, en donde ya se observó una inhibición de aproximadamente el 40%. El atenolol por otra parte fue capaz de inhibir la respuesta celular a concentraciones altas ($100 \mu\text{M}$) y sólo de manera parcial. Si comparamos la inhibición de la respuesta por este agente con la inhibición por el ICI 118551 vemos que a una concentración de $0.1 \mu\text{M}$, prácticamente la

respuesta no fue bloqueada. Resultados que nos confirman que en hepatocitos la generación de AMPc por la AC se debe a la estimulación de receptores beta2 adrenérgicos. Los valores de las constantes de inhibición (K_i) (66), para la acumulación de AMPc por los dos antagonistas se muestran en la tabla I.

De esta manera, se caracterizó farmacológicamente la respuesta beta adrenérgica en las células del hepatoma AS-30D. Creímos conveniente realizar en estas células la caracterización de los receptores por medio de ligandos radiactivos, ya que es un método directo que permite identificar cinéticas de unión fármaco-receptor, afinidad y número de sitios de pegado específico.

Los resultados de estos estudios realizados con membranas de hepatoma se muestran en la figura 4 (paneles izquierdo y derecho). El análisis de los resultados se obtuvo como se explica en materiales y métodos.

En el panel izquierdo de la figura 4 observamos el análisis de Scatchard del pegado específico del [3H] DHA (a concentraciones de 1 a 8 nM) a los receptores beta adrenérgicos de membranas aisladas de células de hepatoma. Observamos en la gráfica una línea recta de pendiente negativa, la cual sugiere que hay una sola clase de sitios de pegado para el ligando radiactivo, con una constante de disociación, $K_d \approx 3$ nM que se obtiene como la recíproca negativa de la pendiente de la curva. En otras palabras, este análisis nos muestra que existe una densidad relativamente alta de receptores beta adrenérgicos en

Tabla I

EFFECTOS DE LOS ANTAGONISTAS BETA ADRENERGICOS sobre el pegado específico del $[^3\text{H}]$ DHA en membranas de células del hepatoma AS-30D, y sobre la acumulación de AMPc en hepatocitos y en células completas de hepatoma.

ANTAGONISTAS	% receptores en alta afinidad* y baja afinidad**		K _i (nM) para la inhibición del pegado específico del $[^3\text{H}]$ DHA	K _i (nM) para la inhibición de la acumulación AMPc	
	HEPATOMA			HEPATOCITOS	HEPATOMA
ATENOLOL	*	35	77	9,000	80
	**	65	1,725		
ICI 118551	*	78	154	18	270
	**	22	1,754		

Los valores de K_i y porcentaje de receptores en alta y baja afinidad se determinaron como se describió en Materiales y Métodos. Son los valores promedio de 4 y de 6-10 experimentos respectivamente.

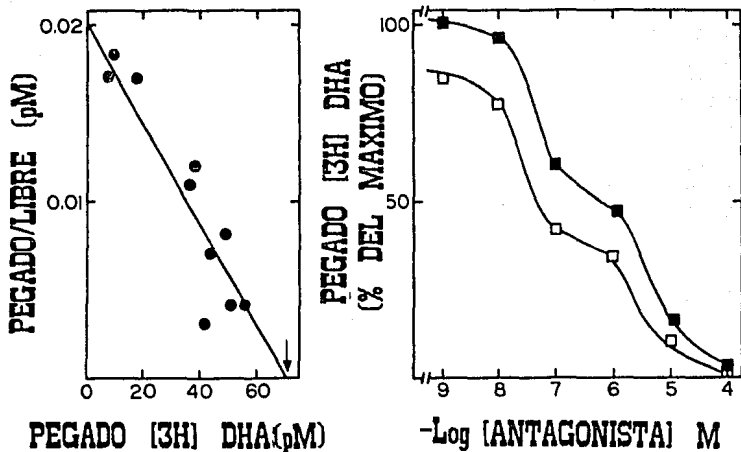


FIG. 4. (Panel izquierdo). ANALISIS DE SCATCHARD. PEGADO ESPECIFICO DEL [3H] DHA A LOS RECEPTORES BETA ADRENERGICOS. La incubación de las membranas de células AS-30D se hizo en presencia de diferentes concentraciones de [3H] DHA. (Panel derecho). INHIBICION DEL PEGADO ESPECIFICO DE [3H] DHA POR LOS ANTAGONISTAS BETA ADRENERGICOS. La incubación de las membranas se hizo en presencia de [3H] DHA 2 nM, y de diferentes concentraciones de ICI 118551 (□) o de atenolol (■). Cada punto representa el promedio de 6 experimentos.

las membranas de las células AS-30D. La densidad total de receptores beta adrenérgicos (B_{max}), presentes en estas células fue de 170 fmolas/mg de protefina, valor que se indica por el intercepto de la curva en el eje de las abscisas.

Las curvas de inhibición del pegado específico del [3H] DHA por los antagonistas beta adrenérgicos selectivos y los valores de sus constantes de inhibición (K_i), se muestran en la figura 4 (panel derecho) y en la tabla I respectivamente. Observamos en la gráfica que sorprendentemente el ICI 118551 fue el agente que desplazó con mayor potencia el pegado específico del [3H] DHA, con respecto al atenolol. A una concentración de 100 nM el antagonista beta2 inhibió en un 50% el pegado específico del ligando radiactivo, el atenolol en este caso inhibió en un 50% la unión [3H] DHA-receptor, pero sólo a una concentración más alta, de 1 μ M. Estos resultados permiten suponer que son los receptores beta2 los que se encuentran en mayor cantidad en las células AS-30D. Además si se observan las dos curvas de desplazamiento del ligando radiactivo por los dos antagonistas se aprecia que cada curva tiene dos pendientes, por lo que suponemos que existen dos poblaciones de receptores beta adrenérgicos para cada antagonista con distinta afinidad para estos.

El análisis posterior de las curvas por el programa "LIGAND" nos proporcionó los porcentajes relativos de los sitios de unión en alta y en baja afinidad para cada uno de los agentes, los resultados se muestran en la tabla I. De la

competencia del pegado del [3H] DHA con el atenolol resultó un 35 % de sitios en alta afinidad para este agente y un 65 % de sitios con baja afinidad. Con el ICI 118551 resultó un 78 % de sitios de alta afinidad y un 22% de sitios de baja afinidad para este agente.

En este estudio nuestro interés fue dirigido posteriormente a medir la actividad de la AC en membranas de células de hepatoma y de hepatocitos, ya que como antecedentes sabíamos que la producción de AMPc estimulada por las catecolaminas es mucho menor en las células AS-30D que en los hepatocitos (paneles izquierdos de las figuras 2 y 3). Esto con el fin de determinar a que nivel ó cual de los elementos del sistema de transducción de la AC era el responsable de tal disminución en la respuesta. Descartando en este momento, la posibilidad de que este efecto disminuido en la estimulación beta adrenérgica por las catecolaminas se debiera a la acción alfa adrenérgica, ya que ninguno de los antagonistas alfa adrenérgicos empleados para inhibir la estimulación de la AC por la epinefrina disminuyó los niveles de AMPc (datos que no se muestran).

Observamos que la actividad basal de la enzima fue similar en membranas de hepatocitos y en membranas de hepatoma (Tabla II); pero la estimulación de la respuesta beta adrenérgica con isoproterenol + GTP, la activación de las proteínas G con Gpp(NH)p (análogo no hidrolizable del GTP) y la activación de la subunidad catalítica de la AC estimulada por forskolina fue mucho menor en membranas de hepatoma que en membranas de

Tabla II.

ACTIVIDAD DE LA ADENILATO CICLASA en membranas de hepatocitos o en membranas de células del hepatoma AS-30D.

AGENTE EN EL ENSAYO	HEPATOCITOS	HEPATOMA AS-30D
	Actividad específica (pmol min ⁻¹ mg proteína ⁻¹)	
Ninguno	6.5 ± 1.2	7.3 ± 1.0
Isoproterenol 10 μM + GTP 100 μM	17.5 ± 1.32	9.1 ± 1.5
Gpp(NH)p 100 μM	28.0 ± 5.6	10.5 ± 1.5
Forskolina 100 μM	69.0 ± 7.9	40.0 ± 4.0

Los resultados son valores promedio ± el error estándar de 16 determinaciones, utilizando 4 preparaciones diferentes de membranas en cada caso.

hepatocitos. La estimulación beta adrenérgica fue muy pequeña en membranas de hepatoma, sólo del 20 al 50 % con respecto al valor basal y bajo todas las condiciones. Desafortunadamente estos resultados no nos permitieron esclarecer porqué la respuesta a las catecolaminas es menor en estas células.

A continuación se estudió si hay desensibilización de la respuesta beta adrenérgica de las células de hepatoma, para de alguna manera comparar el fenómeno con la desensibilización de la respuesta beta adrenérgica típica de hepatocitos de ratas hipotiroideas (49). Previamente en nuestro laboratorio se demostró que la activación de la respuesta beta adrenérgica en hepatocitos de rata muestra una desensibilización homóloga por el isoproterenol (36) y además una desensibilización heteróloga de la acumulación de AMPc (41) por los ésteres de forbol .

En la figura 5 se muestran los resultados del estudio de desensibilización. Lo primero que observamos fue que los pretratamientos de las células de hepatoma durante 15 minutos con TPA 100 nM, o con TPA 100 nM más isoproterenol 100 μ M, provocó la disminución de los niveles basales de AMPc, por ello se muestra en el panel derecho los valores normalizados como por ciento con respecto al control. La preincubación de las células con isoproterenol 100 μ M disminuyó claramente (40%) las subsecuentes estimulaciones beta adrenérgicas con el mismo agente. El TPA sólo indujo un pequeño desplazamiento de la curva dosis-respuesta al isoproterenol, sin que la disminución de la producción de AMPc fuera muy grande. Sólo en un intervalo, de l

HEPATOMA AS-30D

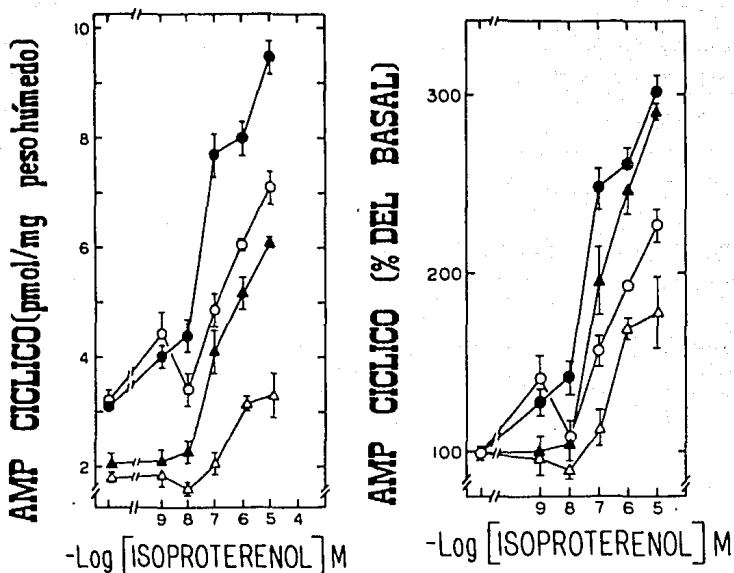


FIG. 5. DESENSIBILIZACION BETA ADRENERGICA EN CELULAS AS-30D. Las células se incubaron durante 15 minutos a 37 °C, sin agentes (●), con isoproterenol 100 μM (○), con TPA 100 nM (▲), o con ambos agentes juntos (Δ). Después de la preincubación las células se lavaron exhaustivamente y se incubaron durante 2 minutos en una solución amortiguadora con MIX 250 μM en presencia de diferentes concentraciones de isoproterenol. Se presentan los valores absolutos (panel izquierdo) y los valores normalizados como porcentaje con respecto al control (panel derecho). Cada punto representa el promedio ± el error estándar de determinaciones por triplicado de 6 a 7 preparaciones diferentes.

nM a 100 nM de isoproterenol la respuesta fue menor en un 30 % con respecto al control.

La respuesta fue aún menor cuando los dos agentes se pusieron en el medio de incubación. La respuesta beta adrenérgica se desensibilizó un 60%, por lo que se puede suponer que la disminución de la respuesta beta en las células AS-30D es aditiva, de tal forma que además de intervenir en esta disminución alguno de los elementos del sistema de la AC, probablemente participe la proteína cinasa C en este fenómeno de desensibilización. Resultados similares se han obtenido en hepatocitos (41).

Para definir cual de los componentes del sistema de la AC es el que se afecta en este fenómeno, se preincubaron a las células bajo las mismas 4 condiciones anteriores; pero ahora retando a las células con forskolina 100 μ M o con isoproterenol 1 μ M.

En la figura 6 se muestran los resultados que obtuvimos. La acumulación de AMPc en respuesta a forskolina no se afectó significativamente bajo ninguna de las 4 condiciones de preincubación. La respuesta a la estimulación beta adrenérgica por isoproterenol disminuyó después de la preincubación de las células únicamente con isoproterenol, y no por la preincubación con TPA. La disminución de la acumulación de AMPc se observó de manera clara cuando las células estuvieron expuestas por 15 minutos al isoproterenol y al TPA juntos. Posiblemente en nuestro sistema celular sean los receptores beta los que están

HEPATOMA AS-30D

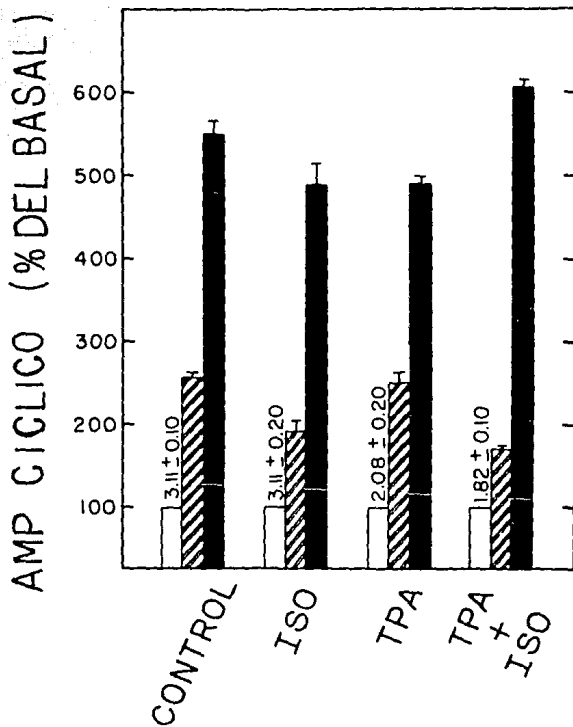


FIG.6. EFECTO DE LA PREINCUBACION DE LAS CELULAS SOBRE LA RESPUESTA A ISOPROTERENOL O FORSKOLINA. Las células de hepatoma se preincubaron en ausencia (control) o presencia de isoproterenol 100 μ M (ISO), de TPA 100 μ M o de ambos agentes (TPA + ISO). Se lavaron las células e incubaron sin ningún agente (barras blancas), con isoproterenol 1 μ M (barras rayadas) o con forskolina 100 μ M (barras negras). Los resultados se muestran como porcentaje con respecto al valor basal dado en pmolas AMPc/mg peso húmedo de las células. El promedio se indica por las barras \pm el error estándar de determinaciones por triplicado de 6 a 7 preparaciones distintas.

involucrados directamente en este fenómeno y no la AC, como sugieren los resultados anteriores. Sin embargo, no se puede descartar que la desensibilización de la respuesta beta adrenérgica de las células AS-30D ocurra también a nivel de las proteínas G.

5. DISCUSION.

Los resultados de nuestro estudio muestran que las células del hepatoma de rata de la línea celular AS-30, expresan una marcada respuesta beta adrenérgica, característica de estados celulares proliferativos (67 a 70), de células en cultivo (69 y 70), de hígado fetal (71), de hígado en regeneración (67 y 68) y de hepatocitos aislados de ratas tratadas con compuestos cancerígenos (51 a 53), ya que bajo estas condiciones se ve alterada la actividad de la AC.

En la caracterización farmacológica de la respuesta adrenérgica de las células AS-30D resultó claro que la epinefrina y la norepinefrina fueron igualmente potentes para estimular la producción de AMPc intracelular, por lo que podemos asegurar que son los receptores del subtipo beta1, y no los beta2 los que modulan la generación del segundo mensajero. En hepatocitos de rata, la epinefrina fue mucho más potente que la norepinefrina para estimular la producción de AMPc, a diferencia del orden de potencia que observamos para estas catecolaminas en las células AS-30D. Por lo tanto son los receptores del subtipo beta1 los que regulan la producción del AMPc en el sistema de transducción de la AC de células normales de hígado (49).

El empleo de los antagonistas selectivos nos permitió comprobar las observaciones anteriores. El efecto inhibitorio de los dos agentes fue determinado en presencia de una sola concentración de isoproterenol ($1 \mu\text{M}$), con la cual se obtuvo la

estimulación máxima de la producción de AMPc en ambos tipos celulares (Figuras 2 y 3). En hepatocitos, el ICI 118551 bloqueó la producción de AMPc con mayor potencia, lo hizo desde concentraciones bajas en comparación con el atenolol que únicamente bloqueó la respuesta de manera parcial. La potencia del atenolol para inhibir la acumulación de AMPc en células de hepatoma fue mayor en este caso, fue suficiente una concentración de 1 M de este antagonista beta para inhibir la respuesta en un 40%, a diferencia del ICI 118551 que a la misma concentración sólo la inhibió en un 15%. Estos resultados estarían de acuerdo con trabajos anteriores (72) en donde se descubrió en una gran variedad de tejidos, que la transformación maligna está acompañada por cambios en el sistema de la AC; estos cambios probablemente debidos a la ausencia funcional de la AC, a un cambio en la conformación de esta enzima efectora, o por alteraciones en el número de los receptores membranales a hormonas acoplados a este sistema de transducción (20).

Por ejemplo, se sabe que en el hígado la actividad de la AC estimulada por varios activadores cambia cuando se presenta un tumor, o incluso hay diferencias en su actividad de un tipo de tumor a otro, y lo mismo se ha descrito que ocurre en el proceso de carcinogénesis; de tal manera que se ve incrementada generalmente la respuesta a las catecolaminas (72). Ya se había demostrado que los hepatocitos aislados de ratas hipertiroideas son un modelo celular que presenta una respuesta beta adrenérgica prominente (49), a diferencia de lo que ocurre en

hepatocitos aislados de ratas eutiroides, por ello es que lo utilizamos para hacer la comparación de la respuesta al encontrar que las células del hepatoma AS-30D responden a agonistas beta adrenérgicos. Resultó interesante que el orden de potencia relativa para los agonistas naturales en células de hepatoma fuera uno característico del subtipo betal, por lo que podemos pensar que en nuestro sistema la transformación maligna no solo provoca un cambio cuantitativo en la actividad de la AC. Sino que provoca además un cambio cualitativo de tal magnitud, que de expresarse adrenoceptores del subtipo beta² "normales" se expresen receptores del subtipo betal y sean los que regulan de manera más importante la producción de AMPc. Es importante mencionar que esta transformación de un tipo de receptor a otro se observó también en un hepatoma ascítico de otra línea celular, el hepatoma Zadjela (72). La producción de AMPc en células de hepatoma es menor con respecto a la respuesta en hepatocitos estimulados con las catecolaminas naturales, pero no cuando estimulamos con el isoproterenol. Esta información se correlaciona con los datos obtenidos al medir la actividad de la AC en membranas, en donde su actividad resultó ser menor bajo todas las condiciones de activación, con isoproterenol + GTP a nivel de los receptores beta, con Gpp(NH)p a nivel de las proteínas Gs, o con forskolina a nivel de la subunidad catalítica de la AC. Sin embargo, aun no sabemos si efectivamente se trate en este sistema celular, de una alteración de la AC, ya que por otra parte esta respuesta inhibitoria de la enzima

efectora podría estar mediada por receptores alfa adrenérgicos, no obstante que el uso de la fentolamina, la yohimbina y la prazosina (antagonistas alfa adrenérgicos) no tuvo ningún efecto sobre la acción de la norepinefrina en la acumulación de AMPc (resultados que no se muestran).

La razón por la cual se expresan receptores beta1 en las células AS-30D como moduladores principales de la acumulación de AMPc no la conocemos, pero existen varias explicaciones posibles. Una de ellas es que bajo condiciones de activa proliferación celular se exprese el gene que codifica a los receptores beta1 como consecuencia de los cambios que ocurren en el medio al transformarse de una célula normal a una célula maligna. Por otra parte, se sabe que hay una regulación de los receptores beta adrenérgicos dada por la activación quizá directamente del genoma, por hormonas tales como los glucocorticoides y las hormonas tiroideas. Estas hormonas lo que hacen es modular el número de receptores beta en numerosos tejidos y en células en cultivo (73 y 74). Lo mismo se ha visto con compuestos que pertenecen a la familia de los ésteres de forbol, como el forbol dibutirato, el cual regula la expresión de receptores beta adrenérgicos. En la línea celular 3T3-L1 de ratón tanto los glucocorticoides como el forbol dibutirato promueven un incremento en la expresión de receptores beta2, sin incrementar la expresión de receptores beta1, lo que indica que los dos subtipos de receptores son regulados independientemente (65).

Sí bien con las células AS-30D completas determinamos el

predominio de los receptores beta1 adrenérgicos sobre la producción de AMPc, tenemos evidencias de que en las membranas celulares, en los estudios de pegado específico del ligando radiactivo, los dos subtipos de receptores coexisten en estas células y tienen sitios de unión con diferentes afinidades para los antagonistas selectivos utilizados. En otros tejidos de mamífero ya se ha visto que los dos subtipos están presentes en la misma célula (12). Incluso en otros estudios se han caracterizado a los receptores beta1 y a los beta2 adrenérgicos por su distribución en el tejido, por ejemplo en sistemas celulares de mamíferos el subtipo beta1 predomina en corazón, mientras que el subtipo beta2 predomina en pulmón y en músculo liso uterino. En el cerebro la localización es compleja y las proporciones relativas de receptores beta1 y beta2 cambian de una área a otra, además de que esta distribución diferencial se combina con las diferencias en afinidad y en especificidad de la respuesta celular a las catecolaminas. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que las preparaciones celulares usadas en nuestros experimentos consideradas como homogéneas sólo por la morfología de las células, sean en realidad dos poblaciones de células (52) que responden de manera diferente a las catecolaminas, según sus receptores. Sin embargo, la población de receptores beta2 adrenérgicos no parece contribuir a la acumulación de AMPc.

Ha sido ampliamente estudiada la regulación de los receptores beta adrenérgicos en muchos tipos celulares. Uno de

los mecanismos que permiten dicha regulación es la desensibilización de la respuesta celular, la cual se observa después de periodos prolongados de exposición de las células a los agonistas beta adrenérgicos o a los ésteres de forbol. Ya en cultivo primario de hepatocitos (39) y en hepatocitos aislados de ratas hipotiroideas (36), entre otros tipos celulares, se demostró que el pretratamiento de los hepatocitos con isoproterenol induce una desensibilización de la respuesta beta adrenérgica estimulada por este agente ó una desensibilización de tipo homóloga, ya que la producción de AMPc no disminuye cuando se estimula a la AC con el glucagon. También en hepatocitos de ratas hipotiroideas se demostró que el pretratamiento de las células con un éster activo del forbol, el tetradecanoil forbol miristato acetato (TPA) induce una desensibilización de tipo heteróloga, se reduce marcadamente la estimulación de la ureagénesis y de la acumulación de AMPc inducida por isoproterenol o por glucagon (41). En las células AS-30D la acumulación de AMPc en respuesta a las subsecuentes estimulaciones beta adrenérgicas disminuyó 40 % (Figura 5), como efecto del pretratamiento con isoproterenol 100 μ M, y un 30 % como efecto del pretratamiento con TPA 100 nM. Es interesante que bajo condiciones de preincubación en donde los dos agentes estuvieron presentes la acumulación de AMPc estimulada por isoproterenol fuera más significativa, del 60 %, lo que nos sugiere que los efectos que tienen los dos agentes en la desensibilización de la respuesta son aditivos y que

posiblemente se traten de varios elementos o sitios implicados en la desensibilización de la respuesta beta adrenérgica. La falta de una respuesta significativa cuando se midió la acumulación de AMPc en células o al medir la actividad de la AC en membranas con agonistas no-adrenérgicos tales como el glucagon, la histamina, la N-etilcarboxamida adenosina, las prostaglandinas E2 y la ACTH, nos impidió clasificar este fenómeno como una desensibilización homóloga o heteróloga, e identificar el sitio o sitios de regulación.

Podemos suponer que si el tratamiento de las células con TPA disminuyó la actividad de la AC acoplada a los receptores beta adrenérgicos, entonces interviene en la desensibilización de este sistema la proteína cinasa C. Se ha visto que los ésteres de forbol tienen muchos efectos en una gran variedad de receptores externos, incluyendo a los beta adrenérgicos (38). Por otra parte si observamos una disminución de la producción de AMPc después de que se preincubaron las células con isoproterenol, podemos considerar que son los receptores beta adrenérgicos los que están directamente implicados en este fenómeno biológico. Para esta consideración existen varias explicaciones. Se ha demostrado que la desensibilización puede ser el resultado de varios sucesos: uno de ellos es la fosforilación de los receptores por una proteína cinasa del receptor beta adrenérgico (44), otro que el número de receptores disminuya porque sean secuestrados de la superficie celular hacia el interior de la membrana lo que impide que se acoplen a las

proteínas Gs (75). Algunos autores sugieren que el acoplamiento receptor-proteína Gs es fundamental en la desensibilización, ya que si ambos elementos se desacoplan resulta que el receptor pierde la capacidad de ser desensibilizado y secuestrado (76). Evidentemente es necesario ampliar los estudios si deseamos precisar los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la(s) desensibilización(es) aquí presentada(s).

6. CONCLUSIONES.

En el presente estudio, se demuestra directamente que la acumulación de AMPc en células del hepatoma AS-30D, es mediada principalmente a través de la estimulación de receptores beta1 adrenérgicos, mientras que en los hepatocitos es mediada por receptores beta2 adrenérgicos.

Las células de hepatoma tienen los dos subtipos de receptores beta adrenérgicos.

Las células de hepatoma manifiestan el fenómeno de desensibilización beta adrenérgica; al igual que los hepatocitos. La desensibilización no ocurre a nivel de la AC, pero sí probablemente a nivel de los receptores. No quedó definido si en las células AS-30D la desensibilización es de tipo homóloga o de tipo heteróloga, debido a la falta de repuestas significativas a otras hormonas que estimulan a la AC pero que se acoplan a receptores diferentes a los beta adrenérgicos.

7. BIBLIOGRAFIA.

1. Bonner, J.T. (1972) *Ann. Rev. Microbiol.* 25: 75-92.
2. García-Sáinz, J. A. (1987) "La Ciencia desde México". Vol. 28, 108 p.
3. Ariens, E. J. (1984) en *Journal of Receptor Research*. Vol. 4 (números 1-6).
4. García-Sáinz, J. A. (1987) en *Mensaje Bioquímico*. (L. Fernández, Y. Saldaña, S. Jiménez y Morales eds.) Vol. X 177-210 pp.
5. Lester, H. A. (1988) *Science*. 241: 1057-1063.
6. Zemcik, B.A., Strader, C.D. (1988) *Biochem. J.* 251: 333-339.
7. Strader, C., Sigal, D., Register, I. S., Candelore, M. R., Rands, S. E. y Dixon, R. A. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 84: 4384-4388.
8. Howell, G. M., Po, C. y Lafebvre, Y. A. (1989) *Biochem. J.* 260: 435-441.
9. Berridge, M.J. (1985) *Sci. Am.* 253(4): 124-134.
10. Alquist, R. P. (1948). *Am. J. Physiol.* 135: 586-600.
11. Lands, A. M., Arnold, A. McAuliff, J. P., Luduena, F. P. y Brown, T.G. Jr. (1967) *Nature*. 214: 597-598.
12. Minneman, K. P. y Molinoff, P. B. (1980) *Biochem. Pharmacol.* 29: 1317-1323.
13. Nahorski, S. R. (1981) en *Towards Understanding Receptor*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. 71-77 p.
14. Frielle, T., Collins, S., Daniel, K. W., Caron, M. G.,

- Lefkowitz, R. J. y Kobilka, B. K. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 7920-7924.
15. Moxham, C. P., George, S. T., Graziano, M. P., Branwein, H. J. y Malbon, C. C. (1986) J. Biol. Chem. 261: 14532-14569.
 16. Stiles, G. L., Strasser, R. H., Caron, M. G. y Lefkowitz, R. J. (1983) J. Biol. Chem. 258: 10689-10694.
 17. Levitzki, A. (1988) Science. 241: 800-806.
 18. Newsholme, E. A. y Leech, A. R. (1987) Bioquímica Médica. Interamericana. 803 p.
 19. Rall, T. W. y Sutherland, J. (1958) J. Biol. Chem. 232: 1065.
 20. Pastan, I. (1972) Sci. Am. 227: 97-105.
 21. Lefkowitz, R. J., Stadel, J. M. y Caron, M. (1983) Ann. Rev. Biochem. 52: 159-186.
 22. Rodbell, M., Krans, H. M. J., Birnbaumer, L. y Pohl, J. (1971) J. Biol. Chem. 246: 1872.
 23. Casey, P. J. y Gilman, A. G. (1988) J. Biol. Chem. 25: 2577-2580.
 24. Birnbaumer, L. (1987) Trends. Pharmacol. Sci. 8: 209-211.
 25. Lochrie, M. A. y Simon, M. I. (1988) Biochemistry. 27: 4957-4965.
 26. Conn, M. (1984) Biochem. J. 220: 345-360.
 27. Neer, E. J. y Clapham, D.E. (1988) Nature. 33: 129-134.
 28. Berridge, M.J. (1984) Biochem. J. 220: 345-360.
 29. Takai, Y., Kishimoto, A., Inone, M. y Nishizuka, Y. (1977) J. Biol. Chem. 252: 7603.
 30. Nishizuka, Y. (1986) Science. 233: 305-311.

31. Exton, J. H. (1985) *J. Clin. Invest.* 75: 1753-1757.
32. Evans, F. J. (1986) *Naturally Occurring Phorbol Esters*. CRC Press. 313 p.
33. Triggle, D. J. (1981) *en Towards Understanding Receptors*. Elsevier/North-Holland Biom. Press. 28-33 pp.
34. Aggerberck, M., Ferry, N., Zafran, E.S., Billan, M. C., Barouk, R. y Hanoune, J. (1983) *J. Clin. Invest.* 71: 476-486.
35. Benovic, J. L., Pike, L. J., Cerione, R. A. y Staniszewski, C. (1985) *J. Biol. Chem.* 260: 7094-7101.
36. García-Sáinz, J. A. y Michel, B. (1987) *Biochem. J.* 246: 331-336.
37. Chambaut-Guerin, A. M. y Tomoupoulus, P. (1987) *Eur. J. Biochem.* 170: 381-387.
38. Toews, M. L., Liang, M. y Perkins, J. P. (1987) *Mol. Pharmacol.* 32: 737-742.
39. Noda, Ch., Shiniyo, F., Tomomura, A., Kato, S., Nakamura, T. e Ichihara, A. (1984) *J. Biol. Chem.* 259: 7747-7754.
40. Clark, R. B., Kunkel, M. W., Friedman, J., Goka, T. J. y Johnson, J. A. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 1442-1446.
41. Hernández-Sotomayor, S. M. T., Macías, S. M., Plebański, M. y García-Sáinz, J. A. (1988) *Biochem. Biophys. Acta.* 972: 311-319.
42. Mickey, J. V., Tate, R. y Lefkowitz, R. J. (1975) *J. Biol. Chem.* 250: 5727-5729.
43. Mickey, J. V., Tate, R. y Lekowitz, R. J. (1976) *J. Mol.*

Pharmacol. 12: 409-414.

44. Martin, J. L., Lefkowitz, R. J. , Caron, M. G. y Benovic, J. L. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 3011-3015.
45. Harden, T. S. Y. y Perkins, J. P. (1979) J. Cyclic Nucleotide Res. 5: 99-106.
46. Harden, T. S. (1983) Pharmacol. Rev. 3: 5-32.
47. Heyworth, C. M. y Houslay, M. D. (1983) Biochem. J. 214: 93-98.
48. Malbon, C. C. y Fain, J. N. (1978) J. Biol. Chem. 253: 8820-8825.
49. Corvera, S., Hernández-Sotomayor, S. M. T. y García-Sáinz, J. A. (1984) Biochem. Biophys. Acta. 803: 95-105.
50. Bitensky, M. W., Russel, V. y Blanco, M. (1970) Endocrinology (Baltimore). 86: 154-159.
51. Boyd, H., Louis, C. J. y Martin, T. J. (1974) Cancer Research. 34: 1720-1735.
52. Christoffersen, T. y Berg, T. (1975) Biochem. Biophys. Acta. 381: 72-77.
53. Boyd, H. y Martin. T. J. (1975) Mol. Pharmacol. 12: 195-202.
54. Smith, D. F., Walborg, E. F., Chang, J. P. (1970) Cancer Res. 30: 2306-2309.
55. Berry, M. N. y Friend, D. S. (1969) J. Cell. Biol. 43: 506-520.
56. Brown, B. L., Albano, J. D. M., Elkins, P. y Sgherzi, A. M. (1971) Biochem. J. 121: 561-562.
57. Gilman, A. G. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 67: 305-312.

58. Loten, E. G. y Redshaw-Loten, J. L. (1986) *Anal. Biochem.* 154: 183-185.
59. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
60. Salomon, Y., Londos, C. y Robdell, M. (1974) *Anal. Biochem.* 58: 541-548.
61. Yamada, S., Kashiwabara, T., Yamazawa, T., Harada, Y. y Nakayama, K. (1988) *Life Sci.* 43: 1999-2006.
62. Minneman, K. P., Hedberg, A. y Molinoff, P. B. (1979) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 211: 502-508.
63. Minneman, K. P., Hegstrand, L. R. y Molinoff, P. B. (1979) *Mol. Pharmacol.* 16: 34-46.
64. Munson, P. J. y Rodbard, L. (1980) *Anal. Biochem.* 107: 220-239.
65. Nakada, M. T., Haskell, K. M., Ecker, D. J., Stadel, J. M. y Crooke, S. T. (1989) *Biochem. J.* 260: 53-59.
66. Cheng, Y. y Prusoff, W. F. (1979) *Biochem. Pharmacol.* 22: 3099-3108.
67. Huerta-Baena, J., Villalobos-Molina, R. y García-Sáinz, J. A. (1983) *Biochem. Biophys. Acta.* 763: 112-119.
68. García-Sáinz, J. A. y Nájera-Alvarado, A. (1986) *Biochem. Biophys. Acta.* 885: 102-109.
69. Refnes, M., Sadnes, D. y Christoffersen, T. (1987). *Eur. J. Biochem.* 163: 457-466.
70. Nakamura, T., Tomomura, A., Nodaj, L., Shimoji, M. e Ichihara A. (1983) *J. Biol. Chem.* 258: 9283-9289.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

71. Sherline, P., Eisen, H. y Glinsmann, W. (1974) *Endocrinology*.
94: 935-939.
72. Lacombe, M. L., Rene, M., Guellen, G. y Hanoune, J. (1976)
Nature. 262: 70-72.
73. O'Donell, S. R. y Wanstall, J. C. (1987) *Trends. Pharmacol.*
Sci. 8: 265-268.
74. Scarpace, P. J. y Abrass, I. B. (1982) *J. Pharmacol. Exp.*
Ther. 223: 327-331.
75. Conney, D. y Keenan, A. K. (1988) *Biochem. Pharmacol.* 37:
3701-3708.
76. Strader, C. D., Sigal, I. S., Blake, A. D., Cheung, A. H.,
Register, R. B., Rands, E., Zencik, B. A., Candelore, M. R. y
Dixon, R. A. F. (1987) *Cell*. 49: 855-863.

BETA₁-ADRENOCEPTORS IN RAT HEPATOMA. DESENSITIZATION BY
ISOPROTERENOL AND PHORBOL-MYRISTATE-ACETATE.

J. Adolfo García-Sáinz, Rocío Alcántara,
S. M. Teresa Hernández-Sotomayor and Jaime Mas-Oliva.

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de
México, Ap. Postal 70-248, 04510 México D. F. MEXICO

(Received in final form March 30, 1989)

Summary

The beta-adrenergic responsiveness of hepatocytes obtained from hypothyroid rats and of a transplantable hepatoma cell line (AS-30D) were studied by measuring the accumulation of cyclic AMP. The potency order for agonists in hepatocytes was: isoproterenol > epinephrine >> norepinephrine whereas in the hepatoma cells the potency order was: isoproterenol > norepinephrine > epinephrine. The effect of isoproterenol was antagonized in hepatocytes by low concentrations of ICI 118551 and only partially by concentrations of atenolol as high as 100 µM. In hepatoma cells the effect of isoproterenol was inhibited by both antagonists with the potency order atenolol > ICI 118551. These data indicate that in hepatocytes the effect is mediated by beta₂-adrenoceptors whereas in hepatoma cells it is through beta₁-adrenoceptors.

Preincubation of hepatoma cells with isoproterenol or phorbol-myristate-acetate diminished the subsequent beta-adrenergic responsiveness of the cells. Interestingly, when both isoproterenol and phorbol-myristate-acetate were present during the preincubation the beta-adrenergic desensitization observed was bigger than that induced by any of these agents alone.

Beta-adrenoceptors have been extensively studied and are among the best characterized receptors (1). The existence of beta-adrenoceptor subtypes were first postulated by Lands *et al* (2). These investigators subdivided these adrenoceptors into two categories, beta₁ and beta₂, on the basis of the rank order of potency of agonists. Liver beta-adrenoceptors belong to the beta₂-adrenoceptor subtype (3,4).

Liver cells rarely undergo mitosis under normal conditions but proliferate actively in response to partial hepatectomy (5-7), cholestasis (7) or during cell culture (8,9). Such proliferative states are usually associated with a marked beta-adrenergic responsiveness (5-9). Similarly, in preneoplastic rat liver there is a prominent beta-adrenergic responsiveness (10-12).

Using a transplantable ascites variant of a rat hepatoma (AS-30D) (13) we investigated if these cells accumulate cyclic AMP in response to beta-adrenergic activation. Surprisingly, it was observed that the type of adrenoceptor that mediates this effect does not belong to the beta₂-class but rather to the beta₁-subtype. The characterization of this receptor and the desensitizations induced by preincubation with an agonist and/or an active phorbol ester are here reported.

Materials and Methods

Materials: 1-Isoproterenol, 1-epinephrine, 1-norepinephrine, GTP, guanylyl imidodiphosphate (Gpp(NH)p), theophylline, ATP, phosphocreatine, creatine kinase, phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA), 6-N-propyl 2-thiouracil, N'-2-hydroxyethylpiperazine-N''2 etanesulfonic acid (Hepes) and methyl-isobutyl-xanthine were obtained from Sigma Chemical Co. Forskolin (7 beta-acetoxy-8-12-epoxy-12, 6 beta, 9 alpha-trihydroxylabd-14-en-11-one) was from Calbiochem. Glucagon was generously given by Eli Lilly. Atenolol and ICI 118551 were generous gifts from Imperial Chemical Industries. [³H]Cyclic AMP (32 Ci/mmol) and [α -³²P]ATP (28.7 Ci/mmol) were obtained from New England Nuclear. Percoll was from Pharmacia.

Hepatoma: The AS-30D tumor was transplanted essentially as described in the original report (13). In brief, AS-30D cells suspended in saline solution were injected into 8-week old rats; within one week sufficient ascites fluid developed to distend the abdominal wall. For transplantation 3 ml of the ascites fluid was injected per rat and was maintained from 5 to 10 transplant generations. Approximately 6 ml of ascites fluid was obtained for each experiment; usually 3-4 samples could be obtained from each rat in consecutive days.

The cells obtained in the ascites fluid were washed 4-times by centrifugation and resuspension with Krebs-Ringer bicarbonate Hepes buffer (120 mM NaCl, 4.75 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 20 mM NaHCO₃, 10 mM Hepes, adjusted to pH 7.4 at 37°C under an atmosphere of 95% O₂ 5% CO₂) to remove red blood cells and other ascites components. This system produces a high yield of tumor cells which can be obtained essentially free of nontumor cells and connective tissue.

Hepatocytes: Liver cells obtained from hypothyroid rats (14) were used for comparison. Hypothyroidism was induced by giving the animals water containing 0.03% 6-N-propyl-2-thiouracil for 40-50 days and it was assessed by decreased weight gain, dryness of the fur and decreased levels of triiodothyronine (14). Hepatocytes were isolated by the method of Berry and Friend (15); the cells were resuspended in Krebs-Ringer bicarbonate Hepes buffer.

Cyclic AMP accumulation: The cells (\approx 10 mg of AS-30D cells or \approx 30 mg of hepatocytes wet weight) were incubated for 2 minutes in buffer containing 250 μ M methyl isobutyl xanthine and the agents to be tested. Cyclic AMP was determined by the method of Brown *et al* (16).

Adenylate cyclase: Membranes were isolated from hepatocytes or hepatoma cells by a modification of the method of Loten and Redshaw-Loten (17). In brief, 2-2.5 ml of packed cells were homogenized at 4°C with a Dounce homogenizer in 12.5 ml of 250 mM sucrose, 10 mM Tris pH 7.5. The homogenate was centrifuged at 1500 g for 15 min; the pellet was resuspended in 12.5 ml of the same buffer and 3.4 ml of Percoll and 0.5 ml of 2 M sucrose were added. This suspension was thoroughly mixed with the homogenizer and centrifuged at 35,000 g for 20 min. The plasma membrane fraction was clearly visible at the top of the tube. This layer was removed and washed with 25 mM Tris, 5 mM MgCl₂ pH 7.5.

Adenylate cyclase activity was assayed in a mixture containing 25 mM Tris pH 7.5, 0.4 mM ATP (containing 1-2 x 10⁶ cpm of [α -³²P]ATP), 5 mM MgCl₂, 10 mM theophylline, 7.4 mg/ml phosphocreatine and 1 mg/ml creatine kinase. The reaction was initiated by the addition of membrane protein (\approx 150 μ g) to a total volume of 0.1 ml and was carried out for 20 min at 30°C. Cyclic AMP was isolated as described by Salomon *et al* (18). Protein was quantified by the method of Lowry *et al* (19) using bovine serum albumin as standard.

Results

Activation of AS-30D cells with the beta-adrenergic agonist isoproterenol (1 μ M) resulted in a rapid accumulation of cyclic AMP that reached its maximum (\approx 3-fold increases) at 2 min followed by a slow decrease (\approx 30% at 20 min). Forskolin (100 μ M) produced a bigger response (5 to 6-fold increases) with a similar time-course (results not shown).

Hepatocytes isolated from hypothyroid rats, which have a big beta-adrenergic responsiveness (14), were used for comparison in this study. These cells also reached the maximal accumulation of cyclic AMP 2 minutes after activation with 1 μ M isoproterenol (\approx 5-fold increases) or 100 μ M forskolin (\approx 15-fold increase) and with a similar time-course (results not shown). For all subsequent experiments the incubations were for 2 min.

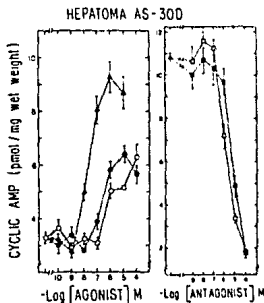


FIG. 1

Beta-adrenergic action in hepatoma AS-30D. Left panel: cells were incubated in the absence or presence of different concentrations of isoproterenol (closed triangles), norepinephrine (closed circles) or epinephrine (open circles). Right panel: cells were incubated in the presence of 1 μ M isoproterenol alone (triangle) or in the presence of different concentrations of either atenolol (open squares) or ICI 118551 (close squares). Incubations were for 2 min in buffer containing 250 μ M methyl isobutyl xanthine. Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of triplicate determinations of 6-10 different cell preparations.

Figure 1 (left panel) shows the accumulation of cyclic AMP in AS-30D hepatoma cells in response to different agonists. Isoproterenol has more efficacy than epinephrine or norepinephrine; the possibility of an inhibitory alpha-adrenergic action was considered. However, none of the alpha-adrenergic antagonists used (phentolamine, yohimbine and prazosin) magnified the beta-adrenergic action of epinephrine. The reason for this difference in efficacy is currently unknown. Nevertheless, it was clear that the order of potency was: isoproterenol ($EC_{50} \approx$ 40 nM) > norepinephrine ($EC_{50} \approx$ 300 nM) \geq epinephrine

(EC₅₀ = 1 μM). In contrast, in hepatocytes (Fig. 2 left panel) the order of potency was isoproterenol (EC₅₀ ≈ 100 nM) > epinephrine (EC₅₀ = 1 μM) > norepinephrine. This latter order of potency characterizes beta₂-adrenergic receptors, whereas that observed in hepatoma cells suggest the involvement of beta₁-adrenoceptors.

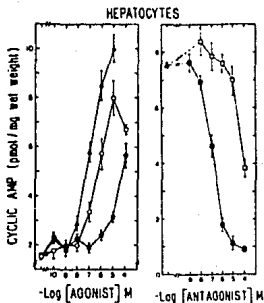


FIG. 2

Beta-adrenergic action in hepatocytes. Indications as in Figure 1.

In order to further document these findings, the selective antagonists atenolol (beta₁-adrenergic selective) (20) and ICI 118551 (beta₂-adrenergic selective) (21,23) were employed. In hepatocytes (Figure 2, right panel) the effect of 1 μM isoproterenol was dose-dependently antagonized by ICI 118551 with an EC₅₀ of ≈ 200 nM. In contrast, atenolol up to 10 μM was unable to antagonize the effect of isoproterenol and at a concentration of 100 μM only a partial effect was observed. These data confirm that these hepatocyte adrenoceptors belong to the beta₂-subtype.

In AS-30D hepatoma cells both ICI 118551 and atenolol (Fig. 1, right panel) antagonized dose-dependently the effect of 1 μM isoproterenol. Atenolol was consistently more potent than ICI 118551 (EC₅₀s ≈ 2 μM and ≈ 7 μM, respectively). The data indicate that this adrenoceptor belongs to the beta₁ subtype. Interestingly, preliminary binding-competition experiments using [³H]Dihydroalprenolol and atenol or ICI 118551 suggested that membranes obtained from AS-30D hepatoma cells have a mixed population of beta-adrenoceptors (40-50% beta₁-adrenoceptors and 50-60% beta₂-adrenoceptors).

Adenylate cyclase activity was determined in membranes from hepatocytes and AS-30D hepatoma cells and the data are presented in Table I. It can be observed that the basal activity was similar in both preparations. However, the response to beta-adrenergic stimulation (isoproterenol + GTP), activation of G-proteins (Gpp(NH)p) or the catalytic subunit of adenylate cyclase (forskolin) was much smaller in membranes from hepatoma cells than in those obtained from hepatocytes. The beta-adrenergic stimulation in membranes from hepatoma cells was very small (20 to 50% over basal) which did not allow us to perform any more detailed studies.

TABLE I.

Adenylate Cyclase Activity in Membranes obtained
from Hepatocytes or AS-30D Hepatoma Cells.

Assay Agent	HEPATOCYTES	HEPATOMA AS-30D
	Specific Activity (pmol min ⁻¹ mg protein ⁻¹)	
None	6.5 ± 1.2	7.3 ± 1.0
10 μM Isoproterenol + 100 μM GTP	17.5 ± 1.3	9.1 ± 1.5
100 μM Gpp(NH)p	28.0 ± 5.6	10.0 ± 1.5
100 μM Forskolin	69.0 ± 7.9	40.0 ± 4.0

Results are the means ± S.E.M. of 16 determinations using 4 different membrane preparations in each case.

We have previously shown that activation of hepatocyte beta-adrenoceptors leads to homologous desensitization (24). Recent data have also shown that active phorbol esters, via activation of protein kinase C, induce an heterologous desensitization of adenylate cyclase in hepatocytes (25); the homologous and heterologous desensitizations are additive in this model (25). In order to test if these desensitizations take place in hepatoma cells, we tested the effects of preincubation with isoproterenol (100 μM), phorbol myristate acetate (TPA) 100 nM or both, on the ability of the cells to accumulate cyclic AMP in response to the beta-adrenergic agonist; the data are presented in Figure 3. Preincubation with TPA decreased the basal value of cyclic AMP; for this reason and in order to better analyze the data, the results are presented both, as absolute values and normalized to the basal (100%) (Figure 4, left and right panels, respectively). Preincubation with isoproterenol clearly desensitized the subsequent beta-adrenergic responsiveness of the cells. TPA induced only a small shift to the right in the dose-response curve to isoproterenol. When both isoproterenol and TPA were present during the preincubation the desensitization was bigger than that produced by any of the agents alone (Fig. 3).

In Figure 4 the effects of the four preincubation conditions used on the cyclic AMP accumulation induced by 1 μM isoproterenol or 100 μM forskolin are presented. It can be observed that under all the conditions studied forskolin increased cyclic AMP levels 5 to 6-fold. The data indicate that none of the preincubation conditions employed altered the catalytic subunit of adenylate cyclase, indicating that these desensitizations affect components before it.

Agonists for other receptors (Glucagon, N-ethylcarboxamide adenosine, serotonin, ACTH, prostaglandin E₂, histamine) were employed in both hepatoma cells (cyclic AMP accumulation) and membranes obtained from these cells (adenylate cyclase activity) but none of them produced any significant effect.

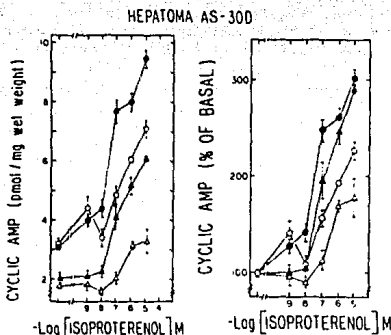


FIG. 3

Beta-adrenergic desensitization in hepatoma AS-30D. Cells were preincubated for 15 min in the absence of any agent (closed circles) or in the presence of 100 μ M isoproterenol (open circles), 100 nM TPA (closed triangles) or 100 μ M isoproterenol plus 100 nM TPA (open triangles). After this preincubation the cells were extensively washed and incubated for 2 min in buffer containing 250 μ M methyl isobutyl xanthine in the absence or presence of different concentrations of isoproterenol. The data are presented as absolute values (left panel) or normalized as percentage of basal value (right panel). Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of triplicate determinations of 6-7 different cell preparations.

Discussion

Our present results show beta-adrenergic responsiveness in the transplantable rat hepatoma cell line AS-30D. It has been observed that in general liver cell proliferation (liver regeneration (5-7) fetal liver (26) cell culture (8,9)) is associated with marked beta-adrenergic responsiveness. Treatment of rats with carcinogens also alters the properties of adenylate cyclase, increasing the responsiveness to beta-adrenergic agonists (10-13). This increased responsiveness is a transient phenomenon of the pre-cancerous state when minor histological changes are observed (10,12). Interestingly, in this pre-cancerous state, the enhanced responsiveness is mediated by the usual beta₂-adrenoceptor observed in liver cells (12). In our study with the AS-30D hepatoma cells the adrenoceptor that mediated the increases in cyclic AMP is of the beta₁- subtype. Using the equation of Cheng and Prusoff (27) the apparent K_i obtained for ICI 118551 in hepatocytes was of 18 nM, which is similar to the K_i obtained for beta₂-adrenoceptors in binding studies (3-20 nM) (21-23). The apparent K_i for this antagonist in hepatoma cells was more than 10-times bigger (\approx 270 nM) which is also close to the K_i obtained for beta₁-adrenoceptors in binding studies (300 nM) (21). The apparent K_i for atenolol in hepatoma cells

was of ≈ 80 nM which is smaller than the K_i observed for heart beta₁-adrenoceptors (≈ 500 nM) (28). Thus, our data clearly show that hepatocytes have beta₂-adrenoceptors whereas beta₁-adrenoceptors are present in hepatoma cells. It has been observed that some tissues contain both beta₁ and beta₂-adrenoceptors (20). Our binding-competition experiments suggest that there is heterogeneity in the beta-adrenergic population of AS-30D hepatoma cells.

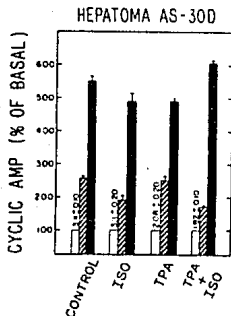


FIG. 4

Effect of preincubation on the response to isoproterenol or forskolin in hepatoma AS-30D. Cells were preincubated in the absence (control) or presence of 100 μ M isoproterenol (ISO), 1 μ M TPA or both agents (TPA + ISO) washed and incubated in buffer containing 250 μ M methyl isobutyl xanthine without any agent (basal, open bar), with 1 μ M isoproterenol (dashed bar) or 100 μ M forskolin (closed bar). Results are expressed as % of basal values (given in pmol/mg wet weight on top of the open bar) and are the means \pm S.E.M. of triplicate determination of 6-7 different cell preparations.

However, the data on cyclic AMP accumulation indicate that this effect is mediated exclusively by beta₁-adrenoceptors in these cells. In different words, the data indicate that the beta₂-adrenoceptors present in hepatoma cells do not participate in this effect. The reason for this is unknown and presently being investigated in our laboratory. It is important to mention that Lacombe *et al* (29) previously observed that beta₁-adrenoceptors in Zajdela hepatoma mediate the stimulation of adenylate cyclase by catecholamines.

Beta₁- and beta₂-adrenoceptors are among the better characterized receptors. They have been purified to homogeneity, reconstituted and their cDNA sequenced (ref. 1 and references therein). Although great similarity exists between these adrenoceptors (1,4) they are the products of different genes (30). It is, therefore, clear that hepatocytes and hepatoma are expressing different genes. It is worth mentioning that dexamethasone regulates the

subtype of beta-adrenoceptor expressed by preadipocytes and adipocytes (31). Little is known about the factors that control the expression of receptors in different tissues.

The beta₁-adrenoceptor of hepatoma seems to be modulated by agonists and activators of protein kinase C in a fashion similar to that observed in hepatocytes (24,25). However, the absence of response to non-adrenergic agonists precluded the classification of these processes as homologous or heterologous desensitizations and the localization of the site(s) of regulation. Nevertheless, their apparent additivity suggests the possible involvement of different sites and mechanisms of action. Some effects of phorbol esters have been variable or even opposite in different tissues; the reason for this is not known, but it is possible that the existence of isoforms of protein kinase C (32) may explain such discrepancy. In this regard, it has been observed that TPA markedly amplifies the beta-adrenergic responsiveness of T51B rat liver cells (33). A comparative study may shed some light on the mechanism(s) and reason(s) of such differences.

Acknowledgements. The authors thank Ms. Guadalupe Ramírez for typing the manuscript. This research was partially supported by Grants from Fundación Miguel Alemán and Secretaría de Salud. The authors thank Dr. Jaime Martuscelli for his generous help. The authors thank Dr. Antonio Villalobos for the generous gift of the hepatoma cells.

References

1. R.J. LEFKOWITZ and M.G. CARON, *J. Biol. Chem.* **263** 4993-4996 (1988).
2. A.H. LANDS, A. ARNOLD, J.P. McAULIFF, F.P. LUDUENA, and T.G. BROWN Jr., *Nature* **214** 597-598 (1967).
3. P.H. SCHMELCK and J. HANOUNE, *Mol. Cell. Biochem.* **33** 35-48 (1980).
4. M.P. GRAZIANO, C.P. MOXHAM and C.C. MALBON, *J. Biol. Chem.* **260** 7665-7674 (1985).
5. J. HUERTA-BAHENA, R. VILLALOBOS-MOLINA and J.A. GARCIA-SAINZ, *Biochim. Biophys. Acta* **763** 112-119 (1983).
6. J.A. GARCIA-SAINZ and A. NAJERA-ALVARADO, *Biochim. Biophys. Acta* **885** 102-109 (1986).
7. M. AGGERBECK, N. FERRY, E. S. ZAFRANI, M. C. BILLON, R. BAROUKI and J. HANOUNE, *J. Clin. Invest.* **71** 476-486 (1983).
8. T. NAKAMURA, A. TOMOMURA, C. NODAJ, M. SHIMOJI and A. ICHIHARA, *J. Biol. Chem.* **258** 9283-9289 (1983).
9. M. REFSNES, D. SADNES, and T. CHRISTOFFERSEN, *Eur. J. Biochem.* **163** 457-466 (1987).
10. H. BOYD, C. J. LOUIS and T.J. MARTIN, *Cancer Res.* **34** 1720-1725 (1974).
11. T. CHRISTOFFERSEN and T. BERG, *Biochim. Biophys. Acta* **381** 72-77 (1975).
12. H. BOYD and T.J. MARTIN, *Mol. Pharmacol.* **12** 195-202 (1976).
13. D.F. SMITH, E.F. WALBORG Jr. and J.P. CHANG, *Cancer Res.* **30** 2306-2309 (1970).
14. S. CORVERA, S.M.T. HERNANDEZ-SOTOMAYOR, and J.A. GARCIA-SAINZ, *Biochim. Biophys. Acta* **802** 95-105 (1984).
15. M.N. BERRY and D.S. FRIEND, *The Journal of Cell Biol.* **43** 506-520 (1969).
16. B.L. BROWN, J.D.H. ALBANO, P. EKINS, and A.M. SCHERZI, *Biochem. J.* **121** 561-562 (1971).
17. E.G. LOTEN and J.C. REDSHAW-LOTEN, *Anal. Biochem.* **154** 183-185 (1986).
18. Y. SALOMON, C. LONDOS, and M. RODBELL, *Anal. Biochem.* **58** 541-548 (1974).

19. O.H. LOWRY, N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL, *J. Biol. Chem.* 193 265-275 (1951).
20. K.P. MINNEMAN and P.B. MOLINOFF, *Biochem. Pharmacol.* 29 1317-1323 (1980).
21. C.D. STRADER, M.R. CANDELORE, E. RANDE and R.A.F. DIXON, *Mol. Pharmacol.* 32 179-183 (1987).
22. C.M. FRASER, F-Z. CHUNG and J.C. VENTER, *J. Biol. Chem.* 262 14843-14846 (1987).
23. M. BOUVIER, M. HNATOWICH, S. COLLINS, B.K. KOBILKA, A. DEBLASI, R. J. LEFKOWITZ, and M.G. CARON, *Mol. Pharmacol.* 33 133-139 (1987).
24. J.A. GARCIA-SAINZ and B. MICHEL, *Biochem. J.* 246 331-336 (1987).
25. S.M. T. HERNANDEZ-SOTOMAYOR, M. MACIAS-SILVA, M. PLEBARSKI and J. A. GARCIA-SAINZ, *Biochim. Biophys. Acta* 972 311-319 (1988).
26. P. SHERLINE, H. EISEN, and W. GLINSMANN, *Endocrinology* 96 935-939 (1974).
27. Y. CHENG and W.F. PRUSOFF, *Biochem. Pharmacol.* 22 3099-3108 (1973).
28. K.P. MINNEMAN, A. HEDBERG and P. MOLINOFF, *J. Pharmacol. Exptl. Ther.* 211 502-508 (1979).
29. M-L. LACOMBE, E. RENE, G. GUELLAEN, J. HANOUNE, *Nature* 262 70-72 (1976).
30. T. FRIELLE, S. COLLINS, K. W. DANIEL, M.G. CARON, R.J. LEFKOWITZ and B.K. KOBILKA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 7920-7924 (1987).
31. E. LAI, O.M. ROSEN, and C.S. RUBIN, *J. Biol. Chem.* 257 6691-6696 (1982).
32. K-P. HUANG, H. NAKABAYASHI, and F.L. HUANG, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 8535-8539 (1986).
33. L.H. AASHEIM, L.P. KLEINE, J.F. WHITFIELDRAND, and D.J. FRANKS, *FASEB J.* 2, A351 (Abstract 317).