

11281
23

**UNIVERSIDAD
NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

**EXPRESION Y PAPEL FUNCIONAL DE LOS
RECEPTORES DOPAMINERGICOS
DE LA FAMILIA D2 EN CORAZON**

TESIS

PARA LA OBTENCION DEL GRADO DE DOCTORA EN:

CIENCIAS BIOMEDICAS

PRESENTADO POR:

Ma. de Jesús Gómez Villalobos

TUTOR: DR. P. JORGE SUAREZ MUNGUIA

COTUTORES: DRA. VICTORIA CHAGOYA DE SANCHEZ
DR. ROBERTO CORIA ORTEGA

México. D. F.

AGOSTO 2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

**Mi agradecimiento al Instituto de Fisiología Celular
por haberme brindado la oportunidad de realizar mis
Estudios de Doctorado.**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Con profunda gratitud y aprecio

Al Dr. Jorge Pablo Suárez Murguía, por su apoyo para contribuir a mi formación académica.

Con mi mayor reconocimiento

A la Dra. Victoria Chagoya y al Dr. Roberto Coria por sus comentarios, consejos y críticas.

Con profundo agradecimiento

Al Dr. Reginald Nadeau sin el apoyo del cual no se hubiera terminado este trabajo

Al Dr. Guy Rousseau por su valiosa colaboración

A la Sra. Ruth Giles por su apoyo constante

Con respeto y admiración

Al Dr. Edmundo Chávez Cosío

Al Dr. Pedro Reyes

A la Dra. Martha Franco

Al Dr. Carlos Castillo Henckel

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A mi Familia

Mis padres, hermanas y hermano

A mis hijos

Alejandra y Daniel que son el motor de mi vida

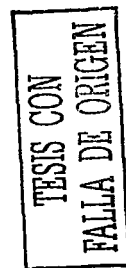
A mi Esposo

Gonzalo por su comprensión, apoyo, cariño y consejos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONTENIDO

	Página
1- Resumen.....	6
2- Introducción.....	7
3- La dopamina como neurotransmisor central y periférico.....	9
4- Clasificación de los receptores dopaminérgicos.....	12
5- Estructura Genética del receptor dopaminérgico.....	15
6- Estructura del receptor dopaminérgico.....	15
7- Sistemas de Segundos Mensajeros.....	18
8- Farmacología y Distribución de los receptores dopaminérgicos.....	19
10.1 Receptor D ₁	21
10.2 Receptor D ₂	21
10.3 Receptor D ₃	22
10.4 Receptor D ₄	22
10.5 Receptor D ₅	22
9- Receptores Dopaminérgicos en corazón de mamífero.....	25
11.1 Estudios Electrofisiológicos.....	25
11.2 Estudios de Autoradiografía.....	28
10- Participación de Dopamina y Receptores Dopaminérgicos en Patologías Cardiovasculares	30
11- Justificación.....	31



12- Hipótesis.....	32
13- Objetivos	32
14- Material y Métodos.....	33
16.1 Estudios de Autorradiografía.....	33
16.2 Estudios de Western Blot.....	36
16.3 Estudios Electrofisiológicos.....	38
16.4 Estudios Bioquímicos.....	47
15- Resultados.....	51
17.1 Estudios de Autorradiografía.....	51
17.2 Estudios de Western Blot.....	56
17.3 Estudios Electrofisiológicos.....	57
17.4 Estudios Bioquímicos.....	73
18 - Discusión.....	74
19 – Implicaciones futuras de los receptores dopaminérgicos en el corazón.....	81
20 - Conclusiones.....	82
21 –Publicación y resúmenes a congreso del trabajo de tesis.....	83
22 -Referencias.....	84

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS**página**

Figura 1. Síntesis de Catecolaminas.....	10
Figura 2. Estructura del receptor dopaminérgico.....	17
Figura 3. Diagrama experimental de los estudios de Autoradiografía.....	35
Figura 4. Diagrama experimental de los estudios de Western Blot.....	38
Figura 5. Esquema del sistema de perfusión cardíaca.....	40
Figura 6. Diagrama experimental de los estudios Electrofisiológicos.....	41
Figura 7. Esquema del sistema de registro de los potenciales de acción de tejidos Cardíacos.....	46
Figura 8. Diagrama experimental de los estudios Bioquímicos.....	49
Figura 9. Resultados de Autoradiografía para los receptores D ₂ -Familia.....	53
Figura 10. Resultados de Autoradiografía para los receptores D ₄	54
Figura 11. Resultados de Autoradiografía para los receptores D ₃	55
Figura 12. Resultados de Western Blot.....	56
Figura 14. Gráfica. Efectos de dopamina sobre la frecuencia cardíaca en el corazón de cobayo.....	61
Figura 15. Gráfica. Efectos de dopamina sobre la dP/dt máx en el corazón de cobayo.....	62
Figura 16. Gráfica. Efectos de agonistas dopaminérgicos sobre la frecuencia cardíaca en el corazón de cobayo.....	63
Figura 17. Gráfica. Efectos de agonistas dopaminérgicos sobre la dP/dt máx en el corazón de cobayo.....	64
Figura 18. Gráfica. Efectos de agonistas dopaminérgicos sobre la frecuencia cardíaca en	

en el corazón de cobayo en presencia de U-99194A	65
Figura 19. Gráfica. Efectos de agonistas dopaminérgicos sobre la frecuencia cardíaca del de cobayo en presencia de raclopride.....	66
Figura 20. Gráfica. Efectos de agonistas dopaminérgicos sobre la frecuencia cardíaca del de cobayo en presencia de raclopride.....	67
Figura 21. Gráfica. Efectos de agonistas dopaminérgicos sobre el intervalo Q-T del Electrocardiograma.....	69
Figura 22. Gráfica. Efectos de agonistas dopaminérgicos sobre la actividad de Adenilato Ciclasa.....	73

TABLAS

TABLA 1: Clasificación de receptores dopaminérgicos.....	14
TABLA 2: Receptores dopaminérgicos periféricos. Función y Distribución.....	20
TABLA 3: Agonistas y Antagonistas de los receptores dopaminérgicos.....	24
TABLA 4: Resultados de Autoradiografía.....	52
TABLA 5: Resultados fisiológicos. Efectos de agonistas dopaminérgicos sobre parámetros de función cardíaca en el corazón de cobayo.....	68
TABLA 6: Resultados Electrofisiológicos. Efectos de (\pm)-7-OH-DPAT sobre los parámetros del Potencial de acción de aurícula derecha y ventrículo izquierdo.	71
TABLA 7: Resultados Electrofisiológicos. Efectos de PD 168 077 sobre los parámetros del Potencial de acción de aurícula derecha y ventrículo izquierdo.	72

Resumen

Los receptores dopaminérgicos incluyen las familias D_1 (subtipos D_1 y D_5) y D_2 (subtipos D_2 , D_3 , y D_4). Los receptores de la familia D_1 están acoplados positivamente y los receptores de la familia D_2 negativamente a la adenilato ciclasa. Los receptores de la familia D_2 (subtipo D_4) han sido identificados en tejidos cardíacos de rata y de humano. Sin embargo la presencia de los subtipos de receptores D_2 and D_3 no ha sido determinada. La probable participación de estos receptores en las funciones del corazón se desconoce. A través de estudios de autoradiografía usando radioligandos selectivos para el receptor dopaminérgico D_3 ($[^3H]$ -7-OH-DPAT) y para el receptor dopaminérgico D_4 ($[^3H]$ emonapride-YM-09151-2 más raclopride) identificamos la presencia de estos receptores dopaminérgicos D_3 y D_4 en tejidos del corazón de cobayo. El análisis con Western blot confirmó la expresión de los receptores dopaminérgicos D_3 y D_4 en aurícula derecha y en ventrículo izquierdo de la misma especie. El uso de agonistas selectivos de los receptores dopaminérgicos D_3 y D_4 ((\pm) -7-OH-DPAT y PD-168 077, 10^{-9} a 10^{-5} M, respectivamente) produjeron efectos cronotrópicos e inotrópicos negativos significativos en el corazón aislado de cobayo. El efecto inotrópico negativo inducido por el PD-168 077 fue asociado con una inhibición significativa en la actividad de la adenilato ciclasa, mientras que el efecto cronotrópico negativo inducido por el (\pm) -7-OH-DPAT no produjo cambios en el mismo parámetro. El estudio aporta más información para apoyar la presencia de los receptores dopaminérgicos D_3 y D_4 en el corazón de mamífero. Aunque nuestros resultados sugieren que estos receptores son funcionalmente activos en el corazón se requiere información adicional con el uso de agonistas y antagonistas de mayor selectividad y potencia en orden de entender el papel funcional de los receptores D_3 y D_4 en las funciones del corazón.

Introducción

La dopamina es una sustancia vasoactiva que desde principios del siglo pasado ha sido estudiada por sus efectos similares a los de noradrenalina y epinefrina, así como por los diversos efectos fisiológicos que produce en el organismo humano. Actualmente es considerado que las diversas acciones de la dopamina son efectuadas a través de cuando menos 5 subtipos de receptores dopaminérgicos acoplados al sistema de proteínas G membranal (*Jackson y Westlind-Danielsson 1994, Missale y Cols., 1998*). La expresión de los receptores dopaminérgicos varía en los tejidos y en las diferentes especies. En el sistema nervioso central los receptores dopaminérgicos están ampliamente expresados y están involucrados en varias funciones, como el control de la locomoción, funciones cognoscitivas, en las emociones y afecto así como en la secreción neuroendocrina. En los tejidos periféricos los receptores dopaminérgicos están presentes en forma más importante en los riñones, en los vasos sanguíneos y glándula suprarrenal, donde participan en la homeostasis del sodio, tono vascular y secreción de hormonas (*Camsonne 1987, Goldberg y Cols., 1978, 1985, Felder y Cols., 1989, José y Cols., 1998*).

La alteración en la expresión y/o función de los receptores dopaminérgicos ha sido involucrada en varias alteraciones del sistema nervioso central y periférico; como la enfermedad de Parkinson, esquizofrenia, hiperprolactinemia y recientemente en problemas cardiovasculares como la hipertensión arterial sistémica (*Civelli y Cols., 1993; Francis 1995; José y Cols., 1996 y 1998; Asico y Cols., 1998*).

La carencia de agonistas y antagonistas selectivos para cada uno de los subtipos de receptores dopaminérgicos, ha hecho difícil el estudiar la distribución y la función en la que están participando estos receptores, especialmente para los subtipos D₃, D₄ y D₅. El advenimiento de las técnicas de biología molecular, ha dado nuevas herramientas para su estudio. La aplicación de técnicas como hibridación *in situ*, la reacción en cadena por polimerasas (PCR) y la clonación de genes han

permitido localizar receptores dopaminérgicos en donde se desconocía su existencia. Sin embargo la función de muchos de estos receptores es desconocida. En los últimos años, el desarrollado de fármacos agonistas y antagonistas, cada vez con mayor selectividad para cada uno de los subtipos de receptores dopaminérgicos, ha hecho posible la manipulación farmacológica de estos receptores y de hecho ha clarificado parcialmente la función de los receptores de las familias D_1 y D_2 en varias funciones del sistema nervioso central, así como la interacción de la dopamina con otros neurotransmisores.

La dopamina es una droga ampliamente usada en el manejo de pacientes en estado crítico, como insuficiencia cardíaca (*Saito y Cols., 1991*) y choque cardiogénico (*Holzer y Cols., 1973*) entre otras. Aunque su uso más frecuente es por su efecto vasoconstrictor e inotrópico positivo obtenido con dosis elevadas ($10 \mu\text{g/Kg/min}$), su efecto vasodilatador ($2-4 \mu\text{g/Kg/min}$) predominantemente en la vasculatura renal es de gran ayuda para eliminar sodio y agua. A pesar del amplio uso de este fármaco el mecanismo de acción por el cual produce estos efectos, aun es controversial.

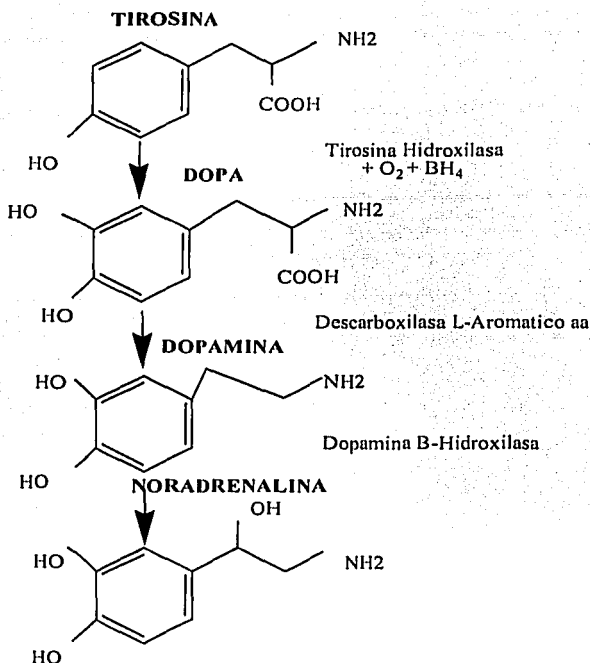
El conocimiento de la existencia de diversos subtipos de receptores dopaminérgicos D_1 , D_2 , D_3 , D_4 , ha permitido explicar las acciones de la dopamina en el SNC. Los recientes hallazgos de estos receptores en tejido cardíaco sugieren que la dopamina puede estar actuando a través de la activación de estos receptores en corazón en forma similar que en el SNC.

Aunque se conoce que los receptores dopaminérgicos de la familia D_2 se encuentran expresados en los tejidos cardíacos, se desconoce su localización exacta (terminales nerviosas y/o miocitos), distribución, mecanismos de acción y efectos fisiológicos, por lo que es necesario realizar estudios encaminados a obtener esta información que nos permitirá entender la participación de los subtipos de receptores dopaminérgicos en los procesos fisiológicos y fisiopatológicos cardiovasculares.

La dopamina como neurotransmisor central y periférico

La dopamina es un intermediario en la biosíntesis de la noradrenalina (NA) y adrenalina, así como un importante neurotransmisor en el sistema nervioso central y periférico. Tiene una participación esencial en una gran variedad de funciones fisiológicas, así como en estados fisiopatológicos. La dopamina, noradrenalina y epinefrina son sintetizadas a partir del aminoácido precursor, la tirosina, la cual por una serie de reacciones catalizadas por diferentes enzimas, origina estas aminas. La primera etapa es la hidroxilación de la tirosina por la enzima hidroxilasa de tirosina, seguida por una descarboxilación que da origen a la dopamina, la cual es hidroxilada por la enzima β -hidroxilasa, en el carbono beta de la cadena lateral para dar origen a la NA (Figura 1). La dopamina es sintetizada a través de la misma ruta que la NA, las neuronas dopaminérgicas carecen de la enzima β -hidroxilasa y por lo tanto no producen NA. La dopamina una vez liberada al espacio sináptico puede seguir tres caminos; primero interactuar con receptores dopaminérgicos en las células, segundo puede ser metabolizada por las enzimas MAO y catecol-ometiltransferas COMT en el espacio sináptico y tercero puede ser recapturada en la terminal nerviosa a través de los sistemas transportadores de dopamina.

(Fillenz 1990, pág 1-45).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 1. Vía de la síntesis de la noradrenalina a partir de tirosina, así como las enzimas que catalizan las varias etapas en la cadena de las reacciones.

En el SNC la dopamina está involucrada en la regulación del movimiento. La activación de la vía nigroestriatal y consecuentemente de receptores dopaminérgicos produce movimientos estereotipados. Una lesión en la vía nigroestriatal produce la Enfermedad de Parkinson, un trastorno caracterizado por rigidez, temblor, e hipocinesia, mientras que la enfermedad de Huntington es un síndrome asociado con severos movimientos voluntarios y también se considera que es por una degeneración de la vía estriatonigral, asociada a un exceso en la transmisión dopaminérgica. La dopamina también es un neurotransmisor en el sistema mesolímbico en donde está involucrado en

las respuestas emocionales y cognocitivas. La dopamina también parece tener un papel fisiológico en inhibir la secreción de prolactina en la glándula hipófisis anterior y en iniciar náuseas y vómitos a través de una acción en la médula.

Aproximadamente el 75 % de la dopamina en el cerebro se encuentra en las vías nigroestriales, cuyos axones terminan en el estriado. La dopamina también se encuentra en los cuerpos celulares que se originan en el cerebro medio que se proyectan al sistema límbico, especialmente al núcleo accumbens. También está presente en un grupo de neuronas cortas que van del hipotálamo a la eminencia media y a la glándula pituitaria. Interneuronas dopaminérgicas locales también se encuentran en el bulbo olfatorio y en la retina. En la periferia se ha localizado dopamina en algunas neuronas simpáticas, de mayor importancia en el riñón.

En el sistema cardiovascular a pesar de que la dopamina es una droga ampliamente usada en diversas patologías, es poco lo que se conoce acerca de su mecanismo de acción. Su principal efecto es en vasos arteriales, riñón y corazón, (*Goldberg 1972, 1985, Struyker 1986, Felder y Cols., 1989, Pedro y Felder 1998*). Dependiendo de la cantidad de dopamina usada se observan diversos efectos. A dosis bajas (100 nM) tiene efecto vasodilatador en vasos arteriales y en riñón con poco efecto sobre corazón. A dosis intermedias (500 nM) tiene efecto inotrópico positivo y a dosis altas (10 µM) tiene efecto vasoconstrictor. En la actualidad se postula que los principales efectos de la dopamina son a través de estimular o inhibir la liberación de noradrenalina en las terminales nerviosas, siendo considerada como un modulador de la liberación de noradrenalina (*Mugelli y Cols., 1977, Brodde y Cols., 1980, Wagner y Cols., 1980, Dlewait y Cols., 1989*). Sin embargo, su efecto no es posible bloquearlo totalmente (predominantemente el efecto vasodilatador), al bloquear la síntesis y liberación de noradrenalina, con atropina, ni con alfa o beta bloqueadores (*Holmes y Fowler., 1962, McDonald y Goldberg, 1963, Schuelke y Cols 1970, Habuchi y Cols., 1997a*). Esto sugiere que la dopamina puede tener un efecto directo a través de receptores dopaminérgicos en esas estructuras.

Clasificación de los receptores dopaminérgicos

La primera evidencia para la existencia de los receptores dopaminérgicos en el sistema nervioso central fue a través de estudios bioquímicos que mostraron que la dopamina era capaz de estimular la adenilato ciclasa (AC) así como la producción de AMPc (*Kebabian y Cols., 1972, Horn y Cols., 1974*). Sin embargo, fue observado que en otros tejidos la dopamina y agonistas dopaminérgicos inhibían la actividad de la AC, así como la producción de AMPc (*Cote y Cols 1981, Lazareno y Cols., 1985, Weiss y Cols., 1985*). La información previa llevó a postular la existencia de más de un receptor para la dopamina. La primera clasificación de receptores dopaminérgicos fue propuesta por *Kebabian y Calne en 1979*, de acuerdo a la evidencia farmacológica y bioquímica, como dos familias, una acoplada positivamente a la AC y otra independiente del sistema de generación de de 3',5'-adenosin monofosfato cíclico (AMPc). La familia D₁ estaría acoplada a proteínas G_o, induciendo un incremento en la producción de AMPc y la familia de los D₂ estarían acoplados a proteínas G_i, induciendo una menor actividad de la AC y menor producción de AMPc (*Cooper y Cols., 1986, Dohman y Cols., 1987, Civelli y Cols., 1991*). Estas diferencias funcionales son actualmente explicadas por las diferencias estructurales que existen entre las dos familias de receptores dopaminérgicos.

Con el advenimiento de la biología molecular y las nuevas técnicas para sintetizar drogas específicas, ha sido posible identificar la presencia de diversos receptores dopaminérgicos especialmente en SNC. Son conocidos clásicamente la familia de los receptores D₁ ó D₁-like y D₂ ó D₂-like (*Clark D. y White F.J., 1987, Andersen y Cols., 1990*). De acuerdo a las similitudes que existen entre los receptores en cuanto a su estructura, sus efectos farmacológicos, su distribución, así como a la activación de segundos mensajeros intracelulares, han sido clasificados dentro de la familia D₁ a los subtipos de receptores D₁ y D₅, mientras que dentro de la familia de los receptores D₂ se encuentran los subtipos de receptores D₂, D₃ y D₄ (TABLA 1).

Los receptores D_1 y D_5 (familia D_1) están constituidos por siete dominios transmembranales con una secuencia de aminoácidos muy parecida y un perfil farmacológico similar. Mientras que los receptores D_2 , D_3 y D_4 (familia D_2) también están formados por siete dominios transmembranales con una secuencia de aminoácidos muy similar, así como su perfil farmacológico. En los subtipos de receptores dopaminérgicos varios aminoácidos están conservados, los cuales están implicados en la unión de la dopamina. La conservación de un residuo de aspartato en la tercera región transmembranal parece ser el sitio de unión para un grupo amino protonado, mientras que dos residuos de serina, que están conservados en la quinta región transmembranal, se piensa que forman uniones de hidrógeno con grupos hidroxilo y catecol.

TABLA I. RECEPTORES DOPAMINERGICOS. CLASIFICACION

Nombre Aceptado	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	D ₅
Otros Nombres	D _{1A}	D _{2A} , D _{2L} , D _{2S} D ₂₍₄₄₄₎ D ₂₍₄₁₅₎	D _{2B}	D _{2C}	D _{1B}
Amino acidos	446 aa*	Corto:414 aa* Largo:443 aa*	400 aa*	386 – 515 aa*	477 aa*
Amino acidos en la tercera asa citoplásmica	57*	Corto: 134 * Largo: 443 *	120 *	101 – 261 *	50 *
Amino acidos en la porción COOH terminal	113 *	16 *	16 *	16 *	116 *
Intrones	0	6	5	3	0
Localización cromosómica	5q 35.1	11q 22-23	3q 13.3	11p 15.5	4p 15.1-16.1
Agonistas Selectivos	R(+)-SKF-3839 A-68930	U-91,356A	Pd 128,907 R(+)-7-OH-DPAT	PD 168,077	R(+)-SKF-3839 A-68930
Antagonistas Selectivos	SCH-23390 SCH-39166	L-741,626	S(-) Nafadotride	L-745,870. L-750,667 RBI-257. U-101.387	SCH-23390 SCH-39166
Segundos Mensajeros	Gs (↑ AMPc)	Gi (modula AMPc) Gq/11(↑ IP ₃ /DAG)	Gi (modula AMPc)	Gi (modula AMPc) ↑ ácido araquidónico	Gs (↑ AMPc)
Radioligando	[³ H]-SCH-23390 [¹²⁵ I]-SCH23982	[³ H]-Nemonapride [³ H]-Spipirone	[³ H]-7-OH-DPAT [¹²⁵ I]-7-OH-PIPAT	[³ H]-Nemonapride [³ H]-Spipirone	[³ H]-SCH-23390 [¹²⁵ I]-SCH23982

* En humano. ** En rata. aa = aminoácidos. AMPc= Adenin monofosfato ciclico. PI3= Fosfalidil Inositol. DAG= Diacilglicerol. Gs=Sistema de proteínas G membranales estimulatorios. Gi= Sistema de proteínas G inhibitorias.

Modificada de The Sigma-RBI Handbook of Receptor Classification and signal Transduction. 4th. Edition. 2001 y *Missale y Cols., 1998.*

Estructura genética del receptor dopaminérgico

Desde que fue aislado por primera vez el cDNA del receptor dopaminérgico D_2 por *Bunzow y Cols.*, en 1988, se conoce la existencia de otros subtipos de receptores, así como variaciones de un mismo receptor (TABLA 1). La organización genómica de los receptores dopaminérgicos apoya el concepto de que ellos derivan de la divergencia de dos familias de genes que difieren principalmente en la ausencia o presencia de intrones en su código de secuencia. Como se resumen en la TABLA 1, los genes de los receptores D_1 y D_5 no contienen intrones en su código genético, entendiéndose por intron, la secuencia de nucleótidos en un gen que es transcrita pero eliminada antes de que el gen sea expresado. La familia de los receptores D_2 presentan intrones dentro de su código genético lo que permite la generación de variaciones del receptor (*Giros y Cols., 1989; Civelli y Cols., 1993, Gingrich y Caron 1993*).

Estructura del receptor dopaminérgico

Todos los subtipos de receptores dopaminérgicos tienen una estructura similar con siete regiones hidrofóbicas o dominios que se encuentran distribuidos en la membrana celular denominadas TMI-TMVII (Figura 1). Entre estos dominios existen tres asas de aminoácidos denominadas CPL1, CPL2 y CPL3 que se extienden dentro y fuera del citoplasma. El extremo amino terminal (NH_2) es extracelular y presenta el mismo número de aminoácidos en todos los subtipos de receptores, así como un número variable de sitios para glicosilación. Los receptores D_1 y D_5 poseen dos sitios, uno en la cadena NH_2 y otro en la segunda asa extracelular. El receptor D_2 tiene 4 sitios para glicosilación, mientras que los receptores D_3 y D_4 tienen 3 y uno respectivamente. Los receptores de la familia D_2 tienen una asa intracelular (CPL3) muy larga, una característica que es común a los receptores que interactúan con el sistema de proteínas G_i , para inhibir la adenilato ciclasa. Mientras que los receptores de la familia D_1 se caracterizan por una CPL3 corta, como muchos de los receptores que se acoplan a las proteínas G_s y que estimulan la producción de AMPc.

El extremo carboxilo (COOH) terminal protruye al igual que las asas citoplásmicas dentro del citoplasma, y es 7 veces más larga para la familia de los receptores D_1 que para los de la familia D_2 . Esta porción es rica en residuos de serina, treonina lo cual es un sustrato para fosforilación (Dohlman y Cols., 1987). También se observan residuos de cisteína, que está conservado en todos los receptores que se acoplan al sistema de proteínas G y que se ha mostrado que es palmitoilada en los receptores β -adrenérgicos y a rhodopsina probablemente para anclar la cola citoplásmica a la membrana. Este residuo de cisteína está localizado cerca del inicio del carboxilo terminal en la familia de los receptores D_1 , mientras que en la familia de los receptores D_2 se encuentra al final de la cadena (Missale y Cols., 1998). Esta organización topográfica es considerada una característica importante entre los receptores que se acoplan al sistema de las proteínas G membranales (Jackson and Westlind 1994). Varios aminoácidos se conservan en los 5 subtipos de receptores dopaminérgicos. Los subtipos de receptores de la misma familia presentan gran homología. Así los receptores D_1 y D_5 son idénticos en un 80 % en sus dominios transmembranales. Los receptores D_2 y D_3 son idénticos en un 75 % en sus dominios transmembranales, mientras que el receptor D_2 y D_4 solo son idénticos en 53 % (Civelli y Cols., 1993, Gingrich y Caron 1993, Jackson y Westlind 1994).

La conservación de dos residuos de serina en el asa extracelular 2 y 3, sugiere que forman puentes de disulfuro para estabilizar la estructura del receptor (Dohlman y Cols., 1990). Un residuo aspartato en la tercera región transmembranal (TM3) es considerado el sitio de unión para el grupo amino de la cadena lateral de las catecolaminas (Strader et al 1988). Dos residuos de serina en la quinta región transmembranal (TM5) parecen ser donadores de hidrógeno para la unión con los grupos hidroxilos de diversas catecolaminas. Ha sido observado que un residuo de aspartato conservado en la región TM2, es crucial en la activación de receptores β_2 y α_2 - adrenérgicos, D_1 y

D₂ dopaminérgicos (Strader y Cols., 1988, Wang y Cols., 1991, Chung y Cols., 1988, Tomic y Cols., 1993).

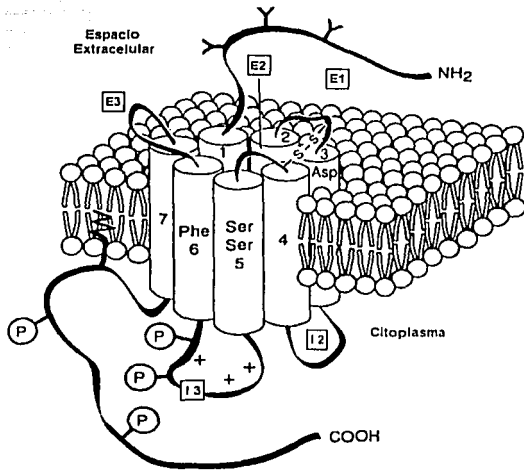


Figura 2. Estructura del receptor dopaminérgico. Se presentan las características estructurales de los receptores dopaminérgicos de la familia D₁. Los receptores dopaminérgicos de la familia D₂ se caracterizan por tener una cadena terminal COOH corta con una larga asa intracitoplásmica (CPL3). Los residuos que están involucrados en los sitios de unión a dopamina se encuentran en los dominios transmembranales. Los sitios potenciales de fosforilación están representados en la tercer asa intracelular y en la cadena COOH terminal. Los sitios de glicosilación se representan en la cadena NH₂ terminal. E1-E3 Asas Extracelulares. 1-7 Dominios Transmembranales. 12-13 Asas Intracelulares. Tomada de *Missale et al 1998*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Sistemas de Segundos Mensajeros

La activación de los receptores dopaminérgicos D_1 y D_5 inducen una estimulación de la adenilato ciclasa vía el sistema de proteínas Gs. Sin embargo varios reportes sugieren que son también capaces de estimular el metabolismo del fosfatidilinositol (*Wang y Cols 1995*). La activación de los receptores D_2 inducen una inhibición de la adenilato ciclasa y de los canales de Ca^{2+} , así como activación de los canales de K^+ , a través del sistema de proteínas G sensitiva a la toxina pertussis más probablemente a la clase G_i/G_o (*Vallar y Maldosi., 1989*). Se ha descrito que pueden inducir una activación e inhibición del metabolismo del fosfatidilinositol, así como una potenciación de la liberación de ácido araquidónico. Los receptores D_4 inducen una inhibición de la adenilato ciclasa a través de proteínas G sensitivas a la toxina pertussi, más probablemente a la clase G_i/G_o . Se ha mostrado que la dopamina incrementa la producción de AMPc en corazón de rata (*Amenta y Cols., 1993*). En tejidos cardíacos solo esta descrito que la activación de los subtipos de receptores D_1 , a través del agonista selectivo, SKF 38393 induce un ligero, pero significativo incremento en la actividad de la adenilato ciclasa en membranas de tejido ventricular de rata (*Ozono y Cols., 1996*). Es de notar que en este estudio solo la dosis de 100 μM de SKF38393, indujo un incremento del 15 % en la generación del AMPc, efecto que fue bloqueado en presencia del antagonista selectivo para D_1 , el SCH 23390, mientras que la forskolina a dosis de 1 μM , incrementó en 128.4 % la producción de AMPc.

Farmacología y Distribución de los receptores dopaminérgicos periféricos

Los receptores dopaminérgicos en el sistema cardiovascular fueron originalmente caracterizados a través de estudios fisiológicos como cambios en el flujo sanguíneo en respuesta a la administración de agonistas y antagonistas de la dopamina. Se observaron dos diferentes tipos de respuestas e inicialmente se clasificaron en base a estas en dos familias de receptores dopaminérgicos DA1 y DA2 (*Goldberg y Cols., 1972*). Los estudios realizados en tejidos periféricos sugirieron que las características moleculares de estos receptores son similares a los encontrados en el SNC (*Watson y Arkininstall 1994*). Sin embargo existe poca información acerca de la naturaleza molecular de los receptores dopaminérgicos en vasos sanguíneos, terminales nerviosas postganglionares, glándula adrenal, corazón, riñón. Actualmente lo que se conoce acerca de su función y clasificación en estos tejidos está basado en estudios farmacológicos. La distribución y función de los receptores dopaminérgicos periféricos se resumen en la TABLA 2:

TABLA 2. RECEPTORES DOPAMINERGICOS PERIFERICOS: FUNCION Y DISTRIBUCION

TEJIDO	TIPO DE RECEPTOR	FUNCION
Vasos Sanguíneos		
Adventicia	Familia D ₁	Inhibición de la liberación de NA
Media	Familia D ₂	Vasodilatación
Intima	Familia D ₂	Desconocido
Glandula Adrenal		
Glomerulosa	Familia D ₂	Inhibición de la secreción de Aldosterona
Médula	Familia D ₁	Estimulación e Inhibición de la liberación de A y NA
	Familia D ₂	
Riñón		
Glomérulo	Familia D ₁	↑ Velocidad de Filtración
Aparato Yuxtaglomerular	Familia D ₁	↑ Secreción de Renina
Túbulo Proximal	Familia D ₁	Inhibición de reabsorción de Na ⁺
Asa Ascendente de Henle	Familia D ₁	Inhibición de reabsorción de Na ⁺
Túbulo Colector Cortical	Familia D ₁ , Familia D ₂	Inhibición de reabsorción de Na ⁺
Ganglios Simpáticos	Familia D ₂	Inhibición de liberación de NA
Corazón	D ₄	Desconocido

NA: Noradrenalina; A: Adrenalina. Tomada de *Missale et al 1998*.

Receptor D₁. Tiene gran homología con el receptor D₅. También se le conoce como D_{1A}. En general la localización del RNAm para el receptor D₁, es concordante con los sitios de unión del ligando radioactivo [³H]-SCH-23390. Se encuentra principalmente distribuido en el SNC en el caudo-putamen, núcleo accumbens y tubérculo olfatorio, con bajos niveles en la corteza frontal, hipófisis, amígdala, hipotálamo y tálamo. En la periferia se ha encontrado sitios de unión al ligando radioactivo en riñón, hígado, corazón, y glándula paratiroides, sin embargo solo se ha detectado RNAm para D₁ en la glándula paratiroides y en linfocitos. Sus agonistas son SKF-38393 y fenoldopam los cuales tienen una selectividad 10 veces mayor a los receptores D₁ y D₅ que por los receptores D₂, D₃ y D₄. Sus antagonistas son SCH 23390 (kd 0.1-0.5 nM) y tiene una selectividad 1000 veces mayor por los receptores de la familia D₁ que por los de la familia D₂.

Receptor D₂. Este receptor tiene una farmacología similar a los receptores D₃ y D₄. También se le conoce como receptor D_{2A}. Existen dos isoformas del receptor D₂: una corta y otra larga: D_{2S} y D_{2L}, los cuales son derivados del mismo gen por "procesamiento alternativo". La forma larga del receptor D_{2L}, contiene 29 aa adicionales en la tercera asa citoplásmica, esta forma predomina en la rata, pero no en humanos. Existen pequeñas diferencias farmacológicas entre estas dos isoformas. La distribución del RNAm también es concordante con los estudios de unión con ligando radioactivo selectivos para D₂. El receptor D₂ predomina en SNC en áreas como el caudo-putamen, núcleo accumbens y tubérculo olfatorio así como en cuerpos celulares de neuronas dopaminérgicas, en sustancia nigra y área tegmental ventral. En la periferia se encuentra en la glándula pituitaria, corazón y vasos sanguíneos. Sus agonistas son aminotriptilina (N-0437) y bromocriptina que tienen una selectividad de 10 a 100 veces mayor por los receptores de la familia D₂ que por los de la familia D₁.

Receptor D₃. Tiene una farmacología similar al receptor D₂, se le conoce también como D_{2B}. Esta distribuido también primordialmente en SNC en el área límbica, tubérculo olfatorio, núcleo accumbens hipotálamo e Islas de Calleja (*Sokoloff y Cols., 1992*). Esta presente en bajos niveles en el caudo putamen y en la corteza cerebral. Su distribución en el SNC es consistente con un papel en las funciones cognitivas y emocionales y es un blanco en la terapia antipsicótica que involucra antagonistas dopaminérgicos. Se desconoce su distribución periférica, aunque se ha encontrado en riñón.

Receptor D₄. Su farmacología es similar al receptor D₂ y también se le conoce como receptor D_{2C}. Actualmente hay más ligandos selectivos. Este receptor exhibe una variación polimórfica en la población humana. La expresión del RNAm para D₄ se encuentra en orden de dos unidades menor que la expresión del receptor D₂. Los niveles más altos de expresión se encuentran en cerebro, en la médula, en amígdala, corteza frontal y media; bajos niveles se encuentran en estriado y en tubérculo olfatorio. En tejidos periféricos el RNAm para D₄ parece expresarse preferencialmente en el sistema cardiovascular de la rata. El receptor D₄ tiene igual o baja afinidad para los agonistas selectivos de D₂. Dentro de los antagonistas el clozapine tiene una selectividad 10 veces mayor para D₄ que para D₂ y D₃. Dentro de los radioligandos [³H]-Clozapine tiene una débil selectividad, ya que también se une a otros receptores como a 5 HT.

Receptor D₅. Este receptor tiene una farmacología similar al receptor D₁ pero se expresa en muchos menores niveles en el cerebro. También se le conoce como D_{1B} o D_{1b}. La carencia de ligandos selectivos para este receptor no ha permitido conocer adecuadamente su distribución. El RNAm para D₅ se ha encontrado en muy bajo nivel en ganglios basales en corteza frontal, hipocampo e hipotálamo y no parece estar expresado en tejidos periféricos. En cerebro parece que está participando en funciones de conducta y en la percepción del dolor. Dentro de los agonistas la

dopamina es 10 veces más selectivo para D_5 que para D_1 . Dentro de los antagonistas, prácticamente existe la misma afinidad por D_1 que por D_5 , excepto con (+)-butaclamol que tiene una afinidad 10 veces menor por D_5 que por D_1 .

En la TABLA 3, se muestran diferentes agonistas y antagonistas de los receptores dopaminérgicos.

TABLA 3. Perfil Farmacológico de los receptores dopaminérgicos

ANTAGONISTAS	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄
(+) Butaclamol	+++	++	+++	ND	++
Clorpromazina	+	+	+++	++	++
Clozapine	+	+	+	+	++
Eticlopride	-	-	++++	ND	+++
Haloperidol	+	+	++++	++	+++
Nafadotride	ND	ND	+++	++++	+/-
Nemonapride	ND	ND	++++	++++	++++
Raclopride	-	ND	+++	+++	+/-
SCH-23390	++++	++++	+/-	+/-	+/-
(-) Sulpiride	-	-	++	++	++
Spiroprone	+	+/-	++++	+++	++++
AGONISTAS					
Apomorfin	+/-	+	+++	++	+++
Bromocriptina	+	+	+++	+++	+
Dopamina	+/-	+	+	++	++
Fenoldopam	+++	+++	++	ND	+
7-OH-DPAT	+/-	ND	++	+++	+/-
Quinpirole	-	ND	+/-	++	++
PD1628 077	ND	ND	ND	ND	+++
PD 128,907	ND	ND	++	+++	++
SKF-38393	+++	++++	+	+/-	+/-

++++ Constante de Inhibición (K_i) < 0.5 nM; +++ 0.5 nM < K_i < 5 nM; ++ 5 nM < K_i < 50 nM; + 50 nM < K_i < 500 nM; +/- , 500 nM < K_i < 5 μM; -, K_i > 5 μM; ND, no determinado; 7-OH-DPAT, 7- hydroxi-dipropilaminotetralin. Modificada de *Missale y cols., 1998.*

Receptores dopaminérgicos en corazón de mamífero

Estudios Electrofisiológicos

La dopamina ha sido estudiada ampliamente en diversas especies en animales íntegros (*in vivo*) y en preparaciones aisladas de tejidos cardíacos *in vitro*. Aplicada en preparaciones de corazón aislado (modelo de Langendorff), así como de músculo papilar de corazón de cobayo y de diversas especies animales, se ha observado que induce un efecto positivo o negativo sobre la contracción y la frecuencia cardíaca dependiendo de la dosis usada.

El efecto inotrópico positivo es mediado por un mecanismo directo a través de la estimulación de receptores β -adrenérgicos y por un mecanismo indirecto a través de la liberación de noradrenalina. (Colmes y Fowler 1962; Mugelli y Cols., 1977; Yamaguchi y Cols., 1977; Fuder y Muscholl, 1978; Brodde y Cols., 1980; Habuchi y Cols., 1997a; 1997b; Zhao y Cols., 1997). De hecho se considera por algunos autores que la dopamina administrada en forma exógena por vía parenteral, puede actuar como un sustrato para la síntesis de catecolaminas. Hellmann *et al* 1971, mostraron por estudios con dopamina marcada (^3H -dopamina), que la dopamina es transformada en NA en corazón de rata. La dopamina provoca la liberación de noradrenalina (NA) de las terminales nerviosas simpáticas que inervan al corazón (Tsai y Cols., 1967; Brown y Cols., 1985; Habuchi y Cols., 1995; Habuchi y Cols., 1997b). En corazones de perro y de cobayo el efecto inotrópico de la dopamina puede ser inhibido con bloqueadores β -adrenérgicos. (Mc Donald y Goldberg 1963, Vatner y Cols., 1973; Mugelli y Cols., 1977). Otros estudios realizados en conejo, sugieren también la participación de los receptores alfa adrenérgicos en el efecto inotrópico positivo de la dopamina. (Brodde y Cols., 1980). Sin embargo los estudios de Mugelli y Cols., 1977, excluyeron el efecto mediado a través de receptores alfa en corazón de cobayo.

Estudios más recientes en el corazón de cobayo en el preparado de Langendorff, apoyan el hecho de que el efecto inotrópico positivo de la dopamina, sea predominantemente un mecanismo indirecto a través de la estimulación de la liberación de noradrenalina de las terminales nerviosas cardíacas. Los estudios de *Habuchi y Cols., 1997a, 1997b*, muestran claramente que existe una correlación entre los niveles de noradrenalina medidos en el líquido de post-perfusión cardíaca por HPLC (High Performance Liquid Chromatography) y el efecto estimulador de la dopamina. La administración previa de reserpina, la cual depleta la noradrenalina almacenada en las terminales nerviosas simpáticas en los animales de experimentación, disminuyó el efecto estimulador de la dopamina. Sin embargo el efecto no fue bloqueado completamente, lo cual aunado al bloqueo parcial que se observó de la dopamina a $3 \mu\text{M}$ con el antagonista del receptor dopaminérgico D_1 (SKF 83742), sugiere la participación de receptores dopaminérgicos. Cabe señalar que en estos estudios, la aplicación de bloqueadores beta adrenérgicos (bisoprololol, β_1 antagonista), tampoco bloqueó completamente los efectos provocados por dopamina. Estos datos sugieren que la dopamina puede estar actuando directamente sobre receptores dopaminérgicos en tejido cardíaco. En estos estudios también se encontró que dosis de $3 \mu\text{M}$ de dopamina, tiene un efecto estimulador débil sobre las corrientes de Ca, dependientes de canales tipo L en miocitos de aurícula derecha. Sin embargo otros estudios de estas corrientes en miocitos aislados de corazón de rata y conejo, mostraron que dosis de 1 y $10 \mu\text{M}$ no afectó las corrientes de calcio dependiente de canales de Ca tipo L (I_{Ca}), ni en la corriente transitoria de salida (I_{to}) en miocitos auriculares y ventriculares de rata, ni en miocitos ventriculares, así como tampoco en células del nodo sinoauricular de conejo.

Las discrepancias entre los resultados parece ser debida a diferencias de especies. Sin embargo, la posibilidad de que el efecto inotrópico positivo de la dopamina en preparaciones de

corazón aislado sea cuando menos mediado parcialmente a través de receptores dopaminérgicos no ha sido excluida o negada.

Con relación a los efectos inhibitorios de la dopamina, hay reportes aislados de que tiene un efecto inotrópico y cronotrópico negativo leve cuando se usa a dosis nanomolares (*Cavero I., 1982; Rump y Cols., 1995*). Estos efectos de la dopamina han sido atribuidos a la activación de receptores dopaminérgicos específicos que inducen una disminución en la liberación de noradrenalina de las terminales nerviosas simpáticas.

La acción de la dopamina en el sistema vascular periférico también ejerce un efecto dual, similar a su efecto en corazón. La dopamina a dosis elevada, provoca vasoconstricción de la aorta, arterias renales y coronarias, que conlleva a un aumento en la presión sanguínea (*Privitera y Cols., 1969; Setler y Cols., 1975*). Se propone que este efecto es mediado por la activación de receptores α -adrenérgicos, (*Goldberg y Whitsell, 1971; Berkowitz, 1983; Goldberg y Kohlr, 1983; Goldberg y Rajfer, 1985*). El uso de dosis bajas de dopamina, provoca una vasodilatación de arterias renales, coronarias, vasos mesentéricos y celíacos (*Osborne y Cols., 1971; Lokhandwala y Jandhyala, 1979; Hilditch y Drew, 1985; Kopia y Valocik., 1989; Yatsu y Cols., 1997*), lo que conlleva a una disminución de la presión sanguínea. Este efecto es mediado por la estimulación directa de los receptores dopaminérgicos de la familia D_1 y D_2 presentes en estos vasos sanguíneos (*Schuelke y Cols., 1970; Brode O-E., 1982; Missale y Cols., 1988; Amenta y Cols., 1992; Ricci y Cols., 1994*). Los receptores de la familia D_1 , están localizados en el músculo vascular liso (postsinápticos), los cuales parecen mediar la relajación del músculo, mientras que los receptores de la familia D_2 están localizados en nervios simpáticos (presinápticos), que inhiben la liberación de NA (*Yeh y Cols., 1969; Lokhandwala y Cols., 1985; Kopia y Valocik, 1989; Francis, 1995*).

Estudios de Autoradiografía

El corazón es un órgano que expresa una gran variedad de receptores. A través de diversos procedimientos experimentales se conoce que los receptores adrenérgicos se expresan en mayor proporción que otros. Aunque la proporción de receptores expresados varía en relación a la especie animal estudiada, los receptores β adrenérgicos parecen predominar en los tejidos cardíacos (Summers y Cols., 1987; Brodde and Michel 1999). Aunque la mayor expresión de un receptor parece estar asociada a la mayor participación en alguna función en este caso cardíaca, la presencia de otros tipos de receptores en menor cantidad no descarta su participación funcional. Diversos estudios electrofisiológicos ya mencionados y de autoradiografía dan evidencia de la presencia de receptores dopaminérgicos en los tejidos cardíacos, los cuales se detallan a continuación.

Estudios de unión con ligando radioactivo en corazón de cobayo en membranas de ventrículo derecho e izquierdo (Sandrini y Cols., 1984) demostraron la presencia de receptores dopaminérgicos de la familia D_2 ya que la apomorfina (agonista de la familia D_2) fue más potente que la dopamina (agonista de la familia D_1 y D_2) en desplazar la unión de la [3 H]-Dopamina y el sulpiride (antagonista de la familia D_2) fue el que tuvo mayor actividad como antagonista de esta unión. Estos resultados mostraron que la dopamina se une a receptores específicos en el tejido ventricular del corazón de cobayo, los que parecen ser de la familia D_2 . Esta información aunada a los efectos inducidos por la dopamina apoyan que sus efectos pueden estar mediados a través de estos receptores con probable localización presináptica, los cuales pueden inhibir o aumentar la liberación de noradrenalina de las terminales nerviosas simpáticas, dependiendo de la dosis de dopamina usada y de las condiciones experimentales dentro de las cuales, el animal de experimentación usado parece ser muy importante.

Otros estudios con autoradiografía y ligandos radioactivos para los receptores de la familia D₂ en corazones de humanos, corroboraron la presencia de estos receptores en corazón de humano, así como también el hecho de que su activación no inducía una estimulación de la adenilato ciclasa. (Amenta y Cols., 1992, 1993). Estudios combinados de unión con ligando radioactivo y de autorradiografía con microscopía de luz, identificaron al receptor en corazón de humano y de rata como del subtipo de receptor D₄ (Amenta y cols., 1997), con localización selectiva en tejido auricular. En estos estudios usaron [³H] Clozapine como ligando para definir la presencia del receptor D₄ en los tejidos cardíacos. Es bien conocido la poca especificidad del clozapine por receptores D₄, pues tiene afinidad también por el D₁, D₂ y D₃, incluso por otros receptores como los de serotonina (5HT₁), α-adrenérgicos y receptores muscarínicos (Coward 1992, Prinseen y Cols., 1994).

Por otro lado estudios de O'Malley y cols., 1992, mostraron por técnicas de biología molecular la secuencia y la estructura genética del subtipo de receptor D₄ en el sistema cardiovascular de la rata. Ozono y Cols 1996 y 1997 a su vez mostraron por técnicas de inmunohistoquímica con microscopía de luz y electrónica y de análisis de Western blot y RT-PCR que la proteína del receptor D₁ se encuentra expresada en el corazón de humano (aurícula, ventrículo y arterias coronarias) y de rata. En estos estudios se usaron anticuerpos policlonales de conejo dirigidos contra la porción de la tercera región extracelular del receptor D₁. La secuencia de esta porción específica, aparentemente no tiene homología con otros genes incluyendo a los otros subtipos de receptores dopaminérgicos. La selectividad del anticuerpo fue validada por su capacidad para reconocer al receptor D₁ humano expresado en células transfectadas (fibroblastos murinos LTK-). La secuencia de amino ácidos del tercer dominio extracelular está conservada en humanos y en la rata, con excepción de solo un amino ácido. Los estudios de Western blot mostraron un banda de 55- Kd en todos los tejidos estudiados,

concordante con el peso molecular calculado para el receptor D_1 . Simultáneamente realizaron medición de AMPc en miocitos ventriculares encontrándose que la aplicación del agonista selectivo para el receptor D_1 , el SKF incrementó la actividad de la AC en un 15%. Sin embargo otros estudios han fallado para evidenciar la presencia del receptor D_1 en los tejidos cardiacos (*Amenta y Cols., 1997, Martínez Mir y Cols., 1987*), estudios en los que hay que considerar la especie en la que fueron estudiados los receptores dopaminérgicos.

Participación de Dopamina y receptores dopaminérgicos en patologías cardiovasculares

Existe evidencia experimental de que la dopamina y/o los receptores dopaminérgicos pueden estar participando en diversas patologías cardiovasculares. Los estudios de *Habuchi y Cols., en 1995*, mostraron que la concentración de dopamina tisular, medida por HPLC en corazones (ventrículo derecho e izquierdo) de rata con hipertensión arterial espontánea (SHR) y sus cepa control (WKY), fueron significativamente mayor en las ratas con hipertensión espontánea que en las del grupo control. En las ratas con hipertensión espontánea las concentraciones de dopamina fueron 22 ± 4.5 ng/gr y 14.5 ± 3.1 ng/gr en ventrículo derecho e izquierdo respectivamente, mientras que en las ratas control (WKY) los valores fueron de 13.2 ± 3.9 ng/gr y 9.6 ± 2.4 ng/gr respectivamente en ventrículo derecho e izquierdo. *Ganguly y Cols., 1992*, en un estudio con ratas con desarrollo de hipertrofia ventricular por ligadura de aorta abdominal, encontró un incremento en la unión del ligando radioactivo [3 H] Spiperone en membranas de ventrículo izquierdo, de corazones con hipertrofia ventricular, sugiriendo una mayor expresión de los receptores dopaminérgicos de la familia D_2 . Este mismo autor (*Ganguly y Cols., 1995*) en el mismo modelo experimental, encontró regresión parcial de la hipertrofia ventricular izquierda, al administrar a los animales de experimentación SCH 23390 (antagonista de los receptores de la familia D_1), sugiriendo la participación de los receptores D_1 en el desarrollo de la hipertrofia ventricular. Recientemente se

reportó que la supresión genética del receptor D_3 dopaminérgico en ratones, incrementa la producción renal de renina y produce retención renal de sodio, con la consecuente hipertensión arterial sistémica dependiente de renina (*Asico y Cols., 1998*).

Otros estudios en modelos experimentales de isquemia miocárdica por ligadura de la coronaria descendente anterior en perros, han encontrado que el agonista dopaminérgico de la familia D_1 y D_2 , el Z1046 disminuye significativamente la incidencia de arritmias ventriculares malignas, así como los cambios electrocardiográficos inducidos por la isquemia miocárdica (*V'egh, y Cols., 1998*). Este mismo fármaco ha sido estudiado también por su efecto cronotrópico negativo y vasodilatador arterial (*Semeraro y Cols., 1997, Dunker y Cols., 1997*).

JUSTIFICACION

La dopamina es una droga ampliamente usada en el manejo de pacientes en estado crítico, como insuficiencia cardíaca (*Saito y Cols., 1991*) y choque cardiogénico (*Holzer y Cols., 1973*) entre otras. Aunque su uso más frecuente es por su efecto vasoconstrictor e inotrópico positivo obtenido con dosis elevadas ($10 \mu\text{g}/\text{Kg}/\text{min}$), su efecto vasodilatador ($2-4 \mu\text{g}/\text{Kg}/\text{min}$) predominantemente en la vasculatura renal es de gran ayuda para eliminar sodio y agua. A pesar del amplio uso de este fármaco el mecanismo de acción por el cual produce estos efectos, aun es controversial.

El conocimiento de la existencia de diversos subtipos de receptores dopaminérgicos D_1 , D_2 , D_3 , D_4 , ha permitido explicar las acciones de la dopamina en el SNC. Los recientes hallazgos de estos receptores en tejido cardíaco sugieren que la dopamina puede estar actuando a través de la activación de estos receptores en corazón en forma similar que en el SNC.

Es evidente que la dopamina y/o receptores dopaminérgicos están presentes en los tejidos periféricos, en donde parecen estar participando en importantes funciones fisiológicas. A pesar de la

amplia evidencia clínica y experimental de los efectos de la dopamina en el corazón, poco se conoce acerca de la presencia de los subtipos de receptores dopaminérgicos y menos aún se conoce acerca de su función. Considero que es importante el realizar estudios encaminados a investigar la presencia de los receptores dopaminérgicos en el corazón, así como la función en la que están participando. El conocer la localización de estos receptores (terminales nerviosas simpáticas y/o miocitos), así como los mecanismos intracelulares que activan, permitirá entender la participación de los subtipos de receptores dopaminérgicos en los procesos fisiopatológicos cardiovasculares.

HIPOTESIS

- 1.- El efecto depresor que se observa con el uso de dopamina en el corazón, sugiere la existencia de los subtipos de receptores dopaminérgicos de la familia D_2 (D_2 , D_3 y D_4) en el mismo.
- 2.- La existencia de receptores dopaminérgicos de la familia D_2 en el corazón debe estar asociada a un papel funcional, que de acuerdo a los efectos de estos receptores en el SNC, en el corazón deben tener un efecto depresor sobre automaticidad, excitabilidad, contracción y conducción.

OBJETIVOS

- 1.- El propósito de este proyecto es en primer lugar identificar, a través de técnicas de autorradiografía y de western blot la expresión y distribución de los subtipos de receptores dopaminérgicos de la familia D_2 (D_2 , D_3 , D_4) en corazón de cobayo.
- 2.- En segundo lugar se evaluará el efecto fisiológico de la activación de estos receptores dopaminérgicos en corazón de cobayo en el modelo de Langerdorff y a través de estudios electrofisiológicos en la actividad espontánea de la aurícula derecha y en músculo papilar de corazón de cobayo con registro del potencial de acción intracelular.

3.- Finalmente se realizará la medición de adenosin monofosfato cíclico (cAMP), a través de cromatografía secuencial en aurícula derecha y ventrículo izquierdo del corazón de cobayo, en presencia de los agonistas selectivos para los subtipos de receptores D_3 y D_4 .

MATERIALES Y METODOS

1 Expresión de los receptores dopaminérgicos de la familia D_2 en corazón de cobayo.

1.1 Autorradiografía de receptores dopaminérgicos de la familia D_2 en corazón de cobayo.

Se usaron 6 cobayo adultos machos (peso promedio 300 g) a los cuales previa dislocación cervical, se les practicó toracotomía para exponer al corazón, el cual se extrajo rápidamente. Una vez removido el corazón de los animales seleccionados se congelaron en una mezcla de 2-methylbutane/hielo seco (-40°C) y se almacenaron a -80°C , hasta su uso. Los corazones almacenados de cobayo fueron cortados en secciones de $15\ \mu\text{m}$ en plano sagital, usando un criostato Leitz. Los cortes de tejido fueron recolectados sobre portaobjetos pre-lavados y gelatinizados (3 cortes por portaobjetos), luego fueron desecados por vacío a 4°C durante 12 horas, para posteriormente almacenarse a -80°C , hasta el día del experimento.

Para la autoradiografía de los receptores de la familia D_2 y del receptor D_4 , las muestras fueron preincubadas en 50 mM de Tris-HCL, 120 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM KCL, 1.5 mM CaCl_2 y 4 mM de MgCl_2 a pH de 7.4, a temperatura ambiente por 10 minutos. Los cortes fueron incubados a temperatura ambiente en el mismo buffer conteniendo 1 nM [^3H]-YM-09151-2 (86 Ci/mmol) con y sin 100 nM de raclopride (antagonista de los receptores D_2/D_3) para la unión de ligando-receptor a los receptores D_4 y a los receptores de la familia D_2 respectivamente. Se agregó 8-OH-DPAT (50nM) para bloquear posible afinidad del ligando por receptores serotoninérgicos 5-HT $_{1A}$. La unión ligando receptor no específica fue determinada agregando 1 μM de (+)-Butaclamol (antagonista de receptores dopaminérgicos de la familia D_1 y D_2) al buffer. Las incubaciones fueron

terminadas lavando las muestras con buffer frío (4° C), seguidos de dos lavados consecutivos en el mismo buffer frío. Finalmente fueron lavadas con agua destilada fría, secadas por aire frío (secadora de cabello) y montadas en un casset para autoradiografía con el film [3 H]-Hyperfilm durante 21 días.

La autoradiografía del receptor D_3 se realizó con [3 H]-7-OH-DPAT, las secciones de tejido fueron preincubadas en 50 mM de Tris-HCL a un pH de 7.4, conteniendo 100 mM NaCl y 300 mM de GTP, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente fueron incubadas en el mismo buffer por dos horas en presencia de 2 nM [3 H]-7-OH-DPAT, 300 mM de GTP y 5 mM DTG (para bloquear la unión ligando receptor a sitios sigma). Se utilizó dopamina 1 μ M para determinar la unión no específica. Las incubaciones fueron terminadas por dos lavados consecutivos de 10 minutos con 50 mM Tris-HCL, pH 7.4 frío. Finalmente, la reacción fue parada por lavado con agua destilada fría (4° C). Fueron secadas por aire frío (secadora de cabello) y montadas en un casset para autoradiografía con el film [3 H]-Hyperfilm durante 5 semanas.

Las autorradiografías se analizaron con un sistema de analizador de imágenes computarizado (MCID-4, Imaging research, Ste-Catherine, Ontario), en la Universidad de McGill en Montreal Canada.

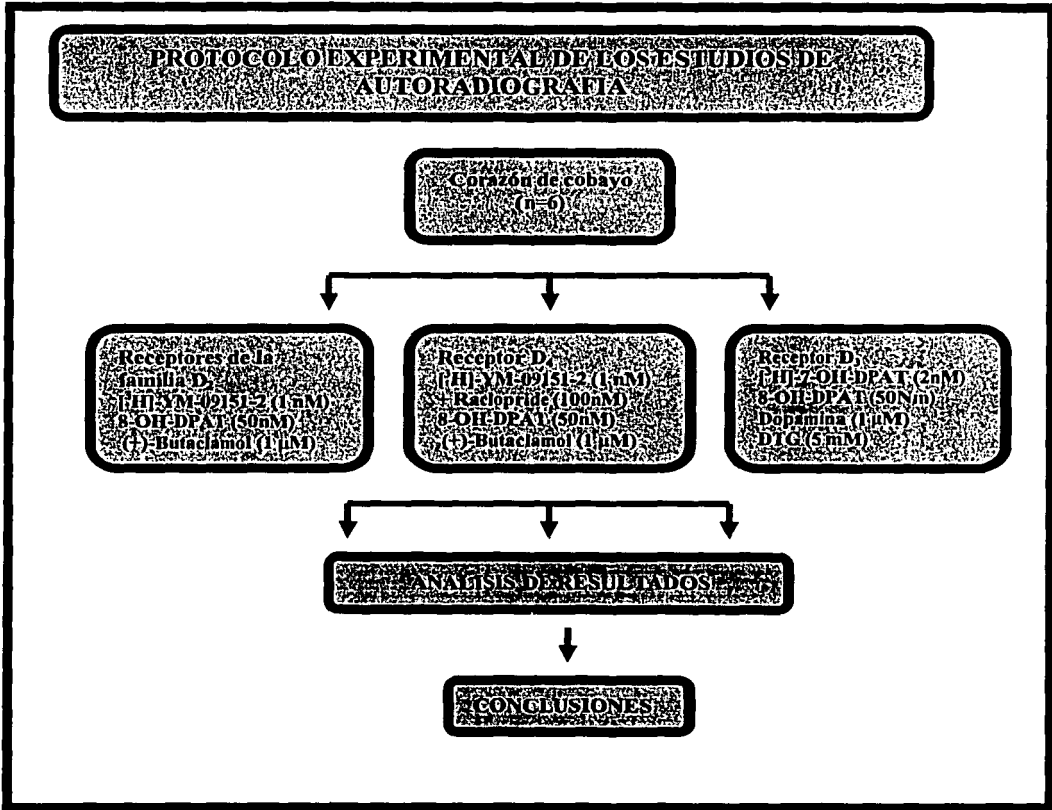


Figura 3. Diagrama de trabajo de los estudios de autorradiografía

1.2 Estudios de Western blot de Receptores Dopaminérgicos D2-like en corazón de cobayo.

Preparación de Membranas

Se obtuvieron tejidos cardíacos (aurícula derecha y músculo papilar del ventrículo izquierdo) del cobayo los cuales inmediatamente fueron colocados en 10 ml de buffer frío conteniendo 20 mM Tris-HCL (pH 7.4), 1 mM EDTA, leupeptina (5 µg/ml), inhibidor de tripsina (5 µg/ml), y benzamidina (10 µg/ml). Los tejidos fueron homogeneizados en un sistema homogenizador Politron (tres periodos de 10 segundos cada uno a máxima velocidad, 30 000 rpm) y centrifugado a 1000 g durante 10 minutos a 4°C. El lizado fue filtrado a través de cuatro capas de gasa de algodón en un tubo corex y centrifugado a 45 000 g (18 500 rpm) durante 20 minutos a 4°C. Los pellets fueron resuspendidos en 250 µl de buffer conteniendo triton X-100, Nonidet (NP-40), 2 M NaCl, Tris-HCL 1 M (pH 7.4), EDTA 250 mM (pH 7.4). Los tubos fueron invertidos durante dos horas a 4°C, y centrifugados a 45 000 g (18500 rpm) durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se conservó para determinación de proteínas y el western blot. El contenido proteico se determinó de acuerdo al método de Bradford usando un kit de Bio-Rad (Bradford M., 1976).

Western Blot

Cantidades iguales de membranas proteicas solubilizadas (50 µl/pozo) fueron fraccionadas en geles de polyacrylamida al 10 % (SDS). Las proteínas separadas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa de 0.2 µm y la intensidad de las bandas se verificó con colorante rojo de ponceau. Las membranas se bloquearon usando leche en polvo sin grasa al 5 % en TBST (Tris-HCl 1 M, NaCl 2 M; pH 7.4, Tween-20 250 µM) durante una hora a temperatura ambiente. Las membranas fueron posteriormente incubadas con anticuerpos policlonales para los receptores D₃ y D₄ a una dilución de 1:500 durante una hora a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4 °C. Después se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con TBST, las membranas fueron incubadas con

anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (anti-goat IgG y anti-rabbit IgG, diluidos a 1:2500, Santa Cruz Biotechnology, durante 45 minutos y lavados 5 veces durante 10 minutos con TBST. La detección de anticuerpos se realizó con el sistema de detección de quimiluminiscencia (Renaissance reagent, Mandel). Las membranas fueron expuestas en un film Kodak y revelados posteriormente.

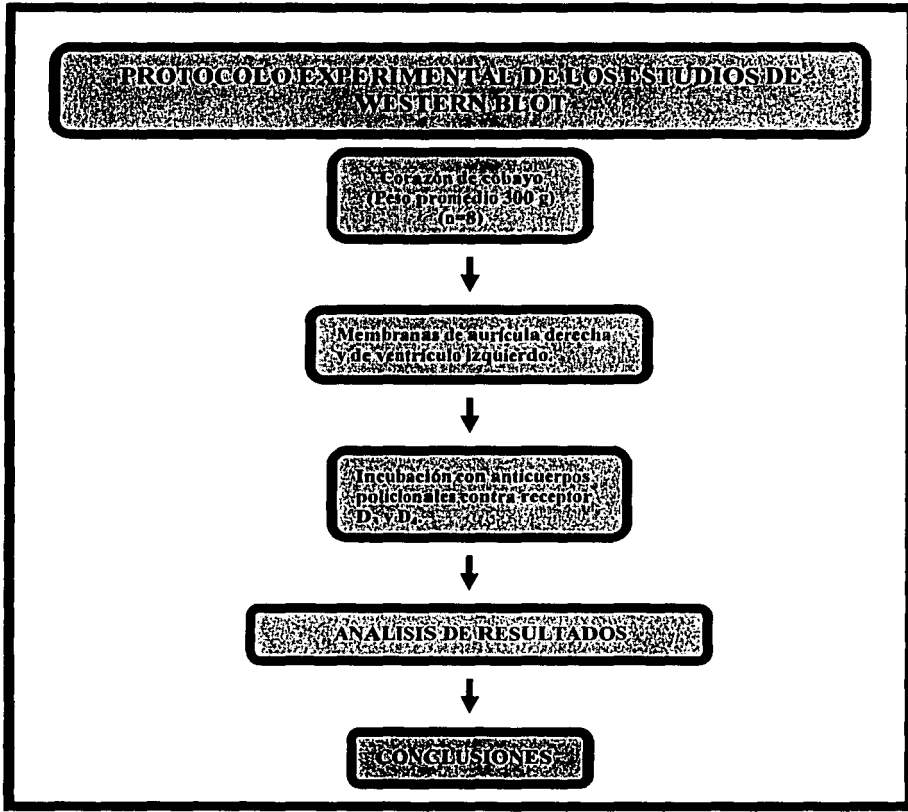


Figura 4 - Diagrama de trabajo de los estudios de Western Blot.

2- Papel funcional de los receptores de la familia D₂ en el corazón de cobayo

A).- Estudios fisiológicos en corazón aislado. Modelo de Langerdorff.

Se utilizaron cobayos machos de 300-350g. Los cobayos fueron sacrificados por dislocación cervical, rápidamente se les practicó una toracotomía anterior para poner al descubierto el corazón. Se retiró el pericardio dejando visible la aorta ascendente. Se puso un hilo de seda alrededor de la aorta. Inmediatamente se extrajo el corazón, y se canuló la aorta, en el sistema de perfusión

retrograda de Langendorff (*Döring y Dehnert, 1988*) (Figura 5). El principio de este sistema consiste en perfundir, algún fluido oxigenado adecuado para mantener la actividad cardiaca, a través de una cánula insertada en la aorta ascendente. En este caso utilizamos la solución Krebs-Henseleit a 37°C cuya, composición (en mmol/l) es la siguiente: 118 NaCl, 4.7 KCl, 1.66 MgSO_4 , 24.88 NaHCO_3 , 5.55 Dextrosa, 2 Piruvato de Sodio, 1.18 KH_2PO_4 , 2.52 CaCl_2 . El pH final de la solución fue ajustado a 7.4 con carbógeno (95% de O_2 y 5% de CO_2). La perfusión retrograda cierra las válvulas aórticas, al igual como sucede en el corazón in situ durante la diástole, y el fluido es perfundido a través de las arterias coronarias. Después de pasar a través del sistema vascular coronario el fluido de perfusión desemboca en la aurícula derecha, de tal manera que las cavidades cardíacas permanecen vacías durante el experimento. La perfusión se realizó a un flujo continuo de 8 ml/min generando una presión de perfusión de 40 mmHg. Se colocaron dos electrodos unipolares de registro: uno sobre la canula en la cual queda inserta la aorta y otro en ventrículo derecho para el registro de la actividad eléctrica del corazón (derivada bipolar estándar). Se colocó a través de la aurícula izquierda un balón de látex, el cual se llenó de agua destilada (0.01-0.3 ml) a través de una canula para generar una presión de 10 mm Hg. La canula se conecto a un transductor de presión P23, para el registro de la presión intraventricular izquierda

REGISTRO Y ANALISIS DE LAS SEÑALES: Las señales de electrocardiograma, presión intraventricular izquierda, fueron registradas a través de un polígrafo GRASS modelo 79D de 8 canales. Por medio de un diferenciador poligráfico GRASS modelo 7P20C se obtuvo la derivada de la presión intraventricular en función del tiempo, máxima y mínima ($dP/dt_{\text{máx/min}}$), cuyo trazo es desplegado por una pajilla del polígrafo en el mismo papel de registro, simultáneamente con la presión intraventricular y el electrocardiograma. La medición de la $dP/dt_{\text{máx}}$ se realizó directamente

en el papel, tomando la $dp/dt_{\text{máx}}$ como el valor máximo positivo de la curva de la dp/dt . Se promedió la $dp/dt_{\text{máx}}$ obtenida de los últimos cinco minutos, de exposición a cada una de las dosis aplicadas.

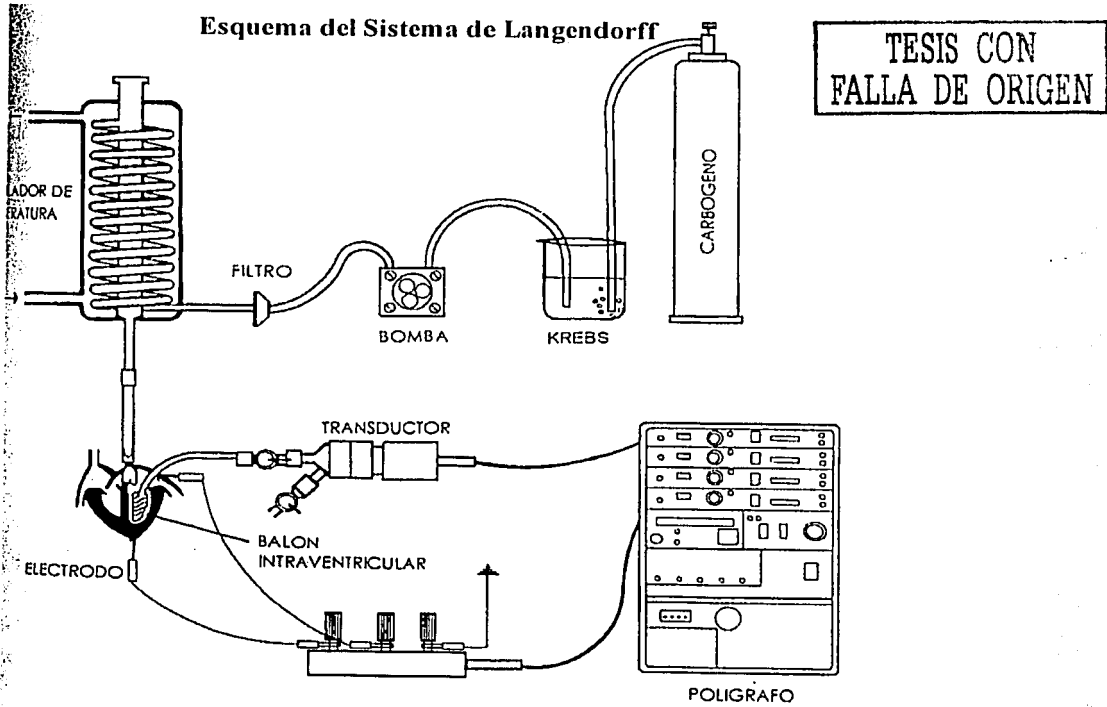


Figura 6. Esquema del sistema de perfusión retrógrada del corazón de acuerdo al modelo de Langendorff.

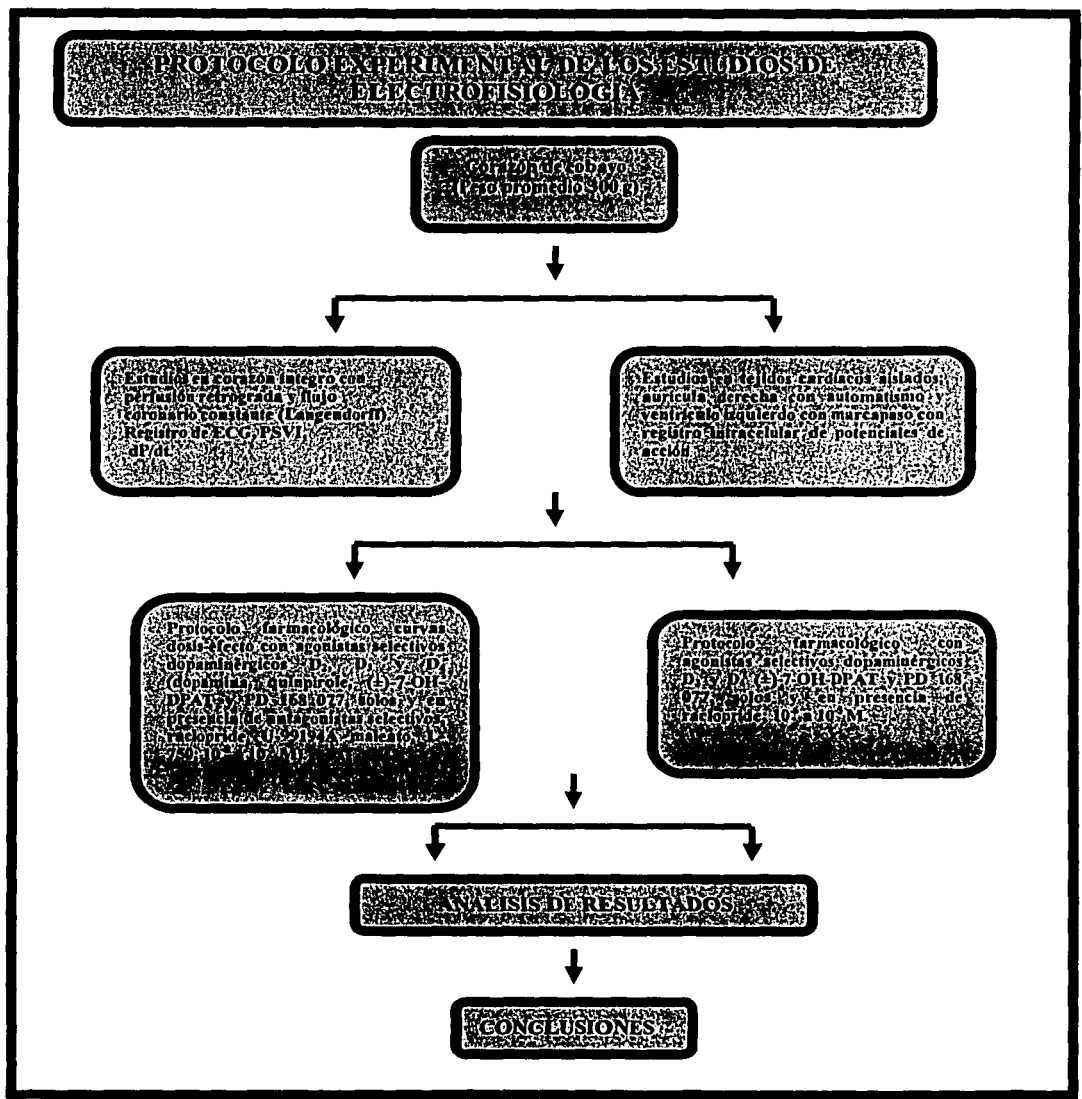


Figura 5. Diagrama de trabajo de los estudios electrofisiológicos.

En el registro del ECG se realizaron mediciones de los intervalos R-R, en un promedio de 6 a 10 para obtener la frecuencia cardiaca. Así también se midieron los intervalos P-R (tiempo de conducción auriculo-ventricular) y Q-T (tiempo de repolarización ventricular) en el electrocardiograma. Los registros de las señales se obtuvieron a través del sistema de registro con pajillas del polígrafo Grass. Se realizaron registros cada 5 minutos durante todo el experimento a una velocidad del papel de 100 mm/seg, para realizar posteriormente las mediciones de los parámetros estudiados en el papel de registro

PROTOCOLOS EXPERIMENTALES: Todos los corazones fueron sometidos a las mismas condiciones de control. Previa colocación del corazón en el sistema de perfusión se mantuvieron durante 30 minutos, para su estabilización, a partir de los cuales se inició la infusión de fármacos previa obtención de los registros control. En los experimentos en los cuales, se valoró el efecto de los agonistas dopaminérgicos, así como de dopamina se procedió a perfundir por lapsos de 20 min dosis acumulativas (100, 250, 500 nM, 1, y 10 μ M) de los diferentes agonistas o dopamina.

En la valoración del efecto de agonistas más antagonistas, en todos los experimentos primero se perfundió por un lapso de 15 min el antagonista, con la finalidad de favorecer su distribución en todo el tejido y observar si por si solo tiene algún efecto. Posteriormente se perfundieron mezclas del agonista y antagonista por 20 min y después de un periodo de lavado de 30 min, se perfundió el agonista solo (20 min).

Los cobayos fueron divididos en 12 grupos experimentales, además del grupo control:

- a.- Grupo control. Corazones perfundidos solo con solución de Krebs (n=14)
- b.- Protocolo con Dopamina (agonista no selectivo de receptores dopaminérgicos, n=18)
- c.- Protocolo con Quinpirole (agonista D₂, n=12)
- d.- Protocolo con (\pm)- 7-OH-DPAT (Agonista D₃, n=18)
- e.- Protocolo con PD 168 077(Agonista D₄, n=12).

- f.- Protocolo con 7-OH-DPAT más PD 160 077 (agonistas D_3 y D_4 respectivamente) (n=6).
- g.- Protocolo de Quinpirole en presencia de Raclopride (agonista D_2 y antagonista D_2/D_3 , respectivamente, n=8).
- h.- Protocolo con (\pm)-7-OH-DPAT en presencia de Raclopride (agonista D_3 y antagonista D_2/D_3 , respectivamente, n=12).
- i.- Protocolo con (\pm)-7-OH-DPAT en presencia de U-99194A (agonista D_3 y antagonista D_3 respectivamente, n=8)
- j.- Protocolo con PD 168 077, en presencia de Raclopride (antagonista D_2/D_3) (n=12).
- k.- Protocolo con PD 168 077, en presencia de L-750 (agonista D_4 y antagonista D_4 , respectivamente, n=8).
- l.- Protocolo con PD 168 077, en presencia de Clozapine (agonista D_4 y antagonista D_4 , respectivamente, n=8).
- m.- Protocolo con PD 160 077 más U-99194A (agonista D_4 y antagonista D_3 respectivamente, n=6)

B).- Estudios electrofisiológicos en la actividad espontánea de la aurícula derecha y en músculo papilar de corazón de cobayo. Registro intracelular de potenciales de acción.

Los experimentos se realizaron en aurícula derecha con automatismo espontáneo y en el músculo papilar del ventrículo izquierdo con estimulación. Los tejidos fueron seccionados del corazón de cobayo, el cual fue extraído previa dislocación cervical del animal. Por medio de una toracotomía se extrajo el corazón rápidamente y se colocó en un recipiente con solución de Krebs oxigenado con carbógeno (CO_2 5% y O_2 95%) y se procedió a hacer la disección de los tejidos por estudiar. Las preparaciones se colocaron en una cámara para tejido aislado, la cual fue perfundida continuamente a un flujo constante de 8 ml por minuto con solución Krebs-Henselit a 37°C cuya composición (en mmol/l) fue la siguiente: 118 NaCl, 4.7 KCl, 1.66 MgSO_4 , 24.88 NaHCO_3 , 5.55 Dextrosa, 2 Piruvato de Sodio, 1.18 KH_2PO_4 , 2.52 CaCl_2 . El pH final de la solución fue ajustado a 7.4. La solución se mantuvo continuamente oxigenada con carbógeno

Sistema de registro

Los parámetros que fueron determinados, se registraron por medio de microelectrodos de vidrio llenos con solución de KCl 3M y con una resistencia en la punta entre 15 a 30 Mohms. La señal registrada por el microelectrodo fue pasada a través de un amplificador (Electrometer DUO 773 de WPI) y fueron observadas en la pantalla de un osciloscopio (Tektronix 2201), paralelamente la señal fue grabada en una video VHS-Sony. El sistema de captura de los datos fue por medio de un conversor A/D, para después realizar las mediciones de cada parámetro (Fig. 7).

Los parámetros que se determinaron fueron son los siguientes:

1. Potencial en reposo (PR)
2. Amplitud del PA
3. Duración al 50% (D 50%) del PA

4. Duración al 90% (D 90%) del PA
5. Frecuencia cardiaca en aurícula derecha
6. Período refractario absoluto

Protocolo Experimental.

Se realizaron protocolos experimentales para evaluar el efecto de la (\pm)- 7-OH-DPAT (agonista del receptor D_3) y del PD 168 077 (agonista del receptor D_4) sobre los parámetros del potencial de acción en aurícula derecha con actividad espontánea y en el músculo papilar del ventrículo izquierdo con estimulación fija. La estimulación de los músculos papilares se realizó por medio de electrodos bipolares de plata colocados sobre la superficie del músculo en uno de sus extremos y fueron aplicados pulsos de corriente rectangulares con una duración de 1 mseg y con una intensidad 1.5 veces el umbral a un ciclo básico de 500 mseg de intervalo. Previa estabilización de las preparaciones con el registro del potencial de acción continua durante 20 minutos, se realizó un registro control durante 1 minuto en ambos tejidos. Después se realizó la infusión del fármaco a una concentración de 10 μ M durante 20 minutos, tiempo durante el cual se realizaron registros de un minuto de duración a los 5, 10, 15 y 20 minutos de la infusión del fármaco bajo las mismas condiciones. Finalmente se lavó la preparación con solución de Krebs libre del fármaco durante 20 minutos, obteniéndose también registros control.

Para la obtención del período refractario absoluto en las preparaciones de músculo papilar bajo condiciones de marcapaso, se aplicó un tren de 8 estímulos a una frecuencia fija de 2 Hz terminando con un estímulo de prueba. El intervalo entre el estímulo de prueba y el último estímulo del tren se fue acortando en tiempo, hasta el momento en donde no se obtuvo una generación del potencial de acción con el estímulo de prueba. El valor del PRA fue en aquel intervalo de tiempo en donde una

vez aplicado el pulso de prueba con una intensidad de 3 veces el umbral no fue posible generar una respuesta.

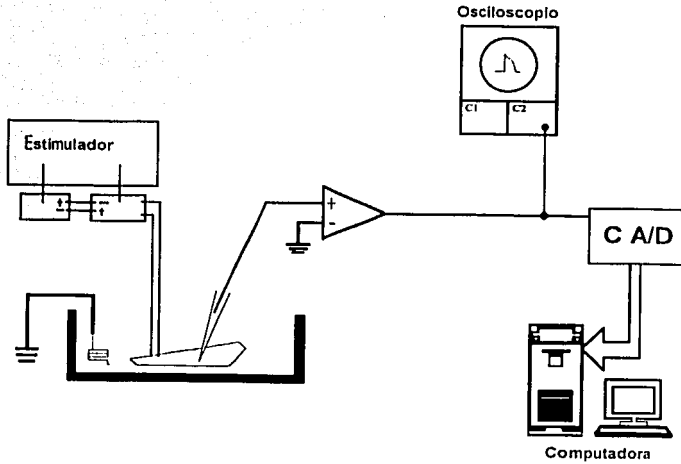


Figura 7. Esquema del dispositivo experimental para el registro de los potenciales de acción por la técnica convencional con microelectrodos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.- Determinación de Segundos Mensajeros

En otros grupos de experimentos se evaluó el efecto de la estimulación los receptores dopaminérgicos D_3 y D_4 , a través de sus agonistas selectivos 7-OH-DPAT más PD 160 077, respectivamente en la actividad de la adenilato ciclasa y de la producción de cAMP.

Preparación de Membranas

Tejidos cardíacos de aurícula derecha y de ventrículo izquierdo (músculos papilares) fueron homogeneizados en una solución de buffer frío, conteniendo 5 mM Tris (pH 7.4) y 2 mM EDTA, 5 $\mu\text{g/ml}$ leupeptina, 5 $\mu\text{g/ml}$ de inhibidor de tripsina, y 10 $\mu\text{g/ml}$ de benzamidina. Después las preparaciones fueron centrifugadas a 500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente el preparado fue filtrado y centrifugado a 18.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. El precipitado fue resuspendido en el mismo buffer y lavado dos veces. Nuevamente el precipitado fue resuspendido en un buffer conteniendo 75mM Tris (pH 7.4), 5 mM MgCl_2 y 2 mM EDTA, 5 $\mu\text{g/ml}$ leupeptina, 5 $\mu\text{g/ml}$ de inhibidor de tripsina, y 10 $\mu\text{g/ml}$ benzamidina. El contenido de proteínas fue determinado de acuerdo al método de Bradford (Bio-rad).

Actividad de Adenilato ciclasa

La actividad de la adenilato ciclasa fue medida de acuerdo al método de *Salomon y Cols 1974*, en dónde se usa un substrato marcado para generar AMPc, el ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$). Se colocan las membranas en presencia del substrato y de los agonistas estudiados en este caso 7-OH-DPAT y PD 168 077 (agonistas de los receptores D_3 y D_4 respectivamente). Después de un tiempo, la reacción se interrumpe con AMPc no marcado y posteriormente se cuantifica el ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-AMPc}$ producido en las membranas, en un contador de radioactividad.

Brevemente, 0.25 μg de proteínas de membranas fue agregado a un volumen total de 50 μl . La mezcla fue incubada conteniendo: 120 μM ATP, 1 μCi $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$, 100 μM cAMP, 53 μM GTP,

2.8 mM phosphoenolpiruvato, 0.2 U de piruvato cinasa, 1 U de miocinasa, 30 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2 mM MgCl₂, 0.8 mM EDTA y 100 μM de forskolina. La actividad de la enzima fue determinada en duplicado en ausencia (actividad basal) y en presencia de los agonistas dopaminérgicos D3 y D4, (±)-7-Hydroxy-DPAT Hbr y PD 168,077 respectivamente, en concentraciones de 10⁻⁹ a 10⁻⁵

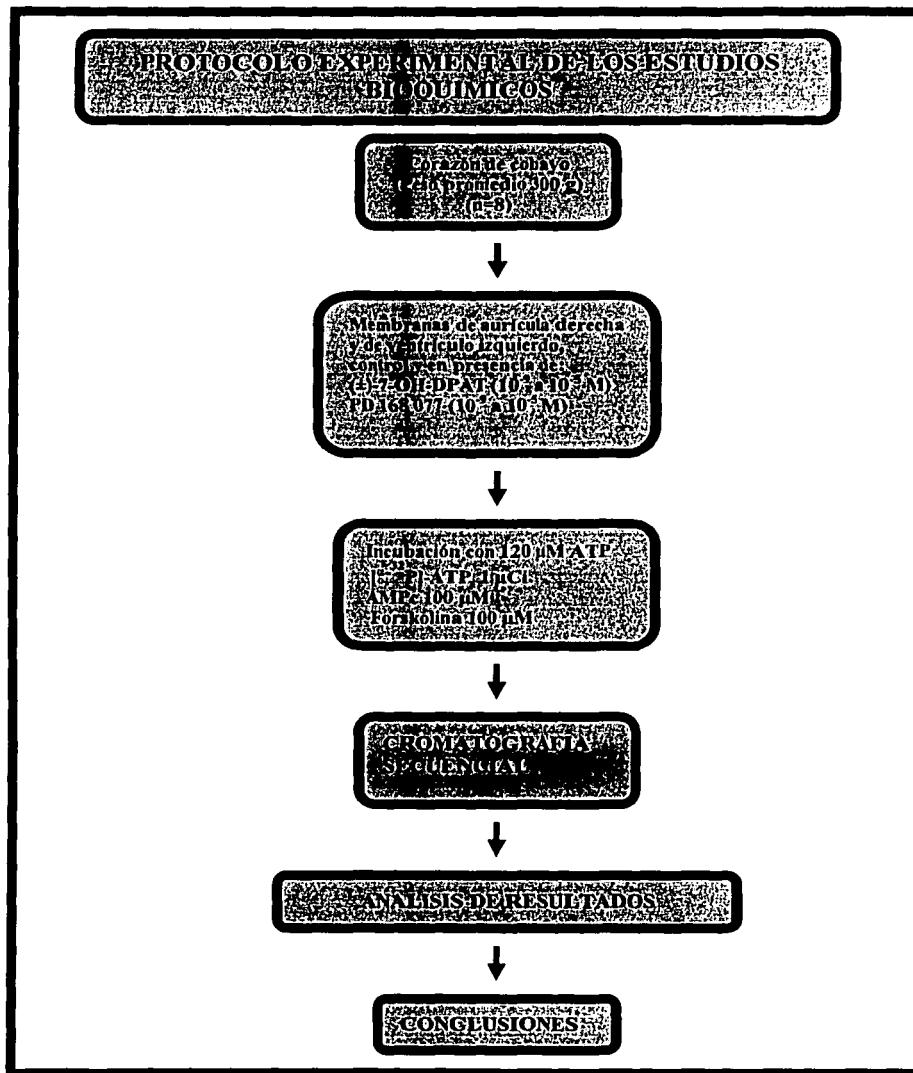


Figura 8. Esquema de trabajo de los estudios bioquímicos

Fármacos Usados.

Dopamina HCL (3-hidroxytyramine hydrochloride), **(-)-Quinpirole HCL** (trans-(-)-4aR-4,4",5,6,7,8,8",9-Octahydro-5-propyl-1H-pyrazolo[3,4-g] quinoline hydrochloride, **S(-)- Raclopride L-tartrato** (S)-3,5-Dichloro-N-[(1-ethyl-2-pyrrolidinyl)methyl]-2-hydroxy-6-methoxy-benzamide L-tartrate, **Hidrobromuro de (±)-7-Hydroxy-DPAT** (±)-2-Dipropylamino-7-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene hydrobromide, **maleato de PD 168 077**:(N-[[4-(2-Cyanophenyl)-1-piperazinyl]methyl]-3-methyl-benzamide, **L-750, 667 3HCL** (3-[[4-(4-Iodophenyl)-1-piperazyl]-1H-pyrrolo[2,3,-β]pyridine , **Butaclamol**, **Guanosine 5'-triphosphate (GTP)**, **dihidrocloruro de GBR-12909** fueron obtenidas de Research Biochemicals International (RBI, Natick, MA U.S.A.) **1,3-Di(2-5-tolyl)guanidine** se obtuvo de Sigma (St. Louis, MO). **[³H]-YM-09151-2** (86 Ci/mmol), y **[³H]-7-OH-DPAT** (139 Ci/mmo) de New England Nuclear. (Boston, MA).

Fármacos dopaminérgicos: fórmula química y peso molecular

Agonista	Receptor	Fórmula	Peso Molecular
Dopamine	D ₁ , D ₂ , D ₃ , D ₄ , D ₅	C ₈ H ₁₁ NO ₂ HCL	189.6
Quinpirole	D ₂ /D ₃	C ₁₃ H ₂₁ N ₃ ·HCL	255.79
7-OH-DPAT	D ₃	C ₁₆ H ₂₅ NO·HBr	328.3
PD 168,077 Maleato	D ₄	C ₂₀ H ₂₂ N ₄ OUC ₄ H ₄ O ₄	450.5

Antagonistas

Raclopride	D ₂ /D ₃	C ₁₅ H ₂₀ Cl ₂ N ₂ O ₃ ·C ₄ H ₆ O ₆	497.33
L-750,667	D ₄	C ₁₈ H ₁₉ N ₄ ·1.3HCL	527.67
U-99194A maleato	D ₃	C ₁₇ H ₂₇ NO ₂ ·C ₄ H ₄ O ₄	393.48
Clozapine	D ₄	C ₁₈ H ₁₉ CIN ₄	326.83

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresan como el promedio \pm el error estándar (SEM), en valores absolutos y/o normalizados. Las curvas dosis-efecto fueron analizadas por regresión no lineal (GraphPad, Prism). Cada regresión lineal se realizó de acuerdo a la ecuación sigmoidea $R/R_{\max} = A^c / (A^c + (EC_{50})^c)$ donde R_{\max} es el máximo efecto causado por agonista, A es la concentración del agonista, EC_{50} es la concentración requerida para obtener la mitad del máximo efecto y c es una constante. Posteriormente los resultados entre los diferentes grupos de estudio fueron analizados por el método de ANOVA de una vía, y posteriormente se aplicó la prueba de Dunnet (que compara los grupos experimentales con el control). Un valor de $p < 0.05$ fue considerado significativo.

RESULTADOS

Los resultados que se describen a continuación constituyen la base del artículo científico "*Functional and Autoradiographic characterization of Dopamine D₂-like receptor in the guinea pig Heart*". *Canadian J Physiol and Pharmacol 2002* (en proceso de impresión).

1.- Expresión de los receptores de la familia D₂ en corazón de cobayo.

a)- Autoradiografía de Receptores

Como se muestra en la TABLA 4, los resultados de autoradiografía con ligandos radioactivos muestran la presencia de los subtipos de receptores D₂, D₃ y D₄ distribuidos en todos los tejidos cardíacos. Sin embargo debe considerarse que el ligando usado [³H]-YM-09151-2, tiene afinidad para todos los receptores de la familia D₂ y que el raclopride que fue usado para bloquear los receptores D₂ y D₃ puede no efectuar un bloqueo total. Si se compara la imagen de la figura 5 (unión del receptor D₄), con la 4 (unión total a los receptores de la familia D₂), se observa una gran similitud, sugiriendo que el receptor D₄ se expresa en mayor proporción, en concordancia con la

cantidad en fmol/mg de tejido encontrada para este receptor. Estos resultados muestran que el receptor D₄, es el que tiene mayor grado de expresión en los tejidos cardíacos. Es de notar que la distribución del receptor D₃ predomina en la región lateral de la aurícula derecha, así como en los vasos arteriales (aorta y arteria pulmonar) de los corazones estudiados (Figura 6).

TABLA 4
Análisis cuantitativo de los subtipos de receptores dopaminérgicos en tejidos del corazón de cobayo

Receptor dopaminérgico detectado y Ligando usado	Aurícula Derecha	Aurícula Izquierda	Ventrículo Derecho	Ventrículo Izquierdo
Familia D ₂ [³ H] YM-09151-2	3.3 ± 1.6	3.0 ± 2.0	3.9 ± 1.2	3.3 ± 3.0
Receptor D ₃ [³ H]-7-OH-DPAT	5.1 ± 0.8	2.3 ± 0.8	1.8 ± 0.6	1.7 ± 0.7
Receptor D ₄ [³ H]YM-09151-2 + raclopride	4.4 ± 0.8	3.0 ± 1.2	3.0 ± 0.8	2.5 ± 1.3

Los niveles de unión del ligando son expresados en fmol/mg de tejido húmedo. Los valores son el promedio ± SEM de 6 animales (cuatro secciones por animal).

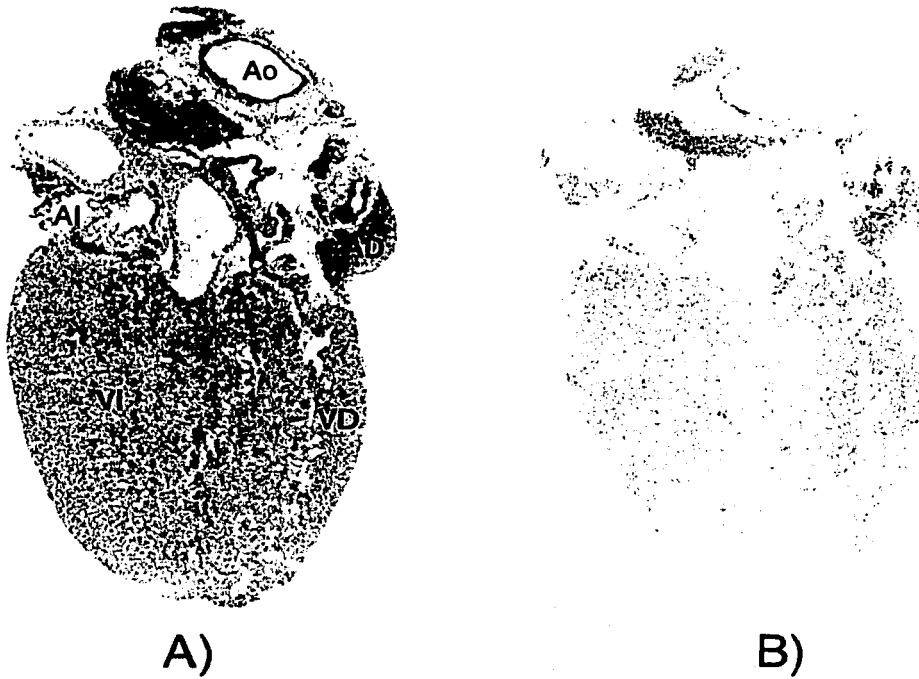


Figura 9. Imagen de la región posterolateral izquierda del corazón de cobayo en un corte sobre su eje mayor. En A se muestra la imagen de la unión del ligando radioactivo $[^3\text{H}]\text{-YM-09151-2}$ a los tejidos cardíacos. En B se muestra la unión no específica del ligando. Como puede observarse la unión del ligando se localiza predominantemente en tejido auricular derecho e izquierdo, en los grandes vasos y en forma difusa en el tejido ventricular izquierdo. AD: aurícula derecha. AI: aurícula izquierda. VD: ventrículo derecho. VI: ventrículo izquierdo. Ao: aorta. La mayor densidad de la figura (oscuro) indica las regiones de unión del ligando.

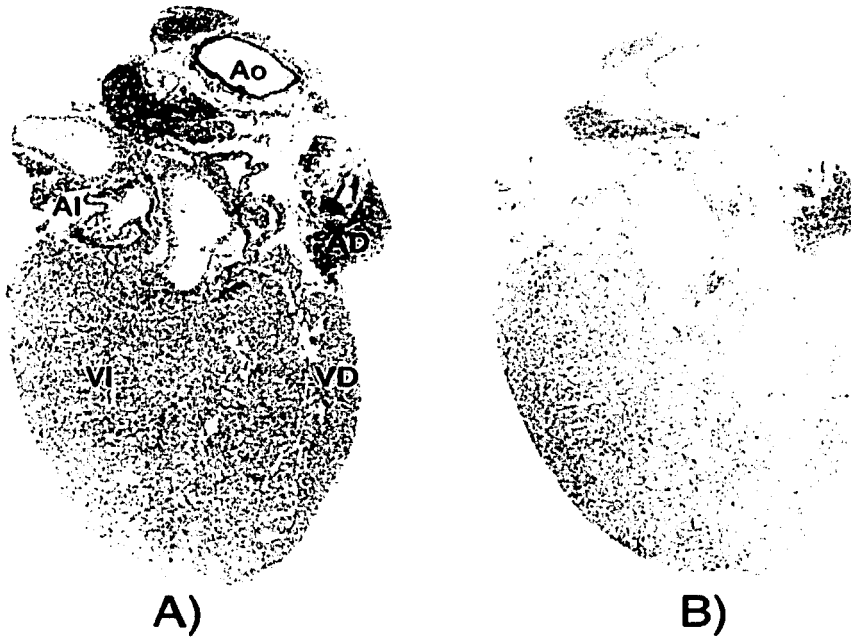


Figura 10. Imagen de la región posterolateral izquierda del corazón de cobayo en un corte coronal. En A se muestra la imagen de la unión del ligando radioactivo [^3H]-YM-09151-2 en presencia de Raclopride (antagonista D_2/D_3), por lo que la unión correspondería a la presencia de los receptores dopaminérgicos D_4 , en los tejidos cardíacos. En B se muestra la unión no específica del ligando. Como puede observarse la unión del ligando se localiza predominantemente en tejido auricular derecho e izquierdo, en los grandes vasos y en forma difusa en el tejido ventricular izquierdo. AD: aurícula derecha. AI: aurícula izquierda. VD: ventrículo derecho. VI: ventrículo izquierdo. Ao: aorta. La mayor densidad de la figura (oscuro) indica las regiones de unión del ligando.

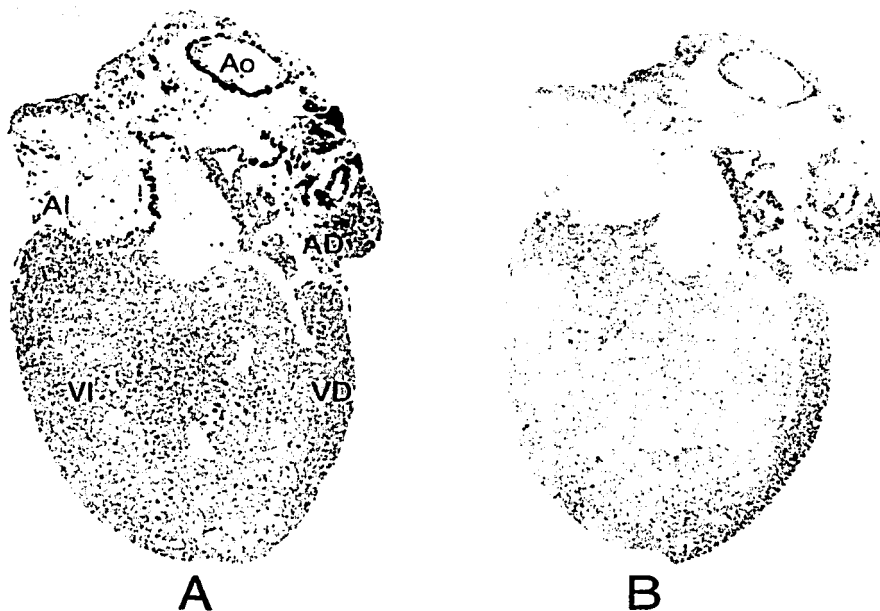


Figura 11. Imagen de la región posterolateral izquierda del corazón de cobayo en un corte coronal. En A se muestra la imagen de la unión del ligando radioactivo $[^3\text{H}]-7\text{-OH-DPAT}$ a los tejidos cardíacos. En B se muestra la unión no específica del ligando. Como puede observarse la unión del ligando se localiza predominantemente en tejido auricular derecho y en la aorta. AD: aurícula derecha. AI: aurícula izquierda. VD: ventrículo derecho. VI: ventrículo izquierdo. Ao: aorta. La mayor densidad de la figura (oscuro) indica las regiones de unión del ligando.

Western Blot

La figura 12 muestra los resultados del western blot de los receptores D₃ y D₄ en membranas de corazón de cobayo (aurícula derecha y ventrículo izquierdo). Las bandas para los receptores (aproximadamente 75 kD) D₃ y D₄ fueron detectados en ambos tejidos.

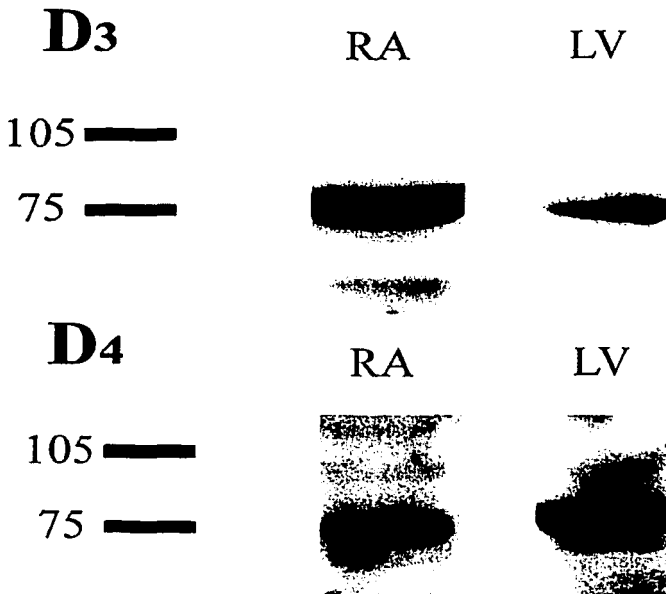


Figura 12. Análisis de western blot para los receptores D₃ y D₄ en la aurícula derecha y en ventrículo izquierdo del corazón de cobayo. Se identificaron bandas de 75 KDa para ambos receptores en ambos tejidos.

2.- Papel funcional de los receptores de la familia D₂ en el corazón de cobayos

A).- Estudios en corazón perfundido. Modelo de Langerdorff.

a.- En el grupo control, n=14, se observó que durante tres horas y media de perfundir a las preparaciones, únicamente con solución Krebs, la frecuencia cardíaca (Figura 14) y la dP/dt_{max} (Figura 15), tuvieron variaciones, no mayores a un 10 %.

b.- Protocolo con Dopamina (n=18). Se corroboró el efecto dual de la dopamina. A concentraciones bajas de 50 y 100nM se observó una tendencia a disminuir la frecuencia cardíaca con respecto al control: $218 \pm 24/\text{min}$ a 190 ± 26 y 182 ± 18 latidos por minuto, respectivamente. Contrariamente a partir de la concentración de 500 nM, se indujo un incremento en la frecuencia cardíaca, siendo el efecto máximo con la concentración de 10 μM , ($218 \pm 24/\text{min}$ a $268 \pm 36/\text{min}$, $p < 0.01$, con respecto al control) (Figura 14). En cuanto a la derivada máxima de la presión sobre tiempo (dP/dt_{max}), se observó con las concentraciones de 50 y 100 nM una discreta tendencia a disminuir, lo cual no fue significativo. Con concentración de 1 y 10 μM se observó un incremento significativo con respecto al control (de 1800 ± 600 a 2400 ± 350 , $p < 0.05$) (Figura 15).

c.- Protocolo con Quinpirole (agonista D₂) (n=12). Se realizó al igual que en el resto de los protocolos una curva dosis efecto a partir de 50, 100, 250 y 500 nM y 1 y 10 μM . Con concentraciones bajas se observó una discreta disminución en la frecuencia cardíaca aproximadamente del 12 % y con altas concentraciones (10 μM), los valores regresaron a los valores control. (Figura 16). El efecto sobre la contracción ventricular fue significativamente depresor con las dosis de 100 y 250 nM (Figura 17). Sin embargo al igual que con la frecuencia cardíaca los valores regresaron a los valores control con la dosis máxima de 10 μM . Estos resultados sugieren que el quinpirole esta activando dos diferentes tipos de receptores. Por la similitud del efecto a dosis

bajas del quinpirole, con el efecto observado con el agonista D_3 ((\pm)-7-OH-DPAT) y el D_4 (PD 168 077) existe la probabilidad de que el efecto observado con el quinpirole a la concentración de 100 y 250 nM sea mediado por uno de estos receptores.

d.- Protocolo con (\pm)-7-OH-DPAT (agonista D_3) (n=18). En este grupo la administración de (\pm)-7-OH-DPAT a partir de la concentración de 100 nM indujo una disminución de la frecuencia cardiaca, efecto dependiente de la concentración, la cual fue estadísticamente significativa a partir de la concentración de 500nM ($p < 0.05$). El efecto máximo fue observado con la concentración de 10 μ M donde se observó una reducción cercana al 40 % en la frecuencia cardiaca ($p < 0.001$) (Figura 16). Este efecto fue revertido con el lavado de la preparación con solución de Krebs. Sobre la derivada máxima de la presión ventricular ($dP/dt_{m\acute{a}x}$), el (\pm)-7-OH-DPAT no indujo cambios significativos a concentraciones nanomolar. Una reducción en la $dP/dt_{m\acute{a}x}$ aproximada del 20 % fue observada con la dosis de 10 μ M, lo que sugiere que a esta concentración probablemente se está activando otro receptor (Figura 17). Es de notar que en este protocolo experimental se observó un incremento significativo en el tiempo de repolarización ventricular (intervalo Q-T del electrocardiograma) durante la infusión de la droga (160 ± 12 mseg a 230 ± 18 mseg a la concentración de 10 μ M, $p < 0.01$) (Figura 21).

e.- Protocolo con PD168 077 (agonista D_4) (n=12). A 12 corazones se les perfundió en forma continua el agonista específico D_4 (PD 168 077) a concentración de 100, 250, 500 nM y 1 y 10 μ M. El efecto sobre la frecuencia cardiaca fue de depresor, efecto dosis-dependiente (Figura 16). El efecto cronotrópico negativo fue menor en comparación con el (\pm)-7-OH-DPAT, pues a la concentración máxima usada de 10 μ M, solo se redujo un 24 % la frecuencia cardiaca, en comparación con una reducción del 40 % inducida por el (\pm)-7-OH-DPAT. Sin embargo se observó un efecto inotrópico negativo significativo desde la concentración de 500 nM (efecto sobre la

$dP/dt_{\text{máx}}$ de 1800 ± 600 a 1300 ± 350 , $p < 0.01$) (Figura 17). No se observaron cambios en los intervalos de conducción aurículo-ventricular (P-R), ni de repolarización ventricular (Q-T).

f.- Protocolo con (\pm)-7-OH-DPAT más PD 160 077 (agonistas D_3 y D_4 respectivamente). (n=6). En este grupo se realizó la administración simultánea de (\pm)-7-OH-DPAT más PD 168 077 a las mismas concentraciones. La administración simultánea de ambos agonistas no produjo efectos aditivos, como se muestra en la Tabla 7.

g.- Protocolo de quinpirole en presencia de raclopride (agonista D_2 y antagonista D_2/D_3 , respectivamente) (n=8). El efecto depresor sobre la frecuencia cardíaca y la $dP/dt_{\text{máx}}$ observado con el quinpirole fue abolido en presencia de $10 \mu\text{M}$ de raclopride (no mostrado).

h.- Protocolo con (\pm)-7-OH-DPAT en presencia de raclopride (agonista D_3 y antagonista D_2/D_3) (n=12). Se evaluó el efecto del (\pm)-7-OH-DPAT (10^{-7} a 10^{-5} M) más raclopride (se usaron dos dosis 1 y $10 \mu\text{M}$). Se observó que el raclopride a $10 \mu\text{M}$, perfundido en forma aislada no produce cambios ni en la frecuencia cardíaca ni en la $dP/dt_{\text{máx}}$. Cuando se perfundió el raclopride en presencia del agonista, en concentraciones iguales ($10 \mu\text{M}$) la frecuencia disminuye ligeramente, cambio que no alcanzó a ser estadísticamente significativo. Por otro lado con la perfusión de 7-OH-DPAT, después del lavado de la mezcla, a la misma concentración ($10 \mu\text{M}$), se observa nuevamente la disminución de la frecuencia cardíaca (30 %) con respecto al control, (Figura 15). Los resultados muestran un bloqueo parcial del efecto del (\pm)-7-OH-DPAT en presencia del raclopride.

i.- Protocolo con (\pm)-7-OH-DPAT en presencia de U-99194A (agonista D_3 y antagonista D_3 respectivamente, n=8). En la curva dosis-respuesta del (\pm)-7-OH-DPAT (10^{-7} a 10^{-5} M) la administración simultánea de U-99194A a 1 y $10 \mu\text{M}$, se observa que el efecto inhibitorio sobre la frecuencia cardíaca del (\pm)-7-OH-DPAT es revertido solo a concentraciones nanomolar en forma estadísticamente significativa (Figura 18). El efecto inhibitorio sobre la frecuencia cardíaca inducido

por el (\pm)-7-OH-DPAT a concentración micromolar, no fue modificado en presencia del U-99194 A

j.- Protocolo con PD 168 077, en presencia de raclopride (agonista D_4 y antagonista D_2/D_3 , respectivamente) (n=12). En este protocolo se estudió el efecto del PD 168 077 en presencia de raclopride (ambos a concentraciones similares, 10^{-5} M). Los resultados fueron similares a los del protocolo con el agonista D_3 , el (\pm)-7-OH-DPAT más raclopride. El raclopride redujo parcialmente el efecto cronotrópico negativo del PD 168 077; (reducción del 7.48 %) sin embargo el efecto no fue estadísticamente significativo en comparación con el efecto cronotrópico negativo inducido solo con el PD 168 077 (reducción del 17.48 %) (Figura 20).

K, l, m.- Protocolos con PD 168 077, en presencia de L-750, clozapine y U-99194A (agonista D_4 y antagonistas D_4 , respectivamente, n=6 para cada antagonista). Los antagonistas de los receptores D_4 (L-750 y clozapine) en concentraciones de 1 y 10 μ M no revirtieron el efecto inotrópico negativo inducido por el PD 168 077 (10^{-5} M). Tampoco el antagonista D_3 , el U-99194A fue capaz de revertir este efecto (datos no mostrados).

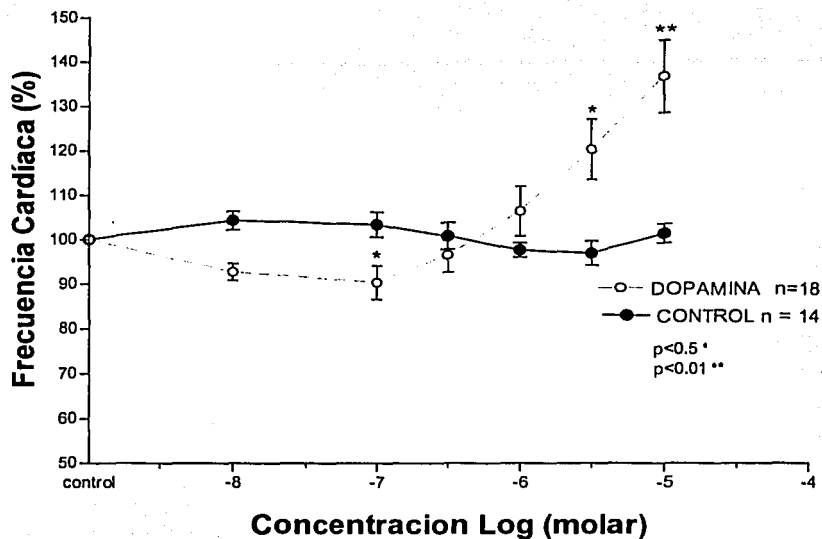


Figura 14. Curva dosis-respuesta de dopamina sobre la frecuencia cardíaca. Como puede observarse la dopamina induce dos tipos de efectos, a dosis nanomolares induce un efecto cronotrópico negativo leve de aproximadamente el 10 % a dosis entre 50 y 100 nM. A dosis de 500 nm se observa un efecto estimulador, el cual persiste y es sostenido con las dosis subsiguientes, siendo el efecto máximo a la dosis de 10 μ M. La gráfica muestra el grupo control, en círculos oscuros (●)n=14. El grupo experimental con dopamina se muestra en círculos claros (○), n= 18. Los valores fueron normalizados y son expresados en promedio \pm SEM. (*p<0.05, **p<0.01).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

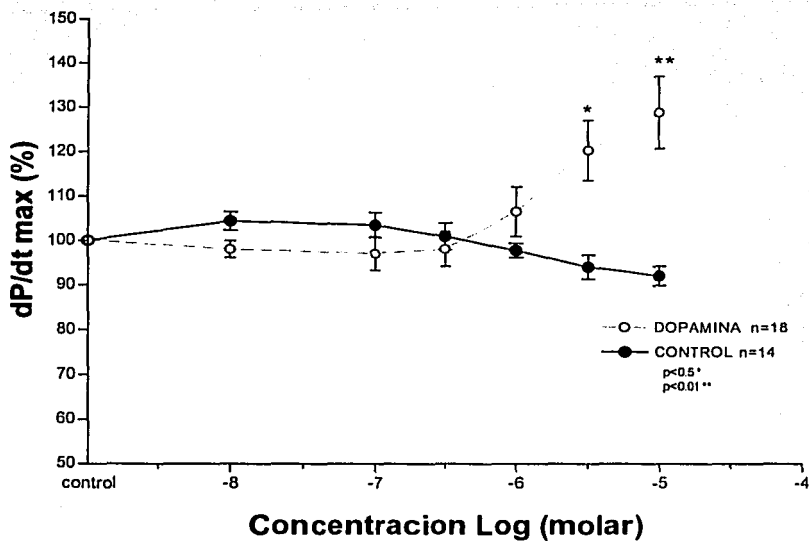


Figura 15. Curva dosis-respuesta de dopamina sobre la dP/dtmax. Como puede observarse la dopamina induce a dosis de 500 nm un efecto estimulador, el cual persiste y es sostenido con las dosis subsiguientes, siendo el efecto máximo a la dosis de 10 µM. No se observa un efecto depresor significativo. La gráfica muestra el grupo control en círculos oscuros (●) n=14. El grupo experimental con dopamina se muestra en círculos claros (○), n= 18. Los valores fueron normalizados y son expresados en promedio ± SEM. (*p<0.05, **p<0.01, ***p>0.001).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

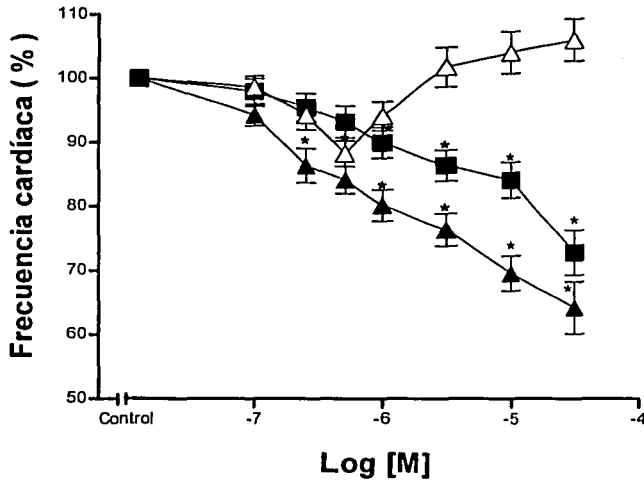


Figura 16. Curva dosis-respuesta de diferentes agonistas dopaminérgicos sobre la frecuencia cardíaca. Como puede observarse la activación de los receptores dopaminérgicos D₂-like, induce un efecto cronotrópico negativo, siendo mayor el efecto con el agonista D₃ (7-OH-DPAT). En la gráfica se muestra el grupo experimental con el agonista D₂ (quinpirole, n=12) en triángulos claros (). El grupo con agonista D₃ (7-OH-DPAT, n=18) en triángulos oscuros () y el grupo con agonista D₄ (PD168077, n=12) en cuadros oscuros (). Los valores fueron normalizados y son expresados en promedio \pm SEM. (*p<0.01, **p<0.001).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

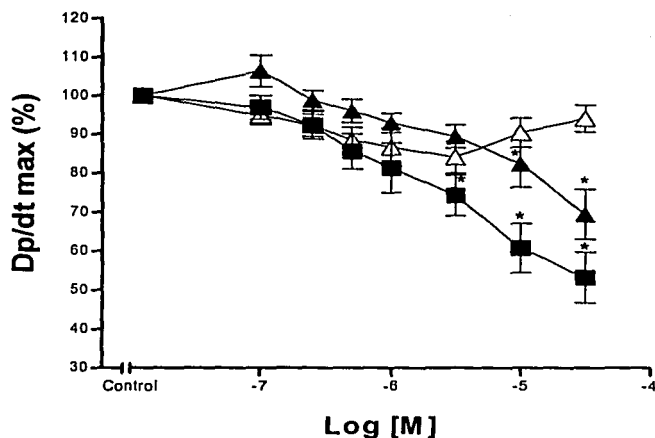


Figura 17. Curva dosis-respuesta de diferentes agonistas dopaminérgicos sobre $dp/dt_{máx}$. Como puede observarse solo la activación de los receptores dopaminérgicos del tipo D_4 (PD 168 077), induce un claro efecto inotrópico negativo. La activación de los receptores D_3 , solo tiene un efecto depresor significativo a la dosis de $10 \mu\text{M}$. El grupo experimental con el agonista D_2 (quinpirole, $n=12$) en triángulos claros (). El grupo con agonista D_3 (7-OH-DPAT, $n=18$) en triángulos oscuros () y el grupo con agonista D_4 (PD168077, $n=12$) en cuadros oscuros (). Los valores fueron normalizados y son expresados en promedio \pm SEM. (* $p < 0.05$).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

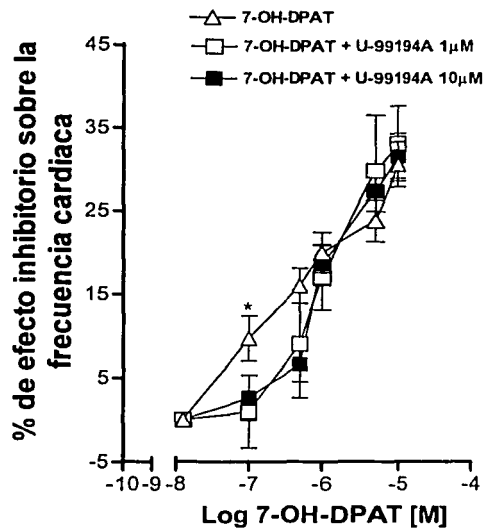


Figura 18. Curva dosis-respuesta que muestra el efecto inhibitorio sobre la frecuencia cardíaca del agonista selectivo del receptor D_3 , el (\pm)-7-OH-DPAT en ausencia y presencia de U-99194A un antagonista selectivo de los receptores D_3 . Como se observa en la gráfica el U-99194A revierte el efecto inhibitorio del (\pm)-7-OH-DPAT sobre la frecuencia cardíaca a concentración nanomolar. El efecto inhibitorio del agonista a concentración micromolar no es diferente en presencia del U-99194A. Los datos fueron normalizados y expresado en \pm SEM. * $p < 0.01$ comparado con su propio control.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

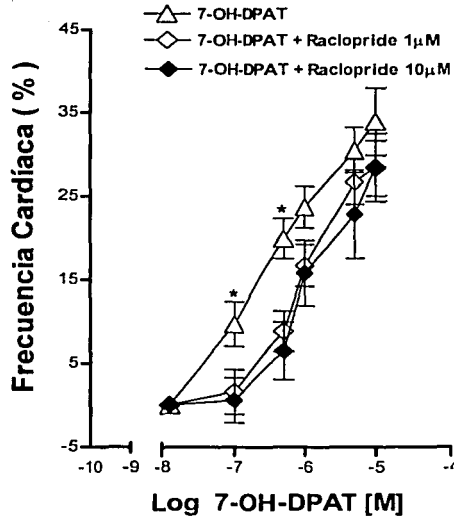


Figura 19. Curva dosis-respuesta que muestra el efecto inhibitorio sobre la frecuencia cardíaca del agonista selectivo del receptor D_3 , el (\pm)-7-OH-DPAT en ausencia y presencia de Raclopride un antagonista de los receptores D_2/D_3 . Como se observa en la gráfica el Raclopride fue capaz de bloquear el efecto inhibitorio del (\pm)-7-OH-DPAT sobre la frecuencia cardíaca. Sin embargo el efecto fue estadísticamente significativo solo a concentración nanomolar. Los datos fueron normalizados y expresado en \pm SEM. * $p < 0.01$ comparado con su propio control.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

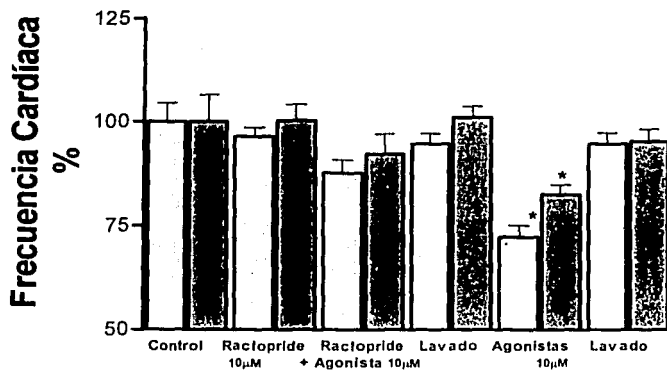


Figura 20. En la gráfica se muestra que el efecto cronotrópico negativo del agonista selectivo del receptor D_3 y D_4 , el 7-OH-DPAT y del PD 168 077 respectivamente, no fue revertido en presencia del antagonista de los receptores dopaminérgicos D_2/D_3 , el Raclopride (N.S.). Como puede observarse en ausencia del Raclopride el efecto cronotrópico negativo del 7 OH-DPAT se aprecia claramente. $P > 0.05$ con relación al control.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 5. Efectos de los agonistas de receptores dopaminérgicos de la familia D₂ sobre los parámetros hemodinámicos de función del corazón del cobayo

Parámetros	Valores Control	Quinpirole (10 ⁻⁵ M) (n=12)	(±)-7-OH- DPAT (10 ⁻⁵ M) (n=18)	PD-168 077 (10 ⁻⁵ M) (n=12)	(±)-7-OH-DPAT + PD 168 077 (10 ⁻⁵ M) (n=6)
Frecuencia Cardíaca (latidos/min)	240 ± 16 100 %	232 ± 24 96 % (↓ 4 %)	**176 ± 26 73 % (↓ 27 %)	*198 ± 18 82 % (↓ 18 %)	**170 ± 18 70 % (↓ 30 %)
Presión Sistólica Ventricular Izquierda (mmHg)	116 ± 12 100 %	106 ± 8 91 % (↓ 9 %)	*94 ± 9 82 % (↓ 18 %)	**80 ± 16 68 % (↓ 32 %)	**82 ± 14 70 % (↓ 30 %)
dP/dt max (mmHg/seg)	1800 ± 420 100 %	1760 ± 350 98 % (↓ 2 %)	1600 ± 560 88 % (↓ 12 %)	*1400 ± 320 74 % (↓ 26 %)	*1260 ± 500 70 % (↓ 30 %)

Los valores son el promedio ± S.E.M y son expresados en valores absolutos y normalizados (%). *p<0.01, **p<0.001

Con relación a los valores control.

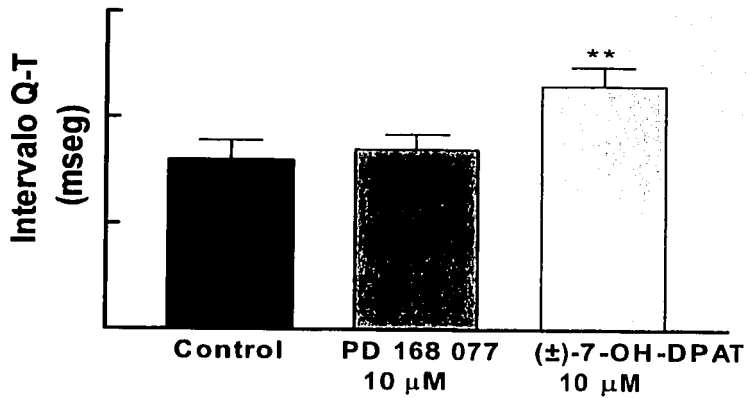


Figura 21. En la gráfica se muestra el efecto de los agonistas dopaminérgicos PD168 077 (D_4) y el 7-H-DPAT (D_3), en el intervalo Q-T del electrocardiograma. Como puede observarse solo el agonista D_3 induce una prolongación significativa del intervalo Q-T con relación al control, (** $p < 0.01$).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B).- Estudios electrofisiológicos en la actividad espontánea de la aurícula derecha de corazón de cobayo. Registro intracelular del potencial de acción.

Los resultados de estos protocolos experimentales se muestran en la tabla 5 y 6. Como puede observarse, es claro el efecto del agonista del receptor D_3 , el (\pm)-7-OH-DPAT en la duración del potencial de acción en la actividad espontánea de la aurícula derecha. La prolongación de la duración al 90 % fue aproximadamente del 20 %, en comparación con el registro control, lo que se correlaciona con el incremento en la duración del intervalo Q-T del electrocardiograma, que el fármaco induce en la preparación del Langendorff. También se aprecia la disminución en la frecuencia de disparo por efecto del fármaco. En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos en las preparaciones de músculo papilar del efecto del agonista selectivo del receptor D_3 , el (\pm)-7-OH-DPAT sobre la duración del potencial de acción en presencia de estimulación fija. Los resultados sugieren que independientemente de la frecuencia de disparo la probable activación de los receptores D_3 inducen una prolongación en la duración del potencial de acción.

TABLA 6. EFECTO DEL (\pm)-7-OH-DPAT EN LA DURACION DEL POTENCIAL DE ACCION DE AURÍCULA DERECHA CON ACTIVIDAD ESPONTANEA Y DEL MÚSCULO PAPILAR DEL VENTRICULO IZQUIERDO CON ESTIMULACION.

PARÁMETROS	CONTROL	CONTROL	7-OH-DPAT	7-OH-DPAT	LAVADO	LAVADO
	AD	MPVI	(10 μ M) AD	(10 μ m) MPVI		
Amplitud del PA (mV)	108.20 \pm 4.53	116 \pm 2.80	108.50 \pm 2.04	115.2 \pm 3.48	108.1 \pm 3.35	114.7 \pm 1.81
Duración al 50% del PA (mseg)	9.40 \pm 2.733	14 \pm 0.57	12.13 \pm 0.63 (10.76 % \uparrow)	16.33 \pm 7.88 * (14.92% \uparrow)	9.46 \pm 0.71	15.67 \pm 1.20
Duración al 90% del PA (mseg)	36.20 \pm 3.82	64.72 \pm 3.12	44.5 \pm 1.38 (23.11% \uparrow)	76.87 \pm 6.86 * (18.22% \uparrow)	37.91 \pm 2.79	68.60 \pm 5.53
Frecuencia cardiaca (latidos por minuto)	210.2 \pm 5.04		168 \pm 8.38 * (18.47% \downarrow)		193.3 \pm 5.59	
Potencial en reposo (mV)	70.00 \pm 2.15	90 \pm 3.16	90.00 \pm 0.13	90 \pm 1.16	70.00 \pm 0.12	90 \pm 4.16
PRA (mseg)		33.33 \pm 4.89	37.25 \pm 1.91 * (12.76% \uparrow)			38.19 \pm 6.07

Estos resultados muestran el promedio \pm el error estándar, n=6. PA: potencial de acción. PRA: período refractario absoluto

\uparrow = aumento, \downarrow = disminución. * p<0.05 con respecto a su control.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 7. EFECTO DEL PD 168 077 EN LA DURACION DEL POTENCIAL DE ACCION DE AURÍCULA DERECHA CON ACTIVIDAD ESPONTANEA Y MÚSCULO PAPILAR DEL VENTRICULO IZQUIERDO CON ESTIMULACION.

PARÁMETROS	CONTROL AD	CONTROL VI	PD 168 077 (10 µM) AD	PD 168 077 (10 µM) MPVI	LAVADO AD	LAVADO MPVI
Amplitud del PA (mV)	98.20 ± 4.53	118.20 ± 4.53	98.50 ± 2.04	116.50 ± 2.04	118.1 ± 3.3	118.1 ± 3.3
Duración al 50% del PA (mseg)	9.40 ± 2.733	9.40 ± 2.733	9.13 ± 0.63	12.13 ± 0.63 (14.76%↑)	9.46 ± 0.71	9.46 ± 0.71
Duración al 90% del PA (mseg)	36.20 ± 3.82	36.20 ± 3.82	34.5 ± 5.38 (6.11%↓)	46.5 ± 1.38 *(14.11%↑)	37.9 ± 2.7	37.9 ± 2.7
Potencial en reposo (mV)	70.0 ± 2.15	90.0 ± 2.15	70.0 ± 0.13	90.0 ± 0.13	70.0 ± 0.12	90.0 ± 0.12

Estos resultados muestran el promedio ± el error estándar, n=4. AI: Aurícula izquierda. MPVI: Músculo papilar del ventrículo izquierdo. PA: potencial de acción. PRA: período refractario absoluto ↑= aumento. ↓= disminución. * p<0.05 con respecto a su control.

3.- Actividad de Adenilato Ciclasa

Los resultados mostraron que el agonista del receptor D_3 , el (\pm)-7-OH-DPAT, no tiene efecto sobre la actividad de la AC, ni en aurícula derecha ni en ventrículo izquierdo; mientras que la producción del AMPc fue inhibida por el agonista D_4 , (PD 168 077), solo en el ventrículo izquierdo, un efecto dependiente de la concentración (10^{-9} a 10^{-5} M), siendo la inhibición máxima cercana al 40 % con la concentración máxima usada, 10^{-5} M. (Figura 17).

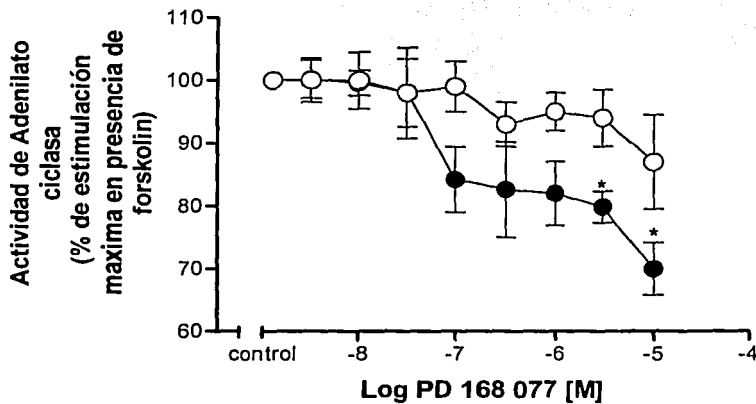


Figura 22. Efecto del agonista dopaminérgico D_4 (PD 168 077) sobre la actividad de la adenilato ciclasa. Se observa que solo en tejido del ventrículo izquierdo induce una disminución significativa en la actividad de la adenilato ciclasa. Los valores se expresan en porcentaje \pm el error estándar. * $p < 0.01$. AD: aurícula derecha. VI: ventrículo izquierdo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSION

Los resultados de los estudios de autorradiografía, western blot, electrofisiológicos y bioquímicos realizados en este proyecto de investigación, aportan evidencias de la presencia de receptores dopaminérgicos D_3 y D_4 en el corazón de cobayo, así como de su probable participación en las funciones de automatismo e inotropismo del mismo.

Los resultados de los estudios de autorradiografía y de western blot sugieren que los receptores dopaminérgicos D_3 y D_4 se encuentran expresados en aurícula derecha y ventrículo izquierdo del corazón de cobayo. A través de estudios electrofisiológicos y usando agonistas selectivos de los receptores dopaminérgicos D_3 y D_4 ((±)-7-OH-DPAT y PD 168 077 respectivamente, 10^{-8} a 10^{-5} M) se obtuvo información que sugiere que la activación de estos receptores inducen un efecto cronotrópico e inotrópico negativo en el corazón de la misma especie. Además también se evaluaron cambios en la producción de AMPc bajo el efecto de los mismos fármacos, encontrándose que solo el uso del agonista selectivo de los receptores D_4 , el PD 168 077 produce una disminución significativa de la producción de AMPc en el ventrículo izquierdo del corazón de cobayo.

Los resultados de autorradiografía y de western blot, obtenidos en este trabajo experimental son concordantes con los estudios previamente publicados en los cuales se demuestra la presencia de los receptores dopaminérgicos de la familia D_2 en corazón de humano y de rata, a través de estudios de unión con [3 H] Spiperone (Amenta y Cols., 1993; Ricci y Cols., 1998). Los mismos autores encontraron evidencias de que el subtipo D_4 era el que mayormente se encontraba expresado en aurícula derecha de humano y de rata (Amenta 1997; Rici y cols., 1998). Sin embargo la presencia de los receptores D_3 , así como los efectos de la activación de los receptores D_3 y D_4 en el corazón de mamífero, no han sido descritos previamente.

Los resultados de autorradiografía para los receptores dopaminérgicos de la familia D_2 y del subtipo D_4 son similares a los reportados por otros autores (*Amenta et al 1991, 1997, Ricci 1998*), aunque los ligandos marcados que se usaron fueron diferentes. Estudios previos realizados con la misma técnica de autorradiografía han usado como ligando radioactivo para los receptores dopaminérgicos al clozapine (*Amenta et al 1991, 1997, Ricci 1998*). El clozapine es un fármaco que ha tenido un amplio uso como antipsicótico y es bien conocida su pobre selectividad por los receptores dopaminérgicos. Existe información en la literatura de que el clozapine puede tener interacción con receptores alfa, beta adrenergicos, serotoninérgicos (*Bengston y Cols., 1998, Gioanni y Cols., 1998*). Por otro lado el [3H]-YM-09151-2 parece ser más selectivo para los receptores dopaminérgicos de la familia D_2 como ha sido reportado en otros estudios en los cuales se ha utilizado para caracterizar a estos receptores (*Lahti y cols., 1995*), razón por la que en nuestros protocolos de autorradiografía usamos este ligando. Para poder discriminar al receptor D_4 , el protocolo experimental de autorradiografía se realizó en presencia de raclopride el cual es un antagonista de los receptores D_2 y D_3 (*Protais y Cols., 1994*). El agonista selectivo (\pm)-7-OH-DPAT, (7-hidroxy-N,N-7(di-n-propyl)-2-aminotetralin), pertenece al grupo de las aminotetralinas (*Freedman y Cols., 1994, Levesque, 1996*) y ha sido ampliamente usado para caracterizar al subtipo de receptor dopaminérgico D_3 en diferentes tejidos del organismo (SNC, linfocitos, riñón) y solo ha sido reportado que puede unirse a los receptores sigma (*Schoemaker 1993*), razón por lo cual en nuestro protocolo experimental usamos un antagonista de estos receptores. El (\pm)-7-OH-DPAT es 7 veces más selectivo para los receptores D_3 que para los D_2 (*Sautel y Cols., 1995*). En estudios de unión en células de ovario de hamster chino transfectado (CHO), el [3H] 7-OH-DPAT se unió al receptor D_3 con una afinidad subnanomolar (K_d 0.8 nM), mientras que la afinidad por los receptores D_2 , D_4 y D_1 fue 100, 1000 y 10 000 menor, respectivamente (*Lévesque y Cols., 1992*). No esta

reportado que se una a otros receptores adrenérgicos. Por lo tanto los resultados obtenidos con este ligando sugieren un grado de confiabilidad con relación a la presencia de los receptores dopaminérgicos D_3 en los tejidos del corazón de cobayo. El hecho de que previamente no haya sido reportado en la literatura este resultado, probablemente esta en relación a que los ligandos usados en los otros estudios pueden unirse con todos los receptores dopaminérgicos de la familia D_2 (D_2, D_3 y D_4), sin poder discriminarlos.

Aunque los receptores D_3 y D_4 parecen estar localizado primordialmente en aurícula derecha nuestros datos sugieren que también se encuentran expresados en las otras cámaras cardíacas, así como en los grandes vasos arteriales (aorta y arteria pulmonar). Es de notar que la cantidad de fmol/mg de tejido es considerablemente bajo para estos receptores dopaminérgicos cuando se comparan con las cifras de otros receptores, reportados en el mismo órgano, como los receptores adrenérgicos (*Brodde y Michel 1999*). Sin embargo debe considerarse que los estudios de autoradiografía son más cualitativos que cuantitativos, que si bien nos permiten detectar la localización de los receptores, solo nos da una información muy general de la cantidad de los mismos. Para tener un concepto cuantitativo será necesario, realizar estudios de unión con ligandos radioactivos en membranas de tejidos cardíacos y con diferentes concentraciones del ligando, para poder determinar la B_{max} y K_D de estos receptores. Los datos para el receptor D_3 en aurícula derecha (4.5 fmol/mg de tejido húmedo) no fueron realmente bajos, comparados con los valores que se han reportado en núcleos accumbens (12 fmol/mg de tejido húmedo) y es alta en comparación con reportes previos en el núcleo caudo-putamen (*Flores y Cols., 1996, 1998*). Además existen varios reportes que sugieren un probable papel fisiológico del receptor D_3 en esas dos estructuras cerebrales (*Flores y Cols., 1999*). Finalmente aunque la densidad de expresión de los receptores dopaminérgicos parece ser baja en el corazón, esta puede ser suficiente para que el receptor dopaminérgico D_3 esté participando en la regulación de la frecuencia de disparo de las células cardíacas.

El análisis del Western blot también aportó evidencias para la presencia de los receptores D₃ y D₄ en aurícula derecha y en ventrículo izquierdo del corazón de cobayo. Los anticuerpos fueron dirigidos contra la región extracelular amino terminal del receptor D₃ y contra la región intracelular carboxilo terminal del receptor D₄, los cuales no tienen reacción cruzada entre ellos, ni con los receptores D₁, D₂ y D₅ (*Santa Cruz Biotechnology, Inc*).

Los resultados fisiológicos muestran que la activación de los receptores D₃ con el agonista selectivo (±)-7-OH-DPAT, induce un claro efecto cronotrópico negativo dependiente de la dosis administrada. Nuestros resultados sobre la frecuencia cardíaca fueron estadísticamente significativos desde concentraciones nanomolares (10^{-7} M), apoyando el concepto de que los efectos fueron mediados a través del receptor D₃ (*Devoto Cols., 1995, Clos y Clos., 1997, García-Sanz y Cols., 2001, Sotnikova y Cols., 2001*). Estos resultados son consistentes con reportes previos acerca del papel funcional de los receptores D₃ en la actividad de las neuronas (*Kreiss y Cols., 1995, Lejeune y Millan, 1995*). Usando (±)-7-OH-DPAT, la activación de los receptores D₃ en el *núcleo accumbens*, área ventral tegmental y *substancia nigra pars compacta* produjo una inhibición del disparo de las células (*Kreiss y Cols., 1995*). De acuerdo a estos resultados, un efecto inhibitorio sobre la frecuencia de disparo de las células cardíacas por activación del receptor D₃, podría explicar el efecto cronotrópico negativo que induce el (±)-7-OH-DPAT en el corazón de cobayo. El efecto cronotrópico negativo del (±)-7-OH-DPAT disminuyó en presencia de raclopride (antagonista D₂/D₃) y el U-99194A (antagonista selectivo del receptor D₃) en concentraciones de 1 y 10 μ M. El U-99194A revirtió el efecto inhibitorio del (±)-7-OH-DPAT, sobre la frecuencia cardíaca únicamente a concentraciones nanomolares, mientras que Raclopride fue capaz de bloquear el efecto inhibitorio del (±)-7-OH-DPAT a concentraciones nanomolar y micromolar. Sin embargo el efecto fue significativo estadísticamente solo a concentraciones nanomolar. Estos resultados sugieren que el (±)-7-OH-

DPAT induce el efecto inhibitorio sobre la frecuencia cardiaca probablemente a través de dos mecanismos. Un mecanismo directo a través de activación de receptores D_3 , ya que el efecto se produjo a concentraciones nanomolar y fue revertido por el U-99194A. Otro probable mecanismo no mediado por receptores dopaminérgicos ya que el efecto inhibitorio del (\pm)-7-OH-DPAT sobre la frecuencia cardiaca a concentraciones micromolar no fue posible revertirlo con el U-99194A.

El quinpirole, agonista de los receptores de la familia D_2 (D_2/D_3), también produjo una disminución en la frecuencia cardiaca. Sin embargo el efecto cronotrópico negativo inducido por el quinpirole no fue dependiente de la dosis y solo se observó a concentraciones nanomolar. Ya que el efecto cronotrópico negativo del quinpirole fue revertido en presencia de raclopride, probablemente este efecto esta siendo mediado también por receptores D_3 .

La probable activación de los receptores D_4 , con el uso del agonista PD 168 077 también produjo un efecto cronotrópico negativo, sin embargo este efecto fue menor comparado con el efecto inducido con (\pm)-7-OH-DPAT, ya que los cambios solo fueron significativos a concentraciones micromolares. Estos datos sugieren que ambos agonistas inducen activación del mismo receptor pero con diferente afinidad. De acuerdo con esto el efecto cronotrópico negativo inducido con el PD 168 077 también fue bloqueado en presencia de Raclopride, apoyando la idea de que el PD 168 077 interactúa con receptores D_3 . Varios estudios han demostrado que el (\pm)-7-OH-DPAT, activa selectivamente a los receptores D_3 con dosis similares a las usadas en el presente estudio (*Levesque y Cols., 1992, 1996, Shoemaker y Cols., 1993, Schwartz y Cols., 1993, Sautel y Cols., 1995*). Sin embargo hay pocos estudios que apoyen que el PD 168 077 es agonista selectivo para los receptores D_4 (*Glase S., 1997, Clifford J. y Waddington J.L. 2000*). Hasta este momento y en ausencia de agonistas más selectivos para los receptores D_4 , nuestros resultados sugieren que el PD 168 077 induce activación de los receptores D_3 y D_4 .

Con el uso del agonista del receptor D_4 , el PD 168 077 se observó un efecto inotrópico negativo predominante. En contraste solo altas concentraciones del (\pm)-7-OH-DPAT fueron capaces de reducir la dP/dt_{max} . El efecto inotrópico negativo inducido por el PD 168 077 no fue posible revertirlo con el uso de antagonistas de los receptores D_4 , como el L-750 y el clozapine, ni tampoco con Raclopride, ni con el U-99194A. Por lo que estos resultados necesitan ser confirmados con antagonistas más selectivos de los receptores D_4 cuando estén disponibles.

En acuerdo con nuestros resultados, la activación de los receptores D_3 no producen cambios en los niveles de AMPc (Freedman y Cols., 1994; Tang y Cols., 1994, MacKenzie y Cols., 1994, Aretha y Galloway, 1996). Varios reportes científicos realizados en diferentes líneas celulares que expresan receptores D_3 sugieren que estos receptores pueden no estar acoplados al sistema de proteínas G membranal (Levesque y Cols., 1992, Freedman y Cols., 1994, Tang y Cols., 1994, MacKenzie y Cols., 1994, Shafer y Levant, 1998). Sin embargo existen reportes de que hay una variedad de señales de transducción activados por los receptores D_3 que incluyen la estimulación y/o inhibición en la actividad de la AC (Chio y Cols., 1994a, Potenza y Cols., 1994, McAllister y Cols., 1995). Otros estudios que indican que los agonistas de los receptores D_4 pueden inhibir la producción de AMPc, la incubación de tejido de ventrículo izquierdo con PD 168 077 se asoció a una disminución significativa del contenido de AMPc (Chio y Cols., 1994b, Tang y Cols., 1994, Missale y Cols., 1988). El efecto inotrópico negativo que induce el PD 168 077 en el corazón aislado del cobayo, podría ser explicado a través de un efecto directo en los miocitos cardíacos. Es probable que el receptor D_4 esté acoplado en forma negativa a la adenilato ciclasa, explicando la inhibición en la producción del AMPc observada en nuestros estudios.

Además de estudiar la frecuencia cardíaca, la presión ventricular izquierda y la dP/dt_{max} , otro parámetro que evaluamos en este estudio fue la actividad eléctrica del corazón a través del electrocardiograma, bajo la influencia de los agonistas de los receptores D_3 y D_4 . La conducción

eléctrica se midió a nivel auriculo-ventricular (intervalo P-R) y ventricular (intervalo Q-T). La activación de los receptores D_3 con el agonista (\pm)-7-OH-DPAT causó una significativa prolongación en el intervalo Q-T (160 ± 12 mseg a 230 ± 18 mseg, $p < 0.01$) sin cambios en el intervalo P-R. En apoyo a estos resultados la prolongación del intervalo Q-T se relacionó con la prolongación significativa en la duración del potencial de acción observado en la aurícula derecha con automatismo y en la aurícula izquierda con marcapaso del corazón de cobayo con el uso del mismo agonista (7-OH-DPAT, 10^{-5} M). En contraste el uso del agonista de los receptores D_4 no produjo cambios significativos en los intervalos P-R ni Q-T del electrocardiograma, sugiriendo que no tiene efectos en la conducción auriculo-ventricular ni en la repolarización ventricular.

Los mecanismos a través de los cuales la activación de los receptores D_3 induce un efecto cronotrópico negativo e incrementa la repolarización ventricular no es posible explicarlo en el momento actual. Los receptores de la familia D_2 se encuentran localizados en las terminales nerviosas simpáticas en los tejidos periféricos en donde ellos pueden modular la liberación de noradrenalina (Ricci y Cols., 1994, Missale y Cols., 1988, Foucart y Cols., 1988, Felder y Cols., 1989, Dlewati y Cols., 1989, Amenta F., 1997). De hecho ha sido demostrado que el uso de agonistas de los receptores de la familia D_2 en tejido auricular derecho de humanos (quinpirole y propilnorapomorphine) producen una inhibición en la liberación de noradrenalina (Rump y Cols., 1995, Abadie y Cols., 1996). La participación de este mecanismo en el efecto cronotrópico negativo inducido por el (\pm)-7-OH-DPAT requiere ser explorado y confirmado por otros estudios experimentales.

Receptores Dopaminérgicos en corazón de mamífero. Implicaciones futuras

La demostración de la presencia de los receptores dopaminérgicos D_3 y D_4 en el corazón de mamífero abre un amplio campo de investigación para conocer la participación que puedan tener estos receptores en las funciones de automatismo, conducción y contracción del mismo en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas. La participación de un sistema de transmisión dopaminérgica dentro de los mecanismos que regulan las funciones del corazón de mamífero ha sido sugerida previamente, los resultados obtenidos en este trabajo experimental apoyan su existencia y expande el campo de investigación en esta área lo que ofrece nuevas alternativas para explicar los mecanismo de regulación de la frecuencia cardiaca por ejemplo, así como probables nuevas alternativas terapéuticas en diversos procesos fisiopatológicas cardíacos en los cuales podrían estar participando los receptores dopaminérgicos.

Dentro del proceso de continuidad de este proyecto de investigación quedan aun varias preguntas por contestar:

- 1- ¿Cuáles son las características farmacológicas de los agonistas selectivos (7-OH-DPAT y PD 168 077) de los receptores dopaminérgicos D_3 y D_4 en los tejidos cardíacos?
- 2- ¿Los receptores dopaminérgicos D_3 y D_4 están localizados en las terminales nerviosas simpáticas cardíacas y/o en los miocitos?
- 3- ¿La activación de los receptores dopaminérgicos D_3 y D_4 influye en la liberación de noradrenalina de las terminales nerviosas simpáticas, como ha sido demostrado en otros tejidos?
- 4- ¿Cuál es la señal intracelular o el mecanismo de acción que se activa por el receptor dopaminérgico D_3 en los tejidos cardíacos y que explicarían sus efectos electrofisiológicos?

5- ¿Se alteran y/o modifican los receptores dopaminérgicos D_3 y D_4 , en su expresión y/o su función en los procesos fisiopatológicos cardiacos como la insuficiencia cardiaca, cardiopatía hipertensiva y cardiopatía isquémica?

6- ¿La manipulación farmacológica de los receptores dopaminérgicos D_3 y D_4 , modifica el desarrollo de procesos fisiopatológicos cardiacos como la insuficiencia cardiaca, cardiopatía hipertensiva, y cardiopatía isquémica?

La contestación de estas preguntas nos permitirá tener un mayor conocimiento y entendimiento acerca de cómo los receptores dopaminérgicos D_3 y D_4 participan en la regulación de las funciones del corazón de mamífero, en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas como en la insuficiencia cardiaca, cardiopatía hipertensiva, y cardiopatía isquémica en donde es probable que los receptores dopaminérgicos estén involucrados.

CONCLUSIONES

Los resultados de los estudios de autoradiografía, electrofisiológicos - farmacológicos y bioquímicos realizados demuestran:

- I- La presencia anatómica y funcional del receptor D_3 y D_4 en el corazón aislado del cobayo.
- II- La activación de los receptores dopaminérgicos D_3 , a través del agonista selectivo (\pm)-7-OH-DPAT, inducen un efecto cronotrópico negativo, efecto que no esta siendo mediado por inhibición en la producción de AMPc y esta asociado a un incremento significativo en la repolarización ventricular.
- III- La activación de los receptores dopaminérgicos D_4 , a través del agonista selectivo PD 168 077, induce un efecto cronotrópico negativo moderado sin modificar la repolarización ventricular. El efecto predominante fue el inotrópico negativo, efecto que esta asociado a una inhibición significativa en la producción de AMPc en tejido de ventrículo izquierdo.

Resultados de este estudio han sido publicados y presentados en congresos nacionales e internacionales.

Publicación

1. - Gómez MJ, Rousseau G, Nadeau R, Berra R, Flores G and Suarez J: Functional and Autoradiographic characterization of Dopamine D₂-like receptor in the guinea pig Heart. Canadian J Physiol and Pharmacol (en impresión).

Resúmenes a Congresos

1.- Berra R, Gordillo L, López-López G, Suárez J, Shiravastava L.K. Florez G and **Gómez MJ**. Dopamine D₃ receptors: Anatomic distribution and functional role. XXI Meeting of the American Section of the International Society for Heart Research. San Diego CA, 9-12 June, 1999.

2.- **Gómez M.J.**¹ Cuellar M^{1*}, Franco M^{3*} and Hernández V^{2*}. Dopamine D₃ receptor in normal and hypertrophy cardiac tissues of rat: Electrophysiology study. ¹Instituto de Fisiología. Universidad Autónoma de Puebla. ²Depto. Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV, IPN. ³Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". México. Aceptado para presentación oral en el XLIV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas a efectuarse del 26-30 de agosto del 2001 en Monterrey, Nuevo León. México.

3.- **Gómez MJ**¹, Berra R¹, Suárez J³, Rousseau G², Nadeau R² and Flores G¹. Functional and autoradiographic characterization of dopamine D₂ family receptors in the guinea pig heart. ¹Instituto de Fisiología, Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Puebla, MEXICO; ²Centre de Recherche, Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal, Université de Montréal. ³Escuela Superior de Medicina-IPN. México, D.F. MEXICO. XXII Congreso Nacional de Cardiología, Cancún del 18 al 22 de Noviembre del 2001.

REFERENCIAS

Abadie C., Foucart S., Pagé P. y Nadeau R. (1996). Modulation of noradrenaline release from isolated human atrial appendages. *J. Autonom. Nervous System.* 61:269-276.

Amenta F., Ferrante F., Rossodivita A. y Ricci A. (1992). Pharmacological characterization and autoradiographic localization of dopamine receptors in human epicardial arteries. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 263:1447-1453.

Amenta F., Gallo P., Rossodivita A. y Ricci A. (1993). Radioligand binding and autoradiographic analysis of dopamine receptors in the human heart. *Nauny-Schmiedberg's Pharmacol.* 347:147-154.

Amenta F. (1997). Light microscope autoradiography of peripheral dopamine receptor subtypes. *Clin. Exp. Hypertens.* 19:27-41.

Andersen H. P., Gingrich A. J., Bates D. M., Deary A., Falardeau P., Senogles E. S. y Caron G. M. (1990). Dopamine receptor subtypes: beyond the D_1/D_2 classification. *TIPS.* 11:231-236.

Aretha Ch.W. and Galloway M.P. (1996) Dopamine autoreceptor reserve in vitro: possible role of dopamine D_3 receptors. *Eur J Pharmacol* 305:119-122.

Asico L.D., Ladines C., Fuchs S., Accili D., Carey R.M., Semeraro C., Pocchiari F., Felder R.A., Eisner G.M., Jose P.A. (1998): Disruption of the dopamine D3 receptor gene produces renin-dependent hypertension. *J Clin. Invest*, 102:493-498.

Bengston H.J, Kullberg A., Millan M.J., Hjorth S (1998): The role of 5-HT 1 A autoreceptors and alpha 1-adrenoreceptors in the modulation of 5-HT release—III. Clozapine and the novel putative antipsychotic S 16924. *Neuropharmacology* 37(3):349-356

Berkowitz A. (1983). Dopamine and dopamine receptors as target sites for cardiovascular drug action. *Federation Proceedings*. 42:3019-3021.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72, 248.

Brodde O., Inui J., Motomura S. y Schumann H. (1980): The model of direct action of dopamine on the rabbit heart. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2:567-582.

Brodde O-E (1982) Vascular dopamine receptors: Demonstration and characterization by in vitro studies. *Life Sci* 31:289-306

Brodde O-E and Michel C.M. (1999): Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacological Reviews* 51:651-689.

Brown L., Lorenz B. y Erdmann E. (1985). The inotropic effects of dopamine and its precursor levodopa on isolated human ventricular myocardium. *Klin Wochenschr.* 63:1117-1123.

Bunzow J.R., Van Tol H.H., Grandy D.K., Albert P., Salon J., Christie M., Machida C.A., Neve K.A., Civelli O. (1988) Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature* 336:783-787.

Camsonne R. (1987) Dopamine receptors in brain and periphery: some prospects. *Neurochem Int* 10:35-37.

Cavero I (1982): Effects of pergolide, a dopamine receptor agonist and clonidine on cardiovascular responses evoked by activation of peripheral sympathetic outflow in rats. *Clin and Exper Hypertension* 2:221-233.

Chio C.L, Lajiness M.E. and Huff R.M. (1994a) Activation of heterologously expressed D₃ dopamine receptors: comparison with D₂ dopamine receptors. *Mol Pharmacol* 45:51-60.

Chio C.L, Drong R.F., Riley D.T., Gill G.S., Slightom J.L. and Huff R.M. (1994b) D₄ dopamine receptor-mediated signaling events determined in transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 269:11813-11819.

Chung F.Z., Wang c.D., Potter P.C., Venter J.C., and Fraser C.M. (1988): Site-directed mutagenesis and continuous expression of human β adrenergic receptors: identification of a conserved aspartate residue involved in agonist binding and receptor activation. *J. biol. Chem.* 262:4052-4055.

Civelli O., Bunzow J.R., Grandy D.K., Zhou Q.Y. and Van Tol H.V.M. (1991): Molecular biology of the dopamine receptors. *Eur J Pharmac* 207:277-286.

Civelli O., Bunzow R. J. and Grandy K. D. (1993) Molecular diversity of the dopamine receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:281-307.

Clark D. and White F.J. (1987) Review: D₁ dopamine receptor-the search for a function: a critical evaluation of the D₁/D₂ dopamine receptors classification and its functional implications. *Synapse* 1:347-388.

Clifford J.J. and Waddington J.L. (2000) Topographically based search for an "Ethogram" among a series of a novel D(4) dopamine receptor agonist and antagonists. *Neuropsychopharmacology* 22:538-544.

Clos M.V., García-Sanz A., Vivas N.M.& Badia A (1997). D₂ dopamine receptors and modulation of spontaneous acetylcholine (Ach) release from rat striatal synaptosomes. *Br J Pharmacol* 122:286-290.

Cooper D.M., Bier L.C., Halford M.K., Ahlijanian M.K. and Zahniser N.R. (1986): Dopamine, acting through D-2 receptors, inhibits rat striatal adenylate cyclase by a GTP-dependent process. *Molec Pharmac* 29:113-119.

Cote T.E., Grewe C.W. and Keabian J.W. (1981): Stimulation of a D-2 dopamine receptor in the intermediate lobe of the rat pituitary gland decreases the responsiveness of the beta-adrenoceptor: biochemical mechanism. *Endocrinology* 108:420-426.

Coward D.M. (1992): General pharmacology of clozapine. *British Journal of Psychiatry, Suppl* 17:5-11.

Devoto P., Collu M., Muntoni A., Pistis M., Serra G., Gessa G., Diana M. (1995). Biochemical and electrophysiological effects of 7-OH-DPAT on the mesolimbic dopaminergic system D₂ dopamine receptors and modulation of spontaneous acetylcholine (Ach) release from rat striatal synaptosomes. *Synapse* 20:153-155

Dlewati A., Watkins H.O., Lokhandwala M.F. (1989) Effects of SKF& 85174, a DA-1/DA-2 receptor agonist, on pre- and postganglionic sympathetic neurotransmission to the heart. *Eur J Pharmacol* 164:2, 197-203.

Dohlman H.G., Caron M.G. and Lefkowitz R.J. (1987): A family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Biochemistry* 26: 2657-2664.

Döring J. H. y Dehnert H. (1988). The isolated perfused heart. Biomesstechnik-verlag March GmbH, D-7806 March, West Germany 1st English Edition.

Duncker D.J., Van Meegen J.R., y Verdoun P.D. (1997): Cardiovascular actions of the dopamine receptor agonist Z10446 in swine. *Cardiovasc Drugs Ther* 11:537-545.

Felder R.A, Felder C.C., Eisner G.M. and José P.A. (1989). The dopamine receptor in adult and maturing kidney. *Am J Physiol* 257:F315-327.

Fillenz Marianne. Noradrenergic neurons. Cambridge University Press.1990 page 1-45.

Flores G., Barbeau D. G., Quirion R. and Srivastava L. K. (1996) Decreased binding of dopamine D3 receptors in limbic subregions after neonatal bilateral lesion of rat hippocampus. *J Neurosci.* 16:2020-2026.

Flores G., Wood GK., Barbeau D., Quirion R. and Srivastava L. K. (1998) Lewis and Fisher rats: a comparison of dopamine transporter and receptors levels. *Brain Res.* 814:34-40.

Flores G., Liang J-J., Sierra A., Martínez-Fong D., Quirion R., Aceves J. and Srivastava L. K. (1999) Expression of dopamine receptors in the subthalamic nucleus of the rat: characterization using reverse transcriptase-polymerase chain reaction and autoradiography. *Neurosci.* 91:549-556.

Foucart S., Lacaille-Belanger P., Kimura T.R., Nadeau R., and Champlain de J. (1988). Modulation of adrenal catecholamine release by DA₂ dopamine receptors in the anesthetized dog. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 15:601-611.

Francis S. (1995). Receptor systems involved in norepinephrine release in heart failure: focus on dopaminergic systems. *Clin. Cardiol.* 18:1-13- 1-16.

Freedman S.B., Patel S., Marwood R., Emms F., Seabrook G.R., Knowles M.R. and McAllister G. (1994) Expression and pharmacological characterization of the human D₃ dopamine receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, 286:417-426.

Fuder H. and Muscholl E. (1978). The effect of dopamine on the overflow of endogenous noradrenaline from the perfused rabbit heart evoked by sympathetic nerve stimulation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 305:108-115.

Steve Watson y Steve Arkininstall. (1994): The G-protein linked recptor. Facts books. Academic Press

Ganguly P.K., Mukherjee K., Sahai A (1992): Altered renal dopamine receptors during development of cardiac hypertrophy. *Am J of Physiol* 262:E569-E573.

Ganguly P.K., Mukherjee K., Sahai A (1995): Renal dopamine receptors are involved in the development of cardiac hypertrophy. *Mol Cell Biochem* 144:81-84

García-Sanz A., Badia A., and Clos M.V. (2001). Differential effect of quinpirole and 7-OH-DPAT on the spontaneous [³H]-Dopamine efflux from rat striatal synaptosomes. *Synapse*, 40:65-73.

Gingrich J.A. and Caron M.G. (1993): Recent avances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annu Rev Neurosci* 16:299-321.

Gioanni Y., Thierry A.M., Glowinski J., y Tassin J.P. (1998): Alpha1- adrenergic, D1, and d2 receptora interactions in the prefrontal cortex: implications for the modality of action of differents types of neuroleptics. *Synapse* 30:362-370.

Giros B., Sokoloff P., Martres M.P. Riou J.F., E morine L.J. and Schwartz J.C. (1989) Alternative splicing directs the expression of the two D2 dopamine receptors isoforms. *Nature* 342:923-926.

Glase S. (1997) substituted [(4-Phenylpiperazinyl)-methyl]benzamides: selective dopamine D₄ agonist. *J Med Chem* 40:1771-1771.

Goldberg I. y Whitsett L. (1971). Cardiovascular effects of levodopa. *J. Amr. Med. Assoc.* 218:1921-1923.

Goldberg I. (1972). Cardiovascular and renal actions of dopamine: potential clinical applications. *Pharmacological Reviews*. 24:1-29.

Goldgerg I. L., Paul H. V. y Kohil D. J. (1978). A comparison of the vascular dopamine receptor with other dopamine receptors. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 18:57-79.

Goldberg I. L. y Kohlr D. J. (1983). Peripheral dopamine receptors: a classification based on potency series and specific antagonism. TIPS. 64-66.

Goldberg I. L. y Rajfer I. S. (1985). Dopamine receptors: applications in clinical cardiology. Circulation. 72(2):245-248.

Grandy D.K., Litt M., Allen J.R., Bunzow J.R., Marchionni M. A., Makam H., reed L., Magenis R.E., and Civelli O (1989). The human dopamine D2 receptor gene is located on chromosome 11 at q22-23 and identifies a Taq RFLP. Am. J. Hum. Genet. 45:778-785.

Habuchi Y., Ling-Ling L., Komori T., Okamoto S., Nishimura M., Morikawa J. y Yoshimura M. (1995). Does dopamine act on myocardial cells? Hypertens Res. 18:S157-S159.

Habuchi Y., Tanaka H., Yamamoto T., Komori T., Nishio M y Yoshimura M (1997a). The mechanisms underlying heart stimulatío by dopamine, with special reference to direct and indirect β adrenoceptor stimulation. Clin. Exper. Hypertension. 19:141-154.

Habuchi Y., Tanaka H., Nishio M., Komori T., Morikawa J. y Yoshimura M. (1997b). Dopamine stimulation of cardiac β -adrenoreceptros: the involvement of sympathetic amine transporters and the effect of SKF38393. J. Pharmac. 122:1669-1678.

Hilditch A. y Drew G. M. (1985). Peripheral dopamine receptor subtypes- a closer look. TIPS. 396-400.

Holmes C. J. y Fowler O. N. (1962). Direct cardiac effects of dopamine. Circ. Res. 10:68-72.

Holzer J., Karliner S. J., O'rouke A. R., Pitt W. y Ross J. (1973). Effectiveness of dopamine in patients whit cardiogenic shock. Am. J. Cardiology. 32:79-83.

Horn A.S., Cuello A.C. and Miller R.J., (1974) Dopamine in the mesolimbic system of the rat brain: endogenous levels and the effects of drugs on the uptake mechanism and stimulation of adenylate cyclase activity. J Neurochem 22:265-270.

Jackson M. y Westlind-Danielsson A. (1994). Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspect. Pharmac. Ther. 64:291-369.

Jose P.A., Eisner GM, Drago J., Carey R.M., Felder R.A.(1996): Dopamine receptor signaling defects in spontaneous hypertension. Am J Hypertens 9;4 Pt 1:400-405

José Pedro A., Eisner G.M. and Felder R. (1998): Renal dopamine receptors in health and hypertension. Pharmacol Ther. 80,149-182

Kebabian J. W., Petzold G.L., and Greengard P. (1972): Dopamine-sensitive adenylate cyclase in caudate nucleus of rat brain and its similarity to the dopamine receptor. Proc Natl Acad. Sci. U.S.A. 69: 2145:2149.

- Kebabian J. W. and Calne D. B. (1979): Multiple receptors for dopamine. *Nature*. 277:93-96.
- Kopia A.G. and Valocik E.R. (1989) Demonstration of specific dopamine-1 receptor-mediated coronary vasodilation in the anesthetized dog. *J Pharmacol Exp Ther* 248:215-221.
- Kreis DS., Bergstrom DA., Gonzalez AM., Huang K-X., Sibley DR., and Walters JR. (1995) Dopamine receptors agonist potencies for inhibition of cell firing correlate with dopamine D₃ receptor binding affinities. *Eur J Pharmacol* 277:209-214.
- Lahti RA, Roberts RC, Tamminga CA (1995): D-2 family receptor distribution in human postmortem tissues: an autoradiography study. *Neuroreport* 6;18:2505-2512
- Lazareno S., Marriott D.B. and Nahorski S.R. (1985) Differential effect of selective and non-selective neuroleptics on intracellular and extracellular cyclic AMP accumulation in rat striatal slices. *Brain Res* 361:91-98.
- Lejeune F. and Millan MJ. (1995) Activation of dopamine D₃ autoreceptors inhibits firing of ventral tegmental dopaminergic neurons in vivo. *Eur J Pharmacol* 275:R7-R9.
- Lévesque D, Diaz J, Pilon C, Martres MP, Giros B, Souil E, Schott D, Morgat JL, Schwartz JC, Sokoloff P. (1992): Identification, characterization and localization of the dopamine D₃ receptor in rat brain using 7-[³H]hydroxy-N,N-di-n-propyl-2-aminotetralin. *Proc Natl Acad Sci USA* 89;17:8155-8159.

Lévesque D. (1996): Aminotetralin drugs and D3 receptor functions. What may partially selective D3 receptor ligands tell us about dopamine D3 receptor functions?. *Biochem Pharmacol* 4:511-518.

Lokhandwala F. M. y Jandhyala S. B. (1979). The role of sympathetic nervous system in the vascular actions of dopamine. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 210:120-126.

Lokhandwala F. M., Watkins O. H., Sabouni H. M. y Alkadhi A. K. (1985). Pharmacological analysis of the actions of SKF 82526 on cardiovascular dopamine receptors. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 234:337-344.

MacKenzie R.G., Van Leeuwen D., Pugsley T.A., Shih Y.H., Demattos S., Tang L., Tood R.D. and O'Malley K.L. (1994) Characterization of the human dopamine D₃ receptor expressed in transfected cell lines. *Eur J Pharmacol* 266:79-85.

McAllister G.M., Knowless M.R., Ward-Booth S.M., Sinclair H.A., Patel S., Marwood R., Emms F., Smith A., Seabrook G.R. and Freedman S.B. (1995) Functional coupling of human D₂, D₃, D₄ dopamine receptor in HEK293 cells. *J Receptor Signal Transduction Res* 15:267-281.

Martínez-Mir, Morales Olivas F.J., Rubio E. (1987): The lack of the effect of DA-1 and DA-2 dopamine agonist on the isolated guinea-pig atria. *J Auton Pharmacol* 7: 111-117.

McDonald R. H. y Goldberg L. I. (1963). Analysis of the cardiovascular effects of dopamine in the dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 140:60-66.

Missale C., Castelletti L., Mema M., Carruba O. M. y Spano P. (1988). Identification and characterization of postsynaptic D₁ and D₂ dopamine receptors in the cardiovascular system. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 11:643-650.

Missale C., Nash R. S., Robinson W. S., Jaber M. y Caron G. M. (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* 78(1):189-225.

Mugelli F. L., Torrini M. L. y Maccioni T. (1977). Studies on the positive inotropic effect of dopamine in the guinea-pig heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 301:49-55.

O'Malley K.L., Harmon S., Tang L., y Todd R.D (1992): The rat dopamine D4 receptor sequence gene structure and demonstration of expression in the cardiovascular system. *New Biologist* 4:137-146.

Osborne W., Wanger J. y Willems W. (1971). The cardiovascular pharmacology of L (-)-DOPA: peripheral and central effects. *J. Phar. Exp. Ther.* 178:517-528.

Ozono R., O'Connell P., Vaughan C., Botkin J. S., Walk F. S., Felder A. R. and Carey M. R. (1996) Expression of the subtype 1A dopamine receptor in the rat heart. *Hypertension* . 27:693-703.

Ozono R., O'Connell P. D., Wang Q.Z., Moore F. A., Sanada H., Felder A. R. and Carey MR. (1997) Localization of the dopamine D₁ receptor protein in the human heart and kidney. *Hypertension.* 30(3):725-729.

Potenza M.N., Graminski G.F., Schmauss C. and Lerner M.R. (1994) Functional expression and characterization of human D2 and D3 dopamine receptors. *J Neurosci* 14: 1463-1476.

Prinssen E.P., Ellenbroek B.A., y Cools A.R. (1994): Combined antagonis of adrenoceptors and dopamine and 5-HT receptors underlies the atypical profile of clozapine. *Eu J Pharmacol* 262:167-170.

Privitera J. P., Loggie M.J. y Gaffney E. T. (1969). A comparison of the cardiovascular effects of biogenic amines and their precursors in newborn and adult dogs. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 166:293-298.

Protais P, Chagraoui A, Arbaoui J, Mocaër E (1994): Dopamine receptor antagonists properties of S 14506, 8-OH-DPAT, raclopride and clozapine in rodents. *Eur J Pharmacol* 271;1:167-177.

Ricci A., Collier L. W. y Amenta F. (1994). Pharmacological characterization and autoradiographic localization of dopamine receptors in the portal vein. *J. Auton. Pharmacol.* 14: 61-68.

Ricci A., Bronztti E., Fedele F., Ferrante F., Zaccheo D. y Amenta F. (1998). Pharmacological characterization and autoradiographic localization of a putative dopamine D4 receptor in the heart. *J. Auton. Pharmacol.* 18(2):115-21.

Rump C. L., Knorrenshild R. G., Schwertfeger E., Bohmann C., Spillner G. y Schollmeyer P. (1995). Dopaminergic and α -adrenergic control of neurotransmission in human right atrium. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 26(3):462-470.

Saito I., Hasegawa C., Iwaida Y., Yamakawa H., Saruta T., Takeshita E., Nagano S. y Sekihara T. (1991). Effect of L-dopa in Young patients with hypertension. *Angiology. Journal of Vascular Disease.* 691-695.

Sandrini M., Benelli A y Baraldi M (1984): Dopamine receptors in the guinea pig heart. A binding study. *Life Sci* 35:1839-1849.

Sautel F., Griffon N., Levesque D., Pilon C., Schwartz J.C., Sokoloff P. (1995) A functional test identifies dopamine agonist selective for D_3 versus D_2 receptors. *Neuroreport* 6:329-332.

Schoemaker H. (1993) [3 H] 7-OH-DPAT labels both dopamine D_3 receptors and sigma sites in the bovine caudate nucleus. *Eur J Pharmacol* 242;3:R1-R2

Schuelke M. D., Mark L. A., Schmid G. P. y Eckstein W. J. (1970). Coronary vasodilatation produced by dopamine after adrenergic blockade. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 176:320-327.

Schwartz J., Levesque D., Martes P. M. and Sokoloff P. (1993) Dopamine D_3 receptor: basic and clinical aspects. *Clinical Neuropharmacology.* 16:295-314.

Semeraro C, Marchini F, Ferlanga P, Masotto C, Morazzoni G, Pradella L, Pocchiari F (1997): The role of dopaminergic agonist in congestive heart failure. *Clin Exp Hypertens* 19:1-2:201-215

Setler E. P., Pendleton G. R. y Finlay E. (1975). The cardiovascular actions of dopamine and the effects of central and peripheral catecholaminergic receptor blocking drugs. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 192(3):702-711.

Shafer R.A. and Levant B. (1998) The D₃ dopamine receptor in cellular and organismal function. *Psychopharmacology* 135:1-16.

Solomon Y., Londos C. and Rodbell M. (1974) A highly sensitive adenylate cyclase assay. *Annal Biochem* 58, 541.

Sokoloff P., Martres P. M., Giros B., Bouthenet L. M. y Schwartz C. J. The third dopamine receptor (D₃) as a novel target for antipsychotics. (1992). *Biochemical Pharmacol.* 43(4):659-666.

Sotnikova T.D., Gainetdinov R.R., Grekhova T.V., Rayevsky KS (2001). Effects of intrastriatal infusion of D2 and D3 dopamine receptor preferring antagonist on dopamine release in rat dorsal striatum (in vivo microdialysis study). *Pharmacol Res*, 43:283-290).

Strader C.D., Sigal I.S., Candelore M.R., Rands E., Hill W.S., and Dixon R.a. (1988) Conserved aspartic acids residues 79 and 113 of the beta-adrenergic receptor have different roles in receptor function. *J. Biol. Chem* 263:10267-10271.

Summers R. J., Molenaar P. y Stephenson A. J. (1987). Autoradiographic localization of receptors in the cardiovascular system. *TIPS*. 8:272-276.

Tomic M., Seeman P., George S.R., and O'Dowd B. (1993): Dopamine D1 receptor mutagenesis: role of amino acids in agonist and antagonist binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191:1020-1027.

Tang L., Todd R.D., Heller A., O'Malley K.L. (1994) Pharmacological and functional characterization of D₂, D₃ and D₄ dopamine receptor in fibroblast and dopaminergic cell lines. *J. Pharmacol Exp Ther* 268:495-502.

Tsai H. T., Langer Z. S. y Trendelenburg U. (1967). Effects of dopamine and α -methyl-dopamine on smooth muscle and on the cardiac pacemaker. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 156:310-324.

Vallar L. and Meldolesi J. (1989) Mechanism of signal transduction at the dopamine D2 receptors. *Trends Pharmac Sci* 10:74-77.

Vatner F. S., Millard W. R. y Higgins B. C. (1973). Coronary and myocardial effects of dopamine in the conscious dog: parasymphatholytic augmentation of pressor and inotropic actions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 187(2):280-295.

Végh A, Papp JG, Semeraro C, Fatchi Hasanabad Z, Parrat JR. (1998): The dopamine receptor agonist Z 1046 reduces ischaemia severity in a canine model of coronary artery occlusion. *Eur J Pharmacol* 344 :2-3, 203-13

Wang H.A., Buck M.A., and Fraser C.M. (1991): Site-directed mutagenesis of $\alpha 2A$ adrenergic receptors: identification of amino acids involved in ligand binding and receptor activation by agonists. *Mol. Pharmacol.* 40:168-179.

Wang H.A., Undie A.s., and Friedman E. (1995): Evidence for coupling of Gq protein to D1-like dopamine sites in rat striatum: possible role in dopamine-mediated inositol phosphate formation. *Mol. Pharmacol.* 48:988-994.

Weiss S., Sereben M., Garcia-Sainz J.A. and Bockaert J. (1985) D2 dopamine receptors mediated inhibition of cyclic AMP formation in striatal neurons in primary culture. *Molec Pharmac* 27:595-599.

Yamaguchi N., Champlain J. y Nadeau A. R. (1977). Regulation of norepinephrine release from cardiac sympathetic fibers in the dog by presynaptic α y β receptors. *Circ. Res.* 41(1):108-117.

Yatsu T., Takizawa K., Kasai-Nakagawa C., Uchida W., Tanaka A., Asano M, Hoda K. y Takenaka T. (1997). Hemodynamic Characterization of YM435, a novel dopamine DA1 receptor agonist, in anesthetized dogs. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 29:382-388.

Yeh K. B., McNay L. J. y Goldberg I. L. (1969). Attenuation of dopamine renal and mesenteric vasodilation by haloperidol: evidence for a specific dopamine receptor. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 168:303-309.

Zhao H., Matsuoka S., Fujioka Y. y Noma A. (1997). Effects of dopamine on L-type Ca^{+2} current in single atrial and ventricular myocytes of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 121:1247-1254.

Functional and autoradiographic characterization of dopamine D₂-like receptors in the guinea pig heart

María de Jesús Gómez, Guy Rousseau, Réginald Nadeau, Roberto Berra, Gonzalo Flores, and Jorge Suárez

Abstract: Dopamine receptors include the D₁- (D₁ and D₅ subtypes) and D₂-like (D₂, D₃, and D₄ subtypes) families. D₁-like receptors are positively and D₂-like receptors negatively coupled to the adenylyl cyclase. Dopamine D₂-like (D₄ subtype) receptors have been identified in human and rat hearts. However the presence of D₂ and D₃ receptor subtypes is unclear. Furthermore, their role in cardiac functions is unknown. By autoradiographic studies of guinea pig hearts, we identified D₃ and D₄ receptors, using the selective radioligands [³H]-7-OH-DPAT and [³H]emonaipride (YM-09151-2 plus raclopride). Western blot analysis confirmed D₃ and D₄ receptors in the right and left ventricle of the same species. Selective agonists of D₃ and D₄ receptors (±)-7-OH-DPAT and PD 168 077 (10⁻⁹ to 10⁻⁵ M, respectively) induced a significant negative chronotropic and inotropic effect in the isolated guinea pig heart preparation. Negative inotropic effect induced by PD 168 077 was associated with an inhibition in cyclase activity. No changes in cyclase activity were found with (±)-7-OH-DPAT. The aim of this study is to support the presence of D₃ and D₄ receptors in the heart. Although our results suggest that D₃ and D₄ receptors are functionally active in the heart, we need additional information with an antagonist and an agonist of improved potency and selectivity to understand the respective roles of D₃ and D₄ receptors in the cardiac functions.

Key words: Dopamine receptors (D₂, D₃, D₄ subtypes), autoradiography, Western blot, cAMP, heart.

Résumé : Les récepteurs de la dopamine incluent les familles de type D₁ (sous-types D₁ et D₅) et de type D₂ (sous-types D₂, D₃ et D₄). Les récepteurs de type D₁ sont couplés positivement et les récepteurs de type D₂ couplés négativement à l'adénylylcyclase. Les récepteurs de type D₂ (sous-type D₄) ont été identifiés dans les cœurs d'humains et de rats. Toutefois, la présence des sous-types D₂ et D₃ n'est pas claire, et leur rôle dans les fonctions cardiaques est inconnu. Des études autoradiographiques avec les radioligands sélectifs [³H]-7-OH-DPAT et [³H]émónapride (YM-09151-2 plus raclopride) ont permis d'identifier les récepteurs D₃ et D₄ dans les cœurs de cobayes. Une analyse par transfert de Western a confirmé la présence des récepteurs D₃ et D₄ dans les ventricules droit et gauche de cette espèce. Les agonistes sélectifs des récepteurs D₃ et D₄, (±)-7-OH-DPAT et PD 168 077 (de 10⁻⁹ à 10⁻⁵ M, respectivement), ont provoqué des effets chronotropes et inotropes négatifs significatifs dans la préparation de cœurs isolés de cobayes. L'effet inotrope négatif induit par PD 168 077 a été associé à une inhibition de l'activité cyclase. Aucune variation de l'activité cyclase n'a été observée avec (±)-7-OH-DPAT. Cette étude a pour but d'attester la présence des récepteurs D₃ et D₄ dans le cœur. Bien que nos résultats donnent à penser que les récepteurs D₃ et D₄ sont fonctionnellement actifs dans le cœur, nous avons besoin de données additionnelles, au moyen d'agonistes et d'antagonistes plus puissants et plus sélectifs, pour comprendre les rôles respectifs des récepteurs D₃ et D₄ dans les fonctions cardiaques.

Mots clés : récepteurs de la dopamine (sous-types D₂, D₃, D₄), autoradiographie, transfert de Western, AMPc, cœur.

[Traduit par la Rédaction]

Introduction

Since the first cloned and sequenced dopamine receptor was made (Bunzow et al. 1988), research on the distribution

as well as the functional role of the dopamine receptor in central and peripheral tissues has increased. It is presently considered that the action of dopamine, an endogenous amine, takes place through five dopamine receptor subtypes,

Received 18 October 2001. Published on the NRC Research Press Web site at <http://cjpp.nrc.ca> on 7 June 2002.

M. de J. Gómez,¹ R. Berra, and G. Flores. Instituto de Fisiología, Universidad Autónoma de Puebla, 14 Sur, 6301, Col. San Manuel, CP 72570, Puebla, Puebla, Mexico.

G. Rousseau and R. Nadeau. Centre de Recherche, Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal, 5400 Gouin Ouest, Université de Montréal, Montréal, QC H4J 1C5, Canada.

J. Suárez. Escuela Superior de Medicina-IPN. Sección de Estudios de Postgrado e Investigación, Plan de San Luis y Dfáz Mirón, Col. Casco de Santo Tomás, CP 11340, México, D.F. Mexico.

¹Corresponding author (e-mail: jomagom@siu.buap.mx).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

which are coupled to the guanine nucleotide protein (G protein) transmembrane system. Dopamine receptors included the D₁-family receptors (renamed D₁-like receptors) and D₂-family receptors (renamed D₂-like receptors) of the former classification (Kebabian and Calne 1979; Andersen et al. 1990; Civelli et al. 1993). Dopamine D₁-like receptors include D₁ or D_{1A} and D₅ or D_{1B}, while dopamine D₂-like receptors include two isoforms of the D₂ receptor subtypes and D₃ and D₄ receptors (Giros et al. 1989; Civelli et al. 1993; Jackson and Westlind-Danielsson 1994; Missale et al. 1998). Expression of the dopamine receptor varies from one animal species to another and even from one tissue to another in the same animal.

Dopamine D₁-like receptors are positively and dopamine D₂-like receptors negatively coupled to the adenylyl cyclase (AC) enzyme (Horn et al. 1974; Kebabian and Calne 1979; Lazareno et al. 1985; Weiss et al. 1985; Jackson and Westlind-Danielsson 1994). However, interaction with other intracellular signals such as phospholipase-C has been proven (Felder et al. 1989; Vallar and Meldolesi 1989; Jackson and Westlind-Danielsson 1994). Dopamine receptors have been studied mainly in the brain, where their participation in the control of motor activity, behaviors, learning, and memory is known (Camsonne 1987; Clark and White 1987; Jackson and Westlind-Danielsson 1994). Dopamine receptors are also distributed in the peripheral tissues. They are considered similar but not identical to the homologous brain dopamine receptors. Activation of peripheral dopamine receptors induces vasodilatation in renal, mesenteric, and coronary arteries. This effect has been explained through postsynaptic dopamine D₁-like receptors and presynaptic dopamine D₂-like receptors. The former induce a direct vasodilatation while the latter produce an inhibition of noradrenaline release from presynaptic neurons (Brodde 1982; Kopia and Valocik 1989; Missale et al. 1988; Ricci et al. 1994; Amenta 1997).

Through radioligand binding and autoradiographic studies with [³H]spiperone as a ligand, the dopamine D₂-like receptor binding sites in the human heart were evident (Amenta et al. 1993). Using [³H]clozapine as a ligand (dopamine D₄ receptor antagonist) the same author found positive binding in the human and rat atria tissues, whereas no specific [³H]clozapine binding was found in ventricles, suggesting the expression of D₄ receptor subtype in atrial tissues (Amenta 1997). In support of these findings, Ricci et al. 1998 found that [³H]spiperone was bound specifically to sections of the human and rat atria and ventricles, whereas preincubation with a D₄ receptor antibody and subsequent exposure to [³H]spiperone caused a remarkable decrease of radioligand binding only in atria tissues. Others studies have reported the expression of dopamine D₁-like receptors by Western blot analysis and light microscopic immunohistochemistry techniques in the human and rat hearts (Ozono et al. 1996, 1997). However, radioligand binding and autoradiography studies were unable to detect binding of [³H]SCH 23390, a D₁ receptor antagonist in the human heart (Amenta et al. 1993). In spite of data supporting the presence of dopamine receptors in the heart there is no information about their physiological role in cardiac functions.

The first purpose of this study was to evaluate the expression of dopamine D₂-like receptors by means of dopamine receptor binding sites using autoradiography and Western

blot techniques in the guinea pig heart. The second purpose was to analyze the physiological effects of the activation of D₂, D₃, and D₄ receptors subtypes through selective agonists in the isolated guinea pig heart under constant flow perfusion. We also measured the cyclic adenosine monophosphate (cAMP) content in the right atria and left ventricle under the effect of the same drugs.

Materials and methods

Materials

(-)-Quinpirole HCl, S-(+)-raclopride L-tartrate, (±)-7-OH-DPAT HBr (dipropylamino-7-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-naphthalene), U-99194A maleate (5,6-dimethoxy-2-(di-*n*-propylamino)indan maleate), PD 168 077 (*N*-[4-(2-cyanophenyl)-1-piperazinyl]methyl]-3-methyl-benzamide, L-750-667 3HCl, EDTA, forskolin, ATP, GTP, cAMP, myokinase, 1,3-di(2,5-tolyl)guanidine, soybean trypsin inhibitor, and benzamide were obtained from Sigma (St. Louis, Mo.). Leupeptin were from Alexis Biochemicals (San Diego, Calif.). Pyruvate kinase, phosphoenolpyruvate, and isobutylmethylxanthine were from Calbiochem (San Diego, Calif.). New England Nuclear supplied [α-³²P]-ATP and [³H]cAMP. Butaclamol, guanosine 5'-triphosphate (GTP), and dopamine were purchased from RBI (Natick, Mass.). [³H]-YM-09151-2 (86 Ci/mmol), [³H]-7-OH-DPAT (139 Ci/mmol), [³H]Hyperfilm, and micro scale calibrated tritium standards were purchased from Amersham Canada (Toronto, Ont.). D3DR (H-50) (catalogue No. sc-9114) is a rabbit polyclonal antibody raised against a recombinant protein corresponding to amino acids 1-50 mapped within the amino terminal extracellular region of dopamine receptor type 3 of human origin. D4DR (R-20) (catalogue No. sc-1439) is an affinity-purified goat polyclonal antibody raised against a peptide mapped at the carboxy terminus of dopamine type 4 receptor of rat origin. D3DR and D4DR were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Calif.). All other chemicals were of analytical reagent grade quality and obtained from the usual commercial sources.

Autoradiographic studies

Animals

All experiments were conducted in male guinea pigs (weighing 250-300 g) bred in our facilities. Animals were maintained under constant room temperature (23°C) and a 12 h light : 12 h dark cycle, with food and water ad libitum. All procedures were in agreement with the official Mexican guidelines stated in the *Leyes y Códigos de México*, under Título 7 de la Ley General de Investigación en Salud as well as with the Guidelines of the Canadian Council for Animal Care and the Institutional Animal Care Committee. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used.

Heart processing

Guinea-pigs were killed by decapitation and excised hearts were rapidly frozen in a 2-methylbutane - dry ice mixture (-40°C) and then stored at -80°C until use. Frozen guinea pig hearts were sectioned at 15 μm thickness on the sagittal plane using a Leitz cryostat. Sections were collected on precleaned, gelatin-coated microscope slides (three sections

per slide), thaw-mounted, desiccated under vacuum at 4°C overnight, and then stored at -80°C until the day of the experiment.

Receptor autoradiography

Sagittal sections along maximum longitudinal axes of the heart were taken and used in the following protocols. All the protocols used followed Flores et al. 1999. For dopamine D₂-like and D₄ binding, the slides were first preincubated at room temperature for 10 min in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 120 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, and 4 mM MgCl₂. Sections were then incubated for 2 h at room temperature in the same buffer containing 1 nM [³H]emonaipride (YM-09151-2; 86 Ci/mmol, K_d > 0.5 nM) with and without 100 nM of raclopride for dopamine D₂-like or D₄ binding, respectively. 2-Dipropylamino-8-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene (8-OH-DPAT, 50 nM) was added in each case to mask possible binding of the ligand to serotonin receptors. Non-specific binding was determined on adjacent cardiac sections by adding 1 μM (+)-butaclamol in the binding buffer. Incubations were terminated by dipping the slides in an ice-cold buffer, followed by two consecutive 10-min washes in the same buffer. After a final dipping in ice-cold distilled water, slides were dried at room temperature and apposed to [³H]Hyperfilm for 15 days, alongside micro scales - calibrated tritium standards.

[³H]-2-Dipropylamino-7-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene ([³H]-7-OH-DPAT, K_d = 0.8 nM) binding to the D₃ receptor was assessed as described previously (Flores et al. 1999). Tissue sections were first preincubated for 30 min in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 100 mM NaCl and 300 μM GTP. Sections were then incubated for 2 h at room temperature with 2 nM [³H]-7-OH-DPAT, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM NaCl, 300 μM GTP, and 10 μM 1,3-di(2,5-tolyl) guanidine (to block binding sigma site). Dopamine (1 μM) was used to determine non-specific labeling. Incubations were terminated by washing the cardiac sections twice for 10 min each in ice-cold buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4). After a brief dipping in ice-cold distilled water, cardiac sections were rapidly dried and apposed to [³H]Hyperfilm for 8 weeks, alongside micro scales - calibrated tritium standards.

Autoradiograms were analyzed using a computerized image analysis system (MCID-4, Imaging Research, St Catherine's, Ont.). The binding data were analyzed in the right and left atria and in the right and left ventricle.

Western blot analysis

Membrane preparations

Tissues from the right atria and left papillary muscle from male guinea pigs were minced in 10 mL of cold buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, leupeptin (5 μg/mL), soybean trypsin inhibitor (5 μg/mL), and benzamidine (10 μg/mL). Tissues were then lysed with a polytron homogenizer (three 10 s bursts at maximum speed) and the lysates were centrifuged at 1000 × g for 10 min at 4°C. The lysate was filtered through 4 layers of cheesecloth in a corex tube and centrifuged at 45 000 × g (18 500 rpm) for 20 min at 4°C. The pellets were resuspended in 250 μL of solubilization buffer containing Triton X-100, Nonidet (NP-40), NaCl 2M, Tris-HCl 1 M (pH 7.4), EDTA 250 mM

(pH 7.4). The tubes were inverted during 2 h at 4°C, and centrifuged at 45 000 × g for 20 min at 4°C. The supernatants were kept for protein assay and Western blot. Protein content was determined according to Bradford's method using a Bio-Rad kit (Bradford 1976).

Western blot

Equal amounts of solubilized membrane proteins (50 μL/well) were fractionated on 10% SDS polyacrylamide gels. The separated proteins were transferred to 0.2 μm nitrocellulose membranes and the intensity of the bands was verified with red ponceau. Membranes were blocked using 5% nonfat dry milk in TBST (Tris-HCl 1 M, NaCl 2 M; pH 7.4, Tween 20 250 μM) for 1 h at room temperature. The membranes were then incubated with polyclonal antibodies for D₃ and D₄ receptors at a dilution of 1:500 for 1 h at room temperature or at 4°C overnight. After three 10 min washes with TBST, the membranes were incubated with peroxidase-conjugated secondary antibody (anti-goat IgG and anti-rabbit IgG, diluted at 1:2500, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) for 45 min and washed five times, 10-min, with TBST. Antibody detection was performed by chemiluminescent detection system (Renaissance reagent, Mandel Scientific Company, Inc., Guelph, Ont.). Membranes were exposed to a Kodak film and developed right away.

Physiological studies

Male guinea pigs weighing 250–300 g were used in all experiments. Under sodium pentobarbital anesthesia (30 mg/kg, i.p.) thoracotomy was performed in the midline and the hearts were removed. The aorta was cannulated quickly for retrograded perfusion by means of the Langerdorff system. Hearts were perfused at a constant flow of 10 mL/min with a Krebs-Henseleit solution containing (in mM): NaCl 118, KCl 4.7, MgSO₄ 1.6, KH₂PO₄ 1.18, NaHCO₃ 24.8, CaCl₂ 2.5, glucose 5.5, pyruvate 2, (pH = 7.4). The perfusate was continuously bubbled using 95% O₂ : 5% CO₂. Temperature was kept at 37°C by means of a glass heat exchanger. The perfusion pressure was usually 50 mmHg in all experiments. Coronary flow was calculated by timed collection of the effluent fluid in one minute.

To record cardiac electrical activity, pairs of platinum wires with Teflon coating were plunged to the epicardial surface of the right ventricle. Bipolar electrograms were displayed on a Grass chart recorder and depolarization (R-R) and repolarization (Q-T) ventricular intervals were measured on electrocardiogram (ECG) recording. Cardiac rate (CR) was calculated from R-R intervals. Left ventricular systolic pressure (LVSP) was measured using a GOULD P23 ID USA pressure transducer, passed into a compliant latex balloon inserted through the left atrium into the left ventricle. The balloon was filled with bubble-free water to set the left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) at 10–12 mmHg. Through a Polygraph differentiator Model 7P20C, an index of inotropic state, the maximum rate of rise of left ventricle systolic pressure (dP/dt_{max}), was obtained from LVSP. All the signals were amplified and recorded continuously in a GRASS 79 D Polygraph with 8 channels (GRASS Instrument CO. Quincy, Mass.). Measurements were made on recording paper at 100 mm/s.

Table 1. Quantitative analysis of the dopamine receptor subtypes in cardiac tissues of guinea pigs.

Dopamine receptor subtype, ³ H ligand	Right atria	Left atria	Right ventricle	Left ventricle
D ₂ -family, [³ H]YM-09151-2	3.3±1.6	3.0±2.0	3.9±1.2	3.3±3.0
D ₃ , [³ H]-7-OH-DPAT	5.1±0.8	2.3±0.8	1.8±0.6	1.7±0.7
D ₂ -family, [³ H]YM-09151-2 + raclopride	4.4±0.8	3.0±1.2	3.0±0.8	2.5±1.3

Note: Binding levels are expressed in fmol/mg of wet tissue. The values are the mean ± SEM, obtained from six animals (four sections for animals).

Experimental protocol

Initially the hearts were allowed to stabilize for 30 min. Those that showed more than 10% variability in sinus rate or an LVSP less than 100 mmHg over the last 20 min were discarded. Baseline measurements of CR, LVSP, and dP/dt_{max} were made. Dose-response curves for (-)-quinpirole HCl (D₂ receptor subtype agonist), (±)-7-hydroxy-DPAT HBr (D₃ receptor subtype agonist), and PD 168 077 (D₄ receptor subtype agonist) were made in cumulative concentrations, from 10⁻⁹ to 10⁻⁵ M. The duration of each perfusion drug concentration was 20 min. Other groups of experiments involved the use of an antagonist at 1 and 10 μM concentration, infused alone during 15 min and after, plus an agonist at 10⁻⁸ to 10⁻⁵ concentration, both of them infused during 20 min. A final experimental group involved the use of an antagonist at one concentration, 10⁻⁵, infused alone during 15 min and after, plus an agonist at the same concentration (10⁻⁵), both of them infused during 20 min. The following antagonists were used: S(-)- raclopride, a D₂/D₃ antagonist; U-99194A maleate, a D₃ selective antagonist; and L-750-667 3HCl and clozapine, D₄ receptor antagonists.

Data were recorded continuously and measured every 5 min during the experiment. Physiological parameters were measured 20 min after infusion of the drug. A this time a steady-state effect had been achieved. The values in each parameter represent the mean of 8–10 beats.

AC activity

Membrane preparation

Tissues from the right atria and left papillary muscle were minced in 5 mL of a cold buffer containing 5 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2 mM EDTA, 5 μg/mL leupeptin, 5 μg/mL soybean trypsin inhibitor, and 10 μg/mL benzamidine. Tissues were then lyzed with a polytron homogenizer (three 10 s bursts at maximum speed) and centrifuged at 1000 × g for 5 min at 4°C. The lysates were filtered through 4 layers of cheesecloth and centrifuged at 40 000 × g for 20 min at 4°C. The pelleted membranes were washed twice and resuspended in 0.5 mL of buffer containing 75 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 5 μg/mL leupeptin, 5 μg/mL soybean trypsin inhibitor, and 10 μg/mL benzamidine, and were used immediately for AC activity determination. Protein content was determined according to Bradford's method using a Bio-Rad kit.

AC assay

AC activity was measured according to the method of Solomon et al. 1974. In summary, 10–20 μg of membrane proteins were added in a total volume of 50 μL. The incubation mixture included 120 μM ATP, 0.5 μCi [³²P]ATP, 100 μM cAMP, 53 μM GTP, 2.8 mM phosphoenolpyruvate, 0.2 U of pyruvate kinase, 1 U of myokinase, 30 mM Tris-

HCl (pH 7.4), 2 mM MgCl₂, 0.8 mM EDTA, and 100 μM of forskoline. The enzyme activity was determined in duplicate in the absence (basal activity) or presence of activators of D₃ and D₄ receptors, (±)-7-hydroxy-DPAT HBr and PD 168 077, respectively. Concentrations of the agonist ranging from 10⁻⁹ to 10⁻⁵ M were used.

Calculations and statistical analysis

All data are expressed as a mean ± SEM. Concentration-response curves were analyzed by nonlinear regression analysis (GraphPad, Prism). Each regression line was fitted to a sigmoid equation, $R/R_{max} = A^c / (A^c + (EC_{50})^c)$, where R_{max} is the maximal effect caused by the agonist, A is the concentration of agonist, EC_{50} is the concentration required for half-maximum effect, and c is a constant. Statistical analysis was done with one-way analysis of variance with post-ANOVA Dunnet test when appropriate. A p value less than 0.05 was considered significant.

Results

Autoradiographic results

[³H]emonaipride binding

[³H]emonaipride (YM-09151-2) labels dopamine receptor subtypes belonging to the dopamine D₂-like receptor (D₂, D₃, and D₄). Dopamine D₂-like receptors were detected in all the heart (3–4 fmol/mg wet tissue). D₄ receptor, measured by [³H]YM-09151-2 in the presence of raclopride, a D₂/D₃ receptor antagonist, was also detected in the four cardiac chambers. Receptor density was 2–4 fmol/mg wet tissue (Table 1).

[³H]2-Dipropylamino-7-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene binding

D₃ receptor measured by [³H]-7-OH-DPAT binding was found mainly in the right atria (Fig. 1). Binding for D₃ receptors was also detected in the left atria and in the right and left ventricle (Table 1). It was interesting to note the binding in proximal aorta and pulmonary artery (15 fmol/mg wet tissue), as shown in Fig. 1.

Western blot

Figure 2 shows Western blot analysis of D₃ and D₄ receptors in cardiac membranes (right atria and left ventricle) of the guinea pig heart. Bands (approximately 75 kDa) for D₃ and D₄ were detected in both tissues.

Fig. 1. Binding of [³H]-7-OH-DPAT in cardiac tissues of the guinea pig. Longitudinal section of posterolateral left region of the heart. As shown in the right (A), the binding of [³H]-7-OH-DPAT is localized mainly in the right atria and in aorta and pulmonary artery. In the left (B), no specific binding of [³H]-7-OH-DPAT in presence of dopamine (10⁻⁵ M). RA, right atria; RV, right ventricle; LA, left atria; LV, left ventricle; Ao, aorta.

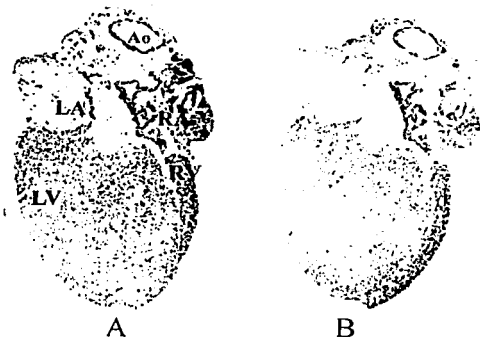
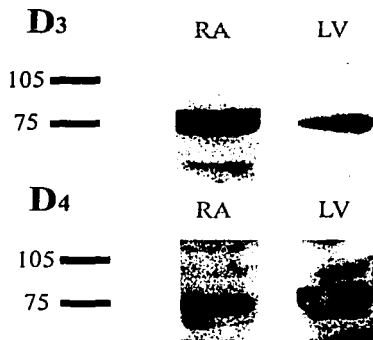


Fig. 2. Western blot analysis of D₃ and D₄ receptors in the right atria and left ventricle of guinea pig heart. Bands of 75 kDa for D₃ and D₄ receptor were detected in both tissues.



Physiological results in isolated heart

Effects of dopamine D₂-like receptor agonists on cardiac rate and *dp/dt*_{max}

Dopamine D₂-like agonists, quinpirole, (±)-7-OH-DPAT, and PD 168 077, all induced a negative chronotropic and inotropic effect, as shown in Figs. 3 and 4. Quinpirole, a D₂ agonist, induced a decrease of 12% of CR at nanomolar concentrations. Interestingly, micromolar concentrations returned the values to basal levels. Effects on *dp/dt*_{max} were similar: nanomolar concentrations produced a reduction of 20% in *dp/dt*_{max}, with recovery at micromolar concentrations. (±)-7-OH-DPAT and PD 168 077 (D₃ and D₄ agonists, respectively) both induced a significant negative chronotropic and inotropic effect in a concentration-dependent manner (EC₅₀ = 3.93 × 10⁻⁷ and 3.64 × 10⁻⁶, respectively).

Fig. 3. Effect of D₂, D₃, and D₄ receptor agonists on cardiac rate of isolated guinea pig heart. ▲, (±)-7-OH-DPAT, *n* = 18; △, quinpirole, *n* = 12; ■, PD 168 077, *n* = 12. (±)-7-OH-DPAT and PD 168 077 (D₃ and D₄ receptor agonists, respectively) produced a negative chronotropic effect in a clear dose-dependant manner. Also, quinpirole, a D₂ receptor agonist, decreased the cardiac rate, but only at nanomolar concentrations, as shown in the figure. Further experimental details are provided in Materials and Methods. Data were normalized and expressed as a mean ± SEM. **p* < 0.01 with respect to own control.

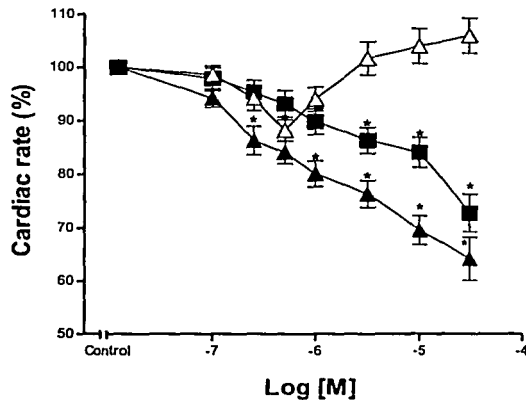


Fig. 4. Effects of D₂, D₃ and D₄ receptor agonists on *dp/dt*_{max} of isolated guinea pig heart. ▲, (±)-7-OH-DPAT, *n* = 18; △, quinpirole, *n* = 12; ■, PD 168 077, *n* = 12. (±)-7-OH-DPAT and PD 168 077 (D₃ and D₄ receptor agonists, respectively) also produced a negative inotropic effect in a dose-dependant manner. However, PD 168 077 had the predominant effect, as opposed to the predominant effect on cardiac rate of (±)-7-OH-DPAT, as shown in Fig. 3. Further experimental details are provided in Materials and Methods. Data were normalized and expressed as a mean ± SEM. **p* < 0.05 with respect to own control.

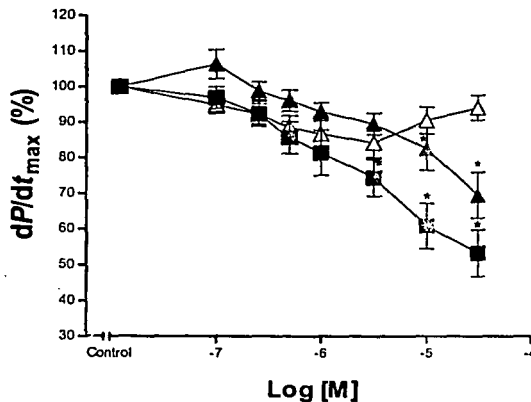


Fig. 5. Concentration–response curves for the inhibitory effect of (\pm)-7-OH-DPAT on cardiac rate of isolated guinea pig heart in the absence and presence of raclopride, a D_2/D_3 antagonist receptor. \blacktriangle , (\pm)-7-OH-DPAT, $n = 8$; \diamond , (\pm)-7-OH-DPAT + raclopride $1 \mu\text{M}$, $n = 6$; \blacklozenge , (\pm)-7-OH-DPAT + raclopride $10 \mu\text{M}$, $n = 6$. Raclopride was able to block the negative chronotropic effect induced by (\pm)-7-OH-DPAT as shown in the figure. However, the effect was statistically significant just at nanomolar concentration. Further experimental details are provided in Materials and methods. Data were normalized and expressed as a mean \pm SEM. * $p < 0.01$ compared with appropriate control mean.

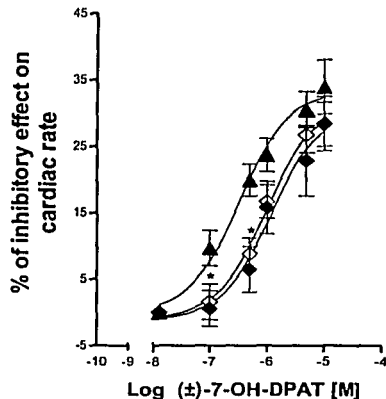
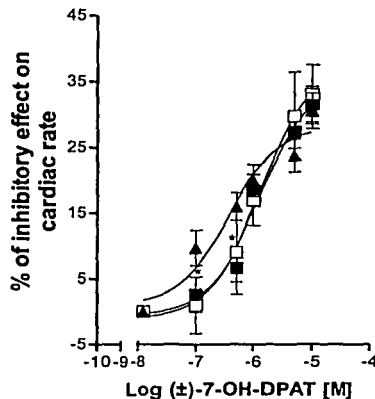


Fig. 6. Concentration–response curves for the inhibitory effect of (\pm)-7-OH-DPAT on cardiac rate of isolated guinea pig heart in the absence and presence of U-99194A maleate, a D_3 selective antagonist receptor. \blacktriangle , (\pm)-7-OH-DPAT, $n = 8$; \square , (\pm)-7-OH-DPAT + U-99194A maleate $1 \mu\text{M}$, $n = 6$; \blacksquare , (\pm)-7-OH-DPAT + U-99194A maleate $10 \mu\text{M}$, $n = 6$. U-99194A maleate reversed the inhibitory effect of (\pm)-7-OH-DPAT on cardiac rate only at nanomolar concentrations as shown in the figure. The inhibitory effect of (\pm)-7-OH-DPAT at micromolar concentration was not different in the presence of U-99194A maleate at 1 and $10 \mu\text{M}$. Further experimental details are provided in Materials and methods. Data were normalized and expressed as a mean \pm SEM. * $p < 0.01$ compared with appropriate control mean.



The negative chronotropic effect of (\pm)-7-OH-DPAT was significant from nanomolar concentrations, being the maximum effect at $20 \mu\text{M}$ concentration associated with a decrease of 40% on cardiac rate. Only high concentrations of (\pm)-7-OH-DPAT decreased significantly the dP/dt_{max} (Fig. 4). Interestingly, the reduction in cardiac rate induced by (\pm)-7-OH-DPAT was associated with a prolongation in the Q-T interval of the ECG (160 ± 15 to 230 ± 20 ms, $p < 0.001$ with respect to control values). No changes in Q-T interval were observed in the PD 168 077 group (Fig. 8). The negative chronotropic effect of (\pm)-7-OH-DPAT was reduced significantly in the presence of raclopride (D_2/D_3 antagonist), at 1 and $10 \mu\text{M}$ concentration as shown in Fig. 5. However the effect was statistically significant just at nanomolar concentrations. In the dose–response curve of (\pm)-7-OH-DPAT (10^{-8} to 10^{-5} M), U-99194A maleate (D_3 selective antagonist, at 1 and $10 \mu\text{M}$) reversed the inhibitory effect of (\pm)-7-OH-DPAT on cardiac rate only at nanomolar concentrations as showed in the Fig. 6. The inhibitory effect of (\pm)-7-OH-DPAT at micromolar concentrations was not different in the presence of U-99194A maleate at 1 and $10 \mu\text{M}$. Although PD 168 077 also produced a negative chronotropic effect, this was only significant at micromolar concentrations, thus suggesting less affinity of the same receptor activation by 7-OH-DPAT (Fig. 3). The negative inotropic effect induced by PD 168 077 was significant at nanomolar concentrations and achieved a reduction of 50% in dP/dt_{max} at $20 \mu\text{M}$. The negative chronotropic effect of PD 168 077 was blocked only with raclopride, similar to the

negative chronotropic effect of (\pm)-7-OH-DPAT (Fig. 5). Raclopride and U-99194A maleate were unable to block the negative inotropic effect induced by (\pm)-7-OH-DPAT and PD 168 077. The same results were seen with the use of D_4 receptor antagonists, L-750, and clozapine. In a protocol where (\pm)-7-OH-DPAT and PD 168 077 were used simultaneously, no additive negative chronotropic and inotropic effects were observed, as shown in Table 2, which summarizes the dopamine receptors agonist effects on the physiological parameters of cardiac functions.

AC activity

The results show that the D_3 receptor agonist (\pm)-7-OH-DPAT had no effect on AC activity on the right atria or in the left papillary muscle. Production of cAMP for forskolin was inhibited by PD 168 077 (D_4 agonist) only in the left papillary muscle in a concentration-dependent manner over the range of 10^{-9} to 10^{-5} M, with an EC_{50} of 2.38×10^{-7} and maximal inhibition of 30% at 10^{-5} M concentration ($p < 0.01$ versus baseline, $n = 8$) (Fig. 9). No effect was seen in right atria.

Discussion

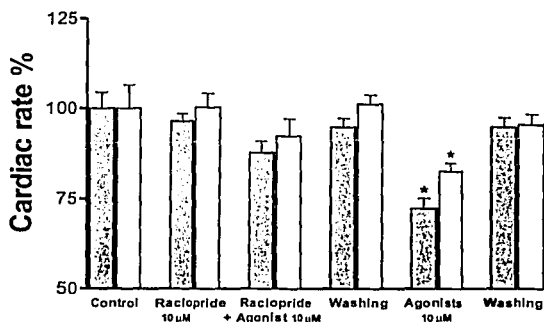
In this study, we provide evidence to support the presence of D_3 and D_4 receptors in the guinea pig heart. In addition, we assessed the activation of D_2 , D_3 , and D_4 receptors by their selective agonists (quinpirole, (\pm)-7-OH-DPAT, and PD

Table 2. Effects of D₂-like receptors agonists on the hemodynamic parameters of the guinea pig cardiac function.

Parameters	Control values	Quinpirole (10 ⁻⁵ M) (n = 12)	7-OH-DPAT (10 ⁻⁵ M) (n = 18)	PD 168 077 (10 ⁻⁵ M) (n = 12)	7-OH-DPAT plus PD 168 077 (10 ⁻⁵ M) (n = 6)
Cardiac rate (beats/min)	240±16	232±24	176±26**	198±18*	170±18**
	100%	96% (14%)	73% (127%)	82% (118%)	70% (130%)
Left ventricular pressure (mmHg)	116±12	106±8	94±9*	80±16**	82±14**
	100%	91% (19%)	82% (118%)	68% (132%)	70% (130%)
dP/dt _{max} (mmHg/s)	1800±420	1760±350	1600±560	1400±320*	1260±500*
	100%	98% (12%)	88% (112%)	74% (126%)	70% (130%)

Note: The values are the mean ± S.E.M and expressed in absolute values and normalized (%). **p* < 0.01, ***p* < 0.001 with respect to control values.

Fig. 7. Influence of raclopride, a D₂/D₃ receptor antagonist, on the negative chronotropic effect of (±)-7-OH-DPAT and PD 168 077 in the isolated guinea pig heart. (□, PD 168 077, *n* = 10; ▨, (±)-7-OH-DPAT, *n* = 12). As shown in the figure, raclopride produces a partial block of the negative chronotropic effect induced by the drugs. Data were normalized and expressed as a mean ± SEM. **p* < 0.01 with respect to own control.



168 077, respectively) in the isolated guinea pig heart preparation. Furthermore, we evaluated changes in the cAMP content in cardiac tissues under the effect of D₃ and D₄ receptor agonist. Our results demonstrate that the guinea pig heart has D₃ and D₄ receptors and that they are mainly distributed in the right atria. The negative chronotropic and inotropic effects observed in the heart after the activation of D₃ and D₄ receptor agonists suggest a probably physiological role of these receptors in the cardiac functions of the guinea pig heart.

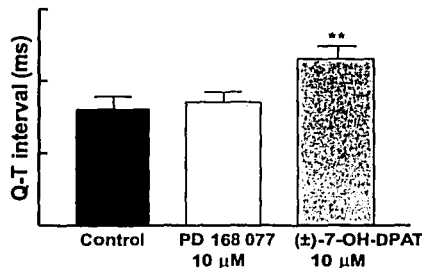
The findings reported here are in agreement with previous studies in which D₂-like receptors assessed by [³H]spiroprone binding have demonstrated the presence of these receptors in the human and rat hearts (Amenta et al. 1993; Ricci et al. 1998). The same authors show evidence that D₄ receptor subtype belonging to D₂-like receptors was expressed in the human and rat right atria (Amenta 1997; Ricci et al. 1998). In contrast, the presence of D₃ receptors and the effects of the activation of the D₃ and D₄ receptors in the guinea pig heart had not, to our knowledge, been previously reported.

Although D₃ and D₄ receptors are mainly located in the right atria, our data also suggested the presence of D₃ and D₄ receptors in other chambers of the heart. D₃ receptor data for the right atria (4.5 fmol/mg of wet tissue) were not low compared with the values reported in nucleus accumbens (12 fmol/mg of wet tissue) and were higher compared with the previous reports in the caudate-putamen nucleus (Flores et al. 1996, 1998). In addition, there are several reports suggesting the probably physiological role of D₃ receptors in these two brain structures (Flores et al. 1999). Finally, although dopamine receptors are low in density, they could be sufficient for a physiological effect in the heart.

Western blot analysis also provided strong evidence for the presence of D₃ and D₄ receptor proteins in the right atria and left ventricle of the guinea pig heart. The antibodies were directed toward the amino terminal extracellular region for D₃ and the carboxy terminus intracellular for D₄, which are not cross-reactive with D₁, D₂, and D₅ receptors (Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

Our results clearly show a dose-dependent decrease of the cardiac rate induced by the activation of the D₃ receptors by (±)-7-OH-DPAT. In agreement with previous reports, we found significant changes at nanomolar concentrations, supporting the notion that the effect was mediated by a D₃ receptor (Devoto et al. 1995; Clos et al. 1997; García-Sanz et al. 2001; Sotnikova et al. 2001). These data are consistent with previous reports about the functional role of D₃ receptors on the activity of the neurons (Kreiss et al. 1995; Lejeune and Millan 1995). Using (±)-7-OH-DPAT, the activation of the D₃ receptors of the nucleus accumbens, ventral tegmental area, and substantia nigra pars compacta produced an inhibition of cell firing (Kreiss et al. 1995). In addition, our findings suggest that this inhibitory effect of D₃ receptors in the cardiac rate could have caused the negative chronotropic effect in the isolated guinea pig heart. The negative chronotropic effect of (±)-7-OH-DPAT was reduced in the presence of raclopride (D₂/D₃ antagonist) and U-99194A maleate (D₃ selective antagonist) at 1 and 10 µM concentrations. However U-99194A maleate clearly reversed the inhibitory effect of (±)-7-OH-DPAT on cardiac rate only at nanomolar concentrations, whereas raclopride was able to block the inhibitory effect of (±)-7-OH-DPAT at nanomolar and micromolar concentrations. However the effect was only statistically significant at nanomolar concentrations. These results suggest a dual mechanism of (±)-7-OH-DPAT to induce the inhibitory effect on cardiac rate. One direct mechanism may be through activation of D₃ receptors, since the effect was induced at nanomolar concentrations of (±)-7-OH-DPAT

Fig. 8. Effect of D_3 and D_4 receptor agonists on the Q-T interval of the ECG. ■, control, $n = 30$; □, PD 168 077, $n = 12$; ▨, (\pm)-7-OH-DPAT, $n = 18$. Hearts were treated with (\pm)-7-OH-DPAT and PD 168 077 at the same concentration (10 μ M). Only (\pm)-7-OH-DPAT produced a significant prolongation of the Q-T interval. Data are absolute values and expressed as a mean \pm SEM. ** $p < 0.001$ with respect to own control.



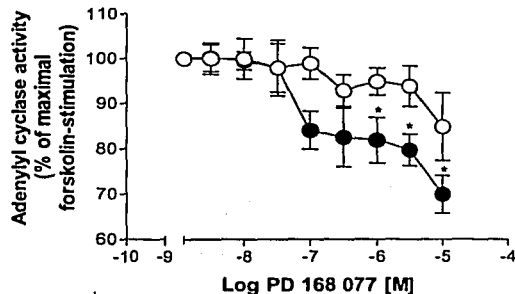
and was reversed by a U-99194A maleate. Another mechanism is probably not mediated by dopamine receptor, since the inhibitory effect of (\pm)-7-OH-DPAT on cardiac rate at micromolar concentrations was not reversed by U-99194A maleate.

Quinpirole, a D_2 -like (D_2/D_3) agonist receptor, also produces a decrease of cardiac rate. However, the negative chronotropic effect induced by quinpirole was not dose-dependant, and only observed at nanomolar concentrations. Since the negative chronotropic effect of quinpirole was blocked by raclopride, this effect is probably mediated by D_3 receptors.

The activation of D_4 receptor by PD 168 077 also caused a negative chronotropic effect; however, this effect was minor compared with (\pm)-7-OH-DPAT, since significant changes only appear at 1 μ M concentrations. These data suggest that both agonists induce activation of the same receptor but with different affinity. Also, the negative chronotropic effect induced by PD 168 077 was blocked by raclopride, thus supporting the notion that PD 168 077 interacts with D_3 receptors. Several studies have demonstrated a selective activation of the D_3 receptor by (\pm)-7-OH-DPAT ($K_D = 0.8$ nM) with the similar dose used in the present study (Levesque et al. 1992, 1996; Schoemaker et al. 1993; Schwartz et al. 1993; Sautel et al. 1995). However, there are few studies about the selective activity of the PD 168 077 as D_4 agonist (Glase 1997; Clifford and Waddington 2000). For the time being, in the absence of other more specific D_4 receptor agonists, our data suggest that PD 168 077 induces the activation of the D_3 and D_4 receptors.

A negative inotropic effect was seen predominantly with PD 168 077, since only higher concentrations of (\pm)-7-OH-DPAT were able to decrease the dP/dt_{max} . The negative inotropic effect induced by PD 168 077 was not blocked with the D_4 receptor antagonist used, L-750 and clozapine, either by raclopride and U-99194A maleate. In any case, these results need confirmation with more specific D_4 selective antagonists, when they became available.

Fig. 9. Effect of D_4 receptor agonist PD 168 077 on adenylyl cyclase activity in cardiac tissues of guinea pig (O, right atria, $n = 8$; ●, left ventricle, $n = 8$). PD 168 077 decreased the cyclase activity only in left ventricle, in correlation with the negative inotropic effect induced for the same drug in the isolated heart. Data were normalized and expressed as a mean \pm SEM. * $p < 0.01$ with respect to own control.



According to our results, the activation of D_3 receptors did not cause changes in cAMP levels (Freedman et al. 1994; Tang et al. 1994; MacKenzie et al. 1994; Aritha and Galloway 1996). Several reports from different cell lines that expressed D_3 receptors suggest that D_3 receptors may not be functionally coupled to G proteins (Levesque et al. 1992; Freedman et al. 1994; Tang et al. 1994; MacKenzie et al. 1994; Shafer and Levant 1998). However, some studies suggest a variety of D_3 -initiating signaling events, including stimulation or inhibition of AC activity (Chio et al. 1994a; Potenza et al. 1994; McAllister et al. 1995). According to other studies that indicate that the use of D_4 receptor agonist can inhibit cAMP accumulation, PD 168 077 was associated with a significant decrease on cAMP content in the left ventricle of guinea pig heart (Chio et al. 1994b; Tang et al. 1994; Missale et al. 1988). The negative inotropic effect of PD 168 077 could be explained through the direct effect of D_4 receptor on cardiac myocytes, which may negatively couple to AC, accounting for the inhibition on cAMP production in our studies.

Besides evaluating cardiac rate, left ventricular pressure, and dP/dt_{max} , another aim of the present study was to evaluate the action of D_3 and D_4 agonists on the ECG. Conduction was measured in the auriculo-ventricular (P-R interval) and in the ventricles (Q-T interval) on the ECG. The activation of D_3 receptors caused a significant prolongation in the Q-T interval (160 ± 12 ms to 230 ± 18 ms, $p < 0.01$) with no changes in P-R interval. In addition, prolongation of the Q-T interval could be related to the prolongation of action potential duration observed in the left atria of the guinea pig heart under pacing with 7-OH-DPAT (10^{-5} M) (data not shown). In contrast, no effects were found on P-R or Q-T intervals with PD 168 077, a D_4 receptor agonist.

The mechanism(s) by which the activation of D_3 receptor induces a negative chronotropic effect and increases the Q-T interval is not clear at this time. D_2 -like receptors are localized on sympathetic nerve endings in peripheral tissues, where they can modulate the release of norepinephrine (Ricci et al. 1994; Missale et al. 1988; Foucart et al. 1988;

Felder et al. 1989; Dlewati et al. 1989; Amenta 1997). Also, studies in isolated human atria appendages using the D₂-like agonists quinpirole and propilnorapomorphine yielded an inhibition of noradrenaline release (Rump et al. 1995; Claire et al. 1996). The participation of this mechanism in the negative chronotropic effect induced by (±)-7-OH-DPAT needs confirmation by another experimental studies.

Conclusions

Our findings demonstrate the anatomic and functional presence of D₃ and D₄ receptors in the guinea pig heart. The D₃ and D₄ receptors are predominantly found in the right atria. (±)-7-OH-DPAT, a D₃ selective agonist, has a significant negative chronotropic effect, which is not mediated by the AC activity but associated with a significant increase in ventricular repolarization. PD 168 077, a D₄ selective agonist, has a moderate negative chronotropic effect without changes in ventricular repolarization. However, PD 168 077 induced a significant negative inotropic effect, which was associated with an inhibition of cyclase activity in left ventricle.

Acknowledgements

We thank Mrs. Chantal de Montigny for her expert technical assistance and Dr. Carlos Escamilla for the animals provided.

References

Abadie, C., Foucart, S., Pagé, P., and Nadeau, R. 1996. Modulation of noradrenaline release from isolated human atrial appendages. *J. Auton. Nerv. Syst.* 61: 269-276.

Amenta, F., Gallo, P., Rossodivita, A., and Ricci, A. 1993. Radioligand binding and autoradiographic analysis of dopamine receptors in the human heart. *Naunyn-Schmiedberg's Arch. Pharmacol.* 347: 147-154.

Amenta, F. 1997. Light microscope autoradiography of peripheral dopamine receptor subtypes. *Clin. Exp. Hypertens.* 19: 27-41.

Andersen, H.P., Gingrich, A.J., Bates, M.D., Deary, A., Falardeau, P., Senogles, S.E., and Caron, M.G. 1990. Dopamine receptor subtypes: beyond the D₁/D₂ classification. *TIPS (Trends Pharmacol. Sci.)*, 11: 231-236.

Aréthas, Ch.W., and Galloway, M.P. 1996. Dopamine autoreceptor reserve in vitro: possible role of dopamine D₃ receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 305: 119-122.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248.

Brodde, O.-E. 1982. Vascular dopamine receptors: Demonstration and characterization by in vitro studies. *Life Sci.* 31: 289-306.

Bunzow, J.R., Van Tol, H.H., Grandy, D.K., Albert, P., Salon, J., Christie, M., Machida, C.A., Neve, K.A., and Civelli, O. 1988. Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature*, 336: 783-787.

Camsonne, R. 1987. Dopamine receptors in brain and periphery: some prospects. *Neurochem. Int.* 10: 35-37.

Chio, C.L., Lajiness, M.E., and Huff, R.M. 1994a. Activation of heterologously expressed D₃ dopamine receptors: comparison with D₂ dopamine receptors. *Mol. Pharmacol.* 45: 51-60.

Chio, C.L., Drong, R.F., Riley, D.T., Gill, G.S., Slightom, J.L., and Huff, R.M. 1994b. D₄ dopamine receptor-mediated signaling

events determined in transfected Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 269: 11 813 - 11 819.

Civelli, O., Bunzow, R.J., and Grandy, K.D. 1993. Molecular diversity of the dopamine receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 281-307.

Clark, D., and White, F.J. 1987. Review: D₁ dopamine receptor-the search for a function: a critical evaluation of the D₁/D₂ dopamine receptors classification and its functional implications. *Synapse*, 1: 347-388.

Clifford, J.J., and Waddington, J.L. 2000. Topographically based search for an "Ethogram" among a series of a novel D(4) dopamine receptor agonist and antagonists. *Neuropsychopharmacology*, 22: 538-544.

Clos, M.V., García-Sanz, A., Vivas, N.M., and Badia, A. 1997. D₂ dopamine receptors and modulation of spontaneous acetylcholine (ACh) release from rat striatal synaptosomes. *Br. J. Pharmacol.* 122: 286-290.

Devoto, P., Collu, M., Muntoni, A., Pistis, M., Serra, G., Gessa, G., and Diana, M. 1995. Biochemical and electrophysiological effects of 7-OH-DPAT on the mesolimbic dopaminergic system D₂ dopamine receptors and modulation of spontaneous acetylcholine (ACh) release from rat striatal synaptosomes. *Synapse*, 20: 153-155.

Dlewati, A., Watkins, H.O., and Lokhandwala, M.F. 1989. Effects of SKF& 85174, a DA-1/DA-2 receptor agonist, on pre- and postganglionic sympathetic neurotransmission to the heart. *Eur. J. Pharmacol.* 164: 197-203.

Felder, R.A., Felder, C.C., Eisner, G.M., and José, P.A. 1989. The dopamine receptor in adult and maturing kidney. *Am. J. Physiol.* 257: F315-327.

Flores, G., Barbeau, D.G., Quirion, R., and Srivastava, L.K. 1996. Decreased binding of dopamine D3 receptors in limbic subregions after neonatal bilateral lesion of rat hippocampus. *J. Neurosci.* 16: 2020-2026.

Flores, G., Wood, G.K., Barbeau, D., Quirion, R., and Srivastava, L.K. 1998. Lewis and Fisher rats: a comparison of dopamine transporter and receptors levels. *Brain Res.* 814: 34-40.

Flores, G., Liang, J.-J., Sierra, A., Martínez-Fong, D., Quirion, R., Aceves, J., and Srivastava, L.K. 1999. Expression of dopamine receptors in the subthalamic nucleus of the rat: characterization using reverse transcriptase-polymerase chain reaction and autoradiography. *Neuroscience*, 91: 549-556.

Foucart, S., Lacaille-Belanger, P., Kimura, T.R., Nadeau, R., and Champlain, de J. 1988. Modulation of adrenal catecholamine release by DA₂ dopamine receptors in the anesthetized dog. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 15: 601-611.

Freedman, S.B., Patel, S., Marwood, R., Emmis, F., Seabrook, G.R., Knowles, M.R., and McAllister, G. 1994. Expression and pharmacological characterization of the human D₃ dopamine receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 286: 417-426.

García-Sanz, A., Badia, A., and Clos, M.V. 2001. Differential effect of quinpirole and 7-OH-DPAT on the spontaneous [³H]-Dopamine efflux from rat striatal synaptosomes. *Synapse*, 40: 65-73.

Giros, B., Sokoloff, P., Martres, M.P., Riou, J.F., Emorine, L.J., and Schwartz, J.C. 1989. Alternative splicing directs the expression of the two D2 dopamine receptors isoforms. *Nature*, 342: 923-926.

Glase, S. 1997. substituted [(4-Phenylpiperazinyl)-methyl] benzamides: selective dopamine D₄ agonist. *J. Med. Chem.* 40: 1771-1771.

Horn, A.S., Cuervo, A.C., and Miller, R.J. 1974. Dopamine in the mesolimbic system of the rat brain: endogenous levels and the effects of drugs on the uptake mechanism and stimulation of adenylate cyclase activity. *J. Neurochem.* 22: 265-270.

- Jackson, M., and Westlind-Danielsson, A. 1994. Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspect. *Pharmacol. Ther.* 64: 291-369.
- Kebabian, J.W., and Calne, D.B. 1979. Multiple receptors for dopamine. *Nature*, 277: 93-96.
- Kopia, A.G., and Valocik, E.R. 1989. Demonstration of specific dopamine-1 receptor-mediated coronary vasodilation in the anesthetized dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 248: 215-221.
- Kreis, D.S., Bergstrom, D.A., Gonzalez, A.M., Huang, K.-X., Sibley, D.R., and Walters, J.R. 1995. Dopamine receptors agonist potencies for inhibition of cell firing correlate with dopamine D₃ receptor binding affinities. *Eur. J. Pharmacol.* 277: 209-214.
- Lazareno, S., Marriott, D.B., and Nahorski, S.R. 1985. Differential effect of selective and non-selective neuroleptics on intracellular and extracellular cyclic AMP accumulation in rat striatal slices. *Brain Res.* 361: 91-98.
- Lejune, F., and Millan, M.J. 1995. Activation of dopamine D₃ autoreceptors inhibits firing of ventral tegmental dopaminergic neurons in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* 275: R7-R9.
- Levesque, D., Diaz, J., Pilon, C., Martres, M.P., Giros, B., Souil, E., Schott, D., Morgat, J.L., Schwartz, J.C., and Sokoloff, P. 1992. Identification, characterization and localization of the dopamine D₃ receptor in rat brain using 7-[³H]hydroxy-N,N-din-propyl-2-aminotetralin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 8155-8159.
- Levesque, D. 1996. Aminotetralin drugs and D₃ receptor functions. What may partially selective D₃ receptor ligands tell us about dopamine D₃ receptor functions? *Biochem. Pharmacol.* 4: 511-518.
- MacKenzie, R.G., Van Leeuwen, D., Pugsley, T.A., Shih, Y.H., Demattos, S., Tang, L., Tood, R.D., and O'Malley, K.L. 1994. Characterization of the human dopamine D₃ receptor expressed in transfected cell lines. *Eur. J. Pharmacol.* 266: 79-85.
- McAllister, G.M., Knowless, M.R., Ward-Booth, S.M., Sinclair, I.A., Patel, S., Marwood, R., Emms, F., Smith, A., Seabrook, G.R., and Freedman, S.B. 1995. Functional coupling of human D₂, D₃, D₄ dopamine receptor in HEK293 cells. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 15: 267-281.
- Missale, C., Castelletti, L., Mema, M., Carruba, O.M., and Spano, P. 1988. Identification and characterization of postsynaptic D₁ and D₂ dopamine receptors in the cardiovascular system. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 11: 643-650.
- Missale, C., Nash, R.S., Robinson, W.S., Jaber, M., and Caron, G.M. 1998. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* 78(1): 189-225.
- Ozono, R., O'Connell, P., Vaughan, C., Botkin, J.S., Walk, F.S., Felder, A.R., and Carey, M.R. 1996. Expression of the subtype 1A dopamine receptor in the rat heart. *Hypertension*, 27: 693-703.
- Ozono, R., O'Connell, P.D., Wang, Q.Z., Moore, F.A., Sanada, H., Felder, A.R., and Carey, M.R. 1997. Localization of the dopamine D₁ receptor protein in the human heart and kidney. *Hypertension*, 30(3): 725-729.
- Potenza, M.N., Graminski, G.F., Schmauss, C., and Lerner, M.R. 1994. Functional expression and characterization of human D₂ and D₃ dopamine receptors. *J. Neurosci.* 14: 1463-1476.
- Ricci, A., Collier, W.L., and Amenta, F. 1994. Pharmacological characterization and autoradiography localization of dopamine receptors in the portal vein. *J. Auton. Pharmacol.* 14: 61-68.
- Ricci, A., Bronziti, E., Fedele, F., Ferrante, F., Zaccheo, D., and Amenta, F. 1998. Pharmacological characterization and autoradiographic localization of a putative dopamine D₄ receptor in the heart. *J. Auton. Pharmacol.* 18: 115-21.
- Rump, C.L., Knorrenshild, R.G., Schwertfeger, E., Bohmann, C., Spillner, G., and Schollmeyer, P. 1995. Dopaminergic and α -adrenergic control of neurotransmission in human right atrium. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 26: 462-470.
- Sautel, F., Griffon, N., Levesque, D., Pilon, C., Schwartz, J.C., and Sokoloff, P. 1995. A functional test identifies dopamine agonist selective for D₃ versus D₂ receptors. *Neuroreport*, 6: 329-332.
- Schoemaker, H. (1993) [³H] 7-OH-DPAT labels both dopamine D₃ receptors and sigma sites in the bovine caudate nucleus. *Eur. J. Pharmacol.* 242(3): R1-R2.
- Schwartz, J., Levesque, D., Martes, P.M., and Sokoloff, P. 1993. Dopamine D₃ receptor: basic and clinical aspects. *Clin. Neuropharmacol.* 16: 295-314.
- Shafer, R.A., and Levant, B. 1998. The D₃ dopamine receptor in cellular and organismal function. *Psychopharmacology*, 135: 1-16.
- Sotnikova, T.D., Gainetdinov, R.R., Grekhova, T.V., and Rayevsky, K.S. 2001. Effects of intrastratial infusion of D₂ and D₃ dopamine receptor preferring antagonist on dopamine release in rat dorsal striatum (in vivo microdialysis study). *Pharmacol Res.* 43: 283-290.
- Solomon, Y., Lontos, C., and Rodbell, M. 1974. A highly sensitive adenylate cyclase assay. *Anal. Biochem.* 58: 541.
- Tang, L., Todd, R.D., Heller, A., and O'Malley, K.L. 1994. Pharmacological and functional characterization of D₂, D₃ and D₄ dopamine receptor in fibroblast and dopaminergic cell lines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268: 495-502.
- Vallar, L., and Meldolesi, J. 1989. Mechanism of signal transduction at the dopamine D₂ receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 10: 74-77.
- Weiss, S., Serebn, M., Garcia-Safnz, J.A., and Dockaert, J. 1985. D₂ dopamine receptors mediated inhibition of cyclic AMP formation in striatal neurons in primary culture. *Mol. Pharmacol.* 27: 595-599.