

3  
2 ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

"LA REGULACION DE RECEPTORES CEREBRALES  
NORADRENERGICOS  $\infty$  POR FARMACOS  
AGONISTAS Y ANTAGONISTAS"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
P R E S E N T A N :

MARIA EUGENIA ALVAREZ CORREA  
MARIA GUADALUPE PATRICIA JIMENEZ RIVERA

ASESOR: O.F.B. MARICELA NOE MARTINEZ



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1993



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## C O N T E N I D O

	Pág.
1.       Objetivos .....	1
2.       Introducción .....	2
3.       Materiales y Métodos .....	16
3.1    Lista de Equipo, Material y Reactivos .....	16
3.1.1   Equipo .....	16
3.1.2   Material .....	17
3.1.3   Reactivos .....	18
3.2    Animales y Tratamiento .....	19
3.3    Sacrificio y Disección .....	20
3.4    Obtención de la Muestra Biológica .....	21
3.4.1   Para los Receptores Noradrenérgicos $\alpha_1$ .....	21
3.4.2   Para los Receptores Noradrenérgicos $\alpha_2$ .....	22
3.5    Técnica de la Unión del Ligando Específico al Receptor Noradrenérgico $\alpha_1$ .....	24
3.6    Técnica de la Unión del Ligando Específico al Receptor Noradrenérgico $\alpha_2$ .....	27
4.       Resultados .....	30

4.1	Efecto Crónico de Anfetamina en la Población de los Receptores Noradrenérgicos $\alpha_1$ , en Diferentes Areas del Cerebro de Rata .....	37
4.2	Efecto Crónico de Anfetamina en la Población de los Receptores Noradrenérgicos $\alpha_2$ , en Diferentes Areas del Cerebro de Rata .....	39
4.3	Efecto Crónico de Prazosina sobre la Población de Receptores Noradrenérgicos $\alpha_1$ , en Diferentes Areas del Cerebro de Rata .....	43
4.4	Efecto Crónico de Prazosina sobre la Población de Receptores Noradrenérgicos $\alpha_2$ , en Diferentes Areas del Cerebro de Rata .....	45
4.5	Efecto Crónico de Atipamezole sobre la Población de los Receptores Noradrenérgicos $\alpha_1$ , en Diferentes Areas del Cerebro de Rata .....	48
4.6	Efecto Crónico de Atipamezole sobre la Población de los Receptores Noradrenérgicos $\alpha_2$ , en Diferentes Areas del Cerebro de Rata .....	50
4.7	Constantes de Disociación .....	53
5.	Discusión .....	55
6.	Conclusiones .....	66
7.	Abreviaturas .....	69
8.	Referencias .....	71

## 1. OBJETIVOS

- Determinar cuantitativamente por la técnica de "Unión" (Binding) la población de receptores noradrenérgicos  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ , y sus constantes de afinidad en diferentes áreas del cerebro de la rata.
- Administrar crónicamente fármacos agonistas y antagonistas a dichos receptores para determinar su acción sobre éstos.
- Demostrar si hay modulación con estos fármacos (Anfetamina, Prazosina y Atipamezole) y por ende en la neurotransmisión respectiva por receptores  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  noradrenérgicos.
- En caso de encontrar que existe modulación de la población de receptores noradrenérgicos  $\alpha$ , determinar si es del mismo tipo en las diferentes áreas del cerebro de rata.
- A través de los objetivos anteriores tratar de conocer mejor como trabaja el sistema noradrenérgico en relación al funcionamiento del cerebro.

## 2. INTRODUCCION

Dentro del sistema nervioso central se localiza el llamado sistema noradrenérgico, el cual se ha visto que regula funciones fisiológicas como sueño ( Hobson 1976; Jouvet 1969 ), aprendizaje ( Flood 1976; Crow 1976 ), memoria ( Flood 1976 ), emoción ( Redmon 1977 ), despertar ( Segal 1976; y 1978 ) y funciones cardiovasculares ( Snyder 1975 ). Como las bases neurofisiológicas de estas funciones no se conocen bien, los detalles de la participación de la noradrenalina en dichos fenómenos quedan por ser délcuidados.

El sistema nervioso autónomo también tiene receptores noradrenérgicos ( Bacq y Fisher 1947 ). En general, el sistema nervioso autónomo regula las actividades de estructuras que no están bajo el control voluntario y que habitualmente funcionan por debajo del nivel consciente. Así es que las funciones cardiovasculares, presión arterial, respiratoria, circulatoria, digestiva, temperatura corporal, metabólica, y las secreciones de ciertas glándulas endócrinas y exócrinas están reguladas al menos en forma parcial por el sistema nervioso autónomo ( Cannon 1921 y 1929 ). Por esta razón el equilibrio del medio interno del organismo está

controlado en gran parte por este sistema.

El conocimiento de la localización y función de las neuronas y vías noradrenérgicas ha progresado rápidamente, gracias al desarrollo de procedimientos de histofluorescencia con vapor de formaldehído ( Dahlström 1964; Lindvall 1978; Falck 1962 ), técnicas de inmunohistoquímicas ( Geffen 1969 ) y técnicas de inmunocitoquímica ( Sternberger 1979; Grzanna 1978 ). Concentraciones relativamente grandes de noradrenalina aparecen dentro del hipotálamo y en ciertas zonas del sistema límbico ( Brownstein 1974 ), así como en el núcleo central de la amígdala ( Lindvall 1978 ) y la circunvolución dentada del hipocampo ( Koda 1977 ). Pero esta catecolamina también está presente en cantidades significativas pero menores en casi todas las regiones del encéfalo.

Estudios que han desarrollado mapas detallados indican que casi todas las neuronas noradrenérgicas surgen de un núcleo localizado en la protuberancia el " locus coeruleus " ( Amaral 1977 ) ó bien en neuronas de la porción tegmental lateral de la formación reticular ( Moore 1982 ). Desde estas neuronas, múltiples proyecciones ramificadas inervan células efectoras específicas en gran número de campos corticales, subcorticales y espinomodulares ( Foote 1983 ). Las neuronas

del locus coeruleus se proyectan de la protuberancia al cerebelo, a la médula espinal, al tálamo y a varias zonas corticales, pero la función de estas regiones efectoras no se interrumpe cuando las fibras noradrenérgicas se destruyen experimentalmente indicando que las neuronas noradrenérgicas -- forman una estructura funcionalmente paralela, pero no jerárquica ( Thoenen 1973; Johsson 1975; Cash 1985 ).

El locus coeruleus contiene 43 % de todas las neuronas productoras de noradrenalina en el cerebro de la rata y ellas envían proyecciones especialmente a estructuras neocorticales ( Savaki 1982 ). Entre las regiones que se encuentran inervadas están la neocorteza, hipocampo, tálamo y cerebelo -- ( Lindvall 1978 ). También el núcleo intersticial de la estria terminalis recibe una densa inervación noradrenérgica y tiene conexiones con los núcleos septal, preóptico, hipotalámico y áreas amigdaloides y del tractus solitarius ya que toda esta región del encéfalo es rica en cuerpos celulares y terminales nerviosas que contienen noradrenalina ( Savaki 1982 ).

Por estudios histoquímicos se revela que en el cerebro de rata la noradrenalina, dopamina y serotonina se localizan en sistemas específicos de neuronas, dando así un firme apo-



yo a la visión de que estas sustancias pueden servir como transmisores en algunas sinápsis del sistema nervioso central.

Ahlquist ( 1948 ) propuso que existen dos clases de receptores noradrenérgicos,  $\alpha$  y  $\beta$ . Lands y cols., (1967) descubrieron que la clase de receptores  $\beta$  consiste en dos subtipos:  $\beta_1$  responsable esencialmente de la estimulación cardíaca y depresión intestinal; y  $\beta_2$  responsable de la acción depresora sobre bronquios ( broncodilatación ) y arteriolas ( vasodilatación ).

La primera propuesta de la subclasificación de los receptores noradrenérgicos  $\alpha$  dentro de las categorías  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  fué hecha por Langer en 1974 ( Langer 1974 ). El tipo  $\alpha_1$  es referido como un receptor postsináptico  $\alpha$ , el cuál inicia la respuesta de tejidos efectores, mientras que el tipo  $\alpha_2$  constituye el receptor presináptico  $\alpha$ , Berthelsen y Pettinger ( 1977 ) propusieron una clasificación similar, pero sobre una base funcional en vez de una base anatómica a fin de explicar la posibilidad de que los receptores  $\alpha_2$  puede también ocurrir también en otras regiones de la neurona además del área presináptica.

Posteriormente Starke y Langer ( 1979 ) puntualizaron - que los receptores presinápticos son definidos por la función que ellos controlan, la modulación de la liberación del transmisor, mientras que los receptores noradrenérgicos  $\alpha_2$  están caracterizados y definidos por sus relativas afinidades por agonistas y antagonistas. Por lo tanto, el término receptor noradrenérgico  $\alpha_2$  debe ser usado en el contexto de sus características farmacológicas. La subclasificación de los receptores noradrenérgicos  $\alpha$  es por lo tanto independiente de su localización anatómica y es basado exclusivamente sobre las características farmacológicas. Así que los receptores del tipo excitatorio son designados  $\alpha_1$  y los del tipo inhibitorio,  $\alpha_2$  es ahora ampliamente aceptada ( Melchiorre 1980 ).

Las diferencias farmacológicas entre receptores noradrenérgicos  $\alpha$  presinápticos y postsinápticos tiene implicaciones funcionales importantes, porque la liberación modulada por receptores presinápticos y es posible activarla o bloquearla selectivamente por agonistas o antagonistas administrados para modificar la liberación de noradrenalina, con pequeños o insignificantes efectos sobre los correspondientes receptores  $\alpha$  postsinápticos ( Langer 1981 ).

Como ya se ha dicho existen receptores noradrenérgicos postsinápticos y receptores noradrenérgicos presinápticos, cuya estimulación puede regular la liberación del transmisor químico noradrenalina por estimulación nerviosa, constituyendo mecanismos de retroalimentación ( Langer 1981 ). Es así que una vez liberada la noradrenalina, si alcanza concentraciones elevadas en la hendidura sináptica estimula receptores presinápticos que llevan una inhibición de dicha liberación, estos receptores pueden ser bloqueados por la fentolamina ( droga antagonista adrenérgica  $\alpha$  ), con aumento de la liberación de la noradrenalina. Por su parte, la liberación de pequeñas cantidades del transmisor noradrenérgico -- estimula receptores beta presinápticos que provocan aumento de la liberación de la noradrenalina; esto último se demuestra por el hecho que el isoproterenol, droga noradrenérgica beta aumenta la liberación del neurotransmisor noradrenalina durante la estimulación nerviosa, lo que es prevenido por el propanolol, droga bloqueante noradrenérgica beta ( Langer 1981 ).

En el presente trabajo se trata de establecer mediante la técnica de " Unión " ( Binding ) que consiste en el uso de un radioligando marcado, el cual se une específicamente a sitios de unión de los mencionados receptores, si el sis-

tema noradrenérgico es un sistema con capacidad de automodulación en sus receptores, cuando se suministran crónicamente fármacos agonistas y antagonistas selectivamente para los receptores  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ , los cuales serán anfetamina ( agonista  $\alpha_1$  ), prazosina ( antagonista  $\alpha_2$  ) y atipamezole ( antagonista  $\alpha_2$  ).

Los auténticos receptores deben tener las siguientes propiedades:

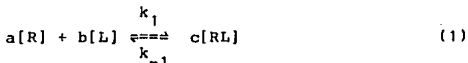
1. Saturabilidad.- La gran mayoría de los receptores se encuentran en la superficie celular. Puesto que hay un número finito de receptores en la célula, se deduce que una curva de dosis-respuesta para la fijación de un ligando debe manifestar saturabilidad.

2. Especificidad.- Este es uno de los criterios más difíciles e importantes que se debe llenar, no sólo por la enorme cantidad de sitios de unión no específicos si se les compara con los sitios de receptores en los tejidos, sino también debido a la avidez con la cual las superficies inertes fijan los ligandos. Es obvio que la especificidad significa que sólo se deben encontrar receptores en células que se sabe responde al transmisor particular o a la hormona bajo estudio.

Más aún, es cierta la evidencia de una correlación entre la capacidad fijadora de una serie de ligandos y la respuesta biológica producida por esta serie.

3. Reversibilidad.- Puesto que los transmisores, hormonas y la mayor parte de los medicamentos actúan en forma reversible, se deduce que la unión de estos agentes a los receptores -- también debe ser reversible. También es de esperarse que el ligando de un receptor reversible, no sólo debe ser disociable sino recuperable en su forma natural ( por ejemplo, no metabolizado ). Esta última afirmación diferencia las interacciones receptor-agonista pero no la unión receptor-antagonista a partir de reacciones enzima-substrato.

Los estudios de unión a receptores usualmente sigue una cinética muy similar a la de la clásica interacción enzima-substrato. Para interacciones reversibles ligando-receptor donde [ R ] = concentración de sitios receptores no ocupados, [ L ] = concentración de ligando libre, [ RL ] = concentración del complejo receptor-ligando:



describe un fenómeno general de unión reversible con a, b, y c representando la estequiometría de la reacción. Al equilibrio, la velocidad de la reacción hacia delante iguala la velocidad de reversa de la reacción:

$$k_1[R]^a[L]^b = k_{-1}[RL]^c \quad (2)$$

La constante de unión al equilibrio puede después ser definida como una constante de asociación ( $K_A$ ) :

$$K_A = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[RL]^c}{[R]^a[L]^b} \quad (3)$$

ó como una constante disociación ( $K_D$ ) :

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[R]^a[L]^b}{[RL]^c} \quad (4)$$

Así la determinación experimental de las constantes de afinidad de unión al equilibrio para las reacciones reversibles requieren de los experimentos que se realicen bajo condiciones de estado-constante.

Otra propiedad de las interacciones ligando-receptor es

la saturabilidad, que es, únicamente un número finito de sitios receptores específicos por unidad de tejido. Este número máximo de sitios receptores específicos es usualmente designado como  $B_{\max}$  :

$$[RL] + [R] = B_{\max}$$

Multiplicando por  $[L]$  :

$$[RL] [L] + [R] [L] = B_{\max} [L]$$

$$[RL] [L] + \frac{[RL]}{[RL]} [R] [L] = B_{\max} [L]$$

Sustituyendo Ec. (4) con  $a = b = c = 1$  :

$$[RL] [L] + [RL] K_D = B_{\max} [L]$$

$$[RL] ( [L] + K_D ) = B_{\max} [L]$$

$$[RL] = \frac{B_{\max} [L]}{[L] + K_D}$$

Esta es la clásica ley de acción de masas para interacciones enzima-substrato adaptada para interacciones receptor ligando. Si ahora definimos RL como ligando unido = B, y L como ligando libre = F, de la EC. 5 :

$$B = \frac{B_{\max} F}{F + K_D}$$

$$BF + BK_D = B_{\max} F$$

Dividiendo entre F :

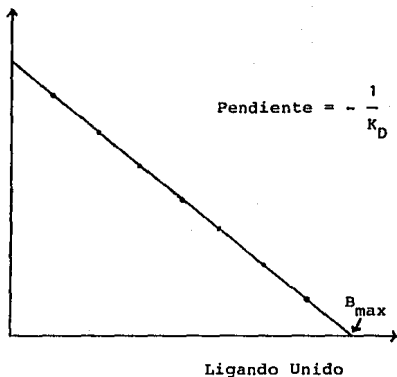
$$B + \frac{B}{F} K_D = B_{\max}$$

$$B/F = \frac{B_{\max} - B}{K_D}$$

Esta es la ecuación de Scatchard. Así conociendo las concentraciones de ligando unido y libre al equilibrio permite la determinación de la constante de unión al equilibrio ( $K_D$ ) y el número máximo de sitios de unión ( $B_{\max}$ ).



$\frac{\text{Ligando Unido}}{\text{Ligando Libre}}$



La amfetamina y demás fenilisopropilaminas son simpaticomiméticos indirectos, es decir que actúan aumentando la liberación del transmisor químico la noradrenalina, en las terminaciones nerviosas simpáticas. La hipótesis de la noradrenalina en la depresión nerviosa sugiere que la misma se debe a una deficiencia de dicho transmisor químico a nivel de ciertos centros cerebrales. Esto puede aceptarse, ya que los efectos estimulantes centrales de las fenilisopropilaminas se deben a una liberación de la noradrenalina en las neuronas, que produce dichos efectos ( Litter 1980 ).

Hay evidencia, de que la prazosina puede cruzar la barrera hematoencefálica aumentando la posibilidad de un sitio de acción cardiovascular central. Además, estudios de unión a radioligandos muestran que la [  $^3\text{H}$  ] prazosina es un antagonista selectivo de alta afinidad de los receptores  $\alpha_1$  -- noradrenérgicos de membranas del cerebro. Recientemente se determinó que la prazosina reduce el flujo simpático nervioso de el cordón espinal por bloqueo de los receptores noradrenérgicos  $\alpha_1$  en un sitio indeterminado dentro del sistema nervioso central. La presencia de los receptores noradrenérgicos  $\alpha_1$  farmacológicamente caracterizados en dos áreas del cerebro; el núcleo raphe dorsal y el núcleo geniculado dorsal lateral ha permitido examinar los efectos centrales del antagonista prazosina, sobre el receptor noradrenérgico  $\alpha_1$ , -- cuando ésta es administrada sistemática y localmente a el nivel de la neurona ( Menkes 1981 ).

El atipamezole es un nuevo y selectivo antagonista específico a receptores noradrenérgicos  $\alpha_2$ . Tiene la habilidad de antagonizar el comportamiento y efecto neuroquímico de dos agonistas de receptores noradrenérgicos  $\alpha_2$  ( detomidina y metomidina ). El fármaco causa dosis-dependencia, rápida y relativamente larga, incrementa la noradrenalina, puesto que los antagonistas  $\alpha_2$  causan un incremento en la liberación

de noradrenalina de las neuronas noradrenérgicas centrales - por bloqueo presináptico inhibiendo la liberación de los auto receptores. El coeficiente de selectividad  $\alpha_2 / \alpha_1$  del atipamezole en unión al receptor fue 8500 comparado a 27 del idazoxan el cual es un antagonista relativamente específico a receptores noradrenérgicos  $\alpha_2$ .

Por lo tanto, la identificación de los receptores noradrenérgicos específicos involucrados en respuestas excitatorias e inhibitorias es claramente un prerrequisito, a la subsecuente caracterización de sus mecanismos de acción celulares.

Una vez que la presencia y la identidad de los receptores esta establecida, esta información puede ser usada para caracterizar el funcionamiento del sistema noradrenérgico en el sistema nervioso central y por lo tanto los efectos de la noradrenalina en vivo y demostrar que las respuestas excitatorias e inhibitorias son medidas por diferentes tipos de receptores noradrenérgicos.

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1 LISTA DE EQUIPO, MATERIAL Y REACTIVOS

##### 3.1.1 EQUIPO

- 1.- Homogenizador con embolo de teflón con 0.018 mm de paso de luz.
- 2.- Centrífuga Internacional.
- 3.- Centrífuga Sorvall con rotor SS-34.
- 4.- Homogenizador Polytron.
- 5.- Baño de incubación con agitación.
- 6.- Ollas de filtración.
- 7.- Secadora de Aire.
- 8.- Contador líquido de centelleo Beckman LS 7800.
- 9.- Cronómetro.
- 10.- Vortex.
- 11.- Espectrofotómetro.
- 12.- pHmetro.
- 13.- Lámpara.

### 3.1.2 MATERIAL

- 1.- Caja de Petri.
- 2.- Tubos de Ensaye.
- 3.- Matraces Volumétricos.
- 4.- Pipetas Pasteur.
- 5.- Viales.
- 6.- Tubos de nalgene de fondo cónico de 50 ml.
- 7.- Tubos de nalgene de fondo redondo de 50 ml.
- 8.- Vasos de precipitados.
- 9.- Probetas.
- 10.- Tijeras.
- 11.- Pipetas graduadas.
- 12.- Pipetas volumétricas.
- 13.- Papel Whatman GF/B.
- 14.- Micropipetas.
- 15.- Jeringas de 10, 50, 100 y 500  $\mu$ l.

### 3.1.3 REACTIVOS

- 1.- Anfetamina.
- 2.- Prazosina.
- 3.- Atipamezole.
- 4.- Solución Salina al 0.9 %.
- 5.- Solución de Sacarosa 0.3 M.
- 6.- Amortiguador Tris 50 mM a pH 7.4 con 0.5 mM de PMSF.
- 7.- Amortiguador de Fosfatos de Sodio y Potasio 50 mM a pH 7.5 con 0.5 mM de PMSF.
- 8.- Fentolamina  $1 \times 10^{-6}$  M.
- 9.- 7-metoxi-[ $^3$ H]-Prazosina.
- 10.- [ $^3$ H]-RX 781094 : Clorhidrato de ( 1,4-6,7-[ $^3$ H]benzodioxan-2-il )-2-imidazolino.
- 11.- Tolueno.
- 12.- PPO 3 g/l.
- 13.- POPOP 0.3 g/l.
- 14.- Nitrógeno líquido.
- 15.- Albumina bovina.

### 3.2 ANIMALES Y TRATAMIENTO :

Se emplearon lotes de 32 ratas machos de la cepa Winstar Porton de 230-250 g de peso cada una. Para comprobar el efecto de cada fármaco, se utilizaron dos lotes de animales, los que se pesaron diariamente para calcular la cantidad del fármaco a administrar dependiendo de la dosis. De cada lote, 16 ratas elegidas al azar formaron el grupo testigo al que se le administró únicamente el vehículo ( solución salina al 0.9 % ) en que se disuelve el fármaco.

La administración de la dosis indicada de fármaco fue - cada 12 hrs. durante 10 días. Los fármacos empleados en este estudio fueron :

- a) Anfetamina administrada por vía intradérmica (0.75 mg/kg);
- b) Prazosina por vía intraperitoneal ( 1.0 mg/kg );
- c) Atipamezole por vía intraperitoneal ( 3.5 mg/kg ).

A los animales se les mantuvo en un lugar adecuado, con alimento y agua suficiente con sus cajas limpias. También fué importante observar el comportamiento de los animales después de cada administración.

### 3.3 SACRIFICIO Y DISECCION :

Después de dos horas de la última administración se llevó a cabo el sacrificio de los animales por decapitación, lo cual se hizo en el interior de un cuarto frío manteniendo una temperatura de 4 °C. Las cabezas se sumergieron en nitrógeno líquido por 4 segundos, después se extrajeron los cerebros y se depositaron en una caja de petri conteniendo una base de papel absorbente mojado con una solución salina al 0.9% y esta caja estuvo sobre hielo para la disección de los cerebros.

Con ayuda de instrumental apropiado se efectuó la disección de los cerebros, obteniendo las siguientes áreas : núcleo caudado, corteza frontal, hipocampo, amígdala y la corteza tempoparietal.

Todas las áreas iguales se juntan y éstas se lavaron 2 veces en solución salina 0.9% fría, decantando el líquido y luego se pesó el tejido húmedo.

Cada área se corta finamente quedando los cortes de aproximadamente 2 mm por lado y también se sometieron a un lavado con solución salina fría, decantando nuevamente.



### 3.4 OBTENCION DE LA MUESTRA BIOLÓGICA :

#### 3.4.1 Para los receptores Noradrenérgicos $\alpha_1$ :

Para homogenizar el tejido, se utilizó sacarosa 0.3 M con 0.5 mM PMSF en una relación de 1:10 ( p/v ) y con 3 movimientos completos de pistón en un homogenizador con embolo de teflón con 0.018 mm de paso de luz.

Una vez terminado el homogenizado, se repartió en tubos de nalgene de 50 ml de fondo cónico, y se centrifugó a 175 xg ( 900 rpm ) por 10 minutos en un cabezal de columpio en una centrífuga Internacional a 4 °C.

A continuación se extrajo el sobrenadante con mucho cuidado para no traerse la pastilla la cual se desechó y el sobrenadante se diluyó en una relación 1:50 ( p/v ) con amortiguador Tris 50 mM a pH 7.4 con 0.5 mM de PMSF, enseguida se centrifugó a 37,000 xg ( 17500 rpm ) durante 15 minutos en un rotor SS-34 en una centrífuga Sorvall a 4 °C.

Con una pipeta Pasteur se desechó el sobrenadante y las

pastillas se resuspendieron con el mismo amortiguador con una relación 1:20 ( p/v ) y se centrifugaron nuevamente a 17500 rpm por 15 minutos. Finalmente la pastilla se resuspendió en el mismo amortiguador a razón de 1:10 ( p/v ) a partir de una alícuota de 100  $\mu$ l de cada área y cada grupo se determinó la cantidad de proteína por el método de Lowry ( 1951 ). Las preparaciones se guardarón en el congelador hasta su utilización en las determinaciones del método de Unión.

#### 3.4.2 Para los Receptores Noradrenérgicos $\alpha_2$ :

Las áreas del cerebro por estudiar se homogenizaron con solución amortiguadora de fosfatos de sodio/potasio de 50 mM a pH 7.5 que contendrá 0.5 mM de PMSF a razón de 1:20 ( p/v ), con tres movimientos completos de pistón, en un homogenizador de embolo de teflón. Después se centrifugó en un cabezal de columpio en la centrífuga Internacional a 1000 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 4 °C, ésto se hizo con el fin de eliminar los núcleos y eritrocitos, para ello se eliminó la pastilla y el sobrenadante se diluyó en 30 volúmenes del -- amortiguador de fosfatos de sodio/potasio. Para romper las - membranas se usó un homogenizador Polytrón en la posición No.

5 por 30 segundos. Una vez obtenidas las membranas se centri  
fugarón en una centrifuga Sorvall a 37000 xg durante 20 minu  
tos, se desecharon el sobrenadante y las membranas se lava--  
ron y resuspendieron en el mismo amortiguador y se recentri-  
fugaron bajo las mismas condiciones. La pastilla final se re  
suspendió en 50 volúmenes del amortiguador y a partir de la  
alícuota de 100  $\mu$ l de cada área y cada grupo se determinó la  
cantidad de proteína por el método Lowry ( 1951 ). Las prepa  
raciones se guardaron en el congelador hasta su utilización  
en las determinaciones del método de Unión.

### 3.5 TECNICA DE LA UNION DEL LIGANDO ESPECIFICO AL RECEPTOR NORADRENERGICO $\alpha_1$ :

Reactivos :

Ligando Marcado.- 7-metoxi-[  $^3\text{H}$  ]-Prazosina.

Actividad específica.- 85 Ci/mmol .

Ligando Frío.- Fentolamina ( antagonista desplazador ).

La unión del ligando marcado a los receptores noradre -  
négricos se determinó mediante la técnica de " Unión ", que  
se llevó a cabo de la siguiente manera:

Para obtener la curva de saturación de tal Unión, los  
ensayos que se hicieron para cada concentración fueron por  
quintuplicado. La cantidad de proteína que se usó fue siem-  
pre la misma para cada área con su respectivo control en ca  
da tubo ( aproximadamente 600  $\mu\text{g}$  de proteína ), a continua-  
ción se adicionó el volumen del amortiguador Tris 50 mM a -  
pH 7.4 hasta completar 1 ml ( menos el volumen del ligando ).

Los tubos se preincubaron 30 minutos a 30 °C con inter-  
valos de 20 segundos entre muestra y muestra. Al cumplirse

los 30 minutos de preincubación al primer tubo se le adicionó el volumen del ligando de la apropiada concentración de [<sup>3</sup>H]-Prazosina (0.0025, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.3 nM), se agitó y a partir de ese momento se inició la incubación esta duró 45 minutos en un baño con agitación. La adición del ligando siguió el mismo orden, y tiempo de incubación, filtración y lavado.

Al término de este período de incubación, la muestra se agitó y se tomaron 800  $\mu$ l con una micropipeta los cuales se filtraron bajo presión de -200 mm Hg a través de discos de papel Whatman GF/B de 26 mm de diámetro, previamente húmedos con 1 ml del mismo amortiguador, los cuales inmediatamente después de depositar la muestra se lavaron dos veces con 8 ml del mismo amortiguador frío ( 4°C ).

Los filtros se secaron con una corriente de aire caliente durante 30 minutos y se pasaron a viales precontados, con 8 ml de líquido de centelleo ( que contiene PPO 3 g/l, POPOP 0.3 g/l disueltos en tolueno ) y se cuantificarán por 20 minutos, en un Contador Líquido de Centelleo Beckman LS 7800 con una eficiencia del 59 % y una desviación estándar en la variabilidad de su conteo.

Para la curva de unión inespecífica, la fentolamina se adicionó a una concentración de  $1 \times 10^{-6}$  M antes de la preincubación y este volumen se restó del amortiguador Tris, -siguiendo después del mismo procedimiento de la curva de saturación.

### 3.6 TECNICA DE LA UNION DEL LIGANDO ESPECIFICO AL RECEPTOR NORADRENERGICO $\alpha_2$ :

#### Reactivos :

Ligando marcado.- [ $^3\text{H}$ ]-RX781094 ( 1,4-6,7- [ $^3\text{H}$ ]benzodioxan-2-yl ) -2-imidazoline hydrochloride.

Actividad Específica.- 40 Ci/mmol .

Ligando Frío.- Fentolamina ( Antagonista desplazador ).

De manera similar, los receptores  $\alpha_1$  se estudiaron los receptores noradrenérgicos  $\alpha_2$ . Esta determinación se llevó a cabo empleando el antagonista selectivo [  $^3\text{H}$  ] - RX781094.

Para obtener la curva de saturación de tal unión los ensayos se hicieron por quintuplicado para cada concentración de ligando. La cantidad de proteína a usar fué siempre la -- misma para cada área y con su respectivo control en cada tubo ( aproximadamente 1 mg de proteína ). A continuación se adicionó el volumen del amortiguador de fosfatos sodio/potasio a pH 7.5 50 mM que contuvo 0.5 mM de PMSF hasta completar 1 ml ( menos el volumen del ligando ).

La reacción se inició añadiendo el ligando [  $^3\text{H}$  ] - RX781094 a las concentraciones indicadas ( 0.5, 1, 2, 3, 5, 8 y 10 nM ), en un volumen final de 1 ml ajustado con solución amortiguadora, se agitó y a partir de ese momento se inció la incubación la cual duró 60 minutos a 25 °C en un baño con agitación. A igual que en la técnica de Unión para los - receptores noradrenérgicos  $\alpha_1$ , los intervalos entre muestra y muestra fueron de 20 segundos durante la adición del ligando en la incubación, filtración y lavado.

Al término de este período de incubación, la muestra se agitó y se tomaron 800  $\mu\text{l}$  con una micropipeta, éstos se filtraron bajo presión de -200 mm Hg a través de discos de papel Whatman GF/B de 26 mm de diámetro, previamente húmedos con 1 ml del mismo amortiguador, los cuales inmediatamente después de depositar la muestra se lavaron dos veces con 8 ml del -- mismo amortiguador frío ( 4 °C ). los filtros se secaron con una corriente de aire caliente durante 30 minutos y se pasaron a viales precontados con 8 ml de líquido de centelleo ( que contiene PPO 3 g/l, POPOP 0.3 g/l disueltos en tolueno) y se cuantificaron por 20 minutos, en un Contador Líquido de Centelleo Beckman LS 7800 con una eficiencia del 59% y una desviación estándar en el conteo.



Para la curva de unión de inespecífica, la fentolamina se adicionó a una concentración de 10  $\mu$ M antes de la incubación y este volumen se restó de la solución amortiguadora de fosfatos sodio/potasio, siguiendo después el mismo procedimiento de la curva de saturación antes descrita.

#### 4. RESULTADOS

La unión específica del ligando  $^3\text{[ H ]}$ -Prazosina a receptores noradrenérgicos  $\alpha_1$  de membranas de diferentes áreas del cerebro de rata ( corteza frontal, corteza temporeital, hipocampo, amígdala y núcleo caudado ), se puede ver -- que es un proceso saturable, las concentraciones utilizadas para esta curva están en el rango de 0.0025 - 0.5 nM, en general la unión específica es la diferencia entre la unión -- total y la unión inespecífica, que ocurre en presencia de un exceso de concentración del ligando no marcado, por arriba - de 500 veces la concentración de su kd, en este caso fué fen<sub>t</sub>olamina 10  $\mu\text{M}$ . Para la unión específica de receptores noradrenérgicos  $\alpha_2$  se utilizó el ligando  $^3\text{[ H ]}$ -RX781094, pero a diferentes rangos de concentraciones; 0.5 - 0.8 nM y como ligando frío se empleó fentolamina 10  $\mu\text{M}$ . En este estudio ob<sub>s</sub>ervamos que se alcanzó un estado de saturación en la mayoría de las curvas totales y por consiguiente de las curvas espe<sub>c</sub>íficas.

La fig. No. 1 muestra la unión total e inespecífica del ligando  $^3\text{[ H ]}$ - Prazosina a los receptores noradrenérgicos  $\alpha_1$ , del núcleo caudado. La diferencia de la curva total y

su curva inespecífica da como resultado la unión específica ( ver fig. No. 2 ). En esta figura podemos ver claramente -- las curvas específicas tanto del grupo tratado con anfetamina, como del grupo testigo, gracias a este tipo de determinaciones podemos visualizar el comportamiento de la población de los receptores noradrenérgicos  $\alpha_1$ , en diferentes áreas cerebrales.

El cálculo de estos cambios entre los grupos tratados y testigo, se hizo por medio del programa de computación " Ligand " ( Munson y Rodbard 1980 ) que es un análisis de regresión múltiple no lineal, el que nos reporta los valores de  $B_{max}$  y  $K_d$ . Con ellos podemos determinar si hay o no diferencias significativas en la población (  $B_{max}$  ) de receptores noradrenérgicos, después del tratamiento crónico con fármacos adrenérgicos agonistas y antagonistas de receptores  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ , pues recordemos que el valor de  $B_{max}$  se refiere a un número finito de sitios específicos del receptor por unidad de proteína lo que nos permite hacer una comparación de los grupos tratados con respecto a los grupos testigo ( Fig. 3 ).

Si en una gráfica, el coeficiente de Hill ( Co. Hill ) nos da un valor de uno, se dice que hay unión a un solo tipo de receptor y además que la curva de saturación técnicamente

está bien hecha. En muchas ocasiones, la pendiente resulta ser no lineal y dar un valor diferente a la unidad, este hecho indica la posible existencia de cooperatividad en la -- unión de ligando - receptor. La cooperatividad es el fenómeno por el cual el ligando unido a un sitio receptor influye ya sea positiva o negativamente en la fijación del ligando a otros sitios, en otras subunidades de dicha proteína (Fig. 4).

El valor de  $K_d$  es la constante de disociación de la unión del ligando al receptor, en el equilibrio. Los fármacos utilizados en este estudio fueron anfetamina, prazosina y atipamezole.

La anfetamina es un fármaco con acción o efecto indirecto de un agonista  $\alpha_1$ . Para ver su efecto tanto en la población de receptores noradrenérgicos  $\alpha_1$  como  $\alpha_2$ , se usaron ligandos específicos marcados para cada uno de estos tipos de receptores.

CURVA DE SATURACION DE RECEPTORES NORADRENERGICOS  $\alpha_1$  EN  
 NUCLEO CAUDADO DE RATAS TRATADAS CON ANFETAMINA

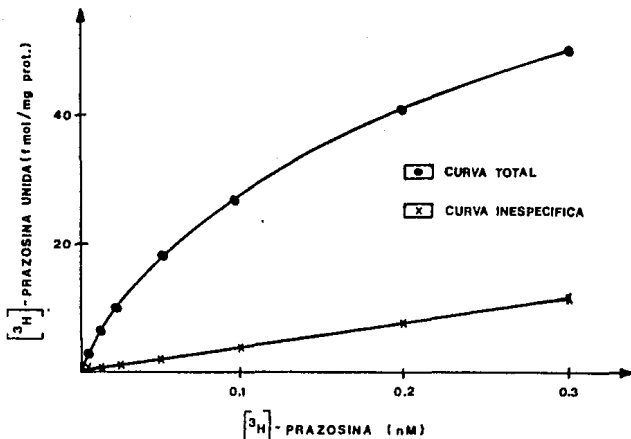


FIG. 1 CURVA DE SATURACION DE RECEPTORES NORADRENERGICOS  $\alpha_1$  DE NUCLEO CAUDADO DE RATAS TRATADAS CON ANFETAMINA. LA UNION DE  $[^3\text{H}]$ -PRAZOSINA A MEMBRANAS DE CEREBRO DE RATA COMO UNA FUNCION DEL INCREMENTO DE LA CONCENTRACION DEL LIGANDO. LAS MEMBRANAS (0,6 MG DE PROTEINA), EL LIGANDO  $[^3\text{H}]$ -PRAZOSINA Y EL VOLUMEN DEL AMORTIGUADOR TRIS HASTA COMPLETAR 1 ML. FUERON INCUBADOS POR 45 MIN A  $30^\circ\text{C}$ . LAS CONCENTRACIONES DE  $[^3\text{H}]$ -PRAZOSINA USADAS FUERON LAS QUE SE INDICARON EN "MATERIALES Y METODOS". LA UNION NO ESPECIFICA FUE DETERMINADA EN PRESENCIA DE 10  $\mu\text{M}$  DE FENTOLAMINA.

CURVAS ESPECIFICAS DE RECEPTORES NORADRENERGICOS  $\alpha_1$  EN  
NUCLEO CAUDADO DE RATAS TRATADAS CON ANFETAMINA

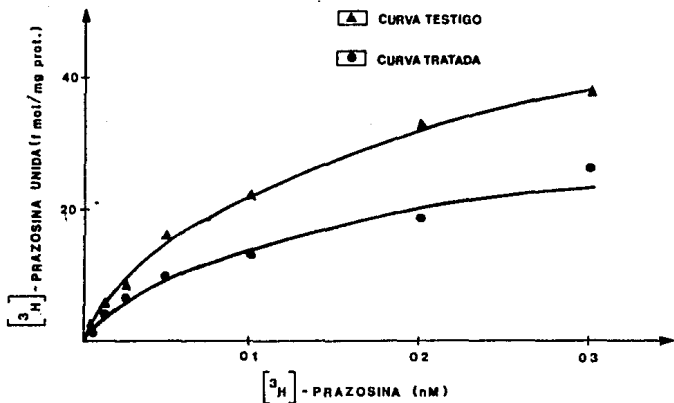


FIG. 2. CURVAS ESPECIFICAS DE RECEPTORES NORADRENERGICOS  $\alpha_1$  DE NUCLEO CAUDADO DE RATAS TRATADAS CON ANFETAMINA. LA UNION ESPECIFICA FUE DEFINIDA COMO LA DIFERENCIA DE LA CURVA TOTAL Y LA UNION NO ESPECIFICA. LOS PUNTOS QUE SE MUESTRAN PERTENECEN A LAS CONCENTRACIONES DE  $[^3\text{H}]$ -PRAZOSINA USADAS FUERON LAS QUE SE INDICARON EN "MATERIALES Y METODOS" Y CADA PUNTO ES EL PROMEDIO DE CINCO DETERMINACIONES.

CURVAS SCATCHARD DE RECEPTORES NORADRENERGICOS  $\alpha_1$  EN  
 NUCLEO CAUDADO DE RATAS TRATADAS CON ANFETAMINA

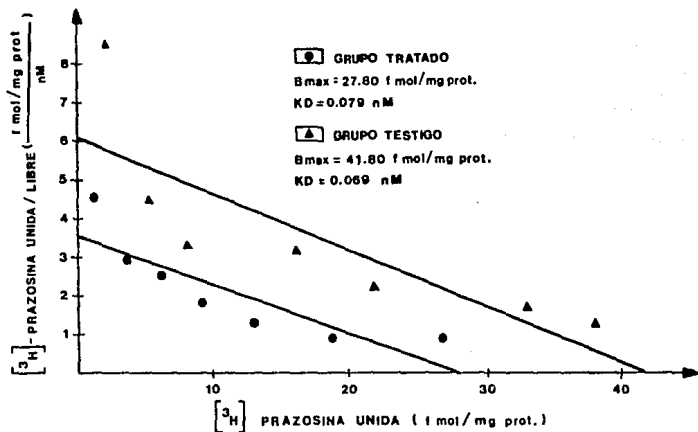


FIG. 3. CURVAS SCATCHARD DE RECEPTORES NORADRENERGICOS  $\alpha_1$  EN EL AREA DE NUCLEO CAUDADO DE RATAS TRATADAS CON ANFETAMINA. EL NUMERO DE SITIOS DE UNION O  $B_{MAX}$  (FMOL/ML PROT) FUE OBTENIDO EN EL PUNTO DE INTERSECCION CON LA ABSCISA. LA CONSTANTE DE DISOCIACION AL EQUILIBRIO, RESULTA DE LA INVERSA DEL VALOR DE LA PENDIENTE. ESTOS VALORES SE CALCULARON POR EL PROGRAMA "LIDANO" (MUNSON Y ROOSARD 1989). EN EL EJE DE LA ORDENADA SE ENCUENTRA LA RELACION DE LA  $[^3H]$ -PRAZOSINA UNIDA A LA LIBRE (B/F); MIENTRAS QUE LA ABSCISA INDICA LA  $[^3H]$ -PRAZOSINA UNIDA A RECEPTORES NORADRENERGICOS  $\alpha_1$ .

COEFICIENTE DE HILL DE LA UNION DE PRAZOSINA A RECEPTORES NORADRENERGICOS  $\alpha_1$  DE NUCLEO CAUDADO DE RATAS TRATADAS CON ANFETAMINA

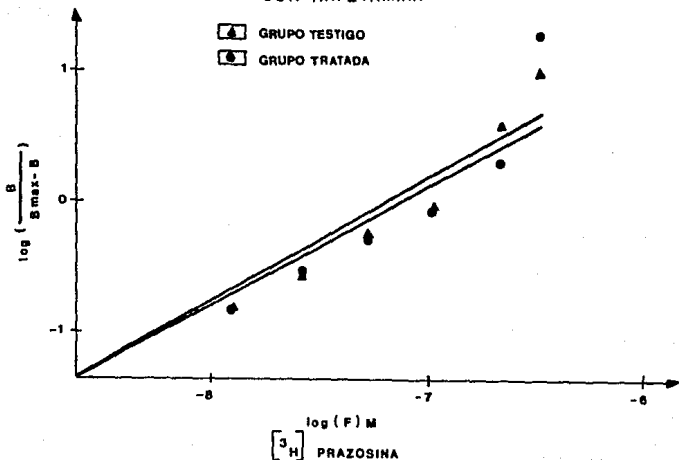


FIG. 4. COEFICIENTE DE HILL DE LA UNION DE PRAZOSINA A RECEPTORES NORADRENERGICOS  $\alpha_1$  DE NUCLEO CAUDADO DE RATAS TRATADAS CON ANFETAMINA. LOS VALORES DE LOS COEFICIENTES DE HILL SE DETERMINARON A PARTIR DE LA  $B_{MAX}$  OBTENIDA DEL ANALISIS DE SCATCHARD TAL Y COMO SE INDICA Y CORRESPONDE AL VALOR DE LA PENDIENTE OBTENIDA.



4.1 EFECTO CRONICO DE ANFETAMINA EN LA POBLACION DE LOS RECEPTORES NORADRENERGICOS  $\alpha_1$ , EN DIFERENTES AREAS DEL CEREBRO DE RATA :

A excepción del área de la amígdala, el efecto general de la anfetamina sobre la población de los receptores noradrenérgicos  $\alpha_1$ , tiende a una disminución de ellos en las diferentes áreas, ( ver Fig. 5 ). Esto se confirma con los valores que se indican en la tabla No. 1, donde tenemos para cada área cerebral los valores de  $B_{max} \cdot K_d$ , coeficiente de Hill y la diferencia en porcentaje de los valores de  $B_{max}$  respectivamente. Así, los valores de cambios de  $B_{max}$  ( % ) se encontró una disminución para corteza frontal de - 9.21 %; para la corteza tempoparietal se mostró una disminución de - 34.63 % para el área de hipocampo de 26.2 % y para el área de amígdala se observa un incremento de 40.1 %. Por lo anterior vemos que con respecto a los grupos testigo, la amígdala presenta un cambio opuesto al respecto de las áreas estudiadas en cuanto a la población de receptores noradrenérgicos  $\alpha_1$  y para el núcleo caudado se obtuvieron valores de misma tendencia a disminuir el número de receptores a 33.5 %.

EFFECTO CRONICO DE ANFETAMINA EN RECEPTORES NORADRENERGICOS  $\alpha_1$ , EN DIFERENTES AREAS DEL CEREBRO DE RATA

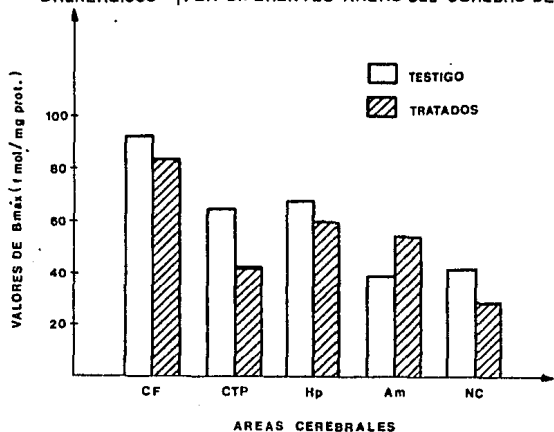


FIG. 5. EFECTO CRONICO DE ANFETAMINA EN RECEPTORES NORADRENERGICOS  $\alpha_1$ , EN DIFERENTES AREAS DEL CEREBRO DE RATA. LA GRAFICA MUESTRA EL EFECTO DEL TRATAMIENTO DE ANFETAMINA CADA 12 HORAS DURANTE 10 DIAS DE ADMINISTRACION (0.75 MG/KG) POR VIA INTRADERMICA SOBRE LOS RECEPTORES NORADRENERGICOS  $\alpha_1$  DE LAS MEMBRANAS DE CEREBRO DE RATA CON RESPECTO A SU GRUPO NO TRATADO. LA GRAFICA MUESTRA LOS VALORES DE  $B_{MAX}$  (FMOL/MG PROT). EN LAS AREAS CEREBRALES TRABAJADAS: LAS DETERMINACIONES SE HICIERON POR QUINTUPLICADO EN LAS CONDICIONES YA SEÑALADAS. CF = CORTEZA FRONTAL, CTP = CORTEZA TEMPORAL; Hp = HIPOCAMPO; AM = AMIGDALA; NC = NUCLEO CAUDADO.

#### 4.2 EFECTO CRONICO DE ANFETAMINA EN LA POBLACION DE LOS RECEPTORES NORADRENERGICOS $\alpha_2$ EN DIFERENTES AREAS DEL CEREBRO DE RATA :

Se utilizó la misma dosis y via de administración de este fármaco que para el caso de los receptores noradrenérgicos  $\alpha_1$ .

En la fig. 6 se ve claramente los cambios que produjo la administración del fármaco sobre el número de receptores noradrenérgicos  $\alpha_2$ , en las cinco áreas del cerebro de rata. Así para la corteza frontal y tempoparietal se ve una disminución en la población de los receptores noradrenérgicos  $\alpha_2$ , al contrario de las otras tres áreas: hipocampo, amígdala y núcleo caudado donde se observa la marcada tendencia a incrementarse el número de estos receptores.

En la población de los receptores noradrenérgicos  $\alpha_2$  se observa que después del tratamiento crónico con anfetamina, en el área de corteza frontal se encontró una disminución del 52.7 % en relación a su grupo testigo ( Tabla No. 1 ). Sucede lo mismo para el área de corteza tempoparietal mostrando una disminución del número de receptores en un 68.7 % con

respecto a su control. Opuestamente en el área del hipocampo se observó un aumento altamente significativo del 167.5 % en la población de sus receptores noradrenérgicos  $\alpha_2$ , y las -- áreas de amígdala y núcleo caudado presentan la misma tendencia de aumento, aunque este cambio es más significativo en - la amígdala ya que los porcentajes de las diferencias de su  $B_{max}$  son 159.3 % y 21.1 % respectivamente.

EFFECTO CRONICO DE ANFETAMINA EN RECEPTORES NORADRENERGICOS  $\alpha_2$ , EN DIFERENTES AREAS DEL CEREBRO DE RATA

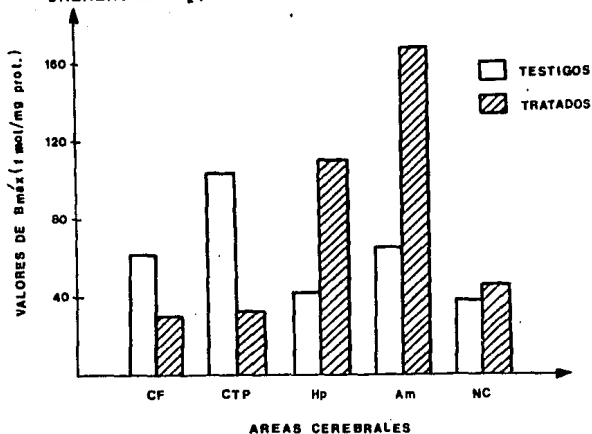


FIG. 8. EFFECTO CRONICO DE ANFETAMINA EN RECEPTORES NORADRENERGICOS  $\alpha_2$  EN DIFERENTES AREAS DEL CEREBRO DE RATA. LA GRAFICA MUESTRA EL EFFECTO DEL TRATAMIENTO DE ANFETAMINA CADA 12 HORAS DURANTE 10 DIAS DE ADMINISTRACION (0.75 MG/KG) POR VIA INTRADERMICA SOBRE LOS RECEPTORES NORADRENERGICOS  $\alpha_2$  DE LAS MEMBRANAS DE CEREBRO DE RATA CON RESPECTO A SU GRUPO NO TRATADO. LA GRAFICA MUESTRA LOS VALORES DE  $B_{MAX}$  (FMOL/MG PROT), EN LAS AREAS CEREBRALES TRABAJADAS; LAS DETERMINACIONES SE HICIERON POR QUINTUPLICADO EN LAS CONDICIONES YA SEÑALADAS: CF: CTP: Hp: AM: NC.

**EFEECTO CRONICO DE ANFETAMINA EN RECEPTORES NORADRENERGICOS  $\alpha_1$  Y  $\alpha_2$  EN  
DIFERENTES AREAS DEL CEREBRO DE RATA**

**SITIOS DE UNION AL LIGANDO A PRAZOSINA ( $\alpha_1$ )**

AREA	GRUPOS TESTIGO			GRUPOS TRATADOS			CAMBIOS DE Bmax (%)
	Bmax (FMOL/MG PROT)	K <sub>D</sub> (nM)	Co. HILL	Bmax (FMOL/MG PROT)	K <sub>D</sub> (nM)	Co. HILL	
C. FRONTAL	82.2	1.88	0.98	89.7	0.848	0.99	- 0.21
C. TEMPORIAL	84.1	1.41	0.99	41.9	1.03	0.94	- 34.83
HIPOCAMPO	87.5	1.581	0.98	49.8	1.40	0.99	- 20.1
AMIGDALA	38.4	0.919	0.99	53.8	1.53	0.98	+ 40.1
NUCLEO CAUDADO	41.8	0.693	1.00	27.8	0.78	1.10	- 33.8

**SITIOS DE UNION A RX 781094 ( $\alpha_2$ )**

C. FRONTAL	82.4	3.19	1.10	29.5	0.50	0.86	- 52.7
C. TEMPORIAL	103.3	18.22	0.90	32.2	3.09	0.95	- 68.7
HIPOCAMPO	40.9	1.85	0.90	109.4	0.51	0.98	+ 187.5
AMIGDALA	65.1	1.33	0.98	188.8	16.69	0.91	+ 159.3
NUCLEO CAUDADO	38.4	2.25	0.74	46.5	4.31	0.84	+ 21.1

TABLA NO. 1. EFECTO CRONICO DE ANFETAMINA EN RECEPTORES NORADRENERGICOS  $\alpha_1$  Y  $\alpha_2$  EN DIFERENTES AREAS DEL CEREBRO DE RATA. EL LIGANDO [<sup>3</sup>H]-PRAZOSINA SE UTILIZO PARA LA DETERMINACION DE LOS RECEPTORES NORADRENERGICOS  $\alpha_1$  Y PARA LA DETERMINACION DE LOS RECEPTORES NORADRENERGICOS  $\alpha_2$  SE UTILIZO EL LIGANDO [<sup>3</sup>H]-RX 781094. LOS VALORES QUE SE REPORTAN DE K<sub>D</sub> (nM) Y Bmax (FMOL/MG PROT) SON EL RESULTADO DE UN ANALISIS DE REGRESION MULTIPLE NO LINEAL HECHO CON EL PROGRAMA LIGAND (MUNSON Y ROBBARD 1980). TAMBIEN SE EXPRESAN LOS COEFICIENTES DE HILL Y EN LA COLUMNA DE LA EXTREMA DERECHA SE REFIERE A LA DIFERENCIA PORCENTUAL DEL CAMBIO DEL VALOR DE Bmax DEL GRUPO TRATADO CON RESPECTO A SU Bmax DEL GRUPO TESTIGO.

#### 4.3 EFECTO CRONICO DE PRAZOSINA SOBRE LA POBLACION DE RECEPTORES NORADRENERGICOS $\alpha_1$ , EN DIFERENTES AREAS DEL CEREBRO DE RATA :

Después de la administración crónica de este fármaco, en las cinco áreas del cerebro se observa que hay un claro incremento en los receptores noradrenérgicos  $\alpha_1$  ( ver Fig. 7 ) la diferencia de la unión máxima de los grupos testigo es el de 78.5 % para corteza frontal, 20.6 % para corteza tempoparietal 6.8 % para la amígdala y 143.3 % para núcleo caudado. Sólo el área del hipocampo presentó un decremento en el número de dichos receptores a razón de un 70.6 % -- ( ver Tabla No. 2 ).

EFFECTO CRONICO DE PRAZOSINA EN RECEPTORES NORADRENERGICOS  $\alpha_1$ , EN DIFERENTES AREAS DEL CEREBRO DE RATA

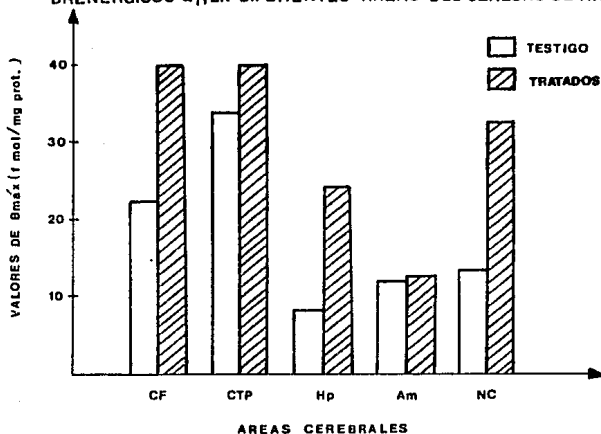


FIG. 7. EFECTO CRONICO DE PRAZOSINA EN RECEPTORES NORADRENERGICOS  $\alpha_1$ , EN DIFERENTES AREAS DEL CEREBRO DE RATA. LA GRAFICA MUESTRA EL EFECTO DEL TRATAMIENTO DE PRAZOSINA CADA 12 HORAS DURANTE 10 DIAS DE ADMINISTRACION (1.0 MG/KG) POR VIA INTRAPERITONEAL SOBRE LOS RECEPTORES NORADRENERGICOS  $\alpha_1$  DE LAS MEMBRANAS DE CEREBRO DE RATA CON RESPECTO A SU GRUPO NO TRATADO. LA GRAFICA MUESTRA LOS VALORES DE  $B_{MAX}$  (FMOL/MG PROT). EN LAS AREAS CEREBRALES TRABAJADAS: LAS DETERMINACIONES SE HICIERON POR QUINTUPPLICADO EN LAS CONDICIONES YA SEÑALADAS. CF: CTP; Hp: Am; NC.



#### 4.4 EFECTO CRONICO DE PRAZOSINA SOBRE LA POBLACION DE RECEPTORES NORADRENERGICOS $\alpha_2$ , EN DIFERENTES AREAS DEL CEREBRO DE RATA :

En la fig. 8 se observan los cambios de los receptores  $\alpha_2$  producidos por el tratamiento con prazosina en las diferentes áreas del cerebro de rata analizadas. El número de estos receptores se ve disminuido después de la administración de prazosina en la siguiente forma: corteza frontal con un 19.0 %, corteza tempoparietal con 74.7 % e hipocampo con un 37.0 %. En cambio este efecto es opuesto para las áreas de la amígdala y del núcleo caudado ya que aumentan la población de receptores del tipo  $\alpha_2$ . Las diferencias de la  $B_{max}$  de los grupos tratados fueron del 14.8 % y 135.7 % respectivamente ( ver Tabla No. 2 ).

EFFECTO CRONICO DE PRAZOSINA EN RECEPTORES NORADRENERGICOS  $\alpha_2$ , EN DIFERENTES AREAS DEL CEREBRO DE RATA

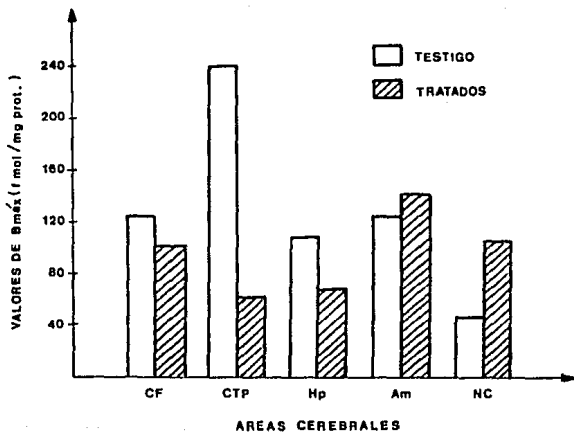


FIG. 8. EFECTO CRONICO DE PRAZOSINA EN RECEPTORES NORADRENERGICOS  $\alpha_2$ , EN DIFERENTES AREAS DEL CEREBRO DE RATA. LA GRAFICA MUESTRA EL EFECTO DEL TRATAMIENTO DE PRAZOSINA CADA 12 HORAS DURANTE 15 DIAS DE ADMINISTRACION (1 MG/KG) POR VIA INTRAPERITONEAL, SOBRE LOS RECEPTORES NORADRENERGICOS  $\alpha_2$  DE LAS MEMBRANAS DE CEREBRO DE RATA CON RESPECTO A SU GRUPO NO TRATADO. LA GRAFICA MUESTRA LOS VALORES DE  $B_{MAX}$  (FMOL/MG PROT), EN LAS AREAS CEREBRALES TRABAJADAS: LAS DETERMINACIONES SE HICIERON POR QUINTUPLICADO EN LAS CONDICIONES YA SEÑALADAS. CF: CTP; Hp; Am; NC.

EFFECTO CRONICO DE PRAZOSINA SOBRE LOS RECEPTORES NORADRENERGICOS  $\alpha_1$  Y  $\alpha_2$ .  
 DIFERENTES AREAS DEL CEREBRO DE RATA

SITIOS DE UNION A PRAZOSINA ( $\alpha_1$ )

AREA	GRUPO TESTIGO			GRUPO TRATADO			CAMBIOS DE Bmax (%)
	Bmax (FMOL/MG PROT)	K <sub>D</sub> (nM)	Co. HILL	Bmax. (FMOL/MG PROT)	K <sub>D</sub> (nM)	Co. HILL	
C. FRONTAL	22.3	1.47	0.93	30.8	1.75	0.95	+ 78.47
C. TEMPORALIETAL	33.4	1.25	0.96	40.3	0.78	0.91	+ 20.65
HIPOCAMPO	62.0	0.14	1.09	24.1	0.31	0.85	- 70.6
AMIGDALA	11.7	0.30	0.83	12.5	0.21	0.85	+ 6.83
NUCLEO CAUDADO	13.4	0.20	1.07	32.6	0.93	0.86	+ 143.28

SITIOS DE UNION A RX 781004 ( $\alpha_2$ )

C. FRONTAL	122.28	6.33	0.93	99.0	5.05	0.97	- 19.02
C. TEMPORALIETAL	238.0	2.20	0.99	60.3	6.03	0.92	- 74.65
HIPOCAMPO	105.5	7.52	0.95	65.5	5.38	0.98	- 38.38
AMIGDALA	121.6	2.00	1.05	139.6	4.45	0.97	+ 14.8
NUCLEO	43.7	2.11	1.03	103.0	8.95	0.95	+ 135.69

TABLA NO. 2. EFECTO CRONICO DE PRAZOSINA EN RECEPTORES NORADRENERGICOS  $\alpha_1$  Y  $\alpha_2$ . EN DIFERENTES AREAS DEL CEREBRO DE RATA. EL LIQUIDO (H) - PRAZOSINA SE UTILIZO PARA LA DETERMINACION DE LOS RECEPTORES NORADRENERGICOS  $\alpha_1$  Y PARA LA DETERMINACION DE LOS RECEPTORES NORADRENERGICOS  $\alpha_2$  SE UTILIZO EL LIQUIDO (H) - RX 781004. LOS VALORES QUE SE REPORTAN DE K<sub>D</sub> (nM) Y Bmax (FMOL/MG PROT) SON EL RESULTADO DE UN ANALISIS DE REGRESION MULTIPLE NO LINEAL HECHO CON EL PROGRAMA LIQAND (MUNSON Y ROYBARD 1980). TAMBIEN SE EXPRESAN LOS COEFICIENTES DE HILL Y EN LA COLUMNA DE LA EXTREMA DERECHA SE REFIERE A LA DIFERENCIA PORCENTUAL DEL CAMBIO DE VALOR DE Bmax DEL GRUPO TRATADO CON RESPECTO A SU Bmax DEL GRUPO TESTIGO.

#### 4.5 EFECTO CRONICO DE ATIPAMEZOLE SOBRE LA POBLACION DE LOS RECEPTORES NORADRENERGICOS $\alpha_1$ , EN DIFERENTES - AREAS DEL CEREBRO DE RATA :

Existe una clara tendencia general a incrementar el número de receptores noradrenérgicos  $\alpha_1$ , ésto se puede observar en la Fig. 9 ya que del total de las cinco áreas cerebrales, solo en hipocampo se comporta en forma contraria, aunque este cambio no es tan significativo como algunos de los incrementos referidos.

Los valores de  $B_{max}$  de los grupos tratados como superiores a sus respectivos grupos testigos en las áreas de corteza tempoparietal, corteza frontal, amígdala y núcleo caudado dando diferencias positivas del 28.6 %, 45.4 %, 54.0 % y 73.6 % en mismo orden.

La única diferencia negativa es del 16.2 % correspondiente al área del hipocampo ( Tabla No. 3 ).

EFFECTO CRONICO DE ATIPAMEZOLE EN RECEPTORES NORADRENERGICOS  $\alpha_1$ , EN DIFERENTES AREAS DEL CEREBRO DE RATA

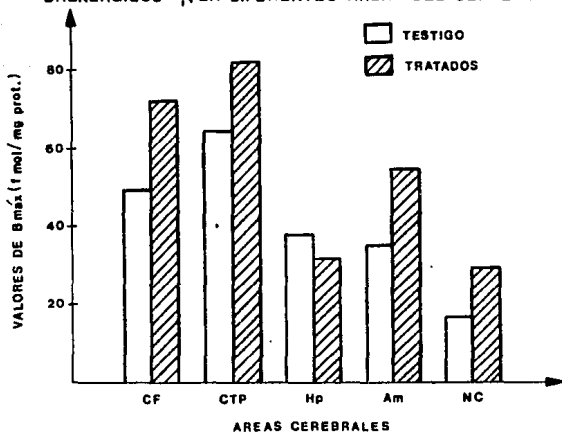


FIG. 9. EFECTO CRONICO DE ATIPAMEZOLE EN RECEPTORES NORADRENERGICOS  $\alpha_1$  EN DIFERENTES AREAS DEL CEREBRO DE RATA. LA GRAFICA MUESTRA EL EFECTO DEL TRATAMIENTO DE ATIPAMEZOLE CADA 12 HORAS DURANTE 10 DIAS DE ADMINISTRACION (3,3 MG/KG) POR VIA INTRAPERITONEAL SOBRE LOS RECEPTORES NORADRENERGICOS  $\alpha_1$  DE LAS MEMBRANAS DE CEREBRO DE RATA CON RESPECTO A SU GRUPO NO TRATADO. LA GRAFICA MUESTRA LOS VALORES  $B_{MAX}$  (FMOL/MG PROT), EN LAS AREAS CEREBRALES TRABAJADAS. LAS DETERMINACIONES SE HICIERON POR QUINTUPLICADO EN LAS CONDICIONES YA SEÑALADAS: CF: CTP: Hp: Am: NC.

#### 4.6 EFECTO CRONICO DE ATIPAMEZOLE SOBRE LA POBLACION DE RECEPTORES NORADRENERGICOS $\alpha_2$ EN DIFERENTES AREAS DEL CEREBRO DE RATA :

Aquí se observa una importante disminución de receptores con respecto al grupo testigo en la mayoría de las áreas cerebrales a excepción del núcleo caudado, donde se elevan los niveles de este tipo de receptores ( ver Fig. 10 ). La magnitud en que se disminuyen los niveles de este tipo de receptores es 36.2 % para hipocampo, de 69.7 % para amígdala, de 77.5 % para corteza frontal y de 86.9 % para corteza tempoparietal y solo núcleo caudado tiene una disminución positiva del 3.6 % ( Tabla No. 3 ).

EFFECTO CRONICO DE ATIPAMEZOLE EN RECEPTORES NORADRENERGICOS  $\alpha_2$ , EN DIFERENTES AREAS DEL CEREBRO DE RATA

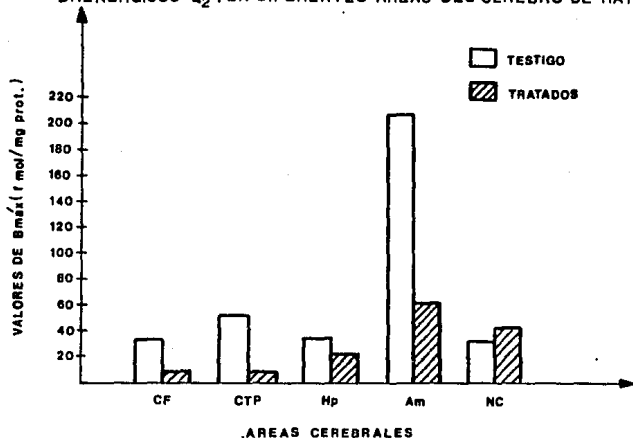


FIG. 10. EFECTO CRONICO DE ATIPAMEZOLE EN RECEPTORES NORADRENERGICOS  $\alpha_2$  EN DIFERENTES AREAS DEL CEREBRO DE RATA. LA GRAFICA MUESTRA EL EFECTO DEL TRATAMIENTO DE ATIPAMEZOLE CADA 12 HORAS DURANTE 10 DIAS DE ADMINISTRACION (3.5 MG/KG) POR VIA INTRAPERITONEAL SOBRE LOS RECEPTORES NORADRENERGICOS  $\alpha_2$  DE LAS MEMBRANAS DE CEREBRO DE RATA CON RESPECTO A SU GRUPO NO TRATADO. LA GRAFICA MUESTRA LOS VALORES DE  $B_{MAX}$  (FMOL/MG PROT). EN LAS AREAS CEREBRALES TRABAJADAS, LAS DETERMINACIONES SE HICIERON POR QUINTUPlicADO EN LAS CONDICIONES YA SEÑALADAS: CF: CTP: Hp: Am: NC.

EFFECTO CRONICO DE ATIPAMEZOLE SOBRE LOS RECEPTORES NORADRENÉRGICOS  $\alpha_1$  Y  $\alpha_2$ .  
DE DIFERENTES ÁREAS DEL CEREBRO DE RATA

SITIOS DE UNIÓN A PRAZOSINA ( $\alpha_1$ )

AREA	GRUPO TESTIGO			GRUPO TRATADO			CAMBIO DE $B_{max}$ (%)
	$B_{max}$ (FMOL/MG PROT)	$K_D$ (NM)	Co. HILL	$B_{max}$ (FMOL/MG PROT)	$K_D$ (NM)	Co. HILL	
C. FRONTAL	49.6	0.71	1.04	72.1	1.54	1.00	+ 45.4
C. TEMPORALIETAL	84.1	1.02	0.97	82.4	1.78	0.98	+ 28.6
HIPOCAMPO	37.3	1.85	1.00	31.2	1.32	0.97	- 18.2
AMIGDALA	35.0	0.98	0.95	54.0	1.52	0.98	+ 54.0
NUCLEO CAUDADO	18.7	0.38	0.88	29.0	0.69	0.87	+ 73.6

SITIOS DE UNIÓN A RX 781094 ( $\alpha_2$ )

C. FRONTAL	33.8	4.80	0.97	7.8	0.504	0.77	- 77.5
C. TEMPORALIETAL	51.4	5.40	0.97	6.7	0.726	0.93	- 88.0
HIPOCAMPO	34.3	4.16	0.96	21.9	4.88	0.96	- 36.2
AMIGDALA	206.9	11.08	0.99	82.6	9.95	0.99	- 69.7
NUCLEO CAUDADO	33.8	3.35	0.93	43.9	11.82	0.95	+ 30.8

TABLA NO. 3. EFECTO CRONICO DE ATIPAMEZOLE EN RECEPTORES NORADRENÉRGICOS  $\alpha_1$  Y  $\alpha_2$  EN DIFERENTES ÁREAS DEL CEREBRO DE RATA. EL LIGANDO ( $^3$ H) - PRAZOSINA SE UTILIZO PARA LA DETERMINACION DE LOS RECEPTORES NORADRENÉRGICOS  $\alpha_1$  Y PARA LA DETERMINACION DE LOS RECEPTORES NORADRENÉRGICOS  $\alpha_2$  SE UTILIZO EL LIGANDO ( $^3$ H)-RX 781094. LOS VALORES QUE SE REPORTAN DE  $K_D$  (NM) Y  $B_{max}$  (FMOL/MG PROT) SON EL RESULTADO DE UN ANALISIS DE REGRESION MULTIPLE NO LINEAL HECHO EN EL PROGRAMA LIGAND (MUNSON Y ROOBARD 1980). TAMBIEN SE EXPRESAN LOS COEFICIENTES DE HILL Y EN LA COLUMNA DE LA EXTREMA DERECHA SE REFIERE A LA DIFERENCIA PROCENTUAL DEL CAMBIO DEL VALOR DE  $B_{max}$  DEL GRUPO TRATADO CON RESPECTO A SU  $B_{max}$  DEL GRUPO TESTIGO.



#### 4.7 CONSTANTES DE DISOCIACION :

En relación a los valores de las constantes de disociación que aparecen en las Tablas 1, 2 y 3, se observa que todos caen en rangos de concentraciones nanomolares, lo cual nos habla no sólo de su especificidad, sino también nos sugiere que al obtener valores tan pequeños la reacción alcanzó su equilibrio y las concentraciones del ligando no fueron limitantes y alcanzó la saturación.

Se observaron algunos cambios de los valores de  $K_d$  para los receptores noradrenérgicos  $\alpha_2$  tratados con anfetamina en el área de corteza frontal, el valor de su grupo testigo es de 3.19 nM y para el grupo tratado es de 0.50 nM, lo mismo se observa para el área de corteza tempoparietal donde -- los  $K_d$  son para el grupo testigo de 16.2 nM y para el grupo tratado 3.0 nM. Lo contrario se observa en el área del hipocampo teniendo valores de  $K_d$  en el grupo testigo de 1.85 nM y para el grupo tratado de 9.51 nM, de igual manera se ve para el área de la amígdala así el grupo testigo se observan los valores de  $K_d$  de 1.33 nM y para el grupo tratado dicho valor es de 16.69 nM, en el núcleo caudado no es significativo este cambio. Por otra parte en los receptores noradrené-

gicos  $\alpha_1$  tratados con amfetamina no se encontraron cambios significativos de sus constantes de disociación con respecto a su grupo testigo.

En el grupo de ratas tratadas con prazosina no hubo cambios significativos de las constantes de disociación de los receptores noradrenérgicos  $\alpha_1$ , en relación a sus grupos testigo. Para el grupo de ratas tratadas con prazosina, tampoco se observaron cambios significativos en los valores de  $K_d$  en las diferentes áreas analizadas para receptores noradrenérgicos  $\alpha_2$ .

En la determinación de los grupos tratados con atipamezole no se observaron los cambios significativos de dichos valores de  $K_d$  con respecto a sus correspondientes grupos testigo. Algo similar se encontró para los receptores noradrenérgicos  $\alpha_2$ , a excepción de las áreas de corteza tempoparietal con valores de las  $K_d$  para el grupo testigo de 5.4 nM y para el grupo tratado de 0.72 nM. En el área de núcleo caudado por el contrario el valor de  $K_d$  del grupo control fué de 3.35 nM y de 11.62 nM para el grupo tratado. En terminos generales - puede decirse que se observaron pocos cambios en las  $K_d$  por los diferentes tratamientos con fármacos y en las diferentes áreas cerebrales analizadas. En la mayoría de los casos no se observan cambios significativos.

## 5. D I S C U S I O N

La [  $^3\text{H}$  ]-Prazosina se une reversible y óptimamente alrededor de pH 7, a una clase de receptor en membranas cerebrales con un valor de  $K_a$  de  $2 \text{ nM}^{-1}$ . Estos sitios tienen alta afinidad para los antagonistas pero relativamente baja afinidad -- por agonistas ( Honong R., Presek P. y Glomann H. 1979 ). El rango de orden de potencia de agonistas y antagonistas sugiere que los sitios a prazosina tienen un perfil similar a los sitios clasificados como receptores noradrenérgicos  $\alpha_1$ , ( Honong R., Presek P., y Glomann H. 1979 ).

Se usó el ligando [  $^3\text{H}$  ]-RX 781094 : Clorhidrato de ( 1, 4-6,7[ $^3\text{H}$ ]benzodioxan-2-il ) -2-Imidazolino, porque es un radioligando específico antagonista  $\alpha_2$ ; éste se ha usado para caracterizar los receptores noradrenérgicos  $\alpha_2$  en membranas corticales de rata. La unión del [  $^3\text{H}$  ]-RX781094 es reversible, saturable y estereoespecífica, marca con alta afinidad a una sola población de sitios no interactuantes. El valor de su  $K_d$  fue  $3.9 \pm 0.4 \text{ nM}$  y su  $B_{\text{max}}$   $189 \pm 13.4 \text{ fmol/mg}$  proteína ( Pimoule C. 1983 ).

En el presente estudio, nosotros determinamos la existencia de cambios en la densidad de los adrenoreceptores  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  producidos por la administración semicrónica de prazosina, atipamezole y anfetamina. Basados en los valores de  $B_{max}$ , sugerimos que los ligandos [ $^3H$ ]-Prazosina y [ $^3H$ ]-RX781094 fueron selectivamente unidos a los adrenoreceptores  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ , respectivamente. Sin embargo, nosotros no conocemos hasta que punto, cualesquiera de estos ligandos muestren alguna especificidad por los subtipos adrenoreceptores  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ , particularmente bajo las presentes condiciones y en las diferentes áreas de cerebro de rata analizadas. Tampoco podemos decir con certeza, si estos cambios de receptores ocurren en receptores postsinápticos, receptores somatodendríticos, auto o heteroreceptores.

Los cambios encontrados después del tratamiento crónico con anfetamina por vía intradérmica ( 0.75 mg/kg cada 12 horas durante 10 días ), indicaron una clara tendencia hacia una --disminución de la población de receptores  $\alpha_1$  en las áreas de corteza frontal y tempoparietal, hipocampo y núcleo caudado. En la amígdala se encontró una tendencia opuesta, como se observa en la gráfica No. 5. En ésta se muestra la magnitud de

los cambios porcentuales de cada área tratada, con respecto a su control, indicando que sí hay una diferencia importante -- con el efecto agonista indirecto de la anfetamina, sobre los receptores noradrenérgicos.

El efecto de la anfetamina en los receptores  $\alpha_1$ , está de acuerdo con el hecho de que esta droga incrementa los niveles de noradrenalina en el espacio intersináptico. Por otra parte, el efecto de esta droga sobre los receptores  $\alpha_2$  en certeza -- está de acuerdo con lo esperado, pero no en el caso de hipocampo, amígdala y núcleo caudado.

Se ha reportado que la anfetamina bloquea la recaptura presináptica de noradrenalina, como nosotros sabemos la noradrenalina interactúa con todos los adrenoreceptores conocidos, pero puede tener una función agonista o antagonista dependiendo del tipo de receptor con el cual interactúa, por consiguiente es claro que no tiene ninguna selectividad por algún adrenoreceptor en particular, lo que en parte podría explicar los hallazgos no esperados.

Cuando se determinó la población de los receptores noradrenérgicos  $\alpha_2$  se hizo el mismo tratamiento, pero se usó un

ligando diferente, el [ $^3\text{H}$ ]-RX781094. En este caso se obtuvo un aumento de dichos receptores en las áreas de hipocampo, amígdala, y núcleo caudado, por el contrario se vió un efecto opuesto para las áreas de corteza frontal y corteza tempoparietal ( ver gráfica 6 ). En general, el comportamiento de los receptores  $\alpha_2$  fue aumentar su población, esto en relación a su grupo testigo, siendo los cambios estadísticamente significativos en hipocampo y amígdala. En general, los valores resultantes respaldan el comportamiento esperado para este fármaco, con un efecto agonista indirecto para los receptores noradrenérgicos  $\alpha_1$ , y un posible efecto antagonista para los receptores  $\alpha_2$ , en la corteza frontal y tempoparietal pero no en hipocampo, amígdala ni núcleo caudado. A nivel bioquímico, no es sorprendente que las anfetaminas y los compuestos relacionados interactúen con las neuronas que contienen catecolamina, ya que las anfetaminas son análogos estructurales muy parecidos a las catecolaminas. Sin embargo, no había una prueba clara de que la anfetamina produjera su efecto sobre el sistema nervioso central, por un mecanismo de catecolamina hasta que se demostró que la  $\alpha$ -metil, p-tirosina prevenía la mayor parte de los efectos de la D-anfetamina. Además la anfetamina parece inhibir el disparo de las neuronas del locus

coeruleus. Esto se debe en parte, a la interacción de éstos a gentes adrenérgicos con los autorreceptores localizados en - los cuerpos de neuronas noradrenérgicas o de sus dendritas en el locus coeruleus ( Cooper Hack R. 1984 ). Esta inhibición - produciría un incremento en la población de receptores  $\alpha_2$  de corteza. Aún si se consideran todos los modos de acción sugeridos para la anfetamina; inhibición de la recaptura de catecolaminas, inhibición de la monoaminoxidasa, desplazamiento de la noradrenalina de los sitios de almacenamiento liberándola al espacio intersináptico, al parecer ejercen una acción - compatible con la hipótesis mencionada, ya que los resultados netos de todas estas acciones producen un incremento temporal de noradrenalina en el espacio intersináptico, ejerciendo una acción estimuladora directa sobre los adrenoreceptores  $\alpha_1$ , y una inhibición en los  $\alpha_2$ . Por otra parte, la administración crónica de anfetamina puede a su vez producir una disminución crónica del transmisor o una inactividad prolongada de las - neuronas noradrenérgicas, lo que podría relacionarse con la - observación clínica de la tolerancia a la anfetamina o a la - bien conocida depresión postestimuladora o a la fatiga que se observa después de la administración crónica de esta clase de medicamentos ( Cooper Jack R. 1984 ).

Otro factor que pudo haber modificado los resultados esperados, es el stress, pues cuando este es significativo, también aumenta el recambio de noradrenalina en el sistema nervioso central, lo que es el resultado de un incremento de la actividad de las neuronas noradrenérgicas.

El segundo fármaco que se utilizó fue la Prazosina, a una dosis de 1 mg/Kg de peso, durante 10 días cada 12 horas por vía intraperitoneal, para ver su efecto sobre los receptores noradrenérgicos  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  de las membranas del cerebro de rata. En las cinco áreas cerebrales ( corteza frontal, corteza temporarietal, hipocampo, amígdala y núcleo caudado ), se observó un claro incremento de los receptores noradrenérgicos  $\alpha_1$  con respecto a su grupo no tratado ( ver Fig. 7 ). Nosotros esperábamos un aumento en el número de receptores noradrenérgicos  $\alpha_1$ , obteniendo así los resultados esperados.

Para la determinación la población de receptores noradrenérgicos  $\alpha_2$  después de la administración crónica de prazosina, se utilizó como ligando el [ $^3$ H]-RX781094 ( ver Fig. 8 ), y en este caso, el número de estos receptores se ve disminuido en las áreas de corteza frontal, corteza temporarietal e



hipocampo, en cambio este efecto es opuesto para las áreas de amígdala y núcleo caudado, puesto que se encontró un aumento del número de receptores  $\alpha_2$  con respecto a los grupos no tratados. Esperabamos un decremento en los receptores  $\alpha_2$  ya que es exceso de noradrenalina en el espacio intersináptico causado por el bloqueo de  $\alpha_1$ , debía producir una disminución de los receptores  $\alpha_2$ . Ver posible explicación más adelante.

El tercer fármaco que se administró para este estudio - fue Atipamezole a una dosis de 3.5 mg/Kg de peso por 10 días cada 12 horas por vía intraperitoneal, el cual es un antagonista de los receptores noradrenérgicos  $\alpha_2$  ( Schinin y Mac Donals 1988 ). El efecto crónico de atipamezole sobre la población de los receptores noradrenérgicos  $\alpha_1$ , en diferentes áreas del cerebro de rata, en general, mostró una tendencia a incrementar su número en las áreas de corteza frontal, corteza tempoparietal, amígdala, núcleo caudado, a excepción del área de hipocampo donde se observó una disminución del número de receptores, aunque este cambio no es tan significativo como el de las áreas antes mencionadas.

En la determinación de los receptores noradrenérgicos  $\alpha_2$

se observó, una importante disminución de estos receptores, - en las áreas de corteza frontal, corteza tempoparietal, hipocampo y amígdala, a excepción del área de núcleo caudado. Esto, no concuerda con lo que esperabamos. Ver posible explicación más adelante.

El haber obtenido cambios poblacionales de los receptores  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  noradrenérgicos es indicativo, de que los tres fármacos utilizados tienen un claro y definido efecto sobre - estos dos subtipos de receptores.

Algunos estudios parecen demostrar que podría existir - por lo menos en ciertos organos, receptores  $\alpha_2$  presinápticos, en cualquier caso, la presencia de estos es todavía hipotética. Sabemos que los receptores noradrenérgicos  $\alpha_1$  se localizan postsinápticamente y los receptores  $\alpha_2$  presinápticamente.

Recientemente ha sido evidente que los receptores noradrenérgicos  $\alpha_2$  pueden ser subdivididos uniformemente dentro de cuatro posibles subtipos. En un análisis detallado de estudios de unión con radioligandos en una variedad de tejidos, Bylund propuso, la existencia de dos poblaciones de receptores

noradrenérgicos  $\alpha_2$  los cuales fueron llamados  $\alpha_{2A}$  y  $\alpha_{2B}$ ; ambos subtipos tienen alta afinidad por yohimbina y rauwolscina, pero sorprendentemente los antagonistas selectivos a receptores  $\alpha_1$  así como varios análogos estructurales tienen alta afinidad por el subtipo  $\alpha_{2B}$ . Como tal, la prazosina es también un valioso instrumento farmacológico para discriminar entre varios subtipos de receptores  $\alpha_2$ . Usando un análisis similar, recientemente se ha propuesto que subtipos adicionales de los receptores  $\alpha_2$  pueden existir; los que tentativamente han sido llamados  $\alpha_{2C}$  y  $\alpha_{2D}$  y que actualmente están siendo investigados. Lo anterior podría explicar en parte algunos cambios de la población de los adrenoreceptores  $\alpha_2$  producidos por el tratamiento con atipamezole.

Gracias también a la ayuda de estudios por clonación molecular en líneas celulares se ha propuesto la existencia de los subtipos  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  y  $\alpha_{2C}$  ( Bylund 1992 ).

Por otra parte ya mencionamos que el idazoxan es un antagonista relativamente específico a los receptores noradrenérgicos  $\alpha_2$ , aunque se ha dicho que puede poseer algún agonismo parcial en los receptores noradrenérgicos  $\alpha_1$ .

Adicionalmente estudios electrofisiológicos de células han mostrado la presencia de adrenoreceptores  $\alpha_2$  postsinápticos en terminales preganglionares simpáticas y neuronas de amígdala ( Curet y Montigny 1988 ). Esta información también debe de tomarse en consideración para una posible explicación de nuestros hallazgos.

Menkes y Baraban 1981 mencionaban que hay evidencia de -- que la prazosina puede cruzar la barrera hematoencefálica aumentando la posibilidad de un sitio central de su acción cardiovascular. Recientemente se ha determinado que la prazosina puede reducir el flujo nervioso simpático de la espina dorsal por bloqueo de los adrenoreceptores  $\alpha_1$  a un indeterminado sitio dentro del sistema nervioso central ( Call y Humphrey, 1981 ).

Nuestros resultados concuerdan con los estudios hechos por Menkes y Baraban 1981 que proveen evidencia fisiológica de que la prazosina administrada sistemáticamente causa un selectivo bloqueo de los adrenoreceptores cerebrales a dosis dentro del rango usado clínicamente.

Como cualquier proteína, los receptores son permanentemente degradados y sintetizados. Así pues, la concentración de un receptor puede ser modulada por modificación bien de su síntesis, ó bien de su degradación. A esta posibilidad de regulación funcional se añaden otras como son la sensibilización-desensibilización. Aún en el caso de que no se detectaran cambios significativos en la población de un receptor puede estar presente el fenómeno de desensibilización o sensibilización, los cuales se producen en el momento de una estimulación excesiva o nula de estos receptores respectivamente. Estos cambios en la sensibilidad de los adrenoreceptores se caracterizan esencialmente por una pérdida o por un incremento de la capacidad de algunos receptores de inducir respuestas biológicas específicas en : Canales iónicos, sistemas de segundos mensajeros ( más comúnmente a través de una proteína G ) etc., modificando las funciones del receptor.

## 6. CONCLUSIONES

- Después de la administración sistémica crónica de fármacos agonistas y antagonistas de adrenoreceptores  $\alpha$ , utilizando las áreas de corteza frontal, corteza tempoparietal, hipocampo, amígdala y núcleo caudado del cerebro de rata, - se hicieron curvas de saturación a diferentes concentraciones de ligandos específicos, con ello se determinó cuantitativamente los cambios poblacionales ( $B_{max}$ ) de los receptores  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  noradrenérgicos, así como también sus coeficientes de Hill y constantes de disociación por medio de un análisis de regresión múltiple no lineal.
- Podemos decir, que los resultados así obtenidos son estadísticamente significativos y experimentalmente cumplen con las condiciones necesarias, ya que se alcanzó un estado de saturación del receptor a sus ligandos en la mayoría de los casos y además no se observó ningún efecto de cooperatividad, que pudiera indicar la existencia de otro tipo de receptores.

- La distribución de ambos receptores noradrenérgicos  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  no es homogénea en las diferentes áreas cerebrales analizadas, ni en su número, ni con respecto a su localización en la sinápsis.
  
- Puesto que la finalidad de este trabajo fué ver si -- hay modulación de los receptores  $\alpha$  del sistema noradrenérgico por medio de la administración de fármacos específicos, como los que aquí se utilizaron, se encontró que si se observó dicho efecto.
  
- Así a través de la acción crónica de la anfetamina y prazosina, se ejerce una modulación sobre estos receptores. Algo similar ocurre con el fármaco atipamezole. Sin embargo con este fármaco, al menos parcialmente los hallazgos están en oposición a lo esperado. Las razones por lo que los cambios de los receptores  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  en este caso no son los esperados, pudiera ser debido a la existencia de diferentes especies o subtipos de receptores  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  o a diferentes cantidades y/o cualidades de algunos moduladores endógenos de dichos receptores.

- El desarrollo de herramientas farmacológicas, como la técnica de " Unión " con ligandos marcados hace posible la detección de cambios en las poblaciones de los receptores - noradrenérgicos en una variedad de órganos. Como tales, los receptores noradrenérgicos  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  han llegado a ser un - importantes blanco terapéutico para el desarrollo de nuevos y más específicos fármacos que puedan ser útiles en el tratamiento de ciertas enfermedades humanas.



## 7. ABREVIATURAS

Am:	Amígdala
B:	Ligando Unido
B <sub>max</sub> :	Número máximo de sitios de unión
°C:	Grado centigrado
CF:	Corteza Frontal
Ci:	Curies
Co. Hill:	Coeficiente de Hill
CTP:	Corteza tempoparietal
F:	Ligando libre
Fig.:	Figura
fmol:	Fentomol
g:	Gramo
g/l:	Gramo por litro
Hp:	Hipocampo
Kg:	Kilogramo
Kd:	Constante de disociación
M:	Molar
mg:	Miligramo
ml:	Mililitro

mm: Milimetro  
mM: Milimolar  
mmol: Milimol  
 $\mu$ g: Microgramo  
 $\mu$ l: Microlitro  
 $\mu$ M: Micromolar  
NC: Nucleo Caudado  
nM: Nanomolar  
PMSF: Fenil metil sulfonil fluoruro  
POPOP: [1,4-bis(5-fenil-2-oxazolin)-benceno;2,2'-p-fenilen-bi(5-fenil oxazol)]  
PPO: 2,-5-difenil oxazol  
prot.: Proteína  
p/v: Peso/volumen  
rpm: Revoluciones por minuto

## 8. REFERENCIAS

- 1.- Ahlquist, R. P. ( 1948 ). A study of the adrenotropic receptors. Am. J. Physiol. 153: 586-600.
- 2.- Amaral, D. G., and Sinnamon, H. M. ( 1977 ). The locus coeruleus: neurobiology of a central noradrenergic nucleus. Prog. N. Neurobiol. 9: 147-196.
- 3.- Bacq, D. G., and Fisher, P. ( 1947 ). Nature de la substance sympathicomimétique extraite des nerfs su des mammiferes. Archs int. Physiol. 55: 73-91.
- 4.- Berthelsen, S., Pettinger, W. ( 1977 ). A functional basis for classification of  $\alpha$ -adrenergic receptors. Life Sci. 21: 595-606.
- 5.- Brownstein, M., Saavedra, J. M., and Palkovits, M. (1974). Norepinephrine and dopamine in the limbic system of the rat. Brain Res. 79: 431-436.

- 6.- Bylund, D. B. ( 1985 ). Heterogeneity of  $\alpha_2$  adrenergic receptors. Pharmacol. Biochem. Behav. 22: 835.
- 7.- Bylund, D. B., Blaxall H. S., Iversen L. J. ( 1992 ) Pharmacological Characteristics of  $\alpha_2$ -Adrenergic Receptors: Comparison of Pharmacologically Defined Subtypes With Subtypes Identified by Molecular Cloning. Molecular Pharmacology. 42: 1-5.
- 8.- Cannon, W. B., and Uridil, J. E. ( 1921 ). Studies on the denervated heart of stimulation the nerves of the liver. Am. J. Physiol. 58: 253-354.
- 9.- Cannon, W. B. ( 1929 ). Organization for physiological homeostasis. Physiol. Rev 9: 399-431.
- 10.- Cash, R., Raisman, R., Lanfumey, L., Ploska, A., Agid, Y. ( 1985 ). Cellular localization of adrenergic -- receptors in rat and human brain. Brain Res. 370: 127-125.

- 11.- Cooper, J. R., Bloom, F. E., Roth, R. H. Las Bases Bioquímicas de la Neurofarmacología. 2° ed. Oxford University Press. New York 1974. págs. 163, 164, 168, 172.
- 12.- Crow, T.J. and Wendlandt, S. ( 1976 ). Impaired acquisition of a passive avoidance response after lesions induced in the locus coeruleus by 6-OH-dopamine. Nature ( Lond ), 259: 42-44.
- 13.- Curet, O., and de Montigny, C. Electrophysiological characterization of adrenoreceptors in the rat dorsal hippocampus. I. Receptors mediating the effect of microiontophoretically applied norepinephrine. Brain Research. ( 1988 ) 475: 35-46.
- 14.- Dahlström, A., Fuxe, K. ( 1964 ). Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system. I neurons. Acta Physiol. Scand. 62 ( Suppl. 232 ): 1-55.

- 15.- Falck, B., Hillarp, N.-Å., Thieme, G., and Torp, A. (1962)  
Fluorescence of catechol amines and related compounds  
condensed with formaldehyde. J. Histochem. Cytochem. 10:  
348-354.
- 16.- Flood, J. F., and Jarvik, M. E. ( 1976 ). Drugs influen-  
ces on learning and memory. In M. R. Rosenzweig and E. L.  
Bennett ( Eds. ). Neural mechanisms of learning and memo-  
ry. MIT Press, Cambridge, 483-507.
- 17.- Foote, S. L., Bloom, F. E., and Aston-Jones, G. (1983).  
The nucleus locus coeruleus: new evidence of anatomical  
and physiological specificit. Physiol. Rev. 63: 844-914.
- 18.- Geffen, L. B., Livett, B. G., and Rush, R. A. ( 1969 ).  
Immunochemical localization of protein components  
of catecholamine storage vesicles. J. Physiol. ( Lond ).  
204: 593-605.

- 19.- Grzanna, R., Molliver, M. E., and Coyle, J. T. ( 1978 ).  
Visualization of central noradrenergic neurons in thick  
sections by the unlabeled antibody method: A transmitter  
specific Golgi image. Proc Natl. Acad. Sci. USA. 75:  
2502-2506.
- 20.- Hobson, J.A., Mc Carley, R.W., and Wyzinski, P.W. (1975)  
Sleep cycle oscillation: Reciprocal discharge by two  
Brainstem neuronal groups. Science. 189: 55-58.
- 21.- Jouvet, M. ( 1969 ). Biogenic amines and the states of  
sleep. Science. 163: 32-40.
- 22.- Koda. L.Y., and Bloom, F. E. ( 1977 ). A light and elec-  
tron microscopic study of noradrenergic terminals in the  
rat dentate. Brain Res. 120: 327-355.
- 23.- Lands, A. M., Arnold, A., Meltuliff, J. P. Luduena, F. P.  
Brown, T. G., ( 1967 ). Differentiation of receptor sys-  
tems activated by simpathomimetic amines. Nature. 214:  
597-598.

- 24.- Langer, S. Z. ( 1974 ). Presynaptic regulation of catecholamine release. *Biochem Pharmacol.* 23: 1793-1800.
- 25.- Langer, S. Z. ( 1981 ). Presynaptic regulation of the release of catecholamines. *Farm. Rev.* 32: no. 4, 337-362.
- 26.- Lindvall, O., and Björklund, A. ( 1978 ). Organization of catecholamine neurons in the rat central nervous system. In: *Handbook of Psychopharmacology*, Vol. 9, edited by L. L. Iversen, and S. H. Snyder, pp. 139-231.
- 27.- Litter, Manuel. *Farmacología Experimental y Clínica*. 6° ed. Ed. " El Ateneo ". Buenos Aires 1980.
- 28.- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., Randall R. J. ( 1951 ). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- 29.- Mc Call R.B., Humphrey S.J. ( 1981 ). Evidence for a central depressor action of postsynaptic  $\alpha_1$ -adrenergic receptor antagonist. *J. Autonom. Nerv. Sys.* 3: 9-24.



- 30.- Melchiorre, C. ( 1980 ). Selectivity of  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  adrenergic agonists and antagonists. *Il Farmaco. Ed. Sc.* Vol. 35 fasc. 7: 535-550.
- 31.- Menkes. D. B., Baraban, J. M., Aghajaman, G. K. (1981). Prazosin selectively antagonizes neuronal responses mediated by  $\alpha_1$ -adrenoceptors in brain. *Naunyn-Schmiede - berg's. Arch. Pharmacol.* 317: 273-275.
- 32.- Moore, R. Y. (1982). Catecholamine neuron systems in brain. *Ann. Neurol.* 12: 321-327.
- 33.- Munson, P.J., and Rodbard D. ( 1980 ). Ligand: A versatile computerized. Approach for the characterization of  $L_1$  ligand-Binding Systems. *Analytical Chemistry.* 107:220-239.
- 34.- Redmond, D.E. Jr. (1977 ). Alterations in the functions of the nucleus locus coeruleus: A possible model for studies of anxiety. In: *Animal models in Psychiatry and Neurology*, edited by I. Hanin and E. Usdin-Pergamon Press, Oxford, New York. pp. 293-305.

- 35.- Savaki, H. E., Kadekaro, M., Mc Culloch, J., Sukoloff, L. (1982 ). The central noradrenergic system in the rat: metabolic mapping with  $\alpha$ -adrenergic blocking agents. Brain Res. 234: 65-79.
- 36.- Scheinin, H., Mac Donald, E., Scheinin, M. ( 1988 ). Behavioural and neurochemical effects of antipamezole, a novel  $\alpha_2$ -adrenoceptor antagonist. European Journal of Pharmacology, 151 : 35-42.
- 37.- Segal, M., and Bloom, F. E. ( 1976 ). The action of norepinephrine in rat hippocampus IV. The effects of locus coeruleus stimulation on evoked hippocampal unit activity. Brain Res. 107: 513-525.
- 38.- Segal, M. ( 1978 ). A correlation between hippocampal responses to interhemispheric stimulation, hippocampal slow rhythmic activity and behavior. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. 45: 409-411.

- 39.- Starke, K., and Langer, S. Z. ( 1979 ). A note on terminology for presynaptic receptors. In presynaptic receptors, ed. By S. Z . Langer, K. Starke, and M. L. Dubocovich, Pergamon Press, Oxford. pp. 1-3.
- 40.- Snyder, D. W., and Reis, D. J. ( 1975 ). Sudden death following bilateral lesions of nucleus locus coeruleus. Neurosci. Abstr. 1: 425.
- 41.- Sternberger, L. A. ( 1979 ). Immunocytochemistry. Second Edition. John Wiley, New York.
- 42.- Thoene, H., and Tranzer, J. P. ( 1973 ). The pharmacology of 6-Hidroxydopamine. Annu. Rev Pharmacol. 13:169-180.