

59
21



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

MODIFICACION DE LA RESPUESTA
α2-ADRENERGICA EN RIÑON DE RATAS
HIPOTIROIDEAS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
LUZ MARIANA MANJARREZ SANCHEZ



MEXICO, D. F.

1997

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

**Agradezco a mis padres, por demostrarme que el carácter es
la fuerza motriz de este mundo....**

Jurado asignado:

Presidente: Prof. Vazquez Ramos Jorge Manuel.

Vocal: Prof. Romero Avila María Teresa.

Secretario: Prof. Torres Márquez Ma. Eugenia.

1er. Suplente: Prof. García Ramírez Elpidio.

2o. Suplente: Prof. Gutierrez Venegas Gloria.

El tema se desarrolló en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de
la UNAM.

Este trabajo se realizó con apoyo del donativo de CONACYT 0359 PM.

Dra. Ma. Eugenia Torres Márquez
Asesor del Tema: Dra. Ma. Eugenia Torres Márquez.

Luz Mariana Manjarrez Sánchez
Sustentante: Luz Mariana Manjarrez Sánchez.

INDICE.

CONTENIDO.	PAGINA.
Introducción1
Aspectos Farmacológicos1
Cuadro 1 Respuestas Fisiológicas controladas via receptores adrenérgicos2
Cuadro 2 Selectividad de los receptores adrenérgicos por agonistas y antagonistas específicos3
Mecanismos de Transducción de Señales y Receptores3
Receptores β-adrenérgicos4
Receptores α-adrenérgicos4
Esquema 1. Representación de los receptores adrenérgicos acoplados a sus efectores.5
Cuadro 2. Algunas características de los receptores α-2 adrenérgicos6
Proteínas G6
Figura 11. Ciclo de la GTPasa8
El Efector10
Funciones de los receptores α-2 adrenérgicos11
Modificaciones de los elementos del sistema transductor en el hipotiroidismo.11
Hipótesis14
Objetivos14
Material y Métodos.15
Reactivos15
Animales15
Obtención de membranas de corteza de riñón15
Ensayo de Actividad de Adenilato Ciclasa16

Ensayos de unión con radioligando17
ADP-Ribosilación18
Resultados19
Figura 1 Actividad de AC en membranas de corteza de riñón de ratas normales e hipotiroideas.20
Figura 2 Actividad de AC en respuesta a UK 14304 en membranas de corteza de riñón de ratas normales.21
Figura 3 Actividad de AC en respuesta a UK 14304 en membranas de corteza de riñón de ratas hipotiroideas.22
Figura 4 ³² P-ADP-Ribosilación24
Figura 5 Ensayos de unión con el radioligando [³ H] Yohimbina en membranas corticales de riñón de ratas normales.26
Figura 6 Ensayos de unión con el radioligando [³ H] Yohimbina en membranas corticales de riñón de ratas hipotiroideas.27
Figura 7 Actividad de AC en membranas corticales de riñón de ratas normales e hipotiroideas medida en ausencia de teofilina.28
Figura 8 Actividad de AC en respuesta a CPA en membranas corticales de riñón de ratas normales e hipotiroideas.29
Discusión31
Conclusiones32
Bibliografía.33

ABREVIATURAS.

(4-[(3-Butoxi-4-metoxifenil)metil]-2-imidazolidinona	PDE Ro 20-1724
3',5'-Monofosfato cíclico de adenosina	AMPe
5'-Trifosfato de adenosina	ATP
5'-Trifosfato de guanosina	GTP
5-Bromo-N-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-yl)-6-quinolinamina	UK 14304
Adenilato Ciclasa	AC
Adrenalina	Adr
Aminoácido	aa
Diacilglicerol	DG
Dodecil sulfato sódico	SDS
Fosfolipasa C	PLC
Grado de filtración glomerular	GFR
Guanosina difosfato	GDP
Inositol-1,4,5-trifosfato	IP3
Isoproterenol	Iso
Kilodaltones	kDa
N ⁶ -Ciclopentiladenosina	CFA
Nicotina adenina dinucleótido	NAD
Noradrenalina	NA
Proteína Cinasa A	PKA
Receptor β-adrenérgico	βAR
Receptor α1-adrenérgico	α1AR
Receptor α2-adrenérgico	α2AR
Toxina del cólera	CTX
Toxina Pertussis	PTX

INTRODUCCION

Un sistema complejo de señales químicas, es utilizado por las células para coordinar y regular sus actividades. Las diversas señales extracelulares e intracelulares, ocurren a través de la mediación de moléculas que funcionan como mensajeros químicos cuya naturaleza puede ser peptídica, esteroidea, aminas biogénicas entre otras (Goodman y Gilman, 1994).

El Sistema Nervioso Autónomo, al igual que otros sistemas, utiliza mecanismos transductores de señales para convertir un estímulo extracelular en una respuesta, y lo hace a través de la síntesis de sustancias conocidas como neurotransmisores, y son: la norepinefrina y la acetilcolina, que acoplándose a su receptor transmembranal específico presente en la célula blanco, desencadena la síntesis de otras sustancias llamadas segundos mensajeros y la activación de este sistema transductor conllevará a respuestas determinadas como por ejemplo la relajación del músculo liso, glucogenólisis y otras dependiendo del tejido involucrado (Goodman y Gilman, 1994).

Cuando el Sistema Nervioso Autónomo (o Simpático), es estimulado por la actividad física, la tensión psicológica, las reacciones alérgicas generalizadas, entre otras, lo hacen vía receptores α o β -adrenérgicos y las respuestas desencadenadas por la activación de estos receptores se ejemplifican en el cuadro 1.

Aspectos Farmacológicos

A lo largo del trabajo, nos referiremos a moléculas tipo agonista o antagonista, estos se pueden definir así: los fármacos que imitan la acción de acetilcolina o noradrenalina y provocan un cambio en una determinada función se denominan agonistas, los antagonistas serán agentes que causan efectos de inhibición de la acción de acetilcolina o noradrenalina. Algunos ejemplos de agonistas adrenérgicos sintéticos son: la metoxamina, la fenilefrina, la clonidina, el isoproterenol, el UK 14,304, etc.

Organos efectores	Tipo de receptor	Respuestas
Ojo		
Músculo radial del iris	α_1	Contracción (midriasis)++
Músculo ciliar	β_2	Relajación para visión lejana+
Venas (sistémicas)	α_1, β_2	Constricción ++dilatación++
Pulmón		
Músculo liso traqueal y bronquial	β_2	Relajación+
Glandulas bronquiales	α_1, β_2	Secreción disminuida; secreción aumentada
Estómago		
Motilidad y tono	$\alpha_1, \alpha_2, \beta_2$	Disminución (generalmente)+
Esfínteres	α_1	Contracción (generalmente)+
Secreción	α_1	Inhibición ¿?
Intestino		
Motilidad y tono	$\alpha_1, \alpha_2, \beta_1, \beta_2$	Disminución +
Esfínteres	α_1	Contracción (generalmente)+
Secreción	α_2	Inhibición
Vasculas y conductos biliares	β_2	Relajación +
Riñón		
Secreción de renina	α_1, β_1	Disminución+; aumento++
Vejiças		
Trigono y esfínter	α_1	Constracción ++
Ureter		
Motilidad y tono	α_1	Aumento
Utero	α_1, β_1	Embarazado:contracción (α_1);relajación (β_2). embarazado:relajación (β_2)
Organos sexuales masculinos	α_1	Eyacuación +-+
Piel		
Glandulas sudoriparas	α_1	Secreción localizada+
Cápsula esplénica	α_1, β_2	Contracción+++;relajación+
Músculo esquelético	β_2	Aumento en la contractilidad;glucogenólisis; captación de K^+
Hígado	α, β_2	Glucogenólisis y gluconeogénesis+++
Páncreas		
Islotes (células β)	α_2	Mayor secreción +++
Células adiposas	α, β_1, β_2	Lipólisis+--
Glandulas lagrimales	α	Secreción+
Glandula pineal	β	Sinestesia de melatonina
Hipófisis posterior	β_1	Secreción de hormona antidiurética

Cuadro 1. Respuestas fisiológicas controladas via receptores adrenérgicos. Las respuestas se clasifican de + a +++ para indicar aproximadamente la importancia de la actividad adrenérgica en el control de distintos órganos y funciones mencionados. (Tomado de Goodman y Gilman, 1994)

Existen 4 grupos de antagonistas de los receptores adrenérgicos y son:

- 1) Agentes alquilantes.- Haloalquilaminas que bloquean a los receptores $\alpha 1$ y $\alpha 2$ adrenérgicos de manera irreversible, como ejemplos se tienen a la fenoxibenzamina (Goodman y Gilman, 1994) y la cloroetilclonidina (Han y col, 1987).
- 2) Imidazolinás.- Dentro de este grupo se encuentra la Fentolamina. La Fentolamina es un antagonista competitivo con afinidad similar para los receptores $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (Goodman y Gilman, 1994).
- 3) Quinazolinas piperazínicas.- La prazosina, es el prototipo de esta familia, es un antagonista $\alpha 1$ -adrenérgico muy potente y selectivo (Goodman y Gilman, 1994).
- 4) Indoles.- Como la yohimbina, que es un antagonista selectivo para los receptores $\alpha 2$ (Goodman y Gilman, 1994).

MECANISMOS DE TRANSDUCCION DE SEÑALES.

Los efectos biológicos de la noradrenalina y la adrenalina son mediados a través de receptores transmembranales alfa y beta-adrenérgicos; estos se encuentran estructuralmente relacionados, pero regulan procesos fisiológicos distintos al controlar la síntesis o liberación de diferentes segundos mensajeros (Goodman y Gilman, 1994).

Los receptores adrenérgicos se han subdividido en tres tipos denominados $\alpha 1, \alpha 2$ y β . La activación del receptor $\alpha 1$ -adrenérgico lleva a la liberación del diacilglicerol e incrementa el calcio intracelular. Los receptores $\alpha 2$ y β adrenérgicos se encuentran acoplados de manera inhibitoria y estimulatoria respectivamente a la enzima adenilato ciclasa. A continuación mencionaré algunas características de los 3 componentes principales de los mecanismos de transducción relacionados a estos receptores adrenérgicos, con particular énfasis al receptor $\alpha 2$ adrenérgico.

RECEPTORES

Los receptores adrenérgicos pertenecen a la familia de receptores de siete dominios transmembranales que se acoplan a proteínas-G, dentro de esta familia también se encuentran los receptores colinérgicos-muscarínicos, los receptores para la sustancia K, y los receptores de rodopsina, etc. A su vez, tienen características compartidas entre sus miembros: 1) son proteínas transmembranales con siete dominios hidrofóbicos designados del I al VII, 2) poseen residuos de ácido aspártico aparentemente requeridos para demarcar la región citoplasmática de los receptores en los dominios transmembranales II y III, 3) contienen residuos de prolina, en los dominios IV, V, VI y VII que se piensa inducen dobles en la estructura alfa hélice de la proteína para formar regiones interdigitantes (Hoffman y Hartig, 1990).

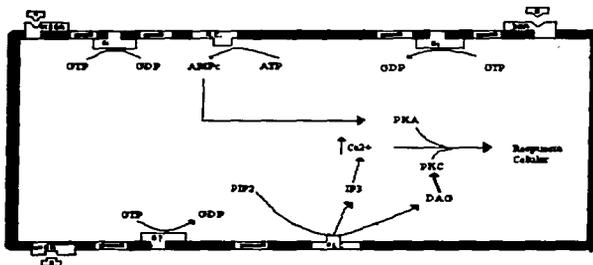
Receptores β -adrenérgicos.

Los receptores β -adrenérgicos, β_1 , β_2 y β_3 que son los subtipos descritos a la fecha; se acoplan a una proteína G α que a su vez se acopla de manera estimulatoria a la enzima adenilato ciclasa (AC), esta enzima cataliza la conversión de trifosfato de adenosina (ATP) en 3',5' monofosfato Cíclico de adenosina (AMPc). La activación del receptor conduce a la acumulación de AMPc, esta acumulación activa a la proteína cinasa dependiente de AMPc y esta al fosforilar diversas proteínas conduce a la alteración de diversas funciones celulares (Goodman y Gilman 1994) ver esquema 1.

Receptores α -adrenérgicos.

La estimulación de los receptores α_1 -adrenérgicos, al acoplarse a una proteína G (G α) provoca la activación de la enzima fosfolipasa-C que hidroliza los fosfoinosítidos componentes de la membrana plasmática, en dos moléculas, el diacilglicerol (DG) y el inositol-1,4,5-trifosfato (IP $_3$). El DG tiene como blanco de acción algunos elementos de la familia de las proteínas cinasas C. El IP $_3$ estimula la liberación de Ca $^{2+}$ de los depósitos intracelulares y el Ca $^{2+}$ libre, a su vez, estimula a proteínas cinasas sensibles a calcio, algunas de las cuales regulan además a otras proteínas cinasas, como por ejemplo la proteína cinasa C que fosforila muchos sustratos celulares incluyendo canales, bombas y

proteínas de intercambio iónico para regular conductancias iónicas; también modifica la concentración de este catión divalente en otros compartimentos celulares, así como la actividad de enzimas que tienen al calcio como modulador alostérico, permitiendo la



Esquema 1. Representación de los receptores adrenérgicos acoplados a sus efectores.

Algunas abreviaturas usadas en este esquema son:

Hormona (H), receptor $\alpha 2$ -adrenérgico ($\alpha 2$ AR), enzima adenilato ciclasa (AC), receptor β -adrenérgico (β AR), proteína cinasa dependiente de AMPc (proteína cinasa A ó PKA), fosfolipasa C (PLC), receptor $\alpha 1$ -adrenérgico ($\alpha 1$ AR), Inositol-1,4,5-trifosfato (IP3), fosfatidilinositol -4,5-bisfosfato (PIP2 ó referido en el texto como fosfoinosítidos), proteína cinasa C (PKC).

activación de vías metabólicas compartimentalizadas como la gluconeogénesis y la ureogénesis (Torres-Márquez, 1991) ver esquema 1.

Los receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos se acoplan a una proteína G (G_i) que inhibe la actividad de la enzima adenilato ciclasa provocando la disminución en la producción de AMPc (ver fig. 1).

Existen 3 subtipos de receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos: los receptores $\alpha 2A$, $\alpha 2B$ y $\alpha 2C$. Cada receptor consiste en una cadena polipeptídica cuya composición de aminoácidos varía, así el receptor $\alpha 2A$ y el $\alpha 2C$ son proteínas de 450 aa., mientras que el

α_2B tiene 461 aa. Tienen un masa molecular variable, el receptor α_2C tiene una masa molecular de aproximadamente 50 kDa, el α_2A de 64 kDa y el α_2B de 75 kDa. Sus secuencias son muy similares, se observa una homología de aproximadamente el 45% entre los tres subtipos de receptores y, la homología en sus regiones transmembranales es de aproximadamente 75% (Regan y col., 1988).

El extremo amino-terminal que posee una homología pequeña, entre los tres subtipos de receptores α_2 adrenérgicos, se encuentra glicosilado en dos sitios en los subtipos α_2A y α_2B en los, pero no en el subtipo α_2C (Weinshank y col., 1990). Los oligosacáridos no forman parte en la unión al ligando y no tienen actividades biológicas; se piensa que su función radica en proteger al extremo amino terminal del ataque de proteasas (O' Dowd y cols., 1989).

Los genes que codifican para los 3 subtipos de receptores α_2 , han sido clonados, secuenciados y expresados, mediante técnicas de biología molecular, que sumadas a técnicas de unión a ligandos (antagonistas y agonistas) marcados radiactivamente han permitido su caracterización farmacológica, para diferenciarlos en subtipos, como se presenta en el cuadro 3 (Regan y cols., 1988; Weinshank y cols., 1990; Kobilka y cols., 1987).

Cuadro 2. Algunas características de los receptores α_2 -adrenérgicos.

SUBTIPO DE RECEPTOR	LOCALIZACION EN EL CROMOSOMA	EXPRESION EN CELULAS	SELECTIVIDAD FARMACOLOGICA
α_2A	10	HT29, COS-C10	Prazosina > ARC-239 > clorpromazina
α_2B	4	COS-C2	Oxymetazolina > sukalmimgina > prazosina
α_2C	2	OK, COS-C4	Clorpromazina > oxymetazolina > sukalmimgina

PROTEINAS G.

La subfamilia de proteínas G pertenece a la familia de proteínas que ligan GTP, cuyos miembros tienen características estructurales y funcionales en común; todas son heterotríméricas, formadas por las subunidades α , β y γ . La subunidad α liga a los nucleótidos de guanina con alta afinidad y posee actividad intrínseca de GTPasa, las subunidades β y γ están fuertemente ligadas (aunque no covalentemente) para formar un complejo funcional $\beta\gamma$ (Spiegel y cols., 1992).

Los receptores activados por una señal extracelular apropiada (Fig 2), como hormonas, neurotransmisores, fotones de luz, etc., provocan que el GDP ligado a la subunidad α sea liberado y que el GTP se una a dicha subunidad; la unión del GTP provoca un cambio conformacional en la subunidad α que causa la activación de la proteína G y lleva a la disociación de la subunidad α del complejo $\beta\gamma$. La activación de la proteína G es suprimida por la actividad GTPasa, que hidroliza el GTP ligado a la subunidad α provocando un cambio conformacional de la subunidad y nuevamente aumentando su afinidad por el complejo $\beta\gamma$ (Bourne y cols., 1991).

Dos herramientas utilizadas en el estudio de las proteínas G son: la toxina Pertussis y la toxina del cólera que provocan modificaciones covalentes en la subunidad α de las proteínas G (Fig 2) por la transferencia de ADP-ribosa del NAD a un aminoácido específico dentro de esta subunidad, tales modificaciones resultan también en alteraciones funcionales de la proteína.

- 1) La toxina Pertussis transfiere el ADP-ribosa a un residuo de Cisteína³⁴⁷ en la región carboxi-terminal de $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ $\alpha 0$, α , causando el desacoplamiento del receptor a la proteína G y provocando con esto una activación continua de la adenilato ciclasa (Spiegel y cols., 1992).
- 2) La toxina del cólera cataliza la ADP-ribosilación del residuo Arginina²⁰¹ en Gs, impidiendo la reasociación de $\alpha\beta\gamma$, por inhibición de la actividad GTPasa, causando una activación "sostenida" (Spiegel y cols., 1992).

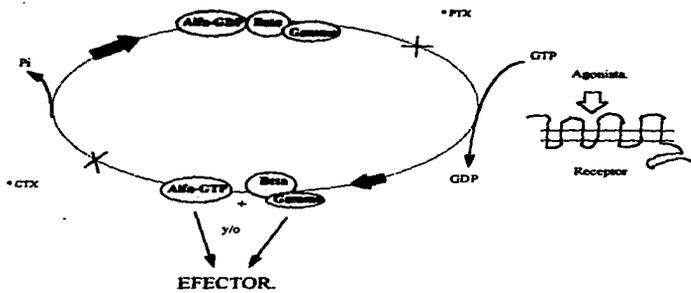


Figura 1 El ciclo de la GTPasa de la proteína G. En su estado basal o estado inactivo, la subunidad α está unida a GDP y está asociada como un heterotrímero con el complejo $\beta\gamma$. La interacción con la porción intracelular de un receptor activado por su agonista conduce al recambio de GDP por GTP. El enlace con GTP conduce a la disociación de la proteína G tanto del receptor como de las subunidades $\beta\gamma$. La subunidad α -GTP interactúa con y regula efectores, como en algunos casos también lo hace $\beta\gamma$. La actividad intrínseca de GTPasa de la subunidad α conduce a la hidrólisis de GTP a GDP + P_i . Esto causa la disociación de la subunidad α del efector y su reasociación con $\beta\gamma$, dando fin al ciclo. Las toxinas bacterianas modifican covalentemente a la subunidad α y por lo tanto alteran la transducción de señales (ver texto).

La subunidad α se encuentra entre los 39-52 kDa de masa molecular aparente basado en una electroforesis en gel de poliacrilamida SDS, y tiene cinco regiones altamente conservadas, no sólo entre la subfamilia de proteínas G sino incluso entre la superfamilia de proteínas que ligan GTP (Bourne y cols., 1991; Jhonson y cols., 1991); una de las regiones participa en la unión de los fosfatos β y γ del nucleótido y una porción de esta región participa en la unión del ión magnesio. En otra región rica en proeinina se encuentra la Arginina²⁰¹ susceptible de ser ribosilada por la toxina del cólera (Bourne y cols., 1991). Otra de estas regiones participa en forma importante en el cambio conformacional que resulta del reemplazamiento de GDP por GTP, así como en la hidrólisis del GTP unido a la subunidad α . Las otras 2 regiones participan en la unión del anillo de guaninas del nucleótido (Masters y cols., 1989; Graziano y Gilman, 1989; Wong y cols., 1992; Wu y cols., 1992).

Criterios bioquímicos, funcionales, immunoquímicos, aunados a las técnicas de purificación, clonación molecular, e hibridación, han permitido clasificar a las proteínas G en tipos y subtipos; así, las subunidades α de mamíferos pueden ser agrupadas en cuatro clases con base en la identidad de sus aa: 1) α_s y α_{olf} , 2) α_{t1} , α_{t2} , α_{i1} , α_{i2} , α_{i3} , α_0 , α_2 , 3) α_4 , α_{11} , α_4 , α_{12-16} , 4) α_{12} , α_3 , α_{13} (Northup y cols., 1980; Fung 1983; Bokoch y cols., 1983; Gilman 1987; Birnbaumer y cols., 1990).

El complejo $\beta\gamma$ presenta las siguientes funciones: 1) suprime la disociación de GDP y por tanto mantiene a la subunidad α en su estado inactivo, 2) es necesario para que la proteína G se acople con alta afinidad a su receptor, 3) está involucrado en la regulación directa de ciertos efectores, 4) se une a la membrana celular (Spiegel y cols., 1992). Además de estas funciones, estudios realizados con clones de adenilato ciclasa (AC), demostraron que la actividad de esta enzima estaba regulada por el complejo $\beta\gamma$; este complejo inhibe a la AC tipo I cuando ésta es estimulada por αGs o Ca^{2+} calmodulina; $\beta\gamma$ potencia el efecto estimulador de αGs tanto para la AC tipo II como la de Tipo IV (Tang y Gilman, 1991), mientras que otros tipos de AC no parecen ser afectados por $\beta\gamma$.

Este es un claro mecanismo de regulación en este camino transductor, ya que mientras la enzima AC es activada por Gs, puede ser inhibida o estimulada por $\beta\gamma$.

La subunidad β esta formada por una secuencia de 340 aminoácidos y migra como una proteína de 35-36 kDa en una electroforesis en gel de poliacrilamida SDS; está compuesta por ocho segmentos repetidos de 40 aa cada uno (Simon y cols., 1991). La subunidad γ está compuesta por 70 aa y tiene un tamaño aparente de 5-10 kDa en una electroforesis dependiendo de las condiciones del buffer utilizado (Spiegel y Weinstein, 1992).

EL EFECTOR

La enzima Adenilato ciclasa es una enzima transmembranal con doce dominios transmembranales, en la gran mayoría de los sistemas estudiados, aunque ciertas bacterias la presentan en el citosol (Tang y Gilman, 1992). El motivo estructural más común en los eucariotes superiores incluye una corta región amino terminal, y dos dominios citoplásmicos (C_1 y C_2) aproximadamente de 40 kDa; antes de cada dominio se encuentra una región flexible altamente hidrofóbica (M_1 y M_2). Cada una de estas regiones contiene seis hélices transmembranales. Esta es la forma de la adenilato ciclasa más ampliamente distribuida (Gilman 1987). Se han clonada ocho adenilato ciclasas de este tipo general, seis de éstas (designadas arbitrariamente I - VI) provienen de mamíferos, una es producto del gen *rutabaga* de *Drosophila*, y otra proviene de *Dictyostelium* y la masa molecular de varias especies de adenilato ciclasa es aproximadamente de 120 kDa (Pfeuffer y cols., 1991). Entre estas 8 Adenilato Ciclasas las porciones C_1 y C_2 (designadas como C_1a y C_2a) están bien conservadas (50%-92% en la identidad de sus secuencias entre las enzimas de mamíferos).

La actividad catalítica de esta enzima requiere ambas porciones C_1a y C_2a y pueden ser reguladas por su interacción. Mutaciones en la C_1a o en C_2a , comprometen la subunidad catalítica severamente (Tang y Gilman, 1992). La similitud en la secuencia de aminoácidos de varias Adenilato Ciclasas radica en las regiones C_1a y C_2a , mientras que en los dominios hidrofóbicos existe una gran diversidad en las secuencias de sus

aminoácidos, y son estos dominios sitios de activación por la forskolina (un diterpeno, soluble en lípidos que es un activador directo de la enzima Adenilato Ciclasa).

FUNCIONES DE LOS RECEPTORES α 2-ADRENERGICOS EN RIÑON

Una gran variedad de sistemas efectores son regulados por los receptores α 2-adrenérgicos, incluyendo a la enzima adenilato ciclasa, canales de K^+ y canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje (Limbird, 1989).

En riñón y específicamente en el epitelio renal, los receptores α 2-adrenérgicos son los más abundantes en las células de los túbulos proximales donde participan en el aumento de la resorción de Na^+ vía modulación del intercambio Na^+/H^+ (Summers 1984; Clark y col.,1990).

Estudios de unión con radioligandos, utilizando como antagonista específico a la [3H] Yohimbina, han demostrado que este tipo de receptor se encuentra enriquecido en las preparaciones membranales basolaterales tanto de túbulos renales de rata, como en los del cuyo (Summers 1984; Matsushima y col., 1987).

Modificaciones de los elementos del sistema transductor en el hipotiroidismo.

Las hormonas tiroideas, producidas por la glándula tiroides, son capaces de regular procesos metabólicos por mecanismos poco entendidos hasta ahora, también regulan la transcripción de algunos genes al estar asociada con su receptor intracelular. En el humano, el hipotiroidismo se caracteriza por un marcado retraso en el crecimiento, disminución en la producción de calor y obesidad (Voet, 1993).

El estado tiroideo también es capaz de modular la respuesta de las células a ciertas hormonas o agonistas, entre ellas la respuesta adrenérgica (Ros y col, 1988) y la respuesta a adenosina (Franco y col, 1996); por lo tanto la modificación en el estado tiroideo puede afectar esta respuesta. El mecanismo por el cual sucede esto no es un mecanismo generalizable a todos los tejidos, pero, como se describe a continuación, hay evidencias de que puede ser a través de la regulación de la expresión de los elementos que

conforman al sistema transductor de señales, compuesto por un receptor de superficie celular, la proteína G y la adenilato ciclasa.

Entre otros ejemplos, en adipocitos blancos de ratas hipotiroideas se encuentra una menor estimulación en la producción de AMPc vía receptores β -adrenérgicos (Malbon y cols. 1978a), existe también un mayor efecto de la respuesta al receptor A1 de adenosina; estos dos estímulos en conjunto llevan a la producción de una menor cantidad de AMPc, que se ha relacionado con una disminución de la lipólisis. El por qué de esta poca producción se ha tratado de explicar a nivel de los receptores β -adrenérgicos y la proteína G α . Se piensa que la hipotiroidismo induce el aumento en el número de receptores β -adrenérgicos y desacopla su interacción con la proteína G α que estimula a la enzima Adenilato Ciclasa (Malbon y col., 1984); pues no existe cambio en la producción de G α (Malbon y Gill, 1979), además induce un incremento en la subunidad α -Gi y α -G β (acopladas inhibitoriamente a la enzima Adenilato Ciclasa). Contrastantemente, el hipertiroidismo se asocia con un marcado aumento en la lipólisis y en la producción de AMPc en respuesta a la epinefrina (Deykin y Vaughn, 1963; Ichikawa y col., 1971; Malbon y col., 1978); existiendo para este estado, un decremento (aproximadamente 30%) en los niveles de α -Gi (Ros y col., 1988) y un ligero aumento en los niveles de α -G β (Rapiejko y Malbon, 1987).

En mamíferos, el tejido Adiposo café es el sitio donde se lleva a cabo la termogénesis la cual es activada por el frío vía Sistema Nervioso Simpático. La estimulación adrenérgica del tejido, por la norepinefrina (NE), causa una lipólisis vigorosa con la consecuente producción de calor (Carvalho y col., 1996); estos efectos son mediados vía receptores adrenérgicos α y β . Ha sido demostrado que el hipotiroidismo en la rata, se asocia con importantes alteraciones de la vía que regula la norepinefrina: existe un incremento en el número de receptores β 3-adrenérgicos (Rubio y col., 1995a) y se ha mostrado una reducción en el número de receptores β 1-adrenérgicos (Rubio y col., 1995b). También se ha observado disminución en la producción de AMPc (Raasmaja y Larsen 1989), la cual ha sido asociada con el incremento del 45% de α -Gi (que es pequeño comparado con el aumento de 2.5 veces en adipocitos blancos de ratas

hipotiroideas) y con el incremento del isotipo de la enzima Adenilato Ciclasa a una de tipo VI.

En riñón, una característica patofisiológica asociada al hipotiroidismo, es la vasoconstricción que provoca alteraciones hemodinámicas como la disminución en el grado de filtración glomerular (GFR) (Capasso y De Santo, 1987). La Adenosina por sus propiedades vasoactivas, ha sido implicada en la regulación de la GFR, porque regula en una gran variedad de procesos renales, tales como el transporte de Adenosina acoplado a sodio, (Le Hir y Dubach, 1984), el transporte de Fosfato de Sodio a nivel túbulo proximal (Coulson y col., 1991), y en el asa ascendente delgada, induce cambios en las concentraciones intracelulares de calcio (Burnatowska y Spielman 1991); sus efectos son mediados principalmente por receptores de superficie celular. La activación de los receptores del tipo A1, inducen vasoconstricción, decremento en la secreción de renina, decremento también en la actividad de la enzima Adenilato Ciclasa. La activación de los receptores de Adenosina del tipo A2, induce vasodilatación renal, aumento en la cantidad de AMPc y en la secreción de renina (Lomasney y col., 1991). Franco y col (1996) han sugerido que la vasoconstricción predominante para este estado está relacionada con la sobreactivación de los receptores de Adenosina del Tipo A1.

Estos antecedentes nos llevaron a plantear la siguiente hipótesis y objetivos:

HIPOTESIS.

Si la hormona tiroidea ejerce un efecto directo sobre las respuestas celulares a través de la regulación de los elementos que conforman los sistemas transductores de señales, específicamente aquel mediado por la enzima adenilato ciclasa como efector, entonces el hipotiroidismo modificará la respuesta $\alpha 2$ -adrenérgica a través de la regulación de uno o varios de los elementos que componen esta respuesta.

OBJETIVOS.

GENERAL.

-Determinar cómo el estado hipotiroideo modifica la respuesta $\alpha 2$ -adrenérgica en membranas corticales de riñón de rata.

ESPECIFICOS.

-Determinar si el hipotiroidismo modifica la respuesta $\alpha 2$ -adrenérgica en membranas corticales de riñón de rata.

-Precisar que elementos de la respuesta $\alpha 2$ -adrenérgica se encuentran modificados cuantitativamente o cualitativamente, por influencia del estado hipotiroideo en membranas corticales de riñón de rata.

MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos.

UK 14304 (5-Bromo-N-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-yl)-6-quinoxalioamina), Ro 20-1724 inhibidor PDE (4-[(3-Butoxi-4-metoxifenil)metil]-2-imidazolidinona, se obtuvieron de RBI; la creatina cinasa se obtuvo de Boehringer Mannheim; el ATP, fosfocreatina, GTP, AMPc, forskolina, ditiotreitol, NAD, arginina, timidina, azul brillante de Coomassie, Dowex y ahúmina se obtuvieron de SIGMA; el [2,8-³H] AMPc, [³²-P]-NAD, [³²-P] ATP, [³H]yohimbina de NEN (Boston MA.); la teofilina de Calbiochem. La Toxina Pertussis fué generosamente proporcionada por el Dr. J.A. García-Sáinz del Instituto de Fisiología Cehular, UNAM.

Animales.

ANIMALES CONTROL

Se utilizaron ratas machos Wistar de 350-450 gramos alimentados al libitum

RATAS HIPOTIROIDEAS

Se utilizaron ratas machos Wistar de 350-450 gramos. El hipotiroidismo se produjo por tiroidectomía quirúrgica, con reimplante de paratiroides (Muntz y col., 1986) realizada por la Dra. Martha Franco en el Departamento de Nefrología y Farmacología del Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez. Las ratas se utilizaron dos semanas después, la efectividad de este procedimiento fué demostrada previamente por Muntz y col. (1986)

Obtención de membranas de corteza de riñón.

Para obtener las membranas corticales de riñón se siguió el método propuesto por Boyer y col (1984).

Las ratas se sacrificaron por dislocación cervical, se extrajeron los riñones y se mantuvieron en NaCl 0.85% en un baño de hielo. Se eliminaron la cápsula y la médula para trabajar con la corteza renal; ésta, fué lavada y seccionada en solución salina, se

homogeneizó en 10 volúmenes de buffer Tris 10mM, EDTA 1mM, Sacarosa 0.25 M pH 7.5 con un vástago de teflón, en un homogeneizador de vidrio (Wheaton), en un tiempo de aproximadamente 20 minutos. El homogenado fue filtrado sobre dos capas de gasa y se centrifugó por 10 min a 1500 x g, la pastilla fué resuspendida en 2 ml de sacarosa 2M, y se volvió a homogeneizar. La mezcla fue centrifugada 10 min a 13000 x g. El sobrenadante se diluyó con agua (1:8, siendo la concentración final de sacarosa de 0.25M) y se centrifugó 10 min. a 10000 x g. El sobrenadante y un anillo rosa formado alrededor del sedimento, fueron cuidadosamente separados y ambos centrifugados en un mismo tubo 15 min a 35000 x g. La pastilla obtenida se resuspendió en el mínimo volumen de buffer Tris 50 mM, MgCl₂ 10 mM pH 7.5. Todas las centrifugaciones se hicieron a 4°C.

Ensayo de actividad de adenilato ciclasa.

La actividad de adenilato ciclasa fue determinada por la medición de la producción de AMPc según Salomon y cols (1974).

Se midió la actividad de la enzima adenilato ciclasa tras la estimulación de los receptores α 2-adrenérgicos con el agonista UK 14304 (5-Bromo-N-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-yl)-6-quinoxalimamína) o tras la estimulación de los receptores de Adenosina del sutiyo A1 con el agonista CPA (N⁶-Ciclopentiladenosina). Cuando se midió la respuesta de los receptores de adenosina, se omitió a la teofilina, porque aunque esta se usa como inhibidor de la fosfodiesterasa, en el ensayo para cualquier otro agonista, también puede funcionar como antagonista de los receptores de adenosina, por lo que en su lugar se empleó el Ro 20-1724 (4-[(3-Butoxi-4-metoxifenil)metil]-2-imidazolidinona) 10⁻⁴ M. El ensayo se realizó como se describe a continuación.

El medio de reacción está compuesto por: GTP 10⁻⁴ M, el agonista selectivo (UK14304 o CPA) en concentraciones de 10⁻¹⁰-10⁻³ M, forskolina 10⁻⁵M, teofilina 10 mM, [³²-P] ATP 1 μ Ci/tubo , ATP 20 nM , como sistema de regeneración de ATP, fosfocreatina 20 mM y creatinacimasa 0.8 U/ml, buffer (Tris-HCl 25 mM , MgCl₂ 5mM pH 7.5). La reacción se inició con la adición de 350-400 μ g de membranas de corteza de riñón . La incubación se llevó a cabo en agitación, a 30°C durante 10 min., se detuvo la

reacción con 1 ml de SDS 1 % , se adicionaron 10 µl de [2,8-³H]AMPc (12000 cpm aprox), se agitó y vertió en las columnas de 0.4 x 15 cm que contienen un 1 ml de resina Dowex previamente activada con HCl y lavada con 10 ml de H₂O, el eluido de ésta y un lavado de 2 ml de agua se desecharon, se colocaron las columnas Dowex sobre las de alumina que previamente fueron lavadas con 8 ml de imidazol 0.1 M, se agregaron 3 ml de agua y se desechó el eluido, se agregaron 4 ml de imidazol 0.1 M y se colectó esta fracción en viales a los que se les añadió líquido de centelleo; se cuantificó la radioactividad en un contador de centelleo Beckman clase LS6000TSA.

La cuantificación de proteínas fue determinada por el método de Lowry y col., (1951) utilizando albúmina como estándar.

Ensayos de unión con radioligandos.

Estos ensayos se realizaron como Snavely e Insel (1982) reportan: la solución de reacción en un volumen final de 250 µl, está compuesta por buffer (Tris 50 mM, MgCl₂ 10 mM, pH 7.4), fentolamina 10⁻⁴ M, antagonista utilizado para determinar el pegado no específico del ligando a los receptores α2-adrenérgicos, [³H]yohimbina (70-90 Ci/mmol), antagonista específico de receptores α2-adrenérgicos, en concentraciones de 0.8-90 nM. El ensayo de unión se inició con la adición de aprox. 300 µg de membranas de corteza renal, se incubó durante 30 min a 24°, después de los cuales la mezcla de reacción fue filtrada rápidamente a través de filtros de fibra de vidrio (Gelman Sciences P/N 66213 25mm), previamente incubados con polietilimina al 0.1%, utilizando un cochedador de células, Brandel 48-R. Los tubos y los filtros fueron lavados 4 veces con el buffer Tris 50 mM, MgCl₂ 10 mM, pH 7.4, a 4°, los filtros se transfirieron a viales a los cuales se les añadió líquido de centelleo y la radioactividad retenida en estos fue cuantificada en un contador de centelleo. Los ensayos fueron hechos por triplicado.

Las curvas de saturación y el análisis de Scatchard fueron analizadas utilizando el programa EBDA-LIGAND 2.0 de McPherson G.A.

La cuantificación de proteína fue determinada por el método de Lowry y col. (1951) utilizando albúmina como estándar.

ADP-RIBOSILACION

El ensayo de ADP-Ribosilación fue hecho como describe por Hernández y cols. (1991) brevemente:

La mezcla de reacción se compone de buffer de KH_2PO_4 pH 7.4 , 1.25 M, timidina 0.4 M, arginina 0.4 M, MgCl_2 0.1 M, ATP 0.02 M, NAD 0.2 M, GTP 0.01 M , [^{32}P]-NAD (10 μCi / tubo) , en un volumen final de 50 μl . Esta mezcla se incubó durante 1h a 30 °C con 100 μg de membranas de corteza de riñón y la toxina activada, la activación de la toxina se llevó a cabo al incubarla por 10 min. y 37°, con ditioneitol 200 mM.

La reacción se paró agregando ácido perclórico a una concentración del 60%, se centrifugó por 30 seg. en una microfuga, se agregó buffer KH_2PO_4 pH 7.4 , 1.25 M, se agitó y nuevamente se centrifugó en la microfuga por 30 seg. y las pastillas, fueron resuspendidas en buffer muestra (Tris 62.5 mM, EDTA 5mM, β -mercaptoetanol 5%, glicerol 10%, SDS 2.3%). Las muestras fueron hervidas y sometidas a una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 10%, el gel, fue teñido con azul brillante de Coomassie R-250. El gel se secó y se expuso en una "placa de almacenaje para fósforo" (storage phosphor screen) por 24 hrs. La radioactividad se determinó en un fosforimager tipo Storm de Molecular Dynamics.

RESULTADOS

En riñón, el AMPc controla diversos procesos, como son la filtración glomerular, la resorción y la secreción tubular, de manera que su producción está regulada estrictamente; sin embargo, en condiciones patológicas como el hipotiroidismo esta regulación puede alterarse.

La producción de AMPc en la respuesta α_2 -adrenérgica involucra 3 niveles: 1) el receptor α_2 -adrenérgico 2) la proteína Gi (que inhibe la actividad de AC) 3) la Adenilato Ciclasa y las fosfodiesterasas de AMPc, enzimas que rompen el anillo del nucleótido para dar lugar a un molécula de AMP; por lo tanto alguna modificación ya sea cuantitativa o cualitativa de cualquiera de estos elementos redundará en la producción de dicha molécula.

La respuesta α_2 adrenérgica se evaluó por medio de la inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa; es necesario tener una forma activada de la enzima para poderla inhibir, lo cual se puede hacer utilizando a un activador directo de la adenilato ciclasa, como lo es el diterpeno forskolina, por lo que se procedió a determinar la actividad basal de la adenilato ciclasa en las membranas de corteza de riñones normales e hipotiroideos. En la Figura 1 se observa que, independientemente del estado tiroideo, la actividad basal de la enzima adenilato ciclasa es muy similar (aprox. 2.5 pmoles/min/mg de prot.); sin embargo, tras estimular con forskolina, la activación de la adenilato ciclasa en membranas de corteza de riñón de ratas normales es mayor (19.6 vs 9.6 pmoles/min/mg de prot.), es decir, el patrón de estimulación de la enzima adenilato ciclasa es diferente en el estado hipotiroideo.

Posteriormente se evaluó la respuesta α_2 -adrenérgica en membranas corticales de ratas normales e hipotiroideas a través de curvas concentración-respuesta, medida ésta como disminución de la actividad de la enzima AC, al agonista selectivo α_2 -adrenérgico, UK 14304.

Tras estimular con el agonista selectivo α_2 -adrenérgico UK 14304 (Figuras 2 y 3), existe una tendencia a la disminución dosis dependiente de la actividad de la enzima adenilato ciclasa, lo que indica una respuesta inhibitoria, mediada por el sistema transductor de interés, tanto en membranas de corteza de riñón de ratas normales como en

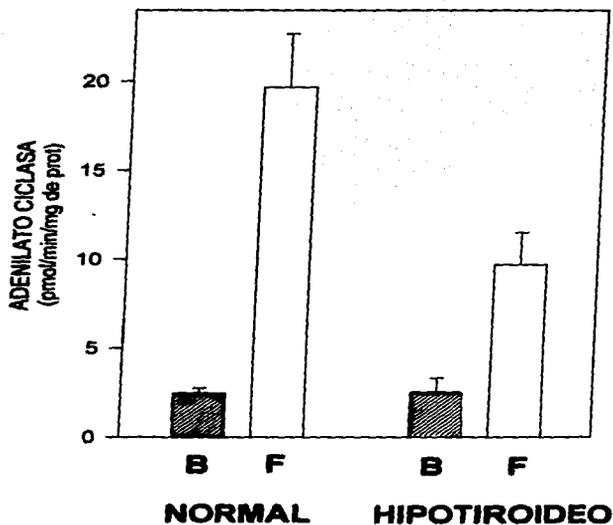


Figura.1.- Actividad de la enzima Adenilato Ciclasa (AC) en membranas de corteza de riñón de ratas normales e hipotiroideas.

Actividad basal (// B) y la obtenida tras estimular con 10 μ M de forskolina (F) los latos se presenta como la $X \pm ES$ de 3 experimentos realizados por duplicado.

NORMAL

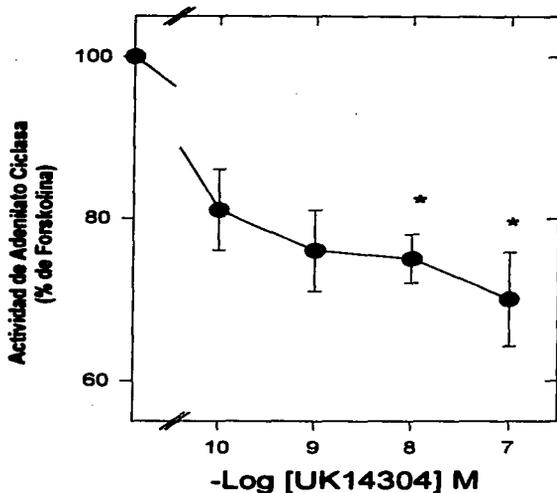


Figura 2. Actividad de AC en respuesta a UK 14304 en membranas de corteza de riñón de ratas normales. La actividad se representa como el % de la activación de la enzima por forskolina, los valores absolutos para las actividades basal y estimulada por forskolina, se muestran en la Fig. 1. Los valores presentados en las curvas son la $\bar{X} \pm$ ES de 3 experimentos realizados por duplicado. *Estadísticamente diferentes con respecto a la respuesta para dichas concentraciones del agonista en las membranas de corteza de riñón de ratas hipotiroidicas $p \leq 0.05$.

Hipotiroides

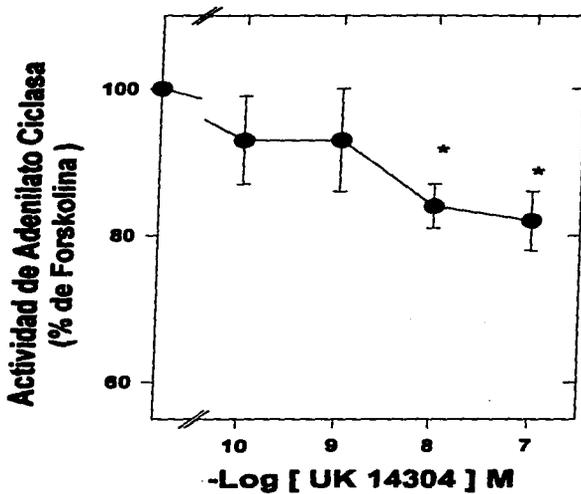


Figura 3. Actividad de AC en respuesta a UK 14304 en membranas de corteza de riñón de ratas hipotiroides. La actividad se representa como el % de la activación de la enzima por forskolina, los valores absolutos para las actividades basal y estimulada por forskolina, se muestran en la Fig. 1. Los valores presentados en las curvas son la $\bar{X} \pm$ ES de 3 experimentos realizados por duplicado. *Estadísticamente diferentes con respecto a la respuesta para dichas concentraciones del agonista en las membranas de corteza de riñón de ratas normales $p \leq 0.05$.

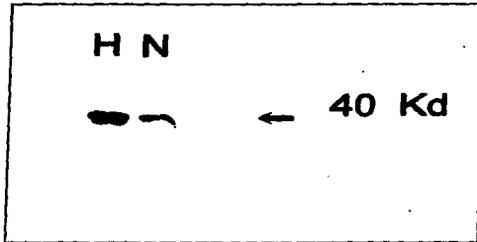
el de las hipotiroides. Sin embargo, las diferencias de respuesta de la actividad de la enzima adenilato ciclasa al agonista, que fueron estadísticamente significativas en el estado normal e hipotiroideo, las obtuvimos solo cuando se utilizaron las máximas concentraciones de UK 14304 (10-100 nM). La disminución de la actividad de la enzima adenilato ciclasa fue de hasta aprox. un 30% en membranas corticales de ratas normales, mientras que para las membranas de corteza de riñón de ratas hipotiroides (Fig. 2), esta disminución solo es del 15%, es decir la respuesta del sistema transductor se encuentra menos activa en el estado hipotiroideo. La respuesta del riñón normal es ligeramente menor a la que se observa en sistemas con pronunciada respuesta α -2 adrenérgica, como el adipocito blanco (40%) y las plaquetas (45%) (García-Sáinz y Medina-Martínez 1989; García-Sáinz y Gutiérrez-Venegas, 1989).

Estos primeros resultados nos indican ya una diferencia en el comportamiento del sistema transductor en el estado hipotiroideo; e incluso nos sugieren una diferencia a nivel actividad de la enzima adenilato ciclasa. No obstante, lo anterior no descarta que tanto a nivel receptores α 2-adrenérgicos, como a nivel proteína G_i puedan darse modificaciones, que en conjunto provocan esta menor activación de la respuesta α 2-adrenérgica para el estado hipotiroideo.

Por lo anterior, se evaluó la cantidad de αG_i en membranas de corteza de riñón de rata normal e hipotiroidea, por medio de una ADP-ribosilación mediada por la toxina Pertussis.

La Fig.4 muestra bandas con una masa molecular aproximada de 40 kDa, correspondientes a las proteínas G_i , de membranas corticales de riñón de ratas normales e hipotiroides. Los resultados de la integración del área ocupada por la banda de αG_i , en ambos tipos de membranas, nos muestra un relación 2.7 veces mayor en el estado hipotiroideo en comparación al normal.

Aunque interesantes, estos resultados no explican la respuesta α 2-adrenérgica observada en el riñón hipotiroideo, por lo que determinamos la cantidad de receptores α 2-adrenérgicos, mediante ensayos de unión con el radioligando [3H] yohimbina, antagonista específico para este tipo de receptores, el cual los satura rápida y reversiblemente. La cantidad de receptores.



Hypotiroideo /Normal = 2.7

Figura 4. ³²ADP -Ribosilación catalizada por toxina Pertussis en membranas de corteza de riñón de ratas normales (N) e hipotiroideas (H). Los datos de la integración de las áreas, se expresan como una relación siendo 2.7 veces mayor para las membranas de ratas hipotiroideas, comparadas con las normales.

(Bmax) , la obtuvimos del intercepto con el eje x, al graficar la relación de radioligando unido entre la cantidad de radioligando libre (B/F) vs la cantidad de radioligando unido específicamente (B), gráfico denominado Scatchard

La Fig.5 es una curva representativa de las saturaciones obtenidas en los ensayos de unión con el radioligando [³H] yohimbina de membranas corticales de ratas normales; en esta figura se observa que el sistema fue rápidamente saturable con un número de receptores de 452 ± 141 fmol/mg de proteína.

En la Fig. 6, se muestra una curva representativa de los ensayos de unión con el radioligando [³H] Yohimbina de membranas corticales de ratas hipotiroides. La unión al radioligando fué también rápidamente saturable y el número de receptores fue de 137 ± 64 fmol/mg de proteína. Por lo que a nivel de receptores α_2 - adrenérgicos se ve una disminución de éstos en el estado hipotiroideo, resultados que concuerdan con la menor respuesta al agonista UK 14304 (30% vs 15% de inhibición de la AC estimulada por forskolina en ratas normales e hipotiroides, respectivamente).

Los datos indican que a pesar del incremento de α_2 Gi para el estado hipotiroideo, prevalece la conducta determinada por el receptor, por lo que nos planteamos medir otra respuesta mediada por Gi; la respuesta de los receptores de adenosina del subtipo A1.

En primer lugar se requirió utilizar un sistema libre de metilxantinas; las xantinas (teofilina, cafeína entre otras), son potentes inhibidores de las fosfodiesterasas de AMPc, pero al mismo tiempo, son antagonistas de los receptores de Adenosina (Godman y Gilman, 1994), por lo que fueron substituidas por otro inhibidor de fosfodiesterasas, Ro1724, que por ser de naturaleza química diferente no interfiere con la acción de los receptores de adenosina.

Así, determinamos nuevamente la actividad de adenilato ciclasa en membranas corticales de ratas normal e hipotiroidea en estas nuevas condiciones. En la Figura 7, se observa que la actividad basal es mucho más baja (4-9 veces) que la respuesta en presencia de teofilina (Fig.3). Esta aparente menor actividad enzimática se observa también para la respuesta a forskolina, lo que nos sugiere que las fosfodiesterasas del AMPc no

RIÑÓN NORMAL

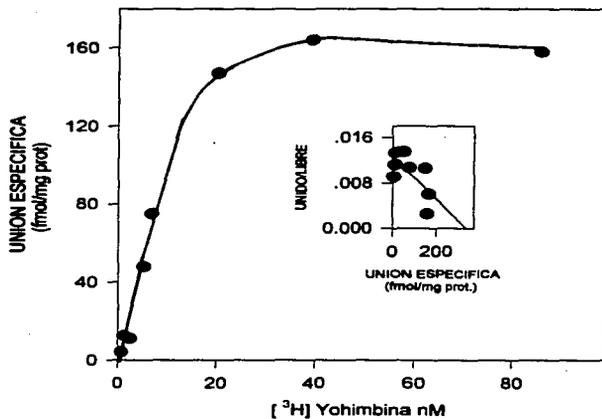


Figura 5. Ensayos de unión con el radioligando [³H] Yohimbina en membranas corticales de riñones de ratas normales. Curva representativa de 3 experimentos realizados por triplicado.

RIÑÓN HIPOTIROIDEO

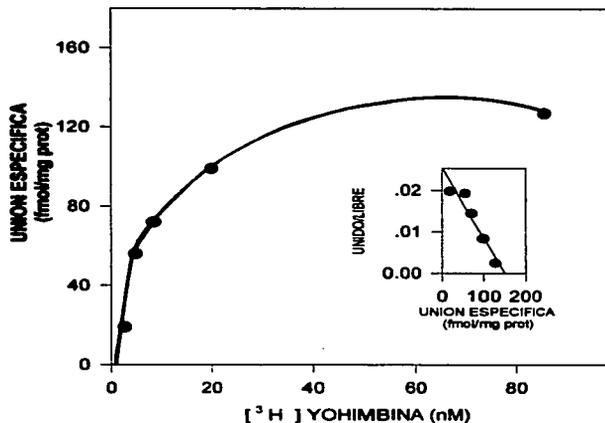


Figura 6. Ensayos de unión con el radioligando $[^3\text{H}]$ Yohimbina en membranas corticales de ratas hipotiroideas. Curva representativa de 3 experimentos realizados por triplicado.

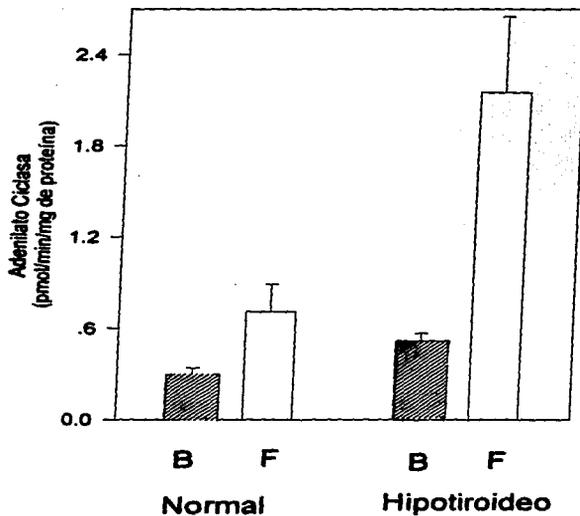


Figura 7. Actividad de la adenilato ciclasa de membranas corticales de riñón de ratas normales e hipotiroideas medida en ausencia de teofilina. La actividad basal (B) y la obtenida tras estimular con forskolina 10 μ M (F) se presenta como $X \pm ES$ de 3 experimentos realizados por duplicado.

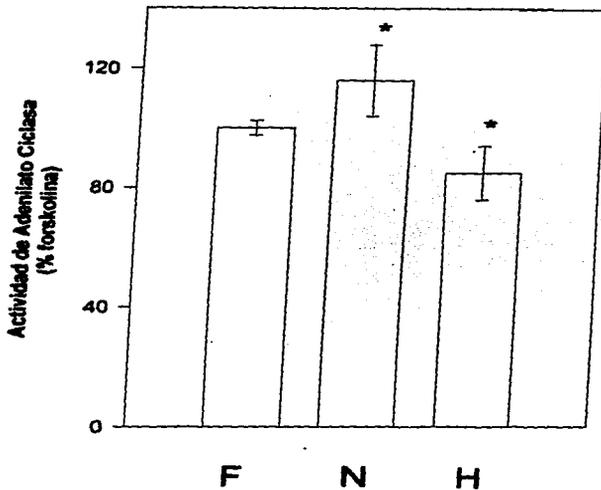


Figura 8. Actividad de adenilato ciclasa en respuesta a CPA de membranas corticales de riñón de ratas normales e hipotiroides. Las membranas de corteza de riñón normal (N) o de ratas hipotiroides (H), se incubaron en presencia de $10 \mu\text{M}$ de forskolina únicamente (F) o forskolina en presencia de CPA $1 \mu\text{M}$ (H y N). La actividad se representa como el % de la activación de la enzima por forskolina, los valores absolutos se muestran en la Fig. 7. Los datos corresponden a la $\bar{X} \pm \text{ES}$ de 3 experimentos realizados por duplicado. * Estadísticamente diferentes con un $p < 0.025$.

fueron totalmente inhibidas en el sistema y apenas nos permitieron ver la activación de la enzima. Aún bajo estas condiciones, nos interesaba determinar la respuesta del receptor de adenosina del subtipo A1, para lo cual utilizamos como agonista al N⁶-ciclopentiladenosina (CPA).

Como se observa en la Figura 8, las membranas de corteza de riñón de ratas normales no presentan respuesta al agonista de adenosina A1, mientras que en las membranas corticales de ratas hipotiroides, si existe una inhibición del 15%, la cual es de la misma magnitud que la observada para el agonista α -2 adrenérgico, lo cual podría sugerir que ésta, es la máxima respuesta inhibitoria de la AC que se puede obtener en riñón de rata hipotiroides.

DISCUSIÓN

Trabajos previos (ver página 11 de esta tesis) han demostrado que en el hipotiroidismo, existen alteraciones en el sistema transductor de señales receptor-proteína G-AC, cualitativas, que implica defectos en el acoplamiento entre los componentes del sistema transductor, cuantitativas o de ambos tipos, que incluso estas alteraciones son las responsables de respuestas patofisiológicas determinadas.

Existe muy poca información de como el estado tiroideo en riñón puede afectar este sistema transductor, pero ya que en riñón son varios los procesos regulados vía producción de AMPc a través de diferentes tipos de respuestas, no es sorprendente especular sobre la posible modificación de alguna de éstas en el hipotiroidismo. En el presente trabajo, se evaluó la respuesta $\alpha 2$ -adrenérgica en membranas de corteza de riñones de ratas normales e hipotiroideas; también se contempló el estudio de la cantidad de receptores $\alpha 2$ adrenérgicos y de la proteína αG_i .

La respuesta global del sistema transductor en membranas de corteza de riñón de ratas hipotiroideas se encuentra modificada, existiendo una menor respuesta $\alpha 2$ -adrenérgica. Proponemos que esta respuesta se debe a la disminución en el número de receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos y posiblemente a un pobre acoplamiento entre receptores y proteína G_i , pues, como vimos, existe un aumento de esta proteína en riñón hipotiroideo.

También evaluamos otro tipo de respuesta hormonal inhibitoria de la producción de AMPc en membranas corticales de riñón, la respuesta de receptores de adenosina A1 y lo que encontramos fue una disminución en la producción de AMPc para el estado hipotiroideo, mientras que ésta no fue detectada en las membranas de riñón normal. Estos datos concuerdan con los efectos fisiológicos observados en el riñón hipotiroideo (Franco y col., 1996), en cuanto a una mayor vasoconstricción producida por adenosina, efecto que en principio se ha atribuido a una disminución en la cantidad de AMPc.

Aunque no determinamos el número de receptores de adenosina A1, por falta de radioligandos suficientemente sensibles para la cuantificación de estos receptores en tejidos no excitables, sugerimos que el aumento de éstos y/o su mejor acoplamiento a la

proteína Gi, en comparación con los α -2 adrenérgicos, podría influir en gran medida en la respuesta obtenida.

Estas 2 respuestas aunque provocan un efecto inhibitorio en la producción de AMPc, en el estado hipotiroideo son diferentes, esto es, que la respuesta a Adenosina se encuentra más activa que en el estado normal, mientras que la respuesta α 2-adrenérgica se encuentra menos activa en el estado hipotiroideo.

Para el estado hipotiroideo se ha propuesto que las modificaciones de las respuestas son tejido específico. En este trabajo, sugerimos que incluso un mismo tipo de respuesta inhibitoria de la Adenilato Ciclasa, mediada por diferentes receptores en el riñón, puede afectarse de manera independiente; es decir, la modificación puede ocurrir a niveles distintos. Particularmente, la cantidad de receptores α -2 adrenérgicos disminuye, junto con esta respuesta, mientras que la respuesta de los receptores de adenosina A1 aumenta de manera semejante a lo que ocurre con la proteína α Gi .

CONCLUSIONES

- En membranas de corteza de riñón de ratas hipotiroideas existe una menor respuesta α 2-adrenérgica lo cual correlaciona con la disminución en el número de receptores.
- En corteza de riñón de ratas hipotiroideas existe una respuesta del receptor tipo A1 de adenosina que no se observa en el riñón normal.
- Existe un aumento de α Gi en riñón de ratas hipotiroideas en relación al riñón de rata normal, que no necesariamente indica un aumento en todas las respuestas mediadas por esta.

BIBLIOGRAFIA

- Birbaumer, L., Abramowitz J., Brown, A.M. (1990) *Biochem. Biophys. Acta.* 1031:163.
- Bokoch, G.M., Katada, T., Northup, J.K., Hewlett, E.L., Gilman, A.G. (1983) *J. Biol. Chem.* 258:2072.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A., MacCormick, F. (1991) *Nature.* 349: 117.
- Boyer, J.L., García A., Posadas, C., García- Sáinz J.A., (1984) *J.Biol. Chem.* 259:8076.
- Burnatowska-Hledin, M.A.; Spielman, W.S (1991) *Am. J. Physiol.* 260:C143.
- Capasso, G., De Santo, N.G. (1987) *Kidney Int.* 32:443.
- Carvalho, S.D., Bianco, A.C., Silva, E.J. (1996) *Endocrinology.* 137:5519.
- Clark, J.P., Gragoe, E.J., Limbird, L.E. (1990) *Am. J. Physiol.* 259: F997.
- Coulson, R., Jkohnson, R.A., Olsson, R.A., Cooper, D.R. Scheinman, S.J., (1991) *Am. J. Physiol.* 269:F921.
- Deykin, D., Vaughn, M. (1963) *J. Lipid. Res* 2:861.
- Franco, M., Bobadilla N., Suarez, J., Tapia, E., Sanchez, L., Herrera-Acosta, J. (1996) *Amer J. Physiol.* 270: F254.
- Fung, B.K. , (1983) *J. Biol. Chem.* 258:10495.
- García- Sáinz J.A., Gutiérrez Venegas (1989) *FEBS Lett.* 257:427.
- García- Sáinz J.A., Medina, M.O. (1989) *Biochem. Int.* 19:899.
- Gilman, A.G. (1987) *Annu. Rev. Biochem.* 56: 615.
- Gilman, A.G. (1994) *Las Bases Farmacológicas de la terapéutica.* pp 97-133, 196-249, De. Médica Panamericana, Octava edición, segunda reimpresión.
- Graziano, M. P., Gilman, A.G. (1989) *J.Biol. Chem.* 264: 15475.
- Hernández-Sotomayor, S.M.T., Macías-Silva, M., Malbon C., García-Sáinz, J.A. (1991) *Am. J. Physiol.* 260: C259.
- Ichikawa, A., Matsumoto, H., Sakato, N., Tomita, K. (1971) *J. Biol.Chem. (Tokyo)* 69:1055
- Jarvis, M.F. (1989) *J.Pharmacol. Exp. Ther.* 251: 888.

- Johnson, G.L., Dhanasekaran, N., Gupta, S.K., Lowndes, J.M., Vaillancourt, R.R., Ruoho, A.E. (1991) *J. Cell Biochem.* 47: 136.
- Kobilka, B.K., Matsui, H., Kobilka, T.S., Yang-Feng, T.L., Francke, V., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., Regan, J.W. (1987) *Science* 238: 650.
- Lehir, M., Dubach, V.C., (1984) *Phuegers Arch.* 401:58.
- Limbird, L.E. (1989) *FASEB J.* 2:2686.
- Lefkowitz, R.J. (1987) *J. Biol. Chem.* 262: 7321.
- Lomasney, J.W., Coteconia, S., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1095:127.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., (1951) *J. Biol. Chem.* 193:265.
- Malbon, C.C., Herte, R.C., Fain, J.N. (1978a) *J. Biol. Chem.* 253:3114.
- Malbon, C.C., Moreno, F.J., Cabelli, R.J., Fain, J.N. (1987) *J. Biol. Chem.* 253:671.
- Malbon, C.C., Gill, D.M. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 586:518.
- Malbon, C.C., Graziano, M.p., Johnson, G.L., (1984) *J. Biol. Chem.* 259:3254.
- Mastera, S.B., Miller, R.T., Chi, M.H., Chang, F.H., Beiderman, B., Lopez, N.G., Bourne, H.R. (1989) *J. Biol. Chem.* 264: 15467.
- Matsushima, Y., Akabre, S., Kawamura, J., Ito, K. (1987) *Jpn. J. Pharmacol.* 4:284.
- Northup, J.K., Sternweis, P.C. Smigel, M.D., Schleifer, L.S., Ross, E.M., Gilman, A.G. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 6516.
- O' Dowd, B.G., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G. (1989) *Annu. Rev. Neurosci.* 12:67.
- Pfeuffer, E., Molner, S., Pfeuffer, T (1991) *Methods. Enzimol.* 195:83.
- Raasmaja, A. and Larsen, P.R. (1989) *Endocrinology* 136: 3267.
- Rapiejo, P.J., Malbon, C.C. (1987) *Biochem. J.* 241:765 .
- Regan, J.W., Kobilka, T.S., Yang-Feng, T.L., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., Kobilka, B.K. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:6301.
- Ros, M., Northup, J.K., Malbon, C.C. (1988) *J. Biol. Chem.* 263:4362.
- Rubio, A., Raasmaja, A., Silva, J. (1995) *Endocrinol.* 136:3277.
- Rubio, A., Raasmaja A., Maia A.I., Kim, K., Silva, J. (1995) *Endocrinol.* 136:3267.

- Salomon, Y., Londos, C., Rodbell, M. (1974) *Anal. Biochem.* 58: 541.
- Imon, M.I., Strahmann, M.P., Gautam, N. (1991) *Science* 252:802.
- Snavey, M.D., Insel, P.A. (1982) *Mol. Pharmacol.* 22:532.
- Spiegel A.M., Shenker, A., Weinstein, L.S. (1992) *Endocrine Reviews*, 13: 536.
- Summers, R.J. (1984) *Fed. Proc.* 43:2917.
- Tang, W.J., Gilman, G.A. (1992) *Cell* 70:869.
- Torres-márquez, M.E.(1991) *Subtipos de receptores α -1 adrenérgicos y su regulación.*
Tesis de Doctorado en IBB. UNAM
- Voet, J and Voet, D. (1993) *Biochemistry*. Ed.
- Weinshank, R.L., Zgombick, J.M., Macchi, M., Adham, N., Lichtblau, H.,
Branchek, T.A., Hartig, P.R. (1990) *Mol. Pharmacol.* 38:681.
- Wong, Y.H., Conklin, B.R., Bourne, H.R. (1992) *Science* 255:339
- Wu, D., Lee, C. H., Rhee, S.G., Simon, M. I. (1992) *J. Biol. Chem.* 267: 1811.