

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



**MECANISMOS DE ADAPTACION  
AL EJERCICIO FÍSICO.  
PAPEL DE LOS SISTEMAS DE TRANSDUCCION  
DE SEÑALES EXTRACELULARES**

TESIS DOCTORAL

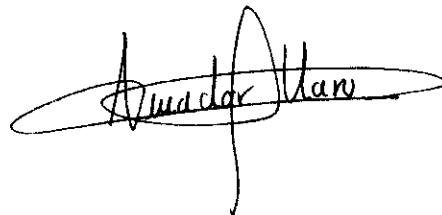
por

JOSE LUIS NIETO BUENO

Director: Dr. Amador Haro Ramos

Madrid, 1993

Vº Bº DEL DIRECTOR

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Amador Alan". The signature is enclosed within a large, horizontal, hand-drawn oval.A handwritten signature in black ink, appearing to read "J. J. Prieto". The signature is enclosed within a large, horizontal, hand-drawn oval.

A tí Mari Carmen por tu amor y  
entrega. Y a nuestros hijos  
Raquel y ...

El presente trabajo de investigación se ha realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Universidad Complutense bajo la dirección del Dr. Amador Haro Ramos, a quien quiero expresar mi más sincero agradecimiento por ello así como por su ayuda personal.

También quiero agradecer al Dr. Alberto Guillén sus enseñanzas, a la Dra. Inés Díaz-Laviada y a Maite Vallejo su inestimable colaboración en la labor experimental, al resto de *compañeros de laboratorio el ambiente de trabajo* y a todos aquellos que con su amistad y apoyo han contribuido a la realización de esta Tesis Doctoral.

Este trabajo se ha financiado con cargo al proyecto DEP 90/0558 de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología.

## ABREVIATURAS

AC:	Adenilato ciclasa
ADP:	Adenosina 5'-difosfato
ADR:	Adrenalina
AngII:	Angiotensina II
ATP:	Adenosina 5'-trifosfato
BARK:	Quinasa de receptores $\beta$ -adrenérgicos
BSA:	Albúmina de suero bovino
cAMP:	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
CB:	Carbacol
cGMP:	Guanosina 3',5'-monofosfato cíclico
CM:	Calmodulina
CHA:	Ciclohexiladenosina
DAG:	Diacilglicerol
DTT:	Ditiotreitol
EDTA:	Etilendiaminotetraacético
EGF:	Factor de crecimiento epidérmico
FK:	Forscolina
GAPs:	Proteínas activantes de la actividad GTPásica
GCA:	Guanilato ciclasa A
GCB:	Guanilato ciclasa B
GCC:	Guanilato ciclasa C
GDP:	Guanosina 5'-difosfato
GIP:	Proteína inhibidora de la actividad GTPásica
GLU:	Glucagón
GNRPs, GRFs:	Proteínas de intercambio y liberación de nucleótidos de guanina
GppNHp:	Guanililimidodifosfato
GTP:	Guanosina 5'-trifosfato
hGC:	Gonadotropina coriónica humana
ICYP:	[ <sup>125</sup> I] iodocianopindolol
IGF:	Factor de crecimiento análogo de insulina
IP <sub>3</sub> :	Inositol trifosfato
ISO:	Isoproterenol
Me <sup>2+</sup> :	Catión divalente
NAD:	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
NGF:	Factor de crecimiento de nervios
PAF:	Factor activador de plaquetas
PDGF:	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PGE <sub>2</sub> :	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PKA:	Proteína quinasa dependiente de cAMP o proteína quinasa A

PKC:	Proteína quinasa dependiente de fosfolípidos
PMSF:	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
SDS:	Dodecilsulfato sódico
TCA:	Acido tricloroacético
VO <sub>2</sub> max:	Capacidad aeróbica máxima

## INDICE

1	INTRODUCCIÓN .....	1
1.1	PREÁMBULO .....	2
1.2	MENSAJEROS QUÍMICOS Y SISTEMAS DE TRANSDUCCIÓN .....	2
1.2.1	Tipos de mensajeros químicos .....	2
1.2.2	Clasificación de los sistemas de transducción de información a través de membrana .....	3
1.3	PROTEÍNAS G .....	6
1.3.1	Clasificación .....	6
1.3.2	Proteínas G heterotriméricas .....	7
1.3.3	Modificación covalente de proteínas G .....	10
1.3.4	Ciclo de activación-desactivación de proteínas G en la transducción de señales .....	13
1.4	RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G. RECEPTORES ADRENÉRGICOS .....	13
1.4.1	Características generales .....	13
1.4.2	Modelo del complejo ternario .....	16
1.4.3	Clasificación de los receptores adrenérgicos .....	18
1.4.4	Mecanismos de desensibilización de receptores acoplados a proteínas G .....	18
1.5	ADENILATO CICLASA .....	21
1.5.1	El cAMP como mensajero intracelular .....	22
1.5.2	Clasificación de adenilato ciclasas .....	23
1.5.3	Regulación de la adenilato ciclasa .....	26
1.5.4	Proteínas G acopladas a adenilato ciclasa .....	29
1.5.5	Desensibilización de adenilato ciclasa .....	29
1.6	TIPOS DE EJERCICIO FÍSICO .....	31
1.7	METABOLISMO ENERGÉTICO DURANTE EL EJERCICIO. RELACIÓN METABÓLICA ENTRE TEJIDO ADIPOSO, HÍGADO Y CORAZÓN .....	32
1.7.1	Reservas energéticas .....	32
1.7.2	Integración del metabolismo energético de tejido adiposo, hígado y músculo cardíaco durante el ejercicio .....	33

1.7.2.1	Ejercicio de intensidad supramáxima y de corta duración .....	34
1.7.2.2	Ejercicio de resistencia .....	34
1.8	RESPUESTAS ADAPTATIVAS DEL SISTEMA $\beta$ -ADRENÉRGICO-ADENILATO CICLASA AL EJERCICIO FÍSICO .....	36
1.8.1	Corazón .....	37
1.8.1.1	Componentes del sistema $\beta$ -adrenérgico-adenilato ciclasa cardíaco y funciones que regulan .....	37
1.8.1.2	Estado actual de conocimiento sobre la adaptación del sistema $\beta$ -adrenérgico-adenilato ciclasa cardíaco al ejercicio físico .....	40
1.8.2	Hígado .....	41
1.8.2.1	Componentes del sistema $\beta$ -adrenérgico-adenilato ciclasa hepático y funciones que regulan .....	41
1.8.2.2	Estado actual de conocimiento sobre la adaptación del sistema $\beta$ -adrenérgico-adenilato ciclasa de hígado al ejercicio físico .....	43
1.8.3	Tejido adiposo .....	45
1.8.3.1	Componentes del sistema $\beta$ -adrenérgico-adenilato ciclasa de tejido adiposo y funciones que regulan .....	45
1.8.3.2	Estado actual de conocimiento sobre la adaptación del sistema $\beta$ -adrenérgico-adenilato ciclasa de tejido adiposo al ejercicio físico .....	48
1.9	OBJETIVOS .....	50
2	MATERIALES Y MÉTODOS .....	51
2.1	OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO .....	52
2.1.1	Descripción de los animales y su estabulación .....	52
2.1.2	Programa de entrenamiento físico de los animales .....	52
2.1.3	Obtención de las muestras biológicas .....	54
2.2	OBTENCIÓN DE LOS PREPARADOS DE MEMBRANAS .....	54
2.2.1	Obtención del preparado de membranas de ventrículo izquierdo .....	54
2.2.2	Obtención del preparado de membranas de hígado .....	55
2.2.3	Obtención del preparado de membranas de tejido adiposo .....	56

2.3	ENSAYOS DE UNIÓN DE LIGANDOS .....	59
2.3.1	Ensayos de saturación .....	59
2.4	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE ADENILATO CICLASA .....	60
2.4.1	Ensayo cromatográfico .....	60
2.4.2	Cálculo de la actividad enzimática .....	61
2.4.3	Preparación de los soportes cromatográficos .....	61
2.5	ADP-RIBOSILACION CATALIZADA POR TOXINA <i>PERTUSSIS</i> .....	61
2.5.1	Incubación de las muestras y posterior tratamiento electroforético .....	61
2.5.2	Cuantificación del sustrato ADP-ribosilado .....	62
2.6	ADP-RIBOSILACIÓN CATALIZADA POR TOXINA COLÉRICA ...	63
2.6.1	Incubación de las muestras y posterior tratamiento electroforético .....	63
2.6.2	Cuantificación del sustrato ADP-ribosilado .....	63
2.7	IMMUNODETECCION DE PROTEINAS DESPUES DE ELECTROTRANSFERENCIA ("IMMUNOBLOT") .....	64
2.7.1	Preparacion de las muestras y posterior electroforesis .....	64
2.7.2	Electrotransferencia a un soporte de nitrocelulosa .....	64
2.7.3	Incubación con los anticuerpos .....	65
2.7.4	Cuantificación de las proteínas inmunodetectadas .....	65
2.8	MEDIDAS DE LAS MUESTRAS RADIOACTIVAS .....	65
2.9	VALORACIÓN DE PROTEÍNAS .....	66
2.10	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	66
2.11	PRODUCTOS Y REACTIVOS .....	66
3	RESULTADOS .....	68
3.1	EFFECTO DEL EJERCICIO FÍSICO SOBRE EL PESO CORPORAL Y DE LOS ÓRGANOS .....	69

3.2	INFLUENCIA DEL EJERCICIO FÍSICO SOBRE EL SISTEMA $\beta$ -ADRENÉRGICO- ADENILATO CICLASA EN MIOCARDIO DE RATA .....	69
3.2.1	Receptores $\beta$ -adrenérgicos .....	69
3.2.2	Regulación del sistema de adenilato ciclasa .....	71
3.2.2.1	Características reguladoras generales de la vía estimuladora del sistema de adenilato ciclasa .....	71
3.2.2.2	Características reguladoras de la subunidad catalítica .....	75
3.2.2.3	Regulación a través de la proteína $G_i$ independiente de receptor .....	77
3.2.2.4	Regulación por la vía estimuladora $\beta$ -adrenérgica .....	78
3.2.2.5	Regulación por la vía inhibidora muscarínica .....	78
3.2.2.6	Otras vías de control negativo del sistema .....	78
3.2.3	Proteínas G .....	79
3.2.3.1	ADP-ribosilación por toxina pertussis .....	79
3.2.3.2	ADP-ribosilación por toxina colérica .....	82
3.2.3.3	Niveles de $\alpha_s$ .....	82
3.2.3.4	Niveles de $\alpha_i$ .....	84
3.2.3.5	Niveles de la subunidad $\beta$ .....	85
3.3	INFLUENCIA DEL EJERCICIO FÍSICO SOBRE EL SISTEMA $\beta$ -ADRENÉRGICO-ADENILATO CICLASA EN HIGADO DE RATA .....	86
3.3.1	Receptores $\beta$ -adrenérgicos .....	86
3.3.2	Regulación del sistema de adenilato ciclasa de hígado .....	86
3.3.2.1	Características reguladoras generales de la vía estimuladora del sistema .....	86
3.3.2.2	Características reguladoras de la subunidad catalítica .....	89
3.3.2.3	Regulación a través de la proteína $G_i$ independiente de receptor .....	90
3.3.2.4	Regulación por la vía estimuladora $\beta$ -adrenérgica .....	92
3.3.2.5	Regulación por glucagón .....	93
3.3.2.6	Regulación por la vía inhibidora $\alpha_2$ -adrenérgica .....	94
3.3.2.7	Otras vías de control negativo del sistema .....	96
3.3.3	Proteínas G .....	97
3.3.3.1	ADP-ribosilación por toxina pertussis .....	97
3.3.3.2	ADP-ribosilación por toxina colérica .....	97
3.3.3.3	Niveles de $\alpha_s$ .....	98
3.3.3.4	Niveles de $\alpha_i$ .....	100
3.3.3.5	Niveles de la subunidad $\beta$ .....	101

3.4	INFLUENCIA DEL EJERCICIO FÍSICO SOBRE EL SISTEMA $\beta$ -ADRENÉRGICO-ADENILATO CICLASA EN TEJIDO ADIPOSO DE RATA .....	101
3.4.1	Selección del preparado de membranas .....	101
3.4.2	Receptores $\beta$ -adrenérgicos .....	103
3.4.3	Regulación del sistema de adenilato ciclasa .....	103
3.4.3.1	Características reguladoras generales de la vía estimuladora del sistema .....	103
3.4.3.2	Regulación por la vía estimuladora $\beta$ -adrenérgica .....	106
3.4.3.3	Regulación por la vía inhibidora $A_1$ de adenosina .....	107
3.4.4	Proteínas G .....	108
3.4.4.1	ADP-ribosilación por toxina pertussis .....	108
3.4.4.2	ADP-ribosilación por toxina colérica .....	110
3.4.4.3	Niveles de $\alpha_s$ .....	111
3.4.4.4	Niveles de $\alpha_i$ .....	114
3.4.4.5	Niveles de la subunidad $\beta$ .....	114
4	DISCUSIÓN .....	116
4.1	MODELO ANIMAL EXPERIMENTAL .....	117
4.1.1	Programa de entrenamiento físico .....	117
4.1.2	Efecto del ejercicio físico sobre el peso del animal y de los diferentes órganos objeto de estudio .....	117
4.2	ADAPTACIÓN DEL SISTEMA $\beta$ -ADRENÉRGICO-ADENILATO CICLASA DE MIOCARDIO DE RATA AL EJERCICIO FÍSICO ...	118
4.2.1	Receptores $\beta$ -adrenérgicos .....	119
4.2.2	Regulación del sistema de adenilato ciclasa .....	121
4.2.2.1	Características reguladoras de la subunidad catalítica ...	121
4.2.2.2	Características reguladoras de la proteína $G_s$ .....	122
4.2.2.3	Regulación por la vía estimuladora $\beta$ -adrenérgica .....	123
4.2.2.4	Regulación negativa del sistema .....	124
4.2.3	Proteínas G .....	125
4.2.3.1	Niveles de $G_s$ .....	125
4.2.3.2	Proteínas $G_i$ .....	126
4.2.4	Resumen .....	128

4.3	ADAPTACIÓN DEL SISTEMA $\beta$ -ADRENÉRGICO-ADENILATO CICLASA DE HÍGADO DE RATA AL EJERCICIO FÍSICO . . . . .	129
4.3.1	Receptores $\beta$ -adrenérgicos . . . . .	129
4.3.2	Regulación del sistema de adenilato ciclasa . . . . .	130
4.3.2.1	Características reguladoras de la subunidad catalítica . . . . .	130
4.3.2.2	Características reguladoras de la proteína $G_s$ . . . . .	130
4.3.2.3	Regulación por receptores acoplados positivamente al sistema, $\beta$ -adrenérgicos y de glucagón . . . . .	131
4.3.2.4	Regulación negativa del sistema . . . . .	131
4.3.3	Proteínas G . . . . .	132
4.3.3.1	Niveles de $G_s$ . . . . .	132
4.3.3.2	Proteínas $G_i$ . . . . .	133
4.3.4	Resumen . . . . .	133
4.4	ADAPTACIÓN DEL SISTEMA $\beta$ -ADRENÉRGICO-ADENILATO CICLASA DE TEJIDO ADIPOSO DE RATA AL EJERCICIO FÍSICO . . . . .	134
4.4.1	Receptores $\beta$ -adrenérgicos . . . . .	134
4.4.2	Regulación del sistema de adenilato ciclasa . . . . .	135
4.4.2.1	Características reguladoras de la subunidad catalítica . . . . .	135
4.4.2.2	Características reguladoras de la proteína $G_s$ . . . . .	136
4.4.2.3	Regulación por la vía estimuladora $\beta$ -adrenérgica . . . . .	137
4.4.2.4	Regulación negativa del sistema . . . . .	138
4.4.3	Proteínas G . . . . .	139
4.4.3.1	Niveles de $G_s$ . . . . .	139
4.4.3.2	Proteínas $G_i$ . . . . .	140
4.4.4	Resumen . . . . .	141
4.5	DISCUSIÓN INTEGRADA DE LA ADAPTACIÓN DEL SISTEMA $\beta$ - ADRENÉRGICO-ADENILATO CICLASA EN CORAZÓN, HÍGADO Y TEJIDO ADIPOSO AL EJERCICIO FÍSICO . . . . .	141
5	CONCLUSIONES . . . . .	144
6	BIBLIOGRAFÍA . . . . .	146

## INTRODUCCION

## 1.1 PREÁMBULO

La regulación de las funciones celulares y su integración en el seno de un organismo pluricelular depende de la transmisión de información, desde células emisoras a receptoras, en forma de mensajeros químicos de muy diversa naturaleza (*Hardie, 1991*).

La especificidad en la transmisión radica en la existencia de receptores, generalmente proteínas localizadas en membrana plasmática o intracelularmente, que median la respuesta biológica promovida por el mensajero al que se unen con elevada afinidad y especificidad, de forma saturable y reversible.

En una gran cantidad de situaciones fisiológicas y patológicas se producen modificaciones adaptativas o alteraciones del funcionamiento de estos sistemas de comunicación biológicos que pueden afectar a los niveles y/o funcionalidad de los mensajeros químicos y sistemas receptores implicados.

El esfuerzo físico promueve una serie de modificaciones transitorias en el sistema neuroendocrino que en el caso de una práctica deportiva regular y de cierta intensidad pueden dar paso a mecanismos adaptativos de carácter mas o menos permanente. La movilización del sistema simpato-adrenal es una de los principales componentes de esta respuesta adaptativa y las catecolaminas liberadas (adrenalina y noradrenalina), actúan a través de diferentes sistemas receptores, siendo uno de los mas importantes el  $\beta$ -adrenérgico-adenilato ciclasa, ubicuamente distribuido en los tejidos de mamíferos, y a través del cual se regulan una enorme variedad de procesos fisiológicos y metabólicos.

La investigación cuyos resultados se presentan en esta memoria, se inscribe dentro del estudio de los mecanismos bioquímicos de adaptación al ejercicio físico de resistencia intenso y regular en los sistemas de transducción de información a través de membrana plasmática y mas concretamente en el sistema  $\beta$ -adrenérgico-adenilato ciclasa. Utilizando un modelo animal experimental fiable y contrastado se ha elegido la unidad de interrelación metabólica que forman músculo cardíaco, hígado y tejido adiposo para estudiar la regulación de adenilato ciclasa, fundamentalmente por la vía  $\beta$ -adrenérgica, en el marco de la respuesta integrada al ejercicio físico.

## 1.2 MENSAJEROS QUÍMICOS Y SISTEMAS DE TRANSDUCCIÓN

### 1.2.1 Tipos de mensajeros químicos

La naturaleza química de los mensajeros utilizados en la comunicación intercelular es muy variada: péptidos o proteínas (glucagón), aminoácidos (glutamato), derivados de aminoácidos (catecolaminas), esteroides o derivados (testosterona, calcitriol), derivados de ácidos grasos (prostaglandinas), nucleósidos (adenosina), nucleótidos (ATP), fosfolípidos (factor

activador de plaquetas, PAF), u otros no incluidos en estos grupos como acetilcolina u óxido nítrico (NO). Además de estos mensajeros químicos que pueden actuar como hormonas, neurotransmisores, neuromoduladores, factores de crecimiento o mediadores locales; otros muy diversos como feromonas, lipoproteínas plasmáticas, toxinas bacterianas, virus, multitud de agentes farmacológicos, compuestos desencadenantes de estímulos olfativos o gustativos e incluso estímulos físicos (luz, presión), ejercen su acción a través de receptores (*Shepherd, 1991 y Hardie, 1991*).

En los sistemas receptores se pueden diferenciar dos componentes funcionales: receptor, al que se une el ligando, y efector, que induce la respuesta. Ambos componentes se pueden encontrar formando parte de la misma cadena polipeptídica, o bien ser dos entidades distintas que requieren para su funcionamiento un acoplamiento previo. Los agonistas (totales o parciales) se unen al receptor promoviendo una respuesta, mientras que los antagonistas (*competitivos o no competitivos*) no desencadenan respuesta biológica alguna aunque se unen al receptor con elevada afinidad y especificidad (*Rang y Dale, 1992*).

### 1.2.2 Clasificación de los sistemas de transducción de información a través de membrana

Por lo que respecta al mecanismo de transducción a través de membrana plasmática (Figura 1), los sistemas receptores se pueden clasificar en dos grandes grupos:

- I) Dependientes de proteínas G para el acoplamiento del receptor con el efector, que son entidades distintas (*Taylor, 1990*). Los efectores, que pueden ser activados o inhibidos, son canales iónicos ( $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ) o enzimas (adenilato ciclasa, fosfolipasa o fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos). El acoplamiento funcional por interacción proteína-proteína específica entre los componentes del sistema dependerá de su movilidad en el seno de la bicapa lipídica y por tanto, de la fluidez de ésta (*Jans, 1992*). La modificación de la permeabilidad de la membrana plasmática por la activación o desactivación de canales iónicos provoca cambios en el potencial de membrana y algunos de estos iones, pueden actuar como mensajeros intracelulares ( $Ca^{2+}$ ). La regulación de enzimas incide sobre la génesis (adenilato ciclasa, fosfolipasa) o degradación (fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos) de mensajeros intracelulares. El mensajero intracelular producido, en la mayoría de los casos, actúa a través de proteínas quinastas específicas que fosforilan en Ser o Thr diferentes sustratos promoviendo una respuesta fisiológica (*Cohen, 1992*). Eventualmente, el mensajero puede actuar directamente, independientemente de la fosforilación (por ejemplo, regulando canales iónicos) (*Barnard, 1992*). Se ha propuesto que el antiporte  $Na^+/H^+$  y la  $Ca^{2+}$ -ATPasa de membrana plasmática pueden actuar como efectores regulados a través de proteínas G por receptores ( $\beta$ -adrenérgicos y glucagón, respectivamente) (*Barber y Ganz, 1992 y Jouneaux et al., 1993*).

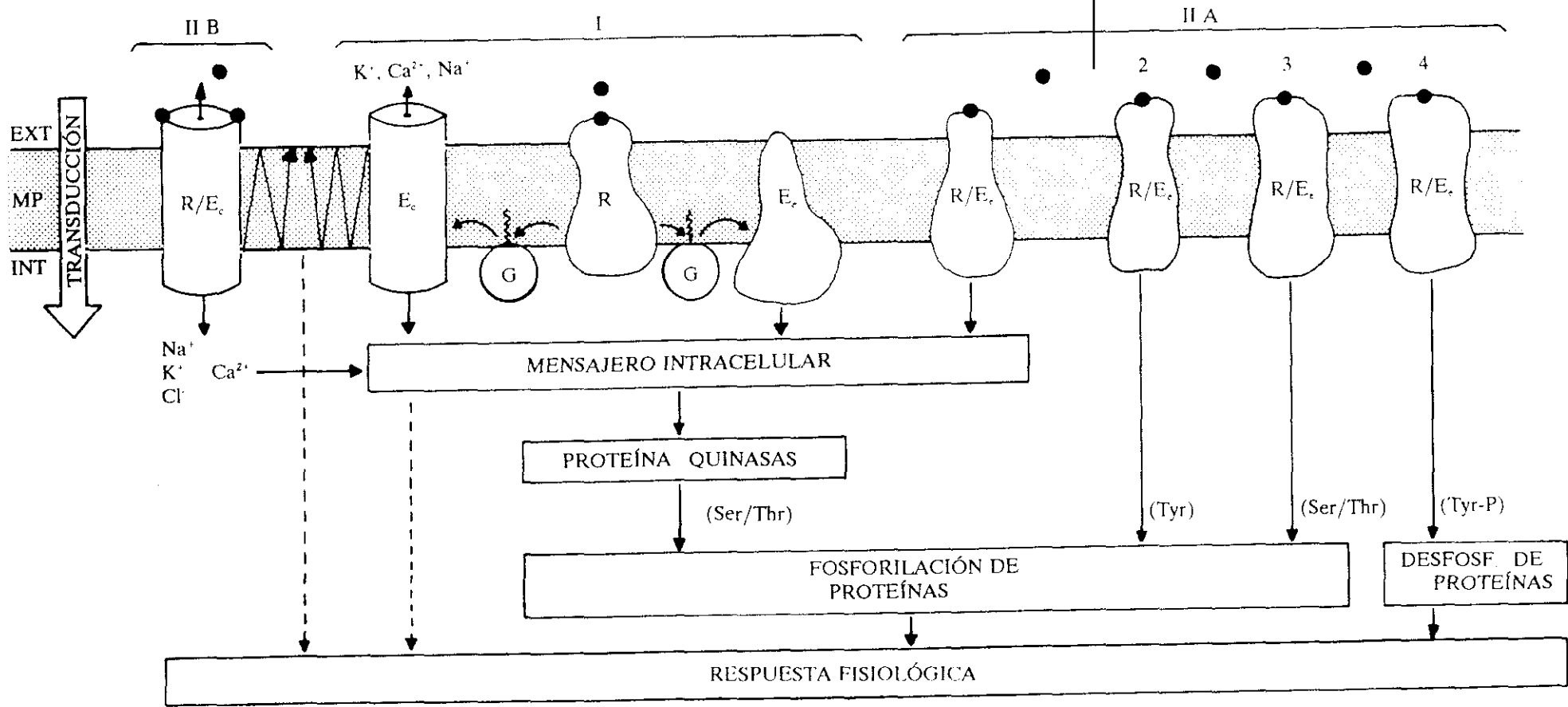


Figura 1. Mecanismos de transducción de información a través de membrana plasmática. MP, membrana plasmática; Ext., exterior; Int., interior; ●, señal extracelular; →, respuestas mediadas por fosforilación/desfosforilación; - →, respuestas no mediadas por fosforilación; R, receptor; E<sub>c</sub>, efector con actividad enzimática; E<sub>c</sub>, efector canal iónico; R/E, receptor y efector formando parte de la misma cadena polipeptídica o estructura oligomérica.

II) Independientes de proteínas G.

II.A) Receptor y efector, que es una actividad enzimática, están formando parte de la misma cadena polipeptídica que presenta un sólo fragmento transmembranar. La unión del mensajero a su sitio específico en el lado extracelular promueve un cambio conformacional que se traduce en la activación enzimática, previa dimerización/oligomerización que también depende de la fluidez de la membrana. En función de la actividad del receptor se pueden distinguir los siguientes subtipos:

II.A.1) Receptores con actividad de guanilato ciclasa para péptidos natriuréticos (GCA y GCB) y enterotoxinas (GCC) (*Garbers, 1992*).

II.A.2) Receptores con actividad de proteína tirosina quinasa para insulina y una gran variedad de factores de crecimiento (IGF-I, EGF, PDGF, NGF, etc.) (*Cadena y Gill, 1992 y Panayotou y Waterfield, 1993*). El receptor de insulina constituye una excepción estructural al tener escindida la cadena polipeptídica ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y encontrarse ya "dimerizado" (puentes disulfuro) antes de unirse la hormona, y una excepción funcional por su capacidad de promover una diversidad de mecanismos de transducción distintos (*Häring, 1991*).

II.A.3) Receptores con actividad de proteína Ser/Thr quinasa. Es el último receptor descrito (tipo II de TGF- $\beta$ ) (*Massagué, 1992*).

II.A.4) Receptores con actividad de proteína tirosina fosfatasa (proteína CD45) (*Fischer et al., 1991*).

II.B) Receptores que son canales iónicos (*Barnard, 1992*). Tienen estructura pentamérica. La unión del mensajero a dos sitios localizados extracelularmente promueve un cambio conformacional que se traduce en la activación de un canal iónico específico que forma la propia estructura oligomérica (receptores nicotínicos de acetilcolina, receptores GABA<sub>A</sub>, receptores NMDA de Glu, etc.).

La afinidad por el ligando que presentan todos estos receptores es muy distinta y mientras el receptor nicotínico de acetilcolina (II.B) trabaja frente a concentraciones de agonista de aproximadamente 300  $\mu$ M en la hendidura sináptica, los receptores con actividad tirosina quinasa (II.A.2) deben detectar muy bajos niveles plasmáticos de hormona (60-600 pM).

El tiempo de generación de respuesta en estos sistemas de transducción es también muy variable desde milisegundos (despolarización postsináptica promovida por acetilcolina, tipo II.B), hasta horas o días (crecimiento y diferenciación celular regulados por factores de crecimiento, tipo II.A.2).

Las respuestas mediadas a través de proteínas G presentan un perfil intermedio entre ambos extremos, con receptores de afinidad relativamente baja (1-100 nM) pero en exceso

("spare receptors") de tal forma que sólo se necesita la ocupación de un mínimo porcentaje para desencadenar la respuesta en un tiempo de segundos.

Los sistemas de transducción no actúan independientemente como simplificada se representa en la Figura 1, sino que se encuentran inmersos en una regulación cruzada ("cross-talk"), de forma que unos modulan la acción de otros, fundamentalmente vía fosforilación (*Nishizuka, 1992*). Así, por ejemplo, la proteína quinasa C (PKC), una Ser/Thr proteína quinasa asociada a la vía de los fosfoinosítidos, fosforila receptores, proteínas G y efectores ajenos a esa vía (receptores  $\alpha_2$  y  $\beta$ -adrenérgicos, proteína  $G_i$ , adenilato ciclasa y receptores con actividad de tirosina quinasa). Por otra parte, algunos receptores con actividad de tirosina quinasa (por ejemplo de EGF) pueden conectar con la vía de generación de mensajeros intracelulares (ciclo de fosfoinosítidos) a través de la activación por fosforilación en Tyr de fosfolipasa  $C\gamma$  (dominios SH2). En otros casos (por ejemplo insulina) la señal inicial de fosforilación en Tyr se puede transformar en fosforilación o desfosforilación en Ser/Thr mediante la activación de quinasas y fosfatasa. Además, la mayoría de los canales iónicos de membrana plasmática se regulan por fosforilación en Ser/Thr y/o Tyr por acción de diferentes proteína quinasas.

### 1.3 PROTEÍNAS G

Las proteínas G unen nucleótidos de guanina (GDP o GTP) y tienen actividad GTPásica (*Conklin y Bourne, 1993; Hepler y Gilman, 1992; Birnbaumer, 1992 y 1993; Bourne et al., 1990 y Spiegel, 1992*). Presentan un ciclo de activación-desactivación (Figura 2) en el que el GDP unido a la forma inactiva es desplazado por el GTP, originándose una forma activa de la proteína G que retorna a su estado inactivo merced a su propia acción GTPásica.

La irreversibilidad de la hidrólisis del GTP concede unidireccionalidad al ciclo, susceptible de ser regulado por proteínas de intercambio o liberación de nucleótidos de guanina (GNRPs o GRFs) y por proteínas activantes (GAPs) o inhibitoras (GIP, fosducina) de la actividad GTPásica.

#### 1.3.1 Clasificación

Existen dos tipos principales de proteínas G:

- I. Heterotriméricas (80-95 KDa) implicadas principalmente en procesos de transducción de información a través de membrana plasmática y probablemente también en transporte intracelular de vesículas.

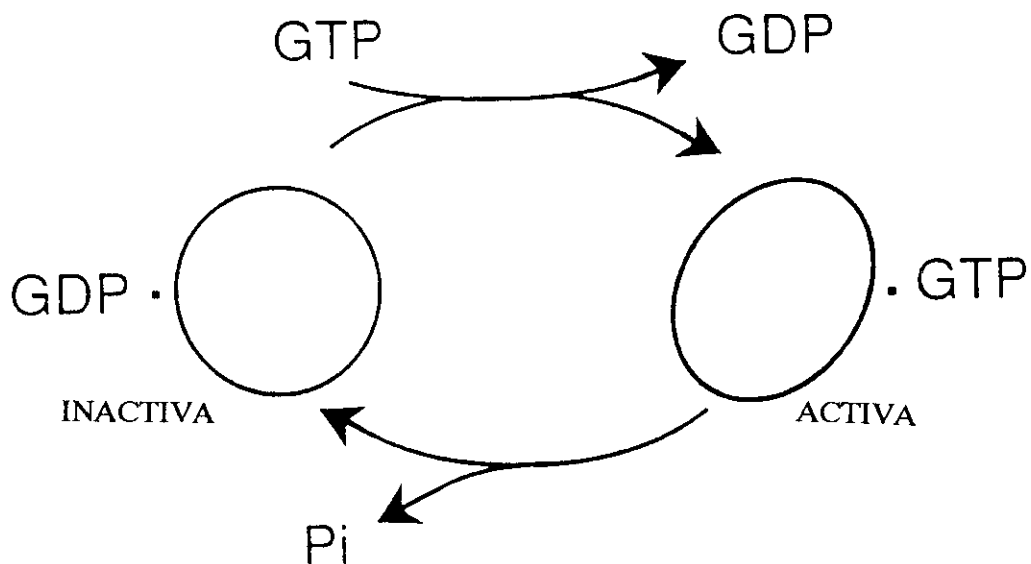


Figura 2. Ciclo de activación-desactivación de proteínas G.

- II. Monoméricas, de pequeño tamaño (21-25 KDa), "small G proteins", con multitud de funciones y procedencias: regulación de síntesis de proteínas (factor de elongación EF-TU de bacterias), del transporte intracelular de vesículas (ARF), productos de oncogenes (familia *ras*) etc.

Hay además un tercer tipo, minoritario, de proteínas G heterodiméricas (100 KDa), como tubulina y el receptor de SRP implicado en biosíntesis de proteínas de membrana y secreción.

### 1.3.2 Proteínas G heterotriméricas

En 1971, Rodbell y colaboradores pusieron de manifiesto el requerimiento de nucleótidos de guanina en la regulación de la transducción de señales mediadas por receptor (Rodbell *et al.*, 1971), lo que condujo posteriormente al descubrimiento de las proteínas G que participan en este proceso. Las proteínas G heterotriméricas, que acoplan receptores de membrana a sus correspondientes efectores, constan de tres subunidades distintas:  $\alpha$  (39-46 KDa),  $\beta$  (35-37 KDa) y  $\gamma$  (8-10 KDa). En mamíferos, existe una gran variedad de subunidades

$\alpha$  (mas de 20 producto de, al menos, 16 genes) que por comparación de su secuencia de aminoácidos (50-90% de identidad) se han agrupado en cuatro familias:  $\alpha_s$ ,  $\alpha_q$ ,  $\alpha_i$  y  $\alpha_{1,2}$  que algunos autores reducen a tres al considerar  $\alpha_{1,2}$  una subfamilia de  $\alpha_q$  ( $\alpha_q$  II). En la Figura 3 se representa las relaciones filogenéticas entre todas ellas y los efectores que regulan (recientemente, aunque no se indica en la figura, se ha demostrado que  $\alpha_s$  inhibe  $Ca^{2+}$ -ATPasa de membrana plasmática, que sería un nuevo efector de esta proteína G) (Jouneaux et al., 1993). En la familia  $\alpha_s$  se incluyen las distintas isoformas de  $\alpha_s$  y  $\alpha_{olf}$  (en neuronas olfativas). La familia  $\alpha_q$  la forman además de la propia  $\alpha_q$ , las subunidades  $\alpha_{11}$ ,  $\alpha_{14}$ ,  $\alpha_{16}$ ,  $\alpha_{12}$  y  $\alpha_{13}$ . En la familia  $\alpha_i$  se incluyen  $\alpha_z$ , gusductina (papilas gustativas) y las distintas isoformas de transducina ( $\alpha_i$ ),  $\alpha_o$  y  $\alpha_r$ . Este criterio de clasificación, que se ha podido utilizar gracias a la clonación y determinación de secuencias, ha sustituido al inicialmente establecido sobre la base del efector regulado ( $G_s$  y  $G_i$ , activación e inhibición de adenilato ciclasa;  $G_p$ , regulación de fosfolipasa C;  $G_K$ , modulación de canales de  $K^+$ , etc.). No obstante, ambos criterios coexisten en algunos casos y existen proteínas G funcionalmente identificadas ( $G_{pta}$ , regulación de fosfolipasa  $A_2$ ) que requieren todavía una ubicación filogenética, y subunidades  $\alpha$  clonadas ( $\alpha_{12}$ ) que necesitan su identificación funcional.

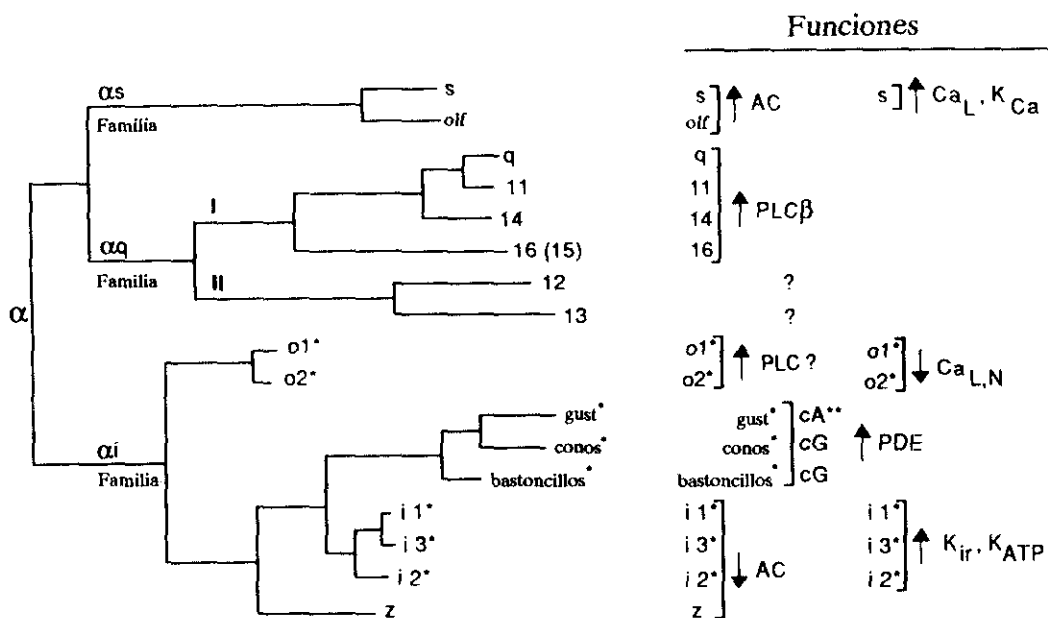


Figura 3. Arbol filogenético de las subunidades  $\alpha$  de las proteínas G y sus funciones. El asterisco indica que la subunidad  $\alpha$  es sustrato de ADP-ribosilación por toxina pertussis, y el doble asterisco indica que la función asignada es posible. AC, adenilato ciclasa;  $Ca_L$ , canal de  $Ca^{2+}$  tipo L;  $Ca_N$ , canal de calcio tipo N;  $K_{Ca}$ , canal de potasio activado por calcio;  $K_{ir}$ , canal rectificador de corrientes de potasio hacia el interior;  $K_{ATP}$ , canal de potasio inhibido por ATP; PLC, fosfolipasa C; PDE, fosfodiesterasa; cA, AMP cíclico; cG, GMP cíclico; Gust, gusductina. Tomado de Birbaumer, (1993).

La variedad de subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  en mamíferos, aunque en constante crecimiento, es todavía bastante menor. Cuatro isoformas de  $\beta$  ( $\beta_1$ - $\beta_4$ ; 80% de identidad) y ocho de  $\gamma$  ( $\gamma_1$ - $\gamma_8$ ), y siempre se presentan, en condiciones no desnaturalizantes, en forma de dímeros estables  $\beta\gamma$ , intercambiables entre al menos algunas de las proteínas G. Recientemente se ha demostrado que el tipo de subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  del heterotrímero puede condicionar la interacción de la proteína G con receptor y efector (*Kleuss et al., 1992 y 1993*). Además, los dímeros  $\beta\gamma$  pueden regular directamente diferentes efectores (adenilato ciclasa, fosfolipasas). De todas las teóricamente posibles, aún queda por determinar el número de combinaciones entre  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  que ocurren *in vivo* en mamíferos

La subunidad  $\alpha$  contiene el sitio de unión del nucleótido y la actividad GTPásica. A la formación del sitio de unión contribuyen 5 secuencias conservadas en todas las proteínas G que se distribuyen a lo largo de la cadena polipeptídica (regiones G, Figura 4) (*Conklin y Bourne, 1993*). En presencia de  $Mg^{2+}$ , y con GDP unido al heterotrímero, fluoruro y aluminio activan las proteínas G formando complejos  $AlF_x$  que mimetizan el fosfato  $\gamma$  del GTP, al interactuar con el sitio de unión del nucleótido. Se han diferenciado también dominios de interacción con el receptor, efector y  $\beta\gamma$  (Figura 4). Al menos tres regiones de  $\alpha$  interactúan con el receptor, una en el extremo amino terminal, sobre la que se tienen mayores evidencias, y otras dos en el extremo carboxilo terminal y próximo a la región G5. Existen otros tres fragmentos implicados en el reconocimiento de  $\beta\gamma$  y del efector (Figura 4). En una imagen tridimensional de la subunidad  $\alpha$ , orientados hacia la membrana plasmática se dispondrían los dominios implicados en la interacción con el receptor, efector y dímero  $\beta\gamma$  mientras que el sitio de unión del nucleótido se encontraría hacia el citoplasma.

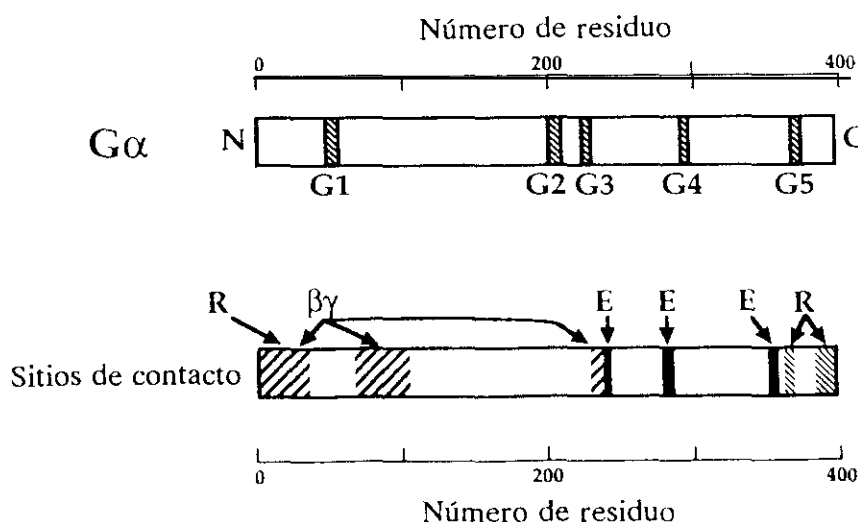


Figura 4. Modelo lineal de  $G_\alpha$ .  $G_1, G_2 \dots G_5$ , secuencias conservadas de las proteínas G que contribuyen a la formación del sitio de unión del nucleótido; R, receptor; E, efector. Tomado de *Conklin y Bourne, (1993)*.

### 1.3.3 Modificación covalente de proteínas G

La subunidad  $\alpha$  se puede encontrar modificada covalentemente por fosforilación, ADP-ribosilación, miristoilación y palmitoilación (Yamane y Fung, 1993). A través de fosforilación, la modificación covalente más frecuente de proteínas, se puede regular la funcionalidad de algunas proteínas G (por ejemplo, fosforilación de  $\alpha$ , por PKC). La ADP-ribosilación por toxinas bacterianas ha constituido un importante elemento en el estudio y clasificación de las proteínas G. La toxina colérica, de *Vibrio cholerae*, ADP-ribosila restos de Arg (Figura 5) de algunas subunidades  $\alpha$  disociadas lo que se traduce en la inhibición de su actividad GTPásica y por tanto, en su activación permanente (Figura 2 y 7A). La toxina pertussis, de *Bordetella pertussis*, ADP-ribosila en Cys (Figura 5) algunas subunidades  $\alpha$  cuando se encuentran formando parte del heterotrímero que permanece inactivado al encontrarse impedido el acoplamiento de la proteína G modificada con el receptor que es lo que promueve el intercambio de nucleótidos de guanina (Figura 2 y 7A). En la Figura 3 se indican las subunidades  $\alpha$  susceptibles de ADP-ribosilación por una u otra toxina. Este tipo de modificación covalente podría tener implicaciones reguladoras y no sólo patológicas, puesto que se ha descrito la existencia de procesos de ADP-ribosilación endógenos llevados a cabo por enzimas presentes en diversos tejidos de mamíferos.

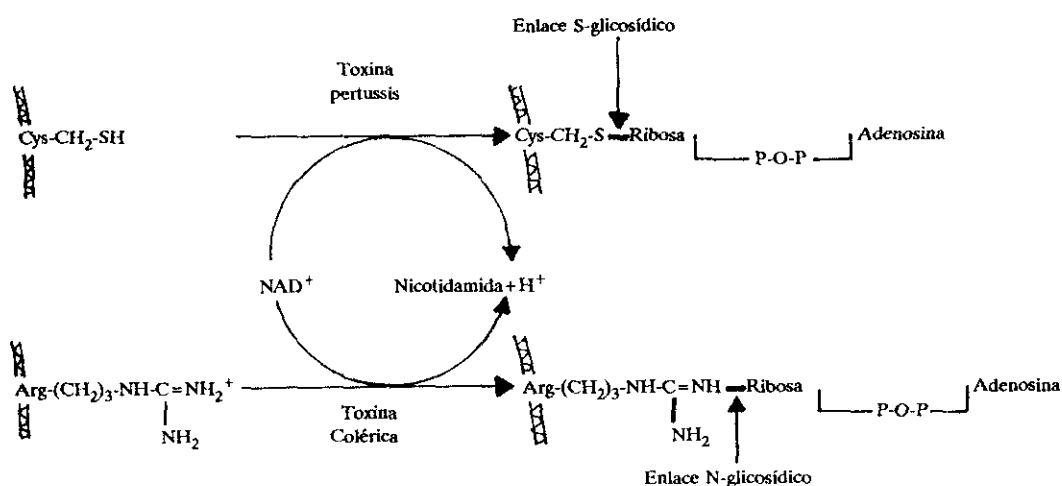


Figura 5. Mecanismo de reacción de la ADP-ribosilación catalizada por toxina colérica y pertussis.

Clásicamente se ha atribuido al dímero  $\beta\gamma$  el anclaje de las proteínas G heterotríméricas a la cara citoplasmática de la membrana plasmática. Las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  se encuentran poliisopreniladas (geranyl-geranilo) en la Cys C-terminal que está carboximetilada

(Figura 6). La prenilación de  $\gamma$  es indispensable, además, para la interacción de alta afinidad de  $\beta\gamma$  con la subunidad  $\alpha$  o con los efectores que regula. Hasta la fecha no se ha descrito modificación lipídica de la subunidad  $\beta$ . Algunas subunidades  $\alpha$  (por ejemplo,  $\alpha_1$  y  $\alpha_o$  pero no  $\alpha_s$ ) se encuentran miristoiladas (unión covalente de miristato mediante enlace amida a Gly N-terminal) lo que aparentemente permitiría que continuaran ancladas a la membrana una vez dissociadas (Figura 6) (Spiegel *et al.*, 1991). Recientemente se ha demostrado la palmitoilación (unión de palmitato mediante enlace tioester) de  $\alpha_o$ ,  $\alpha_s$ ,  $\alpha_q/\alpha_{11}$  y  $\alpha_{12}$  y se ha sugerido que esta modificación covalente reversible puede regular la localización y función de  $\alpha$  (Linder *et al.*, 1993 y Parenti *et al.*, 1993). Transducina ( $\alpha_t$ ) también se puede encontrar acilada por ácidos grasos distintos del mirístico (Neubert *et al.*, 1992). Por tanto, la asociación de las proteínas G a la cara citoplasmática de la membrana plasmática se efectúa a través de la modificación lipídica de  $\beta\gamma$  en todos los casos y al menos también en algunos por la acilación de  $\alpha$ .

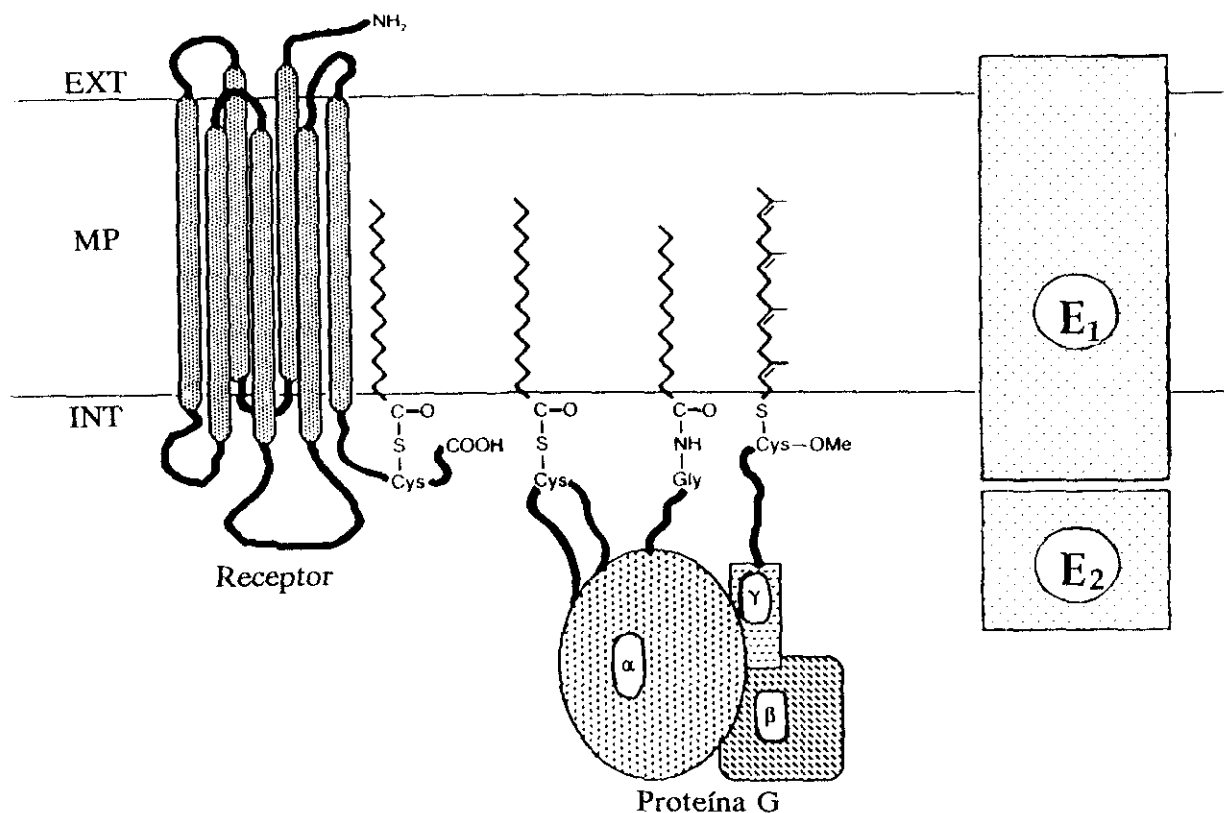
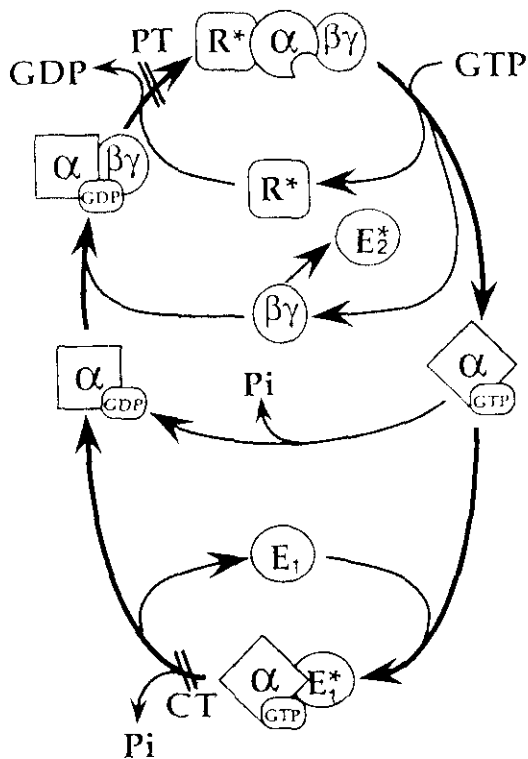


Figura 6.

Sistema receptor dependiente de proteínas G. Las subunidades  $\alpha$  de las proteínas G se pueden encontrar miristoiladas o palmitoiladas, mientras que las  $\gamma$  están isopreniladas. Algunos receptores acoplados a proteínas G (por ejemplo B-adrenérgicos) también se encuentran acilados. El efector es frecuentemente una proteína integral de membrana ( $E_1$ ) pero puede ser también una proteína periférica (por ejemplo fosfolipasas) ( $E_2$ ).

A



B

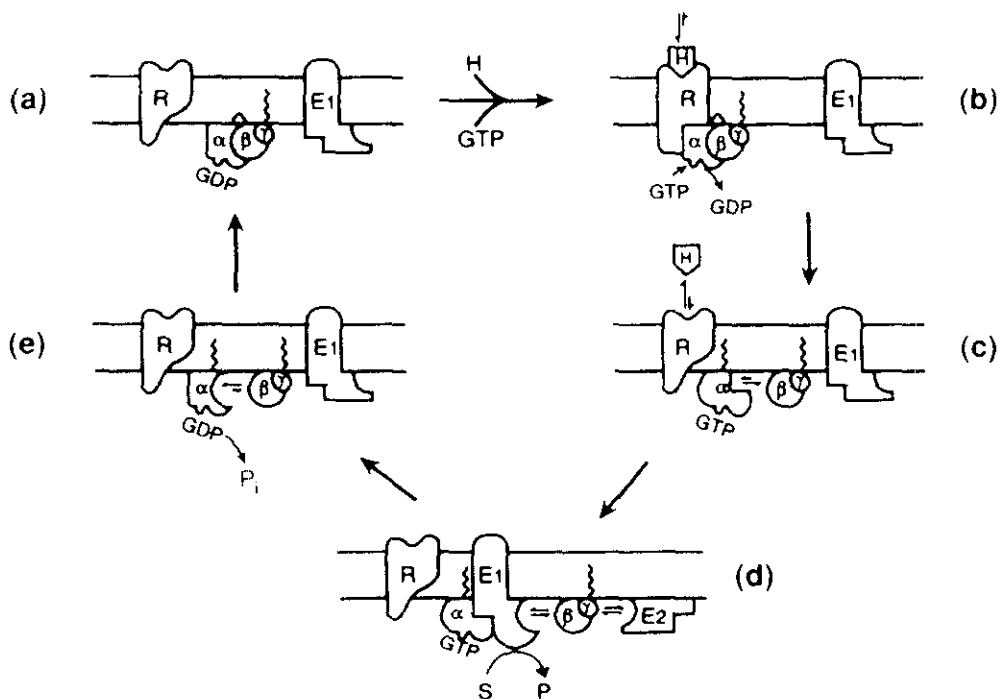


Figura 7.

Ciclo de activación-desactivación de proteínas G en la transducción de señales: A) Representando los tres estados conformacionales que atraviesa la subunidad  $\alpha$ . R, receptor;  $E_1$  y  $E_2$ , efectores distintos regulados por  $\alpha$  y  $\beta\gamma$ , respectivamente; CT, acción de toxina colérica; PT, acción de toxina pertussis; modificado de *Conklin y Boume, (1993)*. B) En membrana plasmática: (a), estado basal; (b), activación del receptor; (c), disociación de la proteína G; (d), activación de los efectores y (e) actividad GTPásica para retornar al estado basal; tomado de *Hepler y Gilman, (1992)*.

### 1.3.4 Ciclo de activación-desactivación de proteínas G en la transducción de señales

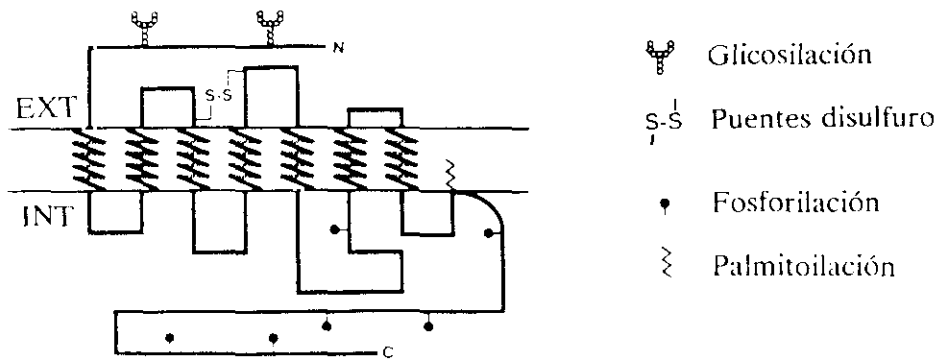
En el ciclo de activación-desactivación de proteínas G heterotriméricas, la subunidad  $\alpha$  atraviesa, al menos, tres estados conformacionales (Figura 7A); un estado inactivo con GDP unido, un estado en el cual el sitio de unión del nucleótido de guanina se encuentra vacío y un estado activo, disociado, con GTP unido.  $\alpha$ -GDP tiene elevada afinidad por  $\beta\gamma$  y la unión de este dímero incrementa su afinidad por GDP. El complejo ligando-receptor ( $R'$  en la figura) se une exclusivamente a la forma heterotrimérica  $\alpha$ -GDP- $\beta\gamma$ , promoviendo la liberación de GDP. La entrada de GTP en el sitio vacío ocasiona la rápida disociación de  $\alpha$ -GTP, de baja afinidad por  $\beta\gamma$  y alta afinidad por el efector E1 que regula. La hidrólisis del GTP unido (que se acelera por la interacción de  $\alpha$ -GTP con el efector que actúa como una proteína estimuladora de la actividad GTPásica), pone fin a la regulación retornando  $\alpha$  a su estado heterotrimérico inactivo con GTP unido. En la Figura 7 se indica que el dímero  $\beta\gamma$  puede también regular directamente efectores (E2). En la Figura 7B se representa este ciclo de activación-desactivación de proteínas G en membrana plasmática y la regulación de dos efectores distintos E1 y E2 por  $\alpha$  y  $\beta\gamma$ . A pesar de que este modelo de activación de proteínas G está plenamente aceptado, existen datos acerca de la asociación permanente del heterotrímero  $G_i$  con adenilato ciclasa, lo que sugiere que  $\beta\gamma$  no se disocia (Marbach *et al.*, 1990), y otros que indican que  $\alpha_q$  puede interactuar simultáneamente con el receptor y el efector fosfolipasa C (Berstein *et al.*, 1992).

## 1.4 RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G. RECEPTORES ADRENÉRGICOS

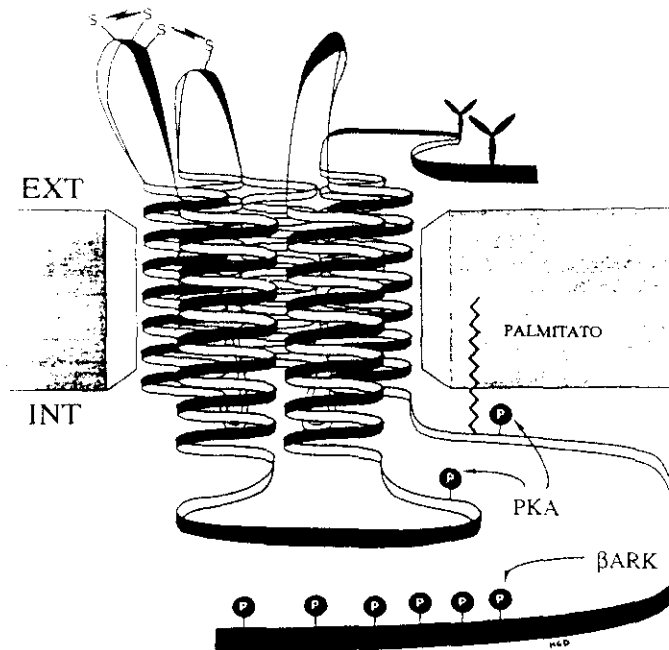
### 1.4.1 Características generales

Los receptores acoplados a proteínas G tienen características estructurales comunes (Figura 8) son monómeros (450-600 aminoácidos) y la cadena polipeptídica se pliega atravesando siete veces la membrana mediante fragmentos transmembranares, TM1-TM7, ricos en aminoácidos hidrofóbicos, que se conectan por lazos extracelulares (E1-E3) e intracelulares (I1-I3) (Strosberg, 1991 y Dohlman *et al.*, 1991). En las zonas E1 se establecen puentes disulfuro que estabilizan la estructura. El extremo N-terminal que se localiza extracelularmente y habitualmente N-glicosilado, tiene un tamaño variable en función del tipo de ligando. Si los ligandos son grandes (hormonas glicoprotéicas), el fragmento N-terminal también lo es y participa en la interacción específica ligando-receptor (por ejemplo, receptor de TSH), mientras que si los ligandos son pequeños (catecolaminas), el fragmento N-terminal también lo es y no participa en la recepción del ligando cuyo sitio de unión se encuentra en una oquedad que forman los fragmentos transmembranares (Figura 8 y 9). Utilizando receptores quiméricos, deleciones, mutaciones puntuales y péptidos que mimetizan

A



B



C

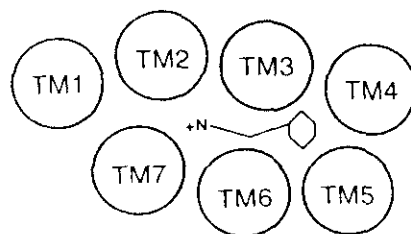


Figura 8.

Características estructurales de los receptores acoplados a proteínas G. (A), representación expandida en la que se reflejan los siete dominios transmembranares y las modificaciones de la cadena polipeptídica. (B), en representación tridimensional. (C) vista superior de los siete segmentos transmembranares que forman un bolsillo donde se introduce el ligando para unirse al receptor. Tomado de *Lefkowitz, (1991)* y *Collins et al., (1991)*.

o inhiben la interacción de los receptores con G, se han identificado cuatro regiones de los receptores responsables de la especificidad de interacción con proteínas G y que se localizan intracelularmente. Estas son el fragmento C-terminal de I2, los fragmentos N y C-terminales de I3 y un fragmento de la región C-terminal. Los fragmentos de I2 e I3 implicados están en forma de  $\alpha$  hélices anfipáticas con aminoácidos hidrofílicos (principalmente básicos) a un lado e hidrofóbicos a otro. El mastoparén (*Sukuman y Higashijima, 1992*), un péptido de catorce aminoácidos del veneno de avispa, con capacidad de formar hélices anfipáticas, activa proteínas G de la familia  $G_i$  ( $G_i$ ,  $G_o$ ,  $G_i$ ) interaccionando con la subunidad  $\alpha$  correspondiente, comportándose como un análogo de receptor activado. La región C-terminal se encuentra frecuentemente acilada (palmitoilada) (Figura 6 y 8) y el cambio conformacional que de esta modificación covalente se deriva es generalmente requerido, aunque no siempre, para la interacción específica del receptor con la proteína G.

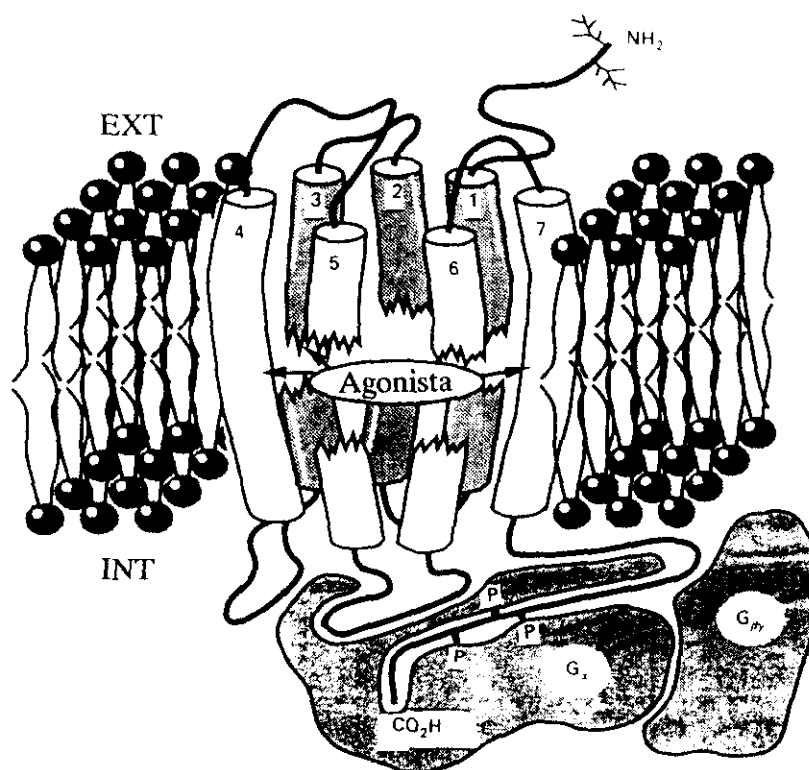


Figura 9.

Regiones características de los receptores acoplados a proteínas G. Se resaltan las regiones implicadas en la interacción con el ligando y con la subunidad  $\alpha$  de las proteínas G. Tomado de *Taylor, (1990)*.

1.4.2 Modelo del complejo ternario

El Modelo del Complejo Ternario, propuesto por Lefkowitz es el mas ampliamente aceptado para describir el mecanismo de activación a través de receptores acoplados a proteínas G. Se denomina así por la formación, durante ese proceso, de un complejo ternario entre el mensajero extracelular (habitualmente denominado hormona), el receptor y la proteína G (Figura 10A). El propio Lefkowitz ha modificado recientemente el modelo en el sentido que se indica en la figura 10B, con el receptor en equilibrio entre dos conformaciones R y R', de las que sólo la forma R' es capaz de interaccionar con la proteína G (Samana et al., 1993). Así, R' se puede considerar el "estado activo", único que puede originar el complejo ternario HR'G, cuya formación viene determinada por dos constantes, J y β, adicionales. J, adimensional, describe la isomerización espontánea R ↔ R', de forma que cuando su valor es elevado, todos los receptores se encontrarían en el estado R', siguiendo el modelo del complejo ternario clásico (Figura 10 A,B). β, también una constante adimensional, relacionada con el ligando, describe la extensión en la que la unión de éste (H) afecta al equilibrio conformacional del receptor, en el sentido de dirigir al receptor a su estado activo R' capaz de interaccionar con la proteína G. En este modelo, la formación del complejo ternario por el ligando depende de dos factores: su capacidad de facilitar la transición de R al estado activo R', medido por la constante β, y su capacidad de estabilizar el complejo ternario HR'G, medido por la constante α (Figura 10). Mientras que β sólo depende del ligando y el receptor, α también depende de la proteína G.

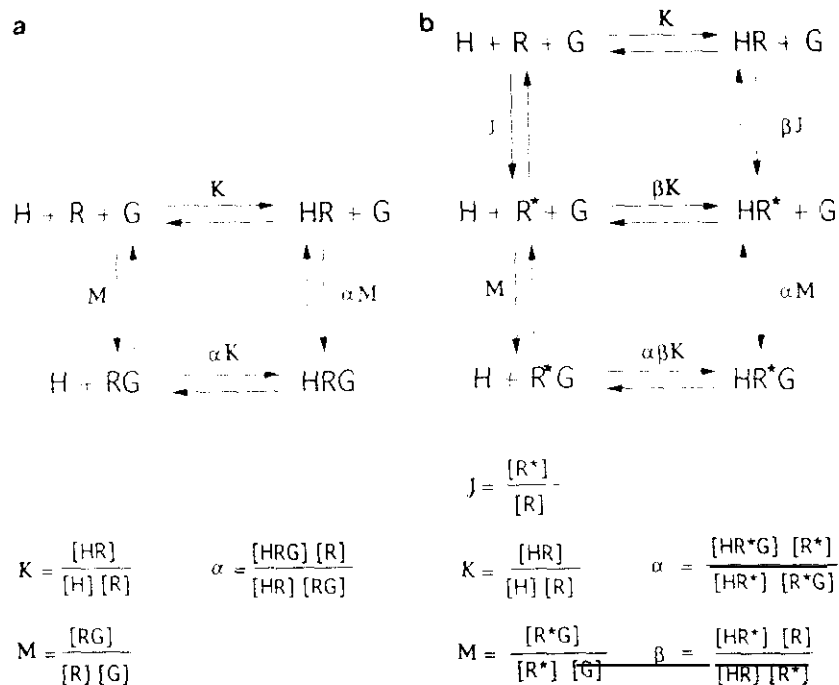


Figura 10. Modelo de Complejo Ternario propuesto por Lefkowitz para describir el mecanismo de activación a través de receptores acoplados a proteínas G. A) en su propuesta original y B) en la moderna versión modificada por el mismo autor. H, hormona; R, receptor; G, proteína G. Tomado de Lefkowitz et al., (1993).

Los receptores cuando se encuentran acoplados con las proteínas G (forma RG) exhiben una mayor afinidad por el agonista (estado de alta afinidad,  $R_H$ , con una constante de disociación  $K_H$ ) que cuando se encuentran libres, en forma R ( $R_L$ , de baja afinidad,  $K_L$ ). Los procesos que regulan la fracción de receptores en estado de alta afinidad no se conocen, aunque pueden reflejar el estado de fosforilación del receptor, y la estequiometría del receptor y la proteína G. Una importante característica de la transducción mediada por proteínas G es la amplificación de la señal extracelular primaria. En la mayoría de los sistemas esta amplificación tiene lugar en dos etapas. En la primera se activan de diez a varios cientos de proteínas G por cada receptor con ligando unido y en la segunda se ve afectado el recambio de miles de moléculas que actúan de mensajeros intracelulares por cada enzima efectora que se regula. Así, se pueden producir amplificaciones de la señal inicial que pueden superar el millón de veces.

Por otra parte, un mismo receptor puede activar diferentes proteínas G y receptores distintos pueden utilizar la misma proteína G. Este hecho, unido a la gran diversidad de

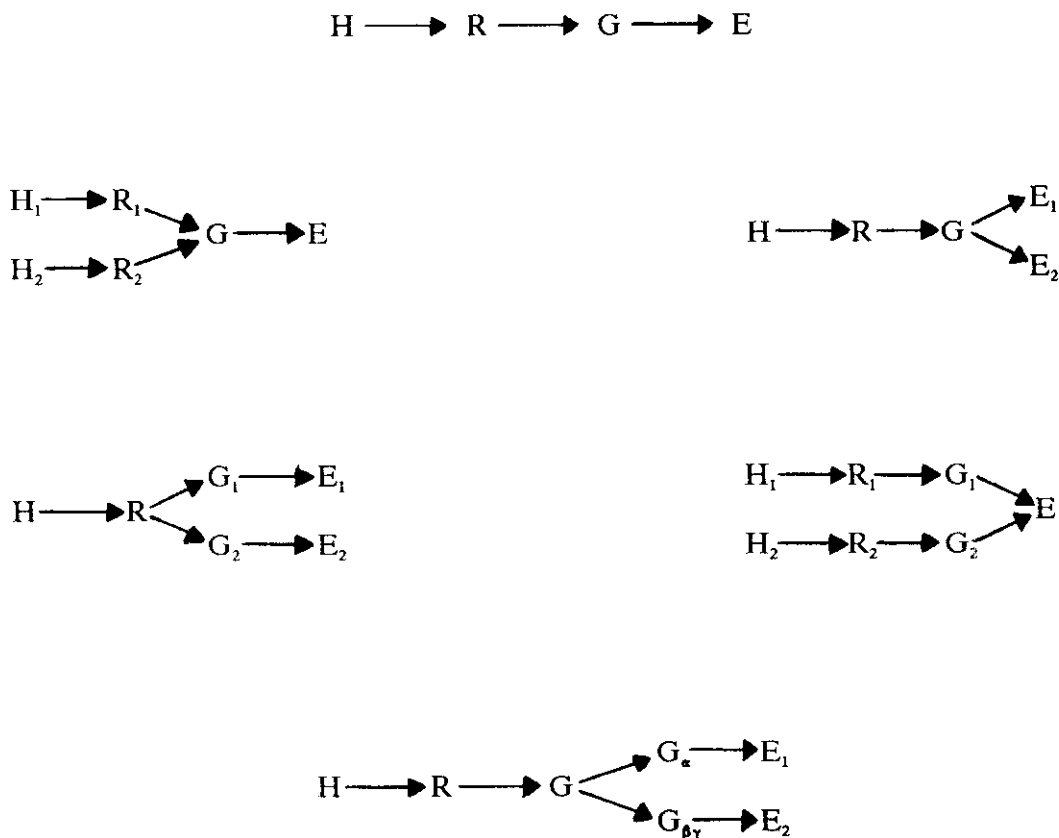


Figura 11. Diferentes posibilidades de transmisión de información a través de proteínas G que dan idea de la versatilidad del sistema. H, hormona; R, receptor; G, proteína G; E, efector. Modificado a partir de Birnbaumer et al., (1990).

efectores que pueden regular una misma proteína G (a través de  $\alpha$  y de  $\beta\gamma$ ) y a que un mismo efector puede resultar regulado por proteínas G distintas, como se ha visto anteriormente, confiere al mecanismo de transducción dependiente de proteínas G una gran versatilidad y complejidad, con posibilidad de regulación cruzada entre vías (Figura 11) (Milligan, 1993 y Birnbaumer et al., 1990). Alteraciones en los niveles y/o funcionalidad de proteínas G se asocian con una gran cantidad de situaciones fisiopatológicas (Spiegel et al., 1992).

### 1.4.3 Clasificación de los receptores adrenérgicos

De los receptores acoplados a proteínas G, uno de los más estudiados han sido los adrenérgicos, para las catecolaminas adrenalina y noradrenalina, distribuidos ubicuamente en el organismo y que median una gran cantidad de funciones fisiológicas (Rang y Dale, 1992). Fueron los primeros receptores en ser clasificados en tipos distintos ( $\alpha$  y  $\beta$ ) sobre la base de la respuesta fisiológica producida por agonistas, en un estudio clásico y pionero de Ahlquist, (1948). El desarrollo de las técnicas de unión de ligandos utilizando antagonistas selectivos permitió avanzar en la clasificación de tipos y subtipos. Esta clasificación se ha completado con estudios de la comparación de la secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica y más concretamente de los fragmentos transmembranarios donde se localiza el sitio de unión (aminoácidos de TM3, TM5 y TM7 participan en el reconocimiento de la catecolamina).

Para las dos catecolaminas, adrenalina y noradrenalina, existen, al menos, diez receptores distintos (Summers y Mc Martin, 1993), acoplados a una gran diversidad de efectores, como se indica en la Figura 12. Adenilato ciclasa se activa por los de tipo  $\beta$  y se inhibe por los de  $\alpha_2$ , mientras que los  $\alpha_1$  no tienen ningún efecto sobre ella. El significado funcional de esta diversidad de tipos y subtipos no está del todo claro. Presumiblemente, ello permite un exquisito grado de especificidad en el control de los procesos bioquímicos y fisiológicos en el organismo. Así, los diferentes efectos de una única hormona en distintos tejidos pueden ser debidos en parte a la variable expresión de subtipos en esos tejidos.

### 1.4.4 Mecanismos de desensibilización de receptores acoplados a proteínas G

El estudio de los receptores adrenérgicos, fundamentalmente  $\beta$ , ha permitido conocer los mecanismos de desensibilización de receptores acoplados a proteínas G (Kobilka, 1992). Se conoce como desensibilización, la disminución de la respuesta a una señal extracelular como consecuencia de la exposición prolongada a elevadas concentraciones de agonista. Es, en definitiva, una respuesta adaptativa a un exceso de información extracelular que se puede producir en determinadas situaciones fisiológicas o patológicas, o como consecuencia de tratamientos farmacológicos. La desensibilización es homóloga, o específica, cuando afecta

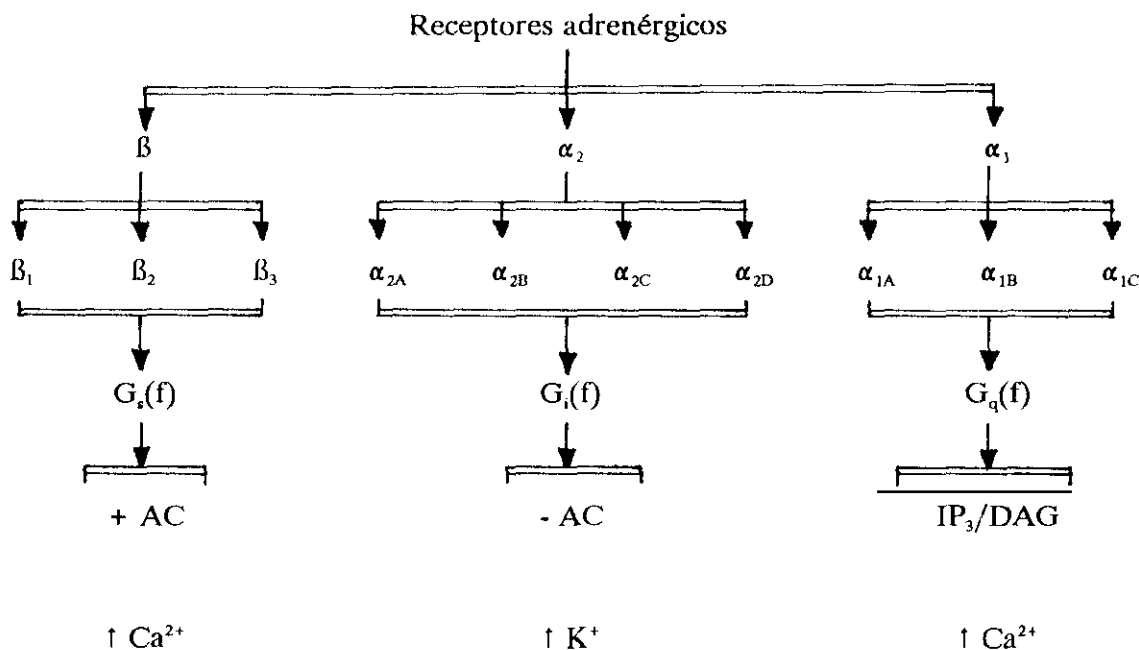


Figura 12. Familias de receptores adrenérgicos y efectores que regulan a través de proteínas G.  $G_p$ , familias de proteínas G; AC, adenilato ciclasa;  $Ca^{2+}$ , canales de  $Ca^{2+}$ ;  $K^+$ , canales de  $K^+$ ;  $IP_3$ , inositol trifosfato; DAG, diacilglicerol.

exclusivamente al receptor a través del cual se promueve el efecto, y heteróloga o inespecífica cuando se ven implicados más receptores o los efectores a través de los cuales actúan diversos receptores. Se puede producir también la hipersensibilización de sistemas receptores de membranas como consecuencia de la disminución de la concentración de agonista o de la presencia de antagonistas. La base molecular de la hipersensibilización, en la que aparentemente se incrementa el número de receptores, se conoce peor que la de la desensibilización, que han sido particularmente bien estudiados en receptores  $\beta$ -adrenérgicos. En estos receptores, se produce de forma rápida (segundos) un desacoplamiento de  $G_s$  por fosforilación y el secuestro del receptor fosforilado a localizaciones intracelulares donde sólo es accesible a ligandos lipofílicos (Figura 13A). El secuestro es un mecanismo imprescindible para la reactivación (desfosforilación) y reciclaje a la membrana de los receptores rápidamente desensibilizados, que no debe confundirse con la "down-regulation", en la que se produce una



disminución en el número total de receptores y que es sólo perceptible después de una exposición prolongada del receptor (mayor de una hora) al agonista (*Yu et al., 1993*). Estos mecanismos lentos de desensibilización, que pueden alcanzar días de duración, implican alteraciones en la síntesis y probablemente también en la degradación del receptor.

La fosforilación del receptor corre a cargo de dos proteínas quinasa distintas, la quinasa de receptores  $\beta$ -adrenérgicos ( $\beta$ ARK) y la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA) (*Palczewski y Benovic, 1991*) (Figuras 8B y 13B).  $\beta$ ARK fosforila restos de Ser próximos al extremo C-terminal, sólo cuando el receptor está ocupado por un agonista (desensibilización homóloga), mientras que la fosforilación por PKA, que se da tanto en el fragmento C-terminal como en la región I3, no requiere la ocupación por agonista y puede ser promovida desde otros receptores distintos (desensibilización heteróloga). PKA desacopla el receptor de G directamente, mientras que  $\beta$ ARK requiere la actuación posterior a la fosforilación de otra proteína,  $\beta$ -arrestina, denominada así por su similitud estructural y funcional con la arrestina, implicada en la transducción visual. La disminución de la capacidad de originar formas RG de alta afinidad por agonista, por fosforilación del receptor y desacoplamiento de G, es una característica secundaria a determinados procesos de desensibilización.  $\beta$ ARK, a pesar de su denominación, no es específica de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, habiéndose demostrado que puede actuar sobre una gran variedad de receptores acoplados a proteínas G, con el único requerimiento de ocupación por el agonista.  $\beta$ ARK forma parte de una familia de quinasa en la que se incluyen además la rodopsina quinasa,  $\beta$ ARK2 bovina y las GPRK1 y GPRK2 de *Drosophila* (*Chen et al., 1993*). Recientemente se ha demostrado que  $\beta$ ARK se ancla a la membrana plasmática a través de  $\beta\gamma$  (*Koch et al., 1993*). Por último, se ha demostrado la fosforilación en Tyr de receptores  $\beta$ -adrenérgicos inducida por insulina, que se traduce en una marcada atenuación (desensibilización) de su capacidad de activación de adenilato ciclasa (*Hadcock et al., 1992*), lo que constituye junto con la fosforilación por PKA del receptor de insulina (*Häring, 1991*), un interesante ejemplo de regulación cruzada entre diferentes vías de transducción.

## 1.5 ADENILATO CICLASA

La adenilato ciclasa [ ATP pirofosfato-liasa (ciclante), EC 4.6.1.1 ] forma parte junto con una gran variedad de receptores y las proteínas G que los acoplan, de un sistema de transducción de señales extracelulares, de distribución ubicua y enorme importancia en la regulación de las funciones celulares (*Tang y Gilman, 1992*).

La enzima, presente tanto en procariontes como en eucariotes sintetiza adenosina 3',5'-monofosfato cíclico, AMP cíclico (cAMP) a partir de ATP, en presencia de un catión divalente,  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$ .



La adenilato ciclase, también denominada adenilil ciclase, puede utilizar como sustrato dATP. La concentración de ATP (5-10 mM), que se encuentra en exceso ( $K_m$  ATP 50-100  $\mu\text{M}$ ), no ejerce ningún efecto regulador. La degradación del cAMP a 5'-AMP corre a cargo de las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos de las que existe una gran variedad con diferente grado de especificidad.

### 1.5.1 El cAMP como mensajero intracelular

El cAMP fue el primer mensajero intracelular descrito. E. Sutherland en 1957 encontró que el nexo de unión entre la estimulación hormonal y la activación de la glucógeno fosforilasa era un factor termoestable, que se generaba después de la exposición de un homogeneizado de hígado a adrenalina, y que era capaz de mimetizar los efectos de la hormona, siendo identificado un año después como adenosina 3',5'-monofosfato cíclico y denominada adenil ciclase la enzima responsable de su biosíntesis (*Rall y Sutherland, 1958*). Este descubrimiento promovió un cambio de paradigma de la Endocrinología y originó de hecho, el nacimiento de la rama de la Endocrinología Molecular. Otros nucleótidos cíclicos posteriormente descritos son el cGMP (guanosina 3',5'-monofosfato cíclico) y cCMP (citosina 3',5'-monofosfato cíclico) sintetizadas respectivamente por guanilato ciclase (*Garbers, 1992*) y citidilato ciclase (*Mori et al., 1990*). El conocimiento de las vías de síntesis, degradación y mecanismos de acción del cCMP es todavía muy limitado.

El cAMP ejerce fundamentalmente su acción a través de la proteína quinasa dependiente de cAMP, PKA (*Taylor et al., 1990*). Cuatro moléculas del nucleótido cíclico se unen a las subunidades reguladoras, R, de la holoenzima ( $R_2C_2$ ), promoviendo la disociación de dos subunidades catalíticas activas. Existen tres isoformas de C y cuatro de R que se combinan para formar las holoenzimas I y II de PKA, pudiendo encontrarse la segunda asociada a fracción particulada. La fosforilación promovida por PKA regula multitud de procesos entre los que se cuenta la expresión génica por traslocación de C al núcleo donde regula factores de transcripción como CREB (Figura 14). El cAMP puede también regular directamente canales de  $\text{Na}^+$ , independientemente de la fosforilación (*Barnard, 1992*).

La vía de cAMP (Figura 14) presenta características de amplificación, especificidad y diversidad. Amplificación, puesto que una única molécula de ligando al interaccionar con el receptor activa muchas proteínas G, cada una de las cuales regula una molécula de adenilato ciclase que tiene capacidad de generar muchas moléculas de cAMP. La proteína quinasa activada fosforila muchas moléculas de proteínas específicas y diversos sistemas receptores de

membrana, canales iónicos y proteínas transportadoras, proteínas estructurales y contractiles y factores de transcripción.

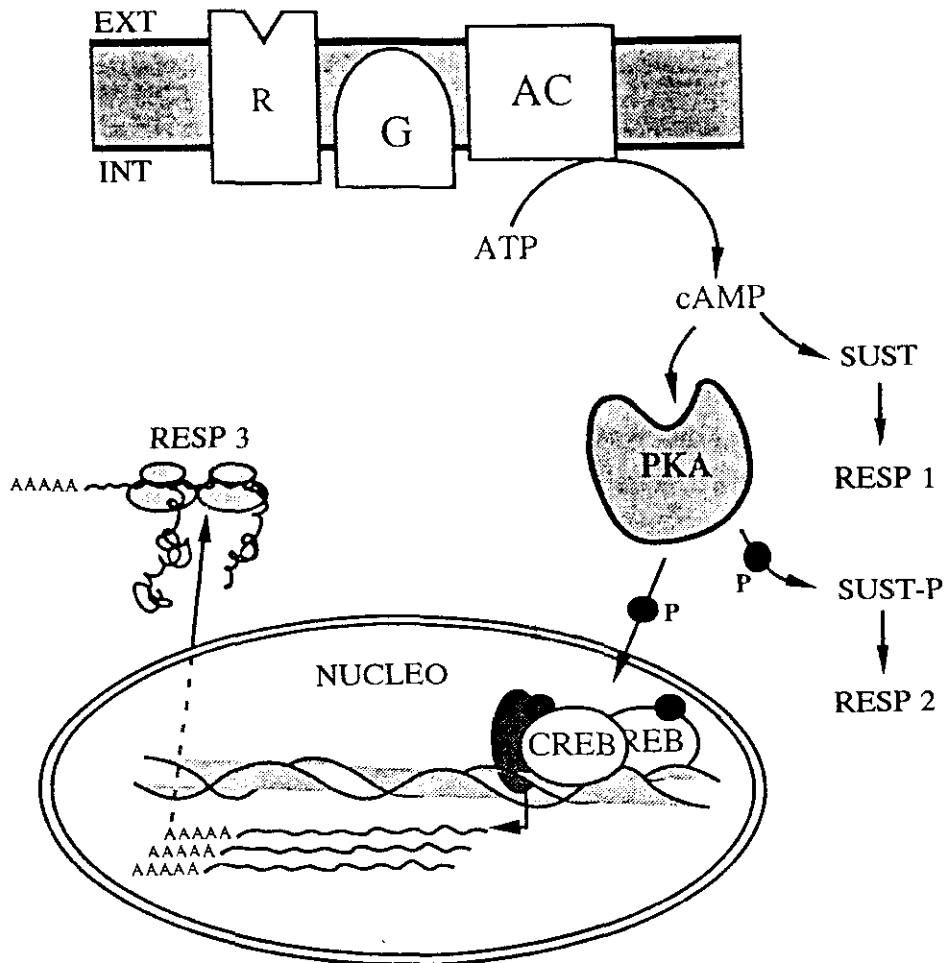


Figura 14. Respuestas fisiológicas reguladas por el cAMP. ●→, respuestas dependientes y —→, respuestas independientes de fosforilación. SUST, sustrato regulado; RESP, respuesta promovida.

### 1.5.2 Clasificación de adenilato ciclasas

Existen tres clases bien definidas de adenilato ciclasas, con diferentes características estructurales y reguladoras (*Danchin, 1993 y Tang y Gilman, 1992*):

- Clase I: Adenilato ciclasa de enterobacterias.

- Clase II: Adenilato ciclasa tóxica, activada por calmodulina, producida por bacterias patógenas (*Bacillus anthracis*, *Bordetella pertussis*).
- Clase III: Adenilato ciclasa "universal", la clase mayoritaria que comprende enzimas de procariotas y eucariotas, y en la que se incluyen los ocho tipos de adenilato ciclasa de mamíferos hasta ahora descritos.

Algunas de estas adenilato ciclasas se encuentran en fracción soluble (por ejemplo, ciertas enzimas bacterianas y quizás una forma de esperma de mamíferos). La inmensa mayoría se encuentra asociada a membrana, bien periféricamente (*Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*) o son proteínas integrales de membrana con un sólo fragmento transmembranar (forma ACG de *Dictyostelium*) o con 12 fragmentos transmembranares, como la forma ACA de *Dictyostelium*, una de *Drosophila* (gen rutabaga) o los ocho tipos de adenilato ciclasa de mamíferos clonados hasta el momento (Figura 15). El descubrimiento de esta última estructura que se corresponde con la de una proteína transportadora resultó sorprendente. De hecho en *Paramecium*, la síntesis de cAMP está acoplada a transporte de  $K^+$ , lo que constituiría un nuevo tipo de receptor. La enzima de mamíferos carece aparentemente de esta capacidad que recientemente se ha descrito también en *Drosophila*.

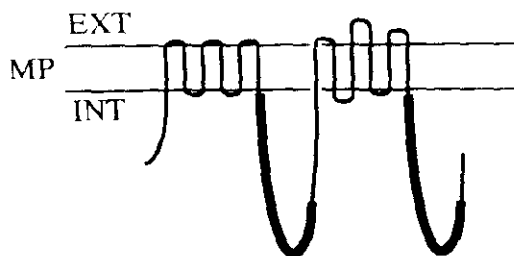
Los ocho tipos de adenilato ciclasas de mamíferos presentan secuencias de aminoácidos, características reguladoras y distribución en tejidos diferentes (*Krupinski et al.*, 1992). La secuencia de aminoácidos de las ocho isoformas difiere significativamente en las regiones transmembranares mientras que los dominios citoplasmáticos son muy similares. Sobre la base de la homología en la secuencia de aminoácidos se han establecido cinco subfamilias de adenilato ciclasa de mamíferos I, III, VIII, II/IV/VII y V/VI que conservan algunas características reguladoras comunes (Figura 15A). Las subfamilias I, III y VIII son específicamente neurales, con la isoforma I muy abundante en cerebro y la III exclusiva de neuronas olfativas, mientras que las subfamilias II/IV/VII y V/VI se localizan tanto en cerebro como en tejidos periféricos. Los tipos VI y VII parecen abundantes en corazón e hígado.

La masa molecular de todas las isoformas es de aproximadamente 120 KDa (unos 1100 aminoácidos), siendo su tamaño estimado a partir de sus propiedades hidrodinámicas de aproximadamente 200-250 KDa, por lo que probablemente se encuentran en forma de dímero, estando además glicosiladas en el extremo N-terminal. La disposición de la cadena polipeptídica en la membrana plasmática presenta una estructura que se repite una vez y que la forman seis fragmentos transmembranares seguidos de un dominio citoplasmático grande (aproximadamente 40 KDa). A la formación del sitio catalítico contribuyen los dos dominios citoplasmáticos que exhiben una elevada homología entre sí y con dominios de guanilato ciclasa de función similar. Formas truncadas de adenilato ciclasa con seis regiones transmembranares y un sólo dominio citoplasmático carecen de actividad catalítica.

**A** CARACTERÍSTICAS REGULADORAS DIFERENCIADORAS DE LAS DISTINTAS FAMILIAS DE ADENILATO CICLASA

FAMILIA	REGULACIÓN		
	$Ca^{2+}$ -CM	$Ca^{2+}$	$\beta\gamma$
I	+	O	-
III	+	O	O
II/IV/VII	O	-	+
V/VI	O	-	O

**B**



**C**

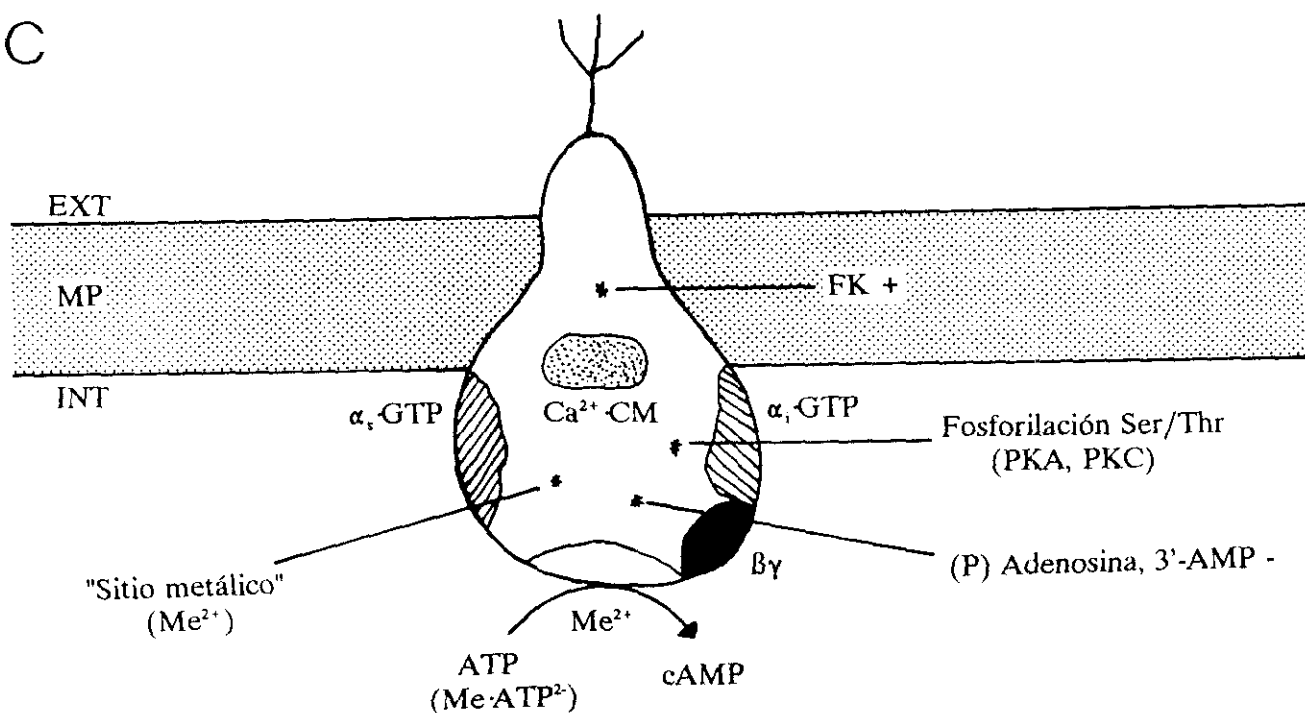


Figura 15. A) Regulación de las diferentes familias de adenilato ciclasa.  $Ca^{2+}$ -CM, regulación por  $Ca^{2+}$  a través de calmodulina; +, activación; -, inhibición; O, sin efecto. La regulación de la isoforma VII, no determinada, se asimila a la de los otros componentes de la familia. No se incluye la familia VIII, cuya regulación no ha sido todavía establecida. B) Representación expandida de la cadena polipeptídica de adenilato ciclasa de mamíferos. C) Representación del centro catalítico y los dominios reguladores de adenilato ciclasa.

### 1.5.3 Regulación de la adenilato ciclasa

Las adenilato ciclasas se han dividido clásicamente, en cuanto a su regulación, en dos categorías, dependientes e independientes de  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina. Los tipos I y III son activables por bajas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de calmodulina, mientras que las isoformas II, IV, V y VI se inhiben por concentraciones similares de  $\text{Ca}^{2+}$  independientemente de calmodulina, sin excluir la participación de factores celulares endógenos análogos a la recoverina de retina (Stryer, 1991), que confiere a guanilato ciclasa la capacidad de ser inhibida por  $\text{Ca}^{2+}$  o la posibilidad más inmediata de existencia de un sitio de alta afinidad para el  $\text{Ca}^{2+}$ . La activación o inhibición de adenilato ciclasa por concentraciones submicromolares de  $\text{Ca}^{2+}$  no se debe confundir con la inhibición que experimentan todos los tipos de adenilato ciclasa a concentraciones submilimolares de  $\text{Ca}^{2+}$  por competencia con el sitio alostérico ("metálico") para el  $\text{Mg}^{2+}$  o  $\text{Mn}^{2+}$ , sin repercusión fisiológica aparente. La actividad de adenilato ciclasa en cerebro, hígado y corazón puede así resultar estimulada, no afectada o inhibida por concentraciones submicromolares de  $\text{Ca}^{2+}$ . La inhibición por calcio podría ser importante en tejidos como el corazón en el que uno de los efectos de la estimulación  $\beta$ -adrenérgica, además de activar la adenilato ciclasa, es incrementar la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula, que puede ejercer un papel desensibilizador sobre la enzima, o de regulación "feed-back" negativa. La adenilato ciclasa proporcionaría así una única respuesta integrada a múltiples estímulos, merced a la complejidad de su regulación.

La adenilato ciclasa presenta diferentes sitios para su modificación covalente: N-glicosilación y fosforilación por PKC y PKA. Todas las formas están glicosiladas y todas a excepción de la IV (para la VII y la VIII no se ha determinado) son potencialmente fosforiladas por PKA (Premont *et al.*, 1992a), cuyo efecto es la desensibilización heteróloga por la menor capacidad de adenilato ciclasa fosforilada de responder a  $G_{\alpha s}$  (efecto "feed-back") (Premont *et al.*, 1992b). La fosforilación por PKC activa, sin embargo, adenilato ciclasa, aunque la selectividad de su acción sobre las diferentes isoformas es contradictoria en la bibliografía (Premont *et al.*, 1992a). La acción de PKC es importante en el ámbito de la regulación cruzada, "cross-talk" de sistemas de transducción (Houslay, 1991).

En adenilato ciclasa además del centro catalítico, existen sitios/dominios reguladores para activación por  $\alpha_i$ -GTP, inhibición por  $\alpha_i$ -GTP, activación por cationes divalentes ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ; "sitio metálico") el diterpeno forskolina, inhibición por adenosina (Sitio "P") y eventualmente, en determinadas isoformas, dominios para activación por  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina y modulación por  $\beta\gamma$  (Figura 15).

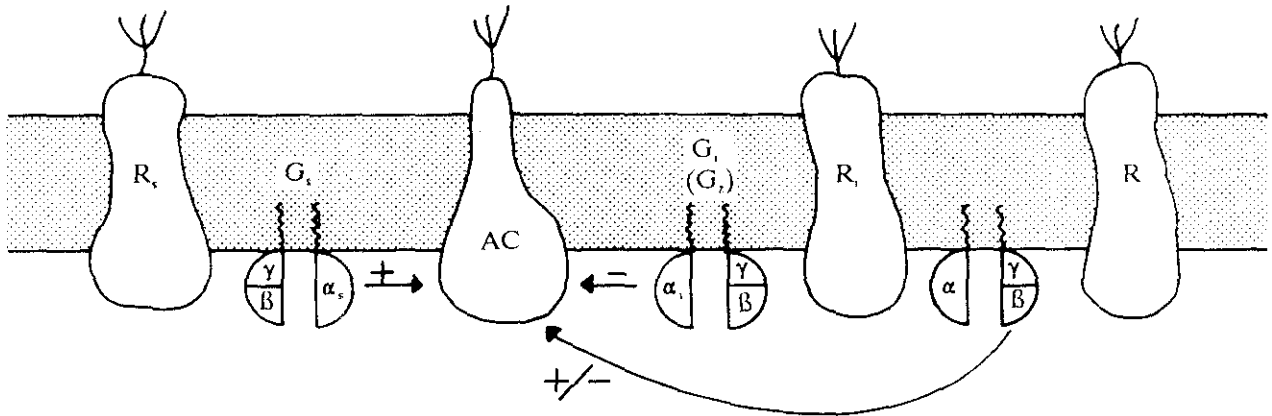
Los cationes divalentes  $\text{Mg}^{2+}$  o  $\text{Mn}^{2+}$ , además de actuar como cosustratos ( $\text{MeATP}^{2+}$ ), son activadores de la enzima, resultando más potente  $\text{Mn}^{2+}$  que  $\text{Mg}^{2+}$ . El  $\text{Mn}^{2+}$  tiene un efecto desacoplante y en su presencia la enzima, no se regula a través de proteínas G (Limbird *et al.*, 1979). El diterpeno forskolina es el activador más potente de la enzima y su efecto se encuentra

favorecido por  $G_s$  (Hubbard *et al.*, 1991). Se ha postulado la existencia de un modulador endógeno "forskolin-like", de forma similar al "ouabain-like" para  $Na^+, K^+$ -ATPasas, cuyo sitio de unión podría encontrarse próximo o formando parte del dominio transmembranar de la enzima, habida cuenta de la naturaleza marcadamente hidrofóbica del diterpeno (Laurenza *et al.*, 1989). La adenosina, además de actuar a través de receptores específicos  $A_2$  y  $A_1$  acoplados a adenilato ciclasa, inhibe la propia subunidad catalítica a través de un sitio P intracelular, de baja afinidad, cuya significación fisiológica es controvertida (Bushfield y Johnson, 1990).

Por lo que respecta a la regulación de adenilato ciclasa por proteínas G, el patrón clásicamente admitido ha sufrido recientemente importantes modificaciones. Así, a la activación de adenilato ciclasa por  $G_{s\alpha}$  y su inhibición por  $G_{i\alpha}$  y  $G_{z\alpha}$  en respuesta a receptores estimuladores  $R_s$  e inhibidores  $R_i$  respectivamente (Figura 16A), hay que añadir la modulación ejercida por el dímero  $\beta\gamma$  a concentraciones fisiológicamente relevantes (5-10 nM) (Tang y Gilman, 1991). El dímero  $\beta\gamma$  procede fundamentalmente de  $G_i$ ,  $G_o$  y  $G_z$ . Las isoformas II y IV se estimulan por  $\beta\gamma$  mientras que la isoforma I se inhibe (Figura 15A) resultando este efecto potenciado cuando la enzima se encuentra activada por  $G_{s\alpha}$  o en su caso por  $Ca^{2+}$ -calmodulina, aunque la acción moduladora de  $\beta\gamma$  es también perceptible sobre la actividad basal en ausencia de  $G_{s\alpha}$ . De hecho, con adenilato ciclasa, se ha demostrado por vez primera, la modulación directa por  $\beta\gamma$  de un efector purificado (Taussig *et al.*, 1993a), aunque se tienen evidencias indirectas de regulación de fosfolipasas y canales iónicos por  $\beta\gamma$ . Recientemente se han demostrado diferencias en la afinidad de  $\beta\gamma$  por adenilato ciclasa que parecen venir dictadas por la identidad de  $\gamma$ , que presenta una mayor heterogeneidad (8 tipos) que  $\beta$  (4 tipos).

Así, la regulación de adenilato ciclasa a través de proteínas G exhibe un perfil bastante complejo que se esquematiza en la Figura 16B. La interacción directa de  $\alpha_s$  con adenilato ciclasa activa la enzima, mientras que  $\alpha_i$  o  $\alpha_z$  la inhiben directamente o compitiendo con  $\alpha_s$ . Por otra parte, el dímero  $\beta\gamma$ , intercambiable en principio entre diferentes proteínas G, y procedente de  $G_i$ ,  $G_o$  o  $G_z$ , podría desactivar  $\alpha_s$  formando el complejo inactivo  $\alpha_s\beta\gamma$ . Además,  $\beta\gamma$ , como ya se ha mencionado, puede modular directamente determinadas isoformas de adenilato ciclasa. Así, por ejemplo, a través de  $G_i$  se puede activar o inhibir adenilato ciclasa (Federman *et al.*, 1992), y receptores que mediante acoplamiento con  $G_i$  inhiben adenilato ciclasa en muchos tejidos, en otros, como células piramidales de sistema nervioso, con abundancia de adenilato ciclasa tipo II, activan la enzima y canales de  $K^+$  a través de  $\beta\gamma$  (Bourne y Nicoll, 1993).

A



B

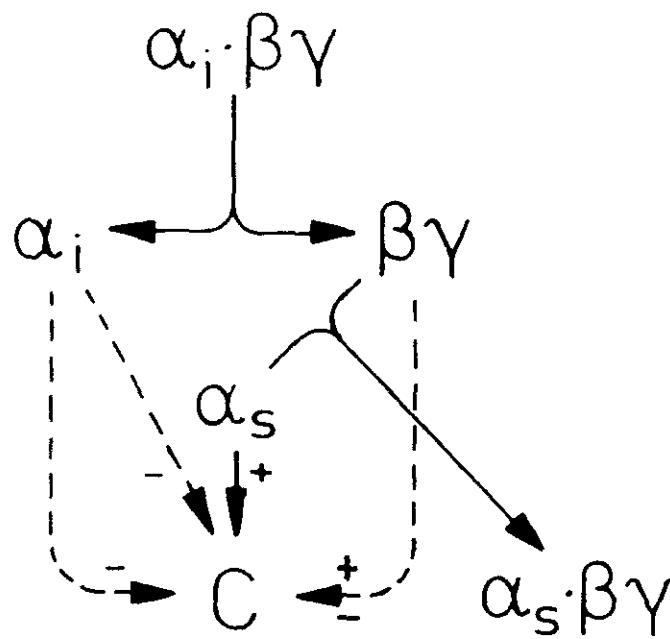


Figura 16. Regulación de adenilato ciclasa por proteínas G.

#### 1.5.4 Proteínas G acopladas a adenilato ciclasa

$G_s$  tiene una distribución ubicua. Existen cuatro isoformas de  $G_{s\alpha}$  codificadas por un único gen y generadas por "splicing" alternativo del RNA. Estas 4 proteínas migran en geles de poliacrilamida-SDS como dos especies mayoritarias que difieren en 15 aminoácidos y que presentan masas moleculares aparentes de 42-45 KDa y 46-52 KDa, respectivamente. Las especies grande y pequeña se designan como  $G_{s\alpha-L}$  y  $G_{s\alpha-S}$ . Cada una de estas dos bandas mayoritarias comprende dos isoformas que se diferencian en tan sólo un residuo. Aunque las cuatro isoformas se expresan de forma diferente en distintos tejidos y etapas del desarrollo, el significado funcional de esta diversidad no ha sido claramente establecido. No obstante, se ha sugerido que la actividad de adenilato ciclasa depende no sólo de la cantidad de  $G_{s\alpha}$  presente en la membrana sino también de la isoforma que se expresa predominantemente. Así,  $G_{s\alpha-L}$  activa adenilato ciclasa más eficazmente que  $G_{s\alpha-S}$  (Birnbauer, 1993). A través de  $G_{s\alpha}$  se activan también canales de  $Ca^{2+}$  y de  $Na^+$  y se ha propuesto también que  $G_{s\alpha}$  media la inhibición hormonal de  $Ca^{2+}$ -ATPasa en la membrana plasmática de hepatocitos (Jouneaux et al., 1993). Por lo que respecta a las proteínas G reguladoras inhibitoras, se han identificado tres isoformas distintas de  $G_i$ ,  $G_{i1-3\alpha}$ , con una masa molecular de 40000 Da, que se pueden separar en electroforesis en SDS por su movilidad ligeramente distinta una vez ADP-ribosiladas por toxina pertussis. Aunque no existe una clara distinción funcional entre estas formas, también se expresan de forma distinta según el tejido y la etapa del desarrollo. Mientras que  $G_{i2\alpha}$  parece expresarse ubicuamente en células de mamíferos,  $G_{i1\alpha}$  y  $G_{i3\alpha}$  lo hacen de forma selectiva. Todas las isoformas activan canales de  $K^+$  además de inhibir adenilato ciclasa, resultando ser  $G_{i2\alpha}$  el principal mediador de la inhibición de la enzima (Mc Kenzie y Milligan, 1990 y Remaury et al., 1993). Existe un exceso de  $G_i$  sobre  $G_s$  (por ejemplo, de 10 veces en sarcolema).  $G_{z\alpha}$ , otra proteína de la familia  $G_{i\alpha}$  menos estudiada e insensible a PTX, también inhibe adenilato ciclasa (Wong et al., 1992) mientras que otro importante componente de esta familia,  $G_{o\alpha}$ , no ejerce ningún efecto (Taussig et al., 1993b).

#### 1.5.5 Desensibilización de adenilato ciclasa

Tanto la estimulación como la inhibición de adenilato ciclasa, cuando es persistente, se traduce en una desensibilización o pérdida de respuesta a la señal extracelular. Además de los procesos de desensibilización homóloga y heteróloga, ya descritos, que afectan al propio receptor (fosforilación por  $\beta$ ARK y PKA), la desensibilización heteróloga promovida a través de receptores estimuladores ( $\beta$ -adrenérgicos, glucagón, hCG) se ve acompañado en muchos casos de una elevación ("up-regulation") de los niveles de  $G_{i\alpha}$ , no concomitantes con los de  $\beta$ y y en algunos casos de disminución de los de  $G_{s\alpha}$  (Reithmann et al., 1991). La elevación de los niveles de  $G_i$  se produce por un incremento en la transcripción de los genes de  $G_{i\alpha}$ , en un

proceso mediado por PKA que actuaría sobre factores reguladores de la transcripción (AP-2). En la desensibilización heteróloga a través de receptores inhibidores ( $A_1$ , de adenosina,  $\alpha_2$ -adrenérgicos y  $PGE_1$ ), se puede producir asimismo, una disminución en los niveles de  $G_{i\alpha}$  por un mecanismo aún no aclarado (Milligan y Green, 1991). Por último, la propia subunidad catalítica del sistema adenilato ciclasa puede ser desensibilizada mediante fosforilación directa por PKA, que inhibe su respuesta a  $G_{i\alpha}$ , como se ha demostrado en hepatocitos por acción de glucagón (Premont et al., 1992b). En la Figura 17 se representan los posibles mecanismos de desensibilización del sistema adenilato ciclasa.

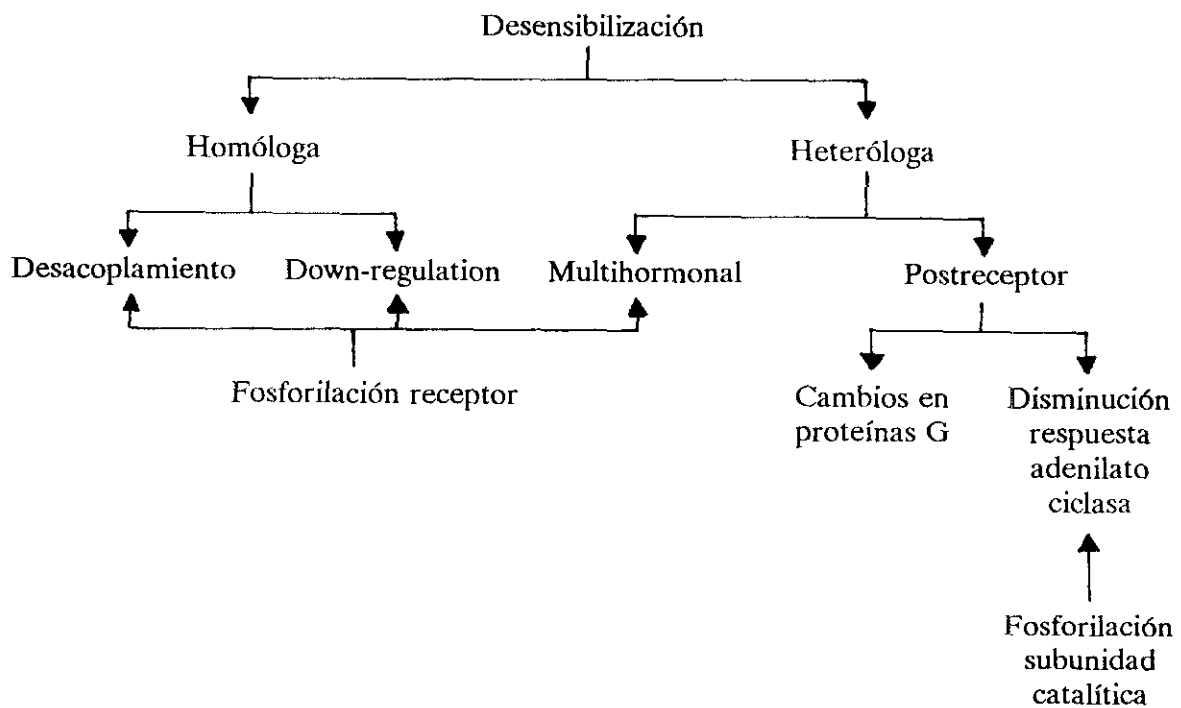


Figura 17. Mecanismos de desensibilización del sistema adenilato ciclasa. Tomado de Premont et al., (1992b).

## 1.6 TIPOS DE EJERCICIO FÍSICO

El término ejercicio se puede definir como el movimiento corporal repetitivo, estructurado y planeado que se realiza para mantener o mejorar uno o más componentes de la forma física (*Braden y Strong, 1990*).

En función de la diferente actividad muscular que ellos implican, *Virmani y Robinowitz, (1987)* consideran la existencia de dos tipos de ejercicio, el estático y el dinámico. El ejercicio dinámico aeróbico se define, según *Braden y Strong, (1990)*, como aquel que implica un gran número de músculos, provoca un ciclo de estiramiento-acortamiento de las fibras musculares y produce una carga predecible y reproducible sobre el sistema de transporte de oxígeno al aumentar su demanda por los tejidos periféricos. Mientras que el ejercicio estático normalmente implica un menor número de músculos y no produce una mejora de la condición cardiovascular del deportista. La natación, la carrera o el ciclismo son ejemplos claros de ejercicio dinámico mientras que el levantamiento de pesos lo es de ejercicio estático.

Los efectos hemodinámicos de estos dos tipos de ejercicio son diferentes. Durante el ejercicio dinámico se produce un descenso de la resistencia periférica al flujo circulatorio y un aumento tanto en el volumen cardíaco como en la presión sistólica. Durante el ejercicio estático, sin embargo, se produce un aumento de la resistencia periférica, en la presión sistólica y diastólica y también un crecimiento pequeño en el volumen cardíaco (*Virmani et al., 1985*). La mayoría de las actividades musculares que se realizan a diario implican una mezcla de esfuerzo dinámico y estático; si bien, una actividad rítmica como la carrera es predominantemente dinámica y el soportar grandes pesos es mayoritariamente un esfuerzo estático.

La intensidad del ejercicio, variable de unos programas de entrenamiento a otros, es un factor que se puede medir por el nivel de oxígeno consumido. Se expresa la intensidad del ejercicio físico en función del porcentaje de la capacidad aeróbica máxima del individuo ( $VO_2$  max) y se considera que cuando este parámetro está por debajo del 25% el ejercicio es ligero, cuando tiene un valor entre el 25% y el 50% es un ejercicio de intensidad media, entre el 51% y el 75% es un ejercicio intenso y entre el 90% y el 100% es un ejercicio exhaustivo (*Scheuer y Tipton, 1977*).

Otro parámetro que también varía de unos protocolos de entrenamiento a otros es la duración de cada sesión de entrenamiento. La conjunción de la duración y la intensidad permite establecer una subclasificación del ejercicio dinámico. De esta manera, *Pate y Branch, (1992)* establecen tres grandes grupos en los que se pueden encuadrar la totalidad de los programas de entrenamiento por carrera:

- Ejercicio de larga duración y moderadamente intenso. En estas sesiones la intensidad oscila entre el 60-70% de la  $VO_2$  max, lo que se corresponde, en deportistas entrenados, con un ritmo más lento que el de la carrera, y la duración de cada sesión oscila entre

los 30 minutos y las 2 horas. En este grupo se incluyen las formas más populares de entrenamiento de resistencia.

- Ejercicio intenso de duración moderada. En los que el deportista se encuentra entre un 70 y un 100% de su capacidad aeróbica máxima. En este tipo de entrenamiento se incluyen ejercicios de resistencia que se realizan a ritmo normal de carrera durante períodos de tiempo prolongados, así como ejercicios cortos (4-5 min.) e intensos pero aeróbicos, a los que los especialistas denominan "aerobic interval training".
- Ejercicio de corta duración y de intensidad supramáxima. Estos ejercicios son de una intensidad superior al 100% de la  $VO_2$  max, y en ellos se observa un aumento rápido en la producción de lactato que da cuenta de una contribución elevada del metabolismo anaeróbico para producir la energía necesaria (Vollestad et al., 1992).

Desde un punto de vista fisiológico, todo tipo de ejercicio supone un cierto nivel de estrés para el organismo. La extensión de la respuesta adaptativa a este estímulo de estrés es variable con la intensidad y duración del ejercicio, así como con el estado de forma física del individuo y las condiciones ambientales durante la competición (Mazzeo, 1991). Una posible limitación de los estudios de adaptación al esfuerzo físico en animales de laboratorio, como el presente, es la contribución al proceso adaptativo estudiado de otros factores de estrés distintos al propio ejercicio, pues son difícilmente cuantificables; por ello, en el diseño de los programas de entrenamiento hay que prestar especial atención a la presencia de los mismos y hay que intentar minimizarlos.

## **1.7 METABOLISMO ENERGÉTICO DURANTE EL EJERCICIO. RELACIÓN METABÓLICA ENTRE TEJIDO ADIPOSO, HÍGADO Y CORAZÓN**

Todas las células del organismo consumen energía para mantener su actividad vital en un situación de reposo. Con el ejercicio físico se produce un aumento importante en sus necesidades energéticas, especialmente en las células de los músculos cardíaco y esquelético. Para satisfacer este crecimiento en la demanda energética se va a producir la movilización de los combustibles metabólicos almacenados en diferentes órganos, proceso que está bajo el control entre otros del sistema  $\beta$ -adrenérgico-adenilato ciclasa.

### **1.7.1 Reservas energéticas**

En el cuerpo de los mamíferos aparecen dos grandes reservas energéticas de diferente naturaleza, el glucógeno y los triglicéridos.

La mayor parte de las reservas de glucógeno en el organismo se localizan en el músculo.

Aunque los niveles de glucógeno almacenado varían con la cantidad de masa muscular, la dieta y el estado de ejercicio previo, suponen aproximadamente entre 350-500 gramos de peso corporal. La otra reserva importante de carbohidratos del organismo es el glucógeno hepático, que en peso puede llegar a ser de hasta 100-150 gramos, si bien la cantidad de glucógeno hepático varía mucho con el estado nutricional y de ejercicio del individuo. En conjunto el glucógeno hepático y muscular suponen un 2% del total de reservas energéticas del organismo (*Hultman y Harris, 1988*).

Los triglicéridos, almacenados fundamentalmente en el tejido adiposo, constituyen la reserva energética más importante de los mamíferos. Comparada con el glucógeno, la cantidad de triglicéridos que almacena un individuo es mucho mayor, pues se ha estimado que en hombres de unos 70 kilos de peso aproximadamente 8 son de triglicéridos. Esta fuente de energía representa el 80% del total de reservas energéticas del individuo (*Johnson et al., 1969*).

Los sustratos energéticos circulantes en sangre, glucosa y ácidos grasos libres, suponen aproximadamente un 1% de la energía total almacenada.

Las proteínas no se almacenan a pesar de que pueden ser empleadas como sustrato energético en ejercicios prolongados, cuando las reservas de carbohidratos se han agotado. En cualquier caso, la utilidad de las proteínas como sustrato energético es limitada pues su consumo conlleva la pérdida de las funciones biológicas que desempeñan (*Felig y Wahren, 1971 y Meredith et al., 1989*).

A parte de estos combustibles metabólicos, en el músculo se encuentra creatina fosfato, encargada de re fosforilar el ADP que se genera durante la contracción muscular y que permite al músculo mantener su actividad contractil durante un corto período de tiempo (segundos), necesario para movilizar las reservas energéticas. El aporte energético que proporciona la creatina fosfato es muy importante en algunas especialidades de competición como son las carreras de 100 o 200 metros.

### **1.7.2 Integración del metabolismo energético de tejido adiposo, hígado y músculo cardíaco durante el ejercicio**

La movilización de las diferentes reservas energéticas, para satisfacer la demanda de los músculos cardíaco y esquelético durante el ejercicio, varía con la intensidad, duración y estado de forma del individuo. Esta aseveración está plenamente aceptada y demostrada, y como ejemplos clásicos de ella se va a describir a continuación la relación metabólica existente entre el tejido adiposo, hígado y corazón (objetos del presente estudio) en dos tipos de ejercicio perfectamente diferenciados.

### 1.7.2.1 Ejercicio de intensidad supramáxima y de corta duración

En este tipo de ejercicio la principal fuente de energía, para que el corazón pueda realizar su función contractil, procede de la movilización de las reservas de carbohidratos. El músculo cardíaco, al igual que el esquelético, emplea la glucosa, procedente de la degradación del glucógeno que tienen almacenado y de la captación de la misma desde el plasma, para obtener energía vía glucolisis. Hecho que tiene su ratificación experimental en el aumento en la actividad de hexoquinasa cardíaca ante la estimulación  $\beta$ -adrenérgica (*Ji et al., 1987*), en el mayor contenido de glucógeno encontrado en el corazón de animales entrenados (*Scheuer et al., 1974*) y en el aumento en la captación de glucosa plasmática como consecuencia de la adaptación de sus transportadores específicos (*Kainulainen, 1985*), manteniéndose el nivel de glucosa del plasma gracias al incremento de su producción en hígado, fundamentalmente vía glucogenolisis.

Por otra parte, el lactato formado por la glucolisis que tiene lugar en los músculos cardíaco y esquelético, y que mayoritariamente va a ser retirado del torrente sanguíneo por el hígado que lo emplea como sustrato gluconeogénico, también puede ser empleado por el corazón como fuente de energía en ejercicios más prolongados en el tiempo.

La movilización de los ácidos grasos almacenados en el tejido adiposo es un proceso relativamente lento; por lo que en este tipo de ejercicio apenas si van a ser empleados por el corazón como fuente de energía para mantener su función contractil. Además, en este tipo de ejercicio la captación de ácidos grasos por el hígado y la cetogénesis van a tener escasa importancia desde el punto de vista cualitativo.

### 1.7.2.2 Ejercicio de resistencia

La energía necesaria para mantener un ejercicio de este tipo la obtiene el músculo cardíaco, fundamentalmente, gracias al aporte continuo de glucosa y ácidos grasos libres por el torrente sanguíneo (Figura 18) (*Hagerman, 1992*). Si bien, el corazón también va a emplear como nutrientes el glucógeno y triglicéridos que almacena.

Se ha estimado que un atleta de resistencia que esté corriendo al 70% de su  $VO_2$  max obtiene, en las etapas iniciales de la carrera, aproximadamente el 50-60% de la energía que necesita a partir de los carbohidratos, y el 40-50% restante a partir de los lípidos. El aporte lipídico será progresivamente más importante a medida que se prolongue la duración del ejercicio físico (*Coyle et al., 1986*). Por otra parte, se sabe que en individuos bien entrenados la contribución lipídica a los requerimientos energéticos es considerablemente mayor (hasta un 70%), lo que permite al organismo ralentizar el consumo de glucógeno (*Costill et al., 1977*).

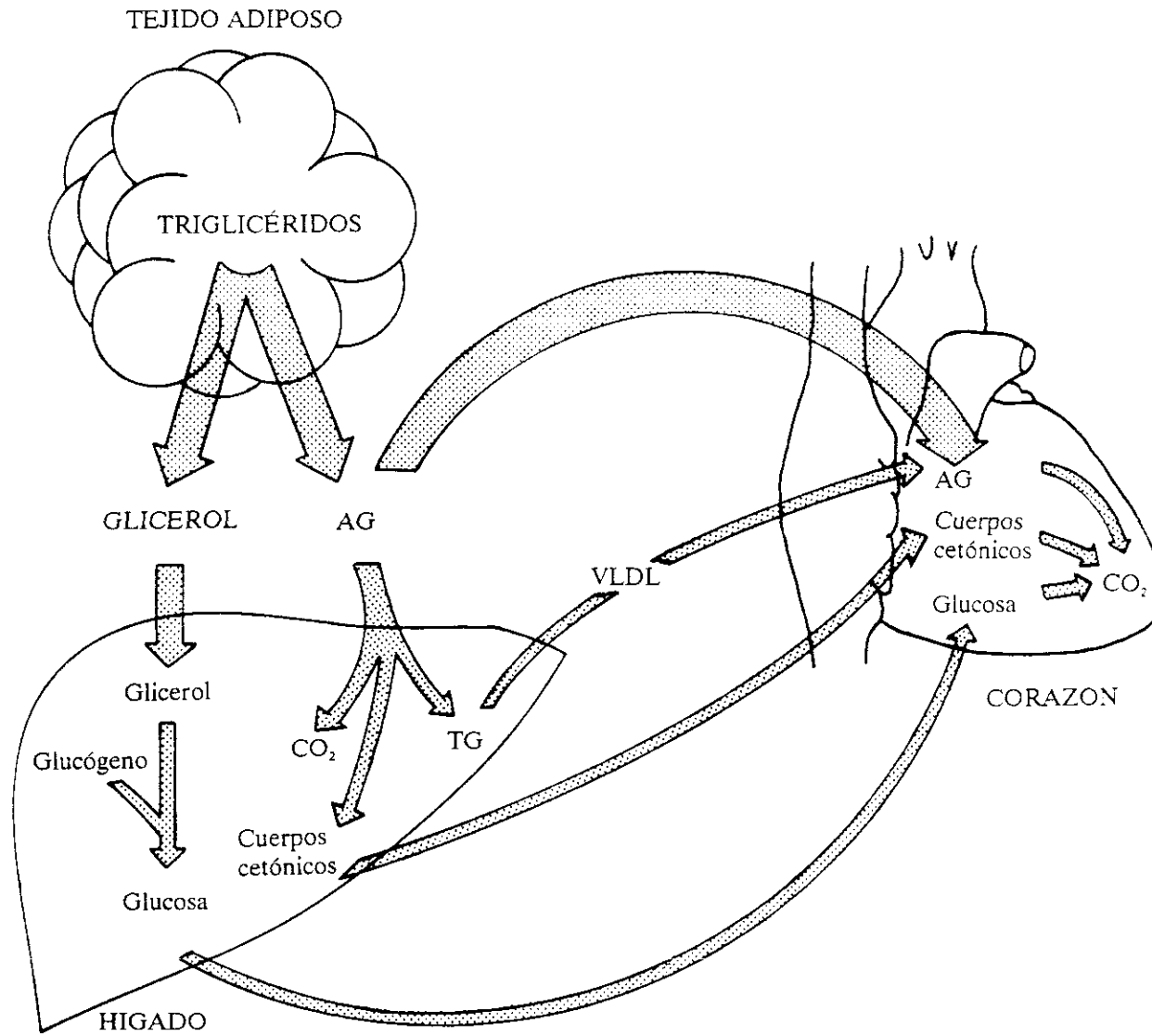


Figura 18. Relación metabólica que se establece entre corazón, hígado y tejido adiposo durante el ejercicio de resistencia. El grosor de las flechas indica la importancia de los procesos metabólicos esquematizados.

En esta situación de ejercicio, por tanto, se estimula la lipólisis del tejido adiposo, y en consecuencia aumenta la concentración de ácidos grasos libres circulantes en plasma (*Ahlborg et al., 1974 y Winder et al., 1979*) y la velocidad de captación por los cardiomiocitos.

El hígado retira parte de los ácidos grasos liberados por el tejido adiposo al torrente sanguíneo y los va a emplear, además de para su reesterificación en triglicéridos, como sustratos de  $\beta$ -oxidación. Este órgano también desvía parte del acetil-CoA que se forma durante la oxidación de los ácidos grasos para formar los cuerpos cetónicos, que aunque pueden ser empleados como combustible por el músculo cardíaco, su contribución cuantitativa al metabolismo oxidativo es poco relevante (*Wahren et al., 1975 y 1984*).

La concentración plasmática de glicerol, generado junto a los ácidos grasos en la lipólisis del tejido adiposo, aumenta durante el ejercicio. El glicerol es captado por el hígado, que lo empleará como sustrato para la producción de glucosa vía gluconeogénesis. La otra fuente de glucosa hepática, para el metabolismo oxidativo muscular, es la liberada mediante glucogenolisis. Dado que el ejercicio prolongado agota prácticamente todo el glucógeno hepático, la gluconeogénesis cobra cada vez más importancia en el aporte de glucosa al músculo cardíaco (*Winder, 1988 y Wasserman y Cherrington, 1991*).

## 1.8 RESPUESTAS ADAPTATIVAS DEL SISTEMA $\beta$ -ADRENÉRGICO-ADENILATO CICLASA AL EJERCICIO FÍSICO

La adaptación biológica es un proceso muy general por el que una célula, un órgano, un organismo o un grupo de individuos se adaptan a un cambio en las condiciones ambientales. A grandes rasgos se puede considerar que existen tres tipos diferentes de adaptación biológica (*Swynghedaw, 1992*): los cambios biológicos que no afectan a la expresión o estructura del genoma, los que afectan a la expresión genética, o los cambios en el propio genoma (mutaciones). Un buen ejemplo de adaptación biológica serían los cambios que se producen en los niveles y funcionalidad de diferentes proteínas en respuesta a la práctica deportiva.

El ejercicio físico de resistencia intenso y regular, como se ha visto en el apartado anterior, afecta a una gran diversidad de procesos metabólicos como glucogenolisis, lipólisis, gluconeogénesis y síntesis de proteínas, y el sistema  $\beta$ -adrenérgico-adenilato ciclasa se encuentra implicado en la regulación de todos ellos. El músculo cardíaco, hígado y tejido adiposo forman una unidad de interrelación del metabolismo energético en cuya integración, para proporcionar una respuesta adaptativa coordinada al ejercicio físico, desempeña un papel destacado el cAMP. Sin embargo, hasta el momento, el estudio de los mecanismos adaptativos al esfuerzo físico se ha centrado fundamentalmente en los aspectos metabólicos y fisiológicos prestando menos atención a los mecanismos de transducción de señales a través de membrana, que en última instancia constituyen la base de su regulación.

## 1.8.1 Corazón

### 1.8.1.1 Componentes del sistema $\beta$ -adrenérgico-adenilato ciclasa cardíaco y funciones que regulan

El sistema nervioso y diferentes hormonas ejercen un rápido y efectivo control tanto de la frecuencia como de la intensidad de la contracción cardíaca en mamíferos. Este control, que se ejerce mayoritariamente a través del sistema  $\beta$ -adrenérgico-adenilato ciclasa (Evans, 1986), permite al organismo regular el flujo circulatorio en diferentes situaciones fisiológicas, ya sea en reposo o durante el ejercicio físico, y en situaciones patológicas.

Desde hace varias décadas se sabe que uno de los factores más importantes que determina la capacidad física es el consumo máximo de oxígeno ( $VO_2$  max). Este parámetro está limitado, asimismo, por la capacidad del sistema cardiovascular para transportar el oxígeno desde los pulmones hasta los músculos cardíaco y esquelético (Blomqvist y Saltin, 1983). Con la adaptación al ejercicio físico se produce un aumento en la capacidad de este sistema debido a que aumenta el volumen de eyección a la vez que disminuye ligeramente el ritmo cardíaco, lo que se traduce en que los individuos entrenados tienen un mayor volumen cardíaco que los individuos sedentarios (Svedenhag, 1985). Y en estos mecanismos adaptativos observados a nivel fisiológico en humanos (Huston et al., 1985) y en animales de experimentación (Ordway et al., 1982) parece tener un papel muy importante el sistema de adenilato ciclasa objeto de estudio en el presente trabajo.

Durante el ejercicio físico, la noradrenalina liberada por los terminales nerviosos cardíacos, como consecuencia del aumento en la actividad del sistema nervioso simpático, provoca un incremento en la respuesta cronotrópica e inotrópica del corazón (Homcy et al., 1991). Por otra parte, aunque durante el ejercicio físico aumentan los niveles de catecolaminas liberados por la médula adrenal al plasma, su papel en el control de la funcionalidad cardíaca parece ser menos importante que el de las catecolaminas del sistema nervioso simpático.

Las catecolaminas ejercen estos efectos a través de los receptores adrenérgicos. En corazón de rata aparecen los dos tipos principales de receptores  $\beta$ -adrenérgicos ( $\beta_1$  y  $\beta_2$ ), que son los encargados de mediar los efectos cronotrópicos e inotrópicos, principalmente a través de los  $\beta_1$  (Brodde y Michel, 1992 y Arnold et al., 1993). Si bien parece que el corazón humano solamente contiene una pequeña fracción de "spare receptors" de tipo  $\beta$ -adrenérgico (Brodde et al., 1992) en otras especies, como ocurre en rata o gato, el número de estos "spare receptors" es mucho mayor (Brodde, 1991).

En miocardio también existen receptores  $\alpha$ -adrenérgicos y de entre los distintos tipos los  $\alpha_1$  son los mayoritarios, si no los únicos, en todas las especies de mamíferos estudiadas (Fleming et al., 1992). Los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos están implicados en la respuesta inotrópica cardíaca (Brodde y Michel, 1992 y Fleming et al., 1992), y estos efectos, en corazón

de ratas adultas, parecen mediados fundamentalmente por los del subtipo  $\alpha_{1B}$  (Endoh et al., 1992) que están acoplados a través de la proteína  $G_q$  a la vía de los fosfoinosítidos.

Junto a los receptores adrenérgicos, en corazón de rata también aparecen otros sistemas receptores, positivamente acoplados a adenilato ciclasa, que producen un aumento en los niveles de cAMP cardíacos y por tanto en la respuesta cronotrópica e inotrópica cardíaca; no obstante, su papel parece ser secundario con respecto al de los receptores adrenérgicos. Entre ellos se encuentran los receptores de glucagón y los de histamina (Brodde et al., 1992).

En el miocardio de mamíferos los terminales nerviosos parasimpáticos provocan, sobre la respuesta contractil cardíaca, un efecto contrario al que se ha descrito para el sistema nervioso simpático (Stadel y Lefkowitz, 1991 y Harden, 1989). Estos efectos son mediados por receptores muscarínicos colinérgicos, que están negativamente acoplados a adenilato ciclasa y que estimulan la funcionalidad de fosfodiesterasas de cAMP. De este modo la acetilcolina, neurotransmisor del sistema nervioso parasimpático, ejerce un efecto protector sobre el corazón frente a la estimulación excesiva del sistema nervioso simpático (Nieto et al., 1993). Junto a los receptores muscarínicos existen otros que también ejercen un control negativo de la actividad de adenilato ciclasa de miocardio, entre ellos los receptores  $A_1$  de adenosina (Hershberger et al., 1991 y Liang, 1992) y los receptores de prostaglandina  $E_2$  (Lopaschuck et al., 1989 y Lerner et al., 1992).

En cuanto a las proteínas  $G_s$  y  $G_i$  encargadas de mediar los efectos estimuladores e inhibidores respectivamente de la actividad de adenilato ciclasa, promovidos por la unión de los agonistas a los receptores específicos enumerados anteriormente, en corazón de rata se ha descrito la existencia de dos formas mayoritarias de  $\alpha$ , que migran en geles de poliacrilamida-SDS con masas moleculares de 41-42 KDa y 53-54 KDa (Neer y Clapham, 1992). También se ha descrito la presencia en miocardio de mamíferos de las tres formas conocidas de  $\alpha_i$ , si bien la forma  $\alpha_{i2}$  es la mayoritaria pues sus niveles son aproximadamente iguales a la suma de los niveles de  $\alpha_{i1}$  y  $\alpha_{i3}$  (Foster et al., 1990).

De los ocho tipos de adenilato ciclasa, descritos hasta el momento, en corazón de rata los mayoritarios son el VI y el VII (Krupinski et al., 1992).

El cAMP, producto de la actividad enzimática de la adenilato ciclasa, activa la PKA, y ésta fosforila diferentes proteínas en el miocardio para desencadenar la respuesta fisiológica (Figura 19). Entre otras, las acciones que produce esta enzima son las que a continuación se mencionan. Fosforila canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje en el sarcolema estimulando el flujo de entrada de  $Ca^{2+}$  al citoplasma (Yatani y Brown, 1989); efecto que se refuerza por el hecho de que la proteína  $G_i$  estimulada vía receptor puede activar directamente los canales de  $Ca^{2+}$  y la entrada de este ión desde el medio extracelular al citoplasma (Yatani y Brown, 1989). PKA también fosforila el fosfolambano, que regula la ATPasa dependiente de  $Ca^{2+}$  en la membrana de retículo sarcoplásmico, lo que permite una rápida recaptura de  $Ca^{2+}$  por parte

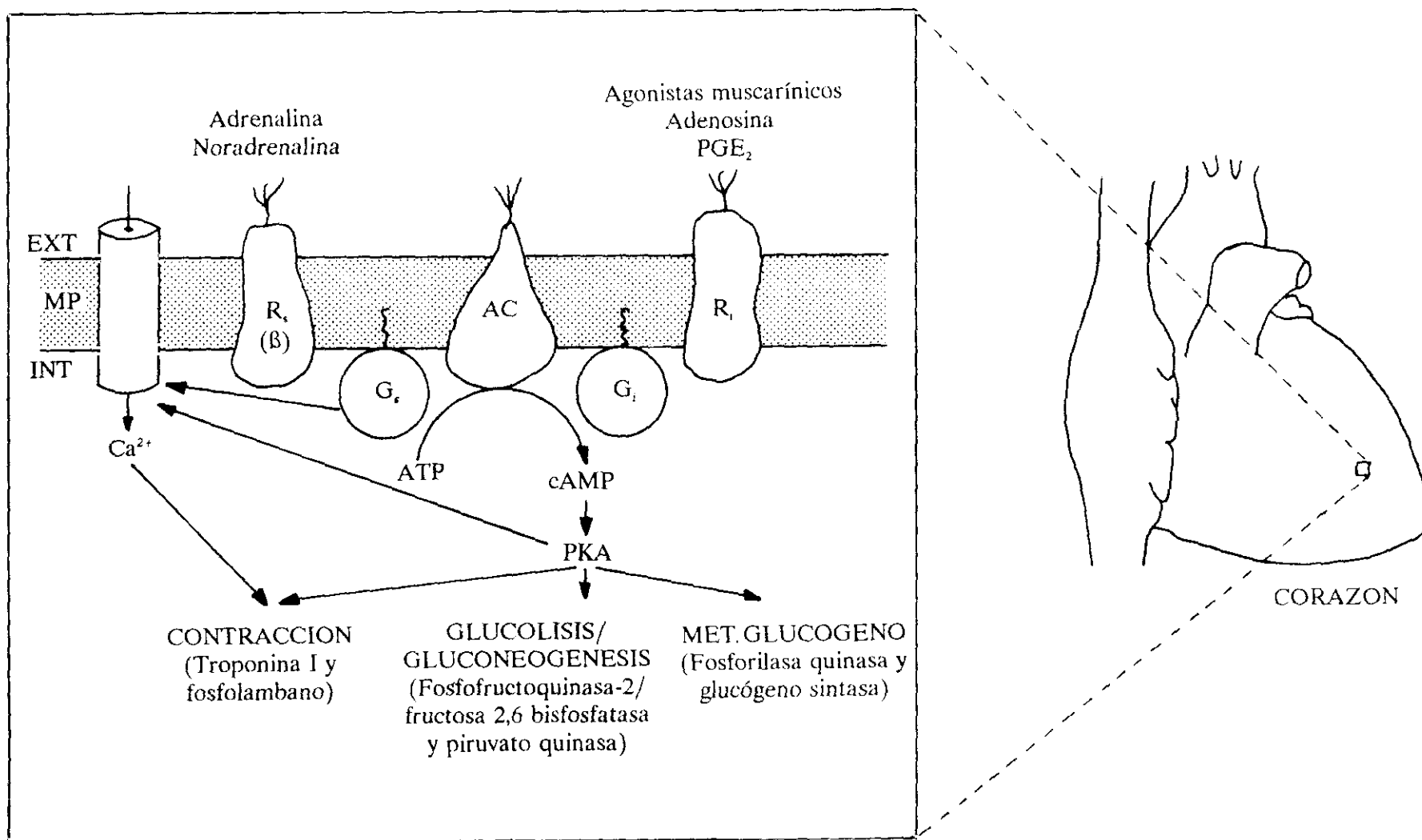


Figura 19.

Principales funciones que controla el sistema de cAMP en corazón. Entre paréntesis se relacionan las proteínas que fosforila la proteína quinasa A para ejercer este control. (β) indica que, entre los receptores estimuladores acoplados a adenilato ciclasa en este órgano, son los β-adrenérgicos a los que se ha prestado una atención especial en el presente estudio. EXT, medio extracelular; INT, medio intracelular; MP, membrana plasmática; R<sub>s</sub>, receptor estimulador; R<sub>i</sub>, receptor inhibidor; AC, adenilato ciclasa y PKA, proteína quinasa A.

de este orgánulo subcelular (*Lindermann et al., 1983*). La fosforilación de la Troponina I, un componente de las proteínas contráctiles, disminuye la afinidad de la troponina C por  $\text{Ca}^{2+}$  (*Schaub y Kunz, 1986*) lo que aumenta el nivel de relajación (*Evans, 1986*). Por otra parte, la fosforilación de las enzimas fosforilasa quinasa y glucógeno sintasa provoca su activación e inactivación, respectivamente, y permite la movilización de las reservas de glucógeno cardíaco (*Fleming et al., 1992*). Además, PKA también fosforila la piruvato quinasa y la fosfofructoquinasa-2 ejerciendo un control negativo de la glucólisis y positivo de la gluconeogénesis, respectivamente.

#### 1.8.1.2. Estado actual de conocimiento sobre la adaptación del sistema $\beta$ -adrenérgico-adenilato ciclasa cardíaco al ejercicio físico

El sistema  $\beta$ -adrenérgico-adenilato ciclasa, como se ha descrito en el apartado anterior, está directamente implicado en el control de la función contractil y del metabolismo cardíaco. Por otra parte, también se han expuesto someramente las respuestas adaptativas que genera la práctica deportiva intensa y regular en el corazón a nivel fisiológico y que afectan, entre otras, a la respuesta inotrópica y cronotrópica del corazón. Todo ello parece indicar que el sistema  $\beta$ -adrenérgico-adenilato ciclasa de corazón puede estar afectado como consecuencia del proceso adaptativo al ejercicio físico en el sentido que permitiese explicar los resultados de los estudios fisiológicos.

A pesar de que existen en la bibliografía varias publicaciones en las que se ha estudiado la adaptación del sistema  $\beta$ -adrenérgico-adenilato ciclasa cardíaco al ejercicio físico de resistencia intenso y regular, los resultados obtenidos por distintos autores son en muchos casos contradictorios. Además, en ninguno de ellos se ha acometido un estudio sistemático de la funcionalidad y niveles de los componentes del sistema como se ha abordado en el trabajo cuyos resultados se presentan en esta memoria.

En cuanto a la densidad de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, son varios los autores que no han encontrado diferencias entre los animales entrenados y sedentarios (*Williams, 1980; Moore et al., 1982; Williams et al., 1984b; Hammond et al., 1987; Scarpace et al., 1992 y Böhm et al., 1993*), mientras que otros han observado un descenso significativo en el número de receptores  $\beta$ -adrenérgicos de miocardio de animales que han seguido un protocolo de entrenamiento de resistencia (*Sylvestre-Gervais et al., 1982; Hammond et al., 1987; Werle et al., 1989 y Plourde et al., 1991*). Todos ellos coinciden, sin embargo, en describir la ausencia de variaciones en la constante de disociación de estos receptores por antagonistas.

En la mayoría de los estudios publicados no se han observado variaciones significativas en la actividad basal de adenilato ciclasa, determinada en presencia de una concentración saturante de  $\text{Mg}^{2+}$  (*Wyatt et al., 1978; Moore et al., 1982 y Plourde et al., 1991*), mientras que

*Döhm et al.*, (1976) si han encontrado un descenso significativo en la actividad basal de la enzima. Además, *Döhm et al.*, (1976); *Wyatt et al.*, (1978) y *Plourde et al.*, (1991) no se han detectado diferencias significativas en la actividad de adenilato ciclasa estimulada por fluoruro, que actúa sobre el componente regulador estimulador del sistema.

Los resultados obtenidos en diferentes trabajos en cuanto a la activación de adenilato ciclasa por agonistas  $\beta$ -adrenérgicos son controvertidos, pues *Moore et al.*, (1982) no han observado variación alguna en los animales entrenados, *Döhm et al.*, (1976) han encontrado un descenso en la activación máxima de la enzima y *Wyatt et al.*, (1978) y *Böhm et al.*, (1993) han detectado un incremento en la actividad enzimática. En ningún trabajo se ha estudiado si los mecanismos adaptativos al ejercicio físico afectan también a las vías de control negativo de adenilato ciclasa, si bien *Hammond et al.*, (1987) y *Böhm et al.*, (1993) no han encontrado variaciones en la densidad de receptores muscarínicos en miocardio de animales entrenados.

Hay sólo dos estudios publicados en los que se ha determinado la posible variación de los niveles de las proteínas  $G_s$  y  $G_i$  en membranas de miocardio de animales entrenados. *Hammond et al.*, (1988) han determinado por ELISA un aumento en los niveles de  $\alpha_s$ , medidos, mientras que *Böhm et al.*, (1993) han descrito un descenso en los niveles de  $\alpha_s$  en ventrículo de ratas envejecidas entrenadas.

## 1.8.2 Hígado

### 1.8.2.1 Componentes del sistema $\beta$ -adrenérgico-adenilato ciclasa hepático y funciones que regulan

El hígado ocupa una posición central en el metabolismo energético del organismo. Durante la fase de absorción, posterior a la ingesta de una comida rica en carbohidratos, se encarga de retirar del torrente circulatorio el exceso de glucosa, y durante el periodo postabsortivo proporciona la glucosa que demandan el resto de los órganos. La glucosa retirada del torrente circulatorio se puede incorporar en la glucogenogénesis, glucolisis y lipogénesis y la glucosa liberada procede de la glucogenolisis y/o gluconeogénesis. Son las células del parenquima hepático las encargadas de catalizar todas estas rutas metabólicas que fundamentalmente están sujetas al control de diferentes hormonas y de la inervación hepática, aunque también parece que pueden intervenir en su regulación las interacciones con células hepáticas no parenquimáticas y la matriz extracelular (*Gardemann et al.*, 1992). A parte de esta función, de reservorio de glucosa del organismo, el hígado también tiene un papel central como centro de defensa del organismo (por ejemplo, metabolismo de xenobióticos), centro de control del sistema hormonal (síntesis y degradación de hormonas) y reservorio de sangre (*Gardemann et al.*, 1992).

Si bien durante las etapas iniciales del ejercicio, el glucógeno muscular es la principal fuente de energía que emplean éstos para su contracción, a medida que aumenta la duración del esfuerzo físico el hígado es el encargado de satisfacer la creciente demanda de glucosa por parte de los músculos. El aumento de la liberación de glucosa por el hígado se debe a la estimulación, con el ejercicio, de la glucogenolisis y gluconeogénesis. La contribución relativa de estas dos rutas al mantenimiento de la euglicemia plasmática está determinada por la duración e intensidad del ejercicio, y mientras que la primera es más importante a tiempos cortos de ejercicio, el papel de la gluconeogénesis será progresivamente mayor a medida que el ejercicio físico se prolongue y las reservas de glucógeno hepático se vayan consumiendo (*Winder, 1988* y *Wasserman y Cherrington, 1991*). El AMP cíclico, y por tanto el sistema de adenilato ciclasa es el principal responsable del control de estas rutas metabólicas, en respuesta al aumento de los niveles de catecolaminas y glucagón circulantes en plasma y de actividad simpática hepática que se produce durante el ejercicio físico.

El aumento en los niveles de glucagón que se produce durante el ejercicio físico es el principal responsable de la estimulación de la glucogenolisis y gluconeogénesis, mientras que las catecolaminas plasmáticas sólo parece que sean importantes en la regulación de la liberación de glucosa en ejercicios muy prolongados en el tiempo, cuando los niveles que alcanzan son sensiblemente más altos (*Mc Kelvie et al., 1991*). Por otra parte, el sistema nervioso simpático controlaría las rutas metabólicas que conducen a la liberación de glucosa hepática directamente a través de sus terminales en el hígado, e indirectamente al estimular la liberación de glucagón por el páncreas y de catecolaminas por la médula adrenal (*Gardemann et al., 1992*). Pero según *Wasserman y Cherrington, (1991)* no existe ninguna evidencia experimental de que la noradrenalina liberada por los terminales nerviosos simpáticos hepáticos sea esencial para aumentar la producción de glucosa durante el ejercicio, a pesar de que se ha demostrado que aumenta la actividad de estos terminales en el hígado de ratas entrenadas (*Winder et al., 1983a*). El hígado también está innervado por el sistema nervioso parasimpático, sin embargo no se ha estudiado el papel que tienen sus terminales nerviosos sobre el metabolismo hepático durante la realización de un esfuerzo físico (*Wasserman y Cherrington, 1991*).

El glucagón ejerce sus efectos a través de un receptor específico, que está positivamente acoplado a adenilato ciclasa. El receptor de glucagón de hígado de rata, que ha sido clonado y expresado recientemente por *Jelinek et al., (1993)*, también está acoplado a la vía de los fosfoinosítidos estimulando la degradación del glucógeno hepático (*Jelinek et al., 1993*), por lo tanto es un receptor que a través de proteínas G diferentes ejerce el mismo efecto sobre el metabolismo hepático. Las catecolaminas actúan en hígado a través de receptores  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ -adrenérgicos (*Mc Kelvie et al., 1991*). Mientras que los receptores  $\beta$ -adrenérgicos y los  $\alpha_2$ -adrenérgicos están acoplados a ciclasa, los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos están acoplados a la vía de los fosfoinosítidos, como se señala en la Figura 12.

Además de los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, en membrana plasmática de hepatocitos también existen receptores de angiotensina II acoplados negativamente a adenilato ciclasa (*Jard et al., 1981* y *Pobiner et al., 1992*).

La unión de agonistas específicos a estos receptores estimuladores ( $\beta$ -adrenérgicos y de glucagón) e inhibidores ( $\alpha_2$ -adrenérgicos y de angiotensina II) provoca el aumento o disminución, respectivamente, en los niveles de cAMP que produce la subunidad catalítica de adenilato ciclasa, efecto que está mediado por las proteínas G<sub>s</sub> y G<sub>i</sub>. En hígado de rata se ha descrito la existencia de las formas grande y pequeña de G<sub>s</sub> (*Begin-Heick y Mc Farlane Anderson, 1992*), y de dos de las tres isoformas de  $\alpha_i$ ;  $\alpha_{i2}$  y  $\alpha_{i3}$ , ambas implicadas en la inhibición de adenilato ciclasa, al acoplar a ella los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos (*Simonds et al., 1989*) y de angiotensina II (*Pobiner et al., 1992*) respectivamente.

Los tipos VI y VII de adenilato ciclasa, de los ocho existentes, son los que aparecen en mayor proporción en hígado de rata, al igual que sucede en el corazón de estos animales (*Krupinski et al., 1992*).

En la Figura 20 se refleja cómo la PKA estimula la secuencia glucogenolítica al modificar covalentemente la fosforilasa quinasa y la glucógeno sintasa. Por otra parte, la proteína quinasa A fosforila la piruvato quinasa, inactivándola e inhibiendo así la glucólisis (*Hers y Hue, 1983*) y fosforila la fosfofructoquinasa-2 dando lugar a la actividad de fructosa 2,6 bisfosfatasa, que permite canalizar el flujo metabólico hacia la gluconeogénesis (*Winder, 1988*). También fosforila la acetil-CoA carboxilasa ejerciendo un control negativo de las rutas de síntesis de los ácidos grasos.

En hígado de ratas entrenadas a diferentes velocidades y durante distintos períodos de tiempo *Winder et al., (1983b)* han encontrado una relación lineal entre la concentración de cAMP y los niveles de glucogenolisis hepática. Además, en ejercicios prolongados, cuando caen los niveles de glucógeno hepático, *Winder, (1988)* ha observado un incremento aún mayor en la concentración intracelular de cAMP que parece que es necesario para inhibir la glucólisis y estimular la gluconeogénesis. Datos que son consistentes con la idea de que durante el ejercicio es la actividad de adenilato ciclasa la que fundamentalmente controla el metabolismo hepático de hidratos de carbono.

#### 1.8.2.2 Estado actual de conocimiento sobre la adaptación del sistema $\beta$ -adrenérgico-adenilato ciclasa de hígado al ejercicio físico

En el apartado anterior ya se ha ilustrado ampliamente el papel tan importante que desempeña el sistema  $\beta$ -adrenérgico-adenilato ciclasa en el control del metabolismo hepático durante el ejercicio físico, lo que permite pensar que este sistema podría estar sujeto a algún mecanismo adaptativo como consecuencia de la práctica deportiva intensa y regular. A pesar

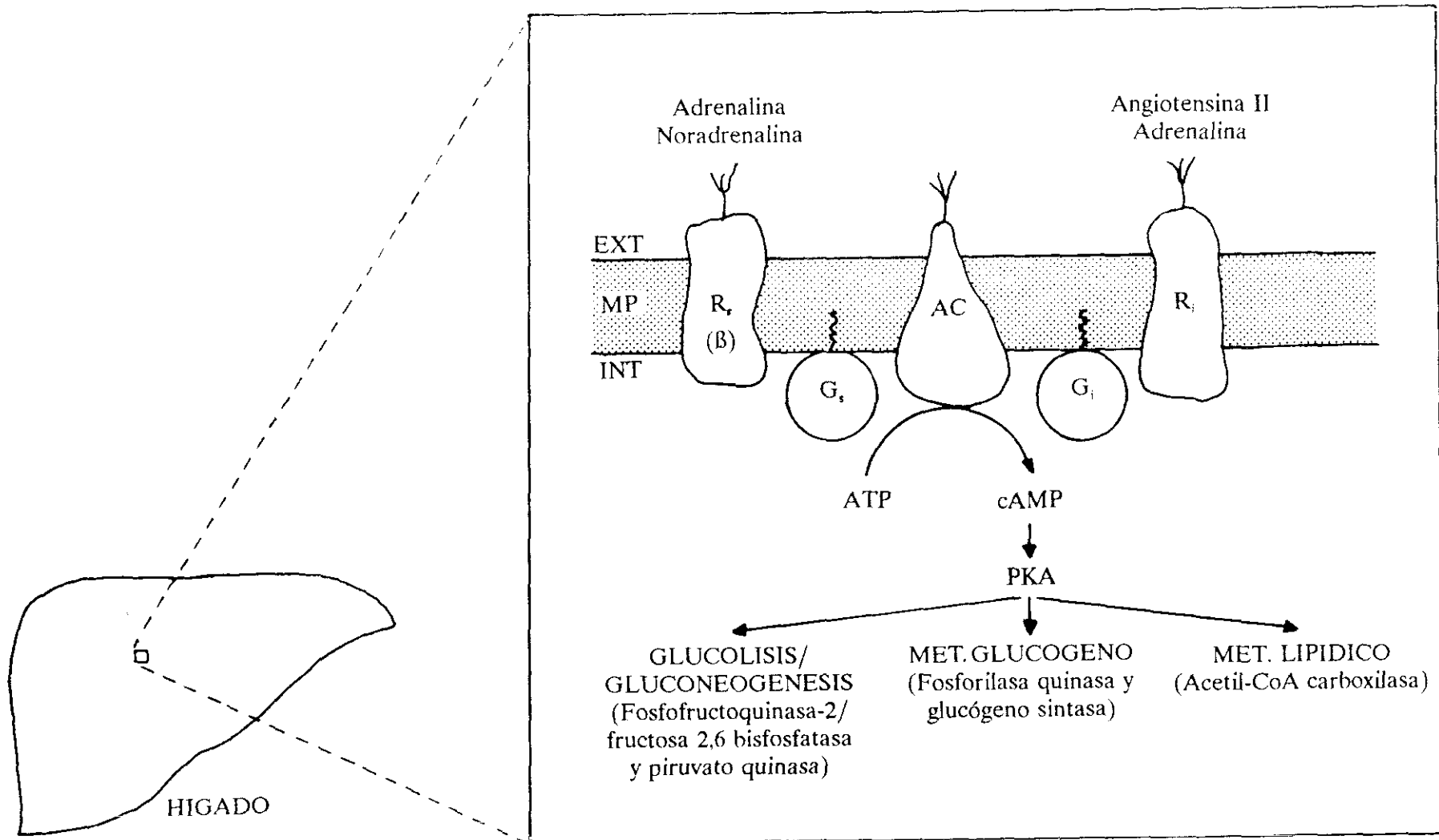


Figura 20.

Principales funciones que controla el sistema de cAMP en hígado. Entre paréntesis se relacionan las enzimas que fosforila la proteína quinasa A para ejercer este control. (B) indica que, entre los receptores estimuladores acoplados a adenilato ciclasa en este órgano, son los  $\beta$ -adrenérgicos a los que se ha prestado una atención especial en el presente estudio. EXT, medio extracelular; INT, medio intracelular; MP, membrana plasmática;  $R_s$ , receptor estimulador;  $R_i$ , receptor inhibitor; AC, adenilato ciclasa y PKA, proteína quinasa A.

de ello, el grado de conocimiento que se tienen sobre el funcionamiento y regulación del mismo, es prácticamente nulo pues sólo hay dos estudios previos en la bibliografía, publicados por *Döhm et al., (1976)* y *Yakovlev, (1974)*.

En estos dos trabajos se ha estudiado la funcionalidad de la vía estimuladora del sistema en ratas entrenadas, sin embargo, las conclusiones a las que llegan sus autores no son totalmente coincidentes. *Döhm et al., (1976)* no observan variaciones ni en la actividad basal de adenilato ciclasa ni en la estimulada por fluoruro o adrenalina, mientras que *Yakovlev, (1974)* describe un aumento en la actividad de la enzima estimulada por catecolaminas sin que se modifique la actividad basal o en presencia de fluoruro.

No hay publicado ningún trabajo en el que se haya estudiado la posible variación en los niveles de proteínas  $G_s$  y  $G_i$ , en la densidad y/o afinidad de los receptores acoplados o en la funcionalidad de las vías de control negativo del sistema como consecuencia de la adaptación al ejercicio físico de resistencia intenso y regular.

### 1.8.3 Tejido adiposo

#### 1.8.3.1 Componentes del sistema $\beta$ -adrenérgico-adenilato ciclasa de tejido adiposo y funciones que regulan

El tejido adiposo blanco, como ya se ha señalado en el apartado 1.7.1, constituye el mayor almacén de energía metabólica, en forma de triglicéridos, tanto en humanos como en el resto de los animales superiores. La movilización de estas reservas lipídicas tiene un papel muy importante en la regulación del balance energético de los seres vivos tanto en una situación de reposo como durante el ejercicio físico, y está sujeta a un preciso control por diferentes factores, tanto hormonales como nerviosos. La hidrólisis de los triglicéridos almacenados, proceso conocido como lipólisis, da lugar a la liberación de ácidos grasos y glicerol desde los adipocitos hacia el torrente circulatorio. Los ácidos grasos libres constituyen el principal combustible metabólico empleado por los diferentes músculos estudiados durante el ejercicio físico prolongado, y el glicerol se emplea por el hígado como precursor gluconeogénico (*Arner et al., 1990* y *Richelsen, 1991*).

Aunque los niveles de catecolaminas liberados al plasma por la médula adrenal aumentan durante la realización del ejercicio, parece que mayoritariamente es la liberación de noradrenalina por los terminales nerviosos simpáticos, cuya actividad también aumenta con el esfuerzo físico, el proceso que estimula la lipólisis y por tanto la liberación de ácidos grasos (*Shepherd y Bah, 1988*; *Wahrenberg et al., 1992*). Si bien la lipólisis parece ser la función más importante que regulan las catecolaminas en tejido adiposo, éstas también controlan otros procesos metabólicos, como son la síntesis de lípidos y el transporte y metabolismo de glucosa (*Arner, 1992* y *Lafontan et al., 1992*).

Los receptores  $\beta$ -adrenérgicos ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$ ) estimulan y los  $\alpha_2$  inhiben la lipólisis vía adenilato ciclasa. Mientras que los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos no ejercen ningún control sobre la lipólisis, mediante estudios "in situ" empleando la técnica de la microdiálisis *Arner et al.*, (1990) han demostrado que los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos modulan la lipólisis en humanos en reposo mientras que los receptores  $\beta$ -adrenérgicos la regulan durante el ejercicio físico. Existen diferencias considerables en la expresión de los distintos subtipos de receptores adrenérgicos en tejido adiposo blanco entre especies. En cuanto a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos,  $\beta_1$  parece que está presente en todas las especies,  $\beta_2$  está presente en humanos (*Arner et al.*, 1982) pero no en ratas (*Bahouth y Malbon*, 1988) y por contra  $\beta_3$  aparece en tejido adiposo de ratas (*Hollenga y Zaagsma*, 1989) pero no en el de humanos (*Arner*, 1992); sin embargo, en adipocitos de hamsters aparecen los tres subtipos de receptores  $\beta$  (*Zaagsma y Nahorski*, 1990). El receptor  $\beta_3$ -adrenérgico de rata ha sido clonado y expresado recientemente por *Granneman et al.*, (1992). Por lo que se refiere a los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, éstos parecen tener un papel mucho más importante sobre la lipólisis en humanos que en otras especies como la rata donde sus niveles son mucho más bajos.

Con relación a la densidad de los receptores adrenérgicos de tejido adiposo parece clara la existencia de "spare receptors" puesto que tan sólo es necesaria la ocupación por agonista del 50% de los sitios para producir la respuesta máxima (*Arner*, 1992).

En tejido adiposo de rata, además de los receptores adrenérgicos, existen otros sistemas receptores estimuladores también acoplados a adenilato ciclasa y susceptibles de estimular la lipólisis como son los receptores de ACTH, TSH y glucagón; sin embargo parece que su papel es menos importante que el de las catecolaminas en el control de la lipólisis (*Richelsen*, 1991).

En cuanto a los receptores inhibidores, en tejido adiposo de rata, se ha demostrado que tanto los  $A_1$  de adenosina (*Kather et al.*, 1985 y *Green y Johnson*, 1991) como los de prostaglandina  $E_2$  (*Richelsen*, 1987 y 1988), acoplados negativamente a ciclasa, son los atenuadores más importantes de la lipólisis, mientras que en adipocitos de humanos, como se ha mencionado antes, son los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos los máximos responsables del control negativo de esta ruta metabólica.

Desde un punto de vista fisiológico la insulina parece ser, en todos los casos, el agente antilipolítico más importante (*Richelsen*, 1991) a pesar de que su efecto máximo es menor que el de otros, como análogos de adenosina o prostaglandina  $E_2$  (*Richelsen y Pedersen*, 1985). Aunque no se ha establecido claramente el mecanismo por el que la insulina ejerce sus efectos, hay diferentes estudios que indican la existencia de procesos dependientes e independientes de cAMP implicados (*Häring*, 1991). Entre los mecanismos dependientes se encuentra la activación por insulina de fosfodiesterasas de cAMP en tejido adiposo (*Makino et al.*, 1992).

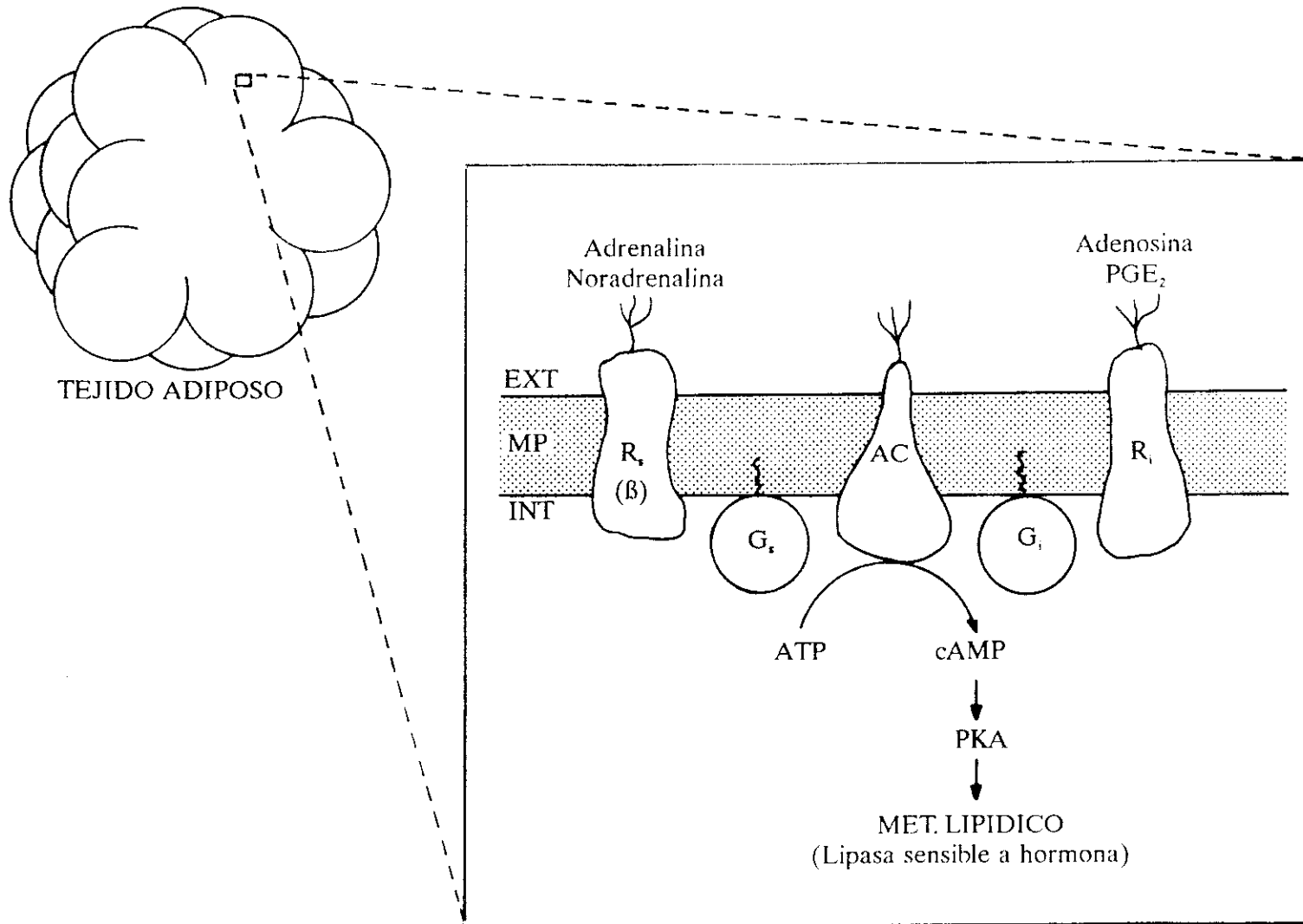


Figura 21.

Principal función que controla el sistema de cAMP en tejido adiposo. Entre paréntesis se señala la enzima que fosforila la proteína quinasa A para ejercer este control. (β) indica que, entre los receptores estimuladores acoplados a adenilato ciclasa en este tejido, son los β-adrenérgicos a los que se ha prestado una atención especial en el presente estudio. EXT, medio extracelular; INT, medio intracelular; MP, membrana plasmática; R<sub>e</sub>, receptor estimulador; R<sub>i</sub>, receptor inhibidor; AC, adenilato ciclasa y PKA, proteína quinasa A.

En cuanto a las proteínas G, en tejido adiposo de rata se ha descrito la existencia de la forma grande y pequeña de  $\alpha$ , que son las dos especies mayoritarias que migran en geles de poliacrilamida-SDS (Milligan y Saggerson, 1990), asimismo se ha descrito la existencia de las tres isoformas conocidas de  $\alpha$ , (Green et al., 1990).

La PKA cataliza la fosforilación de la lipasa sensible a hormona que de este modo pasa a su forma activa e inicia la hidrólisis de los triglicéridos almacenados en el tejido adiposo (Figura 21).

El determinante de la actividad lipolítica es, por tanto, el nivel intracelular de cAMP, y éste se regula por el balance entre la síntesis (por la actividad adenilato ciclasa) y la degradación (por las fosfodiesterasas de cAMP). Sin embargo, en adipocitos aislados la relación entre niveles intracelulares de cAMP y lipólisis no son lineales (Stralfors y Belfrage, 1984) puesto que los niveles máximos de lipólisis se consiguen con un aumento de dos veces en la concentración de cAMP y un incremento posterior de cien veces en la misma no produce efectos apreciables sobre la lipólisis. No obstante, Honnor et al., (1985) han demostrado que existe una correlación lineal entre los niveles de actividad lipolítica y los de cAMP unido a proteína quinasa A. Además, estos mismos autores han observado que el efecto de todos los agentes lipolíticos y antilipolíticos convencionales, excepto la insulina, se puede explicar por su acción sobre la PKA.

#### 1.8.3.2 Estado actual de conocimiento sobre la adaptación del sistema $\beta$ -adrenérgico-adenilato ciclasa de tejido adiposo al ejercicio físico

Está claramente establecido que el ejercicio físico intenso y regular incrementa la respuesta lipolítica a catecolaminas de los adipocitos en animales de laboratorio (Askew y Hecker, 1976; Bukowiecki et al., 1980; Williams y Bishop, 1982; Sheperd et al., 1986 e Izawa et al., 1991) y en humanos entrenados (Crampes et al., 1986; Riviere et al., 1989; Wahrenberg et al., 1991 y Lönnqvist et al., 1992).

Estos resultados parecen indicar que los mecanismos adaptativos que se generan como consecuencia de la práctica deportiva regular, pueden afectar al sistema  $\beta$ -adrenérgico-adenilato ciclasa y/o a etapas posteriores del proceso de estimulación de la lipólisis, como son la proteína quinasa A, las fosfodiesterasas o la lipasa sensible a hormona.

Hasta el momento no se ha observado variación en la actividad de la proteína quinasa A (Shepherd y Bah, 1988 y Ramirez y Shepherd, 1989) ni de la lipasa sensible a hormona (Shepherd y Bah, 1988) en adipocitos de animales entrenados, con respecto a sus controles. Por otra parte, se ha demostrado que con el ejercicio físico se produce un aumento de la actividad de las fosfodiesterasas de cAMP de alta y baja Km (Kenno et al., 1986 y Sheperd y Bah, 1988), que provocarían un descenso en los niveles del nucleótido cíclico difícilmente correlacionable con el aumento de la actividad lipolítica (Izawa et al., 1991).

A la vista de estos resultados y a pesar de los estudios de *Sheperd et al.*, (1986) y *Riviere et al.*, (1989) quienes han observado que el dibutiril cAMP estimula la lipólisis en mayor proporción en animales y humanos entrenados, respectivamente, que en sus controles, parece bastante plausible la posibilidad de que los procesos adaptativos conducentes a aumentar la lipólisis en adipocitos, como consecuencia del ejercicio físico, operen mayoritariamente a nivel del sistema  $\beta$ -adrenérgico-adenilato ciclasa. Con relación a este sistema, existen escasos antecedentes en la bibliografía sobre su adaptación al ejercicio físico intenso y regular, y el grado de conocimiento alcanzado al respecto, tal y como se relata a continuación, parece escaso.

En cuanto a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, la mayoría de los estudios parecen coincidir en que no se produce variación en los niveles o densidad de estos receptores ni en animales de experimentación (*Bukowiecki et al.*, 1980; *Williams y Bishop*, 1982 y *Shepherd et al.*, 1986) ni en humanos (*Crampes et al.*, 1986 y *Wahrenberg et al.*, 1991). Sin embargo, en un trabajo publicado recientemente *Lönnqvist et al.*, (1992) han observado un aumento en los niveles de receptores  $\beta$ -adrenérgicos en adipocitos de hombres entrenados. Además existen datos contradictorios en cuanto a la proporción de estos receptores que se encuentran en el estado de alta afinidad y que dan cuenta del acoplamiento entre el receptor y  $G_s$ , pues si bien *Williams y Bishop*, (1982) atribuyen el aumento en la lipólisis, observada en animales de experimentación, al incremento en la proporción de receptores que se encuentran en el estado de alta afinidad, *Wahrenberg et al.*, (1991) no han encontrado diferencias a este nivel entre hombres y mujeres entrenados y sus respectivos controles.

Tampoco se han observado variaciones significativas ni en la actividad basal de adenilato ciclasa, ni en la actividad de la subunidad reguladora estimuladora  $G_s$  en los estudios publicados por *Yakovlev*, (1974) y *Williams y Bishop*, (1982). Pero *Izawa et al.*, (1986) han descrito un aumento en la actividad de adenilato ciclasa estimulada por concentraciones saturantes de GppNHp, sin que varíe la constante de activación de la enzima por este modulador o la actividad basal en ratas entrenadas. *Yakovlev*, (1974); *Williams y Bishop*, (1982) e *Izawa*, (1988 y 1991) han observado un aumento significativo de la actividad de adenilato ciclasa estimulada por catecolaminas en animales entrenados por diferentes procedimientos.

En la bibliografía existen diferentes publicaciones en las que se ha estudiado la posible adaptación al ejercicio físico de las vías de control negativo de la actividad de adenilato ciclasa (*Williams y Bishop*, 1982; *Izawa et al.*, 1988 y *Wahrenberg et al.*, 1991), y todos ellos coinciden en que se produce un descenso en la actividad antiadrenérgica y antilipolítica de las mismas con el esfuerzo físico intenso y regular.

El conocimiento que se tienen de la posible variación de los niveles de las proteínas  $G_s$  y  $G_i$  en membranas de tejido adiposo con el ejercicio físico es muy escaso. Tan sólo existe un trabajo, publicado por *Izawa et al.*, (1988) en el que mediante ADP-ribosilación han observado un descenso en los niveles de sustrato ADP-ribosilable por toxina pertussis, sin que varíen significativamente los niveles de ADP-ribosilación catalizada por toxina cólica.

Luego en su conjunto, los trabajos publicados apuntan hacia una adaptación del tejido adiposo en el sentido de disminución de la eficacia de sus vías antilipolíticas, que puede ir o no acompañado de un aumento en la actividad de las vías estimuladoras del sistema  $\beta$ -adrenérgico-adenilato ciclasa, para producir en todo caso un aumento en los niveles de cAMP y por ende de los niveles de lipólisis.

## 1.9 OBJETIVOS

El objetivo de la presente tesis ha sido el estudio de las posibles modificaciones en el sistema de adenilato ciclasa con el ejercicio físico de resistencia, intenso y regular, en diferentes tejidos de rata, modelo animal experimental elegido. Se pretende comparar el funcionamiento de este sistema de transducción en corazón, hígado y tejido adiposo de animales entrenados con sus respectivos controles sedentarios, incidiendo a diferentes niveles:

- \* Receptor.
  - Determinación de la densidad y afinidad de receptores  $\beta$ -adrenérgicos.
- \* Efector
  - Subunidad catalítica. Determinación de la actividad enzimática atribuible a posibles variaciones en los niveles y/o funcionalidad de la subunidad catalítica de adenilato ciclasa (actividad enzimática en presencia de  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ /forskolina).
  - Proteínas G. - Funcionalidad de la proteína  $G_s$ . Evaluación de la respuesta de la subunidad catalítica de adenilato ciclasa a proteínas G (actividad enzimática en presencia de fluoruro y nucleótidos de guanina).
    - Niveles de proteínas G. Determinación de niveles de ADP-ribosilación y de las diferentes isoformas de las subunidades  $\alpha_s$ ,  $\alpha_i$  y niveles de subunidad  $\beta$  de proteínas G.
- \* Receptor/efector
  - Regulación de la actividad de adenilato ciclasa vía receptor. Determinación de la actividad enzimática en presencia de agonistas específicos de receptores estimuladores e inhibidores.

## MATERIALES Y METODOS

## 2.1 OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

### 2.1.1 Descripción de los animales y su estabulación

En este estudio se utilizan ratas Wistar macho (*Rattus norvegicus* var. *albina*) con un peso inicial de 110-120 gr, alimentadas "ad libitum" con una dieta sólida estándar (PANLAB). Las ratas permanecen estabuladas durante el período de entrenamiento en el animalario de la Facultad de Ciencias Biológicas de esta Universidad en una habitación con una temperatura constante de  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ , en condiciones de humedad controlada y con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, invertido con respecto al natural.

### 2.1.2 Programa de entrenamiento físico de los animales

El ejercicio físico consiste en la realización de una sesión de carrera por día, 6 días por semana durante 10 semanas sobre un tapiz rodante Columbus Instruments modelo 0145-004L (Columbus Instruments, Ohio) (Figura 22).

Se utilizan 40 ratas por bloque de estudio, 20 controles y 20 animales entrenados. La distribución en estos dos grupos se realiza cuidadosamente en los cinco primeros días de adaptación al ejercicio físico según el programa diseñado.

El programa de entrenamiento que se sigue es el siguiente: en la primera y segunda semana se familiariza a los animales con el funcionamiento del aparato y se aumenta progresivamente la velocidad de 15 m/min a 30 m/min y la duración del entrenamiento de 10 a 60 minutos. Desde la tercera semana hasta la décima, en que se sacrifican, las ratas corren continuamente durante 60 minutos a una velocidad de 30 m/min. En todo momento, las sesiones de carrera se efectúan sin inclinar el tapiz. Aunque el sistema de descarga eléctrica del aparato se emplea durante los primeros días para conseguir una adaptación rápida de los animales al tapiz, posteriormente se desconecta para evitar la posible influencia del estrés provocado por la descarga sobre el proceso adaptativo que se estudia. El protocolo detallado se recoge en la Tabla I.

**TABLA I. CONDICIONES DE ENTRENAMIENTO**

SEMANA	VELOCIDAD (m/min)	DURACION (min)	FRECUENCIA (días/semana)	(nº sesiones/día)
1	15-20	10-30	6	1
2	20-30	30-60	6	1
3-10	30	60	6	1

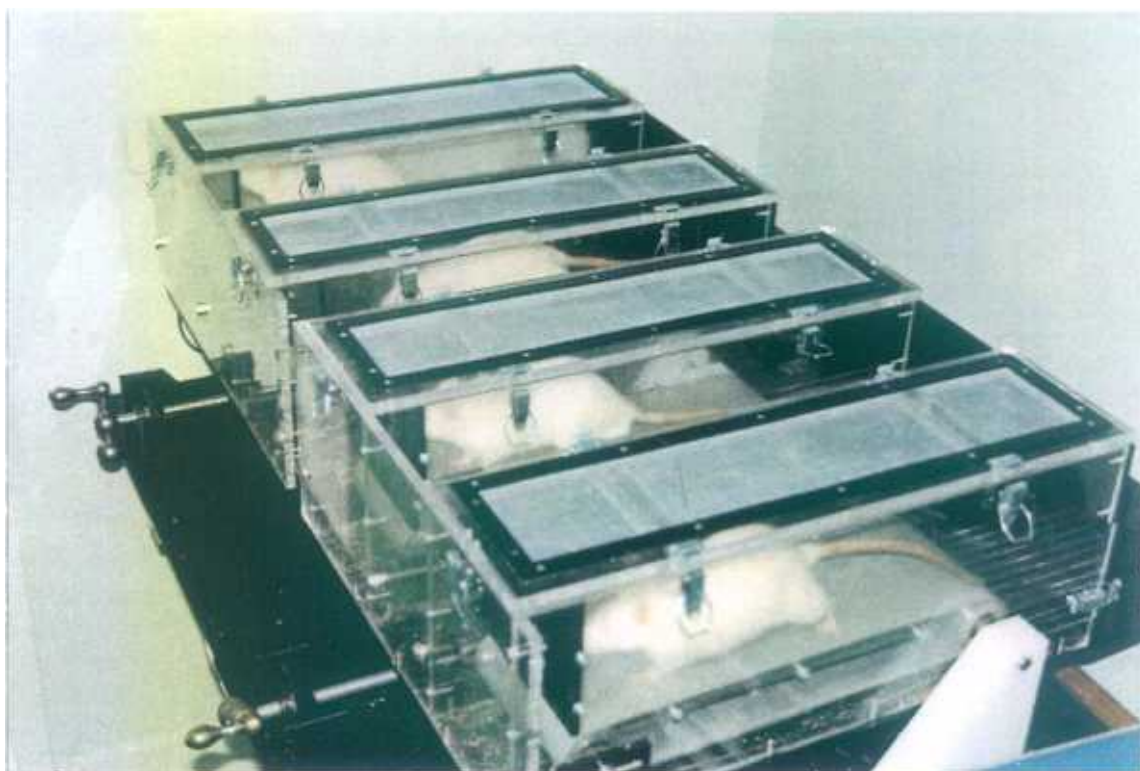


Figura 22. Imagen de los tapices rodantes y de los animales durante una sesión de entrenamiento

### 2.1.3 Obtención de las muestras biológicas

Tras el período de entrenamiento y transcurridas 24 horas desde la última sesión de ejercicio físico, los animales se pesan y se sacrifican por decapitación, y tras recoger la sangre para obtener suero, se procede a abrir rápidamente el tórax y el abdomen. La grasa epididimal y perirrenal se extrae cuidadosamente, se lava con solución salina (Na Cl al 0.9%), se congela en aire líquido y se conserva a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

El hígado se perfunde rápidamente con solución salina por la vena porta, cortándose la arteria aorta abdominal para dar salida a la sangre y a la solución salina. Una vez perfundido se extrae el órgano, se lava en solución salina, se pesa, se congela en aire líquido y se almacena a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

El corazón, tras ser extraído, se lava con solución salina, se pesa y la pared lateral del ventrículo izquierdo se secciona, congelándose en aire líquido esta última y en otro paquete el ventrículo derecho junto al septum. Posteriormente se almacenan las muestras a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

El tiempo total empleado en el proceso de obtención de los órganos del animal fue de aproximadamente 10 minutos, y todas las operaciones efectuadas desde la extracción de los mismos hasta su congelación se realizan a  $0-4^{\circ}\text{C}$ .

## 2.2 OBTENCIÓN DE LOS PREPARADOS DE MEMBRANAS

### 2.2.1 Obtención del preparado de membranas de ventrículo izquierdo

Para la obtención del preparado de membranas se descongela un fragmento de ventrículo izquierdo de cada rata y se elimina a continuación el endocardio, pericardio, tejido graso y arterias principales, según describe *Jones, (1988)*, Figura 23. Posteriormente se seca el material biológico y se pesa antes de trocearlo con tijeras. Las muestras se homogeneizan en un tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 ( $25^{\circ}\text{C}$ ), conteniendo EDTA 3 mM, PMSF 0.1 mM y  $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$  de inhibidor de tripsina de soja (tampón de muestra), con un Polytron PT-20 (Brinkman Instruments) durante 15 segundos a la mitad de su velocidad máxima.

El homogeneizado se filtra a través de 4 capas de gasa y se centrifuga a 14000 g durante 20 min. El sobrenadante se desecha y el sedimento resuspendido se centrifuga de nuevo en las mismas condiciones. El sedimento obtenido finalmente se pesa y se resuspende, por homogeneización en Potter-Elvehjem, en el mismo tampón, en una relación de 80 mg/ml. La preparación de membranas así obtenida se distribuye en alícuotas y se almacena a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

Todas las operaciones se realizan a una temperatura de 0-4°C. Las centrifugaciones se llevan a cabo en una centrífuga refrigerada Sorvall RC-5 equipada con un rotor angular SS-34. En todos los casos se obtienen simultáneamente preparados de membranas de los bloques control y ejercicio.

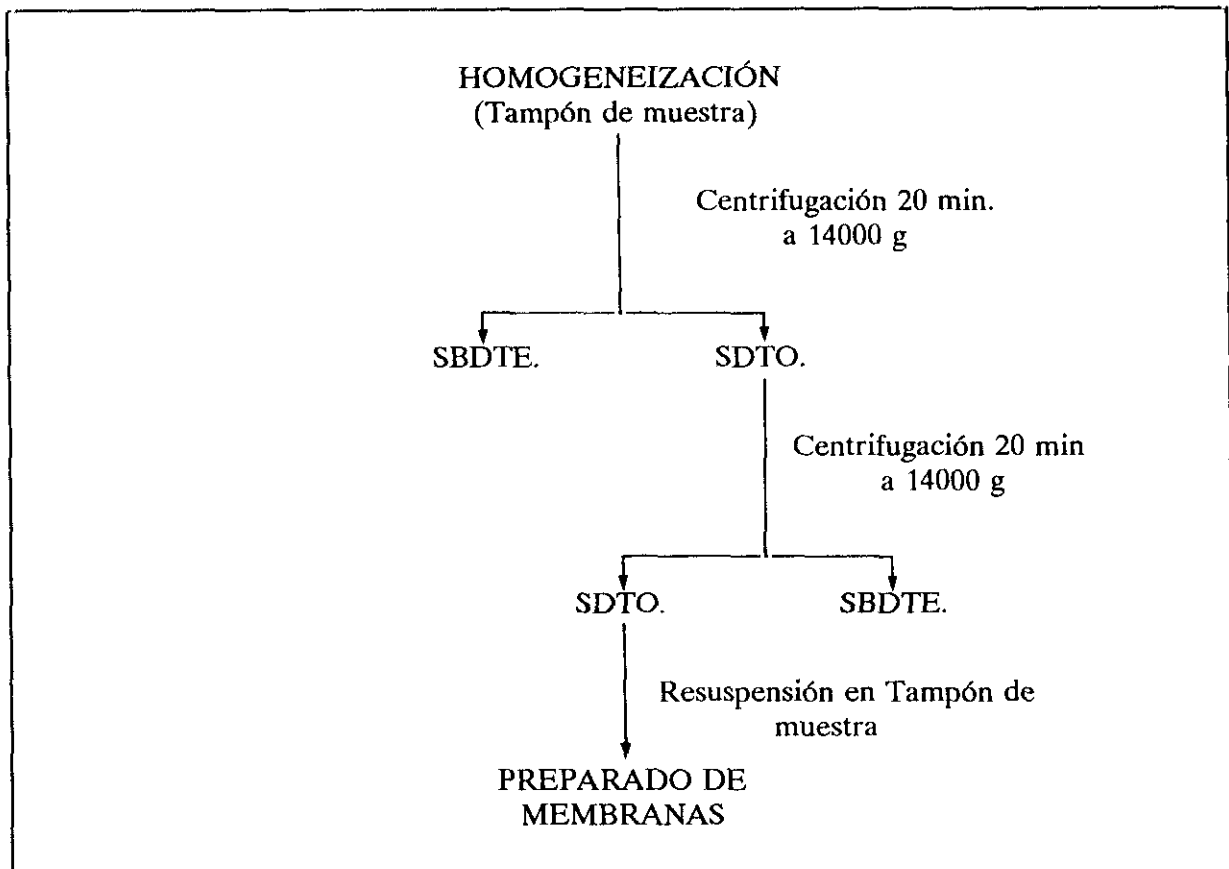


Figura 23. Obtención del preparado de membranas de ventrículo izquierdo

### 2.2.2 Obtención del preparado de membranas de hígado

Los preparados de membranas de hígado se obtienen siguiendo el procedimiento descrito por *Kelly et al.*, (1984), ligeramente modificado en nuestro laboratorio, Figura 24. Se parte de un fragmento de 0.1 gr de peso del hígado de cada animal. La muestra se descongela sumergida en tampón de muestra. Una vez descongelada se seca, se pesa, se tritura con unas tijeras y se homogeneiza en 20 ml de tampón de muestra. La homogeneización se lleva a cabo con un Potter-Elvehjem provisto de un émbolo de teflón mediante 15 emboladas a 2000 rpm.

El homogeneizado se filtra a través de dos capas de gasa hidrófila y se centrifuga a 1500 g durante 10 minutos. El sedimento se elimina y el sobrenadante se centrifuga a 20000 g durante 20 minutos. El sedimento de la segunda centrifugación se resuspende en 15 ml de tampón de muestra y se aplica a un gradiente discontinuo de sacarosa formado con 15 ml de sacarosa 1.06 M y 15 ml de sacarosa 2.02 M (preparadas en tampón de muestra), y se centrifuga a 25000 g durante 45 minutos. La banda que aparece en la interfase 0-1.06 M de sacarosa se extrae con una pipeta Pasteur y se lava dos veces con 45 ml de tampón de muestra por centrifugación a 27000 g durante 20 minutos. El sedimento obtenido se pesa y se resuspende, por homogeneización en Potter-Elvehjem, en una relación de 5  $\mu$ l de tampón de muestra por cada mg de membranas. El preparado de membranas así obtenido se distribuye en alícuotas y se almacena a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

Todas las operaciones se realizan a una temperatura de  $0-4^{\circ}\text{C}$ . Las centrifugaciones se llevan a cabo en una centrífuga refrigerada Sorvall RC-5 equipada con un rotor angular SS-34 excepto en la centrifugación en gradiente, en la que se emplea un rotor flotante HB-4.

### 2.2.3 Obtención del preparado de membranas de tejido adiposo

Se emplea el método descrito por *Belsham et al.*, (1980) ligeramente modificado en nuestro laboratorio. La grasa epididimal y perirrenal de 3 ratas se limpia en una placa petri con NaCl al 0.9%, eliminándose la vasculatura, se seca, se pesa y se tritura con tijeras antes de homogeneizar el tejido. La homogeneización se realiza en 8 ml de tampón de muestra, con un Polytron PT-20 (Brinkman Instruments) en posición 3 con un pulso de 15 segundos. El homogeneizado se centrifuga a 1000 g durante 3 minutos. El sedimento se elimina y el sobrenadante se recoge con una pipeta Pasteur despreciando la capa de grasa y células muertas que queda flotando sobre él. El sobrenadante se centrifuga a 30000 g durante 30 minutos. El sedimento obtenido se pesa y se resuspende en el mismo tampón en una relación de 125 mg/ml. El preparado de membranas obtenido se conserva a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización, (Figura 25).

Todas las operaciones se llevan a cabo a una temperatura de  $0-4^{\circ}\text{C}$ . Las centrifugaciones se realizan en una centrífuga refrigerada Beckman L2-21 provista de un rotor angular JA-17. En todos los casos se obtienen simultáneamente las membranas de los bloques control y ejercicio.

Estos preparados se han comparado con suspensiones de membranas obtenidas a partir de adipocitos previamente aislados, puesto que éste método se emplea con mucha más frecuencia. Los resultados de ésta comparación se presentan en el capítulo correspondiente de ésta memoria.

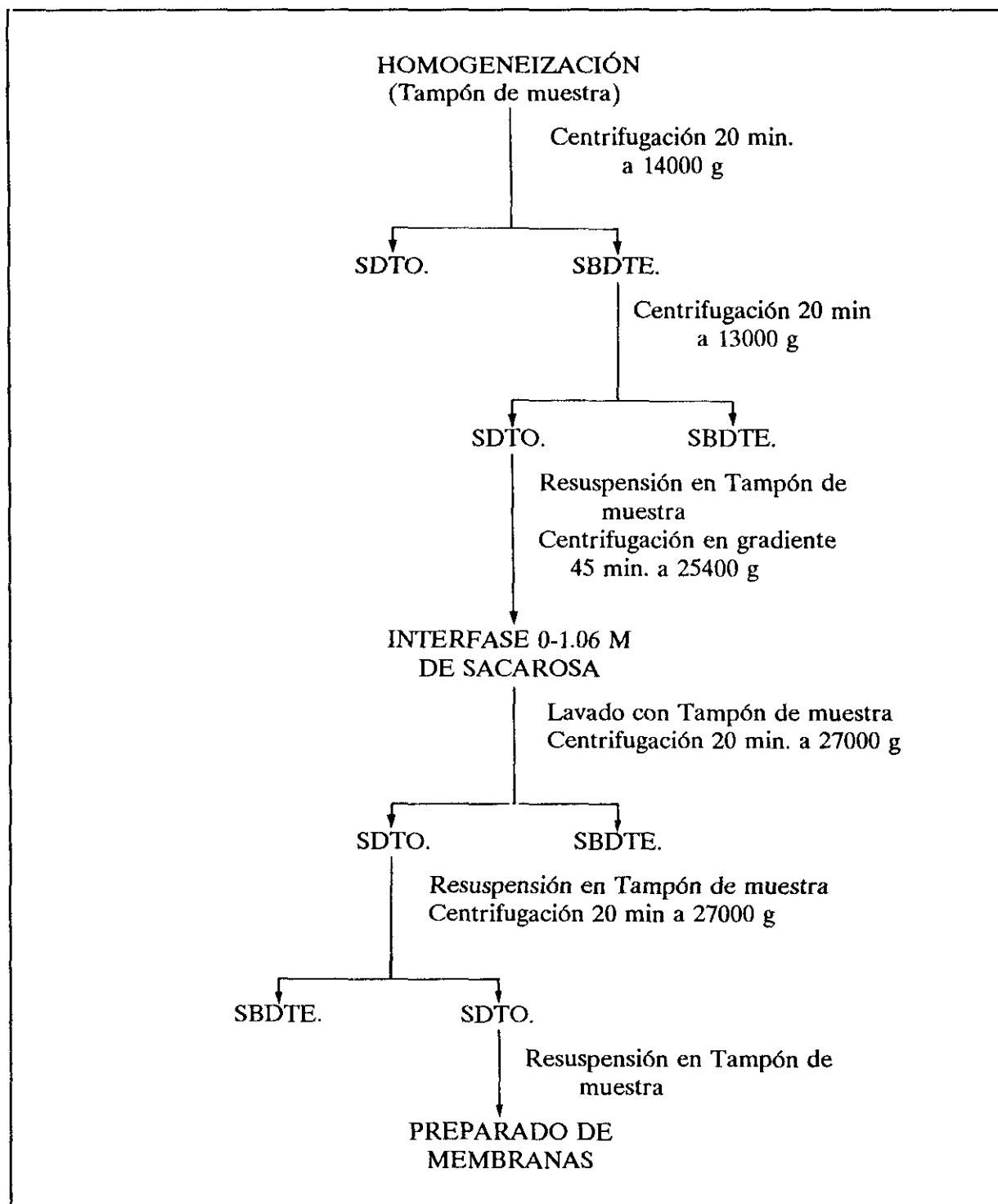


Figura 24. Obtención del preparado de membranas de hígado

Los adipocitos se aíslan a partir de una mezcla de grasa epididimal y perirrenal por el método descrito por *Rodbell*, (1964) ligeramente modificado. La grasa se recoge en una placa petri que contiene tampón Krebs-Ringer-Hepes pH 7.4 (25°C), conteniendo NaCl 118.4 mM, KCl 4.74 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.19 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.54 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.19 mM y Hepes 20 mM, se limpia, se seca y se pesa. A continuación, se tritura con una tijera en tampón Krebs-Ringer-Hepes suplementado con albúmina de suero bovino al 2% (p/v). La digestión del tejido para separar los adipocitos se realiza mediante adición, sobre la mezcla anterior, de 10 mg de colagenasa por cada 10 gr de tejido e incubando después en un baño a 37°C con agitación intensa. El tejido digerido se filtra a través de una malla de nylon, se lava dos veces con 5-10 volúmenes de tampón Krebs-Ringer-Hepes y se centrifuga a 400 g durante dos minutos para eliminar bien la colagenasa del medio. En el sobrenadante así obtenido se encuentran en suspensión los adipocitos aislados.

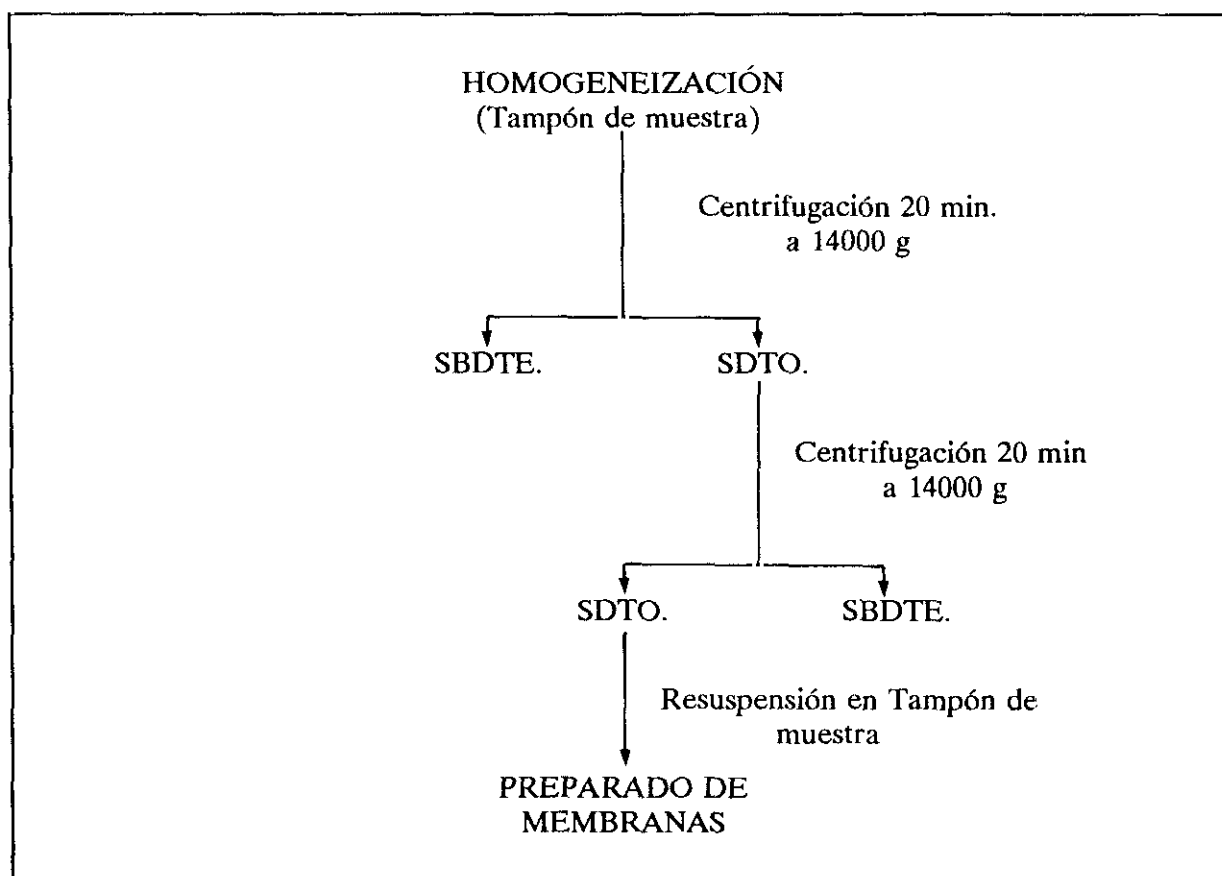


Figura 25. Obtención del preparado de membranas de tejido adiposo

Al preparado de adipocitos se le adicionan 5-10 volúmenes de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 (25°C), conteniendo  $MgCl_2$  10 mM, EDTA 5 mM, 5  $\mu g/ml$  de leupeptina, 5  $\mu g/ml$  de inhibidor de tripsina de soja y PMSF 0.1 mM (Tampón de homogeneización) y se homogeneiza en un Potter-Elvehjem. El homogeneizado se centrifuga a 1500 g durante 10 minutos. El sedimento resultante se desprecia y el sobrenadante se centrifuga a 19500 g durante 30 minutos. El sedimento obtenido se pesa y se resuspende en un tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 (25°C), que contiene  $MgCl_2$  10 mM y EDTA 1 mM, en una relación de 8  $\mu l$  de tampón por cada mg de peso húmedo del sedimento. El preparado de membranas obtenido se distribuye en alícuotas y se almacena hasta su utilización a -80°C.

Todas las operaciones se llevan a cabo a una temperatura de 0-4°C. Las centrifugaciones se realizan en una centrífuga refrigerada Beckman L2-21 provista de un rotor angular JA-17.

## 2.3 ENSAYOS DE UNIÓN DE LIGANDOS

### 2.3.1 Ensayos de saturación

Para los ensayos de unión de ligandos se emplea (-) [ $^{125}I$ ] iodocianopindolol (ICYP) (act. esp. 2200  $\mu Ci/mmol$ ), un antagonista no selectivo de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, como ligando marcado. Alícuotas de 100  $\mu l$  (75  $\mu g$  de proteína), de los preparados de membranas de los diferentes tejidos estudiados, se incuban en un volumen final de 250  $\mu l$  de tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7.4 (37°C), conteniendo NaCl 150 mM,  $MgCl_2$  5mM y ácido ascórbico 0.1 mM (tampón de "binding") con concentraciones crecientes de ICYP comprendidas entre 5-250 pM. En experimentos previos se ha comprobado que en el intervalo de concentraciones empleado en el presente estudio, la unión específica del ligando a los preparados de membranas es saturable y estable después de 50 minutos de incubación a 37°C. Los tubos se mantienen en baño de hielo hasta el inicio de la reacción. Esta comienza por la adición del preparado de membranas y se desarrolla durante 60 minutos en un baño a 37°C con agitación. La reacción finaliza por dilución con 5 ml de tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7.4 (25°C) conteniendo NaCl 150 mM (tampón de lavado) a 4°C, seguida inmediatamente de una filtración a vacío a través de un filtro de fibra de vidrio Whatman GF/A, previamente humedecido en tampón de lavado. El filtro se lava 3 veces con 5 ml del mismo tampón a 4°C y se dispone en un vial y se cuenta la radioactividad incorporada al filtro.

Para determinar la unión inespecífica, inferior al 25% de la unión total, se incuba en presencia del antagonista frío (no marcado) D,L-propranolol  $10^{-5}M$ . Los experimentos se realizan por triplicado, presentando una desviación máxima del 20%, y se repiten al menos dos veces, con diferentes preparaciones de membranas; los datos que figuran en las gráficas y tablas corresponden a un experimento representativo.

La densidad ( $B_{max}$ ) y la constante de afinidad ( $K_d$ ) de los receptores se determina mediante el tratamiento de los datos de la unión específica por el método de *Scatchard*, (1949) y *Rosenthal*, (1967), empleando para ello el programa informático "SigmaPLOT Scientific Graphing System" (versión 4.10).

## 2.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE ADENILATO CICLASA

### 2.4.1 Ensayo cromatográfico

El ensayo de actividad de adenilato ciclasa se realiza conforme al método descrito por *Salomon et al.*, (1974), modificado por *García y Haro*, (1981). La mezcla de incubación contiene el preparado de membranas (50  $\mu\text{g}$  de proteína en preparados ventrículo izquierdo, 75  $\mu\text{g}$  en hígado y 40  $\mu\text{g}$  en tejido adiposo), ATP 0.05 mM, 0.5  $\mu\text{Ci}$  de [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP (act. esp. 400 Ci/mmol),  $\text{MgCl}_2$  10 mM, cAMP 0.75 mM, creatina fosfato 20 mM, 12.5 unidades de creatina quinasa, teofilina 5 mM, y el resto de los cofactores, en un volumen final de 0,2 ml de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (37°C) que contiene 2-mercaptoetanol 5 mM, EDTA 1.5 mM, 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de inhibidor de tripsina de soja y PMSF 0.05 mM. En los experimentos de inhibición de la actividad enzimática la concentración de proteína añadida al ensayo es de 0.5 mg/ml en preparados de membrana de ventrículo izquierdo, de 0.3 mg/ml en hígado y de 0.4 mg/ml en los preparados de membranas de tejido adiposo, la de  $\text{MgCl}_2$  3 mM, sin que se varíe la concentración del resto de compuestos añadidos a la mezcla de incubación y se adiciona NaCl 100 mM. El resto de los reactivos presentes en los ensayos, así como sus concentraciones finales, son los que se indican en las figuras y tablas.

La reacción se inicia por la adición del sustrato. La incubación se lleva a cabo durante 10 minutos a 37°C con agitación y se detiene mediante la adición de 0.5 ml de  $\text{ZnSO}_4$  y 0.5 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , ambos a una concentración 0.12 M. A continuación las muestras se introducen en baño de hielo y se añaden 0.5 ml de agua destilada y 0.06  $\mu\text{Ci}$  de [ $8$ - $^3\text{H}$ ] cAMP (act. esp. 27.5 Ci/mmol) como marcador del rendimiento del proceso de purificación posterior. La mezcla se centrifuga a 4500 g durante 15 minutos en una centrífuga de mesa Wifug-Labor, y el sobrenadante se aplica por decantación en una columna Dowex AG 50 Wx4 ( $\text{H}^+$ ) (200-400 mallas) de 0.8x8 cm. Se lava con 4 ml de agua destilada y se deja eluir sobre una columna de alúmina neutra (70-230 mallas) de 0.8x3 cm. El eluido se descarta y a continuación se añaden 3 ml de Tampón Tris-HCl 100 mM, pH 7.2 (25°C), recogiendo el eluido de esta última etapa en un vial al que se adicionan 15 ml de líquido de centelleo y se cuenta la radioactividad.

Los ensayos, realizados por triplicado, presentan una desviación inferior al 15% del valor medio. La actividad específica de adenilato ciclasa se expresa en pmol de cAMP producido por minuto y mg de proteína.

### 2.4.2 Cálculo de la actividad enzimática

La actividad enzimática se calcula, a partir de los datos obtenidos de la medida de la radiactividad de las muestras, de la siguiente forma:

$$\text{nmoles de AMPc} = \frac{(A-F)xDxG}{[B-(\frac{E}{C}xA)]xC}$$

A = cpm <sup>32</sup>P recuperadas

B = cpm <sup>3</sup>H recuperadas

C = cpm <sup>32</sup>P totales añadidas

D = cpm <sup>3</sup>H totales añadidas

E = cpm de C que se introducen en el canal de <sup>3</sup>H

F = cpm de D que se introducen en el canal de <sup>32</sup>P (fondo del contador)

G = nmoles de ATP en el ensayo

### 2.4.3 Preparación de los soportes cromatográficos

La preparación del Dowex AG 50 Wx4 (H<sup>+</sup>) requiere únicamente un lavado con 15 volúmenes de agua destilada, quedando la resina dispuesta para ser cargada en las columnas. La regeneración de las columnas se realiza mediante lavado con 2 ml de HCL 1 N, seguido de un lavado con 30 ml de agua destilada.

Para preparar la alúmina se efectúa un lavado con tampón Tris-HCL 100 mM, pH 7.2 (25°C) y se carga en las columnas.

## 2.5 ADP-RIBOSILACION CATALIZADA POR TOXINA *PERTUSSIS*

### 2.5.1 Incubación de las muestras y posterior tratamiento electroforético

La preparación de membranas (125 µg de proteína) se centrifuga a 27000 g durante 20 minutos en una microfuga Hettich a 0-4°C. El sobrenadante se elimina por aspiración a vacío y el sedimento se suspende en 10 µl de tampón Tris-HCl 20 mM, pH 8.0 (25°C), conteniendo DTT 1 mM, EDTA 1mM y lubrol PX al 0.05%, y se añade al medio de incubación. La mezcla

de incubación contiene, además del preparado de membranas, 0.3  $\mu\text{g}$  de toxina de *Bordetella pertussis*, NAD 0.5  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{Ci}$  de [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]NAD (act. esp. 800 Ci/mmol),  $\text{MgCl}_2$  0.1 mM, GTP 0.1 mM, ATP 1 mM, EDTA 1 mM, timidina 10 mM, nicotinamida 10 mM, DTT 25 mM, en un volumen final de 60  $\mu\text{l}$  de tampón Tris-HCl 70 mM, pH 8.0 (25°C). La toxina de *B. pertussis* se activa previamente por incubación con DTT 25mM durante 30 min a 37°C y posterior dilución con tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7.4 (25°C), que contiene 1mg/ml de BSA y urea 2M.

La reacción, que se inicia por la adición del NAD, se lleva a cabo durante 90 min a 30°C y se detiene por adición de 20  $\mu\text{l}$  de una disolución 0.1 mg/ml de BSA en SDS al 2% y 70  $\mu\text{l}$  de TCA al 30% frío. Las muestras se dejan precipitando toda la noche a una temperatura de 0-4°C. Transcurrido este tiempo se preparan para ser sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS siguiendo el método descrito por *Guillén et al.*, (1990), para lo que se centrifugan a 27000 g durante 15 minutos en una microfuga Hettich. El sobrenadante se elimina por aspiración a vacío y el sedimento se lava 2 veces con 0.5 ml de eter frío por centrifugación a 27000 g durante 5 minutos, para eliminar perfectamente el medio de incubación. El sedimento final se resuspende con una micropipeta en 20  $\mu\text{l}$  de un tampón Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.8 (25°C), que contiene DTT 50 mM y SDS al 5% (p/v) y se incuba en un baño a 90°C durante 5 minutos. Una vez enfriada, se añade a la mezcla 1 volumen de N-etilmaleimida 100mM, se incuba 15 minutos a temperatura ambiente y se adicionan 2 volúmenes de tampón Tris-HCl 0.125 M, pH 6.8 (25°C), conteniendo SDS al 4%, glicerol al 20%, 2-mercaptoetanol al 10% y azul de bromofenol como indicador. La mezcla resultante se introduce en un baño a ebullición durante 5 minutos, se deja enfriar y se almacena a -20°C hasta su utilización.

La electroforesis de las muestras se realiza conforme al procedimiento descrito por *Brabet et al.*, (1988) en geles de poliacrilamida de 1.5 mm de espesor que contienen acrilamida al 10%, Bis-acrilamida al 0.13% y SDS al 0.1% en tampón Tris-HCl 0.375 M, pH 8.8 (25°C). Se mantiene a 4°C primero durante 90 minutos a un voltaje constante de 100 V y seguidamente 5 horas a 35 mA de intensidad de corriente y una vez finalizada, los geles se tiñen con azul de coomassie, se secan y se realiza una autorradiografía utilizando placas fotográficas Kodak-X Omat AR-5. Para la autorradiografía, que se desarrolla a -80°C, se utilizan pantallas intensificadoras de imagen Dupont Cronex.

Los experimentos se repiten al menos tres veces utilizando preparados de membranas diferentes. Los datos que se presentan en las tablas y figuras son la media de un experimento realizado por duplicado, siendo la desviación inferior al 10%.

### 2.5.2 Cuantificación del sustrato ADP-ribosilado

Para la cuantificación del sustrato ADP-ribosilado se cortan las porciones de gel correspondientes a las bandas impresionadas sobre la placa fotográfica, se introducen en un vial

de centelleo, se añaden 5 ml de líquido de centelleo dioxano-naftaleno y se mide la radiactividad incorporada. También se corta un fragmento de gel de idéntica superficie y perteneciente a la misma pista como fondo del ensayo. Por otra parte, y como índice del rendimiento del proceso de preparación de las muestras para la electroforesis, se cuantifica la banda de BSA mediante densitometrado del gel.

## 2.6 ADP-RIBOSILACIÓN CATALIZADA POR TOXINA COLÉRICA

### 2.6.1 Incubación de las muestras y posterior tratamiento electroforético

El preparado de membranas (200-250  $\mu$ g de proteína) se centrifuga a 27000 g durante 20 minutos en una microfuga Hettich a 0-4°C. El sobrenadante se elimina por aspiración a vacío y el sedimento se resuspende en 40  $\mu$ l del medio de incubación. Este contiene 3  $\mu$ g de toxina colérica, NAD 0.1  $\mu$ M, 2  $\mu$ Ci de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]NAD (act. esp. 800 Ci/mmol), MgCl<sub>2</sub> 10 mM, GppNHp 1 mM, ATP 1 mM, timidina 10 mM, arginina 10 mM y tampón fosfato potásico 100 mM, pH 6.8. La toxina colérica se activa previamente mediante incubación con DTT 20 mM durante 15 min a 30°C.

La incubación se realiza a 37°C durante 2 horas en un baño sin agitación y la reacción se detiene por adición de 13.5  $\mu$ l de una disolución de BSA (0.1 mg/ml) en SDS al 2 % y 53.5  $\mu$ l de TCA al 30% frío.

Después de parar la reacción, las muestras se dejan precipitando toda la noche a 0-4°C. El resto de las operaciones encaminadas a la preparación de las muestras para la electroforesis y posterior separación electroforética de las proteínas de membrana se lleva a cabo por el mismo protocolo descrito para la ADP-ribosilación catalizada por toxina de *Bordetella pertussis* (ver apartado 2.5.1.).

Los experimentos se repiten tres veces con diferentes preparados de membranas. Los valores que se presentan, corresponden a un experimento representativo realizado por duplicado. La desviación es inferior al 10 % del valor medio.

### 2.6.2 Cuantificación del sustrato ADP-ribosilado

Para la cuantificación del sustrato ADP-ribosilado se procede de igual manera que en el apartado 2.5.2.

## 2.7 IMMUNODETECCION DE PROTEINAS DESPUES DE ELECTROTRANSFERENCIA ("IMMUNOBLOT")

El "immunoblot" es una técnica particular de inmunodetección de proteínas después de su electrotransferencia a un soporte de nitrocelulosa. En la presente memoria se utilizará el término inmunodetección para hacer referencia al "immunoblot", a no ser que se haga referencia expresa a otra modalidad de inmunodetección.

### 2.7.1 Preparacion de las muestras y posterior electroforesis

El tratamiento de las preparaciones de membranas para electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS se realiza según el protocolo descrito previamente *Guillén et al., (1990)*, ligeramente modificado. Las muestras (150-250 µg de proteína, en función del tejido y el anticuerpo con el que se incubaba) se centrifugan a 27000 g durante 20 minutos en una microfuga Hettich a 0-4°C. El sobrenadante se elimina por aspiración a vacío y el sedimento se suspende con una micropipeta en 30 µl de tampón Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.8 (25°C) que contiene SDS al 5% (p/v) y DTT 50 mM, y posteriormente se incubaba en un baño a 90°C durante 5 minutos para solubilizar las proteínas de membrana. A continuación las muestras se someten a una reacción de alquilación, mediante la incubación con 10 µl de N-etilmaleimida 200 mM durante 15 minutos a temperatura ambiente, antes de tratarlas durante 5 minutos a 100°C con 40 µl de tampón Tris-HCl 125 mM, pH 6.8 (25°C) que contiene SDS al 4%, glicerol al 20% y β-mercaptoetanol al 10%.

Las muestras así preparadas se aplican a un gel de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS al 0.1% y se procede a la separación electroforética de las proteínas de membrana siguiendo el procedimiento de *Brabet et al., (1988)*, descrito en el apartado 2.5.1.

### 2.7.2 Electrotransferencia a un soporte de nitrocelulosa

Después de la electroforesis las proteínas se transfieren sobre un soporte de nitrocelulosa (0.45 µm; Schleicher & Schuell) a una corriente constante de 20 V en un tampón Tris-HCl 25mM, pH 8.3 (25°C), que contiene glicocola 200 mM y metanol al 20%. La electrotransferencia se efectúa durante 14 horas a temperatura ambiente. Las membranas de nitrocelulosa se secan y se tiñen con rojo Ponceau S para comprobar la calidad de la transferencia.

### 2.7.3 Incubación con los anticuerpos

El tratamiento posterior de las membranas de nitrocelulosa se lleva a cabo siguiendo el protocolo descrito por *Guillén et al.*, (1990) ligeramente modificado. La nitrocelulosa se lava dos veces con un tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 (25°C), conteniendo NaCl 500 mM (tampón A). Con el fin de evitar la unión inespecífica de los anticuerpos se efectúan dos lavados con tampón A, conteniendo gelatina al 3% (p/v) y otros dos lavados con tampón A conteniendo Tween 20 al 0.05% (v/v) (tampón B). La incubación de la nitrocelulosa con los anticuerpos se realiza durante toda la noche a temperatura ambiente en tampón A que contiene gelatina al 1% y el antipéptido correspondiente. A continuación la nitrocelulosa se lava en tampón B y se incuba 2 horas a temperatura ambiente en tampón A, conteniendo gelatina al 0.5% y 400000-600000 cpm/ml de [<sup>125</sup>I] proteína A (act. esp. 2-10  $\mu$ Ci/ $\mu$ g). Los "blots" se lavan sucesivamente con tampón B y tampón A, se secan y se exponen, a -80°C, a una película fotográfica Kodak-X Omat AR-5 utilizando pantallas intensificadoras de imagen Dupont Cronex.

En este estudio se utilizan anticuerpos policlonales anti  $G_s\alpha$  y  $G_{i1,2}\alpha$  (cedidos por el Dr. V. Homburger, C.C.I.P.E., Montpellier, Francia) obtenidos respectivamente frente a los deca péptidos RMHLRQYELL y KNNLKDCGLF del extremo COOH-terminal de estas proteínas. Los anticuerpos anti  $G_b$ , anti  $G_{i1\alpha}$  y anti  $G_{i3\alpha}$  son suministrados por Calbiochem; los dos primeros reconocen de forma específica deca péptidos de un segmento interno de las proteínas  $\beta$  y  $\alpha_{ii}$  (127-139 y 159-168 respectivamente) mientras que el antipéptido anti  $G_{i3\alpha}$  reconoce un deca péptido del extremo COOH-terminal.

### 2.7.4 Cuantificación de las proteínas inmunodetectadas

Las porciones de nitrocelulosa correspondientes a las bandas impresionadas sobre la placa fotográfica se cortan y se mide la radiactividad. También se corta un fragmento de nitrocelulosa de idéntica superficie y perteneciente a la misma pista como fondo del ensayo.

Los experimentos se repiten al menos tres veces con lotes diferentes de membranas. Los datos de las figuras corresponden a un experimento representativo realizado por duplicado, siendo la desviación inferior al 15 % del valor medio.

## 2.8 MEDIDAS DE LAS MUESTRAS RADIOACTIVAS

El conteo de radioactividad de las muestras que contienen <sup>32</sup>P y/o <sup>3</sup>H se lleva a cabo en un contador de centelleo líquido Beckman LS 3801. Para ello se utiliza un líquido de

centelleo preparado con 150 g de naftaleno, 10.5 g de 2.5-difeniloxazol (PPO), 0.45 g de 1.4-bis-2-(5-feniloxazolil)-benceno (POPOP) y dioxano hasta 1.5 l.

Las muestras que contienen  $^{125}\text{I}$  se cuentan en un contador Beckman 5500, siendo la eficacia del contaje del 74%.

## 2.9 VALORACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración de proteínas se determina de acuerdo con el método de *Lowry et al.*, (1951), utilizando BSA como patrón.

## 2.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados mostrados representan la media  $\pm$  la desviación estándar. El análisis estadístico se ha realizado mediante el test de Student, y se consideran significativas, bastante significativas o muy significativas las diferencias entre dos grupos cuando  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*) o  $P < 0.005$  (\*\*\*) respectivamente.

## 2.11 PRODUCTOS Y REACTIVOS

Los productos isotópicamente marcados [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP (act. esp. 400 Ci/mmol) y [ $8$ - $^3\text{H}$ ] AMPc (act. esp. 27.5 Ci/mmol) son de Amersham International (Amersham, Bucks, Reino Unido). New England Nuclear (Boston, Massachusetts, Estados Unidos) suministra [ $^{125}\text{I}$ ] Iodocianopindolol (act. esp. 2200 Ci/mmol), [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ] NAD (act. esp. 800 Ci/mmol) y [ $^{125}\text{I}$ ] proteína A (act. esp. 2-10 Ci/mg).

De Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, Estados Unidos) proceden albúmina de suero bovino (fracción V), creatina fosquinasa (163u/mg), fosfocreatina, nucleotidos, adrenalina, isoproterenol, propranolol, glucagón, ciclohexiladenosina, adenosina desaminasa (1.2 u/mg), toxina de *Vibrio cholerae*, timidina, DTT, N-etilmaleimida, nicotinamida, SDS, TCA, rojo Ponceau S, azul de bromofenol, azul de coomassie, glicocola, placas fotográficas Kodak-X Omat AR-5 y la alúmina neutra.

El reactivo de Folin-Ciocalteu, 2-mercaptoetanol, teofilina, eter, alcoholes y sales inorgánicas son de Merck (Darmstadt, Alemania).

La colagenasa procede de Worthington Biochemical Corp. (Freehold, New Jersey, Estados Unidos). Forscolina, toxina de *Bordetella pertussis* y anticuerpos anti  $G_{11\alpha}$ ,  $G_{13\alpha}$  y  $G_B$  son

---

de Calbiochem (La Jolla, California, Estados Unidos). Los anticuerpos anti  $G_{3x}$  y  $G_{11,2x}$  son una cesión del Dr. V. Homburger, C.C.I.P.E., Montpellier, Francia. Dowex AG-50 Wx4 ( $H^+$ ), acrilamida, bis-acrilamida, TEMED y persulfato amónico proceden de Bio-Rad (Richmond, California, Estados Unidos).

El resto de los productos y reactivos utilizados son de grado analítico.

## **RESULTADOS**

### 3.1 EFECTO DEL EJERCICIO FÍSICO SOBRE EL PESO CORPORAL Y DE LOS ÓRGANOS

El protocolo de entrenamiento seguido en este estudio intenta simular un ejercicio de resistencia en el que, basándonos en las relaciones entre coste energético y velocidad de carrera (*Shepherd y Gollnick, 1976*), los animales se encuentran aproximadamente a un 75% de su capacidad aeróbica máxima.

En la TABLA II se recoge el efecto que el programa de entrenamiento ha tenido sobre el peso corporal de las ratas. Al comienzo del experimento, el peso de las ratas era similar, y a medida que transcurría el tiempo de entrenamiento se observó que progresivamente las ratas ejercitadas pesaban menos que las controles (datos no mostrados). En el momento del sacrificio el peso corporal de los animales sedentarios era significativamente mayor ( $p < 0.005$ ) que el de los animales entrenados.

También se ha estudiado el peso medio del corazón, hígado y el tejido adiposo (grasa perirrenal y epididimal). Estos datos se encuentran reflejados en la TABLA II.

En el caso del corazón, si bien no existen diferencias en cuanto al peso del órgano, entre los dos bloques, si se observa una diferencia estadísticamente significativa en el índice cardíaco (definido como peso del órgano/peso corporal) entre los animales que han llevado a cabo ejercicio y los sedentarios, si bien esto es debido al menor peso corporal que presentan estos animales. El ejercicio realizado no provoca hipertrofia cardíaca, definida inicialmente por *Muller, (1882)* como el incremento en el peso neto del miocardio de pacientes con enfermedades del corazón (*Patel et al., 1989*). Si bien hay autores que utilizan el índice cardíaco como criterio para cuantificar el grado de hipertrofia alcanzado en diferentes modelos animales experimentales (*Patel et al., 1989* y *Knufman et al., 1987*), en el presente trabajo no se ha empleado este criterio puesto que el descenso observado en el peso corporal de los animales entrenados daría cuenta de un falso índice de hipertrofia tal y como discuten *Bugaisky y Zak, (1986)*.

En cuanto al hígado, no se observó tampoco variación en el peso del órgano entre los dos grupos de ratas en estudio. Mientras que en los animales entrenados se observa un descenso del 50% en masa de tejido adiposo con respecto a los animales sedentarios.

### 3.2 INFLUENCIA DEL EJERCICIO FÍSICO SOBRE EL SISTEMA $\beta$ -ADRENÉRGICO-ADENILATO CICLASA EN MIOCARDIO DE RATA

#### 3.2.1 Receptores $\beta$ -adrenérgicos

Se ha medido la constante de disociación ( $K_d$ ) y la densidad ( $B_{max}$ ) de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos mediante ensayos de unión de ICYP a membranas de ventrículo izquierdo de

TABLA II. Efecto del ejercicio físico sobre el peso corporal y de distintos órganos de las ratas

GRUPO	Peso corporal	Corazón	Hígado	Tej. adiposo
CONTROL	450.58±22.7	1.032±0.085 (2.319±0.09)	14.07±1.552	18.4±2.3
EJERCICIO	383.94±25.5 ***	0.969±0.1 (2.544±0.1 *)	11.94±1.72	9.36±1.2 ***

Los resultados se expresan como la media aritmética de los animales de cada grupo  $\pm$  la desviación estándar. Se relacionan los pesos absolutos en gramos de los diferentes órganos, indicando entre paréntesis el índice cardíaco (en mg/gr) definido como la relación entre el peso del órgano y el peso corporal. Diferencias significativas respecto a los correspondientes controles con: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  y \*\*\*  $P < 0.005$ .

ratas que han llevado a cabo ejercicio y sus respectivos controles. La unión del radioligando a los preparados de membrana de ambos bloques es saturable y altamente específica, puesto que la unión inespecífica supone un 15-20% de la unión total (datos no mostrados).

Cuando se procede al análisis de los datos de unión específica por el método de *Scatchard*, (1949) y *Rosenthal* (1967) (Figura 26), se obtiene una recta que nos indica la existencia de un único tipo de sitios de unión. De los puntos de corte de las representaciones obtenidas con el eje de abcisas se determina el valor de la densidad de receptores que, como se puede observar en la TABLA III, es significativamente menor (un 30%) en el grupo de animales que han sido entrenados.

Por otra parte, en la Figura 26 se observa que la pendiente de ambas rectas no varía, lo que nos indica que no existen diferencias entre la constante de disociación aparente por antagonista de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos cardíacos de las ratas controles y de las que han llevado a cabo ejercicio, como se muestra en la TABLA III.

### 3.2.2 Regulación del sistema de adenilato ciclasa

El sistema de adenilato ciclasa, tal y como se describe en la introducción, consta de tres componentes diferentes: los receptores, la subunidad catalítica y una amplia familia de proteínas reguladoras ligantes de nucleótidos de guanina (proteínas G) que transducen señales estimuladoras e inhibitoras. En este estudio se han analizado las características reguladoras de los diferentes componentes del sistema de adenilato ciclasa.

#### 3.2.2.1 Características reguladoras generales de la vía estimuladora del sistema de adenilato ciclasa

Con el fin de determinar las posibles modificaciones que se producen con el ejercicio físico intenso y regular en las vías estimuladoras del sistema adenilato ciclasa de miocardio, se ha medido la actividad enzimática en presencia de moduladores que actúan a través de mecanismos dependientes e independientes de receptor.

Se han empleado cationes divalentes,  $Mg^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ , así como el diterpeno forskolina como indicadores de la funcionalidad de la subunidad catalítica del sistema. Los resultados obtenidos se reflejan en la TABLA IV y como se puede observar, no se han detectado diferencias significativas en la actividad basal de la enzima de ambos grupos en presencia de una concentración saturante de  $Mg^{2+}$  (10 mM), si bien parece ser ligeramente menor en los animales que han sido entrenados. Cuando se ensaya la actividad de adenilato ciclasa en presencia de  $Mn^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ /forskolina, que son estimuladores más potentes de la enzima, se observa que la actividad específica y la activación por el diterpeno son significativamente menores en las ratas que han realizado ejercicio físico.

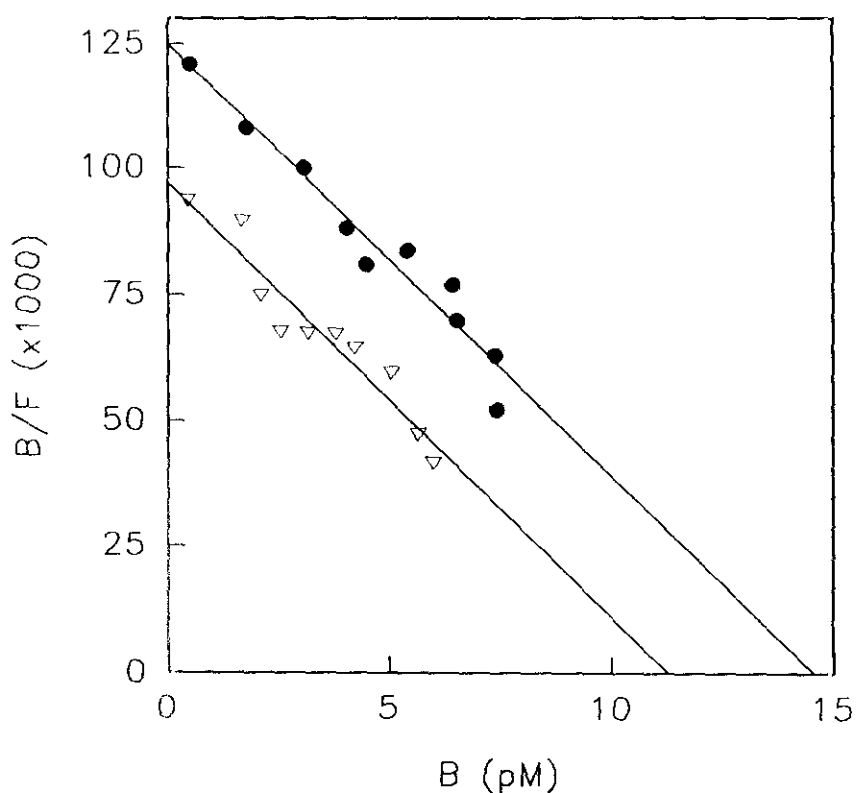


Figura 26. Representación de Scatchard para la unión específica de ICYP a membranas de ventrículo izquierdo de animales controles (●—●) y entrenados (▽—▽).

TABLA III. Densidad y afinidad por ICYP de los receptores β-adrenérgicos en membranas de ventrículo izquierdo de rata.

	CONTROL	EJERCICIO
Bmax (fmol/mg)	47.23 ± 5.9 (100%)	32.9 ± 3.06 *** (69.7 ± 6.5%)
Kd (pM)	117.35 ± 0.65	115.95 ± 0.05

Los resultados se expresan como la media aritmética de los experimentos realizados ± la desviación estándar. Los valores que se presentan entre paréntesis corresponden a los porcentajes de variación con respecto a los controles. Diferencias significativas respecto a los correspondientes controles con: \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 y \*\*\* P < 0.005.

TABLA IV. Actividad de adenilato ciclasa en preparados de membrana de ventrículo izquierdo de rata en presencia de diversos moduladores

MODULADORES	CONTROL		EJERCICIO	
	(pmol/min/mg prot)	(%)	(pmol/min/mg prot)	(%)
Mg <sup>2+</sup> 10mM	9.85±0.25	100	9.14±0.49	100
Mn <sup>2+</sup> 3mM	67.22±0.44		48.73±8.18 ***	
Mg <sup>2+</sup> 10mM + FK 3.5x10 <sup>-5</sup> M	83.53±1.41	848.1±14.37	71.19±2.10 ***	778.9±23.1 ***
Mg <sup>2+</sup> 10mM + GTP 10 <sup>-5</sup> M	11.49±1.00	116.6±10.24	9.70±0.48 *	106.0±5.3
Mg <sup>2+</sup> 10mM + F <sup>-</sup> 10mM	75.30±1.90	764.0±19.70	59.02±0.07 ***	645.0±0.7 ***
Mg <sup>2+</sup> 10mM + GppNHp 10 <sup>-5</sup> M	54.18±0.49	550.1±4.97	44.41±0.81 ***	485.9±8.9 ***
Mg <sup>2+</sup> 10mM + GTP 10 <sup>-5</sup> M + ISO 10 <sup>-7</sup> M	19.21±0.99	195.1±10.1	14.85±0.55 ***	162.5±6.0 ***
Mg <sup>2+</sup> 10mM + GTP 10 <sup>-5</sup> M + ISO 5x10 <sup>-5</sup> M	22.03±0.16	223.0±1.60	19.95±0.40 **	218.0±4.4

FK, forskolina; GTP, guanosina 5'-trifosfato; F<sup>-</sup>, fluoruro; GppNHp, guaninilimidodifosfato; ISO, isoproterenol. Diferencias significativas respecto a los correspondientes controles con:  
 \* P<0.05, \*\* P<0.01 y \*\*\* P<0.005.

También se han empleado guanililimidodifosfato (GppNHp) y fluoruro, que dan cuenta de la funcionalidad del componente regulador activador (*Birnbaumer et al., 1985*). Cuando se ensayan las membranas de ventrículo izquierdo de los dos bloques de ratas con estos moduladores se observa un descenso significativo tanto en la actividad específica como en los niveles de activación de la enzima estimulada por una concentración saturante de GppNHp ( $10^{-5}$ M) y fluoruro (10mM) (TABLA IV).

Por último, se ha ensayado la actividad de la enzima estimulada por la vía  $\beta$ -adrenérgica. Concretamente se ha empleado el agonista  $\beta$ -adrenérgico isoproterenol como indicador de la funcionalidad del receptor estimulador. En la TABLA IV se observa que en las ratas entrenadas se produce un descenso de la actividad y activación de la enzima para una concentración subsaturante del agonista ( $10^{-7}$  M) sin que se afecte la activación en presencia de una concentración saturante de isoproterenol ( $5 \times 10^{-5}$  M).

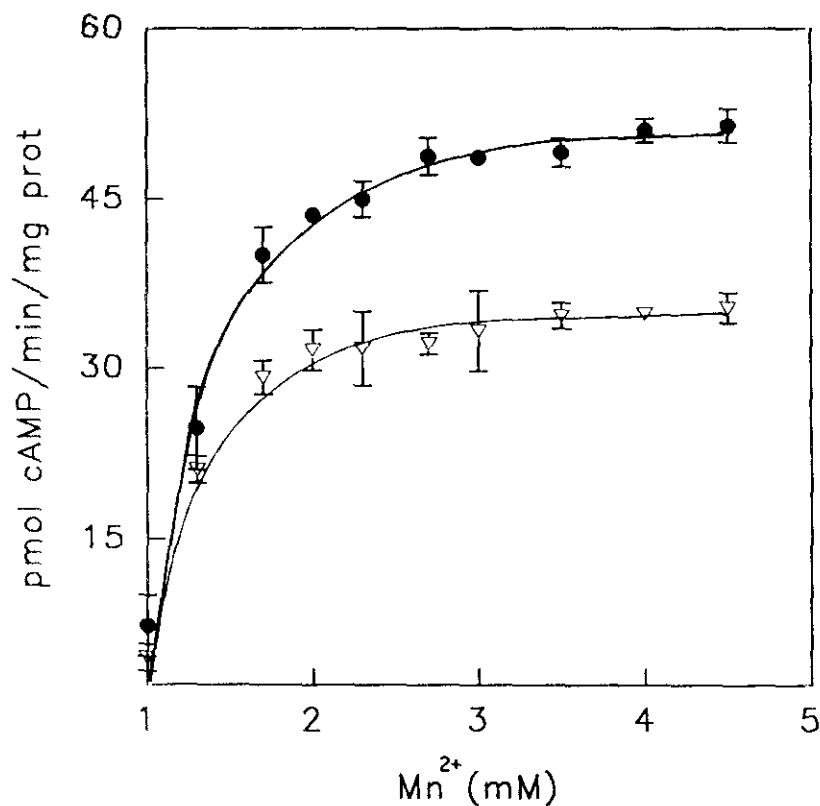


Figura 27. Actividad de la adenilato ciclasa en presencia de  $Mn^{2+}$  en preparaciones de membranas de ventrículo izquierdo de ratas control (●—●) y entrenadas (▽—▽). Las diferencias que se observan en el intervalo de concentraciones 2-4.5 mM entre los dos bloques de animales son significativas para  $p < 0.005$ .

### 3.2.2.2 Características reguladoras de la subunidad catalítica

Para intentar verificar si los resultados que se reflejan en la TABLA IV, cuando se estimula la adenilato ciclasa con  $Mn^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ /forskolina, se corresponden con una posible alteración de la funcionalidad de la proteína efectora en cuanto a su  $V_{max}$  y/o a la constante de activación, se procedió a ensayar la actividad de adenilato ciclasa en presencia de diferentes concentraciones de estos moduladores.

En la Figura 27 se observa que en el intervalo de concentraciones saturantes (2.5-4.5 mM) de  $Mn^{2+}$  la actividad de la subunidad catalítica es significativamente menor en el miocardio de los animales que han llevado a cabo ejercicio. Asimismo, en la Figura 28 se observa un descenso significativo en la actividad de la enzima de los animales entrenados cuando los preparados de membrana de ambos grupos se ensayan a concentraciones saturantes, 15-35  $\mu M$ , de forskolina en presencia de  $Mg^{2+}$  10 mM.

Estos resultados parecen indicar que como consecuencia de la adaptación del sistema al ejercicio físico se produce un descenso considerable en los niveles y/o funcionalidad de la subunidad catalítica del sistema adenilato ciclasa.

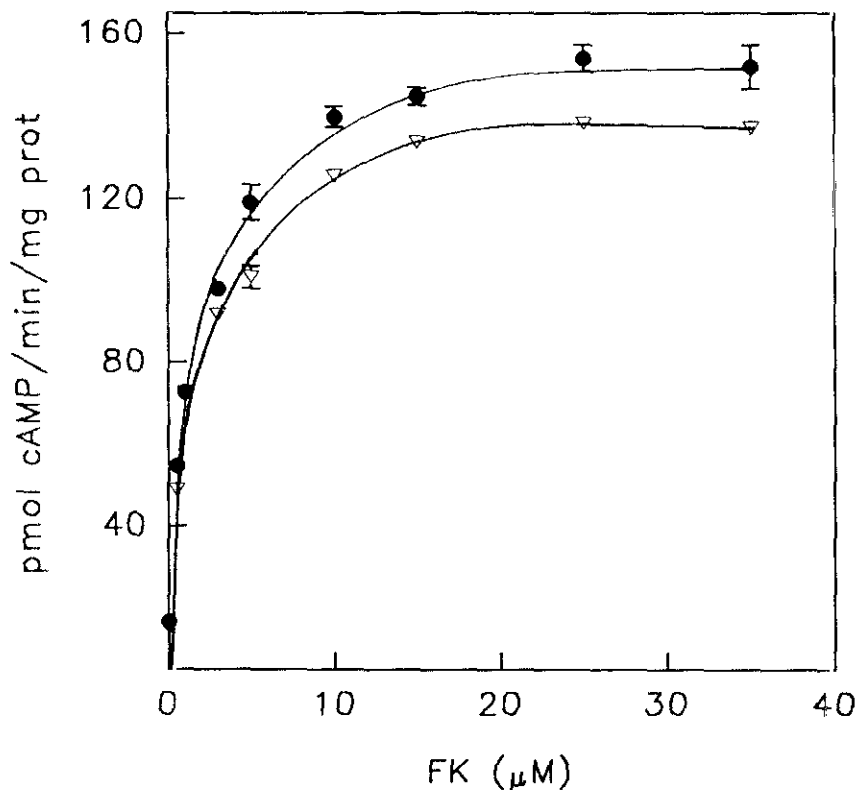


Figura 28. Actividad de la adenilato ciclasa en presencia de  $Mg^{2+}$  (10mM) y forskolina (FK) en preparados de membranas de ventrículo izquierdo de animales controles (●—●) y entrenadas (▽—▽). Las diferencias que se observan en el intervalo de concentraciones 10-35  $\mu M$  entre los dos bloques de animales son significativas para  $p < 0.005$ .

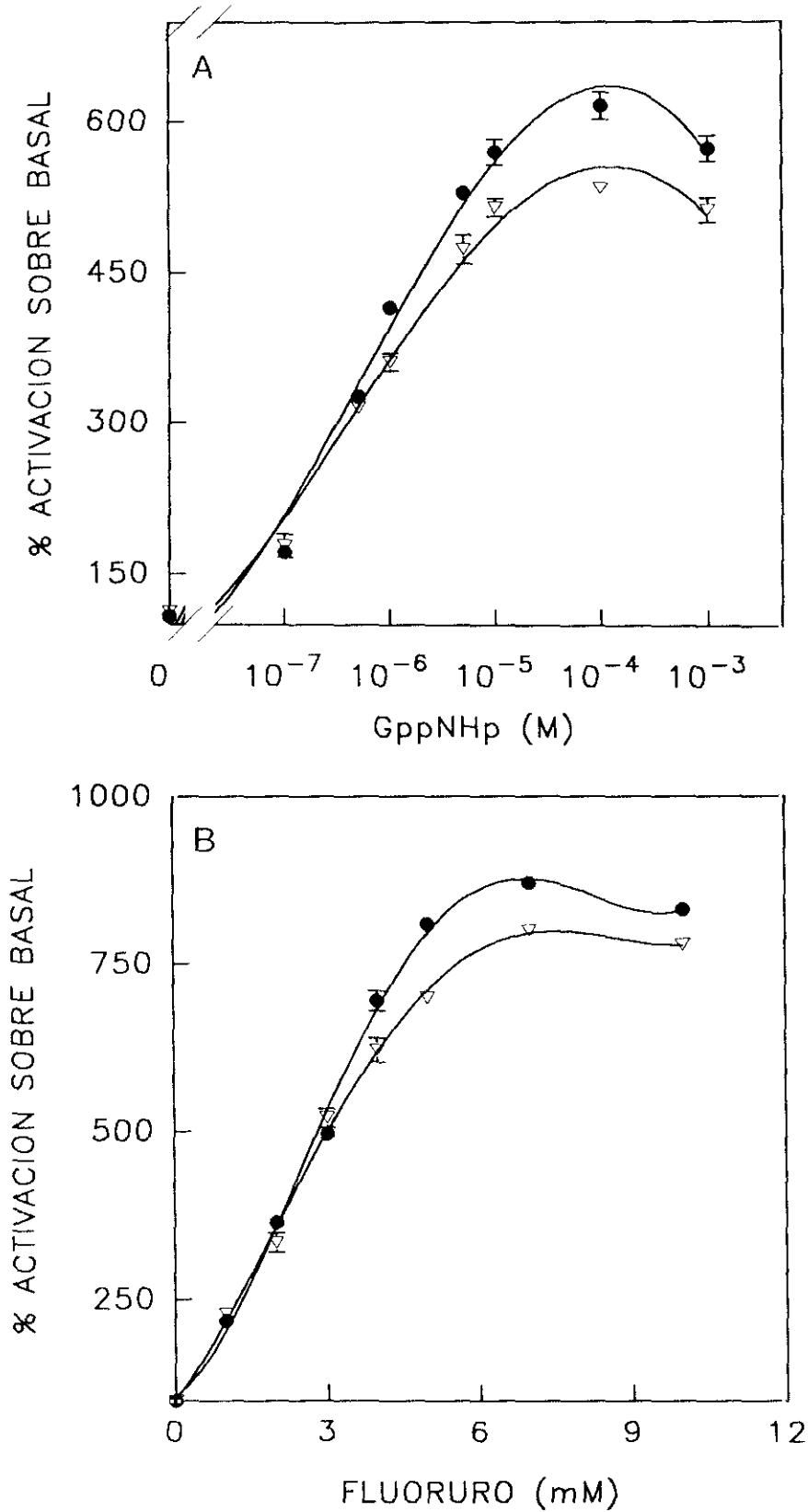


Figura 29. Activación por GppNHp (A) y fluoruro (B) de la adenilato ciclasa de ventriculo izquierdo de ratas controles (●—●) y entrenadas (▽—▽). La actividad basal de la enzima, expresada en pmol cAMP/min/mg prot, fue:  $16.6 \pm 0.72$  en el bloque control y  $15.28 \pm 1.92$  en el bloque entrenado. Las diferencias que se observan en el intervalo de concentraciones  $10^{-5}$ - $10^{-3}$  M de GppNHp y 5-9 mM de fluoruro entre los dos grupos de animales son significativas para  $p < 0.005$ .

### 3.2.2.3 Regulación a través de la proteína G, independiente de receptor

En la Figura 29 se muestra la activación de la adenilato ciclasa por diferentes concentraciones de GppNHp (A) y fluoruro (B) en ventrículo izquierdo de los dos bloques de animales. En ellas se puede observar cómo con el ejercicio físico se produce un descenso de la activación máxima por estos dos moduladores que da cuenta de un descenso en la  $V_{max}$  de la enzima, sin que se modifique la constante de activación de la adenilato ciclasa.

Aunque las diferencias observadas en los niveles de activación promovidos por estos moduladores se corresponden con diferencias, igualmente significativas, en la actividad específica de la enzima (véase TABLA IV) se ha optado por la representación de los niveles de activación para anular la posible influencia que pudiera tener la alteración de la propia subunidad catalítica sobre las variaciones observadas en la actividad específica en presencia del modulador.

Los resultados que se presentan indican que los niveles y/o funcionalidad del componente regulador activador,  $G_s$ , del sistema de adenilato ciclasa de miocardio están deprimidos como consecuencia de la adaptación de este tejido al ejercicio físico.

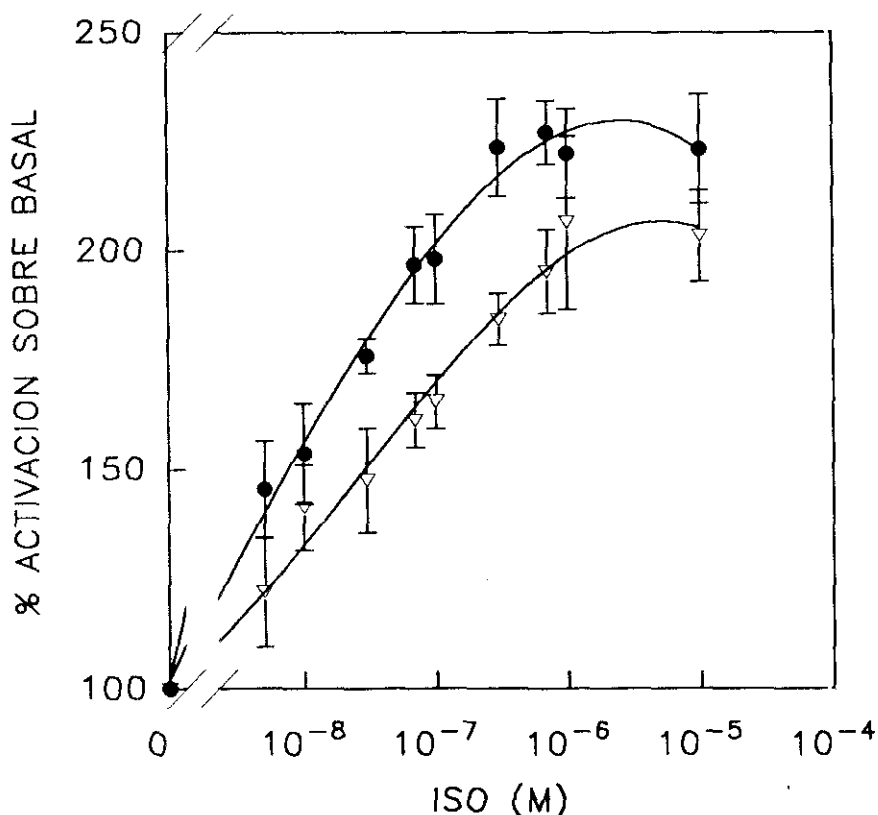


Figura 30.

Activación por isoproterenol de la adenilato ciclasa en membranas de corazón. La actividad enzimática se determina en presencia de  $GTP 10^{-5}M$ . La actividad basal de la enzima, expresada en  $pmol\ cAMP/min/mg\ prot$  fue:  $11.01 \pm 1.5$  para los animales control (●—●) y  $13.89 \pm 1.8$  para los entrenados (▽—▽). Las diferencias que se observan en el intervalo de concentraciones  $5 \times 10^{-8}$ — $7 \times 10^{-7} M$  entre los dos bloques de ratas son significativas para  $p < 0.005$ .

#### 3.2.2.4 Regulación por la vía estimuladora $\beta$ -adrenérgica

En la Figura 30 se muestra la activación de adenilato ciclasa de miocardio por diferentes concentraciones del agonista  $\beta$ -adrenérgico isoproterenol (ISO) en preparados de membrana de los dos bloques de animales. En ella se observa que en las ratas que han llevado a cabo ejercicio físico se produce un desplazamiento de la curva hacia la derecha de forma que la constante de activación para las ratas entrenadas fue de  $5 \times 10^{-8} \text{M}$  y de  $1.5 \times 10^{-8} \text{M}$  para los animales controles, sin que se detecten diferencias a concentraciones saturantes de isoproterenol.

#### 3.2.2.5 Regulación por la vía inhibidora muscarínica

Los receptores muscarínicos colinérgicos son los encargados de mediar el control que el sistema nervioso parasimpático ejerce sobre la funcionalidad cardíaca. En la Figura 31 se muestra el descenso en la inhibición de adenilato ciclasa estimulada por isoproterenol en función de la concentración del agonista muscarínico carbacol en animales entrenados.

La disminución de la inhibición máxima, sin que aparentemente se modifique la constante de inhibición por el carbacol, sería responsable de las diferencias en el nivel de inhibición observado en el miocardio de los animales entrenados (aproximadamente un 15%) frente a sus respectivos controles (25%) (TABLA V).

#### 3.2.2.6 Otras vías de control negativo del sistema

Existen otros receptores que también ejercen un control negativo de la actividad de la adenilato ciclasa de miocardio, entre ellos los receptores  $A_1$  de adenosina (Liang, 1992) y los receptores de prostaglandina  $E_2$  (Lopaschuk et al., 1989 y Lerner et al., 1992). Con el fin de estudiar si estas vías inhibitorias tienen un comportamiento similar al observado para los receptores muscarínicos, se ha ensayado la actividad de la enzima estimulada por isoproterenol en presencia de concentraciones saturantes de ciclohexiladenosina, un agonista análogo de adenosina, y de prostaglandina  $E_2$ . Como se refleja en la TABLA V, hemos medido unos niveles de inhibición de la adenilato ciclasa, por estas dos vías inhibitorias, que son también significativamente inferiores en los animales entrenados que en sus respectivos controles.

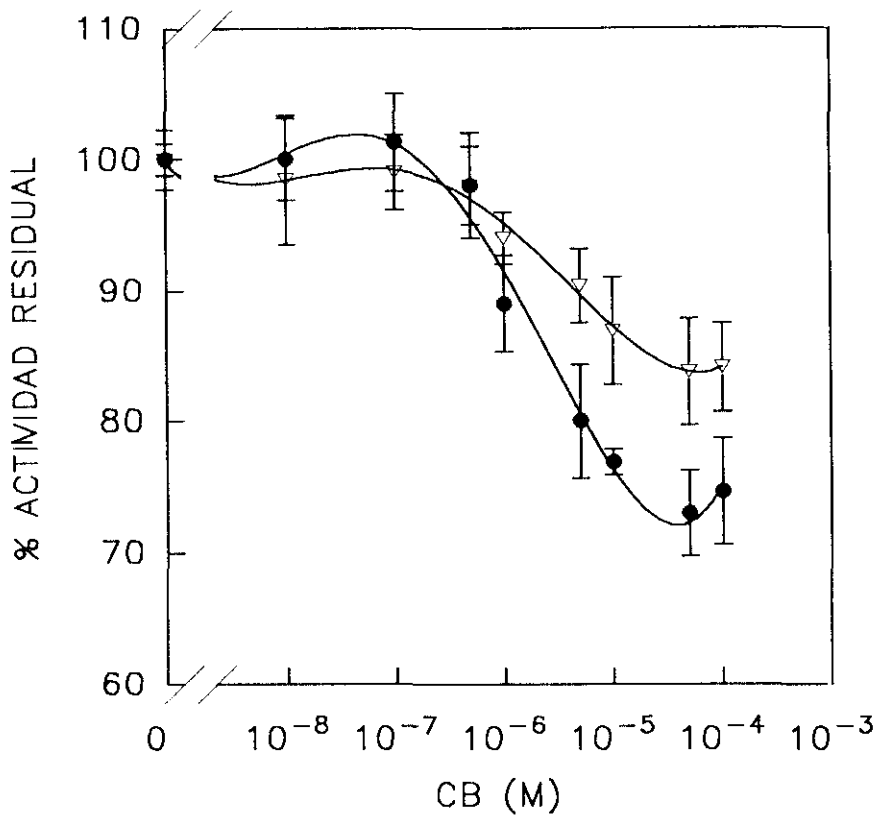


Figura 31. Efecto del carbacol (CB) sobre la actividad de adenilato ciclasa de ventrículo izquierdo. La actividad enzimática se ensaya en presencia de isoproterenol y GTP  $1\mu\text{M}$ . La actividad basal de la enzima, expresada en pmol cAMP/min/mg prot fue:  $17.22\pm 1.08$  para las ratas controles (●—●) y  $14.04\pm 0.168$  para las entrenadas (▽—▽). Las diferencias que se observan en el intervalo de concentraciones  $10^{-5}$ - $10^{-4}$  M entre los dos bloques de animales son significativas para  $p<0.005$ .

### 3.2.3 Proteínas G

Se ha procedido a la cuantificación de las diferentes proteínas G presentes en el miocardio de los dos bloques de animales, control y ejercicio; para ello se han empleado diferentes técnicas experimentales.

#### 3.2.3.1 ADP-ribosilación por toxina pertussis

Cuando se incuban las preparaciones de fracción particulada de corazón de ratas entrenadas, y sus respectivos controles, con ( $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ) NAD en presencia de toxina de *Bordetella*

TABLA V. Actividad de adenilato ciclasa en preparados de membrana de ventrículo izquierdo de rata en presencia de diversos moduladores

MODULADORES	CONTROL		EJERCICIO	
	(pmol/min/mg prot)	(%)	(pmol/min/mg prot)	(%)
Mg <sup>2+</sup> 3mM + GTP 10 <sup>-6</sup> M + ISO 10 <sup>-6</sup> M	14.34±0.46	100	13.05±0.31 *	100
Mg <sup>2+</sup> 3mM + GTP 10 <sup>-6</sup> M + ISO 10 <sup>-6</sup> M + CB 10 <sup>-4</sup> M	10.23±0.01	71.4±0.21	10.34±0.24 *	79.3±5.8 ***
Mg <sup>2+</sup> 3mM + GTP 10 <sup>-6</sup> M + ISO 10 <sup>-6</sup> M + CHA 10 <sup>-6</sup> M	10.14±1.66	70.7±11.59	11.55±0.13	88.56±1.0 ***
Mg <sup>2+</sup> 3mM + GTP 10 <sup>-6</sup> M + ISO 10 <sup>-6</sup> M + PGE <sub>2</sub> 10 <sup>-6</sup> M	11.23±0.38	78.3±2.70	10.96±0.32	83.98±2.52 **

CB, carbacol; CHA, ciclohexiladenosina; PGE<sub>2</sub>, prostaglandina E<sub>2</sub>. Diferencias significativas respecto a los correspondientes controles con: \* P<0.05, \*\* P<0.01 y \*\*\* P<0.005.

*pertussis*, se detectan dos bandas radiactivamente marcadas correspondientes a unas masas moleculares de aproximadamente 40 KDa y 41 KDa. La Figura 32 recoge la variación de los niveles de ADP-ribosilación de las subunidades  $\alpha_i/\alpha_o$ . En ella se observa cómo se produce una caída estadísticamente significativa en los niveles de marcaje tanto para la banda de 40 KDa como para la de 41 KDa, siendo este descenso más acusado (un 33%) para la banda de mayor masa molecular.

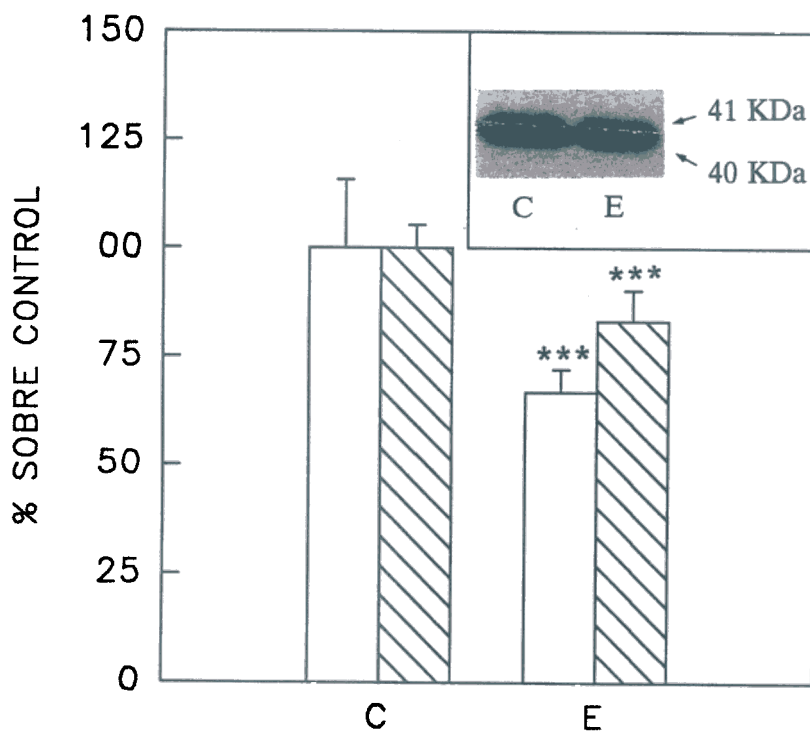


Figura 32.

Niveles de ADP-ribosilación catalizada por toxina pertussis en preparados de membrana de ventrículo izquierdo de animales controles (C) y entrenados (E). La radiactividad incorporada a la banda de 41 KDa ( $\square$ ) del grupo control fue de  $305.3 \pm 48.5$  cpm, y de  $371.3 \pm 19.7$  cpm para la banda de 40 KDa ( $\text{hatched}$ ). (\*\*\*) diferencias significativas entre los dos grupos para  $p < 0.005$ .

### 3.2.3.2 ADP-ribosilación por toxina colérica

Una de las aproximaciones que puede ser utilizada en la cuantificación de la proteína  $G_i$  es el estudio de la ADP-ribosilación de las subunidades  $\alpha_i$  por toxina de *Vibrio cholerae*.

Los estudios de ADP-ribosilación con toxina colérica, en preparados de membrana de corazón, permiten detectar la existencia de dos sustratos mayoritarios de entre los múltiples que son modificados covalentemente. Estos dos sustratos presentan unas masas moleculares de 42 KDa y 53 KDa. En la TABLA VI se recoge la variación en los niveles de ADP-ribosilación de estas dos formas de  $\alpha_i$ . Estos niveles disminuyen considerablemente en miocardio de ratas entrenadas, siendo el descenso medido de aproximadamente un 14% para cada una de las dos formas de  $\alpha_i$ .

TABLA VI. Niveles de ADP-ribosilación catalizada por toxina colérica en membranas de ventrículo izquierdo

Banda	CONTROL		EJERCICIO	
	(cpm)	(%)	(cpm)	(%)
53 KDa	193.0 ± 4.70	100	166.9 ± 1.04 ***	86.5 ± 0.5
42 KDa	199.6 ± 1.04	100	173.2 ± 16.74 ***	86.8 ± 8.3

Los resultados se expresan como la media aritmética de los experimentos realizados  $\pm$  la desviación estándar. Diferencias significativas respecto a los correspondientes controles con: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  y \*\*\*  $P < 0.005$ .

### 3.2.3.3 Niveles de $\alpha_i$

Para determinar los niveles de la proteína  $\alpha_i$  en miocardio se ha empleado un anticuerpo obtenido contra el decapeptido carboxilo terminal. Este anticuerpo es capaz de reconocer en "immunoblots" dos proteínas diferentes, con masas moleculares de 42 KDa y 53 KDa (Figura 33), con lo que se confirma que los dos sustratos ADP-ribosilados en presencia de toxina colérica en estos preparados de membrana corresponden a las dos formas de  $\alpha_i$  que se describen en la bibliografía (Neer y Clapham, 1992).

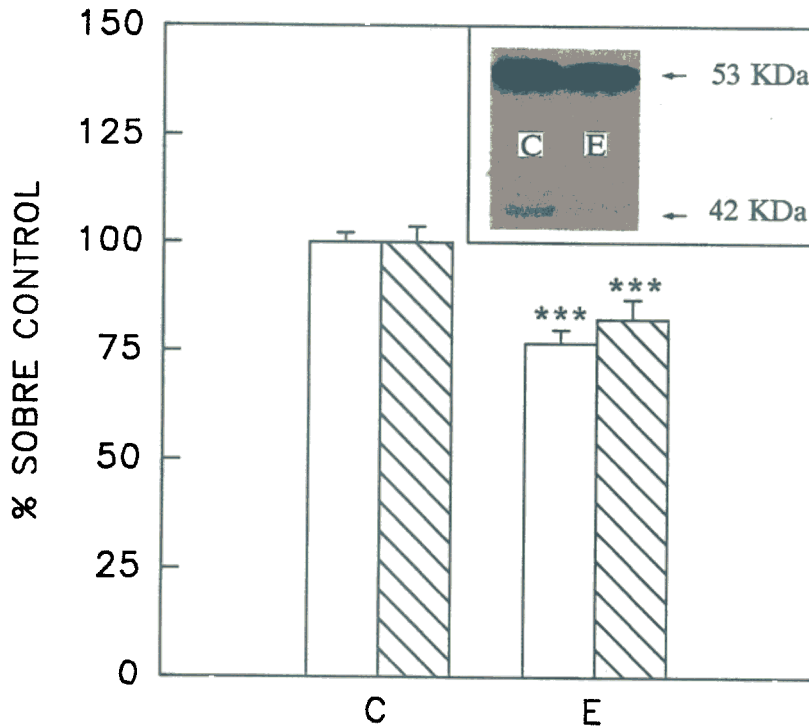


Figura 33. Niveles de  $\alpha_2$  medidos por inmunodetección en preparados de membrana de ventrículo izquierdo de ratas controles (C) y entrenadas (E). La radiactividad incorporada a la banda de 53 KDa ( $\square$ ) del grupo control fue de  $2586 \pm 60$  cpm, y de  $271.6 \pm 10.2$  cpm para la banda de 42 KDa ( $\text{hatched}$ ). (\*\*\*) diferencias significativas entre los dos grupos para  $p < 0.005$ .

Los niveles de las dos formas de subunidad  $\alpha_2$  se han determinado mediante cuantificación de las bandas inmunodetectadas por el anticuerpo. En la Figura 33 se puede observar cómo se produce un descenso significativo en los niveles de las formas de alta y baja masa molecular, siendo este descenso del mismo orden para ambas,  $76.77 \pm 3.01\%$  con respecto a los controles para la forma de 53 KDa y  $82.3 \pm 4.56$  para la de 42 KDa.

### 3.2.3.4 Niveles de $\alpha_i$

Se ha descrito la existencia en el miocardio de los tres subtipos que se conocen de  $\alpha_i$ , si bien  $\alpha_{i2}$  es la forma predominante, siendo sus niveles aproximadamente iguales a dos veces la suma de los niveles de  $\alpha_{i1}$  y  $\alpha_{i3}$  (Foster et al., 1990).

En este estudio hemos empleado anticuerpos policlonales anti  $\alpha_{i1}$ ,  $\alpha_{i1,2}$  y  $\alpha_{i3}$ . De los tres anticuerpos, sólo el anti  $\alpha_{i1,2}$  reconoce en las membranas de nitrocelulosa una proteína de 40 KDa de masa molecular. Puesto que no se detecta señal alguna en las membranas incubadas con anti  $\alpha_{i1}$ , posiblemente debido a sus bajos niveles, y que con el anticuerpo  $\alpha_{i1,2}$  tan sólo reconocemos una banda, ésta la hemos identificado como la proteína  $\alpha_{i2}$ .

Los niveles de  $\alpha_{i2}$  se determinan mediante la cuantificación de la radioactividad incorporada en la banda que reconoce el anticuerpo. Su variación se recoge en la Figura 34, en la que se puede observar que en miocardio de animales que han realizado ejercicio se ha producido un aumento del 25% en los niveles de  $\alpha_{i2}$  con relación a sus controles.

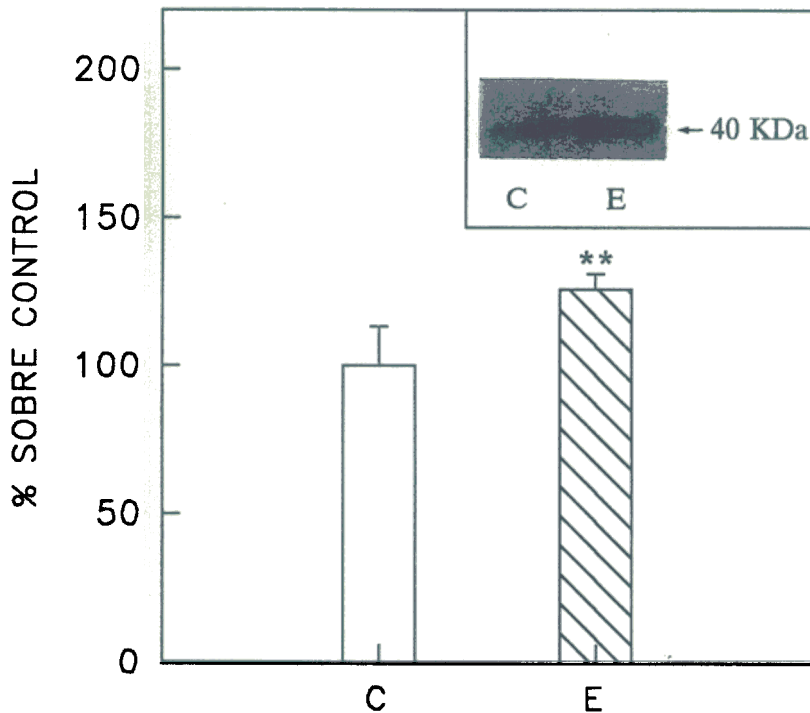


Figura 34. Niveles de  $\alpha_{i1,2}$  medidos por inmunodetección en preparados de membrana de ventrículo izquierdo de ratas controles (□) y entrenadas (▨). La radioactividad incorporada a la banda de 40 KDa del bloque control fue de  $257.5 \pm 33.5$  cpm. (\*\*) diferencias significativas entre los dos grupos para  $p < 0.01$ .

### 3.2.3.5 Niveles de la subunidad $\beta$

Mediante técnicas de inmunodetección, empleando un anticuerpo obtenido específicamente contra un segmento deca péptido interno de la secuencia de las subunidades  $\beta$ , se han determinado los niveles de expresión de la misma. El objetivo de este estudio radicaba en comprobar si como consecuencia de la adaptación del miocardio al ejercicio físico se produce una variación en los niveles de la subunidad  $\beta$ , tal y como sucede con los de las subunidades  $\alpha$ , y  $\alpha_i$ .

En la Figura 35 se muestra como en el miocardio no hemos medido variación alguna en los niveles de esta proteína con el ejercicio físico. Estos resultados indican que en este tejido las modificaciones observadas en los niveles de ADP-ribosilación por toxina pertussis y colérica, y en la regulación de adenilato ciclasa a través de  $G_i$  serían exclusivamente atribuibles a variaciones en las subunidades  $\alpha$ .

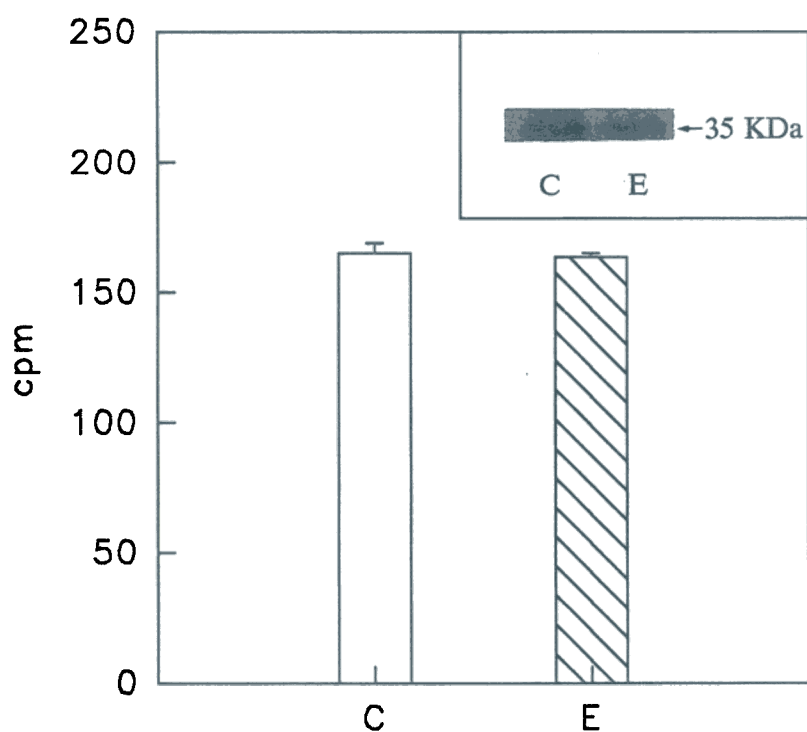


Figura 35. Niveles de subunidad  $\beta$  de las proteínas G medidos por inmunodetección en membranas de corazón de animales controles (□) y entrenados (▨).

### 3.3 INFLUENCIA DEL EJERCICIO FÍSICO SOBRE EL SISTEMA $\beta$ -ADRENÉRGICO-ADENILATO CICLASA EN HIGADO DE RATA

#### 3.3.1 Receptores $\beta$ -adrenérgicos

Se han realizado ensayos de unión de ligandos (empleando ICYP) a membranas de hígado de los dos bloques de ratas, y a partir de los resultados obtenidos se ha determinado el valor de la constante de disociación ( $K_d$ ) y de la densidad ( $B_{max}$ ) de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos. La unión del ligando a los preparados de membrana es saturable y muy específica (20-25% de unión inespecífica, datos no mostrados).

En la Figura 36 se muestran las representaciones de Scatchard que se obtienen con los datos de unión específica. Como se observa en la figura, las nubes de puntos obtenidas para los dos bloques de animales se superponen en todos los experimentos que se han realizado, de modo que al ajustarlas a una recta, no se observan diferencias ni en la densidad de receptores ni en la constante de disociación por el antagonista de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos de membranas de hígado de las ratas entrenadas y sus respectivos controles, datos que se reflejan en la TABLA VII.

#### 3.3.2 Regulación del sistema de adenilato ciclasa de hígado

##### 3.3.2.1 Características reguladoras generales de la vía estimuladora del sistema

Al igual que se ha hecho en miocardio de rata, se ha ensayado la actividad de adenilato ciclasa en presencia de moduladores específicos de los diferentes componentes del sistema.

Cuando se mide la actividad basal de la enzima, en presencia de  $Mg^{2+}$  10 mM, no aparecen diferencias significativas entre los dos bloques de animales, como se refleja en la TABLA VIII. En ella se observa también como la actividad específica de adenilato ciclasa estimulada por una concentración saturante de  $Mn^{2+}$ , así como la actividad y la activación promovida por una concentración  $3.5 \times 10^{-5}$  M de forskolina, son mayores en los animales entrenados.

En la TABLA VIII se muestran los resultados obtenidos cuando se ensaya la actividad de la enzima en presencia de GppNHp ( $10^{-5}$ M) y fluoruro (10mM); en ella se puede observar que la actividad específica de la enzima estimulada por estos moduladores y los niveles de activación promovidos por ellos son significativamente mayores en las ratas entrenadas.

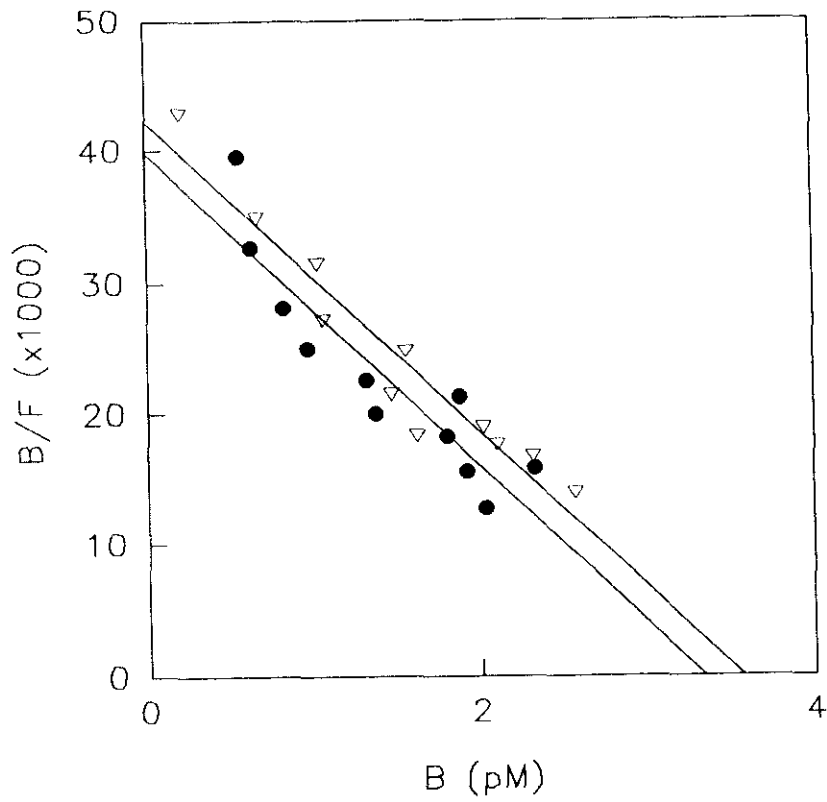


Figura 36. Representación de Scatchard para la unión específica de ICYP a membranas de hígado de ratas controles (●—●) y entrenadas (▽—▽).

TABLA VII. Densidad y afinidad por ICYP de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en membranas de hígado de rata.

	CONTROL	EJERCICIO
Bmax (fmol/mg)	12.13±2.07	11.12±0.06
Kd (pM)	76.2±1.76	76.35±2.35

Los resultados se expresan como la media aritmética de los experimentos realizados  $\pm$  la desviación estándar.

TABLA VIII. Actividad de adenilato ciclasa en preparados de membrana de hígado de rata en presencia de diferentes moduladores

MODULADORES	CONTROL		EJERCICIO	
	(pmol/min/mg prot)	(%)	(pmol/min/mg prot)	(%)
Mg <sup>2+</sup> 10mM	4.54±0.53	100	5.57±0.59	100
Mn <sup>2+</sup> 3mM	12.29±0.12		14.80±0.40 ***	
Mg <sup>2+</sup> 10mM + FK 3.5x10 <sup>-5</sup> M	40.68±0.48	896.2±10.60	56.38±1.48 ***	1012.3±26.6 ***
Mg <sup>2+</sup> 10mM + GTP 10 <sup>-5</sup> M	5.37±0.30	118.3±6.60	6.50±0.27 *	116.7±4.8
Mg <sup>2+</sup> 10mM + F <sup>-</sup> 10mM	32.05±0.49	706.1±10.80	45.10±0.72 ***	809.8±12.9 ***
Mg <sup>2+</sup> 10mM + GppNHp 10 <sup>-5</sup> M	19.28±1.12	424.8±24.67	27.77±1.28 ***	498.5±22.9 ***
Mg <sup>2+</sup> 10mM + GTP 10 <sup>-5</sup> M + ISO 10 <sup>-7</sup> M	5.38±0.17	118.7±37.8	7.26±0.13 ***	130.5±2.3 ***
Mg <sup>2+</sup> 10mM + GTP 10 <sup>-5</sup> M + ISO 5x10 <sup>-5</sup> M	6.72±0.25	148.0±5.50	8.92±0.28 ***	160.1±5.0 ***
Mg <sup>2+</sup> 10mM + GTP 10 <sup>-5</sup> M + GLU 3x10 <sup>-7</sup> M	20.39±1.14	449.2±25.1	29.69±1.88 ***	533.2±33.8 ***
Mg <sup>2+</sup> 10mM + GTP 10 <sup>-5</sup> M + GLU 10 <sup>-6</sup> M	27.29±0.80	601.1±17.6	37.72±0.36 ***	677.2±6.5 ***

FK, forskolina; GTP, guanosina 5'-trifosfato; F<sup>-</sup>, fluoruro; GppNHp, guaninilimidodifosfato; ISO, isoproterenol; GLU, glucagón. Diferencias significativas respecto a los correspondientes controles con: \* P<0.05, \*\* P<0.01 y \*\*\* P<0.005.

También se ha ensayado la actividad de la enzima en presencia de isoproterenol y glucagón como indicadores de la estimulación vía receptor. Los resultados obtenidos se reflejan en la TABLA VIII, y como se puede observar se produce un aumento significativo de la actividad y activación de la enzima tanto para una concentración subsaturante como saturante de estos dos agonistas.

### 3.3.2.2 Características reguladoras de la subunidad catalítica

Cuando se ensaya la actividad de la enzima en presencia de concentraciones crecientes de  $Mn^{2+}$ , catión divalente estimulador más potente de la subunidad catalítica, se obtienen las curvas que se representan en la Figura 37. Como se puede observar, en el intervalo de concentraciones 2.5 mM - 5 mM de  $Mn^{2+}$  la actividad enzimática es significativamente superior en los preparados de membranas de hígado de los animales que han llevado a cabo ejercicio. Como se refleja en la Figura 38, un resultado similar se obtiene cuando se mide la actividad de la enzima en presencia de diferentes concentraciones de forskolina, puesto que para el intervalo 15-35  $\mu M$ , la actividad específica de la enzima es significativamente mayor ( $p < 0.005$ ) en el hígado de las ratas entrenadas que en sus respectivos controles. Luego, con el ejercicio físico, parecen aumentar los niveles y/o funcionalidad de la subunidad catalítica de adenilato ciclasa en tejido hepático.

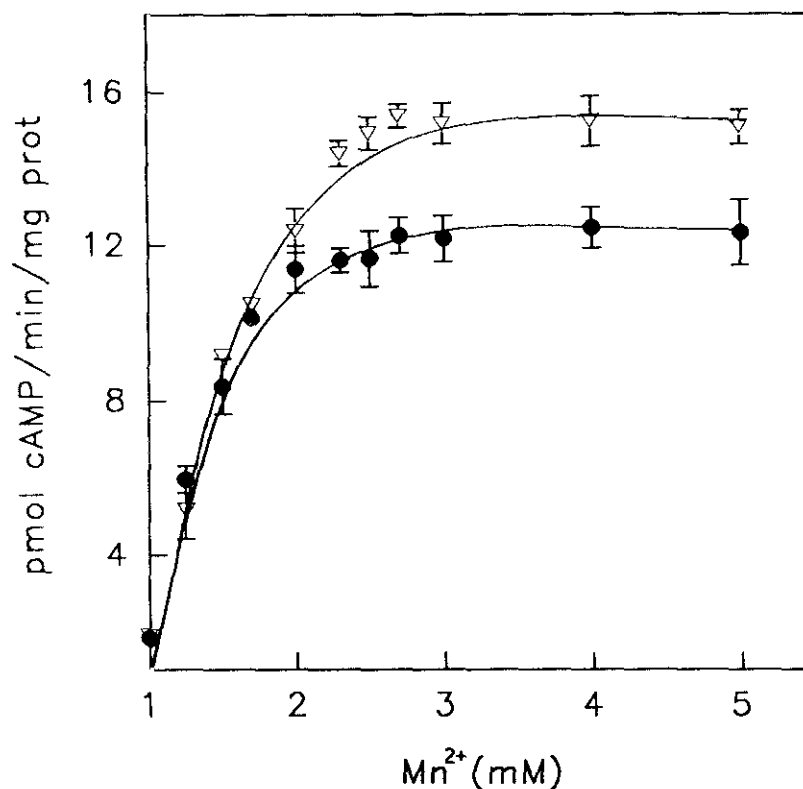


Figura 37.

Actividad de la adenilato ciclasa en presencia de  $Mn^{2+}$  en preparados de membranas de hígado de ratas control (●—●) y entrenadas (▽—▽). Las diferencias que se observan en el intervalo de concentraciones 2.5mM - 5mM entre los dos bloques de animales son significativas para  $p < 0.005$ .

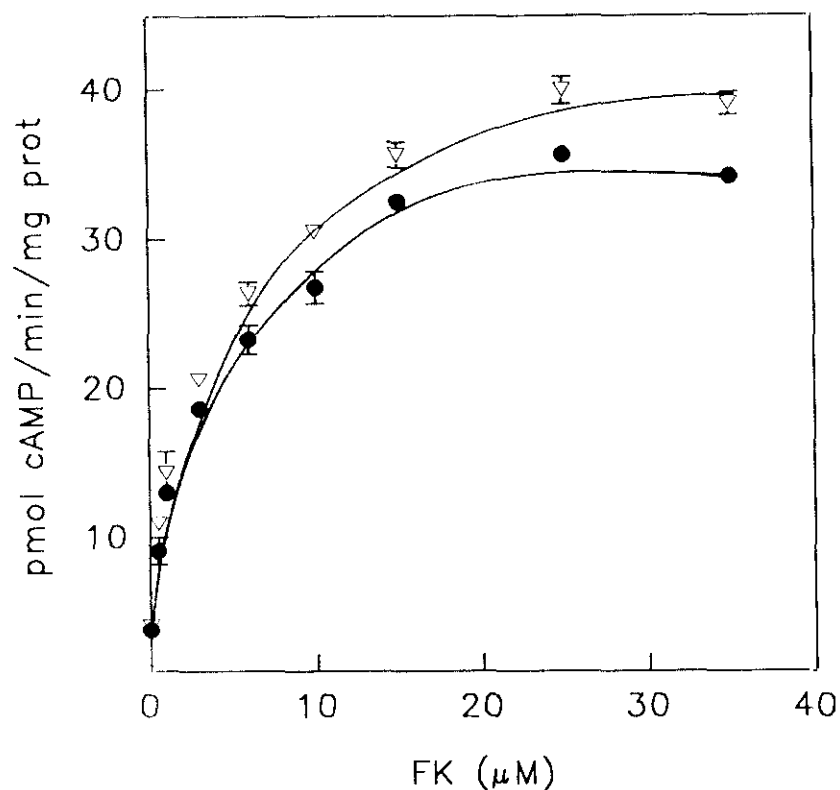


Figura 38. Actividad de la adenilato ciclasa en presencia de  $Mg^{2+}$  (10mM) y forskolina (FK) en preparados de membranas de hígado de animales controles (●—●) y entrenadas (▽—▽). Las diferencias que se observan en el intervalo de concentraciones 15-35  $\mu M$  entre los dos bloques de animales son significativas para  $p < 0.005$ .

### 3.3.2.3 Regulación a través de la proteína $G_i$ independiente de receptor

También se ha medido la actividad de la adenilato ciclasa en presencia de concentraciones crecientes de GppNHp y fluoruro, que son los activadores más potentes del componente regulador estimulador; los resultados obtenidos se muestran en la Figura 39 A y 39 B respectivamente. El perfil de activación de la enzima por ambos moduladores es similar; con el ejercicio físico se produce un aumento significativo de la activación máxima de la enzima sin que se observen diferencias en la afinidad por estos moduladores, lo que podría estar relacionado con un incremento en los niveles de  $\alpha_s$ .

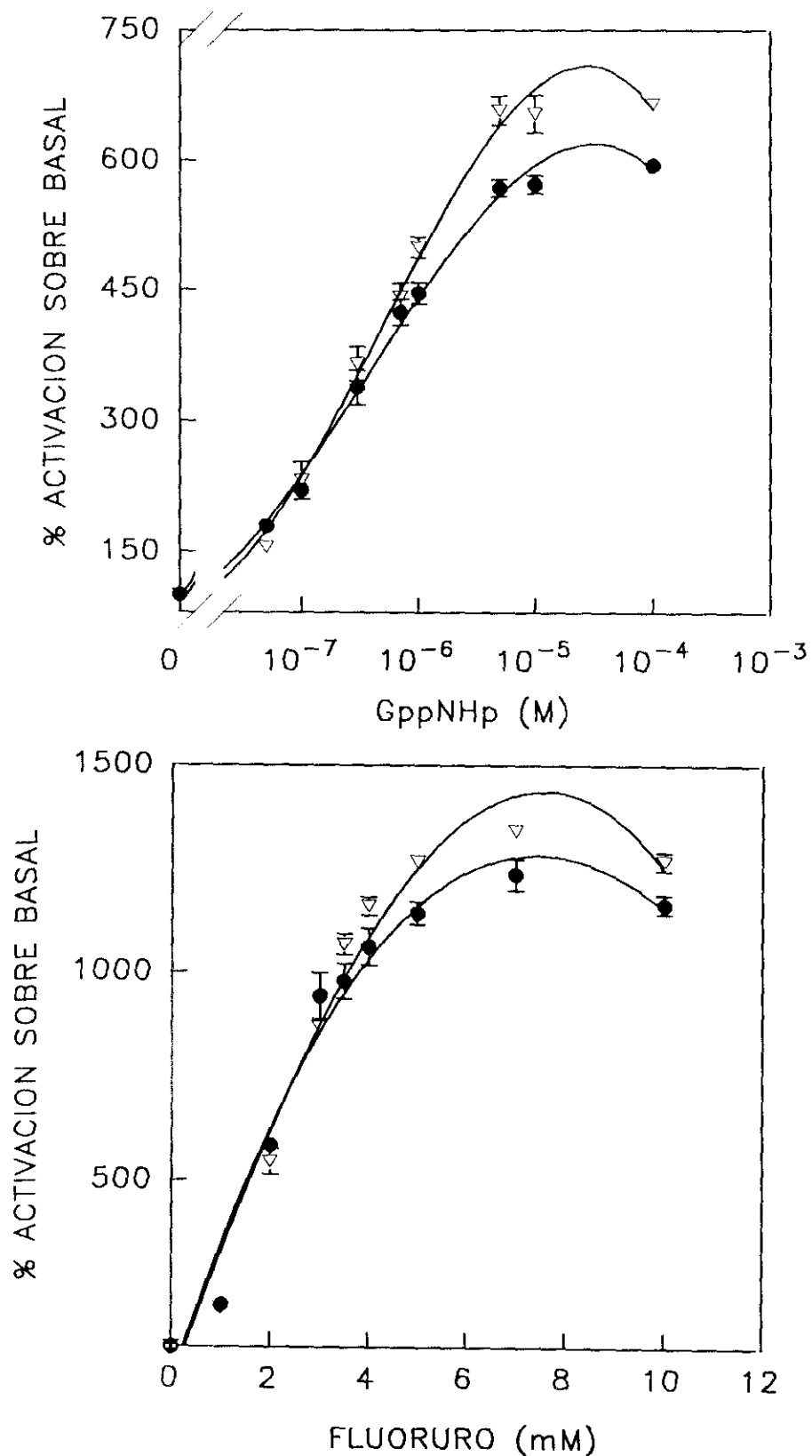


Figura 39.

Activación por GppNHp (A) y fluoruro (B) de la adenilato ciclasa de hígado de ratas controles (●—●) y entrenadas (▽—▽). La actividad basal de la enzima, expresada en pmol cAMP/min/mg prot, fue:  $5.34 \pm 0.226$  en el bloque control y  $5.49 \pm 0.44$  en el bloque entrenado. Las diferencias que se observan en el intervalo de concentraciones  $5 \cdot 10^{-6}$ - $10^{-4}$  M de GppNHp y 5-10 mM de fluoruro entre los dos grupos de animales son significativas para  $p < 0.005$ .

### 3.3.2.4 Regulación por la vía estimuladora $\beta$ -adrenérgica

Cuando se mide la actividad de la enzima en preparados de membranas de hígado en presencia de concentraciones crecientes de isoproterenol se obtienen los resultados que se reflejan en la Figura 40. En ella se observa un desplazamiento de la curva de activación por el agonista hacia la izquierda a la par que se produce un aumento muy significativo en los niveles de activación máxima de la enzima. A partir de estos perfiles se ha determinado el valor de la constante de activación de la enzima por el isoproterenol que cae de aproximadamente  $2 \times 10^{-7} \text{M}$  para el bloque de animales controles a  $7 \times 10^{-8} \text{M}$  para los animales entrenados.

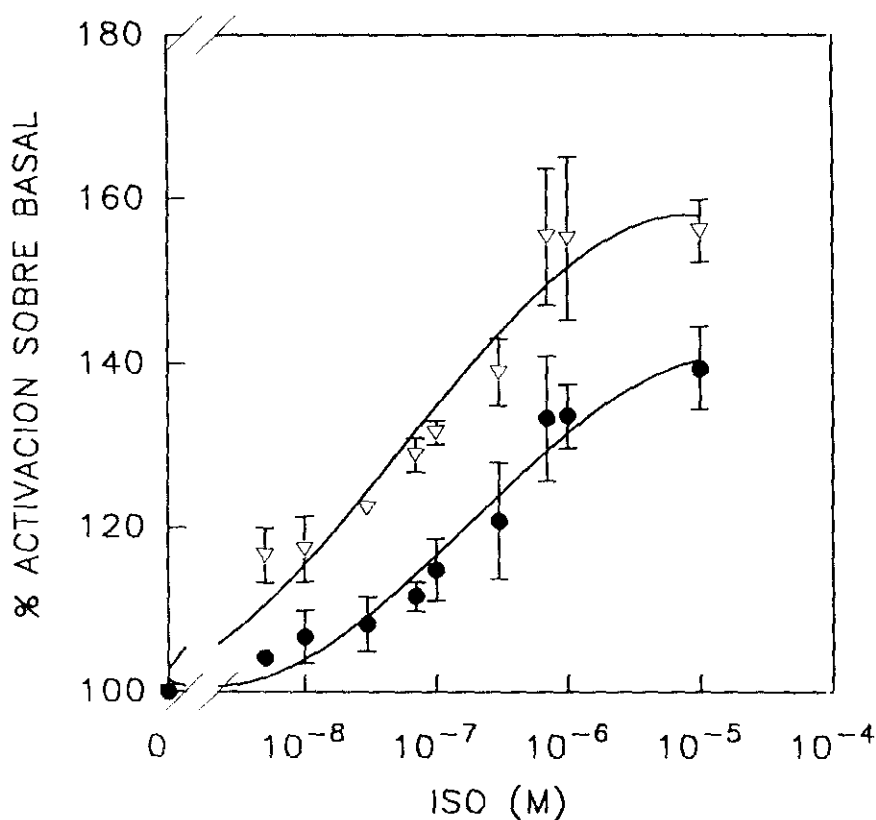


Figura 40.

Activación por isoproterenol (ISO) de la adenilato ciclasa en membranas de hígado. La actividad enzimática se determina en presencia de  $\text{GTP } 10^{-5} \text{M}$ . La actividad basal de la enzima, expresada en  $\text{pmol cAMP/min/mg prot fue}$ :  $4.79 \pm 5.15$  para los animales controles ( $\bullet$ — $\bullet$ ) y  $4.65 \pm 0.25$  para los entrenados ( $\nabla$ — $\nabla$ ). Las diferencias que se observan en el intervalo de concentraciones  $10^{-8}$ - $10^{-5} \text{M}$  entre los dos bloques de ratas son significativas para  $p < 0.005$ .

### 3.3.2.5 Regulación por glucagón

El glucagón, al igual que los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, estimula la glucogenolisis y gluconeogénesis hepática al elevar los niveles de cAMP intracelular producido por el sistema de adenilato ciclasa; pero, como ya se ha desarrollado en la introducción, su papel en el control del metabolismo hepático es mucho más importante que el de los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos. Por este motivo se ha estudiado la funcionalidad del sistema de adenilato ciclasa estimulado por glucagón, y los resultados obtenidos se recogen en la Figura 41. En ella se observa cómo se produce un ligero desplazamiento de la curva de estimulación por glucagón correspondiente a los animales entrenados hacia la izquierda, así como un aumento de la activación máxima de la enzima. Cuando se determina el valor de la constante de activación se comprueba que efectivamente se produce un ligero descenso de la misma ( $1.3 \times 10^{-7} \text{M}$  frente a  $1 \times 10^{-7} \text{M}$ ) en el grupo de ratas entrenadas.

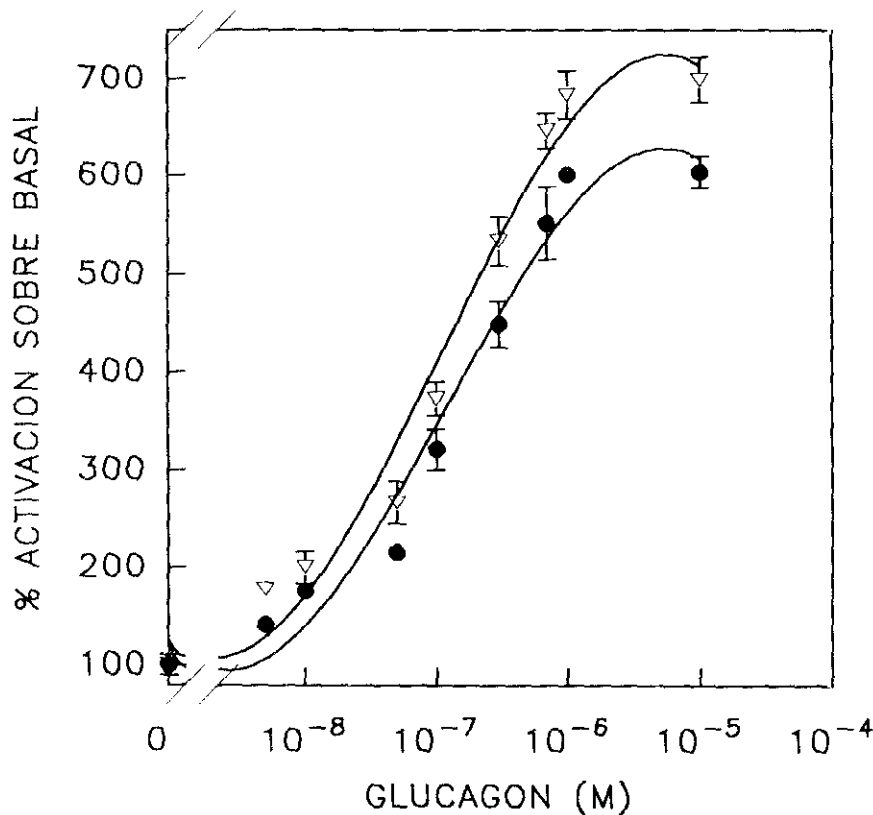


Figura 41.

Activación por glucagón de la adenilato ciclasa en membranas de hígado. La actividad enzimática se determina en presencia de  $\text{GTP } 10^{-5} \text{M}$ . La actividad basal de la enzima, expresada en  $\text{pmol cAMP/min/mg prot}$  fue:  $5.04 \pm 0.32$  para los animales controlados (●-●) y  $4.86 \pm 0.50$  para los entrenados (▽-▽). Las diferencias que se observan en el intervalo de concentraciones  $5 \times 10^{-8}$ - $10^{-4} \text{M}$  entre los dos bloques de ratas son significativas para  $p < 0.005$ .

### 3.3.2.6 Regulación por la vía inhibidora $\alpha_2$ -adrenérgica

Está descrito que los agonistas adrenérgicos, vía receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, son capaces de inhibir la actividad de la adenilato ciclasa (Jard *et al.*, 1981).

Se ha estudiado la posible existencia de diferencias entre los dos bloques de animales en este sistema de control negativo de la actividad de la adenilato ciclasa, y para ello se ha determinado la actividad enzimática en presencia de concentraciones crecientes de adrenalina y de una concentración 30  $\mu$ M del  $\beta$ -bloqueante propranolol. El resultado obtenido se muestra en la Figura 42 y como se puede observar, a concentraciones elevadas de agonista ( $10^{-4}$ - $5 \times 10^{-4}$ M) aparece una ligera diferencia, estadísticamente significativa, en los niveles de inhibición medidos en los animales entrenados (20%) respecto a sus controles (15%), dato similar al reflejado en la TABLA IX. No se aprecia una modificación de la constante de inhibición de la enzima por adrenalina.

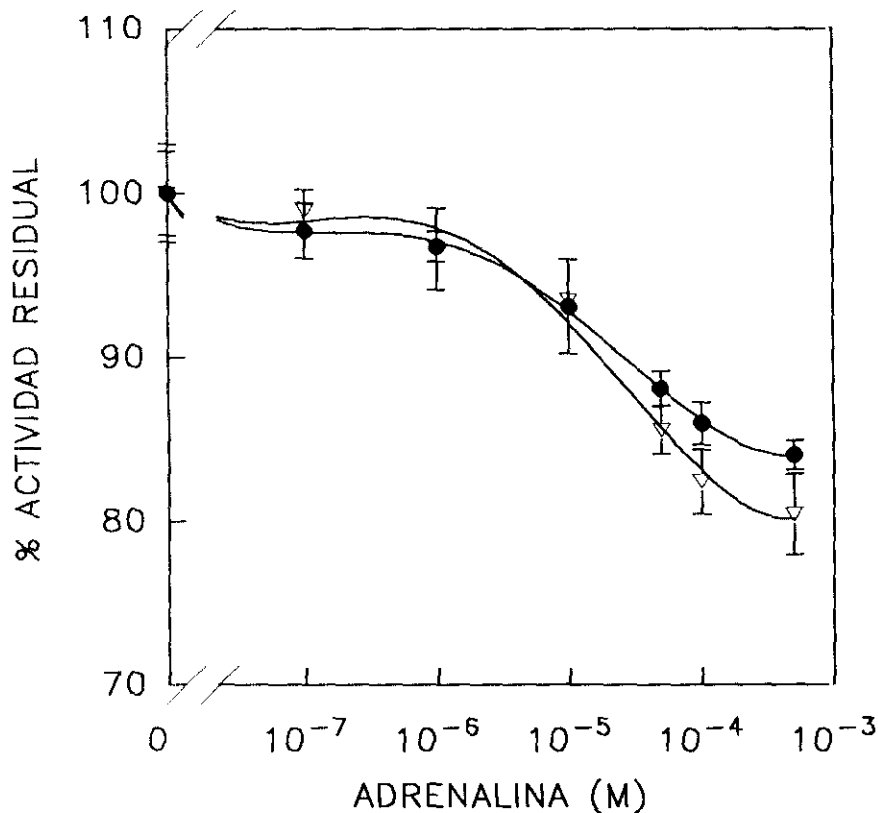


Figura 42.

Efecto de la adrenalina sobre la actividad de adenilato ciclasa de hígado. La actividad enzimática se ensaya en presencia de isoproterenol y GTP 1 $\mu$ M. La actividad basal de la enzima, expresada en pmol cAMP/min/mg prot fue:  $15.85 \pm 0.653$  para las ratas controles (●-●) y  $18.58 \pm 0.4$  para las entrenadas (▽-▽). Las diferencias que se observan en el intervalo de concentraciones  $10^{-4}$ - $5 \times 10^{-4}$  M entre los dos bloques de animales son significativas para  $p < 0.005$ .

TABLA IX. Actividad de adenilato ciclasa en preparados de membrana de hígado de rata en presencia de diferentes moduladores

MODULADORES	CONTROL		EJERCICIO	
	(pmol/min/mg prot)	(%)	(pmol/min/mg prot)	(%)
Mg <sup>2+</sup> 3mM + GTP 10 <sup>-6</sup> M + GLU 10 <sup>-6</sup> M	21.71±0.54	100	24.26±1.14 *	100
Mg <sup>2+</sup> 3mM + GTP 10 <sup>-6</sup> M + GLU 10 <sup>-6</sup> M + ADR 5x10 <sup>-4</sup> M	18.23±0.15	84.0±0.71	19.50±0.68 *	80.4±2.8 *
Mg <sup>2+</sup> 3mM + GTP 10 <sup>-6</sup> M + GLU 10 <sup>-6</sup> M + AII 10 <sup>-6</sup> M	18.82±0.81	86.7±3.75	19.88±0.11 *	81.9±0.5 *

ADR, adrenalina; AII, angiotensina II. Diferencias significativas respecto a los correspondientes controles con: \* P<0.05, \*\* P<0.01 y \*\*\* P<0.005.

### 3.3.2.7 Otras vías de control negativo del sistema

En hígado de rata también existen receptores de angiotensina II acoplados negativamente al sistema de adenilato ciclasa (*Jard et al., 1981* y *Wong et al., 1992*). Se ha estudiado la regulación de la actividad enzimática, por esta vía inhibidora, en membranas de hígado de los dos bloques de animales en presencia de una concentración saturante de angiotensina II. Los resultados obtenidos parecen indicar que, al igual que sucede para la vía adrenérgica de control negativo del sistema, se produce un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en los niveles de inhibición en los animales entrenados, datos recogidos en la TABLA IX.

Cuando en los ensayos se emplea (Asn<sub>1</sub>-Val<sub>8</sub>)-angiotensina II, un análogo de angiotensina II, los resultados obtenidos (datos no mostrados) son equivalentes a los descritos para la angiotensina II.

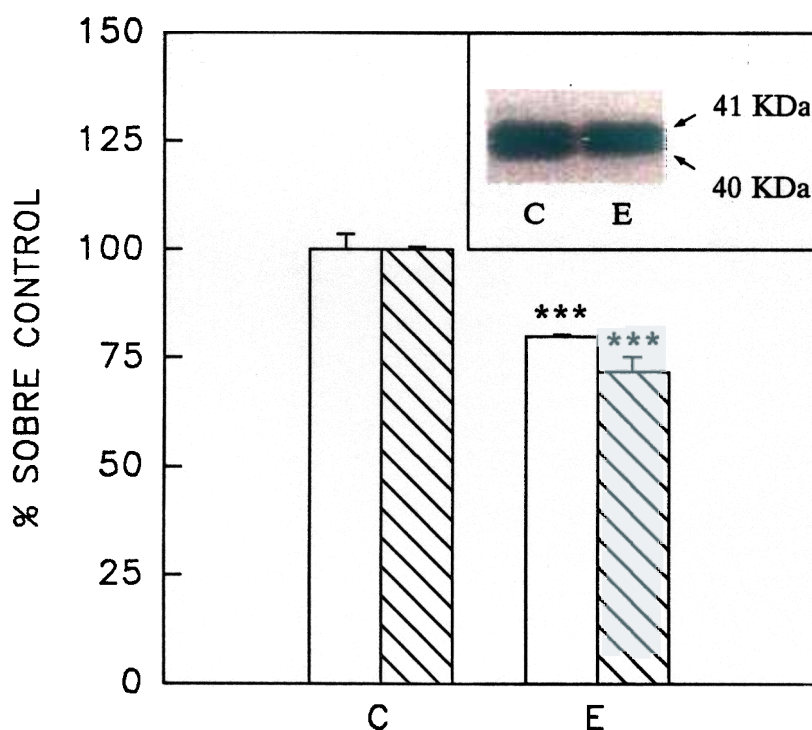


Figura 43.

Niveles de ADP-ribosilación catalizada por toxina pertussis en preparados de membrana de hígado de animales controles (C) y entrenados (E). La radiactividad incorporada a la banda de 41 KDa (□) del grupo control fue de  $421 \pm 15$  cpm, y de  $357.5 \pm 1.5$  cpm para la banda de 40 KDa (▨). (\*\*\*) diferencias significativas entre los dos grupos para  $p < 0.005$ .

### 3.3.3 Proteínas G

#### 3.3.3.1 ADP-ribosilación por toxina pertussis

Los estudios de ADP-ribosilación con toxina pertussis, en preparados de membrana de hígado, permiten detectar la existencia de al menos dos sustratos que son modificados covalentemente, y que tienen 40 KDa y 41 KDa de masa molecular. En la Figura 43 se recoge la variación en los niveles de ADP-ribosilación de estas dos formas en membranas de hígado de ratas entrenadas y de sus respectivos controles. Los niveles de los sustratos ADP-ribosilados disminuyen considerablemente en los animales que han llevado a cabo ejercicio físico, siendo este descenso de un 29% para la banda de 40 KDa y del 20% para la de 41 KDa.

#### 3.3.3.2 ADP-ribosilación por toxina colérica

Estos estudios, al igual que los de ADP-ribosilación catalizada por toxina de *Bordetella pertussis*, permiten detectar dos sustratos mayoritarios de modificación covalente en preparados de membrana de hígado, con masas moleculares de 42 KDa y 46 KDa.

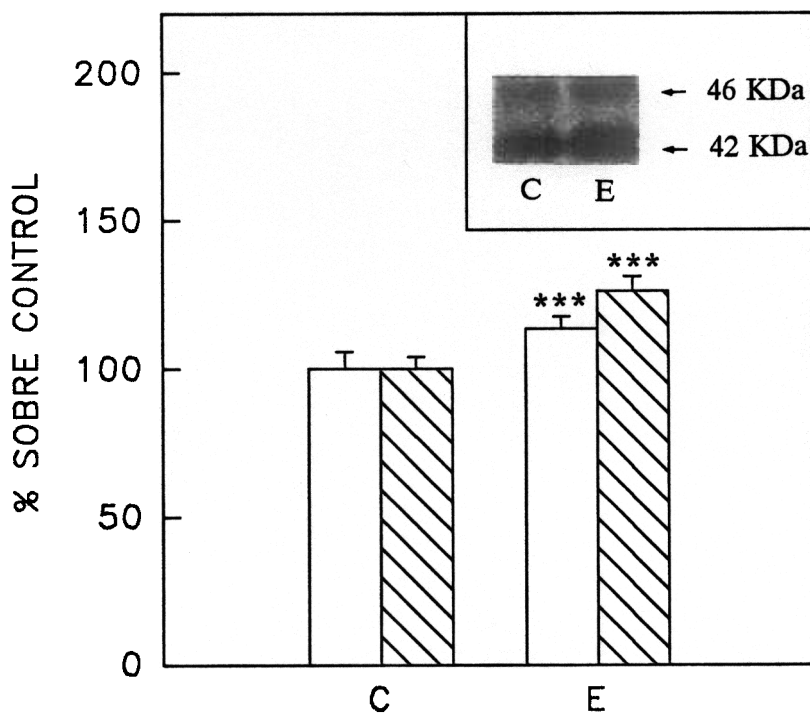


Figura 44. Niveles de ADP-ribosilación catalizada por toxina colérica en preparados de membrana de hígado de animales controles (C) y entrenados (E). La radiactividad incorporada a la banda de 46 KDa (□) del grupo control fue de  $209.6 \pm 12.04$  cpm, y de  $299.3 \pm 12.01$  cpm para la banda de 42 KDa (▨). (\*\*\*) diferencias significativas entre los dos grupos para  $p < 0.005$ .

En la Figura 44 se puede observar que en animales entrenados, los niveles de ADP-ribosilación catalizada por toxina de *Vibrio cholerae* aumentan significativamente ( $p < 0.005$ ) respecto a sus controles, siendo este aumento de un 26% para la banda de menor peso molecular y de tan sólo un 13% para la de 46 KDa.

### 3.3.3.3 Niveles de $\alpha_s$

Se han determinado los niveles de las diferentes formas de  $\alpha_s$ , mediante técnicas de inmunodetección, empleando un anticuerpo policlonal específico. Este anticuerpo es capaz de reconocer en nuestro preparado de membranas dos proteínas de 42 KDa y 46 KDa de masa molecular, que se corresponden con las dos formas de  $\alpha_s$ , descritas en la bibliografía (*Begin-Heick y Mc Farlane-Anderson, 1992*).

Los resultados obtenidos al cuantificar la radioactividad incorporada a las dos bandas marcadas se representan en la Figura 45 y como se puede observar, al igual que sucedía para los niveles de ADP-ribosilación por toxina colérica, se ha medido un aumento significativo de los niveles de la forma de 42 KDa y de la de 46 KDa. Este incremento es mayor para la banda de 42 KDa como también se ha observado para los niveles de ADP-ribosilación por toxina colérica.

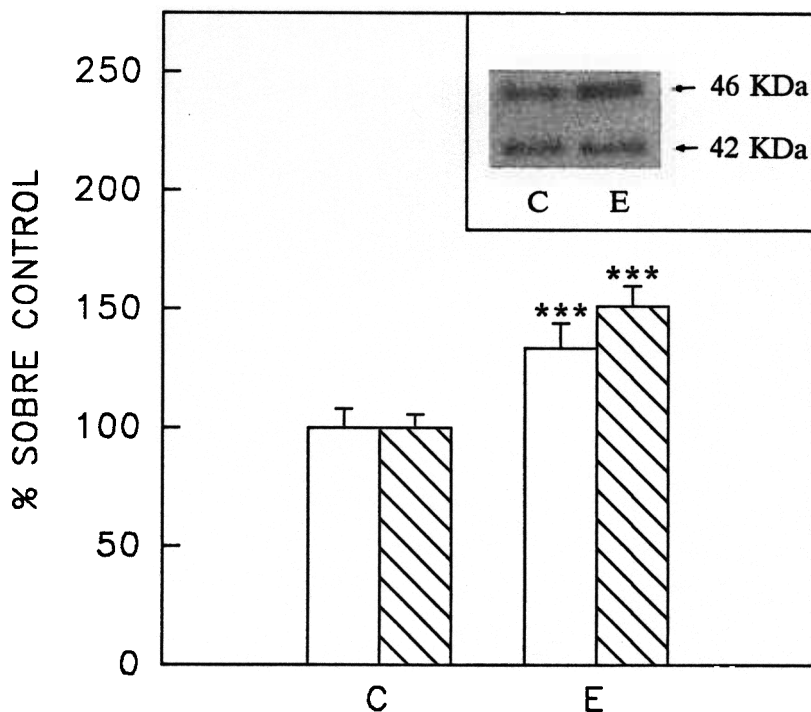


Figura 45.

Niveles de  $\alpha_s$  medidos por inmunodetección en preparados de membrana de hígado de ratas controles (C) y entrenadas (E). La radioactividad incorporada a la banda de 46 KDa ( $\square$ ) del bloque control fue de  $292.7 \pm 23.4$  cpm, y de  $281.5 \pm 15.7$  cpm para la banda de 42 KDa ( $\text{hatched}$ ). (\*\*\*) diferencias significativas entre los dos grupos para  $p < 0.005$ .

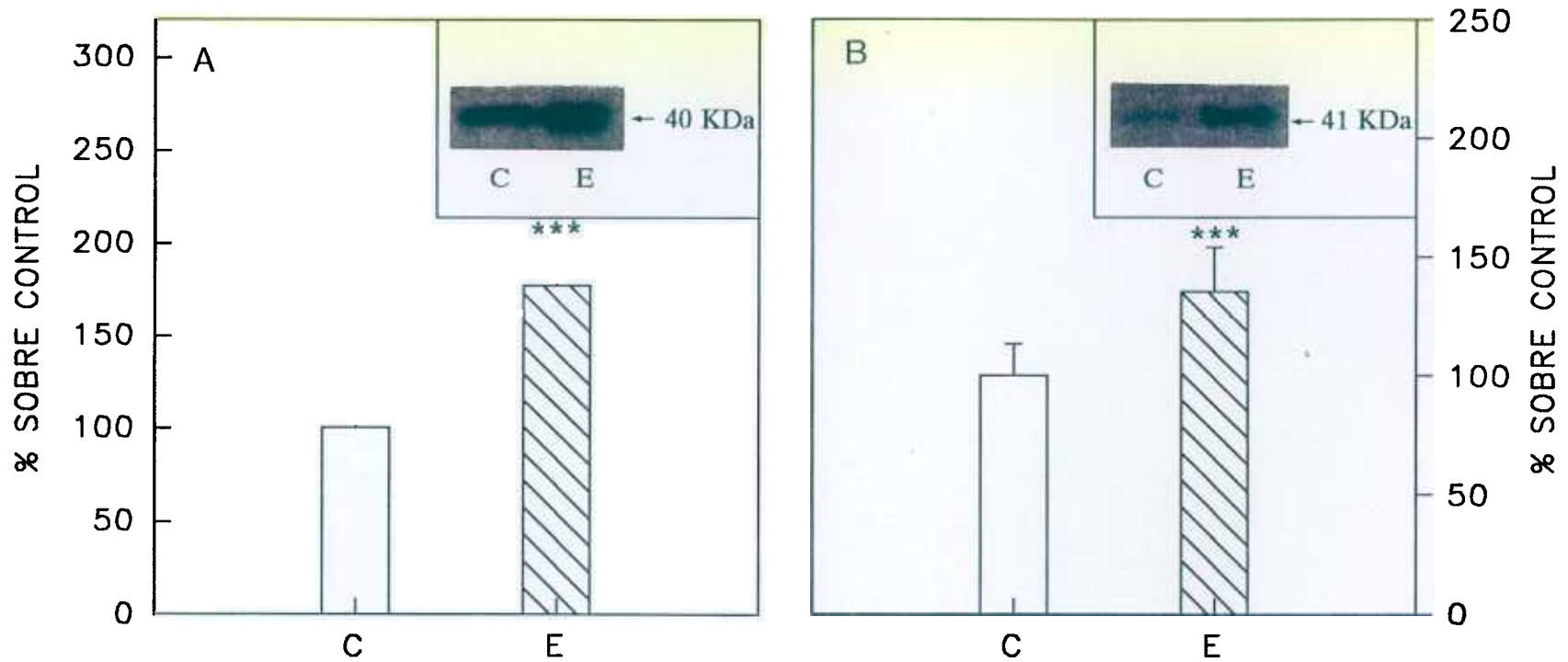


Figura 46.

Niveles de  $\alpha_{i1,2}$  (A) y  $\alpha_{i3}$  (B) medidos por inmunodetección en preparados de membranas de hígado de animales controles (C) y entrenados (E). La radiactividad incorporada fue de  $440.8 \pm 61.8$  (A) y  $268 \pm 35.7$  (B) en las membranas del grupo control ( $\square$ ). (\*\*\*) diferencias significativas entre los dos grupos para  $p < 0.005$ .

### 3.3.3.4 Niveles de $\alpha_i$

En la bibliografía está descrita la existencia de dos formas de  $\alpha_i$  ( $\alpha_{i2}$  y  $\alpha_{i3}$ ) en hígado de rata (*Begin-Heick y Mc Farlane-Anderson, 1992*).

En este estudio se han empleado anticuerpos anti  $\alpha_{i1}$ ,  $\alpha_{i1,2}$  y  $\alpha_{i3}$ . Sólo hemos obtenido señal con los dos últimos, lo que corrobora la ausencia de la proteína  $\alpha_{i1}$  en membranas de hígado de rata. Los resultados obtenidos con los dos anticuerpos se representan en la Figura 46. En la parte A de la figura se puede observar cómo el anticuerpo anti  $\alpha_{i1,2}$  reconoce una sola banda de proteína cuando se le incuba con las membranas de nitrocelulosa. En esta figura también se puede observar cómo los niveles de esta proteína ( $\alpha_{i2}$ ), de 40 KDa de masa molecular, aumentan en un 75% en las membranas obtenidas a partir de tejido hepático de ratas entrenadas.

Cuando las membranas de nitrocelulosa se incuban con el anticuerpo específico frente a  $\alpha_{i3}$  se reconoce, también, una sola banda de 41 KDa de masa molecular. En la Figura 46 B se observa cómo los niveles de esta forma de  $\alpha_i$  aumentan un 67% en las membranas de hígado de ratas entrenadas con respecto a sus controles sedentarios.

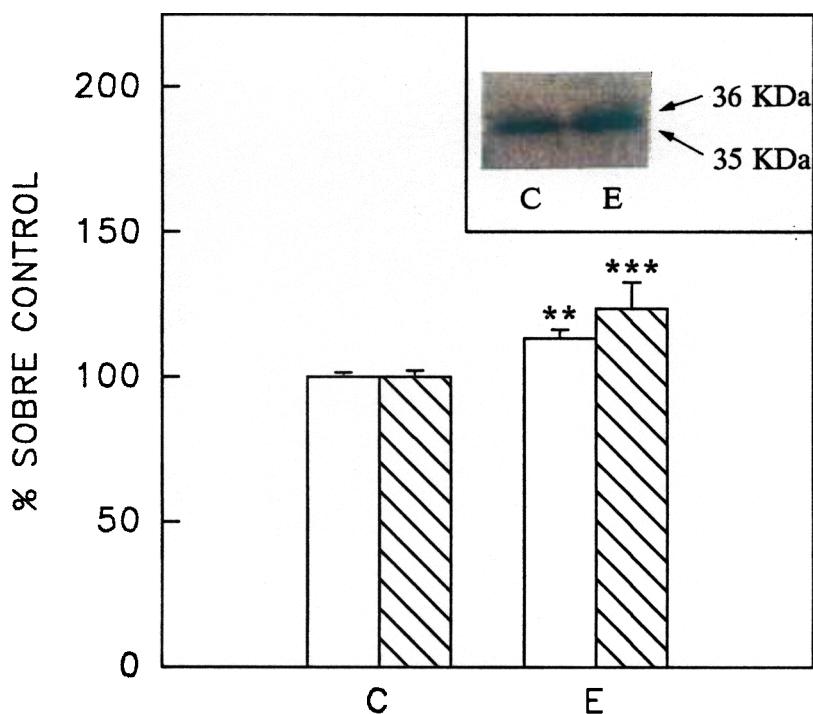


Figura 47.

Niveles de subunidad B de las proteínas G medidos por inmunodetección en membranas de hígado de animales controles (C) y entrenados (E). La radiactividad incorporada a la banda de 36 KDa ( $\square$ ) fue de  $158.25 \pm 2.5$  cpm para el bloque control, y de  $371.3 \pm 19.7$  cpm para la banda de 35 KDa ( $\text{hatched}$ ). (\*\*) y (\*\*\*) diferencias significativas entre los dos grupos para  $p < 0.01$  y  $p < 0.005$  respectivamente.

### 3.3.3.5 Niveles de la subunidad $\beta$

En preparados de membrana de tejido hepático de rata se detectan dos proteínas, de 35 KDa y 36 KDa de masa molecular, mediante el empleo de un anticuerpo específico anti subunidad  $\beta$ . Estas dos formas que se reconocen de la subunidad  $\beta$  son las que está descrito que existen en hígado (*Begin-Heick y Mc Farlane-Anderson, 1992*).

Mediante la cuantificación de la radiactividad incorporada, en las bandas que reconoce el anticuerpo, se ha determinado los niveles de las dos formas de la subunidad  $\beta$  en membranas de hígado de ratas que han llevado a cabo ejercicio y de animales control. La variación de los mismos se recoge en la Figura 47, en ella se puede observar cómo se produce un incremento notable de los niveles de la forma de 35 KDa y de la de 36 KDa en el hígado de las ratas entrenadas, siendo este aumento de un 25% para la banda de menor peso molecular.

## 3.4 INFLUENCIA DEL EJERCICIO FÍSICO SOBRE EL SISTEMA $\beta$ -ADRENÉRGICO-ADENILATO CICLASA EN TEJIDO ADIPOSO DE RATA

### 3.4.1 Selección del preparado de membranas

En el apartado 2.2.3. de los Materiales y Métodos se describen dos procedimientos diferentes para la obtención del preparado de fracción particulada de tejido adiposo, el método descrito por *Belsham et al., (1980)* que supone la preparación de las membranas directamente a partir del tejido (sin aislar previamente los adipocitos), y el método de *Rodbell, (1964)* que implica el aislamiento de las células grasas y su posterior rotura para obtener la suspensión de las membranas.

Mediante el empleo de técnicas de electroforesis en geles de poliacrilamida con fines analíticos, *Belsham et al., (1980)* han comprobado que los preparados de membranas obtenidos por su método presentan un patrón de bandas de proteína cualitativamente similar al obtenido en suspensiones de membranas preparadas a partir de adipocitos aislados por el método de *Rodbell (1964)*. No obstante, en nuestro laboratorio hemos medido y comparado en los dos preparados los niveles de actividad y activación de la adenilato ciclasa en presencia de  $Mg^{2+}$  (actividad basal), de GTP+isoproterenol como un índice de la funcionalidad del componente receptor estimulador, y de GppNHp como indicador de la del componente regulador estimulador del sistema. Los resultados de esta comparación se muestran en la TABLA X y como se puede observar, no existen diferencias ni en la actividad, ni en la activación del sistema enzimático a nivel de sus diferentes componentes (catalítico, regulador y receptor) entre los dos preparados de membranas.

TABLA X. Comparación de actividad y activación de adenilato ciclasa de preparados de membranas de tejido adiposo de rata obtenidos por el método de Belsham et al., (1980) a partir de grasa fresca (A) o grasa congelada (B), y a partir de adipocitos previamente aislados por el método de Rodbell, (1964) (C).

	A		B		C	
	(pmol/min/mg)	(%)	(pmol/min/mg)	(%)	(pmol/min/mg)	(%)
Mg <sup>2+</sup> 10mM	11.20±1.60	100	13.69±1.25	100	12.54±0.5	100
Mg <sup>2+</sup> 10mM + GTP 10 <sup>-5</sup> + ISO 5x10 <sup>-5</sup> M	33.48±0.53	229±4.76	39.56±2.90	289±21.24	38.26±1.18	263±8.11
Mg <sup>2+</sup> 10mM + GppNHp 10 <sup>-5</sup> M	49.17±1.47	439±13.14	59.56±5.43	438±39.70	57.86±2.24	398±15.4

Los resultados se expresan como la media aritmética de los animales de cada grupo ± la desviación estándar.

Por otra parte, el rendimiento obtenido en el proceso de preparación de membranas es mucho mayor cuando se sigue el método de Belsham que cuando se obtiene la fracción particulada a partir de adipocitos previamente aislados.

Además, *Mazancourt et al.*, (1991) han descrito que en adipocitos aislados puede estar alterada la interacción entre la subunidad  $\alpha_1$  de  $G_i$  y la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa como consecuencia de la digestión del tejido con la colagenasa.

La consideración conjunta de todos estos resultados nos hizo decidimos por la utilización del método de *Belsham et al.*, (1980) en todos los experimentos que se presentan en esta memoria.

### 3.4.2 Receptores $\beta$ -adrenérgicos

Se ha determinado la densidad y constante de disociación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos de tejido adiposo mediante ensayos de unión de ICYP a preparados de membranas de los dos bloques de animales. Es igual que sucede en corazón e hígado, la unión del antagonista marcado es saturable y específica (unión inespecífica inferior al 15%).

Los resultados obtenidos en estos experimentos, después de ser sometidos a una transformación lineal se representan en la Figura 48. Como se puede observar, el punto de corte con el eje de abscisas está desplazado hacia la derecha en los preparados de membranas de ratas entrenadas. Este resultado indica que se produce un aumento significativo, del 26%, en el número de sitios de unión como consecuencia de la adaptación del tejido adiposo al ejercicio físico, tal y como se refleja en la TABLA XI.

En cuanto a la  $K_d$  de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, de la observación de la Figura 48 se puede afirmar que, puesto que no varía la pendiente de las representaciones de Scatchard de los dos bloques de estudio, ésta no sufre modificación en los animales que han llevado a cabo ejercicio como se muestra en la TABLA XI.

### 3.4.3 Regulación del sistema de adenilato ciclasa

#### 3.4.3.1 Características reguladoras generales de la vía estimuladora del sistema

Se ha ensayado la actividad de la adenilato ciclasa, al igual que ya se ha descrito en corazón e hígado, en presencia de  $Mg^{2+}$  (actividad basal),  $Mn^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ /forskolina, para determinar si la actividad del componente catalítico del sistema varía como respuesta de los procesos adaptativos del tejido adiposo al ejercicio.

Cuando se mide la actividad enzimática en presencia de concentraciones saturantes de  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$  los resultados obtenidos, como se refleja en la TABLA XII, son similares. Con

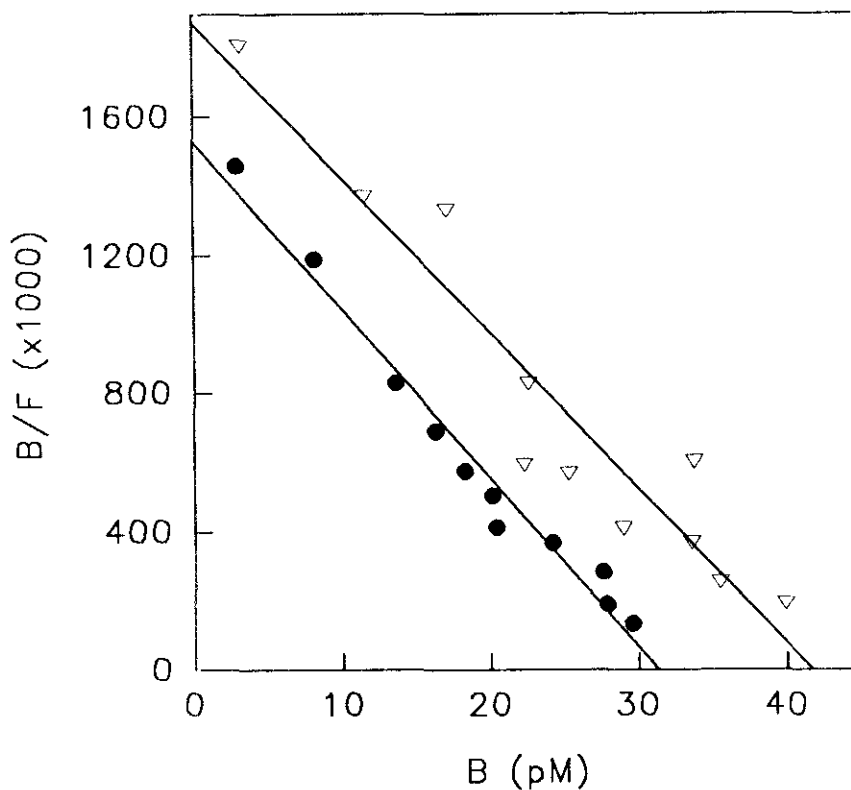


Figura 48. Representación de Scatchard para la unión específica de ICYP a membranas de tejido adiposo de ratas controles (●—●) y entrenadas (▽—▽).

TABLA XI. Densidad y afinidad por ICYP de los receptores β-adrenérgicos en membranas de tejido adiposo de rata.

	CONTROL	EJERCICIO
Bmax (fmol/mg)	117.66 ± 5.76	147.85 ± 1.15 *** (125.66 ± 0.97%)
Kd (pM)	17.02 ± 3.45	18.47 ± 3.73

Los resultados se expresan como la media aritmética de los experimentos realizados ± la desviación estándar. Los valores que se presentan entre paréntesis corresponden a los porcentajes de variación con respecto a los controles. Diferencias significativas respecto a los correspondientes controles con: \* P<0.05, \*\* P<0.01 y \*\*\* P<0.005.

TABLA XII. Actividad de adenilato ciclasa en preparados de membrana de tejido adiposo de rata en presencia de diversos moduladores

MODULADORES	CONTROL		EJERCICIO	
	(pmol/min/mg prot)	(%)	(pmol/min/mg prot)	(%)
Mg <sup>2+</sup> 10mM	10.43±0.48	100	13.39±0.40 *	100
Mn <sup>2+</sup> 5mM	25.07±0.80		28.14±0.25 **	
Mg <sup>2+</sup> 10mM + FK 10 <sup>-5</sup> M	54.33±2.33	520.8±22.30	72.25±5.42 ***	539.7±40.5
Mg <sup>2+</sup> 10mM + FK 3.5x10 <sup>-5</sup> M	82.49±9.49	790.7±91.06	105.78±5.45 ***	790.2±40.7
Mg <sup>2+</sup> 10mM + GTP 10 <sup>-5</sup> M	16.13±0.65	154.6±6.23	20.19±0.61 **	150.8±4.6
Mg <sup>2+</sup> 10mM + F <sup>-</sup> 3mM	66.87±4.03	640.9±38.60	92.38±2.60 ***	690.1±19.5
Mg <sup>2+</sup> 10mM + F <sup>-</sup> 7mM	129.25±5.74	1239.0±55.05	171.40±7.24 ***	1280.2±54.1
Mg <sup>2+</sup> 10mM + GppNHp 5x10 <sup>-7</sup> M	20.63±1.97	197.8±18.90	27.69±2.03 ***	206.9±15.2
Mg <sup>2+</sup> 10mM + GppNHp 10 <sup>-5</sup> M	42.55±0.74	407.9±7.18	54.22±0.94 ***	405.0±7.0
Mg <sup>2+</sup> 10mM + GTP 10 <sup>-5</sup> M + ISO 10 <sup>-7</sup> M	15.73±0.17	150.8±1.62	21.55±0.64 ***	161.0±4.76 ***
Mg <sup>2+</sup> 10mM + GTP 10 <sup>-5</sup> M + ISO 5x10 <sup>-5</sup> M	24.39±1.89	233.8±18.20	32.69±1.59 ***	244.2±11.9

FK, forskolina; GTP, guanosina 5'-trifosfato; F<sup>-</sup>, fluoruro; GppNHp, guanilimidodifosfato; ISO, isoproterenol. Diferencias significativas respecto a los correspondientes controles con:  
 \* P<0.05, \*\* P<0.01 y \*\*\* P<0.005.

ambos cationes divalentes la actividad enzimática es significativamente mayor en las membranas de los animales entrenados que en sus respectivos controles (un 28% mayor con  $Mg^{2+}$  y un 26% mayor con  $Mn^{2+}$ ). En la TABLA XII también se muestran los resultados obtenidos al ensayar la actividad de adenilato ciclasa en presencia de concentraciones saturantes ( $35 \mu M$ ) y subsaturantes ( $10 \mu M$ ) de forskolina. Como se puede observar, la actividad específica es significativamente mayor, con ambas concentraciones de forskolina, en los animales que han llevado a cabo ejercicio físico, aunque la estimulación de la actividad basal ( $Mg^{2+}$ ) promovida por el diterpeno es similar (de unas ocho veces) para los dos bloques de ratas. Resultados, que en su conjunto apuntan hacia una posible elevación de los niveles y/o funcionalidad de la subunidad catalítica con el ejercicio.

Los resultados obtenidos al ensayar la actividad enzimática en presencia de GppNHp y fluoruro, moduladores de la subunidad reguladora estimuladora, se presentan en la TABLA XII y como se puede observar, tanto para concentraciones saturantes como subsaturantes de ellos la actividad específica medida es significativamente mayor en los animales entrenados que en sus controles, mientras que los niveles de activación determinados son similares en ambos grupos de animales. Por tanto, las diferencias observadas en la actividad enzimática de la enzima estimulada por estos tres moduladores son debidas, posiblemente de modo exclusivo, a la diferente funcionalidad de la subunidad catalítica y no a una modificación de la del componente regulador estimulador con el ejercicio físico.

En la TABLA XII se muestran los resultados obtenidos al ensayar la actividad de la enzima en presencia de una concentración subsaturante ( $3 \times 10^{-7} M$ ) y otra saturante ( $10^{-5} M$ ) de isoproterenol; y si bien no existen diferencias en los niveles de activación sobre  $Mg^{2+} + GTP$ , entre los dos grupos de animales, para la concentración más alta de agonista, para la menor se observa un nivel de activación significativamente mayor ( $161 \pm 4.76\%$  frente a  $150.8 \pm 1.62\%$ ) en las ratas entrenadas. Este resultado, parece dar cuenta de una posible modificación en la constante de activación de la enzima por el isoproterenol.

#### 3.4.3.2 Regulación por la vía estimuladora $\beta$ -adrenérgica

Para intentar verificar si los resultados que se reflejan en la TABLA XII, cuando se estimula la adenilato ciclasa con dos concentraciones de isoproterenol, se determinó la actividad enzimática en presencia de concentraciones crecientes del agonista  $\beta$ -adrenérgico. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 49 y como se puede observar, en las ratas entrenadas se produce un desplazamiento significativo de la curva hacia la izquierda, sin que se modifique la activación máxima.

Estos datos indican que, efectivamente, con el ejercicio físico disminuye la constante de activación de la enzima por el isoproterenol de  $5 \times 10^{-7} M$  a  $2.5 \times 10^{-7} M$ .

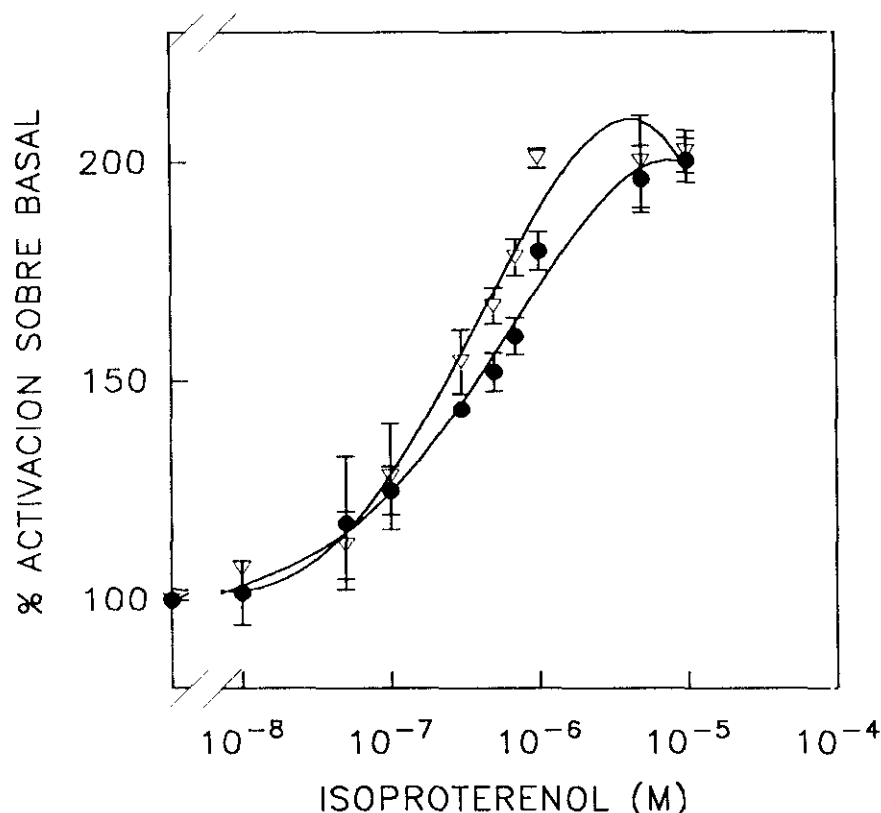


Figura 49.

Activación por isoproterenol de la adenilato ciclasa en membranas de tejido adiposo. La actividad enzimática se determina en presencia de  $GTP 10^{-5}M$ . La actividad basal de la enzima, expresada en  $pmol\ cAMP/min/mg\ prot$  fue:  $8.45 \pm 0.325$  para los animales controles (●—●) y  $9.65 \pm 0.65$  para los entrenados (▽—▽). Las diferencias que se observan en el intervalo de concentraciones  $3 \times 10^{-7}$ - $10^{-5}$  M entre los dos bloques de animales son significativas para  $p < 0.005$ .

### 3.4.3.3 Regulación por la vía inhibidora $A_1$ de adenosina

Está claramente demostrado el importante papel que la adenosina ejerce en la regulación de la lipólisis en tejido adiposo de ratas y humanos (Kather *et al.*, 1985 y Green y Johnson, 1991). Este efecto regulador lo ejerce el nucleosido, vía receptores específicos  $A_1$ , inhibiendo la actividad de adenilato ciclasa.

Cuando se ensaya la actividad de adenilato ciclasa estimulada por isoproterenol en presencia de concentraciones crecientes del análogo de adenosina ciclohexiladenosina, y de 5 U/ml de adenosina desaminasa, se obtienen los perfiles de inhibición que se representan en la Figura 50 en los que no se aprecian diferencias significativas entre los dos bloques de animales, como se señala en la TABLA XIII.

Estos resultados parecen indicar que como consecuencia de la adaptación al ejercicio físico no se ve significativamente afectada esta vía de control negativo de la adenilato ciclasa.

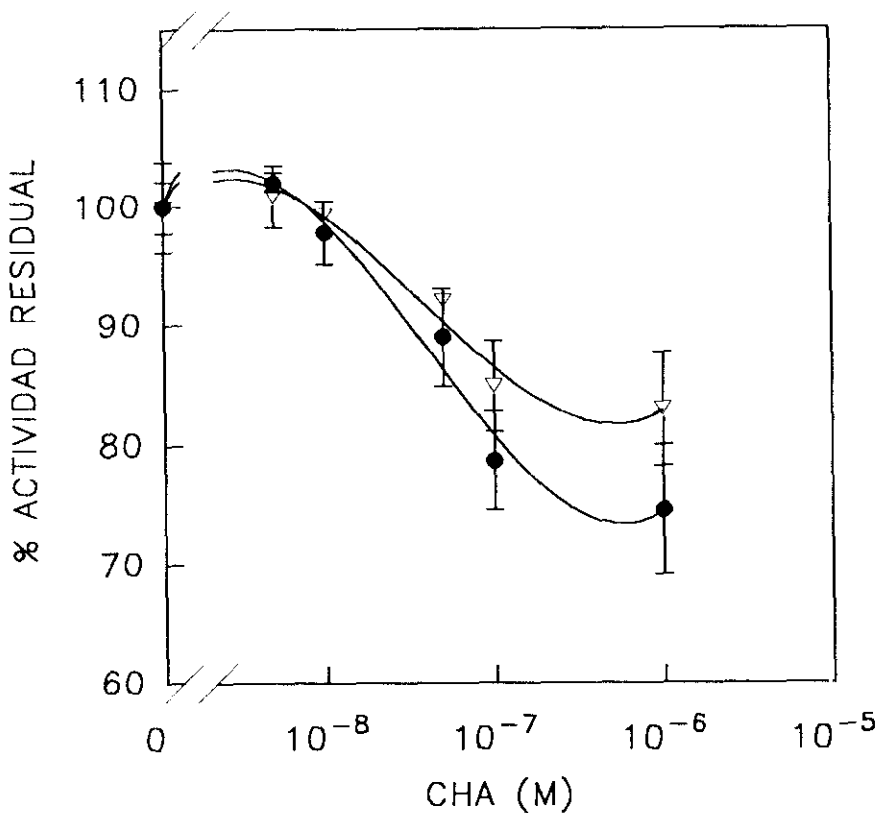


Figura 50. Efecto de la ciclohexiladenosina (CHA) sobre la actividad de adenilato ciclasa de tejido adiposo. La actividad enzimática se ensaya en presencia de isoproterenol y GTP  $1\mu\text{M}$ . La actividad basal de la enzima expresada en pmol cAMP/min/mg prot fue:  $8.23 \pm 0.314$  para las ratas controles (●—●) y  $9.014 \pm 0.49$  para las entrenadas (▽—▽).

### 3.4.4 Proteínas G

#### 3.4.4.1 ADP-ribosilación por toxina pertussis

En los experimentos de ADP-ribosilación catalizada por toxina pertussis que se han realizado en membranas de tejido adiposo de los dos grupos de animales, se han detectado en los autorradiogramas dos sustratos de modificación covalente marcados radiactivamente, correspondientes al menos a dos proteínas de masas moleculares 40 KDa y 41 KDa.

Los resultados obtenidos se representan en la Figura 51. En ellas se observa que se produce un descenso del 16-18%, estadísticamente muy significativo ( $p < 0.005$ ), en los niveles de ADP-ribosilación para las dos bandas en los animales entrenados.

TABLA XIII. Actividad de adenilato ciclasa en preparados de membrana de tejido adiposo de rata en presencia de diversos moduladores

MODULADORES	CONTROL		EJERCICIO	
	(pmol/min/mg prot)	(%)	(pmol/min/mg prot)	(%)
Mg <sup>2+</sup> 3mM + GTP 10 <sup>-6</sup> M + ISO 10 <sup>-6</sup> M	9.73±0.46	100	10.90±0.57	100
Mg <sup>2+</sup> 3mM + GTP 10 <sup>-6</sup> M + ISO 10 <sup>-6</sup> M + CHA 10 <sup>-6</sup> M	6.86±0.60	70.5±5.80	8.51±0.45 *	77.9±4.2

CHA, ciclohexiladenosina. Diferencias significativas respecto a los correspondientes controles con: \* P<0.05, \*\* P<0.01 y \*\*\* P<0.005.

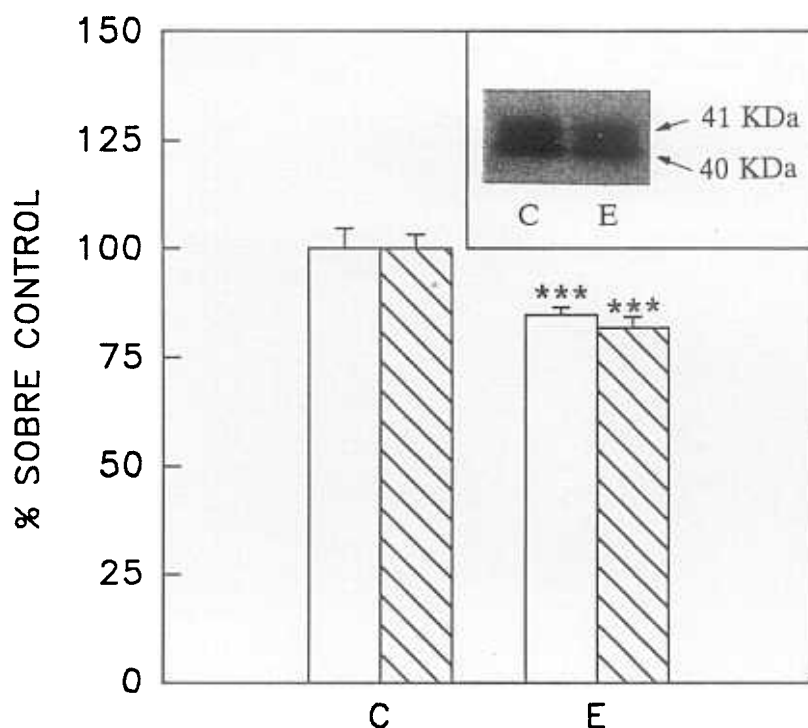


Figura 51. Niveles de ADP-ribosilación catalizada por toxina pertussis en preparados de membrana de tejido adiposo de animales controles (C) y entrenados (E). La radiactividad incorporada a la banda de 41 KDa (□) del grupo control fue de  $219.5 \pm 10.5$  cpm, y de  $289.5 \pm 9.5$  cpm para la banda de 40 KDa (▨). (\*\*\*) diferencias significativas entre los dos grupos para  $p < 0.005$ .

#### 3.4.4.2 ADP-ribosilación por toxina colérica

Cuando se procede a la modificación covalente de los preparados de membranas de tejido adiposo de ratas controles y entrenadas con esta técnica, se detectan dos sustratos mayoritarios. Estos dos sustratos de ADP-ribosilación presentan unas masas moleculares de 42 KDa y 46 KDa. Los resultados obtenidos al cuantificar la radiactividad incorporada a las dos bandas marcadas se representan en la Figura 52. Como se puede observar en ella, los niveles de ADP-ribosilación por toxina colérica en los animales entrenados aumentan un 10% para la forma de alta masa molecular y un 17% para la forma de 42 KDa, siendo la variación obtenida para los dos sustratos estadísticamente significativa ( $p < 0.005$ ).

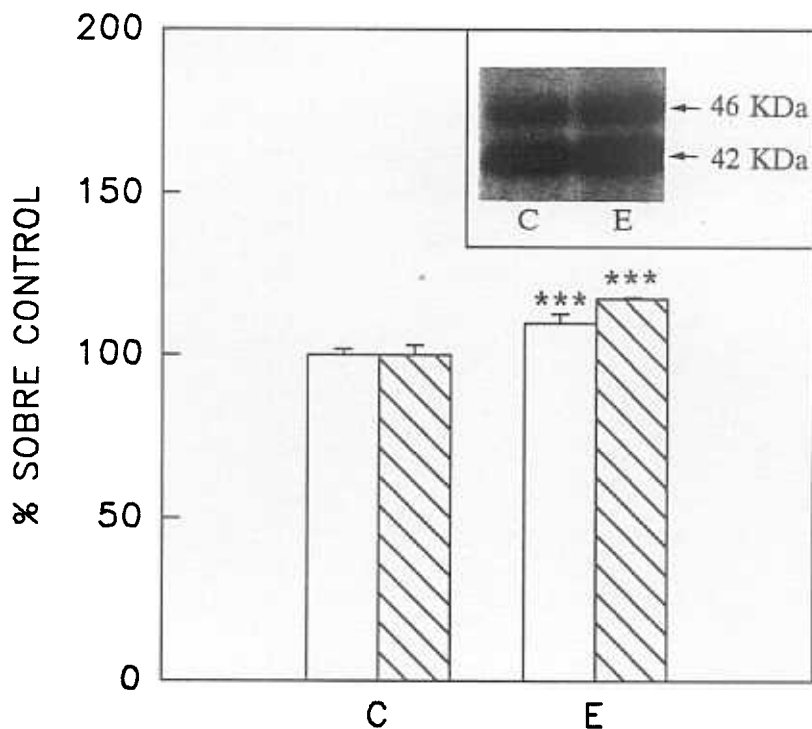


Figura 52. Niveles de ADP-ribosilación catalizada por toxina colérica en preparados de membrana de tejido adiposo de animales controles (C) y entrenados (E). La radiactividad incorporada a la banda de 46 KDa (□) del grupo control fue de  $189.5 \pm 3.5$  cpm, y de  $201 \pm 6$  cpm para la banda de 42 KDa (▨). (\*\*\*) diferencias significativas entre los dos grupos para  $p < 0.005$ .

#### 3.4.4.3 Niveles de $\alpha_s$

Mediante el empleo de un anticuerpo policlonal que reconoce específicamente el decapeptido carboxilo terminal (véase el apartado 2.7.3. de Materiales y Métodos) de las diferentes formas de la subunidad  $\alpha_s$ , se han determinado los niveles de esta proteína en preparados de membranas de tejido adiposo de los animales controles y que han llevado a cabo ejercicio físico.

Este anticuerpo es capaz de reconocer las dos formas de  $\alpha_s$  que se ha descrito en la bibliografía que poseen estos preparados de membranas, y que corresponden a dos proteínas con masas moleculares de 42 KDa y 47 KDa (Milligan y Saggerson, 1990).

En la Figura 53 se refleja el incremento significativo que se ha detectado en el tejido adiposo de ratas entrenadas para los niveles de las dos formas de  $\alpha_s$ , reconocidas por el anticuerpo. Este incremento es mayor para la forma de 42 KDa (77% respecto al control) que para la de 47 KDa (26% respecto al control), al igual que ocurría con las dos formas sustrato de ADP-ribosilación por toxina colérica.

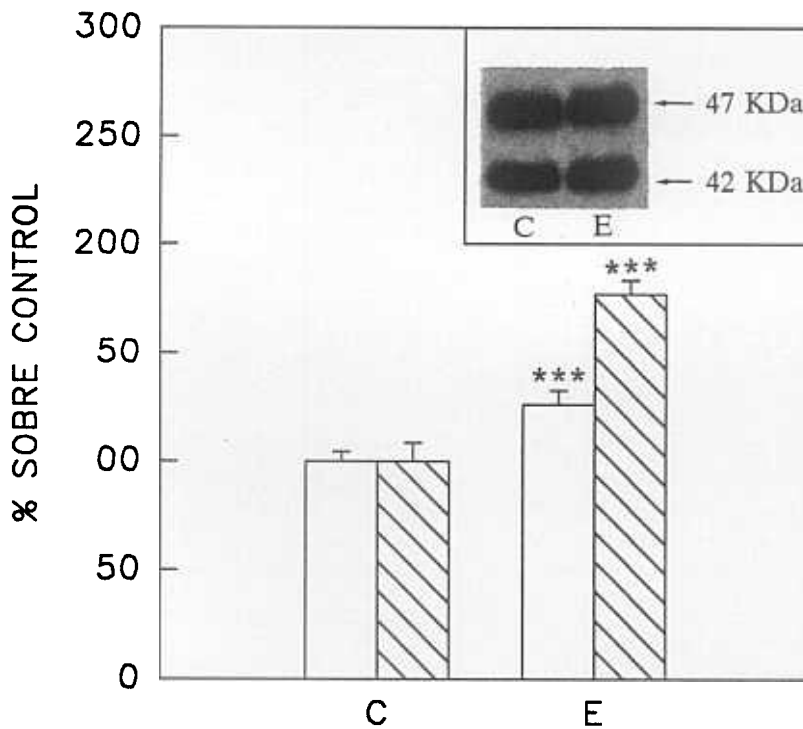


Figura 53.

Niveles de  $\alpha_s$  medidos por inmunodetección en preparados de membrana de tejido adiposo de ratas controles (C) y entrenadas (E). La radiactividad incorporada a la banda de 47 KDa ( $\square$ ) del grupo control fue de  $1775 \pm 80.2$  cpm, y de  $1195 \pm 100.4$  cpm para la banda de 42 KDa ( $\text{hatched}$ ). (\*\*\*) diferencias significativas entre los dos grupos para  $p < 0.005$ .

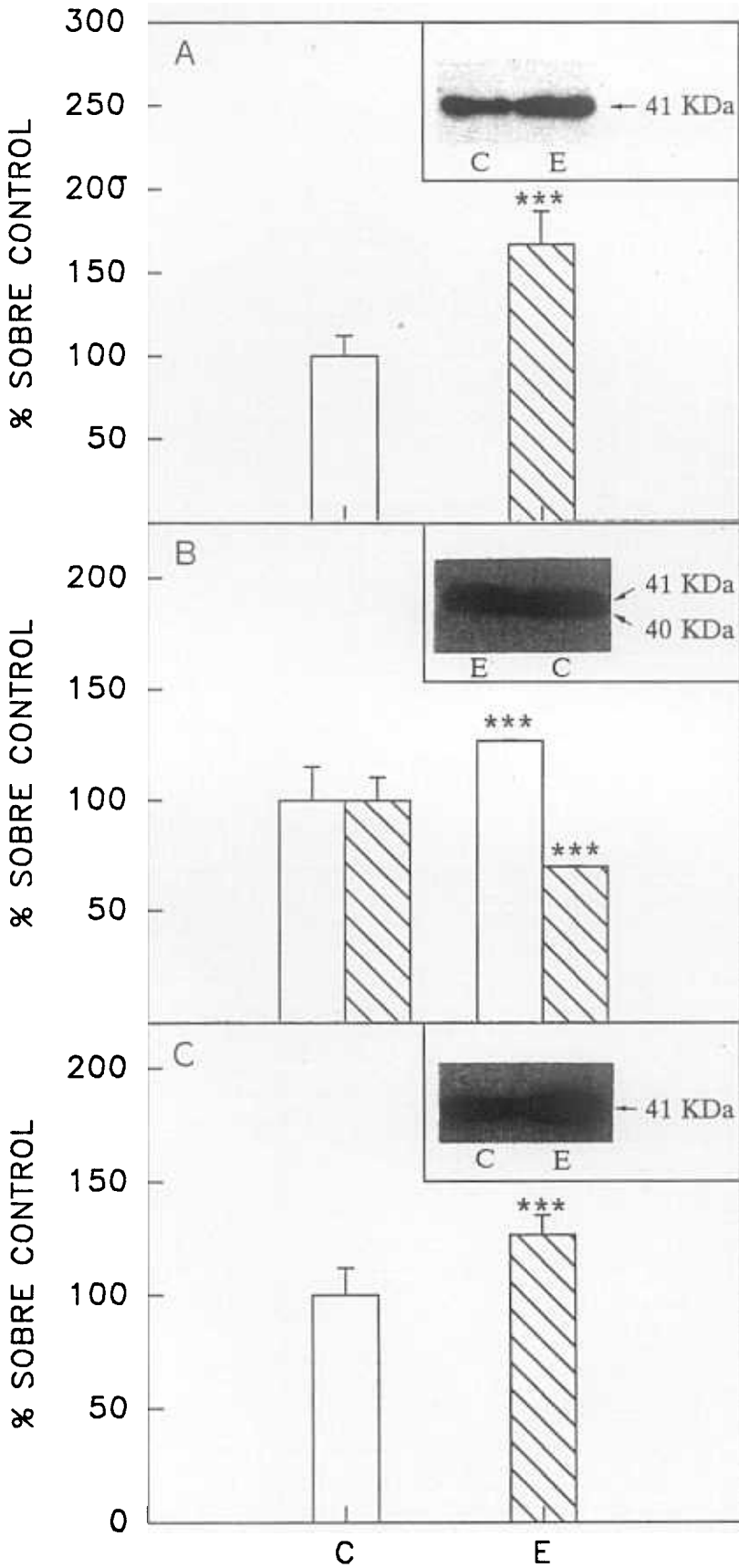


Figura 54.

Niveles de  $\alpha_{11}$  (A),  $\alpha_{1,2}$  (B) y  $\alpha_3$  (C) medidos por inmunodetección en preparados de membrana de tejido adiposo de animales controles (C) y entrenados (E). La radiactividad incorporada en las membranas del grupo control fue de  $2182.65 \pm 261.65$  cpm (A). En B  $4788.45 \pm 734.25$  cpm para la banda de 41 KDa (□) y  $6969.9 \pm 724.17$  cpm para la banda de 40 KDa (▨). (\*\*\*) diferencias significativas entre los dos grupos para  $p < 0.005$ .

#### 3.4.4.4 Niveles de $\alpha_i$

Se ha descrito la existencia en membrana plasmática de tejido adiposo de las tres formas de  $\alpha_i$  ( $\alpha_{i1}$ ,  $\alpha_{i2}$  y  $\alpha_{i3}$ ) (Green et al., 1990).

Al igual que en los otros dos tejidos objeto de este estudio se han empleado anticuerpos anti  $\alpha_{i1}$ ,  $\alpha_{i1,2}$  y  $\alpha_{i3}$ , que han permitido detectar y cuantificar los niveles de las diferentes formas de  $\alpha_i$  en preparados de fracción particulada de tejido adiposo de los dos bloques de animales. Los resultados obtenidos se representan en la Figura 54. En la parte A de la figura se puede observar como el anticuerpo anti  $\alpha_{i1}$  es capaz de reconocer una sólo banda de proteína, en las membranas de nitrocelulosa, de 41 KDa de masa molecular, que corresponde a la forma  $\alpha_{i1}$ . En los animales que han llevado a cabo ejercicio físico los niveles de esta proteína son significativamente mayores (67%) que en sus respectivos controles.

Cuando las membranas de nitrocelulosa se incuban con el anticuerpo anti  $\alpha_{i1,2}$ , se detectan dos bandas de 40 KDa y 41 KDa de masa molecular, que corresponderían a las formas  $\alpha_{i2}$  y  $\alpha_{i1}$ . En la parte B de la Figura 54 se observa como los niveles de estas dos proteínas varían en sentido inverso en los animales entrenados. Así, para la banda de 40 KDa, correspondiente a  $\alpha_{i2}$ , se han medido un descenso del 30% con respecto a los controles, mientras que para la de 41 KDa ( $\alpha_{i1}$ ) se detecta un incremento significativo (un 30%) respecto a los controles, aunque inferior al determinado con el anticuerpo anti  $\alpha_{i1}$ .

Por último, en la parte C de la Figura 54 se presentan los resultados obtenidos cuando se emplea el anticuerpo anti  $\alpha_{i3}$ . Este es capaz de reconocer una sólo banda de 41 KDa de masa molecular ( $\alpha_{i3}$ ). Mediante la cuantificación de la radiactividad incorporada en la banda se ha detectado un aumento del 30% de los niveles de esta proteína en los preparados de membrana obtenidos a partir de los animales que han corrido sobre el tapiz.

#### 3.4.4.5 Niveles de la subunidad $\beta$

En la Figura 55 se puede observar cómo el anticuerpo empleado en este estudio es capaz de reconocer las dos formas de la subunidad  $\beta$  de 35 KDa y 36 KDa de masa molecular que posee el tejido adiposo, según está descrito en la bibliografía (Begin-Heick y Mc Farlane-Anderson, 1992).

Los niveles determinados para estas dos formas de la subunidad  $\beta$  se representan en la Figura 55 y como se puede observar, tanto para la forma de 35 KDa como para la de 36 KDa se produce, con el ejercicio, un incremento estadísticamente significativo ( $p < 0.005$ ) en sus niveles, siendo este incremento de mayor intensidad para la forma de alta masa molecular (33% respecto al control) que para la de 35 KDa (14% respecto al control).

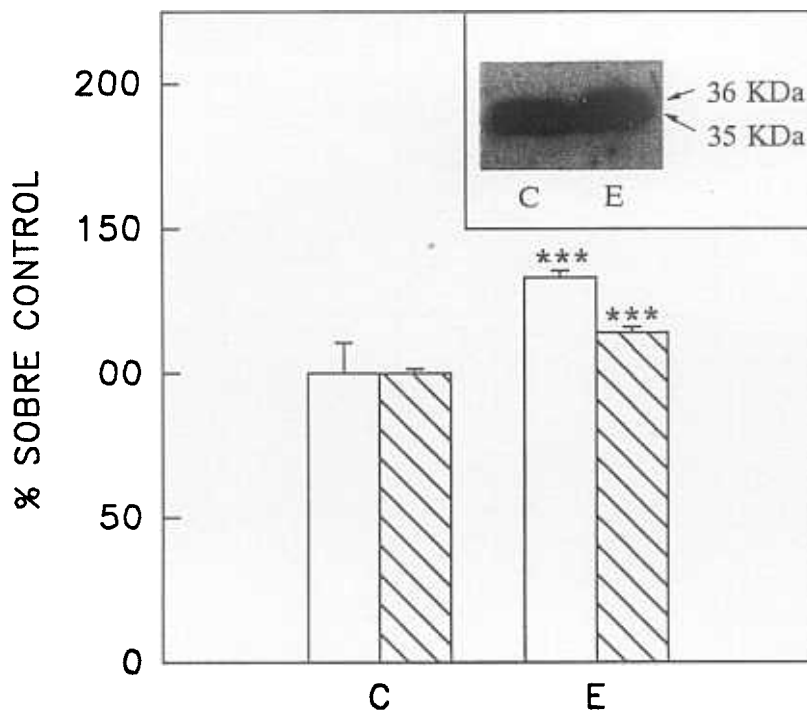


Figura 55. Niveles de subunidad B de las proteínas G medidos por inmunodetección en membranas de tejido adiposo de animales controles (C) y entrenados (E). La radiactividad incorporada a la banda de 36 KDa (□) del grupo control fue de  $282.75.3 \pm 40$  cpm, y de  $523.25 \pm 8$  cpm para la banda de 35 KDa (▨). (\*\*\*) diferencias significativas entre los dos grupos para  $p < 0.005$ .

## DISCUSSION

## 4.1 MODELO ANIMAL EXPERIMENTAL

### 4.1.1 Programa de entrenamiento físico

El objetivo general de este trabajo era estudiar los procesos adaptativos que tienen lugar en el sistema  $\beta$ -adrenérgico-adenilato ciclasa de corazón, hígado y tejido adiposo como consecuencia de la práctica deportiva regular, en concreto se ha elegido el entrenamiento de resistencia por carrera sobre tapiz rodante como ejemplo claro de ejercicio dinámico y aeróbico. El programa de entrenamiento se ha diseñado de acuerdo con los datos previos descritos en la bibliografía y los animales se adaptan a él con facilidad. El protocolo utilizado se puede considerar como típico de un entrenamiento de resistencia equivalente al que realizaría un atleta humano de carreras de resistencia, por ejemplo un maratoniano que en situación de carrera está aproximadamente a un 80% de su capacidad aeróbica máxima.

Otros autores han empleado como modelo de entrenamiento de resistencia la natación (Dawson y Horvath, 1970), sin embargo se ha desechado este tipo de ejercicio puesto que presenta una serie de inconvenientes; resulta difícil controlar el grado de ejercicio que realiza cada animal, pueden darse problemas de hipotermias por lo que hay que secar a los animales después de cada sesión, y el tiempo empleado en estos programas de ejercicio físico es mucho más elevado que el empleado en entrenamientos realizados sobre un tapiz rodante (Williams et al., 1984; Hansen y Rupp, 1991 y Russell et al., 1987).

Por otra parte, otros autores han empleado como modelo de entrenamiento la carrera espontánea sobre ruedas móviles (Suzuki et al., 1979 y Russell et al., 1987); sin embargo, con este tipo de entrenamiento también resulta difícil de controlar el grado de ejercicio que realiza cada animal, puesto que las ratas no corren continuamente sino que realizan series de "sprint" que alternan con períodos de descanso.

### 4.1.2 Efecto del ejercicio físico sobre el peso del animal y de los diferentes órganos objeto de estudio

En este estudio se ha observado que en el momento del sacrificio el peso corporal medio de los animales entrenados era menor que el de los controles sedentarios. Se han descrito resultados similares en ratas entrenadas por carrera sobre tapiz rodante por Williams et al., (1984a y 1984b); Sylvestre-Gervais, (1982) y Plourde et al., (1991, 1992 y 1993).

En humanos también se ha demostrado que el ejercicio físico aeróbico, dependiendo de la intensidad y duración, provoca una disminución en la masa corporal, y este descenso generalmente se debe a una reducción en la masa de grasa del individuo (Ballor y Keesey, 1991).

En el modelo animal experimental empleado en el presente estudio se observa un descenso significativo de la masa de tejido adiposo con respecto a los controles sedentarios. *Bukowiecki et al.*, (1980) y *Lavoie et al.*, (1993) han obtenido resultados similares en ratas entrenadas por natación y han observado que la pérdida de masa grasa es fundamentalmente debida a un descenso en el contenido de triglicéridos de los adipocitos que disminuyen de diámetro y no a una pérdida en el número de adipocitos. *Crampes et al.*, (1986) han observado también que el tamaño de los adipocitos es significativamente menor en corredores de maratón que en individuos sedentarios.

En deportistas se ha observado en atletas un moderado crecimiento en el tamaño del corazón en respuesta al ejercicio físico intenso y regular, dando lugar al denominado "corazón de atleta". Se considera, en general, que esta hipertrofia cardíaca de origen fisiológico supone un mecanismo adaptativo fundamental del músculo cardíaco a la sobrecarga a que se ve sometido con la práctica deportiva (*Bugaisky y Zak*, 1986; *Blomqvist y Saltin*, 1983). El volumen del ventrículo izquierdo es aproximadamente un 33% mayor en atletas que en individuos sedentarios según han determinado *Peronnet et al.*, (1981) mediante ecocardiografías. El grado de hipertrofia alcanzado está directamente correlacionado con la intensidad, duración, tipo de ejercicio y sexo de los individuos (*Blomqvist y Saltin*, 1983). En la mayor parte de los estudios publicados sobre adaptación al ejercicio físico se han empleado las ratas como modelo animal, y en todos aquellos estudios en los que estos animales se entrenan por carrera sobre tapiz rodante no se observa una hipertrofia cardíaca significativa (*Gleeson et al.*, 1983; *Sylvestre-Gervais et al.*, 1982; *Plourde et al.*, 1991; *Baldwin et al.*, 1977; *Fuller y Nutter*, 1981 y *Schaible et al.*, 1981), aunque en general en estos estudios, al igual que en el presente, la relación peso del corazón/peso corporal (índice cardíaco) aumenta debido a que disminuye el peso corporal. Sin embargo, sí se ha observado un aumento neto en la masa cardíaca y un incremento, por tanto, del índice cardíaco en ratas (*Schaible y Scheuer*, 1981 y *Williams et al.*, 1984b) y gatos (*Wyatt et al.*, 1978) entrenados por natación, así como en perros (*Carew y Covell*, 1978 y *Barnard et al.*, 1980) y caballos (*Steel et al.*, 1977) entrenados por carrera.

#### 4.2 ADAPTACIÓN DEL SISTEMA $\beta$ -ADRENÉRGICO-ADENILATO CICLASA DE MIOCARDIO DE RATA AL EJERCICIO FÍSICO

El ejercicio físico de resistencia realizado regularmente conlleva una serie de adaptaciones cardiovasculares. Así se ha observado bradicardia en la situación de reposo en la mayoría de las especies estudiadas (*Tipton*, 1965 en ratas; *Frick et al.*, 1967 y *Huston et al.*, 1985 en atletas y *Ordway et al.*, 1982 en perros), y un descenso del ritmo cardíaco para una situación de ejercicio físico de una intensidad determinada (*Frick et al.*, 1967; *Sigvardson et al.*, 1976 y

*Cousineau et al., 1977*). Por otra parte, también se ha observado que los niveles de catecolaminas en plasma en humanos que practican deportes de resistencia (como es el caso de nuestro modelo animal) disminuyen ligeramente o no varían cuando los individuos están en reposo (*Maki et al., 1990*) y el incremento en los niveles de catecolaminas plasmáticas durante el ejercicio parece depender en mayor medida de la intensidad relativa (% VO<sub>2</sub> max.) que de la intensidad absoluta del ejercicio (*Svedenhag, 1985*). Dado que la bradicardia observada en atletas en reposo no se puede explicar en términos de una variación en los niveles de catecolaminas plasmáticas en estos individuos, una explicación alternativa podría implicar una desensibilización o "down-regulation" de los receptores β-adrenérgicos cardíacos en respuesta al aumento en el tono nervioso simpático que acompaña a la práctica deportiva. Aunque en este estudio no se ha medido el ritmo cardíaco, dado que no era uno de los objetivos marcados, los datos de la bibliografía sugieren que nuestro protocolo de entrenamiento sería de una intensidad y duración suficiente como para producir una bradicardia, puesto que como describe *Tipton, (1965)* un programa en el que las ratas se entrenan gradualmente hasta que corran de 4 a 6 veces por semana, de 60 a 90 minutos a una velocidad de 27 a 40 m/min, produce bradicardia aproximadamente 40 días después de comenzar el entrenamiento.

#### 4.2.1 Receptores β-adrenérgicos

En el modelo animal objeto de estudio se observa, como se ha descrito en el capítulo de resultados, un descenso significativo en la densidad de receptores β-adrenérgicos en miocardio de ratas entrenadas sin que la constante de disociación del receptor por el antagonista ICYP se vea afectada. El descenso observado en el presente estudio en la densidad de receptores β-adrenérgicos de miocardio de ratas entrenadas, podría dar cuenta de las adaptaciones cardiovasculares al ejercicio físico descritas en atletas y animales experimentales y que se han relacionado anteriormente.

Los resultados obtenidos por otros autores en cuanto al efecto del ejercicio físico sobre la densidad de receptores β-adrenérgicos de ventrículo izquierdo son contradictorios. En algunos estudios no se han observado variaciones significativas en el número de receptores entre animales sedentarios y entrenados *Hammond et al., (1987)* en ventrículo de minicerdos de la variedad Yucatán, *Moore et al., (1982)*, *Scarpace et al., (1992)* y *Böhm et al., (1993)* en ratas sometidas a un programa de entrenamiento físico por carrera o *Williams (1980)* y *Williams et al., (1984b)* en ratas que siguen un protocolo de entrenamiento de resistencia por natación.

En otros estudios se ha observado un descenso significativo en el número de receptores β-adrenérgicos de miocardio de animales entrenados; así, empleando como ligando marcado el ICYP, *Werle et al., (1989)* han demostrado que en ratas que siguen un programa de natación tanto el ejercicio crónico como el agudo producen una "down-regulation" de los receptores β-

adrenérgicos, *Hammond et al.*, (1987) han descrito que como consecuencia de la adaptación a un ejercicio dinámico, por carrera, se produce un descenso en el número de estos receptores en la aurícula derecha de minicerdos, y *Sylvestre-Gervais et al.*, (1982) así como *Plourde et al.*, (1991) han observado un descenso, del 21 y el 13% respectivamente, en la densidad de receptores  $\beta$ -adrenérgicos de miocardio de ratas sometidas a programas de entrenamiento por carrera sobre tapiz rodante.

Una posible explicación a la divergencia existente entre los resultados del presente estudio y los obtenidos por *Moore et al.*, (1982), *Williams*, (1980) y *Williams et al.*, (1984 b) se centra en el tipo de ligando empleado; en nuestro trabajo se ha empleado el [ $^{25}$ I] iodocianopindolol mientras que en estos otros estudios se ha empleado [ $^3$ H] dihidroalprenolol como ligando marcado; éste tiene una afinidad cuarenta veces menor y una actividad específica cincuenta veces menor que el ICYP (*Engel et al.*, 1981). Otras posibles explicaciones a las diferencias observadas entre nuestros datos y los de otros autores podrían radicar en el tipo de animal, por ejemplo *Hammond et al.*, (1987) utilizaron minicerdos de la variedad Yucatán en vez de ratas, en el tipo de programa de entrenamiento empleado, natación frente a carrera (*Williams*, 1980 y *Williams et al.*, 1984b), y en la intensidad del ejercicio físico desarrollado, puesto que tanto en el protocolo seguido por *Böhm et al.*, (1993) como en el seguido por *Scarpace et al.*, (1992) la intensidad del ejercicio era considerablemente menor.

Con independencia de la existencia o no de variaciones en la densidad de receptores  $\beta$ -adrenérgicos como consecuencia de la práctica deportiva, en ningún estudio, al igual que sucede en el presente, se han descrito diferencias en la constante de disociación de estos receptores por los diferentes antagonistas empleados en miocardio de animales entrenados con respecto a sus controles sedentarios.

En humanos no existen datos sobre la densidad de receptores  $\beta$ -adrenérgicos de miocardio en atletas, puesto que por razones obvias no se dispone de muestras biológicas para efectuar la medida. No obstante, se ha empleado como índice de variación en miocardio la que experimentan los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en linfocitos (*Brodde et al.*, 1986 y *Aarons y Molinoff*, 1982) lo que resulta muy controvertido. Los datos obtenidos por diferentes autores son contradictorios; así *Butler et al.*, (1983) observaron un aumento en la densidad de receptores  $\beta$ -adrenérgicos de linfocitos humanos en muestras de sangre tomadas inmediatamente después de un pulso de ejercicio y estos mismos autores previamente (*Butler et al.*, 1982) describen un descenso en la densidad tras un programa de dos meses de ejercicio. Los resultados de ambos estudios les permitió sugerir que la densidad de receptores  $\beta$ -adrenérgicos en linfocitos está inversamente correlacionada con el grado de forma física de los atletas. *Ohman et al.*, (1987) también han medido en linfocitos un descenso significativo en el número de receptores con el ejercicio y han sugerido que la variación en la densidad de receptores  $\beta$ -adrenérgicos es un componente importante en la adaptación al ejercicio físico. Sin embargo estos resultados contrastan con los de *Williams et al.*, (1981) que no observaron variación alguna y con el

incremento observado por *Lehman et al.*, (1984), *Maki et al.*, (1987) y *Maki*, (1989) en la densidad de receptores  $\beta$ -adrenérgicos de linfocitos de atletas con entrenamiento de resistencia.

También existe una gran cantidad de bibliografía que describe la existencia de un descenso en la densidad de receptores  $\beta$ -adrenérgicos de miocardio de humanos y animales experimentales en diferentes procesos patológicos, como fallo cardíaco (*Vatner et al.*, 1984; *Chevalier y Swynghedauw*, 1990; *Brodde*, 1991; *Feldman*, 1991 y *Homcy*, 1991), hipertrofia cardíaca secundaria a una sobrecarga de volumen (*Hammond et al.*, 1992) o de presión (*Scholz et al.*, 1990; *Bouani et al.*, 1991 y *Nieto et al.*, 1993) y diabetes (*Savarese et al.*, 1979 y *Atkins et al.*, 1985). Por otra parte *Vatner et al.*, (1984) han encontrado un incremento en la densidad de estos receptores en miocardio de ventrículo izquierdo de perros con hipertrofia cardíaca secundaria a una sobrecarga de presión, aunque no está claro si las diferencias entre los diversos estudios son debidas al empleo de distintas especies, modelo animal experimental o al grado de hipertrofia alcanzado.

## 4.2.2 Regulación del sistema de adenilato ciclasa

### 4.2.2.1 Características reguladoras de la subunidad catalítica

En el presente estudio no se ha observado una variación significativa en la actividad basal de adenilato ciclasa, medida en presencia de  $Mg^{2+}$  10 mM, en miocardio de ratas entrenadas, pero sí un descenso cuando se ensaya la actividad enzimática en presencia de  $Mn^{2+}$  o  $Mg^{2+}$ /forscolina. El  $Mn^{2+}$  es un conocido desacoplante de la interacción entre la subunidad catalítica y las proteínas G, y por tanto en estas condiciones de ensayo se mide la actividad de la subunidad catalítica (*Limbird et al.*, 1979 y *Czech et al.*, 1980). La forscolina, un diterpeno con propiedades inotrópicas y antihipertensivas (*Lindner et al.*, 1978), aislado de *Coleus forskohlii*, activa la adenilato ciclasa en diferentes tejidos (*Seamon y Daly*, 1981) interaccionando con el complejo formado por la subunidad catalítica y la proteína  $\alpha$ , para estimular al máximo la producción de cAMP aunque es capaz de actuar directamente sobre la subunidad catalítica aislada (*Hubbard et al.*, 1991).

Los resultados obtenidos en este estudio, considerados conjuntamente, parecen indicar que como consecuencia de la adaptación del sistema de adenilato ciclasa al ejercicio físico de resistencia, intenso y regular, se produce un descenso considerable en la eficacia catalítica de la enzima, que puede deberse a una modificación aparente de los niveles y/o funcionalidad de la subunidad catalítica de adenilato ciclasa en estas condiciones. En este proceso de desensibilización puede tener un papel importante la fosforilación de la subunidad catalítica por proteína quinasa A (*Premont et al.*, 1992b). Por otra parte, una modificación en la composición de fosfolípidos de la membrana plasmática podría dar cuenta de la variación observada en la

actividad de la subunidad catalítica, a este respecto existe un estudio en el que se ha observado una modificación tanto del porcentaje como de la composición en fosfolípidos en membranas de miocardio de ratas entrenadas sobre un tapiz rodante (*Tibbits et al., 1981*). Otra razón que por sí sola, o junto a las anteriores, podría explicar el descenso en la actividad de la subunidad catalítica observado en presencia de forskolina es el incremento en los niveles de  $\alpha_2$  de los animales entrenados tal y como se ha propuesto por otros autores en diferentes modelos de patologías cardíacas como *Hammond et al., (1992)* en minicerdos con hipertrofia cardíaca secundaria a una sobrecarga de volumen, o *Anand-Srivastava (1992)* en ratas espontáneamente hipertensas.

Existen otros estudios, en la bibliografía, en los que tampoco se han observado variaciones significativas en la actividad basal de la enzima en miocardio de animales que han seguido diferentes protocolos de entrenamiento, como los realizados en ratas con ejercicio por carrera por *Plourde et al., (1991)* y *Moore et al., (1982)* o en gatos con entrenamiento de resistencia por natación por *Wyatt et al., (1978)*, y tan solo *Döhm et al., (1976)* han encontrado un descenso significativo en la actividad de adenilato ciclasa en presencia de  $Mg^{2+}$  10 mM. Por otra parte, no existe ningún estudio en el que se haya medido la posible variación en la actividad de la subunidad catalítica en presencia de  $Mn^{2+}$  o forskolina, estimuladores más potentes que pueden amplificar pequeñas diferencias no significativas debido a los bajos niveles de actividad obtenidos cuando se ensaya la enzima únicamente en presencia de  $Mg^{2+}$ .

#### 4.2.2.2 Características reguladoras de la proteína $G_i$

En este estudio también hemos observado un descenso en la  $V_{max}$  de la enzima estimulada por moduladores ( $GppNHp$  y fluoruro) que actúan a través del componente regulador estimulador en el miocardio de los animales entrenados, sin que se afecte la constante de activación de la adenilato ciclasa. Hay que señalar que si bien tanto el fluoruro como los nucleótidos de guanina activan la adenilato ciclasa y son considerados moduladores típicos de  $G_s$ , la forma en que lo hacen es diferente puesto que el fluoruro parece que no provoca la disociación del heterotrímero  $G_s$  y permite enmascarar la contribución de la vía inhibitoria a la actividad enzimática (*Levitzki, 1987*). Por el contrario, cuando ensayamos la actividad de adenilato ciclasa en presencia de nucleótidos de guanina, éstos están activando tanto  $G_s$  como  $G_i$  y estamos midiendo un balance de las actividades de estas dos proteínas  $G$ . Este balance varía con la concentración de nucleótidos de guanina presentes en el ensayo, y en el intervalo de concentraciones empleado en el presente estudio se puede considerar que la contribución de  $G_i$  a la actividad enzimática medida es mínima.

Los resultados obtenidos parecen indicar que la proteína  $G_i$  podría alterarse como consecuencia de la adaptación del miocardio al ejercicio físico bien porque varíen sus niveles y/o porque varíe su funcionalidad. En este sentido, nosotros hemos medido un descenso en los

niveles de ADP-ribosilación por toxina colérica y en los niveles de  $\alpha_1$  detectados por "immunoblotting" en miocardio de ratas que han realizado ejercicio físico y este descenso en los niveles de  $\alpha_1$  bien podría dar cuenta del descenso observado en la actividad de la adenilato ciclasa.

En ninguno de los tres estudios (*Döhm et al., 1976; Wyatt et al., 1978 y Plourde et al., 1991*) en los que se ha medido la actividad de adenilato ciclasa en presencia de una sola concentración, saturante, de fluoruro se ha descrito un resultado similar al nuestro, pues no observan variación alguna en la estimulación de la enzima en los animales entrenados. Estas diferencias entre nuestros resultados y los de otros autores, en principio, sólo son atribuibles al empleo de diferentes especies (por ejemplo, *Wyatt et al., (1978)* realizaron su estudio con gatos) o en el protocolo de entrenamiento seguido (por ejemplo, *Döhm et al., (1976)* y *Plourde et al., (1991)* siguieron, en ratas, un protocolo menos intenso y duradero en el tiempo al empleado en el presente estudio).

#### 4.2.2.3 Regulación por la vía estimuladora $\beta$ -adrenérgica

A diferencia de lo que ocurre para los moduladores del sistema adenilato ciclasa discutidos hasta ahora, cuando estudiamos la respuesta de la enzima a diferentes concentraciones de isoproterenol (agonista  $\beta$ -adrenérgico) observamos un desplazamiento hacia la derecha de la curva de dosis-respuesta de los animales entrenados. Este resultado indica que la funcionalidad del componente receptor no se ve afectada significativamente en su respuesta máxima, a pesar del descenso medido en la densidad de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, pero sí que se produce un aumento en la constante de activación del componente receptor por el agonista. Resultados como éste han sido obtenidos por otros autores cuando se ensaya la activación enzimática por un agonista en presencia de un antagonista competitivo o después de una pérdida de receptores si el tejido posee "spare receptors" (*Bristow et al., 1985*). Esta última explicación parece la más probable por varios motivos; en primer lugar porque según describe *Brodde, (1991)* existe un número importante de receptores  $\beta$ -adrenérgicos "spare" en miocardio de rata, y en segundo lugar porque, según nuestros datos de unión de ligando, disminuye la densidad de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en el tejido cardíaco de los animales entrenados.

Otra posible interpretación de los resultados obtenidos podría implicar que con el ejercicio físico disminuyese la afinidad de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos por el agonista (*Michel et al., 1985*), a pesar de la ausencia de variaciones en la constante de disociación del receptor por el antagonista ICYP. Así, *Plourde et al., (1991)* han descrito en ratas entrenadas por carrera un descenso del 16% en el número de receptores en el estado de alta afinidad (que refleja el acoplamiento receptor-G<sub>i</sub>) sin que se afecte el de receptores en el estado de baja afinidad, y a ello atribuyen el descenso que observan en la respuesta de adenilato ciclasa a isoproterenol. Además, postulan que un descenso en los niveles de G<sub>i</sub> podría dar cuenta del descenso en el

número de receptores en el estado de alta afinidad, aunque no han determinado los niveles de  $G_i$  en miocardio de su modelo animal. En el presente estudio sí hemos observado un descenso en los niveles de  $G_i$  medidos por ADP-ribosilación y por inmunodetección, lo que también podría dar cuenta de las variaciones mencionadas en la estimulación  $\beta$ -adrenérgica de adenilato ciclasa.

En otros estudios, los resultados obtenidos en cuanto a la activación de adenilato ciclasa por agonistas  $\beta$ -adrenérgicos son controvertidos. *Moore et al.*, (1982) no observaron variación alguna, *Döhm et al.*, (1976) detectaron un descenso en la estimulación máxima de la enzima por adrenalina y *Wyatt et al.*, (1978) y *Böhm et al.*, (1993) encontraron un incremento en la respuesta de adenilato ciclasa. Esta disparidad de resultados sólo se puede explicar, una vez más, por diferencias en las especies, sexo de los animales empleados o por diferencias en el protocolo de entrenamiento seguido (*Plourde et al.*, 1991). Además, en todos los estudios con los que hemos comparado nuestros datos se ha medido la actividad de ciclasa a una sólo concentración de agonista y por lo tanto no aportan información sobre la posible variación en la constante de activación del receptor por el agonista.

#### 4.2.2.4 Regulación negativa del sistema

También hemos observado un descenso en los niveles de inhibición de la actividad de adenilato ciclasa promovidos por concentraciones saturantes de agonistas de diferentes receptores acoplados negativamente al sistema (receptores muscarínicos colinérgicos, receptores  $A_1$  de adenosina y receptores de prostaglandina  $E_2$ ). Estos resultados permiten aseverar que probablemente todas las vías de control negativo de la actividad de adenilato ciclasa de miocardio sufran un proceso adaptativo similar con la práctica del ejercicio físico de resistencia, aunque debido al efecto antiadrenérgico de estas vías cabría esperar, en principio, que se produjese una sensibilización de las mismas para proteger al corazón de la sobreestimulación simpática que acompaña al ejercicio físico.

Una posible explicación a los resultados obtenidos podría ser que con este proceso adaptativo se produce una desensibilización heteróloga de las vías antiadrenérgicas del sistema de adenilato ciclasa. Si bien este proceso de desensibilización podría producir un descenso en la densidad de los receptores inhibidores, parece poco probable que la densidad de todos ellos varíe en el mismo sentido con el ejercicio físico. *Hammond et al.*, (1987) y *Böhm et al.*, (1993) no han encontrado variaciones en la densidad de receptores muscarínicos de miocardio de minicerdos y ratas entrenadas respectivamente, si bien no han medido la inhibición de adenilato ciclasa mediada por estos receptores.

Este proceso de desensibilización de las vías de control negativo del sistema podría afectar a otros componentes del mismo de forma que se produjese un descenso en el acoplamiento de los receptores inhibidores con la proteína  $G_i$  (debido a una disminución en los

niveles y/o funcionalidad de la proteína  $G_i$ ; sin embargo, por inmunodetección hemos observado un aumento en los niveles de  $\alpha_{i2}$ . Este resultado sólo se puede compatibilizar con el descenso en la inhibición de adenilato ciclasa si el incremento en los niveles de  $\alpha_{i2}$  va acompañado de un descenso paralelo en la funcionalidad de la proteína  $G_i$ . En apoyo de esta posibilidad se encontraría el descenso, observado en el presente estudio, en los niveles de ADP-ribosilación catalizada por toxina pertussis en membranas de miocardio de animales entrenados puesto que, según *Fleming et al.*, (1992), sólo la fracción de proteínas G que se modifica covalentemente por esta toxina, del total de proteínas G ADP-ribosilables por ella y presentes en la célula, se corresponder con las proteínas G funcionales. No obstante, parece que sólo una pequeña porción de  $G_{i2}$  podría ser suficiente para acoplar los receptores inhibidores a adenilato ciclasa, y que variaciones en los niveles de  $G_i$  no condicionarían el grado de inhibición de la enzima. Así, *Böhm et al.*, (1990) encontraron en miocardio de humanos con fallo cardíaco un incremento en los niveles de  $G_i$  medidos por inmunodetección sin que variase la densidad de los receptores muscarínicos y de adenosina, ni la inhibición de ciclasa promovida por ellos, y explicaron estos resultados en función de unos niveles de  $G_i$  mucho mayores (0.1% de las proteínas de membrana) que los de receptores de adenosina y muscarínicos (0.00001% de las proteínas de membrana).

### 4.2.3 Proteínas G

#### 4.2.3.1 Niveles de $G_i$

En este estudio se han empleado dos aproximaciones diferentes para cuantificar los niveles de  $G_i$ , la ADP-ribosilación catalizada por toxina de *Vibrio cholerae* y la inmunodetección empleando un anticuerpo obtenido específicamente contra el decapeptido carboxilo-terminal de  $\alpha_i$ . Mediante estas dos técnicas hemos detectado que se produce un descenso en sus niveles que afecta con igual intensidad a la forma de alta y baja masa molecular.

Estos datos apoyan, como se ha discutido anteriormente, los resultados que hemos obtenido al estudiar la vía estimuladora del sistema de adenilato ciclasa y explicarían también el descenso observado por *Plourde et al.*, (1991) en el porcentaje de receptores  $\beta$ -adrenérgicos que se encuentran en el estado de alta afinidad. Sin embargo, el único estudio previo en el que se han medido, mediante ELISA, los niveles de  $\alpha_i$  en miocardio de minicerdos entrenados refleja unos resultados contrarios a los nuestros (*Hammond et al.*, 1988), que se justifican proponiendo que el aumento en los niveles de  $G_i$  sería un mecanismo de compensación del descenso que detectan en la densidad de receptores  $\beta$ -adrenérgicos de miocardio de animales entrenados. En nuestro modelo, sin embargo, el descenso en los niveles de  $G_i$  forma parte del

proceso de desensibilización que afecta a todos los componentes de la vía estimuladora del sistema de adenilato ciclasa.

La divergencia entre nuestros resultados y los de *Hammond et al., (1988)* parece poco probable que pueda deberse al empleo de técnicas diferentes de detección de  $\alpha_1$  (dada la elevada sensibilidad del ELISA y del "inmunoblotting") o al empleo de anticuerpos anti  $\alpha_1$  con diferente procedencia, y en todo caso podría deberse al empleo de diferentes modelos animales y diferentes protocolos de entrenamiento. Por otra parte, *Hammond et al., (1988)* emplearon un número muy limitado de animales (sólo tres machos y dos hembras) y las muestras control fueron obtenidas a partir de biopsias de los mismos animales antes de iniciar el programa de ejercicio físico; este hecho implica que, para la extracción de las muestras, los animales fueron sometidos a una traqueotomía y un postoperatorio en el que fueron tratados con diferentes fármacos lo que podría haber afectado a los niveles de  $G_i$  cuantificados en su estudio.

#### 4.2.3.2 Proteínas $G_i$

Al igual que con las proteínas  $G_o$ , hemos empleado dos aproximaciones diferentes para cuantificar los niveles de proteínas  $G_i$  en miocardio de los dos bloques de animales experimentales empleados en este estudio, la ADP-ribosilación catalizada por toxina de *Bordetella pertussis* y la inmunodetección empleando anticuerpos específicos obtenidos frente a las tres formas de  $\alpha_i$ .

Mediante inmunodetección hemos cuantificado los niveles de  $\alpha_{12}$  pues en las membranas de nitrocelulosa incubadas con anticuerpos anti  $\alpha_{11}$  y anti  $\alpha_{13}$  no hemos detectado señal alguna. Esto es posiblemente debido a que los niveles de  $\alpha_{12}$  en corazón son mucho mayores que los de  $\alpha_{11}$  y  $\alpha_{13}$  (*Foster et al., 1990*); de hecho *Eschenhagen et al., (1991)* no han detectado RNA mensajero de  $\alpha_{11}$  y niveles muy bajos de RNA mensajero de  $\alpha_{13}$  en miocardio de rata empleando técnicas de hibridación.

No hemos podido acometer la cuantificación de los niveles de  $G_o$ , proteína que tiene unos niveles de expresión en corazón mucho más bajos que en cerebro y cuya concentración es mayor en la aurícula que en el ventrículo (*Holmer y Homcy, 1991*), debido a que el anticuerpo anti  $\alpha_o$  del que disponíamos daba reacción cruzada con las proteínas  $\alpha_i$ , cuyo decapeptido carboxilo terminal tiene un alto grado de analogía con el de  $\alpha_o$ .

Los resultados obtenidos por las dos técnicas empleadas son contradictorios, pues de los datos de la ADP-ribosilación se podría extraer la conclusión que disminuyen los niveles de  $\alpha_i$ , mientras que los de inmunodetección indican que aumentan en el miocardio de los animales entrenados. Resultados divergentes entre estas dos técnicas han sido obtenidos también por *Feldman et al., (1988 y 1991)* y *Kessler et al., (1989)*. Si bien la ADP-ribosilación catalizada por toxina pertussis tiene una menor sensibilidad para cuantificar  $\alpha_i$ , pues, por ejemplo, en sarcolema de perro, *Fleming et al., (1992)* han medido aproximadamente 20 pmol de  $\alpha_i/\alpha_o$ /mg proteína

mediante ADP-ribosilación y 150 pmol/mg proteína mediante inmunodetección. Por estas razones Böhm *et al.*, (1992a) cuestionan el que los niveles de la ADP-ribosilación catalizada por toxina pertussis reflejen los verdaderos niveles de  $G_i$  y recomiendan el empleo de técnicas de inmunodetección para cuantificarlos. No obstante, parece interesante el estudio de los niveles de ADP-ribosilación catalizada por toxina pertussis puesto que como ya se ha mencionado, éstos se podrían correlacionar con los de proteínas G funcionales.

La divergencia entre los resultados obtenidos por estas dos técnicas podría explicarse por algunas de las limitaciones que posee la ADP-ribosilación puesto que existen varios factores que pueden afectar a la capacidad de la toxina pertussis para modificar covalentemente sus sustratos: la cantidad de subunidades  $\beta\gamma$  (Neer *et al.*, 1984), la presencia de nucleótidos de guanina unidos a las proteínas G y las propiedades biofísicas del microentorno lipídico de  $G_{i\alpha}$  (Ribeiro-Neto *et al.*, 1987). Además, la modificación covalente del residuo de Cys que ocupa la cuarta posición desde el extremo carboxilo terminal, que es el aceptor del grupo ADP-ribosilo (Milligan, 1988) puede bloquear a la ADP-ribosilación por la toxina. Así, se ha aislado una ADP-ribosiltransferasa que es capaz de ADP-ribosilar proteínas  $G_i$  *in vitro* (Tanuma *et al.*, 1988) y además de estos procesos de modificación covalente endógena se han encontrado también inhibidores endógenos de la ADP-ribosilación catalizada por toxina pertussis (Hara-Yokohama y Furuyama, 1988 y Tanuma y Endo, 1990). Por otra parte existe evidencia experimental de que Cys en una secuencia carboxilo terminal -CAAX (donde C es Cys, A es un aminoácido alifático y X es un aminoácido cualquiera), como las subunidades  $\alpha_i$  y el oncogen ras, pueden ser isopreniladas (Glomset *et al.*, 1990). Además el grado de fosforilación de  $G_i$  puede modular también el nivel de ADP-ribosilación detectado (Watanabe *et al.*, 1988).

Se ha demostrado que la respuesta que media la proteína  $G_i$  sobre la actividad de adenilato ciclasa se puede inhibir por activación de proteína quinasa C y que ésta inactivación de  $G_i$  se debe a su fosforilación por ésta proteína quinasa (Murphy *et al.*, 1989 y Pyne *et al.*, 1989). Un aumento en los niveles de fosforilación de  $G_i$ , debido a una mayor actividad de proteína quinasa en miocardio de animales entrenados, permitiría explicar que a pesar de que los niveles de  $G_i$ , medidos por inmunodetección, son mayores en los animales entrenados, la inhibición de la actividad de adenilato ciclasa es inferior en estas ratas con relación a sus controles. Sin embargo, en contra de esta explicación está el hecho ya comentado de que sólo una pequeña porción de  $G_{i\alpha}$  podría ser suficiente para acoplar los receptores inhibidores a adenilato ciclasa y que variaciones en los niveles de  $G_i$  no condicionarían el grado de inhibición de la enzima.

Sólo existe en la bibliografía un estudio, publicado por Böhm *et al.*, (1993), en el que se estudia el efecto que tiene el ejercicio sobre los niveles de  $\alpha_i$  en ratas envejecidas (28 meses) y en el que se observa que con el ejercicio físico disminuyen los niveles de  $\alpha_i$  de miocardio.

Se ha descrito un aumento en los niveles de  $G_i$  en cultivos de cardiomiocitos sometidos a un tratamiento crónico con noradrenalina (Reithmann *et al.*, 1989). En gran cantidad de

patologías cardíacas, en las que tienen lugar diferentes procesos de desensibilización heteróloga del sistema  $\beta$ -adrenérgico-adenilato ciclasa, se ha descrito también un aumento en los niveles de  $G_i$  en membranas de miocardio. Por ejemplo, en ratas espontáneamente hipertensas, *Anand-Srivastava*, (1992) ha detectado un aumento en los niveles de  $G_i$  por inmunodetección, ADP-ribosilación por toxina pertussis y en los niveles de sus RNA mensajeros; *Böhm et al.*, (1992a y 1992b) han encontrado resultados similares en ratas con hipertensión espontánea o adquirida; en corazón de humanos con fallo cardíaco o cardiomiopatía dilatada *Böhm et al.*, (1990 y 1992c) y *Eschenhagen*, (1992a y 1992b) han encontrado también resultados similares. Por ello *Böhm et al.*, (1992a) han propuesto que  $G_i$  podría tener un papel importante en varias enfermedades cardíacas ejerciendo un control negativo de la actividad de adenilato ciclasa para proteger el corazón de la sobreestimulación simpática. En este sentido hay que resaltar que en estos estudios el aumento en los niveles de  $G_i$  va acompañado de un incremento paralelo en los niveles de inhibición de adenilato ciclasa vía receptores inhibidores; sin embargo, en nuestro modelo animal no se da este paralelismo, lo que nos permite diferenciar los procesos de desensibilización heteróloga descritos para diferentes patologías cardíacas, de humanos y de modelos animales, del proceso adaptativo de desensibilización heteróloga que tiene lugar en miocardio de animales entrenados.

#### 4.2.4 Resumen

Los resultados del presente estudio aportan nuevos datos acerca de los mecanismos adaptativos del miocardio al ejercicio físico de resistencia a nivel molecular, y cómo éstos son diferentes a los que acontecen en algunas patologías cardíacas. Generalmente se considera que el ejercicio físico tiene un efecto beneficioso para el sistema cardiovascular, pues incrementa la capacidad funcional de este sistema y disminuye la demanda de oxígeno por el miocardio (*Mc Henry et al.*, 1989). La desensibilización heteróloga que se observa en el sistema  $\beta$ -adrenérgico-adenilato ciclasa afecta a los diferentes componentes del sistema: a la densidad de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, a los niveles y funcionalidad de las proteínas  $G_s$  y  $G_i$ , y a la actividad catalítica de la enzima. Estos resultados permiten explicar la bradicardia que se genera en los animales de laboratorio y en humanos bien entrenados, y por otra parte indica que con el ejercicio físico el sistema objeto de estudio se adapta en el sentido de proporcionar una respuesta cardioprotectora frente a la sobreestimulación simpática que acompaña a la práctica deportiva.

### 4.3 ADAPTACIÓN DEL SISTEMA $\beta$ -ADRENÉRGICO-ADENILATO CICLASA DE HÍGADO DE RATA AL EJERCICIO FÍSICO

Como consecuencia del crecimiento en la demanda energética de los músculos esquelético y cardíaco durante la realización de un ejercicio físico se producen en el hígado una serie de procesos adaptativos conducentes a acelerar las rutas metabólicas que proporcionan el combustible muscular (glucogenolisis y gluconeogénesis). En este sentido, como ya se ha expuesto en la introducción, el papel del cAMP, y por ende del sistema de adenilato ciclasa, como responsable del control de estas rutas, es importantísimo.

Sólo existen dos trabajos previos en la bibliografía, publicados por *Döhm et al.*, (1976) y por *Yakovlev*, (1974) en los que se haya estudiado parcialmente la adaptación al ejercicio físico del sistema adenilato ciclasa en hígado. Por tanto, el presente es el primer trabajo en el que se estudia de forma sistemática esta adaptación, incorporando técnicas y conceptos que no se conocían en el momento en que estos autores publicaron sus estudios.

#### 4.3.1 Receptores $\beta$ -adrenérgicos

Según los datos obtenidos ni la densidad, ni la constante de disociación por el ICYP, de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos hepáticos se ve afectada como consecuencia del proceso adaptativo. Este resultado parece bastante lógico si consideramos que las catecolaminas plasmáticas sólo parecen ser importantes en la regulación de la liberación de glucosa en ejercicios muy prolongados en el tiempo (*Mc Kelvie et al.*, 1991). Además según *Wasserman y Cherrington*, (1991) no existe evidencia experimental de que la noradrenalina liberada por los terminales nerviosos simpáticos hepáticos sea esencial para aumentar la producción de glucosa durante el ejercicio. Sin embargo, según *Gardemann et al.*, (1992) el sistema nervioso simpático controla la liberación de glucosa directamente a través de sus terminales en el hígado e indirectamente al estimular la liberación de glucagón por el páncreas y de catecolaminas de la médula adrenal.

Por otra parte, está claramente establecido por estudios en los que se han empleado diferentes bloqueantes adrenérgicos que la estimulación de las rutas metabólicas de liberación de glucosa por los terminales simpáticos está mediada fundamentalmente por receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos, no acoplados a adenilato ciclasa en ratas y conejos (*Hartman et al.*, 1982 y *Winder*, 1988).

### 4.3.2 Regulación del sistema de adenilato ciclasa

#### 4.3.2.1 Características reguladoras de la subunidad catalítica

Los resultados obtenidos en cuanto a la funcionalidad de la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa parecen indicar que se produce, en contraposición a lo que ocurría en miocardio, un aumento de la actividad enzimática en el hígado de los animales entrenados. En su estudio, al igual que en éste, *Döhm et al., (1976)* no observaron variaciones en la actividad basal de la enzima (medida en presencia de  $Mg^{2+}$  10 mM); pero no ensayaron la actividad enzimática en presencia de  $Mn^{2+}$  o  $Mg^{2+}$ /forscolina, lo que no permite establecer una comparación más completa.

Las posibles explicaciones al aumento de la eficacia catalítica son similares a las que se daban para la enzima de miocardio de estas ratas y suponen una elevación de los niveles y/o funcionalidad de la subunidad catalítica en los animales entrenados. Otra posible explicación supondría una variación en estos animales de la composición del microentorno lipídico de la enzima; de hecho se ha observado que la composición de fosfolípidos de la membrana plasmática de hígado varía en procesos de diabetes (*Pierce et al., 1983*) afectando a la activación de la enzima por forscolina (*Pierce et al., 1983* y *Srivastava, 1985*).

#### 4.3.2.2 Características reguladoras de la proteína G.

Como se deduce del aumento observado en los niveles de activación máxima de la enzima por GppNHp y por fluoruro, la proteína G estimuladora del sistema parece sufrir alguna modificación durante la adaptación hepática al ejercicio físico de resistencia. Esta modificación podría explicarse en términos de una elevación en los niveles y/o funcionalidad de la proteína G, en hígado de animales entrenados (medidos tanto por ADP-ribosilación catalizada por toxina colérica como por inmunodetección empleando un anticuerpo específico).

En su estudio *Döhm et al., (1976)* midieron la actividad específica de adenilato ciclasa en presencia de una única y elevada concentración (10 mM) de fluoruro y no observaron diferencias entre los animales entrenados y sus correspondientes controles sedentarios. La diferencia entre los resultados de estos autores y los que se presentan en esta memoria pueden deberse al empleo de protocolos de entrenamiento diferentes en cuanto a su duración e intensidad. Además *Döhm et al., (1976)* emplearon ratas Sprague-Dawley que según *Shyu et al., (1984)* presentan una peor disposición para la carrera que las ratas Wistar empleadas en nuestro estudio.

#### 4.3.2.3 Regulación por receptores acoplados positivamente al sistema, $\beta$ -adrenérgicos y de glucagón

En este estudio se observa un desplazamiento hacia la izquierda de las curvas de activación de adenilato ciclasa por concentraciones crecientes de isoproterenol y glucagón, y al determinar las constantes de activación de la enzima para éstos dos mensajeros químicos se obtiene un valor ligeramente inferior en los animales entrenados. Junto a este descenso en la constante de activación se produce un aumento en la activación máxima de la enzima de hígado en respuesta al ejercicio físico.

Estos resultados se pueden explicar de diferentes formas. La primera implicaría un aumento en la densidad de receptores para estos dos mensajeros químicos en el hígado de los animales entrenados. Si bien esta explicación podría ser válida para los receptores de glucagón, no lo es para los  $\beta$ -adrenérgicos como atestiguan los ensayos de unión de ICYP a membranas de hígado. Otra posibilidad, no excluyente de la anterior, sería que la eficacia del acoplamiento entre estos receptores y la proteína  $G_s$  fuese mayor, de forma que en hígado de los animales entrenados habría un número mayor de receptores estimuladores en el estado de alta afinidad; el aumento que se observa en este estudio en los niveles de  $G_s$  sería un apoyo a este razonamiento. Además, en apoyo de esta última posibilidad también está el trabajo de *Hammond et al.*, (1988), quienes proponen que la regulación no coordinada entre los niveles de  $G_s$  y el número de receptores  $\beta$ -adrenérgicos permite explicar algunas situaciones fisiológicas o patológicas en las que la respuesta fisiológica y el número de receptores no varían en el mismo sentido.

Nuestros resultados difieren de los obtenidos por *Döhm et al.*, (1976) para una concentración 0.1 mM de adrenalina, quienes no observaron variación en los niveles de activación promovidos por la catecolamina en los dos bloques de animales experimentales, pero son equivalentes a los obtenidos por *Yakovlev*, (1974) para el hígado de ratas entrenadas por natación.

#### 4.3.2.4 Regulación negativa del sistema

Nuestro trabajo es el primero en estudiar la adaptación de estas vías de control negativo del sistema al ejercicio físico intenso y regular.

En el hígado de animales entrenados hemos observado un aumento significativo en los niveles de inhibición de la actividad de adenilato ciclasa promovidos por concentraciones saturantes de adrenalina y angiotensina II. Si bien los niveles de inhibición de la actividad enzimática obtenidos en este trabajo pueden parecer poco elevados, hay que decir que en membranas de hígado, *Jard et al.*, (1981) detectaron inhibiciones equivalentes para concentraciones saturantes de adrenalina y angiotensina II, dato que confirma la validez de los

resultados que se presentan en esta memoria. Además, recientemente *Liggett y Raymond, (1993)* han observado que los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos pueden acoplarse con  $G_i$ , además de con  $G_o$ , lo que también permite explicar los bajos niveles de inhibición obtenidos para concentraciones elevadas de adrenalina.

Al igual que sucedía en miocardio de animales entrenados, parece que las diferentes vías de control negativo del sistema, en hígado, siguen un proceso adaptativo común con la práctica del ejercicio físico intenso y regular de resistencia. Estos resultados podrían interpretarse como que los niveles de estos receptores inhibidores son mayores o presentan una afinidad mayor por sus ligandos, modulada por la interacción receptor- $G_i$ , en los animales entrenados que en sus controles sedentarios. Con respecto a la primera posibilidad, con los datos disponibles no se puede concluir si es o no cierta, pues sería necesario realizar estudios de unión de ligandos; y si bien no sería descartable en principio, parece poco probable que se produzca una variación de la densidad de los receptores inhibidores que afectase de modo similar, al menos a los estudiados, en respuesta al estímulo adaptativo que provoca el ejercicio físico. Con relación a la segunda explicación, ésta se puede apoyar con el aumento en los niveles de  $G_{i2}$  y  $G_{i3}$  que se ha detectado por inmunodetección en este trabajo, y que permitiría la formación de un mayor número de complejos de alta afinidad receptor-proteína  $G_i$  que fuesen responsables del aumento en los niveles de inhibición de la actividad enzimática que se observa en el hígado de los animales entrenados.  $G_{i2}$  parece mediar la inhibición de la actividad enzimática por receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos en plaquetas (*Simonds et al., 1989*) y  $G_{i3}$  parece acoplar los receptores de angiotensina a adenilato ciclasa en hepatocitos (*Pobiner et al., 1992*).

### 4.3.3 Proteínas G

#### 4.3.3.1 Niveles de $G_i$

Los resultados obtenidos tanto por ADP-ribosilación catalizada por toxina colérica como por inmunodetección llevan a la conclusión de que con el ejercicio físico aumentan los niveles de las dos formas de  $\alpha_i$  en hígado. Estos resultados son los primeros en describir el efecto del ejercicio físico intenso y regular de resistencia sobre los niveles de  $\alpha_i$  en este tejido y corroboran los datos obtenidos para la vía estimuladora del sistema de adenilato ciclasa como ya se ha discutido en el apartado 4.3.2. de esta memoria.

Mediante las dos técnicas empleadas se llega a la conclusión de que los niveles de la forma de  $\alpha_i$  de menor masa molecular, 42 KDa, aumentan en mayor proporción que los de 46 KDa. Esta adaptación diferencial al ejercicio físico de resistencia puede ser importante no sólo para la regulación de la actividad de adenilato ciclasa, efector al que activa más eficazmente la forma grande de  $\alpha_i$ , sino también para la regulación de la funcionalidad de otros efectores

a los que está acoplada  $G_i$ , como son los canales iónicos de  $Ca^{2+}$  y los de  $K^+$  (*Mc Farlane-Anderson, 1992*). Además, dado que tanto la forma de 42 KDa como la de 46 KDa proceden de la diferente modificación post-transcripcional de un mismo RNA mensajero, ésto indica que estos mecanismos operan de forma diferente en el hígado de los animales entrenados que en sus controles sedentarios como una respuesta adaptativa más al ejercicio físico.

#### 4.3.3.2 Proteínas $G_i$

En los experimentos por inmunodetección realizados se han empleado anticuerpos anti  $\alpha_{11}$ ,  $\alpha_{12}$  y  $\alpha_{13}$ , y los resultados obtenidos parecen indicar que en membrana plasmática de hígado sólo aparecen dos formas de  $\alpha_i$ ,  $\alpha_{12}$  y  $\alpha_{13}$ . Estos resultados concuerdan con los datos previos de la bibliografía pues *Mumby et al., (1988)* observaron la presencia de estas dos formas de  $\alpha_i$  en membrana de hígado de conejo, y *Pobiner et al., (1992)* han demostrado que los hepatocitos de rata sólo contienen RNA mensajero para las subunidades  $\alpha$  de las proteínas  $G_{12}$  y  $G_{13}$ .

El aumento en los niveles de  $\alpha_{12}$ ,  $\alpha_{13}$  junto con el de la subunidad  $\beta$  parecen indicar que se produce un incremento en los niveles de las diferentes formas de  $G_i$  que podría dar cuenta del aumento en los niveles de inhibición de adenilato ciclasa detectados en este estudio.

Los resultados obtenidos por estas dos técnicas, al igual que hemos visto en miocardio, son aparentemente contradictorias dado que por ADP-ribosilación parecen disminuir ligeramente los niveles de  $\alpha_i$  mientras que por inmunodetección aumentan de forma muy significativa. *Palmer y Houslay, (1991)* han obtenido resultados igualmente discordantes entre estas dos técnicas en membrana plasmática de hígado de ratones genéticamente diabéticos (*db/db*), y las explicaciones a estos resultados divergentes, así como las razones que justifican el empleo de estas dos técnicas experimentales, son las mismas que se aportan en el apartado 4.2.3.2 de esta memoria.

En diferentes procesos patológicos hepáticos se producen también variaciones en los niveles de  $G_i$  determinados por inmunodetección, así *Palmer y Houslay, (1991)* y *Mc Farlane-Anderson et al., (1992)* han medido un descenso de los mismos en membrana plasmática de ratones genéticamente diabéticos (*db/db*) y genéticamente obesos (*ob/ob*), respectivamente.

#### 4.3.4 Resúmen

Los resultados que se presentan en esta memoria parecen indicar que se produce una sensibilización que afecta, al menos, al efector del sistema (proteínas  $G$  y subunidad catalítica) y no a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Luego el sistema  $\beta$ -adrenérgico-adenilato ciclasa de hígado parece adaptarse al ejercicio físico en el sentido de responder a los requerimientos energéticos del músculo cardíaco y esquelético con más rapidez y eficacia movilizándolo el metabolismo

hepático en su papel de suministro de glucosa. Por otra parte, el aumento en los niveles de inhibición observados en animales entrenados podría suponer un mecanismo adaptativo protector de desconexión rápida del sistema después de un ejercicio prolongado para cortar el aporte de glucosa al plasma.

#### 4.4 ADAPTACIÓN DEL SISTEMA $\beta$ -ADRENÉRGICO-ADENILATO CICLASA DE TEJIDO ADIPOSO DE RATA AL EJERCICIO FÍSICO

Como ya se ha señalado en la Introducción de esta memoria, las reservas de triglicéridos almacenadas en el tejido adiposo constituyen la mayor fuente de combustible metabólico empleado por el músculo cardíaco y esquelético durante la realización de un ejercicio físico sostenido en condiciones aeróbicas. La activación del sistema de adenilato ciclasa a través de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos acoplados, es la principal responsable de la liberación de ácidos grasos libres al torrente circulatorio gracias a la estimulación de la respuesta lipolítica de los adipocitos. Por este motivo, y además porque los datos existentes en la bibliografía sobre la funcionalidad del sistema  $\beta$ -adrenérgico-adenilato ciclasa en animales y humanos entrenados son escasos e incompletos, hemos acometido el estudio de la posible adaptación de este sistema al ejercicio físico de resistencia en tejido adiposo de ratas.

##### 4.4.1 Receptores $\beta$ -adrenérgicos

Los resultados obtenidos en los ensayos de unión de ligandos indican, como se señala en el capítulo de Resultados, que en nuestro modelo animal de entrenamiento por carrera se produce un aumento en la densidad de receptores  $\beta$ -adrenérgicos de tejido adiposo sin que varíe la afinidad de los receptores por el antagonista. Este resultado, en principio, podría dar cuenta del aumento en la respuesta lipolítica a catecolaminas que han observado diferentes autores en animales de laboratorio (*Askew y Hecker, 1976; Bukowiecki et al., 1980; Williams y Bishop, 1982; Shepherd et al., 1986 e Izawa et al., 1991*) y en hombres entrenados (*Crampes et al., 1986; Riviere et al., 1989; Wahrenberg et al., 1991 y Lönnqvist et al., 1992*).

En tejido adiposo de rata se ha demostrado la existencia de un tercer receptor  $\beta$ -adrenérgico funcional, en tanto en cuanto estimula la lipólisis vía adenilato ciclasa, que se corresponde con los denominados receptores  $\beta$ -adrenérgicos "atípicos" (*Hollenga y Zaagsma, 1989*). Este tercer tipo de receptores  $\beta$ -adrenérgicos de rata, que recientemente ha sido clonado y expresado por *Granneman et al., (1992)*, no es reconocido en los ensayos de unión de ligandos con los radioligandos que se emplean clásicamente ( $[^3\text{H}]$  Dihidroalprenolol,  $[^{125}\text{I}]$  iodocianopindolol y  $[^3\text{H}]$  CGP12177). Es por ello que *Langin et al., (1991)*, que han

intentado infructuosamente identificar los receptores  $\beta_3$ -adrenérgicos empleando concentraciones más altas que las utilizadas normalmente, han propuesto que uno de los retos más importantes que tiene planteada la farmacología es la consecución de un antagonista marcado que posea una elevada afinidad por estos receptores. Dado que hasta la actualidad el reto planteado por *Langin et al.*, (1991) no se ha conseguido superar, nuestros resultados tan sólo reflejan la variación en la densidad de los receptores "típicos" ( $\beta_1$  y  $\beta_2$ -adrenérgicos).

Son pocos los trabajos existentes en la bibliografía en los que se estudia la variación en la densidad o afinidad de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos de tejido adiposo con el ejercicio físico en animales o humanos, pues si bien la mayoría se centra en el estudio del aumento en los niveles de lipólisis estimulada vía receptor  $\beta$ -adrenérgico no cuantifican la densidad o afinidad de éste.

*Bukowiecki et al.*, (1980) y *Williams y Bishop*, (1982), en ratas entrenadas por natación, no observaron variación alguna en la densidad o afinidad de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos entre los animales entrenados y sus respectivos controles. La discrepancia en cuanto a densidad entre estos resultados y los nuestros puede deberse al empleo de protocolos de entrenamiento diferentes o al empleo de dihidroalprenolol por estos autores, en vez de [ $^{125}$ I] iodocianopindolol (como en el presente estudio) que posee una afinidad y especificidad mayor que el [ $^3$ H] dihidroalprenolol (*Engel et al.*, 1981). *Shepherd et al.*, (1986) tampoco observaron diferencias en la densidad o afinidad de estos receptores en tejido adiposo de ratas espontáneamente hipertensas entrenadas; pero debido al empleo de este particular modelo animal experimental es posible que sus resultados difieran de los presentados en esta memoria. Asimismo, en humanos entrenados, *Crampes et al.*, (1986) y *Wahrenberg et al.*, (1991) tampoco han encontrado variaciones en la densidad o afinidad de receptores  $\beta$ -adrenérgicos de adipocitos con respecto a sus controles, mientras que *Lönnqvist et al.*, (1992) sí que han observado un aumento en los niveles de receptores  $\beta$ -adrenérgicos en adipocitos de hombres entrenados en una bicicleta ergométrica.

#### 4.4.2 Regulación del sistema de adenilato ciclasa

##### 4.4.2.1 Características reguladoras de la subunidad catalítica

Los resultados obtenidos cuando se mide la actividad de adenilato ciclasa en presencia de concentraciones saturantes de  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ /forskolina, así como subsaturantes del diterpeno parece que indican que con la adaptación al ejercicio físico se produce un aumento de la actividad enzimática en tejido adiposo, que puede atribuirse a una elevación en los niveles y/o funcionalidad de la subunidad catalítica con el entrenamiento. Y este aumento podría

contribuir al incremento en los niveles de lipólisis que han observado otros autores en animales experimentales.

En tejido adiposo, a diferencia de lo que ocurría en corazón e hígado, se observa un aumento significativo en la actividad de la enzima con el ejercicio físico, en presencia de una concentración saturante de  $Mg^{2+}$ . Este hecho podría explicar el que en tejido adiposo los niveles de activación de la enzima promovidos por el diterpeno sean similares en los dos bloques de animales empleados, a pesar de que hemos observado un aumento en la actividad específica de la enzima estimulada por diferentes concentraciones de forskolina en ratas entrenadas. Sin embargo en corazón e hígado varía significativamente la activación promovida por el diterpeno en presencia de  $Mg^{2+}$ , lo que podría deberse a pequeñas diferencias en la actividad basal no detectadas debido a sus bajos niveles. Por tanto, el proceso adaptativo que sufre la subunidad catalítica de la enzima en tejido adiposo no tiene por qué diferir del que acontece, por ejemplo, en el hígado de los animales entrenados y se produce, como cabría esperar, en el mismo sentido. No obstante, no se puede descartar que la ausencia de diferencias en los niveles de activación de la adenilato ciclasa por forskolina reflejen una modificación en la capacidad del sistema  $\beta$ -adrenérgico-adenilato ciclasa para formar el complejo subunidad catalítica- $\alpha$ , puesto que el diterpeno estimula en mayor grado la actividad enzimática cuando interacciona con este complejo (Hubbard *et al.*, 1991).

En la bibliografía sólo existen cuatro publicaciones en las que se ha ensayado la actividad de la subunidad catalítica, pero únicamente la actividad basal en presencia de una concentración de  $Mg^{2+}$  saturante, y en ninguno de ellos se observan diferencias significativas entre los animales entrenados y sus controles sedentarios (Yakovlev, 1974; Williams y Bishop, 1982 e Izawa *et al.*, 1986 y 1988). Luego, el presente se puede considerar que es, hasta el momento, el estudio más completo de la posible adaptación al ejercicio físico de la subunidad catalítica del sistema adenilato ciclasa.

#### 4.4.2.2 Características reguladoras de la proteína G<sub>i</sub>

En este estudio se ha cuantificado la actividad de adenilato ciclasa en presencia de diferentes concentraciones de GppNHp y fluoruro que resulta significativamente mayor en las ratas entrenadas. Sin embargo, cuando se determinan los niveles de activación para eliminar la contribución de las diferencias observadas en la actividad basal de la enzima, no se detectan diferencias entre los dos bloques de animales experimentales. Estos resultados parecen indicar que la funcionalidad del componente regulador activador no se modifica como consecuencia de la adaptación al ejercicio físico intenso y regular en nuestro modelo, y que las diferencias observadas en la actividad son debidas a la diferente funcionalidad de la subunidad catalítica.

Por otra parte, estos resultados contrastan con el aumento en los niveles de G<sub>i</sub> determinados tanto por ADP-ribosilación en presencia de toxina colérica como por

inmunodetección. Un descenso en la capacidad de  $\alpha$ , para interaccionar con la subunidad catalítica, como se ha planteado en el apartado 4.4.2.1. de esta Discusión, podría ser una explicación a estos resultados. O alternativamente, podría suceder que el aumento en los niveles del componente regulador estimulador, que no afecta por igual a la forma grande y pequeña de G<sub>s</sub>, sería un mecanismo adaptativo encaminado a elevar la funcionalidad de efectores distintos a la adenilato ciclasa, como los canales iónicos (*Mc Farlane-Anderson, 1992*). La estimulación de estos efectores podría redundar en una estimulación de la actividad de adenilato ciclasa, gracias a procesos de regulación cruzada vía proteína quinasa C que fosforila diferentes componentes del sistema, tal y como se ha descrito por *Gorin et al., (1990)* y *Mazancourt et al., (1991)*.

*Yakovlev, (1974)* y *Williams y Bishop, (1982)* tampoco han observado diferencias entre ratas entrenadas y sus controles cuando han ensayado la actividad enzimática en presencia de una concentración saturante de fluoruro. Por otra parte, y en contra de los dos estudios anteriores y del nuestro, *Izawa et al., (1986)* han descrito un aumento en la actividad de adenilato ciclasa estimulada por concentraciones saturantes de GppNHp, sin que varíe la constante de activación de la enzima por el modulador, en ratas entrenadas.

#### 4.4.2.3 Regulación por la vía estimuladora $\beta$ -adrenérgica

La curva obtenida al ensayar la actividad enzimática en presencia de concentraciones crecientes de isoproterenol, se desplaza hacia la izquierda en los animales entrenados, lo que indica una disminución de la constante de activación por el agonista, sin que se afecte la respuesta máxima.

En estudios realizados en adipocitos humanos *Crampes et al., (1989)* también han comprobado que la mínima concentración de adrenalina necesaria para estimular la lipólisis es menor en deportistas ( $10^{-7}$  M) que en personas sedentarias ( $10^{-5}$  M), lo que estaría de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo. Sin embargo, *Yakovlev, (1974)*, *Williams y Bishop, (1982)*, *Izawa et al., (1986, 1988 y 1991)* y *Shepherd y Bah, (1988)* describen un aumento significativo en la activación de adenilato ciclasa, a concentraciones saturantes de catecolaminas, en animales entrenados, mientras que en nuestro estudio no se aprecian diferencias significativas en los niveles de activación por isoproterenol  $5 \times 10^{-5}$  M entre las ratas entrenadas y sus controles sedentarios.

Dado que se ha observado un aumento en la densidad de receptores  $\beta$ -adrenérgicos de tejido adiposo de animales entrenados, nuestros resultados se podrían explicar sobre la base de un incremento en el número de "spare-receptors" en tejido adiposo de rata (*Lacasa et al., 1984*), cuyo nivel ha sido estimado en un 50% del total de receptores por *Amer, (1992)*. En cualquier caso, hay que tener presente las limitaciones que tienen los ensayos de unión de ligandos en

tejido adiposo de rata para cuantificar la densidad "real" de receptores  $\beta$ -adrenérgicos debido a la existencia de receptores  $\beta_3$ , receptores atípicos no reconocibles por los radioligandos clásicos (véase el apartado 4.4.2 de esta memoria).

Los resultados obtenidos también se podrían interpretar sobre la base de un aumento en la afinidad del receptor por el agonista con el ejercicio físico, que podría reflejar un aumento en el número de complejos receptor- $G_i$  de alta afinidad, de forma opuesta a lo que sucedía en corazón. Así, *Williams y Bishop, (1982)* han descrito un aumento en el número de receptores que se encuentran en el estado de alta afinidad en tejido adiposo de ratas entrenadas por natación, a pesar de que en su estudio no observaron variación alguna en la densidad de receptores  $\beta$ -adrenérgicos. *Izawa et al., (1986)* también han observado que los niveles de liberación de [ $^3$ H] GDP promovidos por catecolaminas son mayores en membranas de tejido adiposo de ratas entrenadas, resultado que indica que el ejercicio físico podría incrementar la capacidad de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos para interaccionar con  $G_i$  o un aumento en los niveles de  $G_i$  (*Izawa et al., 1986* y *Shepherd y Bah, 1988*).

#### 4.4.2.4 Regulación negativa del sistema

Se ha estudiado únicamente la vía de adenosina, una de las más importantes en tejido adiposo, y no se han observado variaciones significativas en la inhibición de la actividad de adenilato ciclasa promovida por el agonista ciclohexiladenosina en ratas entrenadas con respecto a sus controles. *Williams y Bishop, (1982)*, sin embargo, sí han observado un descenso significativo en los niveles de inhibición promovidos por adenosina en ratas entrenadas. También en ratas *Izawa et al., (1988)* han determinado unos menores niveles de inhibición por GTP de la actividad enzimática estimulada por forskolina y *Wahrenberg et al., (1991)* han observado en mujeres deportistas un menor efecto antilipolítico de catecolaminas, a pesar de no variar la densidad y afinidad de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos con respecto a sus controles sedentarios. Estos tres trabajos coinciden en atribuir los resultados obtenidos a una posible alteración en la funcionalidad o niveles de  $G_i$ .

En nuestro caso, hemos medido por inmunodetección un descenso significativo en los niveles de  $\alpha_2$ , forma mayoritariamente implicada en la inhibición de adenilato ciclasa, que no sería relevante si se considera que tan sólo una pequeña parte del total de  $G_i$  podría ser suficiente para acoplar los receptores inhibidores a adenilato ciclasa tanto en adiposo como en otros tejidos. Así, *Begin-Heick, (1992)* han llegado a hablar de la existencia de "spare  $G_i$ " en membranas de tejido adiposo de ratones para explicar unas discrepancias similares a las nuestras entre los niveles de  $G_i$  inmunodetectados y los de inhibición de adenilato ciclasa. Una posible interpretación de los resultados obtenidos podría implicar un aumento en la eficacia del

acoplamiento entre  $G_{12}$  y el receptor de adenosina que compensase el descenso en los niveles de la isoforma  $\alpha_{12}$ .

#### 4.4.3 Proteínas G

##### 4.4.3.1 Niveles de $G_i$

Los resultados obtenidos al cuantificar los niveles de  $G_i$  por ADP-ribosilación catalizada por toxina colérica e inmunodetección, son coincidentes tanto en el reconocimiento de dos sustratos (de 42 KDa y 46-47 KDa) como en sus niveles, que aumentan como consecuencia de la adaptación al ejercicio físico. Las dos proteínas reconocidas corresponden a las dos formas de  $\alpha_i$ , grande y pequeña, que se ha descrito posee el tejido adiposo (*Milligan y Saggerson, 1990*).

Estos resultados permiten explicar los datos obtenidos al estudiar la funcionalidad del componente regulador, y del receptor  $\beta$ -adrenérgico de la vía estimuladora del sistema, tal y como se ha discutido anteriormente en el apartado 4.4.2.

*Izawa et al., (1988)* han publicado el único trabajo existente en la bibliografía en el que se han cuantificado los niveles de  $G_i$  mediante ADP-ribosilación en presencia de toxina colérica en membranas de tejido adiposo de ratas controles y entrenadas. Sus resultados no coinciden con los que se presentan en esta memoria, tanto porque no observan variaciones en los niveles de ADP-ribosilación entre los dos bloques de animales experimentales, como porque en su estudio sólo reconocen un sustrato ADP-ribosilado de 45 KDa de masa molecular. Las diferencias entre sus resultados y los del presente estudio se pueden deber al empleo de protocolos de ADP-ribosilación que difieren sustancialmente en el medio, tiempo y temperatura de incubación, y también en las condiciones de electroforesis empleadas. Por otra parte, los datos que se han obtenido por inmunodetección corroboran la existencia de las dos formas de  $\alpha_i$ , descritas en la bibliografía.

Como en hígado, en tejido adiposo de animales entrenados el proceso de adaptación al ejercicio físico parece afectar de modo diferencial a las dos formas de  $\alpha_i$ , puesto que los niveles de la forma pequeña aumentan en mayor proporción que los de la grande. Este hecho puede tener importantes consecuencias en la regulación tanto de adenilato ciclasa como de otros efectores que se ha descrito están acoplados a  $G_i$  (como los canales iónicos). *Begin-Heick, (1992)* ha descrito un proceso adaptativo que afecta también de manera diferente a las formas grande y pequeña de  $\alpha_i$  en membranas de tejido adiposo de ratones genéticamente diabéticos (db/db).

#### 4.4.3.2 Proteínas G<sub>i</sub>

El presente trabajo se puede considerar que es el primero, al igual que hemos visto sucede en hígado, en estudiar la posible modificación de los niveles de las diferentes formas de G<sub>i</sub>, que se expresan en tejido adiposo, con la adaptación al ejercicio físico dinámico de resistencia.

En los experimentos de inmunodetección se han empleado anticuerpos específicos para cada una de las formas de  $\alpha_i$  ( $\alpha_{i1}$ ,  $\alpha_{i2}$ ,  $\alpha_{i3}$ ) de vertebrados, y los resultados obtenidos, en coincidencia con los de otros autores (*Green et al., 1990*), indican la existencia en tejido adiposo de rata de todas ellas.

Los resultados obtenidos por ADP-ribosilación catalizada por toxina pertussis e inmunodetección son aparentemente contradictorios, pues si bien por la primera técnica parece que disminuyen los niveles de  $\alpha_i$ , por inmunodetección sólo lo hace  $\alpha_{i2}$  mientras que  $\alpha_{i1}$  y  $\alpha_{i3}$  parece que aumentan en la membrana plasmática de tejido adiposo de ratas entrenadas. Las razones que permiten explicar los resultados aparentemente divergentes obtenidos por estas dos técnicas, así como aquellas que justifican el empleo de la ADP-ribosilación, son las mismas que se han relacionado en el apartado 4.2.3.2 de esta memoria. *Begin-Heick, (1992)* ha obtenido también resultados discordantes entre estas dos técnicas en tejido adiposo de ratones genéticamente diabéticos (db/db). Por otra parte, *Strassheim et al., (1991)* también han descrito un proceso de adaptación diferente para las diferentes formas de  $\alpha_i$  medidas por inmunodetección en membranas de tejido adiposo de ratones genéticamente diabéticos (db/db).

*Izawa et al., (1988)* son los únicos que han estudiado la variación en los niveles de  $\alpha_i$  mediante ADP-ribosilación en presencia de toxina pertussis en tejido adiposo de ratas entrenadas. Los resultados que describen son diferentes a los de esta memoria en cuanto al número de sustratos ADP-ribosilados que se detectan en los autorradiogramas pero coinciden en el sentido de las variaciones observadas. Las diferencias entre su estudio y el nuestro, en cuanto a los sustratos de modificación covalente reconocidos, posiblemente se deben al empleo de procedimientos de ensayo y separación electroforética de las muestras diferentes. En cualquier caso el trabajo de *Izawa et al., (1988)*, por todas las razones aportadas en el apartado 4.2.3.2 de esta memoria, en cuanto a las limitaciones que tiene la ADP-ribosilación, podría no reflejar la variación real de las proteínas  $\alpha_i$  en tejido adiposo de animales entrenados.

Las posibles interpretaciones fisiológicas que se pueden hacer sobre las variaciones de  $\alpha_i$  observadas son escasas, pues no se conocen con exactitud todos los efectores que están acoplados a cada una de sus formas; en este sentido y si bien parece claro que  $\alpha_{i2}$  es la proteína principalmente responsable de la inhibición de adenilato ciclasa (*Simonds et al., 1989*), todas las formas de  $\alpha_i$  parecen implicadas en la regulación de canales iónicos (*Spiegel et al., 1992*). En cualquier caso,  $\alpha_{i1}$  y  $\alpha_{i3}$  no parecen estar acopladas a la inhibición de adenilato ciclasa en tejido

adiposo, y en cuanto al papel que desempeña la variación observada en los niveles de  $\alpha_2$  en el control negativo de la enzima, ya se ha discutido en el apartado 4.4.2.4 de esta memoria.

#### 4.4.4 Resumen

Los resultados del presente estudio en su conjunto constituyen una aportación importante al conocimiento de los procesos adaptativos que se producen en el tejido adiposo con la práctica de un deporte intenso y regular de resistencia, como es la carrera. En el sistema  $\beta$ -adrenérgico-adenilato ciclasa estos procesos están encaminados al aumento en los niveles de producción de cAMP dado que se observa una sensibilización de la vía estimuladora del sistema sin que aparentemente se modifiquen las vías de control negativo del mismo. Esta adaptación conlleva un aumento en los niveles de lipólisis que permite a este tejido satisfacer la demanda energética de los músculos cardíaco y esquelético durante la realización del ejercicio físico. Además, nuestros datos no son excluyentes con la posibilidad de que este proceso adaptativo provoque también modificaciones en etapas de la cadena de estimulación de la lipasa sensible a hormona, posteriores a la del sistema que hemos estudiado, tal y como han descrito *Bukowiecki et al., (1980)*; *Shepherd y Bah, (1988)*; *Izawa et al., (1991)* y *Wahrenberg, (1991)*.

#### 4.5 DISCUSIÓN INTEGRADA DE LA ADAPTACIÓN DEL SISTEMA $\beta$ -ADRENÉRGICO-ADENILATO CICLASA EN CORAZÓN, HÍGADO Y TEJIDO ADIPOSO AL EJERCICIO FÍSICO

El esfuerzo físico intenso y regular promueve una serie de modificaciones más o menos permanentes en el sistema neuroendocrino, y la movilización del sistema simpato-adrenal es una de las principales componentes de esta respuesta adaptativa. Además de las conclusiones particulares que se han expuesto en los sumarios de la discusión efectuada para cada uno de los órganos y tejidos estudiados, se puede extraer una conclusión final acerca de cómo operan de forma integrada en el organismo los mecanismos adaptativos a este estímulo fisiológico.

Estos mecanismos son específicos para cada tejido y en su conjunto permiten una respuesta coordinada del organismo al esfuerzo físico. Así, el corazón se adapta en el sentido de aumentar la eficacia y disminuir la frecuencia de su contracción para aumentar el flujo sanguíneo hacia el resto del organismo, y esta adaptación cardiovascular además permite un transporte más eficaz de los diferentes combustibles metabólicos desde sus centros de producción y exportación (hígado y tejido adiposo) hasta los centros de demanda y consumo que son los músculos cardíaco y esquelético. Además, el hígado y el tejido adiposo se adaptan

en el sentido de satisfacer esta demanda energética muscular durante el ejercicio con mayor rapidez y eficacia. De este modo la unidad de interrelación metabólica que constituyen el músculo cardíaco, hígado y tejido adiposo ofrece una respuesta integrada y más eficaz al ejercicio físico.

El sistema  $\beta$ -adrenérgico-adenilato ciclasa, responsable del control de gran parte de estos procesos fisiológicos, se adapta también de forma diferente pero coordinada. En este sentido, se han descrito respuestas adaptativas diferenciadas en función del tejido, en el sistema  $\beta$ -adrenérgico-adenilato ciclasa en diversas situaciones fisiopatológicas (*Malbon et al., 1988*). Así en un modelo de hipotiroidismo se produce en corazón un descenso en la densidad de receptores  $\beta$ -adrenérgicos y en la respuesta mediada por ellos, resultados que contrastan con el aumento observado en hígado para la densidad de los receptores y la respuesta mediada o con la ausencia de variaciones en la densidad de receptores y el descenso en la respuesta en tejido adiposo. Con hipertiroidismo, para estos mismos órganos, los resultados son exactamente opuestos; y en animales adrenalectomizados también se originan respuestas adaptativas diferentes en corazón, hígado y adiposo, en cuanto a la densidad de receptores  $\beta$ -adrenérgicos y la respuesta mediada por ellos. Asimismo *Buckenmeyer et al., (1990)* y *Plourde et al., (1993)* han descrito procesos adaptativos al ejercicio físico de resistencia que afectan de forma diferente al sistema  $\beta$ -adrenérgico-adenilato ciclasa de distintos tipos de músculo esquelético.

## CONCLUSIONES

## 5 CONCLUSIONES

La conclusión general de este estudio es que **el sistema adenilato ciclasa sí que experimenta importantes modificaciones adaptativas** como consecuencia del ejercicio físico de resistencia intenso y regular, y que estas modificaciones son **distintas en función del tejido** (corazón, hígado y adiposo) y **coherentes** con el papel regulador ejercido por este sistema de transducción en cada uno de ellos, lo que garantiza una respuesta coordinada al estímulo fisiológico. Los resultados que se resumen en la Tabla XIV arrojan las siguientes conclusiones acerca de las **adaptaciones observadas en el sistema con el ejercicio físico**:

\* Receptor

- Si bien no existen variaciones en la afinidad de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos por antagonistas en ninguno de los tres tejidos, la densidad de receptores disminuye en corazón y aumenta en tejido adiposo, mientras que en hígado no varía.

\* Efector

- La actividad enzimática atribuible a variaciones en los niveles y/o funcionalidad de la subunidad catalítica de adenilato ciclasa disminuye significativamente en miocardio, mientras que en tejido hepático y adiposo aumenta.
- La funcionalidad de la proteína  $G_s$ , evaluada por su capacidad de activación de la subunidad catalítica de adenilato ciclasa, disminuye en corazón, aumenta en hígado y en tejido adiposo no varía.
- Los niveles de proteína  $\alpha_s$  y de ADP-ribosilación por toxina colérica disminuyen en el miocardio de los animales entrenados, mientras que en tejido hepático y adiposo aumentan. Los niveles de las diferentes formas de  $\alpha_i$  presentes en estos tres tejidos aumentan en los animales entrenados, excepto los de  $\alpha_{i2}$  que disminuyen en tejido adiposo, mientras que los niveles de ADP-ribosilación catalizada por toxina pertussis son menores en los animales entrenados en todos los tejidos estudiados.

\* Receptor/efector

- La actividad de adenilato ciclasa estimulada por agonistas  $\beta$ -adrenérgicos es menor en corazón, mientras que aumenta en hígado y tejido adiposo. La acción del glucagón en este sentido es similar a la de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos.
- La actividad de la adenilato ciclasa determinada en presencia de agonistas de diferentes receptores inhibidores disminuye en corazón, aumenta en hígado y no varía de modo significativo en tejido adiposo.

Por tanto, se concluye que el sistema de adenilato ciclasa de corazón se desensibiliza como consecuencia del ejercicio físico intenso y regular de resistencia, mientras que en tejido hepático y adiposo se hipersensibiliza. Sin embargo, las variaciones adaptativas para los diferentes componentes del sistema de adenilato ciclasa de hígado y adiposo no cursan en un

sentido estrictamente opuesto. Además, las modificaciones adaptativas que se observan en este sistema en tejido hepático son diferentes a las detectadas en adiposo, a pesar de que los dos tienen un papel de suministro energético al tejido muscular durante la realización del ejercicio físico.

TABLA XIV. Resumen de las adaptaciones que afectan al sistema  $\beta$ -adrenérgico-adenilato ciclasa en corazón, hígado y tejido adiposo de los animales entrenados

	<u>CORAZON</u>	<u>HIGADO</u>	<u>TEJ. ADIPOSO</u>
<u>Rc-<math>\beta</math></u>			
Bmax	↓	O	↑
Kd	O	O	O
<u>AC</u>			
C ( $Mn^{2+}$ y FK)	↓	↑	↑
G <sub>s</sub> (F <sup>-</sup> y GppNHp)	↓	↑	O
ISO	↓	↑	↑
Inhib. de AC	↓	↑	O
<u>Prot. G</u>			
$\alpha_5$	↓	↑	↑
$\alpha_{11}$	↑	↑	↑
$\alpha_{12}$	↑	↑	↓
$\alpha_{13}$	↑	↑	↑
$\beta$	O	↑	↑
CTX	↓	↑	↑
PTX	↓	↓	↓

Rc- $\beta$ , receptores  $\beta$ -adrenérgicos; Bmax, densidad de receptores; Kd, constante de disociación; AC, adenilato ciclasa; C, subunidad catalítica; FK, forskolina; F<sup>-</sup>, fluoruro; GppNHp, guanililimidodifosfato; ISO, isoproterenol; Inhib. de AC, inhibición de adenilato ciclasa;  $\alpha$  y  $\beta$ , niveles de las diferentes subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de proteínas G determinados por inmunodetección; CTX, niveles de ADP-ribosilación catalizada por toxina colérica; PTX, niveles de ADP-ribosilación catalizada por toxina pertussis. Las flechas indican la existencia de variaciones significativas y el sentido en el que se producen; O, indica ausencia de diferencias.

## BIBLIOGRAFIA

- AARONS R.D. y MOLINOFF P.B. (1982) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 221, 439-443.
- AHLBORG G., FELIG P., HAGENFELDT H., HENDLER R. y WAHREN J. (1974) *J. Clin. Invest.* 53, 1080-1090.
- AHLQUIST R.P. (1948) *Am. J. Physiol.* 153, 586-600.
- ARNER P. (1992) *Am. J. Clin. Nutr.* 55, 228 S-236 S.
- ARNER P., WAHRENBERG H. y ÖSTMAN J. (1982) *J. Lipid. Res.* 23, 717-719.
- ARNER P., KRIEGHOLM E., ENGFELTD P. y BOLINDER P. (1990) *J. Clin. Invest.* 85, 893-898.
- ARNOLD I.R., MISTRY R. y BARNETT D.B. (1993) *Eur. J. Pharmacol.* 245, 285-289.
- ASKEW E.W., y HECKER A.L. (1976) *J. Nutr.* 106, 1351-1360.
- ATKINS F.L., DOWELL R.T. y LOVE S. (1985) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 7, 66-70.
- BAHOOTH S.W. y MALBON C.C. (1988) *Mol. Pharmacol.* 34, 318-326.
- BALDWIN K.M., COOKE D.A. y CHEADLE W.G. (1977) *J. Appl. Physiol.* 42, 267-272.
- BALLOR D.L. y KEESEY R.E. (1991) *Int. J. Obesity* 15, 717-726.
- BARBER D.L. y GANZ M.B. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 20607-20612.
- BARNARD E.A. (1992) *Trends Biochem. Sci.* 17, 368-374.
- BARNARD R.J., DUNCAN H.W., BALDWIN K.M., GRIMDITCH G. y BUCKBERG G.D. (1980) *J. Appl. Physiol.* 49, 444-449.
- BEGIN-HEICK N. (1992) *Am. J. Physiol.* 263, C121-C129.
- BEGIN-HEICK N. y Mc FARLANE ANDERSON N. (1992) *G Proteins, Signal Transduction and Disease* (Milligan G. y Wakelam eds.) Academic press, Londres, pp 129-156.
- BELSHAM G.J., DENTON R.M. y TANNER M.J.A. (1980) *Biochem. J.* 192, 457-467.
- BERSTEIN G., BLANK J.L., JHON D.-Y., EXTON J.H., RHEE S.G. y ROSS E.M. (1992) *Cell* 70, 411-418.
- BIRNBAUMER L. (1992) *Cell* 71, 1069-1072.
- BIRNBAUMER L. (1993) *J. Recept. Res.* 13, 19-26.
- BIRNBAUMER L., CODINA J., MATTERA R., CERIONE R.A., HILDEBRANDT J.D., SUNYER T., ROJAS F.J., CARON M.G., LEFKOWITZ R.J., IYENGAR R. (1985) *Molecular Mechanism of Transmembrane Signalling* (Cohen P. y Houslay M.D. eds.) Elsevier Science Publishers, Amsterdam. pp. 131-182.
- BIRNBAUMER L., ABRAMOWITZ J. y BROWN A.M. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1031, 163-224.
- BLOMQUIST C.G. y SALTIN B. (1983) *Annu. Rev. Physiol.* 45, 169-189.
- BÖHM M., GIERSCHICK P., JAKOBS K.H., PIESKE B., SCHNABEL P., UNGERER M. y ERDMANN E. (1990) *Circulation* 82, 1249-1265.
- BÖHM M., GIERSCHIK P., KNORR A., LARISCH K., WEISSMANN K. y ERDMANN E. (1992a) *Hypertension* 20, 103-112.

- BÖHM M., GIERSCHIK P., KNORR A., LARISCH K., WEISMANN K., y ERDMANN E. (1992b) *J. Hypertension* 10, 1115-1128.
- BÖHM M., GIERSCHICK P. y ERDMANN E. (1992c) *Basic Res. Cardiol.* 87, S1, 37-50.
- BÖHM M., DORNER H., HTUN P., LENSCH H., PLATT D. y ERDMANN E. (1993) *Am. J. Physiol.* 264, H805-H814.
- BOUANANI N., CORSIN A., GILSON N. y CROZATIER B. (1991) *J. Mol. Cell. Cardiol.* 23, 573-581.
- BOURNE H.R., SANDERS D.A. y Mc CORMICK (1990) *Nature* 348, 125-132.
- BOURNE H.R. y NICOLL R. (1993) *Cell* 72 / *Neuron* 10 (Suppl), 65-75.
- BRABET P., DUMUIS A., SEBEN M., PANTALONI C., BOCKAERT J. y HOMBURGER V. (1988) *J. Neurosci.* 8, 701-708.
- BRADEN D.S. y STRONG W.B. (1990) *Amer. J. Diseases of Children* 144, 1255-1260.
- BRISTOW M. R., KANTROWITZ N. E., GINSBURG R. y FOWLER M. B. (1985) *J. Mol. Cell. Cardiol.* 17, 41-52.
- BRODDE O.E. (1991) *Pharmacol. Rev.* 43, 203-242.
- BRODDE O.E. y MICHEL M.C. (1992) *J. Hypertens.* 10, S133-S145.
- BRODDE O.E., KRETSCH R., IKEZONO K., ZERKOWSKI H.R. y REIDEMEISTER J.C. (1986) *Science* 231, 1584-1585.
- BRODDE O.E., BROEDE A., DAUL A., KUNDE K. y MICHEL M.C. (1992) *Basic. Res. Cardiol.* 87, 1-14.
- BUCKENMEYER P.J., GOLDFARB A.H., PARTILLA J.S., PIÑEYRO M.A. y DAX E.M. (1990) *Am. J. Physiol.* E 71-E 77.
- BUGAISKY L. y ZAK R. (1986) *The heart and cardiovascular system* (Fozzard H., Haber E., Katz A., Jennings R., Morgan H.E., Eds.) Raven Press, New York, 1491-1506.
- BUKOWIECKI L., LUPIEN J., FOLLEA N., PARADIS A., RICHARD D. y LE BLANC J. (1980) *Am. J. Physiol.* 239, E422-E429.
- BUSHFIELD M. y JOHNSON R.A. (1990) *Biochem. Soc. Trans.* 18, 150-152.
- BUTLER J., O'BRIEN M., O'MALLEY K. y KELLY J.G. (1982) *Nature* 298, 60-62.
- BUTLER J., KELLY J.G., O'MALLEY K. y PIDGEON F. (1983) *J. Physiol.* 344, 113-117.
- CADENA D.L. y GILL G.N. (1992) *FASEB J.* 6, 2332-2337.
- CAREW T.E. y COVELL J.W. (1978) *Am. J. Cardiol.* 42, 82-88.
- COHEN P. (1992) *Trends Biochem. Sci.* 17, 408-413.
- COLLINS S., CARON M.G. y LEFKOWITZ R.J. (1991) *Annu. Rev. Physiol.* 53, 497-508.
- CONKLIN B.R. y BOURNE H.R. (1993) *Cell* 73, 631-641.
- COSTILL D.L., COYLE E.F., DALSKY G., EVANS W., FINK W. y HOOPES D. (1977) *J. Appl. Physiol.* 43, 695-699.
- COUSINEAU D., FERGUSON R.J., DE CHAMPLAIN J., GAUTHIER P., COTE P. y BOURASSA M. (1977) *J. Appl. Physiol.* 43, 801-806.

- COYLE E.F., COGGAN A.R., HEMMERT M.K. e IVY J.L. (1986) *J. Appl. Physiol.* 61, 165-172.
- CRAMPES F., BEAUVILLE M., RIVIERE D. y GARRIGUES M. (1986) *J. Appl. Physiol.* 61, 25-29.
- CRAMPES F., RIVIERE D., BEAUVILLE M., MARCERON M. y GARRIGUES M. (1989) *Eur. J. Appl. Physiol.* 59, 249-255.
- CZECH S.Y., BROADDUS W.C. y MAGUIRE M.E. (1980) *Mol. Cell. Biochem.* 33, 67-92.
- CHEN C-Y., DION S.B., KIM C.M. y BENOVIC J.L. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 7825-7831.
- CHEVALIER B. y SWYNGHEDAUW B. (1990) *Hypertrophic et insuffisance cardiaques* (Swinghedauw B., Ed.) INSERM/ John Libbey Eurotext, Paris, pp. 201-206.
- DANCHIN A. (1993) *Adv. Sec. Mess. Phosphoprot. Res.* 27, 109-162.
- DAWSON C.A. y HORVATH S.M. (1970) *Med. Sci. Sport* 2, 51-78.
- DOHLMAN H.G., THORNER J., CARON M.G. y LEFKOWITZ R.J. (1991) *Annu. Rev. Biochem* 60, 653-688.
- DÖHM G.L., PENNINGTON S.N. y BARAKAT H. (1976) *Biochem. Med.* 16,138-142.
- ENDOH M., TAKANASHI M. y NOROTA I. (1992) *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 345, 578-585.
- ENGEL G., MOYER D., BERTHOLD R. y WAGNER M. (1981) *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol* 317, 277-285.
- ESCHENHAGEN T., MENDE U., NOSE M., SCHMITZ W., SCHOLZ H., WARNHOLTZ A. y WÜSTEL J.M. (1991) *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 343, 609-615.
- ESCHENHAGEN T., MENDE U., NOSE M., SCHMITZ W., SCHOLZ H., HAVERICH A., HIRT S., DÖRING V., KALMAR P., HÖPPNER W. y SEITZ H.J. (1992a) *Circ. Res.* 70, 688-696.
- ESCHENHAGEN T., MENDE U., NOSE M., SCHMITZ W., SCHOLZ H., SCHULTE J., SEMPELL R., WARNHOLTZ A. y WÜSTEL J.M. (1992b) *Basic Res. Cardiol.* 87, 51-64.
- EVANS D.B. (1986) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 8, S22-S29.
- FEDERMAN A.D., CONKLIN B.R., SCHRADER K.A., REED R.R. y BOURNE H.R. (1992) *Nature* 356, 159-161.
- FELDMAN A.M. (1991) *Circulation* 84, 1852-1861.
- FELDMAN A.M., CATES A.E., VEAZEY W.B., HERSHBERGER R.E., BRISTOW M.R., BAUGHMAN K.L., BAUMGARTNER W.A. y VAN DOP C. (1988) *J. Clin. Invest.* 82, 189-197.
- FELDMAN A.M., JACKSON D.G., BRISTOW M.R., CATES A.E. y VAN DOP C. (1991) *J. Mol. Cell. Cardiol.* 23, 439-452.
- FELIG P. y WAHREN J. (1971) *J. Clin. Invest.* 50, 2703-2714.
- FISCUER E.H., CHARBONNEAU H. y TONKS N.K. (1991) *Science* 253, 401-406.
- FLEMING J.W., WISLER P.L. y WATANABE A.M. (1992) *Circulation* 85, 420-433.

- FOSTER K.A., Mc DERMOTT P.J. y ROBINSHAW J.D. (1990) *Am. J. Physiol* 259, H432-H441.
- FRICK M.H., ELOVANO R.O. y SOMER T. (1967) *Cardiologia* 51, 46-54.
- FULLER E.O. y NUTTER D.O. (1981) *J. Appl. Physiol.* 51, 941-947.
- GARBERS D.L. (1992) *Cell* 71, 1-4.
- GARCIA J.L. y HARO A. (1981) *Comp. Biochem. Physiol.* 68C, 109-113.
- GARDEMANN A., PÜSCHEL G.P. y JUNGERMANN K. (1992) *Eur. J. Biochem.* 207, 399-411.
- GLEESON T.T., MULLIN W.J. y BALDWIN K.M. (1983) *J. Appl. Physiol.* 54, 789-793.
- GLOMSET J.A., GELB M.H. y FARNWORTH C.C. (1990) *Trends Biochem. Sci.* 15, 139-142.
- GORIN E., TAI L.R., HONEYMAN T.W. y GOODMAN H.M. (1990) *Endocrinology* 126, 2973-2982.
- GRANNEMAN J.G., LAHNERS K.N. y CHAUDHRY A. (1992) *Mol. Pharmacol.* 40, 895-899.
- GREEN A. y JOHNSON J.L. (1991) *Diabetes* 40, 88-94.
- GREEN A., JOHNSON J.L. y MILLIGAN G. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 5206-5210.
- GUILLÉN A., JALLON J.M., FEHRENTZ J.A., PANTALONI C., BOCKAERT J. y HOMBURGER V. (1990) *EMBO J.* 9, 1449-1455.
- HADCOCK J.R., PORT J.D., GELMAN M.S. y MALBON C.C. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 26017-26022.
- HAGERMAN F.C. (1992) *Med. Sci. Sports Exerc.* 24, S309-S314.
- HAMMNOD H.K., ROTH D.A., INSEL P.A., FORD C.E., WHITE F.C., MAISEL A.S., ZIEGLER M.G. y BLOOR C.M. (1992) *Circulation* 85, 269-280.
- HAMMOND H.K., WHITE F.C., BRUNTON L.L. y LONGHURST J.C. (1987) *Circ. Res.* 60, 720-726.
- HAMMOND H.K., RANSNÄS L.A. e INSEL P.A. (1988) *J. Clin. Invest.* 82, 2168-2171.
- HANSEN M. y RUPP H. (1991) *Methods Achieve. Exp. Pathol.* 15, 58-83.
- HARA-YOKOYAMA M. y FURUYAMA S. (1988) *FEBS Lett.* 234, 27-30.
- HARDEN T. K. (1989) *Muscarinic receptors* (Brown J. H., Ed.) Humana press, Clifton, New Jersey, 221-257.
- HARDIE D.G. (1991) *Biochemical Messengers: Hormones, Neurotransmitters and Growth Factors.* Chapman and Hall, Londres.
- HÄRING H.U. (1991) *Diabetologia* 34, 848-861.
- HARTMAN H., BECKH K. y JUNGERMANN K. (1982) *Eur. J. Biochem.* 123, 521-527.
- HEPLER J.R., y GILMAN A.G. (1992) *Trends Biochem. Sci.* 17, 383-387.
- HERS H.G. y HUE L. (1983) *Annu. Rev. Biochem.* 62, 617-653.
- HERSHBERGER R.E., FELDMAN A.M. y BRISTOW M.R. (1991) *Circulation* 83, 1343-1351.
- HOLMER S.R. y HOMCY C.J. (1991) *Circulation* 84, 1891-1902.
- HOLLENGA C.H. y ZAAGSMA J. (1989) *Br. J. Pharmacol.* (1989) 98, 1420-1424.

- HOMCY C.J., VATNER S.F. y VATNER D.E. (1991) *Annu. Rev. Physiol.* 53, 137-159.
- HONNOR R.C., DHILLON G.S. y LONDOS C. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 15130-15138.
- HOUSLAY M.D. (1991) *Eur. J. Biochem.* 195, 9-27.
- HUBBARD J.W., CONWAY P.G., NORDSTROM L.C., HARTMAN H.B., LEBEDINSKY Y., O'MALLEY G.J. y KOSLEY R.W. (1991) *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 256, 621-627.
- HULTMAN E. y HARRIS R.C. (1988) *Medicine and Sports Science. Principles of Exercise Biochemistry.* (Poortmans J.R. ed.) Karger, Basilea. Vol 27, pp. 78-119.
- HUSTON T.P., PUFFER J.C. y RODNEY W.M. (1985) *New Engl. J. Med.* 313, 24-32.
- IZAWA T., KOMABAYASHI T., TSUBOI M., KOSHIMIZU E. y SUDA K. (1986) *Jpn. J. Physiol.* 36, 1039-1045.
- IZAWA T., KOMABAYASHI T., SHINODA S., SUDA K., TSUBOI M. y KOSHIMIZU E. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151, 1262-1268.
- IZAWA T., KOMABAYASHI T., MOCHIZUKI T., SUDA K. y TSUBOI M. (1991) *J. Appl. Physiol.* 71, 23-29.
- JANS D.A. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1113, 271-276.
- JARD S., CANTAU B. y JAKOBS K.H. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 2603-2606.
- JELINEK L.J., LOK S., ROSENBERG G.B., SMITH R.A., GRANT F.J., BIGGS S., BENSCH P.A., KUIJPER J.L., SHEPPARD P.O., SPRECHER C.A., O'HARA P., FOSTER D., WALKER K.M., CHEN L.H.J., Mc KERNAN P.A. y KINOSVOGEL W. (1993) *Science* 259, 1614-1616.
- JI L.L., STRATMAN F.W. y LARDY H.A. (1987) *Biochem. Pharmacol.* 36, 3411-3417.
- JOHNSON R.H., WALTON J.L., KREBBS H.A. y WILLIAMSON D.H. (1969) *The Lancet* 1, 452-455.
- JONES L.R. (1988) *Methods in Enzymol.* 157, 85-91.
- JOUNEAUX C., AUDIGER Y., GOLDSMITH P., PECKER F. y LOTERSZTAJN S. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 2368-2372.
- KAINULAINEN H., TAKALA T.E., HASSINEN I.E. y VIHKO V. (1985) *Pflüegers Arch.* 403,296-300.
- KATHER H., BIEGER W., MICHEL G., AKTORIES K. y JAKOBS K.H. (1985) *J. Clin. Invest.* 76, 1559-1565.
- KELLY K.L., KIECHLE F. y JAREET (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1089-1092.
- KENNO K.A., DURSTINE J.L. y SHEPHERD R.E. (1986) *J. Appl. Physiol.* 56, 845-848.
- KESSLER P.D., CATES A.E., VAN DOP C. y FELDMAN A.M. (1989) *J. Clin. Invest.* 84, 244-252.
- KLEUSS C., HESCHELER J., EWEL C., ROSENTHAL W., SCHULZ G. y WITTIG B. (1991) *Nature* 353, 43-48.
- KLEUSS C., SCHERÜBL H., HESCHELER J., SCHULZ G. y WITTIG B. (1993) *Science* 259, 832-834.

- KNUFMAN N.M.J., VAN DER LAARSE A., VLIEGEN H.W. y BRINKMAN C.J.J. (1987) *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 57, 15-32.
- KOBILKA B. (1992) *Annu. Rev. Neurosci.* 15, 87-114.
- KOCH W.J., INGLESE J., STONE W.C. y LEFKOWITZ R.J. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 8256-8260.
- KRUPINSKI J., LEHMAN T., FRANKENFIELD C.D., ZWAAGSTRA J.C. y WATSON P.A. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 24858-24862.
- LACASA D., ACLI B. y GIUDICELLI Y. (1984) *Biochem. Int.* 9, 187-195.
- LAFONTAN M., BERLAN M., GALITZKY J. y MONTASTRUC J.L. (1992) *Am. J. Clin. Nutr.* 55, 219S-227S.
- LANGIN D., PORTILLO M.P., SAULNIER-BLACHE J.S. y LAFONTAN M. (1991) *Eur. J. Pharmacol.* 199, 291-301.
- LAURENZA A., Mc HUGH E. y SEAMON K.B. (1989) *Trends Pharmacol. Sci.* 10, 442-447.
- LAVOIE J.M., BONGBELE J., CARDIN S., BELISLE M., TERRETTAZ J. y VAN DER WERVE G. (1993) *J. Appl. Physiol.* 74, 293-296.
- LEHMAN M., DICKHUTH H.M., SCHMID P., PORZIG, H. y KEUL J. (1984) *Eur. J. Appl. Physiol.* 52, 362-369.
- LEFKOWITZ R.J. (1991) *Nature* 351, 353-354.
- LEFKOWITZ R.J., COTECCHIA S., SAMANA P. y COSTA T. (1993) *Trends Pharmacol. Sci.* 14, 303-307.
- LERNER R.W., LOPASCHUK G.D. y OLLEY P.M. (1992) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 70, 77-84.
- LEVITZKI A. (1987) *FEBS Lett.* 211, 113-118.
- LIANG B.T. (1992) *Trends Cardiovasc. Med.* 2, 100-108.
- LIGGETT S.B. y RAYMOND J.R. (1993) *Bailliere's Clin. Endocrinol. Metab.* 7, 279-306.
- LIMBIRD L.E., HICKEY A.R. y LEFKOWITZ R.J. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 2677-2683.
- LINDEMANN J.P., JONES L.R., HATHAWAY D.R., HENRY D.G. y WATANABE A.M. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 464-471.
- LINDER M.E., MIDDLETON P., HEPLER J.R., TAUSSIG R., GILMAN G. y MUMBY S.M. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 3675-3679.
- LINDNER E., DOHADWALLA A.N. y BHATTACHARYA B.K. (1978) *Arzneimittel-Forsch.* 28, 284-289.
- LÖNNQVIST F., WAHRENBER H., HELLSTRÖM L., REYNISDOTTIR S. y ARNER P. (1992) *J. Clin. Invest.* 90, 2175-2186.
- LOPASCHUK G.D., MICHALAK M., WANDLER E.L., LERNER R.W., PISCIONE T.D., COCEANI F. y OLLEY P.M. (1989) *Circ. Res.* 65, 538-545.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. y RANDALL R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

- MAKI T. (1989) *Acta Physiol. Scand.* 136, 569-574.
- MAKI T., KONTULA K., MYLLYNEN P. y HARKONEN M. (1987) *Scan. J. Clin. Lab. Invest.* 47, 261-267.
- MAKI T., KONTULA K. y HÄRKÖNEN M. (1990) *Scan. J. Clin. Lab. Invest.* 50, 25-43.
- MAKINO H., SUZUKI T., KAJINUMA H., YAMAZAKI M., ITO H. y YOSHIDA S. (1992) *Adv. Sec. Mess Phosphoprot. Res.* 25, 185-199.
- MALBON C.C., RAPIEJKO P.J. y WATKINS D.C. (1988) *Trends Pharmacol. Sci.* 9, 33-36.
- MARBACH I., BAR-SINAI A., MINICH M. y LEVITZKI A. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 9992-10004.
- MASSAGUÉ J. (1992) *Cell* 69, 1067-1070.
- MAZANCOURT P., DARIMONT C., GIOT J. y GIUDICELLI Y. (1991) *Biochem. Pharmacol.* 42(9), 1791-1797.
- MAZZEO R.S. (1991) *Med. Sci. Sports Exerc.* 23, 839-845.
- Mc KELVIE R.S., JONES N.L. y HEIGENHAUSER G.J.F. (1991) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 69, 254-261.
- Mc FARLANE ANDERSON N., BAILLY J. y BEGIN-HEICK N. (1992) *Biochem. J.* 282, 15-23.
- Mc KENZIE F.R. y MILLIGAN G. (1990) *Biochem. J.* 267, 391-398.
- Mc HENRY P.L., ELLESTAD M.H., FLETCHER G.F., FROELICHER V., HARTLEY H., MITCHELL J.M. y FROELICHER E.S.S. (1989) *Circulation* 81, 396-398.
- MEREDITH C.N., ZACKIN M.J., FRONTERA W.R. y EVANS W.J. (1989) *J. Appl. Physiol.* 66, 2850-2856.
- MICHEL A., CROS G.H., Mc NEILL J.H. y SERRANO J.J. (1985) *Life Sci.* 37, 2067-2075.
- MILLIGAN G. (1988) *Biochem. J.* 255, 1-13.
- MILLIGAN G. (1993) *Trends Pharmacol. Sci.* 14, 239-244.
- MILLIGAN G. y SAGGERSON E.D. (1990) *Biochem J.* 270, 765-769.
- MILLIGAN G. y GREEN A. (1991) *Trends Pharmacol. Sci.* 12, 207-209.
- MOORE R.L., RIEDY M. y GOLLNICK (1982) *J. Appl. Physiol.* 52, 1133-1137.
- MORI S., YANAGIDA M., KUBOTSU K. y YAMAMOTO I. (1990) *Adv. Sec. Mess. Phosphoprot. Res.* 13, 1-12.
- MULLER W. (1882) *Die Massenverhältnisse Des Manchel.* Hamburg and Leipsig, Herzens.
- MURPHY G.J., GAWLER D.J., MILLIGAN G., WAKELAM M.J.O., PYNE N.J. y HOUSLAY M.D. (1989) *Biochem. J.* 259, 191-197.
- NEER E.J. y CLAPHAM D.E. (1992) *Trends Cardiovasc. Med.* 2,6-11.
- NEER E.J., LOK J.M. y WOLF L.G. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 14222-14229.
- NEUBERT T.A., JOHNSON R.S., HURLEY J.B. y WALSH K.A. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 18274-18277.

- NIETO J.L., DÍAZ-LAVIADA I., GUILLÉN A., GARCÍA-BARRENO P. y HARO A. (1993) *Cell. Signalling* 5, 169-179.
- NISHIZUKA Y. (ed). (1992) *Interactions Among Cell Signalling Systems* (Ciba Fdn. Symp. 164) Wiley, Chichester, UK.
- ORDWAY G.A., CHARLES J.B., RANDALL D.C., BILLMAN G.E. y WEKSTEIN D.R. (1982) *J. Appl. Physiol.* 52, 1586-1590.
- PALCZEWSKI K. y BENOVIC J.L. (1991) *Trends Biochem. Sci.* 16, 387-391.
- PALMER T.M. y HOUSLAY M.D. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1097, 193-204.
- PANAYOTOV G. y WATERFIELD M. (1993) *Bio Essays* 15, 171-177.
- PARENTI M., VIGANO M.A., NEWMAN C.M.H., MILLIGAN G. y MAGEE A.F. (1993) *Biochem. J.* 291, 349-353.
- PATE R.R. y BRANCH J.D. (1992) *Med. Sci. Sports Exerc.* 24, S340-S343.
- PATEL M.B., LOUD A.V., KING B.D., ANVERSA P., SACK D. y HINTZE T.H. (1989) *J. Mol. Cell. Cardiol.* 21, 49-61.
- PERONNET F., FERGUSON R.J., PERRAULT H., RICCI G. y LAJOIE D. (1981) *Phys. Sports Med.* 9, 102-112.
- PIERCE G.N., KUTRYK M.J.B. y DHALLA N.S. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 3412-3416.
- PLOURDE G., ROUSSEAU-MIGNERON S. y NADEAU A. (1991) *J. Appl. Physiol.* 70, 1633-1638.
- PLOURDE G., ROUSSEAU-MIGNERON S. y NADEAU A. (1992) *Metabolism* 41, 1331-1335.
- PLOURDE G., ROUSSEAU-MIGNERON S. y NADEAU A. (1993) *J. Appl. Physiol.* 74, 1641-1646.
- POBINER B.F., NORTHUP J.K., BAVER P.H., FRASER E.D. y GARRISON J.C. (1992) *Mol. Pharmacol.* 40, 156-167.
- PREMONT R.T., CHEN J., MA H-W., PONNAPALLI M. e IYENGAR R. (1992a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 9809-9813.
- PREMONT R.T., JACOBOWITZ O. e IYENGAR R. (1992b) *Endocrinology* 131, 2774-2784.
- PYNE N.J., MURPHY G.J., MILLIGAN G. y HOUSLAY M.D. (1989) *FEBS Lett.* 243, 77-82.
- RALL T.W. y SUTHERLAND E.W. (1958) *J. Biol. Chem.* 232, 1065-1076.
- RAMÍREZ L.R. y SHEPHERD R.E. (1989) *Med. Sci. Sports Exercise* 21, 557.
- RANG H.P. y DALE M.M. (1992) *Farmacologia*. Churchill-Livingstone. Madrid.
- REITHMANN C., GIERSCHIK P., SIDIROPOULOS D., WERDAN K. y JAKOBS K.H. (1989) *Eur. J. Pharmacol.* 172, 211-221.
- REITHMANN C., GIERSCHIK P., WERDAN K. y JAKOBS K.H. (1991) *Mol. Cell. Endocrinol.* 82, C215-C221.
- REMAURY A., LARROUY D., DAVIAUD D., ROUOT B. y PARIS H. (1993) *Biochem. J.* 292, 283-288.

- RIBEIRO-NETO F., MATTERA R., GRENET D., SEKURA K.D., BIRNBAUMER L. y FIELD J.B. (1987) *Mol. Endocrinol.* 1, 472-481.
- RICHELSEN B. (1987) *Biochem. Pharmacol.* 36, 4017-4020.
- RICHELSEN B. (1988) *Mol. Cell. Endocrinol.* 58, 85-91.
- RICHELSEN B. (1991) *Danish Med. Bulletin* 38, 228-244.
- RICHELSEN B. y PEDERSEN O. (1985) *Eur. J. Pharmacol.* 119, 101-112.
- RIVIERE D., CRAMPES F., BEAUVILLE M. y GARRIGUES M. (1989) *J. Appl. Physiol.* 66, 330-335.
- RODBELL M. (1964) *J. Biol. Chem.* 239, 375-380.
- RODBELL M., KRANS H.M.J., POHL S. y BIRNBAUMER L. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 1872-1876.
- ROSENTHAL H.E. (1967) *Anal. Biochem.* 20, 525-532
- RUSSELL J.C., EPLING W.F., PIERCE D., AMY R.M. y BOER D.P. (1987) *J. Appl. Physiol.* 63, 2549-2553.
- SALOMON Y., LONDOS C. y RODBELL M. (1974) *Anal. Biochem.* 58, 541-548.
- SAMANA P., COTECCHIA S., COSTA T. y LEFKOWITZ R.J. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 4625-4636.
- SAVARESE J.J. y BERKOWITZ B.A. (1979) *Life Sci.* 25, 2075-2078.
- SCARPACE P.J., COWENTHAL D.T. y TUMER N. (1992) *Exp. Gerontol.* 27, 169-177.
- SCATCHARD G. (1949) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51, 660-672.
- SCHAIBLE T.F. y SCHEUER J. (1981) *J. Appl. Physiol* 50, 1140-1145.
- SCHAIBLE T.F., PENPARGKUL S. y SCHEUER J. (1981) *J. Appl. Physiol* 50, 112-117.
- SCHAUB M.C. y KUNZ B. (1986) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 8, S117-S123.
- SCHEUER J. y TIPTON C.M. (1977) *Annu. Rev. Physiol.* 39, 221-251.
- SCHEUER J., PENPARGKUL S. y BHAN A.K. (1974) *Am. J. Cardiol.* 33, 744-751.
- SCHOLZ P.M., UPSHER M.E., ELIADES D., KEDEM J. y WEISS H.R. (1990) *Cardiovasc. Res.* 24, 65-71.
- SEAMON K.B. y DALY J.W. (1981) *J. Cyclic. Nucleotide Res.* 7,201-224.
- SHEPHERD G.M. (1991) *Cell* 67, 845-851.
- SHEPHERD R.E. y GOLLNICK P.D. (1976) *Pflügers Arch.* 362, 219-222.
- SHEPHERD R.E. y BAH M.D. (1988) *Med. Sci. Sports Exercise* 20, 531-538.
- SHEPERD R.E., BAH M.D. y NELSON K.M. (1986) *J. Appl. Physiol.* 61, 1301-1308.
- SHYU B.C., ANDERSON S.A. y THOREN P. (1984) *Acta Physiol. Scand.* 121, 103-109.
- SIGVARDSON K., SUANFELDT E. y KILBOM A. (1976) *Acta Physiol. Scand.* 101, 481-488.
- SIMONDS W.F., GOLDSMITH P.K., CODINA J., UNSON C.G. y SPIEGEL A.M. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 7809-7813.
- SPIEGEL A.M. (1992) *Med. Res. Rev.* 12, 55-71.

- SPIEGEL A.M., BACKLUND P.S., BUTRYNSKI J.E., JONES T.L.Z. y SIMONDS W.F. (1991) *Trends Biochem. Sci.* 16, 338-341.
- SPIEGEL A.M., SHENKER A. y WEINSTEIN L.S. (1992) *Endocrine Rev.* 13, 536-565.
- SRIVASTAVA A.K. y ANAND-SRIVASTAVA M.B. (1985) *Biochem. Pharmacol.* 34, 2013-2017.
- STADEL J.M. y LEFKOWITZ R.J. (1991) *The  $\beta$ -adrenergic Receptors* (Perkins J. P., ed.). Humana Press, Clifton, New Jersey. pp. 1-40.
- STEEL J.D., BEILHARZ R.G., STEWART G.A. y GODDARD M. (1977) *Austr. Vet. J.* 53, 306-309.
- STRALFORS P. y BELFRAGE P. (1984) *Enzyme Regulation by Reversible Phosphorylation-further Advances* (Cohn P. ed.) Elsevier Science Publishers. Amsterdam. pp. 27-62.
- STRASSHEIM D., PALMER T. y HOUSLAY M.D. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1096, 121-126.
- STROSBERG A.D. (1991) *Eur. J. Biochem.* 196, 1-10.
- STRYER L. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 10711-10714.
- SUKUMAN M. e HIGASHIJIMA T. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 21421-21424.
- SUMMERS R.J. y Mc MARTIN L.R. (1993) *J. Neurochem* 60, 10-23.
- SUZUKI S., OSHIMA S. e HIGUCHI M. (1979) *Jpn. Heart J.* 20, 365-367.
- SVEDENHAG J. (1985) *Acta Physiol. Scand.* 125 (543), 7-73.
- SWYNGHEDAW B. (1992) *Basic Res. Cardiol.* 87, 1-10.
- SYLVESTRE-GERVAIS L., NADEAU A., NGUYEN M.H., TANCREDE G. y ROUSSEAU-MIGNERON S. (1982) *Cardiovasc. Res.* 16, 530-534.
- TANG W.-J. y GILMAN A.G. (1991) *Science* 254, 1500-1503.
- TANG W.-J. y GILMAN A.G. (1992) *Cell* 70, 869-872.
- TANUMA S. y ENDO H. (1990) *FEBS Lett.* 234, 27-30.
- TANUMA S., KAWASHKMA K. y ENDO H. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 5485-5489.
- TAUSSIG R., QUARMBY L.M. y GILMAN A.G. (1993a) *J. Biol. Chem.* 268, 9-12.
- TAUSSIG R., IÑIGUEZ-LLUHI J.A. y GILMAN A.G. (1993b) *Science* 261, 218-221.
- TAYLOR C.W. (1990) *Biochem. J.* 272, 1-13.
- TAYLOR S.S., BUECHLER J.A. y YONEMOTO W. (1990) *Annu. Rev. Biochem.* 59, 971-1005.
- TIBBITS G.F., NAGAMOTO T., SASAKI M., BARNARD R.J. (1981) *Science* 213, 1271-1273.
- TIPTON C.M. (1965) *Am. J. Physiol.* 209, 1089-1094.
- VATNER D.E., HOMCY C.K., SIT S.P., MANDERS W.T. y VATNER S.F. (1984) *J. Clin. Invest.* 73, 1473-1482.
- VIRMANI R., ROBINOWITZ M. y Mc ALLISTER (1985) *Pathol. Annu. Part 2*, 20, 430-462.
- VIRMANI R. y ROBINOWITZ M. (1987) *Human Pathol.* 18, 493-501.
- VOLLESTAD N.K., TABATA I. y MEDBO J.I. (1992) *Acta Physiol. Scand.* 144, 135-141.
- WAHREN J., HAGENFELDT L. y FELIG P. (1975) *J. Clin. Invest.* 55, 1303-1314.

- WAHREN J., SATO Y., OSTMAN J., HAGENFELDT L. y FELIG P. (1984) *J. Clin. Invest.* 73, 1367-1376.
- WAHRENBERG H., BOLINDER J. y ARNER P. (1991) *Eur. J. Clin. Invest.* 21, 534-541.
- WAHRENBERG H., LÖNNQVIST F., HELLMER J. y ARNER P. (1992) *Eur. J. Clin. Invest.* 22, 412-419.
- WASSERMAN D.H., y CHERRINGTON A.D. (1991) *Am. J. Physiol.* 260, E811-E824.
- WATANABE Y., IMAIZUMI T., MISAKI N., IWAKURA K. y YOSHIDA H. (1988) *FEBS Lett.* 236, 372-374.
- WERLE E.O., STROBEL G. y WEICKER H. (1989). *Life Sci.* 46, 9-17.
- WILLIAMS R.S. (1980) *Cardiovasc. Res.* 14, 177-182.
- WILLIAMS R.S. y BISHOP T. (1982) *Am. J. Physiol.* 243, E345-E351.
- WILLIAMS R.S., EDEN R.S., MOLL M., LEST R.M. y WALLACE A.G. (1981) *J. Appl. Physiol.* 51, 1232-1237.
- WILLIAMS R.S., CARON M.G. y DANIEL K. (1984a) *Am. J. Physiol.* 246, E160-E167.
- WILLIAMS R.S., SCHAIBLE T.F., BISHOP T. y MOREY M. (1984b) *J. Mol. Cell. Cardiol.* 16, 395-403.
- WINDER W.W. (1988) *Med. Sci. Sports Exerc.* 20, 551-559.
- WINDER W.W., HICKSON R.C., HAGBERG J.M., EHSANI A.A. y Mc LANE J.A. (1979) *J. Appl. Physiol.* 46, 766-771.
- WINDER W.W., BEATTIE M.A., PIQUETTE C. y HOLMAN R.T. (1983a) *Am. J. Physiol.* 244, R845-R849.
- WINDER W.W., BEATTIE M.A. y FULLER E.O. (1983b) *Am. J. Physiol.* 245, R353-R356.
- WONG Y.H., CONKLIN B.R. y BOURNE H.R. (1992) *Science* 255, 339-342.
- WONG P.C., CHIU A.T., DUNCIA J.V., HERBLIN W.F., SMITH R.D. y TIMMERMANS P.B.M.W.M. (1992) *Trends Endocrinol. Metab.* 3, 211-217.
- WYATT H.L., CHUCK L., RABINOWITZ B., TYBERG J.B. y PARMLEY W.W. (1978) *Am. J. Physiol.* 3, H608-H613.
- YAKOVLEV N.N. (1974) *Ukr. Biokhim Z.* 46, 18-24, citado en *Biol. Abstr.* 58 Nº 54214 (1974).
- YAMANE H.K. y FUNG K.-K. (1993) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32, 201-241.
- YATANI A. y BROWN A.M. (1989) *Science* 245, 71-74.
- YU S.S., LEFKOWITZ R.J. y HAUSDORFF W.P. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 337-341.
- ZAAGSMA J. y NAHORSKI S.R. (1990) *Trends Pharmacol. Sci.* 11, 3-7.