
Receptores β e isquemia miocárdica

D. Martínez, I. Iglesias, C. Díaz, I. García, E. Alegría, J. Barba, J. Herreros, O. Gil

INTRODUCCIÓN

Los diversos efectos de las catecolaminas están mediados por su interacción con los receptores adrenérgicos, de entre los cuales dos grandes subtipos han sido caracterizados, el α y el β , en base al efecto agonista de determinados compuestos sobre ellos. El receptor β adrenérgico está sometido a una estrecha regulación¹. La mejor caracterizada ha sido la desensibilización homóloga. Cuando el receptor β es sometido a estímulos repetidos por un agonista la respuesta del mismo va decreciendo, probablemente en un intento de compensación la sobreestimulación. La desensibilización homóloga es un proceso complejo en el que se produce la fosforilación del receptor β por una quinasa específica del receptor β adrenérgico (β -ARK) que es de localización intraplasmática, y que se trasloca a la membrana citoplasmática tras un incremento de los niveles de cAMP inducido por la unión del agonista. Posteriormente, el receptor se disocia de la proteína G (desacoplamiento) de manera que es incapaz de responder a más estímulos. El receptor fosforilado es secuestrado de la superfi-

cie celular a un compartimiento intracelular (internalización), donde es defosforilado por fofatasas. Posteriormente, el receptor puede ser reciclado a la superficie para de nuevo acoplarse a la proteína G. Si la exposición al agonista es prolongada el receptor se degrada cuando está intermalizado por proteasas, fenómeno conocido por «down-regulation» o regulación a la baja. La recuperación de la «down-regulation» requiere síntesis de nuevos receptores, que se realiza en el plazo de varias horas.

La fosforilación del receptor es un proceso clave en este mecanismo. Además de la quinasa específica para el receptor β que ya ha sido nombrada con anterioridad (β -ARK), el receptor puede ser fosforilado por proteína-quinasas dependientes de cAMP y por la proteína-quinasa C. Estas últimas parecen tener más importancia en las fases finales de la regulación, al contrario de la β -ARK, que parece tener más importancia en las iniciales. Además, su papel parece más importante es la desensibilización heteróloga o no mediada por catecolaminas y que depende de otras vías diferentes a las citadas. Se han des-

ANALES Sis San Navarra 1997, 20 (Supl. 2): 63-68.

Departamento de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. Clínica Universitaria de Navarra. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra.

crita alteraciones en el número y función de los receptores β en varios procesos. De manera especial, se ha demostrado que la isquemia se asocia a un rápido incremento en el número de los receptores β . Este hecho se sugirió que podía ser el responsable del incremento de sensibilidad a las catecolaminas propio de estos pacientes. En este caso, al contrario de lo que sucede en la insuficiencia cardíaca congestiva, no tiene lugar una regulación a la baja o «down regulation», sino una rápida regulación al alta, que se podría denominar «up regulation». Posteriormente se ha demostrado que este incremento de receptores en la membrana celular de células miocárdicas se producía por un redistribución del receptor β que se encontraba en el «pool-lábil» intracelular. Parece ser que el incremento en el número de receptores β que puede observarse ya a la hora de la isquemia, se produce, pero con desacoplamiento del receptor de la proteína G. Es decir, es un receptor desensibilizado. Sin embargo, también 60 minutos tras la reperfusión, el incremento de los receptores parece permanecer, recuperándose además la capacidad de la adenilato ciclasa de generar cAMP. Estudios posteriores han demostrado, sin embargo, que en fases precoces de la isquemia, es posible detectar, no sólo un incremento en el número de receptores, sino también de la actividad de la adenilato ciclasa. Si la isquemia es duradera, aparece la disminución en el número de receptores, lo que va en favor del desacoplamiento como mecanismo explicativo.

Durante la circulación extracorpórea también se ha documentado una importante activación del sistema adrenérgico, que puede producirse en una desensibilización de los receptores, reversible en 30 minutos tras el cese del mismo. El propósito del presente trabajo fue estudiar las modificaciones que ocurren en el complejo del receptor β en la cirugía cardíaca realizada en circulación extracorpórea.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el estudio se incluyeron pacientes sometidos a circulación extracorpórea con motivo de cirugía cardíaca en nuestro cen-

tro. Los pacientes no fueron seleccionados según el tipo de cirugía que fueran a sufrir, siendo el único requisito que está fuera realizada con by-pass cardiopulmonar. Para el estudio de los receptores β -linfocitarios, se extraían 20 ml de sangre total del oxigenador de la bomba de circulación extracorpórea (circuito arterial). Adicionalmente se extraían 10 ml de sangre total para la determinación de norepinefrina, epinefrina y dopamina y otros 5 ml para la determinación de las proteínas totales en el suero, con la finalidad de descubrir cualquier expansión de volumen de líquido extracelular producida durante el acto quirúrgico.

Las biopsias del miocardio se tomaban mediante una aguja tru-cut de la zona epicárdica de la cara anterior del ventrículo derecho. Para su disgregación se utilizó una solución con colagenasa.

Todas las extracciones se realizaron en dos momentos quirúrgicos bien definidos, en el del clampaje de la aorta y en el momento del desclampaje de la misma. Los tiempos quirúrgicos analizados fueron el tiempo desde la inducción anestésica hasta el comienzo del by-pass cardiopulmonar, en minutos, el tiempo desde la inducción anestésica hasta el clampaje de la aorta en minutos, el tiempo desde el comienzo del by-pass hasta el clampaje de la aorta y el tiempo de circulación extracorpórea.

El aislamiento de las células mononucleares (MNL) se realizó según el método de Böyum². Brevemente, se prepararon tubos de ensayo de polipropileno de 10 ml con 2 ml de Ficoll-Hypaque en cada uno. Con cuidado de evitar la mezcla se echó sobre el Ficoll aproximadamente 1 ml de la muestra de sangre diluida. Estos tubos se centrifugaron a 4 °C durante 20 minutos a 1800 rpm. El halo de células mononucleares que se obtuvo se extrajo manualmente. Se añadió solución salina (NaCl) 0,9% abundante, agitándose ligeramente con los dedos y se volvió a centrifugar en similares condiciones durante 10 minutos. Después se eliminó el sobrenadante por decantación, y se resuspendió el precipitado, sometiéndolo a un nuevo lavado. El precipitado se resuspendió

sobre 1 ml de DMEM (pH = 7,4) que contiene 20 mmol/L de HEPES buffer y 1 mg/ml de BSA (seroalbúmina bovina). 10 μ L de esa solución se mezclaron en una placa de ELISA con 90 μ L de azul tripán para ser contada en cámara de Neubauer, ajustando al número de células con DMEM hasta 2×10^6 por ml.

Como ligando radiactivo se utilizará el 125 I-pindolol con una actividad específica de 2200 Ci/mmol en seis concentraciones diferentes (entre 10 y 300 pmol/L). La cantidad de radioligando a utilizar se determinó diariamente teniendo en cuenta el decaimiento natural de 125 I. 50 μ L de esta solución se contaron por duplicado, teniendo en cuenta que 1 fmol del compuesto produce 3630 cuentas por minuto (cpm).

Para el cálculo de la unión inespecífica se utilizó propranolol o CGP 12177. Con el primer β -bloqueante a una concentración final de 1 μ mol/L se calculó la unión inespecífica total, y por tanto la concentración máxima de receptores ($B_{m\acute{a}x}$) y su constante de disociación en equilibrio (Kd). Con el CGP 12177 a una concentración final de 1 μ mol/L se calculó el número de receptores que se encuentran en la superficie ($B_{m\acute{a}x}_e$) y su constante de disociación en equilibrio (Mde). Tanto el propranolol como el CGP 12177 se conservaron en ácido ascórbico 0,05% para prevenir su oxidación.

La incubación se llevó a cabo durante 15-18 horas a 4 °C y después la separación del radioligando unido del no unido se realizó por filtrado con alto vacío utilizando un Skatron Cell Harvester, a través de filtros de fibra de vidrio Whatman CF/C previamente humedecidos con NaCl 0,9%. El líquido de filtrado fue NaCl 0,9%. El filtro se recogía con pinzas y se colocaba en tubos de polipropileno para proceder a su conteo en un contador gamma con una eficacia del 69%. La unión específica se calculó sustrayendo de la unión total, la unión específica o propia del ligando por el receptor. Se obtuvo así una hipérbola rectangular, situando en el eje de ordenadas las cuentas por minuto (cpm) de la unión específica y en las abscisas la concentración de ligando libre, que se analizó mediante un

programa para el ajuste de regresión no lineal (GraphPad)³. Los mismos cálculos se realizaron según la transformación matemática de Scatchard⁴. Todos los ensayos se realizaron por duplicado y se obtuvo la media aritmética de cada uno de los pares de tubos.

RESULTADOS

Durante el período comprendido entre mayo de 1991 y mayo de 1993 se estudiaron a 35 pacientes que habían sido sometidos a cirugía con circulación extracorpórea en nuestro centro. De ellos, 15 fueron rechazados del estudio final por problemas técnicos en el procesamiento de las muestras o porque los datos obtenidos se ajustaban con un coeficiente de correlación muy bajo o una hipérbola rectangular, utilizando el programa Graph Pad para este análisis.

De los 20 pacientes restantes, en 6 se consiguieron muestras de la cara anterior de ventrículo derecho mediante biopsia en el acto quirúrgico. El tipo de cirugía utilizado en estos pacientes fue en 13 cirugía de pontaje aortocoronario, en 6 sustitución valvular, asociada o no a pontaje aortocoronario, y en 1 aneurismectomía con cardiomioplastia asociada. La edad media fue de $56 \pm 18,3$ años. 15 tenían antecedentes de tabaquismo. De los 20 pacientes, 17 eran varones y 3 mujeres. 4 eran hipertensos. La clase funcional de la NYHA fue grado 1 en 15 pacientes, en 3 grado funcional 2 y 2 en grado 3. No se excluyó ningún paciente con tratamiento β bloqueante previo salvo si su administración había sido realizada 48 horas antes de la cirugía.

Los tiempos medios quirúrgicos fueron los siguientes: tiempo de la inducción anestésica hasta comienzo de la circulación extracorpórea 130 ± 25 minutos. El tiempo desde la inducción hasta el clampaje de la aorta fue $141 \pm 15,1$ minutos. El tiempo de circulación extracorpórea medio fue de $82,7 \pm 17,6$ minutos. En todos se utilizó cardioplejia intermitente fría hemática.

Los resultados obtenidos en el estudio de los receptores adrenérgicos linfocitarios, junto con los niveles de catecolaminas en el momento del clampaje y del desclampaje de la aorta se muestran en la tabla 1. Existe un incremento del receptor β linfocitario, tanto del total como del que se encuentra superficie, asociado al incremento de catecolaminas que estos pacientes padecen durante a cirugía. Sin embargo, la afinidad del receptor por el radioligando no se modifica si la evaluamos a

partir del Kd. En 6 pacientes se consiguió realizar la determinación del receptor β , de las células miocárdicas, tanto en la superficie celular como el internalizado, datos que se resumen en la tabla 2. Cinco de estos pacientes fueron sometidos a cirugía de pontaje aortocoronario y uno a doble sustitución valvular con pontaje aortocoronario. El tiempo desde la inducción anestésica hasta el comienzo de la circulación extracorpórea en este subgrupo fue de $140,7 \pm 29,8$ minutos y desde la induc-

Tabla 1. Valores obtenidos en el estudio de los receptores adrenérgicos y niveles de catecolaminas en el momento del clampaje y del desclampaje de la aorta.

| | Clampaje | Desclampaje | p |
|--------------------------|------------------|-------------------|--------|
| Norepinefrina (pg/ml) | 143,7 \pm 80,1 | 765,3 \pm 95,6 | <0,001 |
| Epinefrina (pg/ml) | 116,9 \pm 60,0 | 340,8 \pm 107,3 | <0,001 |
| Dopamina (pg/ml) | 60,8 \pm 24,9 | 116,4 \pm 40,3 | < 0,01 |
| Proteínas totales (g/dl) | 3,9 \pm 1,0 | 4,0 \pm 0,8 | ns |
| Bmáx (s/c) | 1316 \pm 110 | 1816 \pm 163 | < 0,05 |
| Kd (pM) | 18,7 \pm 7 | 23 \pm 9 | ns |
| Bmáxe (s/c) | 1206 \pm 91 | 1723 \pm 143 | <0,05 |
| Kd superficie (pM) | 18,6 \pm | 6 22 \pm 8 | ns |

Tabla 2. Valores obtenidos en la determinación del receptor β_1 , de células miocárdicas en el momento del clampaje y del desclampaje de la aorta.

| | Clampaje | Desclampaje | P |
|--------------------------|----------------|-----------------|----|
| Receptores totales (s/c) | 3160 \pm 295 | 32806 \pm 460 | ns |
| Kd | 29 \pm 19 | 33 \pm 24 | ns |
| Bmáx | 2976 \pm 460 | 2990 \pm 570 | ns |
| Kd | 30 \pm 20 | 33 \pm 24 | ns |

ción hasta el clampaje de $150,9 \pm 37,6$ minutos. El tiempo de circulación extracorpórea medio fue de $78,8 \pm 13,6$ minutos. No se encontraron diferencias significativas en estos pacientes en ninguno de los parámetros analizados. No se halló ninguna correlación significativa entre los tiempos medidos y la variación en el número y afinidad del receptor β linfocitario ni miocárdico. Es decir, a mayor duración de

esos tiempos no se produce variación en el número de receptores.

DISCUSIÓN

Estos resultados sugieren que no solamente no existe una reducción del receptor β linfocitario durante la cirugía realizada por by-pass cardiopulmonar sino que además, se produce un incremento significativo del mismo. Este hecho es compro-

bado tanto para el receptor total como para el que se encuentra en la superficie celular, manteniéndose una proporción constante. No hemos demostrado tampoco una diferencia significativa en la afinidad del receptor por el radioligando, evaluándose por la K_d o constante de disociación. Ello implica que no existe una diferencia marcada en la afinidad del receptor por las catecolaminas, aunque examinando debidamente los datos, se produce, comparando la K_d del momento del clampaje, con la K_d del desclampaje, un evidente incremento. Es decir, la concentración de radioligando necesaria para ocupar el 50% de los receptores es mayor en el momento del desclampaje. Esto sucede asociado a un incremento significativo en el número de receptor total, pero sugiere la posibilidad de un cambio de afinidad del receptor en el peroperatorio.

Todos estos hechos se producen en un «ambiente» de incremento en el nivel de catecolaminas, en un período de tiempo, suficientemente largo como para que ocurriera internalización y «down-regulation» del receptor linfocitario. En el único trabajo que conocemos sobre el análisis de los receptores β linfocitarios durante este tipo de cirugía⁵, no se encontraron cambios en el número ni en la afinidad de los receptores durante el período de by-pass, aunque sí hubo diferencias en el subgrupo de pacientes que alcanzaba un nivel de catecolaminas más elevado.

Es conocido que un brusco incremento de catecolaminas puede inducir una salida linfocitaria importante especialmente desde el bazo⁶. Los subgrupos de linfocitos poseen diferente número de receptores β . El número máximo de receptores parece estar en las células «Natural-Killer» o NK, seguidas de los linfocitos T supresores, linfocitos B, monocitos y por último los linfocitos T helper.

Las catecolaminas son capaces de inducir un cambio en la subpoblación linfocitaria, con un incremento relativo de los linfocitos que poseen mayor cantidad de receptor β y una reducción relativa de los que tienen menor cantidad de receptor. Es por ello que si determinamos los receptores β en el clampaje aórtico y después un

incremento tan significativo de las catecolaminas aunque se miden los receptores en una misma población celular, su composición fenotípica es diferente y en este último caso con una tendencia a un mayor número de receptores. Este hecho puede explicar los resultados hallados en nuestro estudio, aunque la demostración definitiva requería la determinación de los subtipos linfocitarios en cada uno de los momentos y del número de receptores en cada uno de los subtipos. Esto podría explicar por qué no hemos encontrado diferencias en la cantidad de receptor en la superficie celular linfocitaria. Teóricamente, el incremento de catecolaminas conlleva una internalización de los receptores. Es posible que esto ocurra así de hecho, pero el incremento en el número de receptores totales encontrados y la posible alteración en la proporción de subtipos linfocitarios puede explicar este hecho. En el presente estudio, tampoco hemos hallado diferencias significativas en el estudio de células miocárdicas obtenidas mediante biopsia peroperatoria de la cara anterior del ventrículo derecho. Tanto los receptores de superficie como el receptor total permanecen inalterados y también su afinidad por el radioligando, evaluada mediante la K_d (constante de disociación).

Este hecho podría tener varias explicaciones. La primera es el escaso número de pacientes en los que se ha podido realizar esta técnica en el presente estudio. Una segunda explicación podría ser que la isquemia fría con cardioplegia intermitente fría hemática representa condiciones diferentes a las de un síndrome isquémico coronario agudo. El frío produce una tasa metabólica baja, que puede afectar a la externalización del receptor. La tercera razón es el método utilizado. No tenemos noticia de que se haya aplicado la determinación de receptores β en la célula miocárdica entera. Prácticamente todos los estudios en la literatura emplean receptor de membranas citoplasmáticas aisladas mediante ultracongelación. Un único trabajo ha valorado la densidad y la afinidad del receptor β miocárdico durante la cirugía de by-pass⁷, demostrando que el número de los receptores se reduce, con una desensibilización precoz y una «down-

regulation» tardía. Este trabajo fue realizado en un modelo experimental y no se utilizaron células miocárdicas enteras. ¿Sirven los receptores β linfocitarios para la monitorización del receptor β miocárdico?. Los cambios en los receptores β 2 adrenérgicos linfocitarios pueden ser considerados como representativos de los cambios en otros tejidos cuando son inducidos por agentes farmacológicos β no selectivos⁸. Si un agente β -selectivo está implicado en el cambio de densidad del receptor, hay una buena relación entre el cambio en el número y afinidad del receptor β , en el linfocito y el β 2 del miocardio, pero no con el receptor total de este otro tejido y menos con el receptor β . Esto tiene todavía más importancia en el presente estudio, ya que el miocardio se encuentra excluido de la circulación general por la circulación extracorpórea.

BIBLIOGRAFÍA

1. BRODDE O E, KRETSCH R, IKEZONO K, ZERKOWSKI H R, REIDEMEISTER J C. Human β adrenoceptors: Relation of myocardial and lymphocyte β -adrenoceptor density. *Science* 1986; 231: 1584-1585.
2. DEBLASI A, LIPARDITI M, MOTULSKY H J, INSEL P A, FRATELLI M. Agonist-induced redistribution of β -adrenergic receptors on intact human mononuclear leukocyte redistributed receptors are nonfunctional. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 61: 1081-1088.
3. DEBLASI A, MAISEL A S, FEDDMAN R D, ZIEGLER M G, FRATELLI M, DILLALLO M, SMITH D A et al. In vivo regulation of β -adrenergic receptors on human mononuclear leukocytes. Assessment of receptor number, localization and function after posture change, exercise and isoproterenol infusion. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 63: 847-852.
4. SCATCHARD G. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann New York Acad Sci* 1949; 51: 660-672.
5. MANTZ J, MARTY J, PANSARD Y, HEZCEL D, LOISEAU A, POCIDALO M, LANGLOIS J, DESMONTS J M. β -adrenergic receptor changes during coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1990; 99: 75-81.
6. MOTULSKY H J, CUNNINGHAM E M S, DEBLASI A, INSEL P A. Desensitization and redistribution of β -adrenergic receptors on human mononuclear leukocytes. *Am J Physiol* 1986; 250: 583-590.
7. SCHWINN D A, LEONE B J, SPAHN D R, CHESMUT L C, PAGE S O, McRAE R L, LIGGETT S B. Desensitization of myocardial β -adrenergic receptors during cardiopulmonary bypass. Evidence for early uncoupling and late downregulation. *Circulation* 1991; 84: 2559-2567.
8. BRODDE O E, MICHEL M C, GORDON E P, SANDOVAL A, GILBERT E M, BRISTOW M R. β adrenoceptor regulation in the human heart: can it be monitored in circulating lymphocytes? *Eur Heart J* 1989; 10: 2-10.