

Variantes Genéticas de los Receptores Adrenérgicos y Enfermedades Cardiovasculares

Guillermo Díaz-Araya¹, Mario Chiong², Francisco Moraga², Pablo Castro³, Osvaldo Pérez³, José Luis Vukasovic⁴, Carolina Nazzari³, Ivonne Padilla³, Ramón Corbalán, Mauricio Moreno³ y Sergio Lavandero²

Departamentos de ¹Química Farmacológica y Toxicológica y de ²Bioquímica y Biología Molecular, Facultad Ciencias Químicas y Farmacéuticas, y ³Departamento de Cardiología, Facultad Medicina, Universidad de Chile y ⁴Departamento Enfermedades Cardiovasculares, Hospital Clínico, P Universidad Católica de Chile

El proyecto Genoma Humano ha logrado descifrar la secuencia completa del genoma, aportando una herramienta única para el estudio de la genética humana. Sin embargo, se ha observado cada vez más frecuentemente la aparición de variantes genéticas, o polimorfismos, en cada uno de los genes estudiados. Como reguladores claves de diversos sistemas, los receptores adrenérgicos proveen un sistema único para explorar una posible relación entre los polimorfismos del receptor y la respuesta a fármacos y susceptibilidad o progresión de las enfermedades cardiovasculares. Los adrenoceptores pertenecen a la superfamilia de los receptores con siete dominios de transmembrana que producen su efecto a través del acoplamiento con distintas proteínas G. Hasta la fecha se han identificado varios subtipos de adrenoceptores: α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} , α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} , β_1 , β_2 , β_3 y β_4 . Este artículo provee una visión general de los polimorfismos existentes en los receptores adrenérgicos y su relación con las enfermedades cardiovasculares.

Genetic Variants of the Adrenergic Receptors and Cardiovascular Diseases

The Human Genome Project elucidated the complete genome sequence, generating an unique tool for studying human genetics. However, the discovery of genetic variants, or polymorphisms, in each of the studied genes is more frequently detected. As key regulators of several systems, adrenergic receptors provide an excellent system to explore possible relationships among receptor polymorphisms with drug response and both disease susceptibility and progression. Adrenoceptors belong to the superfamily of seven transmembrane domain receptors that produce their effects through the coupling with different G-proteins. Several subtypes of adrenoceptors have been identified: α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} , α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} , β_1 , β_2 , β_3 and β_4 . This review provides a general insight of the existent adrenoceptor polymorphisms and their association with cardiovascular diseases.

Correspondencia: Dr. Guillermo Díaz-Araya. Departamento Química Toxicológica y Farmacológica, Facultad Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Olivos 1007. Santiago, Chile. E-mail: gadiaz@ll.ciq.uchile.cl. Fax: 7378920.

INTRODUCCIÓN

El dogma central de la biología molecular (DNA → RNA → proteína) ha tenido gran impacto en diversos campos de la investigación biomédica. Recientemente gracias al Proyecto Genoma Humano, existe la oportunidad única de identificar y caracterizar todos y cada uno de los genes que conforman nuestro patrimonio genético. Sin embargo, también es necesario establecer las variaciones de secuencias que pueda tener un gen en particular en una población. Tales variaciones corresponden a variantes alélicas de un gen, que se diferencian de las mutaciones por su alta frecuencia¹.

Hasta la fecha se han descrito diversas mutaciones en genes asociados al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, como son por ejemplo la hipercolesterolemia familiar, los síndromes de Marfán y de Shprintzen-Goldberg, la displasia valvular cardíaca, defecto septal atrioventricular, estenosis aórtica supraventricular, por nombrar algunas; todas ellas se han observado en grupos familiares específicos y con frecuencias menores al 0,1% de la población². Los polimorfismos, en cambio, coexisten múltiples alelos en un locus o variantes genéticas que ocurren con frecuencias superiores al 1% de la población. Estas variantes alélicas se producen por el cambio de una base nucleotídica por otra, o por la inserción o delección de una o varias bases en la secuencia nucleotídica de un gen. Como cada individuo posee dos juegos de cromosomas, uno de origen paterno y otro materno, entonces cada individuo puede ser homocigoto o heterocigoto para un determinado gen. A causa de la redundancia en el código genético, es decir que más de un codón codifica a un aminoácido, sólo un cierto número de esos polimorfismos se traducen en cambios en la secuencia primaria de una proteína^{3,4}.

Dado que los polimorfismos son comunes en la población general, es improbable que sólo la presencia de uno en particular represente la causa primaria de una enfermedad. Estos polimorfismos pueden, sin embargo, representar factores de riesgo en patologías multifactoriales comunes, tales como la insuficiencia cardíaca, la hipertensión arterial y la obesidad.

Para algunas enfermedades cardiovasculares, se ha propuesto que tanto la susceptibilidad y la progresión de una enfermedad como la respuesta a fármacos se deben, en parte, a la variabilidad de los genes que codifican para receptores y otras enzimas que participan en su metabolización.

Existen numerosas metodologías para determinar la existencia de polimorfismos dentro de un gen (Figura 1). Las más utilizadas son la secuenciación del DNA y el Polimorfismo en el Largo de los Fragmentos de Restricción (RFLP). En ambas metodologías, el DNA a estudiar es clonado o amplificado por la Reacción de Polimerización en Cadena (PCR) y luego es secuenciado o digerido por una enzima de restricción (endonucleasa que corta el DNA en una secuencia específica)¹.

SISTEMA ADRENÉRGICO

El sistema nervioso simpático regula diversas funciones fisiológicas, entre ellas la presión sanguínea a través de sus efectos sobre la función cardíaca, resistencia vascular periférica, liberación de renina, manejo del sodio intrarrenal, etc. Estos sistemas regulatorios, que incluyen al mismo sistema nervioso simpático, son influenciados por variaciones genéticas^{5,6}. La existencia de variaciones genéticas en los subtipos de los receptores adrenérgicos y sus componentes de señales intracelulares ha concitado gran interés, desde un punto de vista diagnóstico y terapéutico^{1,5,6}.

RECEPTORES ADRENÉRGICOS

Los receptores adrenérgicos (RA) se clasificaron en receptores α (por excitatorio) y β (por inhibitorio) por Ahlquist en 1948, basado en su comportamiento funcional en los vasos sanguíneos, es decir, vasoconstricción o vasodilatación⁷. Esta clasificación fue ampliada por Lands y cols, categorizando los receptores α y β en dos subtipos distintos, basado en sus potencias relativas para los ligandos disponibles en aquella época⁷. El clonamiento de los cDNA que codifican los RAs humanos y estudios posteriores indicaron que los RAs pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G^{4,7,8}. Estos receptores se caracterizan por poseer siete dominios de transmembrana y producen sus efectos a través de la activación/inhibición de la adenilato ciclasa por medio del acoplamiento con distintas proteínas G (Figura 2)^{7,8}. En respuesta a la activación por las neurohormonas fisiológicas (adrenalina y noradrenalina) o agonistas sintéticos, estos receptores regulan una amplia variedad de procesos celulares, que incluyen metabolismo celular, producción de hormonas, activación neuronal, etc^{5,6}.

Figura 1. Definición, mecanismo, ventajas y desventajas de las diferentes metodologías para identificar variaciones genéticas. Los Polimorfismos en el Largo de los Fragmentos de Restricción (RFLP), Polimorfismo de Conformación de Hebra Simple (SSCP), Electroforesis en Gel en Gradiente de Temperatura (TGGE) o Electroforesis en Gel en Gradiente Denaturante (DGGE), se usan para determinar polimorfismo de genes y son metodologías usadas para la detección de variaciones genéticas dentro de una población.

Metodología	Definición	Mecanismo	Ventaja	Desventaja
Polimorfismo en el Largo de los Fragmentos de Restricción (RFLP)	Variación en el largo de los fragmentos de restricción en regiones idénticas del genoma, las variaciones crean o destruyen sitios para enzimas de restricción.	<p>mutación enzima de restricción b ha perdido el sitio de restricción</p>	<ul style="list-style-type: none"> Fácil y relativamente barato. No hay limitaciones en el tamaño de los fragmentos (100 pb - >10 kb). Discrimina homocigotos/heterocigotos. 	<ul style="list-style-type: none"> No identifica polimorfismos presentes en otro sitio que no sean sitios de reconocimiento para enzimas de restricción.
Polimorfismo en la Conformación de Hebra Simple (SSCP)	Detección electrofórica de diferencias en un par de bases que producen conformaciones alteradas.	<p>cambio en un par de bases</p>	<ul style="list-style-type: none"> Fácil y relativamente barato. Discrimina homocigotos/heterocigotos. 	<ul style="list-style-type: none"> Sólo en fragmentos de DNA <500 pb.
Electroforesis en Gel en Gradiente de Temperatura (TGGE) o Electroforesis en Gel en Gradiente Denaturante (DGGE)	Detección electrofórica de alteraciones en un par de bases con respecto a la secuencia tipo silvestre usando otro temperatura u otro agente denaturante, el cual permite la detección de un genotipo mutante.	<p>cambio en un par de bases PCR</p>	<ul style="list-style-type: none"> Detecta varios polimorfismos simultáneamente. Discrimina homocigotos/heterocigotos. Método altamente sensible, generalmente sin falsos positivos. 	<ul style="list-style-type: none"> Los productos de PCR que poseen desviaciones respecto al tipo silvestre deben secuenciarse para identificar la mutación exacta. Limitación de tamaño: <1 kb. Laborioso.

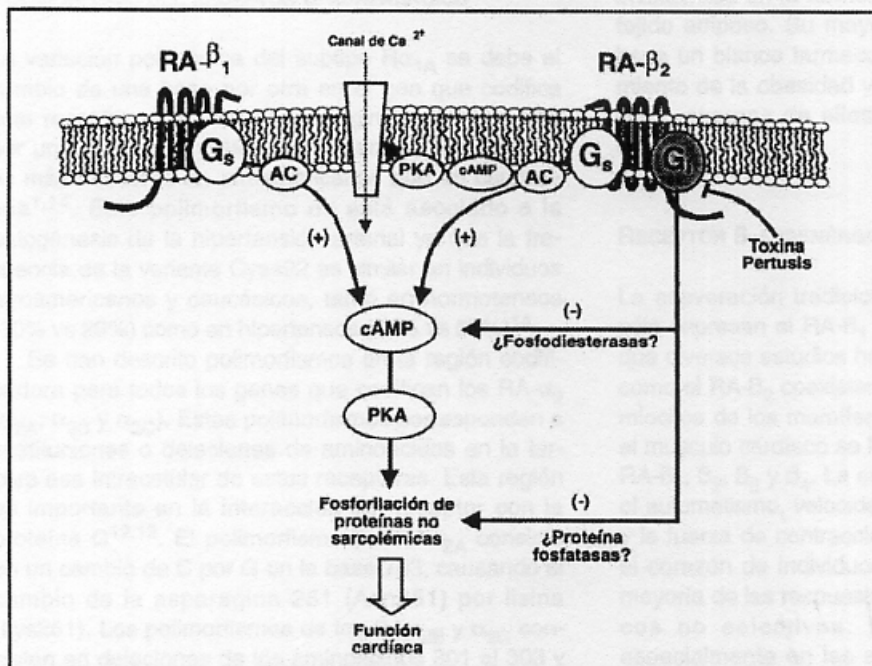


Figura 2. Receptores adrenérgicos (RA) β₁ y β₂ en cardiomiocitos. El RA-β₂ modula la actividad del canal de Ca²⁺ y los niveles intracelulares de AMP cíclico por medio de la proteína G_s. La activación de la proteína G_i por el RA-β₂ ayuda a compartamentalizar la señal generada por la activación de la vía G_s-adenil ciclasa (AC)-proteína quinasa A (PKA) al sarcolema. Esta acción probablemente se efectúa a través de la estimulación de fosfodiesterasas o proteínas fosfatasas. Por otra parte, el RA-β₁ se acopla exclusivamente a la proteína G_s.

RECEPTORES α -ADRENÉRGICOS

Los receptores α -adrenérgicos (RA- α) se dividen en RA- α_1 y RA- α_2 , basados en su localización celular y especificidad farmacológica. Cada clase se subdividió posteriormente en α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} , α_{2AD} , α_{2B} y α_{2C} ⁹.

Los RA- α_1 están involucrados en patologías tan diversas como hipertrofia prostática, arritmias e isquemia cardíaca, y en la patogénesis de la hipertensión esencial⁹. El RA- α_1 media la vasoconstricción y tiene una importante función en la regulación del tono vascular. El subtipo RA- α_{1A} es la especie predominante de estos receptores en el músculo liso vascular. Se han detectado diferencias interindividuales en la respuesta de estos receptores a fenilefrina en individuos normotensos e hipertensos⁹⁻¹¹.

Los RA- α_{2A} median primariamente funciones como hipotensión, sedación, analgesia e hipotermia. El RA- α_{2B} es el principal mediador en la respuesta hipertensiva a agonistas- α_2 , y juega un papel importante en la hipertensión arterial inducida por sal. El RA- α_{2C} controla diversos procesos a nivel del sistema nervioso central, como son la respuesta al estrés y locomoción. La activación de los RA- α_{2A} y RA- α_{2C} presinápticos inhiben la liberación de noradrenalina y parecen ejercer distintos papeles reguladores^{12,13}.

POLIMORFISMO DEL RECEPTOR α -ADRENÉRGICO

La variación polimórfica del subtipo RA- α_{1A} se debe al cambio de una base por otra en el gen que codifica este receptor, reemplazando la arginina 492 (Arg492) por una cisteína (Cys492). La variante alélica Arg492 es más frecuente en afroamericanos que en caucásicos^{1,14}. Este polimorfismo no está asociado a la patogénesis de la hipertensión arterial ya que la frecuencia de la variante Cys492 es similar en individuos afroamericanos y caucásicos, tanto en normotensos (30% vs 29%) como en hipertensos (54% vs 55%)¹⁴.

Se han descrito polimorfismos en la región codificadora para todos los genes que codifican los RA- α_2 (α_{2A} , α_{2B} y α_{2C}). Estos polimorfismos corresponden a sustituciones o deleciones de aminoácidos en la tercera asa intracelular de estos receptores. Esta región es importante en la interacción del receptor con la proteína G^{12,13}. El polimorfismo del RA- α_{2A} consiste en un cambio de C por G en la base 753, causando el cambio de la asparagina 251 (Asn251) por lisina (Lys251). Los polimorfismos de los RA- α_{2B} y α_{2C} consisten en deleciones de los aminoácidos 301 al 303 y 322 al 325, respectivamente¹². Aunque se ha demos-

trado la participación de los RA- α_2 , y en particular el RA- α_{2B} , en el desarrollo de la hipertensión arterial inducida por sal, hasta la fecha no se ha podido asociar ninguno de estos polimorfismos con la hipertensión arterial^{1,15,16}.

RECEPTORES β -ADRENÉRGICOS (RA- β)

El gen del receptor β -adrenérgico (RA- β) humano está situado en el brazo largo del cromosoma 5 y codifica para un producto génico sin intrones de aproximadamente 1.200 pares de bases. El receptor está compuesto de 413 residuos aminoácidos y pesa aproximadamente 46,5 kDa (Figura 3). El RA- β se subdivide en cuatro subgrupos: β_1 , β_2 , β_3 y β_4 , clásicamente identificados en músculo cardíaco, músculo liso de las vías aéreas, tejido adiposo y cardíaco, respectivamente⁸. Estos receptores son muy similares entre sí, existiendo un 65%-70% de homología entre los RA- β_1/β_3 y β_2 ⁸.

El RA- β_1 es una proteína clave en las vías de transducción intracelular en el corazón y en otros órganos, donde median las acciones de las catecolaminas del sistema nervioso simpático. El RA- β_2 media la vasodilatación y su disfunción se ha asociado con la hipertensión arterial sensible a sal en la población europea¹⁷. El RA- β_3 es el principal receptor involucrado en la termorregulación y en la lipólisis del tejido adiposo. Su mayor expresión en adipocitos lo hace un blanco farmacológico atractivo para el tratamiento de la obesidad y otras enfermedades metabólicas, algunas de ellas asociadas a enfermedades cardiovasculares¹⁸.

RECEPTOR β -ADRENÉRGICO EN EL CORAZÓN

La aseveración tradicional de que los cardiomiocitos sólo expresan el RA- β_1 ha cambiado rápidamente, ya que diversos estudios han indicado que tanto el RA- β_1 como el RA- β_2 coexisten funcionalmente en los cardiomiocitos de los mamíferos, incluyendo al hombre⁷. En el músculo cardíaco se ha demostrado la existencia de RA- β_1 , β_2 , β_3 y β_4 . La estimulación del RA- β_1 aumenta el automatismo, velocidad de conducción, excitabilidad y la fuerza de contracción del músculo cardíaco¹⁹. En el corazón de individuos sanos, los RA- β_1 median la mayoría de las respuestas a los agonistas β -adrenérgicos no selectivos. Los RA- β_2 se encuentran especialmente en las aurículas y los ventrículos, en estos tejidos su estimulación aumenta el inotropismo.

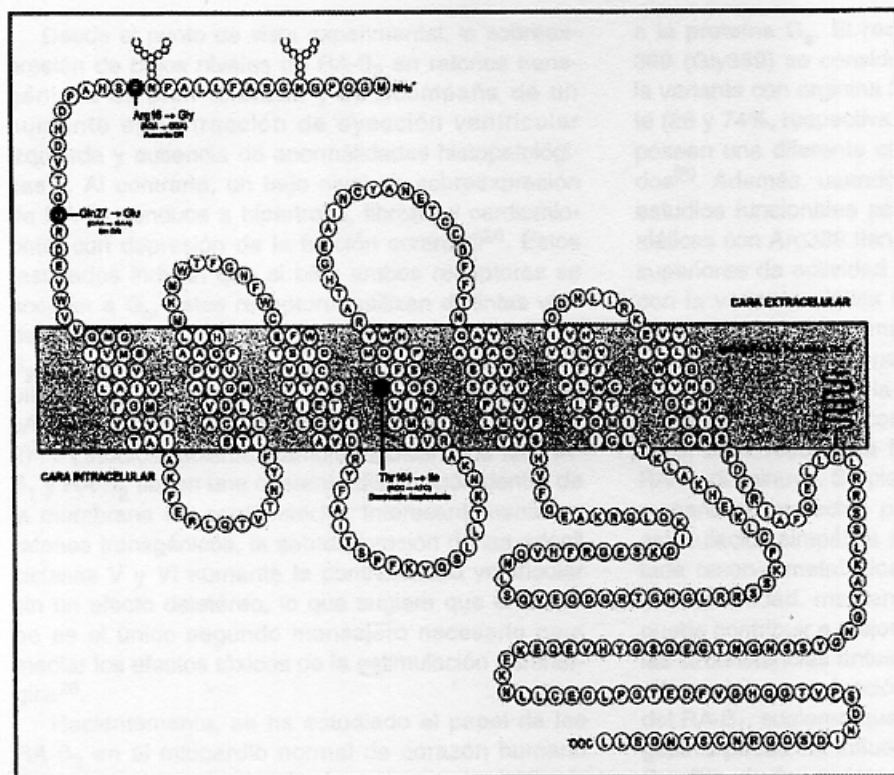


Figura 3. Estructura del receptor adrenérgico β_2 (RA- β_2). Los aminoácidos están representados usando el código de una letra. El receptor es una proteína integral de membrana caracterizada por 7 dominios de transmembrana. Los polimorfismos Arg16→Gly (R→G) y Gln27→Glu (Q→E) se encuentran ubicados en el extremo amino terminal. El polimorfismo Thr164→Ile (T→I) se encuentra localizado en el cuarto dominio de transmembrana.

En las aurículas y ventrículos la proporción entre RA- β_1 y RA- β_2 es aproximadamente 2:1. Altas proporciones de RA- β_2 se encuentran en las zonas de marcapasos y sistemas de conducción en donde son importantes en el control del ritmo y frecuencia cardíacas²⁰. El RA- β_3 se encuentra especialmente en el lecho vascular coronario. Aunque este receptor ejerce un efecto inótrópico positivo en aurículas aisladas, en el corazón intacto tiene un efecto opuesto frente a la estimulación por catecolaminas²¹. Existen evidencias de la expresión de RA- β_4 en varias regiones del corazón, incluyendo el nodo sinoauricular, aurículas y ventrículos. Este receptor aumenta las concentraciones de Ca^{2+} en el interior del cardiomiocito e induce arritmias y en la periferia media, al igual que el RA- β_3 la lipólisis²².

RECEPTOR β -ADRENÉRGICO EN EL CORAZÓN INSUFICIENTE

En la insuficiencia cardíaca (IC) existe un aumento en los niveles de catecolaminas circulantes que resulta en

una prolongada estimulación β -adrenérgica del corazón. Tal exceso de estimulación causa desensibilización, explicada tanto por un desacoplamiento del receptor de las vías de señalización intracelular como por internalización del mismo. El desacoplamiento de los RA- β del sistema de transducción de señales mediado por la proteína G se explica por la fosforilación del receptor por una proteína quinasa específica denominada (BARK) y la subsecuente unión de la β -arrestina²³. Como consecuencia de este proceso, existe una disminución en la producción de AMP cíclico (cAMP), lo que contribuye a explicar una disminución en la liberación del Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico. Además, la captación de Ca^{2+} por el retículo sarcoplásmico se encuentra disminuida. Por otro lado, la internalización es responsable de una disminución en la densidad de los RA- β_1 de hasta un 50-70% en la IC²⁴. La disminución de los RA- β_1 en la IC avanzada resulta en un aumento relativo en la proporción de RA- β_2 . Estos receptores se unen a la proteína Gi disminuyendo la apoptosis²⁵. De acuerdo a estos conceptos, el bloqueo de los RA- β_1 dejaría intacta esta vía protectora.

Desde el punto de vista experimental, la sobreexpresión de bajos niveles de RA- β_2 en ratones transgénicos es bien tolerada y se acompaña de un aumento en la fracción de eyección ventricular izquierda y ausencia de anomalías histopatológicas²⁶. Al contrario, un bajo nivel de sobreexpresión de RA- β_1 conduce a hipertrofia, fibrosis y cardiomiopatía con depresión de la función contráctil²⁶. Estos resultados indican que si bien ambos receptores se acoplan a G_s , estos receptores utilizan distintas vías de segundos mensajeros. Así, pareciera que el RA- β_2 , pero no el RA- β_1 , se puede unir a la proteína inhibitoria (G_i), la que puede atenuar la respuesta de cAMP o activar otras vías aún desconocidas (Figura 2)²⁶. Estudios recientes también indican que los RA- β_1 y RA- β_2 tienen una diferente distribución dentro de la membrana del cardiomiocito. Interesantemente en ratones transgénicos, la sobreexpresión de las adenil ciclasas V y VI aumenta la contractilidad ventricular sin un efecto deletéreo, lo que sugiere que el cAMP no es el único segundo mensajero necesario para mediar los efectos tóxicos de la estimulación adrenérgica²⁶.

Recientemente, se ha estudiado el papel de los RA- β_3 en el miocardio normal de corazón humano denervado. La estimulación de este receptor inhibe la contractilidad. Este efecto parece ser mediado por la proteína G_i e involucra la producción de óxido nítrico (NO) por la isoforma endotelial de la óxido nítrico sintetasa del miocardio ventricular (eNOS)²⁷. Moniotte y cols demostraron un aumento en la expresión de este receptor en el miocardio obtenido por biopsias de corazón de pacientes con IC²⁸.

POLIMORFISMO DEL RECEPTOR β -ADRENÉRGICO

Los miembros de la familia del receptor RA- β (β_1 , β_2 , y β_3) son altamente polimórficos. La existencia de polimorfismos correspondientes a cambios en un nucleótido se han asociado con varias enfermedades cardiovasculares y factores de riesgo que incluyen: obesidad, hipertensión arterial, diabetes e IC congestiva^{1,4,8}.

POLIMORFISMO DEL RECEPTOR β_1 -ADRENÉRGICO

Para este receptor se ha identificado un polimorfismo cerca del séptimo dominio de transmembrana, en la región amino terminal intracelular, en el aminoácido 389. Esta región es importante para el acoplamiento

a la proteína G_s . El receptor con la variante glicina 389 (Gly389) se considera del tipo silvestre, aunque la variante con arginina 389 (Arg389) es más frecuente (26 y 74%, respectivamente). Las variantes alélicas poseen una diferente afinidad de unión a radioligandos²⁹. Además, usando mutaciones sitio dirigidas y estudios funcionales se comprobó que las variantes alélicas con Arg389 tienen niveles basales levemente superiores de actividad adenilato ciclasa, comparada con la variante alélica Gly389. Estas diferencias se exacerban bajo la estimulación con isoproterenol²⁹.

Es interesante considerar el potencial papel de este polimorfismo en la regulación de la función cardíaca normal y bajo condiciones patológicas, ya que en el desarrollo de la IC, la expresión y función de RA- β_1 disminuye. Se piensa que esta respuesta es un mecanismo protector, previniendo al corazón de una estimulación simpática sostenida en caso de una limitada reserva metabólica. En las fases tempranas de la enfermedad, mantener la funcionalidad de RA- β_1 puede contribuir a mejorar la función ventricular. Dada las circunstancias antes mencionadas, las dramáticas diferencias en la función entre los dos polimorfismos del RA- β_1 , sugieren que la fisiopatología de la IC congestiva puede ser influenciada por el genotipo del RA- β_1 . Sin duda, existen inexplicadas variaciones interindividuales en la progresión de la IC como también en la respuesta cardíaca a agonistas β -adrenérgicos, usados terapéuticamente durante la descompensación aguda²⁹. Interesantemente, los antagonistas β (β -bloqueadores) son utilizados en el tratamiento crónico de la IC, presumiblemente por la disminución de la estimulación simpática crónica. Sin embargo, hay bastante variación interindividual en la respuesta clínica a los β -bloqueadores de los pacientes con IC. Basados en estos resultados, se podría predecir que los individuos que poseen en el receptor la Arg389 presentarían una mejor respuesta a la terapia con β -bloqueadores, ya que ellos tendrían una determinación genética a RA- β_1 que lleva a una mayor estimulación de la adenilato ciclasa. Un escenario similar podría estar presente en el tratamiento de la hipertensión esencial con β -bloqueadores, donde se podría predecir a los de mejor respuesta por su genotipo²⁹.

POLIMORFISMO DEL RECEPTOR β_2 -ADRENÉRGICO

Se han descrito numerosas variantes alélicas del RA- β_2 que alteran el comportamiento del receptor luego de la exposición al agonista- β_2 ^{1,8,30}. El principal inte-

rés clínico en esos polimorfismos yace en la posibilidad de que determinen el grado de disminución del número de receptores tanto en el corazón como en las vías aéreas y en la modificación de la respuesta farmacológica, a través de cambios en la expresión y desacoplamiento de los RA- β_2 a sus vías de señalización intracelular. Estudios en el RA- β_2 permitieron la identificación de un total de nueve diferentes polimorfismos, todos ellos difieren de la variante alélica considerada silvestre por un cambio en una única base en diferentes posiciones en la secuencia codificadora del gen. Sin embargo, sólo cuatro polimorfismos que resultan de cambios en una única base alteran la secuencia aminoacídica del receptor^{1,30}. Tres de esos polimorfismos se han estudiado en algún detalle, y todos alteran las propiedades funcionales del receptor, lo que tendría importancia cuando individuos con distintos polimorfismos están expuestos a catecolaminas circulantes o agonistas β_2 -adrenérgicos (Figuras 3 y 4)³⁰.

El estudio inicial se enfocó sobre el aminoácido 16, el cual puede ser Arg o Gly, dependiendo de si la base en la posición 46 es A o G (Figura 3). La desensibilización de un receptor está marcadamente influenciada por la presencia de Gly16. El número de receptores disminuye con la forma Gly16 después de exposición a un agonista en un grado muy superior que la forma con Arg16, tanto en células transfectadas como en cultivos primarios de células de musculatura lisa bronquial^{8,30}. Las frecuencias alélicas en la población alemana para Arg16 y Gly16 son 0,35 y 0,65, en la población caucásica son 0,38 y 0,62 y en la población hispana son 0,31 y 0,59, respectivamente^{1,8}. Recientemente, se ha sugerido que el intercambio Arg16→Gly16 también predispone a la hipertensión arterial⁸.

El segundo polimorfismo es en el codón 27, donde el aminoácido es glutamina (Gln) o ácido glutámico (Glu), dependiendo de si la base en la posición 76 es C o G (Figura 3). Las frecuencias alélicas en la población alemana para Gln27 y Glu27 son 0,55 y 0,45, en la población caucásica son 0,61 y 0,39 y en la población hispana son 0,73 y 0,27, respectivamente^{1,8}. Contrariamente a lo observado en la variante alélica Gly16, la forma Gln 27 del receptor protege de la disminución en el número de receptores β_2 -adrenérgicos. Se ha observado que la exposición prolongada de cultivos primarios de células de musculatura lisa bronquial a agonistas β_2 -adrenérgicos, determina una reducción del número de RA, sin embargo la forma Glu27 experimenta una mayor disminución que la forma Gln27^{8,30}.

El tercer polimorfismo reside en el aminoácido 164, el cual puede ser treonina (Thr) o isoleucina (Ile) (Figura 3). Este polimorfismo es mucho más raro que el de los aminoácidos 16 ó 27 con una frecuencia alélica $\leq 5\%$ para las variantes heterocigotas en varias etnias^{8,30}. Este polimorfismo es potencialmente interesante ya que el aminoácido 164 está situado en el cuarto dominio de transmembrana y es adyacente a la Ser165, la cual ha sido descrita que interactúa con los grupos β -OH de los ligandos adrenérgicos. Este polimorfismo ha sido estudiado en un sistema de células transfectadas y ha demostrado alterar las propiedades de unión de agonistas al receptor. Células que expresan Ile164 tienen cuatro veces menos afinidad por el ligando. Esta alteración en la afinidad de la unión se reflejó en una reducida capacidad del receptor para activar a la adenil ciclasa^{8,30}.

Finalmente, la mutación cisteína 116 (Cys116) por fenilalanina 116 (Phe116) en el tercer dominio transmembrana del RA- β_2 también ha sido asociada con una activación selectiva constitutiva del intercambiador Na^+/H^+ a través de una vía independiente del cAMP. Esas observaciones apuntan a la existencia de múltiples y distintos estados de activación en esos receptores³¹. Este polimorfismo también se ha implicado en la patogénesis de la hipertensión arterial esencial en afroamericanos y se asoció significativamente a variaciones en respuestas a la presión sanguínea por sobrecarga de sodio y/o depleción de volumen (Dzimri, 1999).

POLIMORFISMO DEL RECEPTOR β_2 -ADRENÉRGICO E INSUFICIENCIA CARDÍACA

Se ha encontrado que la distribución de los polimorfismos en el RA- β_2 de pacientes con IC es similar a la encontrada en sujetos normales. Liggett y cols, demostraron que la frecuencia de los polimorfismos en los sujetos con IC fueron: homocigoto Gly16Gly (38,8%), homocigoto Arg16Arg (19,2%) y heterocigoto Arg16Gly (40%); homocigoto Gln27Gln (31,5%), homocigoto Glu27Glu (19,8%) y heterocigoto Gln27Glu (48,6%); y homocigoto Thr164Thr (96,1%), homocigoto Ile164Ile (0%) y heterocigoto Thr164Ile (3,9%). En este estudio, el polimorfismo heterocigoto Thr164Ile se asoció a una progresión acelerada de la IC³².

En forma interesante en un estudio realizado por Wagoner y cols, se encontró una asociación entre determinados polimorfismos del RA- β_2 y la capacidad de ejercicio medida por el consumo máximo de oxígeno.

no en el test cardiopulmonar en pacientes con IC³³. Aquellos pacientes con el polimorfismo Ile164 tuvieron un menor consumo máximo de oxígeno en relación a los que presentaban la variante alélica Thr164. Además, en un subgrupo de estos pacientes, bajo monitoreo hemodinámico invasivo, se demostró un menor aumento en el índice cardíaco y caída en la resistencia vascular sistémica frente al ejercicio. Pacientes con los polimorfismos homocigoto Gly16Gly y la combinación de los homocigotos Gly16Gly y Gln27Gln también tuvieron una disminución significativa del consumo máximo de oxígeno frente al esfuerzo³³. Estos hallazgos son relevantes ya que se conoce que la capacidad física medida por el consumo máximo de oxígeno es de gran utilidad en la estratificación pronóstica de pacientes con IC, habiéndose demostrado una relación entre una disminución en el consumo máximo de oxígeno con una mayor mortalidad y necesidad de trasplante cardíaco³⁴⁻³⁶. Todas estas evidencias confirman la importancia del polimorfismo del RA- β_2 en la funcionalidad de este receptor, en la preservación de la respuesta contráctil y en la progresión de la IC.

A su vez, es posible plantear que en pacientes con IC crónica avanzada y distintos polimorfismos del RA- β_2 sometidos a tratamiento con inótrópicos con acción β -adrenérgica estimuladora tengan respuestas clínicas y hemodinámicas diferentes frente a esta intervención. Evidencias que apoyan una respuesta variable según el polimorfismo del RA- β_2 del paciente, provienen de estudios realizados en sujetos sanos no existiendo información en pacientes con IC. En un estudio realizado por Hoit y cols, en sujetos sanos, se comparó la respuesta vasodilatadora frente a la infusión de una catecolamina (terbutalina) mediante ple-tismografía³⁷. En los sujetos homocigotos para el polimorfismo Gly16Gly del RA- β_2 se demostró una respuesta vasodilatadora atenuada frente a la infusión con relación a los sujetos homocigotos Arg16Arg. Evidencia adicional que apoya una respuesta diferente a la estimulación β_2 proviene de otros reportes que han demostrado que estos polimorfismos alteran la respuesta broncodilatadora a agonistas β_2 -adrenérgicos como la taquifilaxia a éstos en pacientes con asma bronquial³⁸.

Pese a estos hallazgos aún existen interrogantes acerca del rol de estos polimorfismos y de la importancia de la preservación de la función β -adrenérgica en la IC. Aunque estos hallazgos sugieren un deterioro de la respuesta adrenérgica en la IC (y a la inferencia de que una respuesta preservada es protectora),

esta hipótesis es difícil de reconciliar con el hecho de que el bloqueo del sistema adrenérgico mejora el pronóstico de la IC y que la sobreexpresión de los receptores adrenérgicos conduce a cardiomiopatía³⁹. Sin embargo, una preservación de la función β_2 -adrenérgica cuando existe disminución de la funcionalidad de los RA- β_1 podría ser protectora. Pese a esto, no se explica el por qué aún la utilización de β -bloqueadores no selectivos se han asociado a una mayor supervivencia en pacientes con IC³⁹. Estas observaciones divergentes se podrían explicar por diferencias entre un receptor desacoplado con uno bloqueado.

La definición convencional de acoplamiento del receptor se relaciona a la interacción funcional de este receptor con las vías efectoras subyacentes. En el contexto del RA- β_2 , esto ha sido evaluado como un deterioro en la interacción de este receptor con la proteína G y la activación de la adenil ciclasa. Sin embargo, se han identificado mecanismos alternativos que pudiesen mediar efectos fisiológicos de estos receptores. Estos incluyen la interacción con la proteína G inhibitoria (G_i), y más recientemente vías que intersectan con la activación de la Src (proteína tirosina quinasa citosólica) utilizando β arrestina, una proteína que tiene una gran afinidad por el receptor desacoplado⁴⁰. Estas vías alternativas aunque quizás, menos importantes, en la regulación a corto plazo de la función cardíaca, pueden ser importantes en la modulación del crecimiento y apoptosis de los miocitos⁴⁰. Así, estos receptores desacoplados pero no bloqueados aumentarían la activación de estas vías alternativas deletéreas⁴⁰.

POLIMORFISMO DEL RECEPTOR β_3 -ADRENÉRGICO

El polimorfismo es en el triptofano 64 (Trp) por Arg, dependiendo si la base es T o C. La frecuencia alélica para Arg64 varía desde un 30% en los indios Pina hasta un 5,6% en los americanos caucásicos¹⁸. En un estudio italiano se ha asociado este polimorfismo con la presión sanguínea, adiposidad y otras características de síndromes metabólicos (n= 979). Los resultados indicaron que no hubo diferencias entre los heterocigotos Trp64Arg (11,2%) y homocigotos Trp64Trp en cualquiera de las variables en estudio. Sin embargo, en hombres por encima de los 50 años, el genotipo Trp64Arg se asoció a una mayor tendencia a desarrollo de adiposidad abdominal, obesidad, elevación plasmática del ácido úrico e hipertensión arterial⁴¹.

POLIMORFISMO DE LOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS EN LA POBLACIÓN CHILENA

Los tipos y frecuencias de los polimorfismos de los RAs en la población chilena son desconocidas. Estudios preliminares de nuestro laboratorio, usando RFLP del RA- β_2 (Figura 4), indican que la distribución de las diferentes variantes alélicas para el polimorfis-

mo del RA- β_2 no son diferentes de las observadas en otras poblaciones caucásicas (Tabla 1)⁴². Sin embargo, estudios realizados con otros polimorfismos (ie en el gen del angiotensinógeno) mostraron que nuestra población se asemejaría genéticamente más a la población japonesa que a la norteamericana, lo que estaría dado por la influencia asiática en nuestro país⁴³.

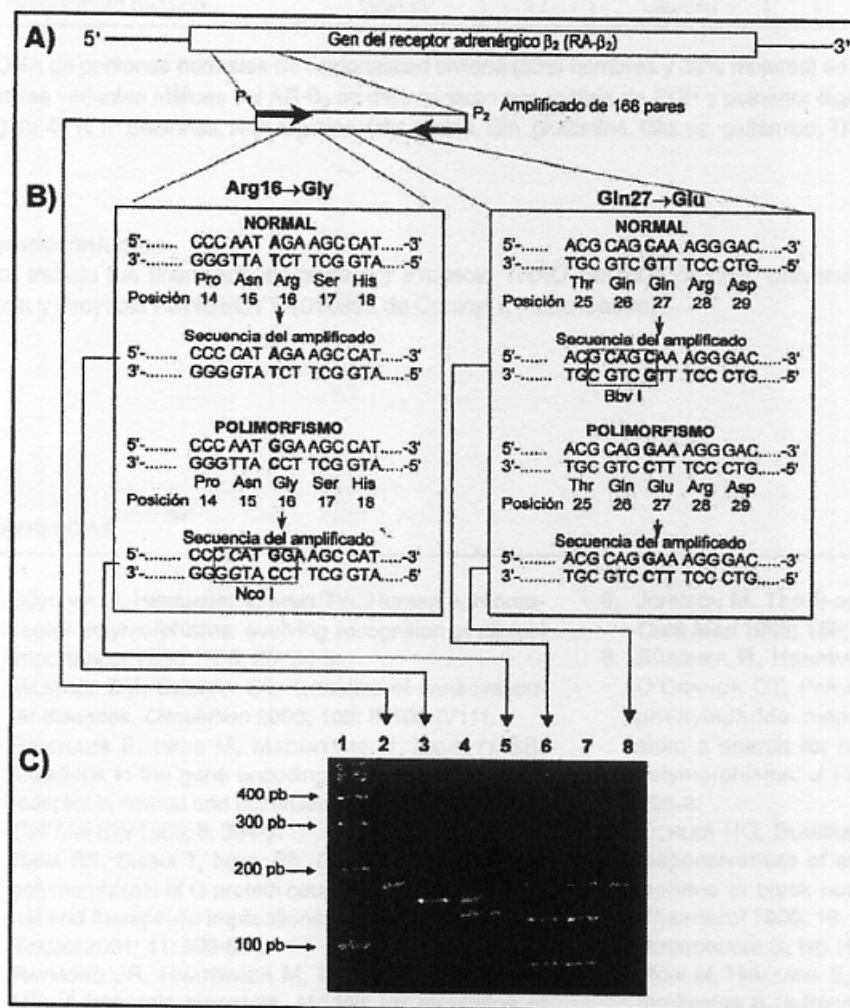


Figura 4. Polimorfismos Arg16-Gly y Gln27-Glu para el gen del receptor adrenérgico β_2 (RA- β_2). A) El extremo 5' del RA- β_2 se amplifica usando los oligonucleótidos partidores P1 y P2, complementarios a la secuencia del RA- β_2 , generando un amplificado de DNA de 168 pb. B) Diagrama que muestra los cambios de bases de los polimorfismos, secuencia de los amplificados y sitios de corte para las enzimas de restricción Nco I y Bbv I. El partidor P1 posee un cambio de base respecto a la secuencia original del RA- β_2 , creando un sitio potencial de reconocimiento para Nco I (base en cursiva). C) Fotografía de un gel de 4% agarosa teñido con bromuro de etidio, en el que se visualizan los distintos patrones de DNA bajo luz ultravioleta.

Carril 1. Estándar de peso molecular. Las bandas menores a 50 pb de no se aprecian en el gel.
 Carril 2. Amplificado de DNA de 168 pb usando los oligonucleótidos partidores P1 y P2.
 Carril 3. El cambio de bases (AGA-GGA) responsable del polimorfismo Arg16-Gly genera un sitio de restricción para Nco I. La digestión de un amplificado de un homocigoto Arg16Arg genera dos fragmentos (146 y 22 pb).
 Carril 4. Digestión de un amplificado de un heterocigoto Arg16Gly. Se aprecia un patrón mixto entre los carriles 3 y 5.
 Carril 5. La digestión de un amplificado de un homocigoto Gly16Gly corta el fragmento de 146 pb en dos fragmentos adicionales (128 y 18 pb).
 Carril 6. El cambio de bases (CAA-GAA) responsable del polimorfismo Gln27-Glu genera un sitio de restricción para Bbv I. La digestión de un homocigoto Gln27Gln genera dos fragmentos (105 y 63 pb).
 Carril 7. Digestión de un amplificado de un heterocigoto Gln27Gln. Se aprecia un patrón mixto entre los carriles 6 y 8.
 Carril 8. En un homocigoto Glu27Glu no existe el sitio Bbv I por lo que esta enzima no corta el amplificado.

Arg= arginina; Asn= asparragina; Asp= ác. aspártico; Gln= glutamina; Glu= ác. glutámico; His= histidina; Pro= prolina; Ser= serina; Thr= treonina.

Tabla 1. Frecuencia de las variantes genéticas del receptor β_2 -adrenérgico en una población normal chilena

	Aminoácido 16 (n=35)		Aminoácido 27 (n=27)		Aminoácido 164 (n=28)	
	genotipos	%	genotipos	%	genotipos	%
Homocigoto normal	Arg/Arg	11	Gln/Gln	63	Thr/Thr	96
Heterocigoto	Gly/Arg	71	Gln/Glu	26	Thr/Ile	4
Homocigoto mutado	Gly/Gly	17	Glu/Glu	11	Ile/Ile	0

El DNA de personas normales de nacionalidad chilena (58% hombres y 32% mujeres) se purificó de sangre periférica. Las distintas variantes alélicas del AR- β_2 se determinaron por análisis de PCR y posterior digestión con enzimas de restricción (Figura 4). n: n° personas. Arg: arginina, Gly: glicina, Gln: glutamina, Glu: ac. glutámico, Thr: treonina, Ile: isoleucina.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado en parte por Proyecto TNAC 14/02/01 de DiD, Universidad de Chile a Guillermo Díaz Araya y Proyecto FONDECYT 1010992 de Conicyt a Pablo Castro.

REFERENCIAS

- BÜSCHER R, HERRMANN V, INSEL PA. Human adrenoceptor polymorphisms: evolving recognition of clinical importance. *TIBS* 1999; 20: 94-9.
- MILEWICZ DM, SEIDMAN CE. Genetics of cardiovascular diseases. *Circulation* 2000; 102: IV103-IV111.
- REISHAUS E, INNIS M, MACINTYRE N, LIGGETT SB. Mutations in the gene encoding for the β_2 -adrenergic receptor in normal and asthmatic subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 8: 334-9.
- RANA BK, SHIINA T, INSEL PA. Genetic variations and polymorphisms of G protein coupled receptors: functional and therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41: 593-624.
- RAYMOND JR, HNATOWICH M, LEFKOWITZ RJ, CARON MG. Adrenergic receptors. Models for regulation of signal transduction processes. *Hypertension* 1990; 15: 119-31.
- INSEL PA. Adrenergic receptors - evolving concepts and clinical implications. *N Engl J Med* 1996; 334: 580-5.
- XIAO RP, CHENG, H, ZHOU YY, KUSCHEL M, LAKATTA EG. Recent advances in cardiac β_2 -adrenergic signal transduction. *Cir Res* 1999; 85: 1092-100.
- JOHNSON M. The β -adrenoceptor. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: S146-S153.
- BÜSCHER R, HERRMANN V, RING KM, KAILASAM MT, O'CONNOR DT, PARMER RJ, INSEL PA. Variability in phenylephrine response and essential hypertension: a search for human α_{1B} -adrenergic receptor polymorphisms. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 291: 793-8.
- EICHLER HG, BLASCHKE TF, HOFFMAN BB. Decreased responsiveness of superficial hand veins to phenylephrine in black normotensive males. *J Cardiovas Pharmacol* 1990; 16: 177-81.
- MINATOGUCHI S, ITO H, ISHIMURA K, SUZUKI T, TONAI N, MORI M, HIRAKAWA S, FUJIWARA H. Plasma adrenaline modulates β_1 -adrenoceptor mediated pressor responses and the baroreflex control in patients with borderline hypertension. *Blood Pressure* 1995; 4: 105-12.
- SMALL KM, LIGGETT SB. Identification and functional characterization of α_2 -adrenoceptor polymorphisms. *TIPS* 2001; 22: 471-7.
- SMALL KM, BROWN KM, FORBES SL, LIGGETT SB. Polymorphic deletion of three intracellular acidic resi-

- dues of the α_{2B} -adrenergic receptor decreases G protein-coupled receptor kinases-mediated phosphorylation and desensitization. *J Biol Chem* 2001; 276: 4917-22.
14. XIE HG, KIM RB, STEIN CM, GAINER JV, BROWN NJ, WOOD AJ. α_{1A} -adrenergic receptor polymorphism: association with ethnicity but not essential hypertension. *Pharmacogenetics* 1999; 9: 651-6.
 15. BALDWIN CT, SCHWARTZ F, BAIMA J, BURZSTYN M, DEStEFANO AL, GAVRAS I, HANDY DE, JOOST O, MARTEL T, MANOLIS A, NICOLAOU M, BRESNAHAN M, FARRER L, GAVRAS H. Identification of a polymorphic glutamic acid stretch in the α_{2B} -adrenergic receptor and lack of linkage with essential hypertension. *Am J Hypertens* 1999; 12: 853-7.
 16. SNAPIR A, HEINONEN P, TUOMAINEN TP, ALHOPURO P, KARVONEN MK, LAKKA TA, NYSSONEN K, SALONEN R, KAUKANEN J, VALKONEN VP, PESONEN U, KOULU M, SCHEININ M, SALONEN JT. An insertion/deletion polymorphism in the α_{2B} -adrenergic receptor is a novel risk factor for acute coronary events. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 1516-22.
 17. LUFT FC. Molecular genetics of salt-sensitivity and hypertension. *Drug Metab Disp* 2001; 29: 500-4.
 18. STROSBERG AD. Association of β_3 -adrenoreceptor polymorphism with obesity and diabetes: current status. *TIPS* 1997; 18: 449-54.
 19. BRISTOW MR, HERSHBERGER RE, PORT JD, GILBERT EM, SANDOVAL A, RASMUSSEN R, CATES AE, FELDMAN AM. β -adrenergic pathways in non failing and failing human ventricular myocardium. *Circulation* 1990; 82(Suppl): I12-I25.
 20. SUMMERS RJ, MOLNAAR P, RUSSELL F, ELNATAN J, JONES CR, BUXTON BF, CHANG V, HAMBLEY J. Coexistence and location of β_1 - and β_2 -adrenoreceptors in the human heart. *Eur Heart J* 1989; 10 Suppl B:1-21.
 21. GAUTHIER C, TAVERNIER G, CHARPENTIER F, LANGIN D, LE MAREC H. Functional β_3 -adrenoreceptor in the human heart. *J Clin Invest* 1996; 98: 556-62.
 22. DZIMIRI N. Regulation of β -adrenoreceptor signaling in cardiac function and disease. *Pharmacol Rev* 1999; 51: 465-501.
 23. HEIN L, KOBILKA BK. Adrenergic receptors: From molecular structures to in vivo function. *Trends Cardiovasc Med* 1997; 7: 137-45.
 24. MAURICE JP, SHAH AS, KYPSON AP, HATA JA, WHITE DC, GLOWER DD, KOCH WJ. Molecular β -adrenergic signaling abnormalities in failing rabbit hearts after infarction. *Am J Physiol* 1999; 276: H1853-1860.
 25. COMMUNAL C, SINGH K, SAWYER DB, COLUCCI WS. Opposing effects of β_1 and β_2 adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis. Role of a pertussis toxin-sensitive G protein. *Circulation* 1999; 100: 2210-2.
 26. LIGGETT SB. β -Adrenergic receptors in the failing heart: the good, the bad and the unknown. *J Clin Invest* 2001; 107: 947-8.
 27. GAUTHIER C, LEBLAIS V, KOBZIK L, TROCHU JN, KHANDOUDI N, BRIL A, BALLIGAND JL, LE MAREC H. The negative inotropic effect of β_3 -adrenoreceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J Clin Invest* 1998; 102: 1377-84.
 28. MONIOTTE S, KOBZIK L, FERON O, TROCHU JN, GAUTHIER C, BALLIGAND JL. Upregulation of β_3 -adrenoreceptors and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardium. *Circulation* 2001; 103: 1649-55.
 29. MASON DA, MOORE JD, GREEN SA, LIGGETT SB. A gain-of-function polymorphism in a G-protein coupling domain of the human β_1 -adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1999; 274: 12870-4.
 30. LIGGETT SB. β_2 -adrenergic receptor pharmacogenetics. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: S197-S201.
 31. ZUSCIK MJ, PORTER JE, GAIVIN R, PÉREZ DM. Identification of a conserved switch residue responsible for selective constitutive activation of the β_2 -adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1998; 273: 3401-7.
 32. LIGGETT SB, WAGONER LE, CRAFT LL, HORNING RW, HOLT BD, MCINTOSH TC, WALSH RA. The Ile164 β_2 -adrenergic receptor polymorphism adversely affects the outcome of congestive heart failure. *J Clin Invest* 1998; 102: 1534-9.
 33. WAGONER LE, CRAFT LL, SINGH B, SURESH DP, ZENGEL PW, MCGUIRE N, ABRAHAM WT, CHENIER, TC, DORN II GW, LIGGETT SB. Polymorphism of the β_2 -adrenergic receptor determine exercise capacity in patients with heart failure. *Circ Res* 2000; 86: 834-40.
 34. MANCINI DM, EISEN H, KUSSMAUL W, MULL R, EDMUNDS LH JR, WILSON JR. Value of peak exercise oxygen consumption for optimal timing of cardiac transplantation in ambulatory patients with heart failure. *Circulation* 1991; 83: 778-86.
 35. MYERS J, GULLESTAD L. The role of exercise testing and gas-exchange measurement in the prognostic assessment of patients with heart failure. *Curr Opin Cardiol* 1998; 13: 145-55.
 36. OSADA N, CHAITMAN BR, MILLER LW, YIP D, CICHECK MB, WOLDFORD TL, DONOHUE TJ. Cardiopulmonary exercise testing identifies low risk patients with heart failure and severely impaired exercise capacity considered for heart transplantation. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 577-82.
 37. HOIT BD, SURESH DP, CRAFT LL, WALSH RA, LIGGETT SB. β_2 -adrenergic receptor polymorphism at amino acid 16 differentially influence agonist-stimulated

- blood pressure and peripheral blood flow in normal individuals. *Am Heart J* 2000; 139: 537-42.
38. HALL IP, WHEATLEY A, WILDIN P. Association of Glu27 β_2 -adrenoreceptor polymorphism with lower airway reactivity in asthmatic subjects. *Lancet* 1995; 345: 1213-4.
39. BRISTOW MR. β adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. *Circulation* 2000; 101: 558-69.
40. FELDMAN RD. Adrenergic receptor polymorphisms and cardiac function (and dysfunction) A failure to communicate? *Circulation* 2001; 103: 1042-3.
41. RINGEL J, KREUTZ R, DISTLER A, SHARMA AM. The Trp64Arg polymorphism of the β_3 -adrenergic receptor gene is associated with hypertension in men with type 2 diabetes mellitus. *Am J Hypertens* 2000; 13: 1027-31.
42. MORAGA F, CHIONG M, DÍAZ-ARAYA G, CASTRO P, PÉREZ O, VUKASOVIC JL, MORENO M, NAZZAL C, PADILLA I, LAVANDERO S. Polimorfismos del receptor β_2 -adrenérgico en una muestra de la población normal chilena. Resumen XXXVIII Congreso Chileno de Cardiología y Cirugía Cardiovascular (2001).
43. JALIL JE, PIDDO AM, CÓRDOVA S, CHAMORRO G, BRAUN S, JALIL R, VEGA J, JADUE P L, LAVANDERO S, LASTRA P. Prevalence of the angiotensin I converting enzyme insertion/deletion polymorphism, plasma angiotensin converting enzyme activity, and left ventricular mass in a normotensive Chilean population. *Am J Hypertens* 1999; 12: 697-704.

Genetic Variants of the Adrenergic Receptors and Cardiovascular Diseases

The Human Genome Project identified the complete genome sequence, generating an atlas for studying human genetics. However, the frequency of genetic variants, or polymorphisms, in most of the studied genes is more frequently detected in any population of several systems, metabolic pathways provide an excellent system to explore possible relationships among receptor polymorphisms with drug responses and their disease susceptibility and progression. Adrenergic receptors belong to the superfamily of seven G-protein-coupled receptor families and are widely distributed throughout the human body. Several variants of adrenergic receptors have been identified, the β_1 , β_2 , β_3 , α_1 , α_2 , α_3 , and α_4 . This review provides a general insight of the human adrenergic receptors polymorphisms and their association with cardiovascular disease.