



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE  
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**FACULTAD DE  
QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA**

**“CARACTERIZACIÓN DE LOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS  
ALFA 1 EN LA AORTA DE CRÍAS DE RATAS DIABÉTICAS.”**

**TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

**PRESENTA:  
SANTIAGO IVÁN LOYA LÓPEZ**

**ASESORES:  
D.C. Daniel Godínez Hernández  
M.C. Leticia Pérez Ordaz**

**Morelia, Michoacán. Noviembre, 2011**

## ÍNDICE GENERAL

<b>ABREVIATURAS</b>	1
<b>RESUMEN</b>	2
<b>INTRODUCCIÓN</b>	4
<b>1. Insulina</b>	4
1.1 Secreción de insulina	6
<b>2. Diabetes Mellitus</b>	9
2.1 Definición	9
2.2 Clasificación	10
2.2.1 Diabetes Mellitus Insulino Dependiente (IDDM), DM 1 o tipo 1	10
2.2.2 Diabetes Mellitus No Insulino Dependiente (NIDDM), DM 2 o tipo 2	10
2.2.2.1 Perspectiva actual de la diabetes	11
2.2.3 Diabetes Gestacional	12
2.2.3.1 Fisiopatología	13
2.2.3.2 Alteraciones celulares y resistencia a la insulina	14
2.2.3.3 Factores de riesgo	15
2.2.3.4 Complicaciones de la diabetes Gestacional	15
2.2.3.5 Epidemiología de la diabetes Gestacional	17
<b>3. Regulación del tono vascular</b>	18

3.1 Catecolaminas .....	20
<b>4. Receptores adrenérgicos .....</b>	<b>23</b>
4.1 Tipos de receptores adrenérgicos .....	24
4.2 Receptores $\beta$ adrenérgicos .....	25
4.3 Receptores $\alpha$ adrenérgicos .....	25
4.3.1 Receptores $\alpha_1$ adrenérgicos .....	26
4.3.1.1 Estructura .....	26
4.3.1.2 Mecanismo de transducción de señales .....	27
4.3.1.3 Regulación de los receptores adrenérgicos .....	29
4.3.1.4 Distribución de los receptores $\alpha_1$ adrenérgicos .....	31
4.3.1.5 Localización subcelular .....	32
<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>33</b>
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>33</b>
<b>OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>33</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>33</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
Animales de estudio .....	34
Preparación del tejido .....	35

Curvas dosis-respuesta a la fenilefrina .....	36
<b>ANÁLISIS DE DATOS</b> .....	<b>37</b>
<b>REACTIVOS</b> .....	<b>39</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>40</b>
Características de las crías .....	40
Curvas concentración respuesta a fenilefrina en arteria aorta torácica de Crías de Ratas Control y Crías de Ratas Diabéticas ...	41
Sensibilidad ( $pD_2$ ) y $E_{max}$ .....	41
Antagonismo de RS100329, .....	42
Antagonismo de ciclazocina .....	44
Antagonismo de BMY 7378, .....	46
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>48</b>
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	<b>52</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>53</b>

## ABREVIATURAS

<b>ACh</b> Acetilcolina.	<b>IRS</b> Insulin Receptor Substrate.
<b>ADN</b> Ácido Desoxirribonucleico.	<b>JNK</b> c-Jun NH2-terminal kinases.
<b>AKT</b> Protein Kinase B ( )	<b>MC</b> Malformaciones Congénitas.
<b>AMPK</b> Adenosine Monophosphate Kinase.	<b>MLC</b> Miosin Light Chain.
<b>ARN</b> Ácido Ribonucleico.	<b>MLCK</b> Miosin Light Chain Kinase.
<b>ATP</b> Trifosfato de Adenosina.	<b>mTOR</b> Mammal Target Of Rapamicine.
<b>cAMP</b> Cyclic Adenosin Monophosphate.	<b>NA</b> Noradrenalina.
<b>cDNA</b> Complementary Deoxyribonucleic Acid.	<b>NAT</b> Transportador de Noradrenalina.
<b>CE<sub>50</sub></b> Concentración efectiva 50.	<b>NIDDM</b> Diabetes Mellitus No Insulino Dependiente.
<b>CM</b> Calmodulina.	<b>NFκB</b> Nuclear Factor kappa B.
<b>CRC</b> Crías de Ratas Control.	<b>pA<sub>2</sub></b> Afinidad antagonista-receptor para pendiente próxima a la unidad.
<b>CRD</b> Crías de Ratas Diabéticas.	<b>pD<sub>2</sub></b> Sensibilidad al agonista (Expresado como -log CE <sub>50</sub> ).
<b>DAG</b> Diacil Glicerol.	<b>PI3K</b> Phosphatidyl Inositol 3-Kinase.
<b>DG</b> Diabetes Gestacional.	<b>PIP2</b> Phosphatidyl Inositol 4, 5 Biphosphate.
<b>DM</b> Diabetes Mellitus.	<b>PIP3</b> Phosphatidyl Inositol 3 Phosphate.
<b>DM1</b> Diabetes Mellitus tipo I.	<b>pK<sub>B</sub></b> Afinidad antagonista-receptor para pendiente diferente de la unidad.
<b>DM2</b> Diabetes Mellitus Tipo II.	<b>PKC</b> Protein Kinase C.
<b>E<sub>max</sub></b> Efecto máximo.	<b>PLC</b> Phospholipase C.
<b>GAD</b> Ácido Glutámico Descarboxilasa.	<b>pS</b> Phosphoserine.
<b>GFP</b> Green Fluorecent Protein.	<b>pY</b> Phosphotirosin.
<b>GLUT-2</b> Transportador de Glucosa 2.	<b>RI</b> Resistencia a la Insulina.
<b>GLUT-4</b> Transportador de Glucosa 4.	<b>SNA</b> Sistema Nervioso Autónomo.
<b>GRK</b> Protein-coupled Receptor Kinase.	<b>SNC</b> Sistema Nervioso Central.
<b>IDDM</b> Diabetes Mellitus Insulino Dependiente.	<b>SNP</b> Sistema Nervioso Periférico.
<b>IMC</b> Índice de Masa Corporal.	<b>TNFα</b> Factor de Necrosis Tumoral.
<b>IP<sub>3</sub></b> Inositol 1, 4, 5 Triphosphate.	
<b>IR</b> Insulin Receptor.	

## RESUMEN

La Diabetes Mellitus es una enfermedad que se caracteriza por la alta concentración de glucosa en la sangre (>120 mg/dl), lo cual desencadena, desde trastornos metabólicos hasta alteraciones en la funcionalidad de los vasos sanguíneos. Dicho padecimiento se presenta en varios tipos, entre los cuales figuran principalmente la Diabetes Mellitus Tipo I (DM1), de etiología inmune o idiopática, caracterizada por la ausencia de insulina, debido a la destrucción de las células beta del páncreas; la Diabetes Mellitus Tipo II (DM2), debida a la deficiente secreción y acción de la insulina y la Diabetes Gestacional (DG), una resistencia insulínica atribuida a los cambios fisiológicos propios del embarazo, lo cual afecta el crecimiento intrauterino del feto, causado por la exposición del embrión a un ambiente metabólico anormal, además de provocar un aumento en la incidencia de defectos morfogénicos en el neonato.

En el presente trabajo se estudió el efecto de la hiperglicemia durante el embarazo sobre las respuestas adrenérgicas alfa-1 en la aorta de crías de ratas. Se usaron dos grupos de ratas gestantes, un grupo diabético (estreptozotocina, 55 mg/kg i.p.) y un grupo control, de las cuales, en ambos casos, fueron separadas las crías al cumplir las cuatro semanas de edad. Se aisló la arteria aorta (torácica) de dichas crías y se hicieron curvas concentración- respuesta a fenilefrina usando antagonistas selectivos para los diferentes subtipos de receptores  $\alpha_1$ : RS100329 ( $\alpha_{1A}$ ), ciclazocina ( $\alpha_{1B}$ ) y BMY 7378 ( $\alpha_{1D}$ ).

Los resultados mostraron que en el nacimiento no hubo cambios en los pesos de las crías de ratas diabéticas (CRD) al compararlas con las de las ratas control (CRC). Sin embargo, al mes de edad, las CRD alcanzaron solo el 25%, aproximadamente, del peso de las CRC. Además, al realizar las curvas dosis-respuesta a la fenilefrina del tejido vascular aislado (aorta torácica), la respuesta máxima de las CRD fue del 40%, aproximadamente, con respecto a las CRC. El análisis de Schild mostró que no hubo cambios en la afinidad de los receptores adrenérgicos presentes en la aorta.

Nuestros resultados sugieren que la diabetes gestacional puede provocar alteraciones en los niveles de insulina y en la homeostasis de calcio en las crías de ratas diabéticas, y en consecuencia, el crecimiento hasta las cuatro semanas de edad se ve retardado, en tanto que las respuestas adrenérgicas disminuidas pueden deberse al peso menor de CRD y/o a una disminución en la población de receptores adrenérgicos alfa- 1.

## INTRODUCCION

### 1.- INSULINA

La insulina es una proteína pequeña: la humana tiene un peso molecular de 5808 D, se compone de dos cadenas de aminoácidos, unidas entre si por enlaces disulfuro. La insulina se sintetiza en las células beta del páncreas en varias etapas: la primera etapa es la producción de la proinsulina. La proinsulina es una molécula formada por una cadena proteínica de 81 aminoácidos, que es precursora de la insulina. El aparato de Golgi de las células beta del páncreas procesa la proinsulina convirtiéndola en insulina por la sustracción enzimática del péptido C, que es una estructura de 30 aminoácidos que conecta las cadenas A y B (de 21 y 30 aminoácidos, respectivamente). Finalmente la insulina es empaquetada en gránulos secretores.

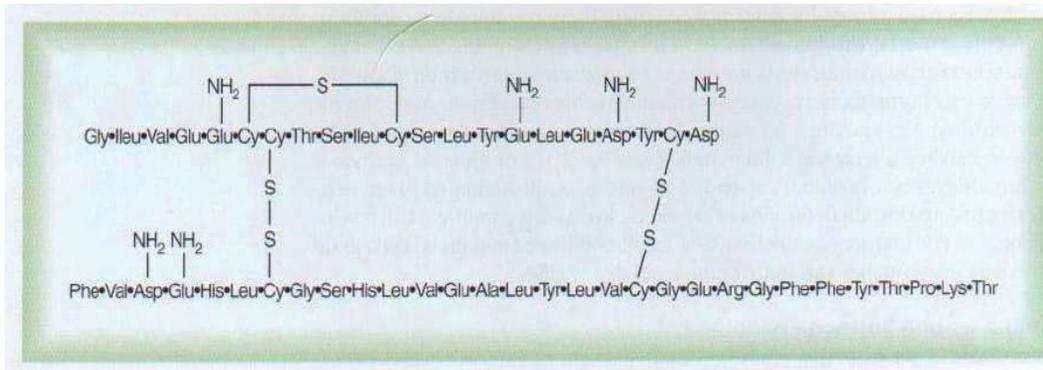


Figura No.1. Molécula de insulina humana.

La mayor parte de la insulina liberada hacia la sangre circula de forma no ligada: su semivida plasmática es de unos 6 minutos por término medio y desaparece de la circulación en unos 10 a 15 minutos. Con excepción de la parte de insulina que se une a los receptores de las células efectoras, el resto se degrada por efecto de la enzima insulinasa, sobre todo en el hígado y, en menor medida en los riñones y en los músculos y de forma muy ligera en casi todos los demás tejidos.

Para que la insulina inicie su función en las células efectoras, ha de unirse primero y activar una proteína receptora de membrana; dicho receptor

de insulina es un receptor tipo tirosin cinasa y consta de cuatro subunidades, enlazadas a través de puentes disulfuro: dos subunidades alfa, que se encuentran totalmente fuera de la membrana celular, y dos subunidades beta, que atraviesan la membrana y sobresalen en el interior del citoplasma. La insulina se une a las subunidades alfa de exterior de la célula pero, debido a su unión con las subunidades beta, las porciones de estas ultimas que se introducen en el interior de la célula se transfosforilan.

La transfosforilación de las cadenas beta del receptor promueve su actividad de tirosin cinasa que a su vez, fosforila a muchas otras enzimas, entre ellas un grupo llamado sustratos del receptor de insulina (IRS, de insulin receptor substrates). El efecto neto es la activación de estas enzimas y la inactivación de otras. Por este mecanismo la insulina dirige la maquinaria metabólica intracelular para provocar los efectos deseados sobre el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas.

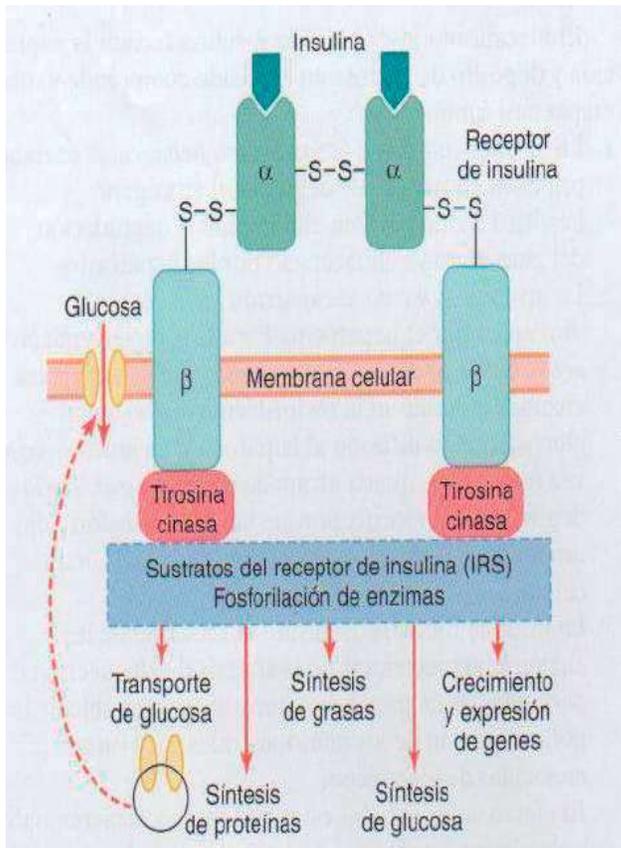


Figura No. 2. Esquema del receptor de insulina. La insulina se une a la subunidad  $\alpha$  del receptor, lo que determina la transfosforilación de la subunidad  $\beta$  del mismo. A su vez, esto induce una actividad tirosin cinasa. La actividad tirosin cinasa del receptor desencadena una cascada de fosforilación celular que aumenta o reduce la actividad de diversas enzimas, incluidos los sustratos del receptor de insulina (IRS), que activarán a su vez a otros efectores hasta promover la translocación en la membrana plasmática de los transportadores de glucosa (GLUT 4) y así facilitar la entrada de dicho azúcar en el interior de la célula.

Los efectos finales de la estimulación insulínica son los siguientes:

- 1.- Pocos segundos después de la unión de la insulina a sus receptores de membrana, se produce un notable incremento de la captación de glucosa por las membranas de casi el 80 % de las células, sobre todo de las células musculares y adiposas, pero no de la mayoría de las neuronas encefálicas.
- 2.- La membrana celular se hace mas permeable para muchos aminoácidos y para los iones potasio y fosfato cuyo transporte al interior de la célula se incrementa.
- 3.- En los 10 a 15 minutos siguientes se observan efectos más lentos que cambian la actividad de muchas más enzimas metabólicas intracelulares. Estos efectos se deben, sobre todo, a una variación de la fosforilación enzimática.
- 4.- Se tiene efectos mucho más lentos, que se deben a cambios en la velocidad de la traducción de algunos ARN mensajeros dentro de los ribosomas para dar lugar a nuevas proteínas e incluso a variaciones de las velocidades de transcripción del ADN del núcleo celular.

### **1.1 Secreción de insulina**

La insulina se almacena en las células beta en gránulos secretorios, que se preparan para liberarla en la circulación sanguínea, en respuesta al estímulo de una concentración creciente de glucosa en sangre. Un páncreas funcionando normalmente puede fabricar y liberar diariamente de 40 a 50 unidades de insulina. Además, tiene varios cientos de unidades almacenadas y disponibles para ser segregadas cuando se necesitan.

Las células beta poseen un gran numero de transportadores (GLUT-2), gracias a los cuales la entrada de glucosa en ellas es proporcional a su concentración en la sangre dentro de límites fisiológicos. Una vez en el interior de las células, la glucocinasa fosforila a la glucosa y la convierte en glucosa-6-fosfato. A continuación la oxidación de glucosa-6-fosfato produce trifosfato de adenosín (ATP), que inhibe los canales de potasio sensibles al ATP de la célula.

El cierre de los canales de potasio despolariza la membrana celular, con lo que se abren los canales de calcio dependientes de voltaje, con la consiguiente entrada de calcio en la célula. El calcio estimula la fusión de vesículas que contienen insulina con la membrana celular y la secreción de la hormona al líquido extracelular mediante exocitosis. Otros nutrientes, hormonas como el glucagón y el péptido inhibidor gástrico; pueden metabolizarse en las células beta incrementando los niveles de ATP y estimulando la secreción de insulina o bien aumentar la concentración intracelular de calcio a través de otras vías de señalización y potenciar el efecto de la glucosa.

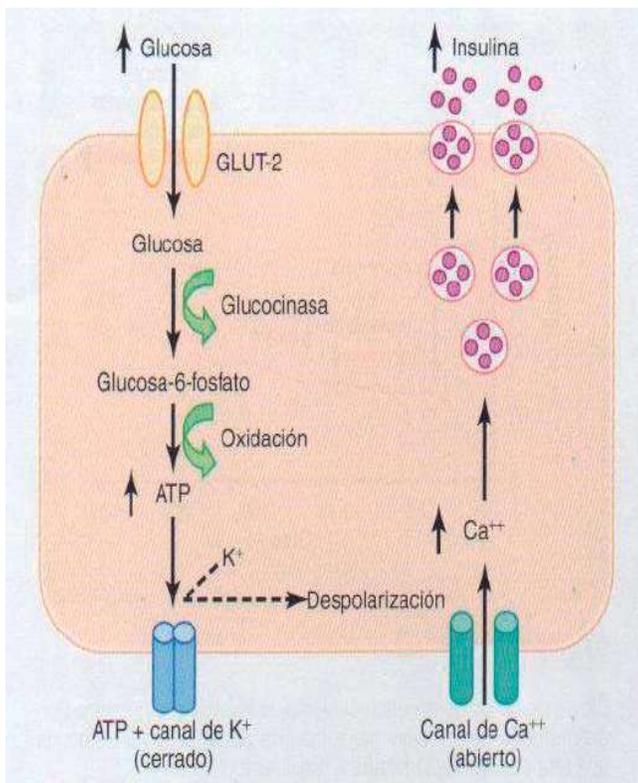


Figura No. 3. Mecanismos básicos de la secreción de insulina en las células beta del páncreas mediada por glucosa. La glucosa entra a la célula por medio de los GLUT-2, una vez dentro es oxidada produciéndose con esto ATP, el cual a su vez provoca el cierre de los canales de potasio sensibles a dicho nucleótido, provocando una despolarización de la membrana favoreciéndose la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje, el calcio estimula la fusión de vesículas que contienen insulina a la membrana plasmática, liberándose de esta manera al líquido extracelular.

Otros factores que estimulan la secreción de insulina son los aminoácidos, principalmente arginina y lisina, ya que si se administran al mismo tiempo en que se eleva la glicemia, la secreción de insulina inducida por la glucosa llegara a duplicarse en presencia de un exceso de aminoácidos.

Algunas hormonas gastrointestinales importantes, como la gastrina, la secretina, la colecistocinina y el péptido inhibidor gástrico, aumentan la secreción de insulina de forma moderada. Otras hormonas que estimulan directamente la secreción de insulina o potencian su estímulo secretor por parte de la glucosa son; el glucagón, la hormona del crecimiento, el cortisol, y en menor medida la progesterona y los estrógenos.

## **2.- DIABETES MELLITUS.**

### **2.1 Definición:**

El termino Diabetes Mellitus (DM) describe un desorden metabólico de etiología múltiple, caracterizado por hiperglicemia crónica con alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas, resultantes de defectos en la secreción o la acción de la insulina, o ambas. Los efectos de la DM incluyen daños a largo plazo, la disfunción y falla de varios órganos. Este padecimiento puede presentar síntomas característicos como polidipsia (necesidad de tomar agua), poliuria (aumento en la excreción urinaria), polifagia (aumento del apetito), visión borrosa y pérdida de peso. En sus formas más severas, se puede desarrollar estupor, conducir a estado de coma y, en ausencia de un tratamiento efectivo, a la muerte. A menudo los síntomas no son severos, o están ausentes, y consecuentemente la hiperglicemia es capaz de causar cambios patológicos y fisiológicos, que pueden estar presentes mucho tiempo antes de ser diagnosticada la enfermedad. Los efectos a largo plazo de la DM incluyen: desarrollo progresivo de complicaciones específicas de retinopatía, con ceguera potencial, nefropatía, que puede conducir a falla renal y/o neuropatía con riesgo de úlceras en los pies, amputación, y disfunción autonómica, incluyendo disfunción sexual. Las personas con diabetes tienen un riesgo incrementado de desarrollar padecimientos cardiovasculares y cerebro vasculares.

En el desarrollo de la diabetes están involucrados distintos procesos patogénicos. Estos incluyen aquellos en los cuales se destruyen las células beta del páncreas, teniendo como consecuencia una deficiencia de insulina; y otras que resultan en resistencia a la acción de dicha hormona. Las anormalidades en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas son atribuidas a la deficiente acción de la insulina en sus órganos blanco, resultante de la insensibilidad o la carencia de la misma.

## **2.2 Clasificación:**

### **2.2.1 Diabetes Mellitus Insulino Dependiente (IDDM), DM 1 o tipo 1.**

La destrucción de células beta conduce a la dependencia total de insulina exógena para prevenir el desarrollo de cetoacidosis, coma o la muerte. Constituye del 3 al 5% de todos los casos reportados de este padecimiento.

Las causas de este tipo de diabetes pueden ser de carácter idiopático o autoinmune. Para el desarrollo de la DM1 tienen importancia tanto factores genéticos como ambientales; aunque los factores genéticos están bien caracterizados y se relacionan con los genes que controlan la respuesta inmunitaria, se han detectado auto anticuerpos frente a proteínas en la membrana de las células beta en etapas tempranas de la enfermedad o antes de que empiece el padecimiento; también se han descubierto anticuerpos contra la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD), esta enzima es similar a una proteína del virus Coxsackie B, la cual se dirige a una fosfatasa presente en el interior de las células beta. También se conoce la presencia de anticuerpos contra la propia insulina. Aunque es importante señalar que aun se desconoce el desencadenante principal de la presencia inmunitaria que conduce a esta enfermedad. En algunos individuos con esta forma clínica de diabetes, particularmente No caucásicos, no hay evidencia de un desorden autoinmune demostrable, esto es clasificado como "Tipo 1 Idiopático". El padecimiento puede afectar a personas de cualquier edad, pero frecuentemente ocurre en niños o adultos jóvenes. La DM1 es una de las condiciones endocrinas y metabólicas más comunes en la infancia.

### **2.2.2 Diabetes Mellitus No Insulino Dependiente (NIDDM), DM2 o tipo 2.**

El tipo 2 es la forma más común de diabetes, comprendiendo el 95% del total de las personas con esta afección y ocurre en su mayoría en individuos obesos, asociados con hipertensión y dislipidemia. Esta forma de DM se caracteriza por desórdenes en la secreción y acción de la insulina, es el resultado de la interacción de factores tanto genéticos como ambientales.

La fisiopatología de la DM2 es multifactorial, pero se hacen evidentes tres defectos: disminución en la respuesta tisular a la acción de la insulina (resistencia a la insulina, RI), aumento en la producción hepática de glucosa y fallas de las células beta del páncreas para compensar la RI; por otro lado, también se ha reportado una disminución del 50% del volumen total de las células beta pancreáticas que se manifiesta con una secreción inadecuada de insulina.

El diagnóstico de este tipo de diabetes regularmente ocurre después de los cuarenta años, pero puede ocurrir antes, especialmente en poblaciones con alta prevalencia de diabetes.

#### 2.2.2.1 Perspectiva actual de la diabetes

En 1995 la prevalencia de Diabetes a nivel mundial fue de un 4% y se estima que aumentará a 5.4% para el año de 2025. Esta cifra es más alta en países industrializados que en aquellos en vías de desarrollo. Se estima que el número de adultos con diabetes en el mundo aumentará de 135 millones, registrados en 1995, a 300 millones para el año de 2025. Habrá un incremento del 42%, de 51 a 72 millones de diabéticos en países desarrollados, mientras que en los países en desarrollo este aumento será del 170%, es decir, de 84 millones registrados en 1995, a 228 millones para el año 2025. En países en vías de desarrollo la mayoría de la gente con diabetes se encuentra en un rango de edad de 45 a 64 años; en cambio en los países industrializados la mayor parte se encuentra por encima de los 65 años. Este patrón será más acentuado en el año 2025.

En la actualidad las enfermedades crónico degenerativas como la diabetes, representan un alarmante problema de salud a nivel mundial. En 2010 la India es el país con la mayoría de las personas con diabetes, con una cifra actual de 50.8 millones, seguido por China con 43.2 millones de diabéticos. Detrás de ellos, los Estados Unidos (26.8 millones), la Federación de Rusia (9.6 millones), Brasil (7.6 millones), Alemania (7.5 millones), Pakistán (7.1 millones), Japón (7.1 millones), Indonesia (7 millones) y México (6.8 millones).

### 2.2.3 Diabetes gestacional.

El embarazo normal es un estado de resistencia al efecto de la insulina, más evidente al final del segundo trimestre del mismo; el organismo de la madre se prepara almacenando nutrientes y en esta etapa la sensibilidad a la insulina es mayor; sin embargo, en la segunda mitad de la gestación hay una resistencia progresiva al efecto de la insulina, lo que causa una liberación de los nutrientes para que el feto tenga un desarrollo adecuado. En esta resistencia a la insulina participan numerosas sustancias producidas por la placenta lactógeno placentario, hormona placentaria de crecimiento, prolactina, hormona liberadora de corticotropina-cortisol, insulina, factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) y adipocitocinas ( leptina, resistina, visfatina, adiponectina) . Dichas sustancias disminuyen el efecto de la insulina a nivel intracelular por diversos mecanismos.

La diabetes gestacional es la alteración en el metabolismo de los carbohidratos que se detecta durante el embarazo, debido a una insuficiente adaptación a la insulino resistencia que se produce en la gestante. Es la complicación más común del embarazo y su frecuencia es variable según los distintos estudios, poblaciones y criterios diagnósticos utilizados. Su importancia radica en que aumenta el riesgo de diversas complicaciones obstétricas como son la macrosomía y problemas neonatales, entre otros.

A diferencia de los otros tipos de diabetes, la gestacional no es causada por la carencia de insulina, sino por los efectos de otras hormonas propias del embarazo en la insulina producida, así como defectos en la transducción de señales después de la unión al receptor insulínico.

### 2.2.3.1 Fisiopatología.

La insulino resistencia de la gestación normal es multifactorial, envolviendo la capacidad reducida de la insulina para fosforilar su receptor, la expresión disminuida de IRS-1 y los niveles aumentados de la subunidad p85- $\alpha$  de la enzima PI3K. Sin embargo en la diabetes gestacional hay cambios recíprocos e inversos en el grado de fosforilación de serina y tirosina del receptor de insulina y el IRS-1, que mas allá de inhibir la señalización, conduce a una translocación sustancialmente reducida de GLUT4 y disminuye el aprovechamiento de glucosa más que en la gestación normal. Las mujeres con historia de DG tienen evidencia de inflamación subclínica, así como un incremento de TNF- $\alpha$  y de p70S6K1 en músculo esquelético. La adiponectina, una hormona clave para la sensibilidad a insulina producida por el tejido adiposo es significativamente mas baja en mujeres con historia de DG y declina conforme avanza la gestación, sugiriendo que puede estar envuelta en la transición a la insulino resistencia.

En el tejido adiposo el factor de transcripción lipogénico PPAR- $\gamma$  disminuye en mujeres durante la gestación y puede cambiar genes de vías metabólicas para favorecer una lipólisis incrementada, acelerando la insulino resistencia por parte del tejido adiposo. Esto contribuye al gran incremento postprandial de los ácidos grasos libres y la producción elevada de glucosa hepática, resultando en una disponibilidad más grande de nutrientes para el feto de mujeres con DG. Así que, como una tormenta perfecta, las hormonas placentarias, la reducida secreción de adiponectina y el exceso de lipólisis conspiran para causar insulino resistencia severa en el hígado, músculo y tejido adiposo en la diabetes mellitus gestacional.

### 2.2.3.2 Alteraciones celulares y resistencia a la insulina

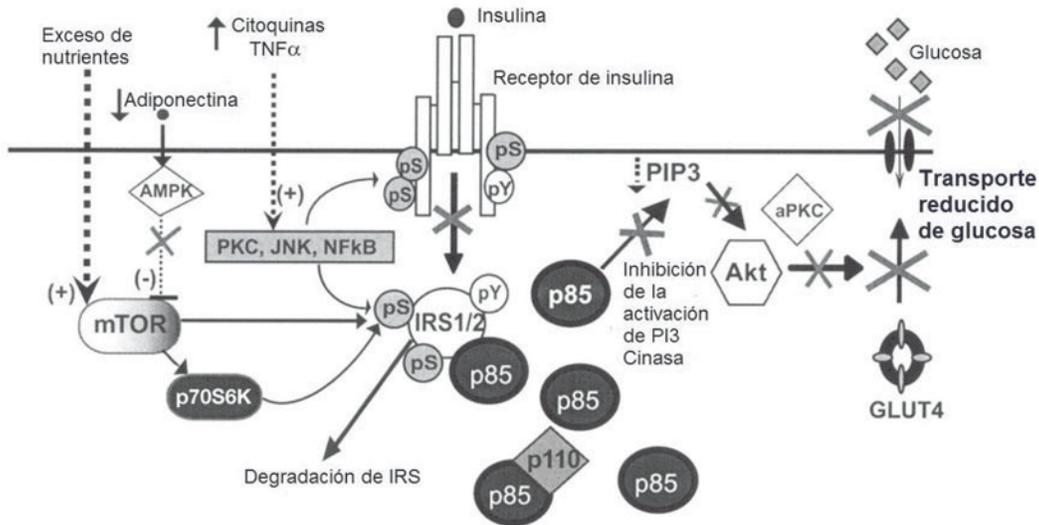


Fig. No. 4. Mecanismo propuesto para la insulino resistencia a nivel de señalización en la diabetes gestacional.

La vía para el transporte de glucosa por la insulina en el músculo envuelve la activación del receptor de insulina (IR), el cual acopla IRS-1 e IRS-2 y fosforila esas proteínas en sus residuos de tirosina. El IRS-1 recluta la subunidad reguladora  $p85\alpha$  de la PI3K ( $p85$ - $p110$ ) resultando en la fosforilación de fosfolípidos unidos a membrana en la posición 3 (fosfatidil inositol). La producción de PIP3 es requerida para la activación de AKT y la señalización para la translocación de GLUT 4. En mujeres con diabetes gestacional se observa una fosforilación de tirosina defectuosa en IR y en IRS-1 y está asociada con una fosforilación inhibitoria incrementada de serina y una súbita pérdida de los niveles proteicos de IRS-1 comparada con mujeres no diabéticas obesas. La incrementada fosforilación de serina del IR y de IRS-1 ha sido asociada a la actividad incrementada de JNK y PKC, enzimas activadas por citoquinas inflamatorias, tales como  $TNF\alpha$ . Alternativamente el incremento en la fosforilación de serina en IRS-1 puede ser atribuida a una aumentada activación de la vía de mTOR- $p70S6$ . mTOR,  $p70S6K1$  y AMPK actúan como sensores de nutrientes y energía dentro de la célula. Una fosforilación basal más alta de  $p70S6K1$  fue observada en DG contra mujeres control y puede justificar el incremento en la fosforilación basal de serina de IRS-1 y conducir a

su degradación. AMPK, un blanco para la señalización de adiponectina es regulador negativo de mTOR; en mujeres con DG los niveles de adiponectina son más bajos, lo cual puede contribuir a la activación incrementada de la vía de mTOR. Tanto en mujeres gestantes normales como en mujeres con DG, los niveles de p85 $\alpha$  están elevados antes del parto, pero retornan a la normalidad después de este. El exceso de p85 $\alpha$  actúa como una molécula señalizadora dominante negativa por el bloqueo de la asociación de PI3K con IRS-1 y de ese modo atenúa la activación de la primera durante el embarazo. Tanto la pérdida de la activación de PI3K por el incremento de p85 $\alpha$ , así como una incrementada fosforilación de serina en IRS-1 conducen a reducir la translocación de GLUT 4 a la membrana plasmática, resultando en un aprovechamiento bajo de glucosa en el músculo esquelético (Figura No.4)

### **2.2.3.3 Factores de riesgo.**

Entre los factores que pueden ser determinantes para el desarrollo de la diabetes gestacional se encuentran:

Edad materna mayor a 30 años. Historia obstétrica pasada (pasado de diabetes gestacional, enfermedad hipertensiva específica del embarazo, abortos a repetición, nati y neomortalidad fetal, macrosomía y malformaciones fetales). Uso de medicamentos con acción hiperglucemiante (corticoides y otros). Obesidad central IMC >30. Historia familiar de diabetes especialmente entre los familiares de primer grado. Se puede agregar como factores de riesgo el hecho de pertenecer a determinados grupos étnicos y el embarazo múltiple.

### **2.2.3.4 Complicaciones de la Diabetes Gestacional.**

Maternas:

- Descompensación metabólica aguda: cetoacidosis diabética, siendo mortal para la madre y el feto.
- Infecciones urinarias recidivantes que agravan la evolución de la diabetes.

- Preclampsia/eclampsia, que aumenta el riesgo de morbimortalidad materno/ fetal.
- DG en embarazos posteriores y diabetes mellitus tipo 2: por lo general la diabetes gestacional desaparece después del embarazo, pero una vez que se ha tenido DG hay posibilidad de que dos de cada tres mujeres presente nuevamente esta enfermedad en futuros embarazos.
- Hasta un 30 a 40% de las mujeres con diabetes gestacional desarrollan una diabetes mellitus manifiesta dentro de 5 a 10 años. El riesgo puede incrementar si la obesidad está presente. Datos recientes apuntan a un mayor riesgo de hipertensión, dislipidemia, y enfermedad cardiovascular.

#### Fetales:

- Macrosomía: Peso excesivo para la edad gestacional, constituye el atributo más característico de la diabetes gestacional, el riesgo de que se presente es de un 17%. Se le ha considerado como una consecuencia del hiperinsulinismo fetal en respuesta a las altas concentraciones de glucosa materno/fetal. Existen complicaciones relativas a la macrosomía fetal, llevando a un aumento de la tasa de partos por cesárea, mayor riesgo de tocotraumatismos y aumento de la neomortalidad. Malformaciones congénitas pueden ocurrir, ya que no siempre se trata de diabetes que aparece por primera vez en el embarazo.
- Problemas respiratorios: Enfermedad de la membrana hialina por inmadurez pulmonar, ya que el hiperinsulinismo fetal, interfiere en la acción madurativa de las catecolaminas y corticoides endógenos. Se presenta en un 4.8% de los casos.
- Hiperbilirrubinemia: es significativamente más frecuente e intensa, con un riesgo del 5.6%, tanto por la prematuridad como por la policitemia secundaria a una mayor secreción de eritropoyetina por hipoxias leves en úteros.

- Hipocalcemia: se presenta a los dos o tres días del nacimiento, cuya causa es la reducción transitoria de la secreción de Paratohormona. Su incidencia es muy alta, de alrededor de un 50%.
- Hipoglucemia: es frecuente, se presenta hasta en un 20% de los casos, especialmente en los neonatos macrosómicos.
- Malformaciones congénitas de 5 a 12% o muerte neonatal, incrementando el riesgo hasta 5 veces más.

### **2.2.3.5 Epidemiología de la Diabetes Gestacional**

La diabetes gestacional afecta a más de 10% de las embarazadas mayores de 25 años. Este padecimiento representa el 90% de los casos de diabetes asociada al embarazo.

La prevalencia de la DG a nivel mundial oscila entre 2 a 9%; en estudios realizados en México, corresponde al 4.9% encontrado en una población con derecho al seguro social y hasta 11% en poblaciones abiertas, dependiendo del criterio empleado para el diagnóstico.

La morbilidad y la mortalidad perinatal en las diabéticas se han convertido en un evento menos frecuente que en el pasado, debido a la implementación de programas educativos de detección precoz, tratamiento del trastorno metabólico y a la vigilancia fetal anteparto.

Las grandes malformaciones congénitas (MC) siguen siendo la principal causa de mortalidad y morbilidad grave en lactantes hijos de mujeres con diabetes gestacional. La asociación de DM materna con anomalías congénitas es bien conocida, especialmente las de los sistemas cardiovascular, sistema nervioso central (SNC), genitourinario y esquelético.

En nuestro país la conducta y tratamiento de estas pacientes está descrito en las normas nacionales y han posibilitado la disminución de las complicaciones usuales en las gestantes diabéticas.

### 3.- REGULACIÓN DEL TONO VASCULAR

La función de la circulación sanguínea es la de satisfacer las necesidades del organismo: transportar nutrientes, desechar sustancias, conducir hormonas de una parte del cuerpo a otra y en general, mantener un ambiente apropiado en todos los líquidos tisulares para una supervivencia y función óptima de las células. Los vasos sanguíneos constituyen un sistema cerrado de canales que transportan la sangre desde el corazón hasta los tejidos y de regreso al corazón.

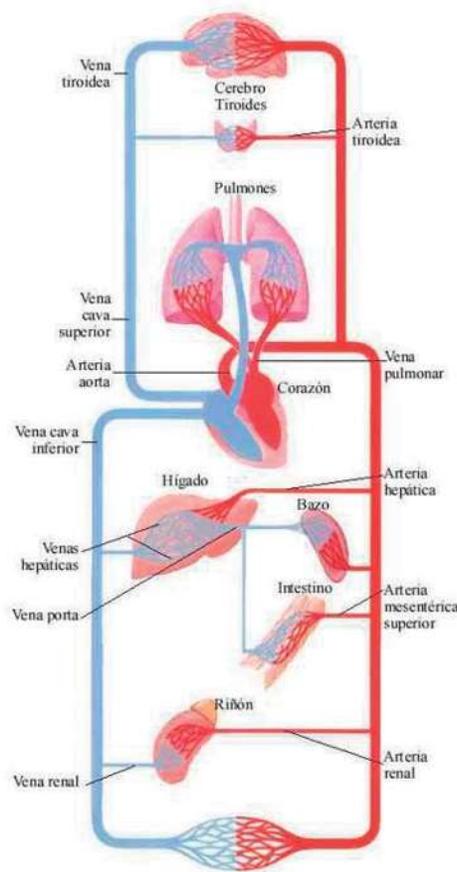


Figura No. 5. Representación de la circulación y sus principales vasos sanguíneos.

Las arterias son vasos gruesos y elásticos que nacen en los ventrículos del corazón y aportan sangre a los órganos del cuerpo, por ellas circula la sangre oxigenada a una presión adecuada debido a la elasticidad de sus paredes.

Las arterias contribuyen a mantener la homeostasis del sistema cardiovascular, la cual se regula en parte por el endotelio localizado en el interior de estos vasos sanguíneos. Este endotelio participa de manera importante en la regulación del tono vascular mediante la secreción y liberación de diversas sustancias vasoactivas y moléculas de adhesión; por otra parte, las paredes de los vasos realizan importantes funciones, que conducen a mantener un equilibrio adecuado de la contracción de las arterias. Este proceso es regulado por el sistema nervioso a través de los receptores adrenérgicos, principalmente del tipo  $\alpha_1$  localizados en células del músculo liso de las arterias.

En el control del tono vascular participa el sistema nervioso, el cual se divide en Sistema Nervioso Central (SNC) y el Sistema Nervioso Periférico (SNP), éste último a su vez se subdivide en Sistema Nervioso Autónomo y Somático. El Sistema Nervioso Autónomo (SNA) se denomina también visceral o involuntario, entre los tejidos que inerva se encuentra el músculo liso de los vasos sanguíneos.

El SNA está constituido por dos grandes divisiones: la vía simpática y la vía parasimpática. El sistema nervioso simpático desempeña un papel principal en la regulación del tono vascular mediante efectos selectivos y específicos, mientras el sistema parasimpático sólo desempeña un papel menor en la regulación del tono vascular.

El neurotransmisor de todas las fibras parasimpáticas y de algunas simpáticas es la acetilcolina (ACh), mientras que todas las fibras simpáticas liberan el neurotransmisor Noradrenalina (NA), mediante el cual se lleva a cabo la regulación del tono vascular.

Dicho neurotransmisor se une a receptores que median su respuesta, este grupo de receptores heterogéneos son llamados receptores adrenérgicos.

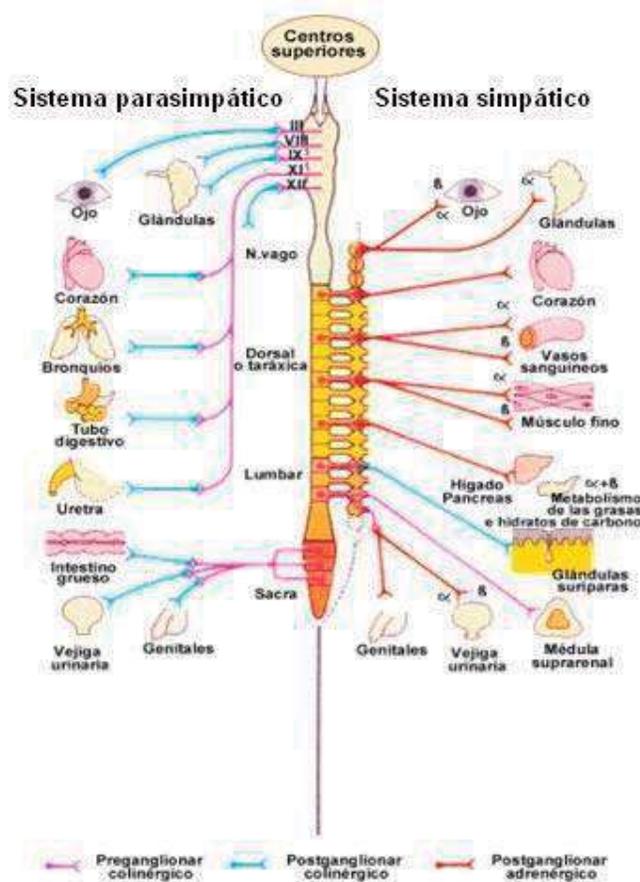


Figura No. 6. Inervaciones de las vías simpática y parasimpática

### 3.1 Catecolaminas

La adrenalina y la noradrenalina pertenecen a un grupo llamado catecolaminas, las cuales se componen de un grupo aromático 3,4, dihidroxifenilo o catecol y una cadena lateral etilamino.

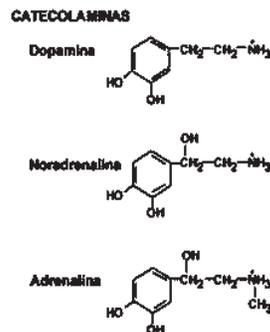


Figura No. 7. Estructura química de las catecolaminas.

Estas catecolaminas son sintetizadas a partir del aminoácido tirosina que por acción de la enzima tirosin hidroxilasa se transforma en dopa, esta a su vez es descarboxilada por la enzima dopa descarboxilasa, obteniéndose dopamina; la dopamina es captada y convertida en noradrenalina por la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa, en la médula suprarrenal y en ciertas áreas del cerebro la noradrenalina es metilada para transformarse en adrenalina por acción de fenil etanolamina-N-metil-transferasa. (Goodman & Gilman, 2007).

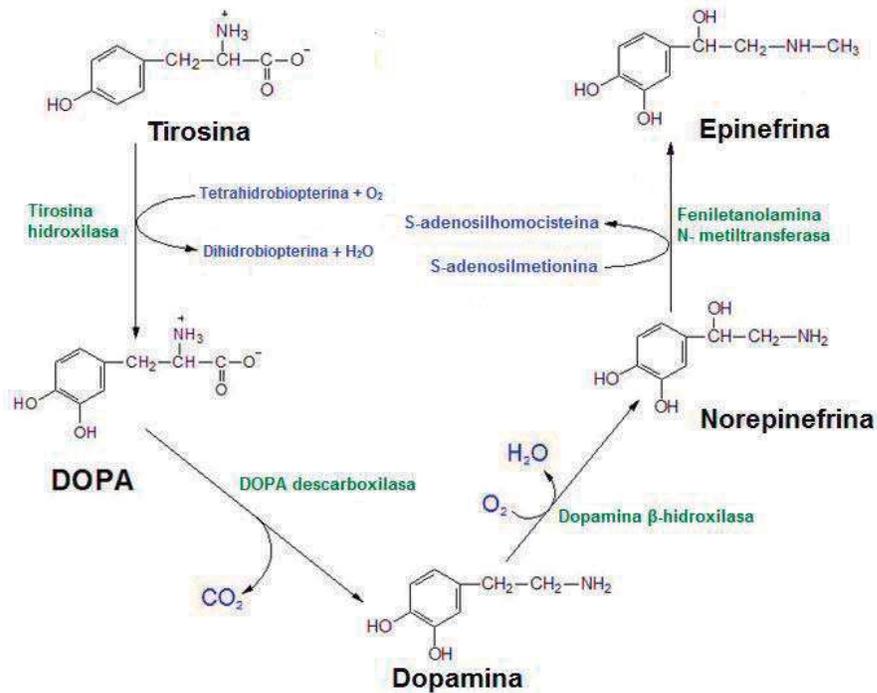


Figura No. 8. Síntesis de las diferentes catecolaminas.

Al igual que otros neurotransmisores, las catecolaminas son almacenadas en vesículas acumuladas en las varicosidades nerviosas. La liberación de la noradrenalina de las neuronas simpáticas es un proceso dependiente de  $Ca^{++}$ , ya que estas neuronas tienen canales dependientes de voltaje, los cuales se abren en presencia de un potencial de acción, lo que permite la entrada del ión, y se pone en marcha el proceso de acoplamiento excitación-exocitosis vesicular.

La fusión de vesículas con la superficie de membrana causa la expulsión de noradrenalina, cotransmisores y dopamina  $\beta$  hidroxilasa. Luego de la liberación, la noradrenalina se difunde fuera de la hendidura o se transporta en el citoplasma de la terminal por el transportador de noradrenalina (NAT). (Katzung,2007).

La noradrenalina es una hormona vasoconstrictora especialmente potente; la adrenalina es menos potente y en algunos tejidos provoca incluso vasodilatación leve.

Cuando se estimula el Sistema Nervioso Simpático en el cuerpo durante el estrés o el ejercicio, las terminaciones nerviosas simpáticas de cada tejido liberan noradrenalina, que excita al corazón y contrae las venas y las arteriolas. Además, los nervios simpáticos de la médula suprarrenal provocan la secreción de adrenalina y noradrenalina en la sangre. Estas hormonas circulan entonces por todo el cuerpo y provocan casi los mismos efectos en la circulación que la estimulación simpática directa, con lo que se consigue un sistema de control doble: 1) estimulación nerviosa directa y 2) efectos indirectos de la noradrenalina y/o de la adrenalina en la sangre circulante (Guyton C.A., 2006).

#### 4.- RECEPTORES ADRENERGICOS

Las catecolaminas endógenas noradrenalina y adrenalina tienen efectos muy diversos en los tejidos sobre los que actúan, dicho fenómeno depende de las características de los receptores que median sus respuestas.

Este grupo de receptores heterogéneos, son los receptores adrenérgicos, los cuales consisten de cadenas simples de polipéptidos, de siete dominios transmembranales, acoplados a proteínas G triméricas. Cada proteína G es un heterotrímero compuesto de subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , y se clasifican sobre la base de sus subunidades  $\alpha$  características. Entre las proteínas G de particular importancia para el funcionamiento de los receptores adrenérgicos se incluyen la  $G_s$ , que estimula la adenilil ciclasa; la  $G_i$ , que inhibe la adenilil ciclasa; la  $G_q$ , que activan a la fosfolipasa C y los  $G_{12/13}$  que activan a una proteína G pequeña de la familia de Rho.

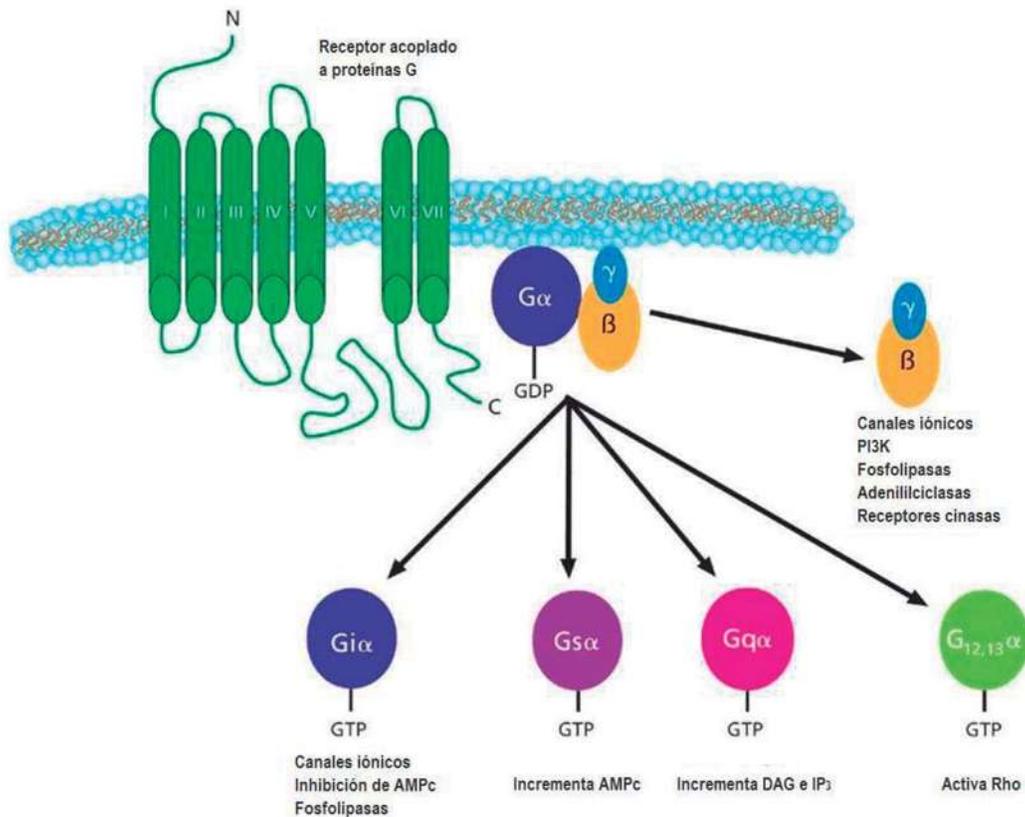


Figura No. 9. Estructura de los receptores adrenérgicos y los tipos de proteínas G acopladas a ellos.

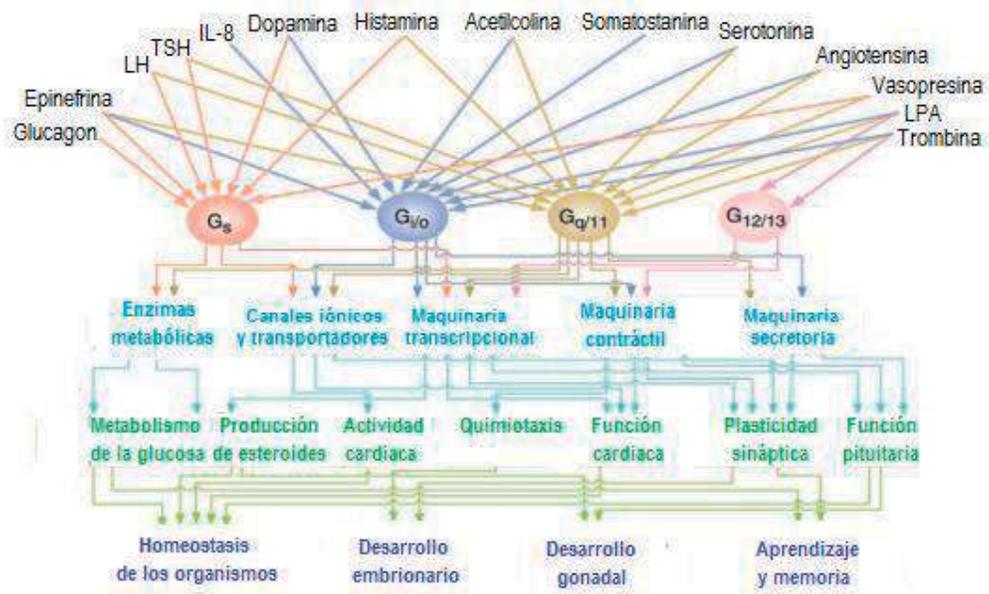


Figura No. 10. Ligandos y funciones que desempeñan las subunidades G $\alpha$  de las proteínas G triméricas

#### 4.1 Tipos de receptores adrenérgicos

En 1948, Raymond Ahlquist analizó una cantidad considerable de observaciones antes de proponer que las catecolaminas actúan mediante dos receptores principales, a los que denominó  $\alpha$  y  $\beta$ . La hipótesis de Ahlquist fue confirmada de manera contundente por el desarrollo de fármacos que antagonizan selectivamente los receptores  $\beta$ , pero no los receptores  $\alpha$ . La evidencia más reciente sugiere que los receptores  $\alpha$  comprenden dos grandes familias; por eso, en la actualidad, parece apropiado clasificar a los receptores adrenérgicos en tres grupos principales denominados  $\beta$ ,  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ . Cada uno de estos grupos de receptores también tiene tres subtipos. El interés que se tiene hacia esta familia de receptores radica en su importante papel en el control de la presión sanguínea, lo que abre un área de potencial desarrollo terapéutico. (Psiascik, et al., 1990; Bylund et al., 1994, Minneman y Esbenshade 1994).

## 4.2 Receptores $\beta$ adrenérgicos

Poco después de que se demostró la existencia de receptores  $\alpha$  y  $\beta$  separados, se encontró que existen por lo menos dos subtipos de receptores  $\beta$ , designados por  $\beta_1$  y  $\beta_2$ . Subsecuentemente, se identificó al receptor  $\beta_3$  como un nuevo y distinto tercer tipo de receptor  $\beta$  adrenérgico.

La activación de los tres subtipos de receptores  $\beta$  da como resultado activación de la adenilil ciclasa y aumento en la conversión de ATP en cAMP. La activación de la enzima ciclasa es mediada por la proteína  $G_s$  estimulante del acoplamiento. El cAMP es el principal segundo mensajero en la activación de receptores  $\beta$ ; por ejemplo, en el hígado de muchas especies, la activación de receptores aumenta la síntesis de cAMP, lo que conduce a una serie de acontecimientos que culminan en la activación de la glucógeno fosforilasa. En el corazón, la activación de los receptores  $\beta$  aumenta la afluencia de calcio a través de la membrana celular y su secuestro en el interior de la célula. La activación de receptores  $\beta$  también promueve la relajación del músculo liso.

## 4.3 Receptores $\alpha$ adrenérgicos

Estos receptores se identificaron originalmente con fármacos antagonistas que distinguían entre dos grupos de receptores  $\alpha$ :  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ .

La hipótesis de que hay subtipos de receptores  $\alpha_2$  surgió en experimentos farmacológicos de clonación molecular. Ahora se sabe que existen tres subtipos de receptores  $\alpha_2$ , denominados  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  y  $\alpha_{2C}$ , productos de distintos genes. Los receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos activan la vía de proteínas cinasas activadas por mitógeno en muchas células (Zhong y Minneman, 1999). Los receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos están acoplados a la inhibición de la adenilil ciclasa por medio de la proteína  $G_i$  (inhibitoria), estos activan canales de  $K^+$  dependientes de proteína G, lo que da por resultado hiperpolarización de la membrana, también pueden inhibir canales de  $Ca^{2+}$  dependiente de voltaje, inhibiendo la liberación de neurotransmisor.

Otros sistemas relacionados a la activación de estos receptores incluyen aumento del intercambio de  $\text{Na}^+$  y  $\text{H}^+$ , estimulación de la actividad de la fosfolipasa C y movilización del ácido araquidónico, incremento de la hidrólisis de polifosfoinosítidos e incremento de la disponibilidad de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular, favoreciendo con ello la contracción del músculo liso.

El concepto de subtipos dentro del grupo  $\alpha_1$  surgió de manera similar en experimentos farmacológicos que indicaban formas complejas de las curvas de respuesta comparadas con dosis de agonista para la contracción de músculo liso, así como diferencias de afinidades por el antagonista en la inhibición de respuestas contráctiles en varios tejidos. Con base a su afinidad reversible, estos experimentos demostraron la existencia de dos subtipos de receptores  $\alpha_1$  que lograron diferenciarse con múltiples fármacos y compuestos experimentales. Mediante técnicas de clonación molecular se identificó un tercer subtipo del receptor  $\alpha_1$ . Estos receptores  $\alpha_1$  se denominan  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  y  $\alpha_{1D}$ .

### **4.3.1 Receptores $\alpha_1$ adrenérgicos**

#### 4.3.1.1 Estructura

Los receptores  $\alpha_1$  son proteínas hidrófobas que abarcan todo el espesor de la membrana plasmática con siete segmentos  $\alpha$  hélice interconectados por asas hidrofílicas, alternadas de manera extra e intracelular, el extremo amino terminal se localiza intracelularmente.

Como miembros de la familia de receptores acoplados a proteínas G, consisten de una sola cadena polipeptídica compuesta de 429 a 561 aminoácidos. Cada receptor contiene porciones de 20 a 28 aminoácidos hidrofóbicos que representan regiones transmembranales. Las regiones transmembranales están unidas por tres lazos extra e intracelulares, son similares en longitud entre los tres subtipos. El primero y segundo lazos extracelulares contienen un solo residuo de cisteína, el cual es altamente conservado en todos los receptores acoplados a proteínas G.

El grupo amino terminal tiene localización extracelular y tiene varios sitios consenso para la glicosilación, aunque la glucosilación se ha demostrado únicamente para el subtipo  $\alpha_{1B}$ , es posible que al menos el  $\alpha_{1D}$  sea también glicosilado. La longitud del amino terminal varía considerablemente en cada subtipo, el  $\alpha_{1D}$  está constituido por 90 aminoácidos aproximadamente, le sigue el  $\alpha_{1B}$  con 42 aminoácidos y, el más pequeño es el del  $\alpha_{1A}$  con 25 aminoácidos.

El grupo carboxilo terminal está localizado intracelularmente y contiene sitios consenso para fosforilación con proteínas kinasas serina/treonina y la modificación de proteínas en estos sitios está involucrada en la desensibilización del receptor. Las regiones del carboxilo terminal muestran poca homología entre los subtipos, sin embargo; estas regiones contienen residuos conservados de cisteína, aproximadamente 16 aminoácidos al final del séptimo dominio transmembranal, al igual que otros receptores acoplados a proteínas G.

#### 4.3.1.2 Mecanismo de transducción de señales

Un sistema de transducción de señales es modular y está formado por tres componentes proteicos: un receptor, un transductor y un efector. El receptor reconoce y une una hormona específica (primer mensajero), en el caso de los receptores adrenérgicos, el transductor es una proteína G, a la cual se le da este nombre por su elevada afinidad por los nucleótidos de guanina. La interacción del complejo hormona-receptor con el transductor estimula una reacción de intercambio, este intercambio activa la proteína G, que interactúa con el efector, esta interacción estimula la enzima que cataliza la conversión del segundo mensajero intracelular (Mathews y Van Holden, 1998).

Los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos pertenecen a la gran familia de receptores acoplados a proteínas  $G_{q/11}$ , los cuales inician señales de activación por la fosfolipasa C, dependiente de la hidrólisis de fosfatidil inositol 4,5 bifosfato ( $PIP_2$ ). Esta enzima genera los segundos mensajeros, inositol -1, 4, 5-trifosfato ( $IP_3$ ), el cual libera el  $Ca^{2+}$  almacenado intracelularmente (retículo endoplásmico). Después, cuatro iones de  $Ca^{2+}$  se unen a la calmodulina (CM), una proteína ubicua con sitios de unión a  $Ca^{2+}$ .

Este proceso ocasiona la formación del complejo  $\text{Ca}^{2+}$  - CM, el cual se une a la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK), formando el complejo  $\text{Ca}^{2+}$  - CM - MLCK, que es la forma activa de esta enzima y cataliza la fosforilación de la subunidad de 20,000 Daltones de la cadena ligera de la miosina (MLC), la cual estimula la interacción entre filamentos de actina-miosina, causando la contracción del músculo liso (Marín, 1993). El otro segundo mensajero, el Diacilglicerol, el cual sinergiza con el calcio activando proteína cinasa C que modula la actividad de muchas vías de señalización entre las cuales se encuentra la expresión de genes para la motilidad celular y la generación de segundos mensajeros lipídicos (Pollard T.D., 2004).

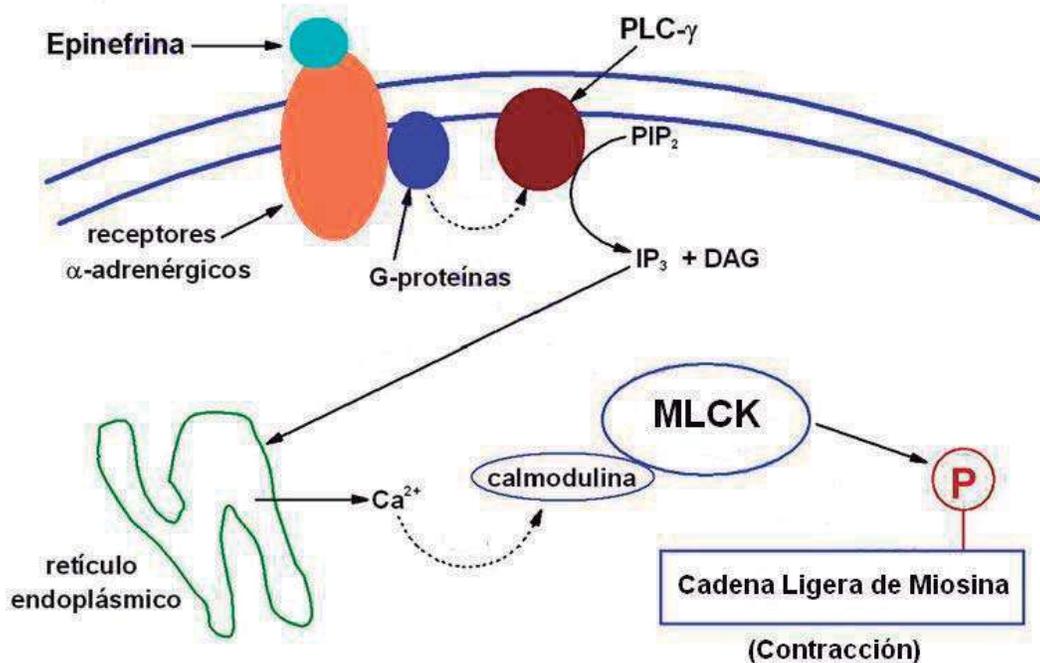


Figura No. 11. Mecanismo de transducción de señales de los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$ .

Como puede apreciarse, los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos pueden activar una variedad de vías de proteínas cinasas activadas por mitógeno para regular varias funciones celulares. El mecanismo involucrado en esta regulación probablemente depende del medio ambiente particular y el fenotipo de cada célula. Las múltiples vías pueden interactuar una con otra de modo inesperado (Zhong y Minneman, 1999).

#### 4.3.1.3 Regulación de los receptores adrenérgicos.

Las respuestas mediadas por los receptores adrenérgicos no son fijas ni estáticas. Su cantidad y función en la superficie celular y sus respuestas pueden regularse por las propias catecolaminas, otras hormonas y fármacos, la edad y diferentes tipos de enfermedades. Estos cambios pueden modificar la magnitud de la respuesta fisiológica de los tejidos a las catecolaminas. Uno de los ejemplos mejor estudiados de la regulación de receptores es la desensibilización de receptores adrenérgicos que puede presentarse después de la exposición a las catecolaminas y otros simpaticomiméticos. Después de que una célula o tejido se expuso durante cierto tiempo a un agonista, dicho tejido con frecuencia responde menos a una estimulación ulterior por dicha sustancia. También se han empleado otros términos, como tolerancia, estado refractario y taquifilaxis para describir la desensibilización.

Muchos mecanismos contribuyen a la desensibilización. Operando a niveles transcripcional, translocal y proteínico, algunos mecanismos funcionan con relativa lentitud, en el curso de horas o días, mientras que otros ocurren rápidamente, en minutos. La rápida modulación de la función del receptor en células desensibilizadas puede implicar una modificación covalente, especialmente por fosforilación de residuos de aminoácidos específicos, asociación de los receptores con otras proteínas o cambios en la localización subcelular de esos receptores.

Existen dos categorías principales de desensibilización de respuestas mediadas por receptores acoplados a proteínas G. La desensibilización homóloga se refiere a la pérdida de la respuesta exclusiva de los receptores que han sido expuestos a activación repetida o sostenida a través de un ligando. La desensibilización heteróloga se refiere a la pérdida de respuesta de algunos receptores de superficie celular que no han sido activados directamente por el agonista en cuestión.

Un mecanismo principal de desensibilización que se presenta rápidamente implica la fosforilación de receptores de miembros de la familia del receptor de cinasa acoplado a proteína G (GRK, del inglés G protein-coupled

receptor kinase), de los que existen al menos siete miembros. Los receptores adrenérgicos específicos son sustratos de estas cinasas solo cuando se unen a un agonista. Este mecanismo es un ejemplo de desensibilización homóloga, dado que específicamente comprende a los receptores ocupados por agonistas.

La fosforilación de estos receptores incrementa su afinidad por las arrestinas  $\beta$ ; una vez que se unen a la molécula de arrestina  $\beta$ , la capacidad del receptor de activar la proteína G es disminuida, presumiblemente debido a impedimento estérico. Las arrestinas constituyen otra gran familia de proteínas ampliamente expresadas. La fosforilación del receptor seguida de la unión a arrestina  $\beta$ , se ha ligado a endocitosis subsecuente del receptor. Esta respuesta puede verse facilitada por la capacidad de las arrestinas  $\beta$  para unirse a la proteína clatrina.

Además de disminuir las respuestas que requieren la respuesta del receptor en la superficie celular, estos procesos regulatorios pueden contribuir a los nuevos mecanismos de señalización del receptor a través de vías intracelulares.

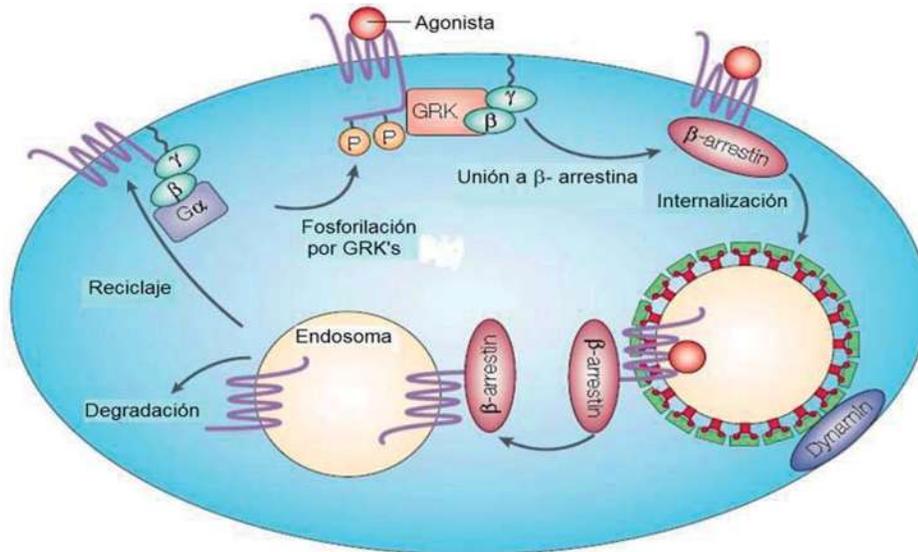


Figura No. 12. Desensibilización homóloga de los receptores adrenérgicos mediada por GRKs.

La desensibilización del receptor puede, además, estar mediada por retroalimentación de segundos mensajeros. La activación de la proteína cinasa C (PKC) por receptores acoplados a  $G_{q11}$  pueden llevar a la fosforilación de esta clase de receptores. Este mecanismo de retroalimentación por segundo mensajero se ha denominado desensibilización heteróloga porque la PKC activada puede fosforilar cualquier receptor estructuralmente similar con los sitios concordantes para la fosforilación por estas enzimas (Katzung, 2007).

#### 4.3.1.4 Distribución de los receptores $\alpha_1$ adrenérgicos

Los receptores adrenérgicos están distribuidos en casi todos los tejidos periféricos y muchas poblaciones neuronales dentro del sistema nervioso central. Los subtipos de adrenoceptores  $\alpha_1$  están involucrados en muchas respuestas fisiológicas.

La respuesta contráctil de los vasos sanguíneos está mediada en gran parte por los diversos subtipos de receptores  $\alpha_1$  presentes en ellos. El músculo dilatador pupilar radial del iris contiene receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos, su activación por fármacos, como la fenilefrina produce midriasis. Los vasos sanguíneos de la mucosa de las vías respiratorias superiores contienen receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos, la acción descongestiva de los estimulantes alfa es de utilidad clínica. En el aparato digestivo la activación  $\alpha_1$  adrenérgica reduce la actividad muscular en forma indirecta al reducir presinápticamente la liberación de acetilcolina. La base de la vejiga, el esfínter uretral y la próstata contienen receptores  $\alpha_1$  que regulan la contracción y por lo tanto promueven la continencia urinaria. La eyaculación depende de la activación normal de los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos en los conductos deferentes, vesículas seminales y próstata, también están involucrados en el tejido eréctil de animales macho (Degroat et al., 1990). En el músculo liso pilomotor los receptores  $\alpha_1$  participan en la erección del pelo.

#### 4.3.1.5 Localización subcelular

Estudios de distribución subcelular de los subtipos  $\alpha_1$  adrenérgicos, en fibroblastos transfectados con cada subtipo, en cultivos de células de músculo liso usando inmunotinción, así como células HEK 293 transfectadas con el cDNA que codifica a proteínas verde fluorescentes (GFP), las cuales se fusionan a cada subtipo  $\alpha_1$  adrenérgico, muestran que el subtipo  $\alpha_{1B}$  se localiza predominantemente en la superficie celular.

El subtipo  $\alpha_{1A}$ , se localiza intracelularmente, así como en la periferia, mientras que el  $\alpha_{1D}$ , tiene una localización principalmente perinuclear.

El alto grado de localización intracelular del subtipo  $\alpha_{1D}$  en células no estimuladas puede ser debida a que el receptor esta continuamente internalizado por su naturaleza de actividad constitutiva.

## JUSTIFICACIÓN

Son bien conocidas las complicaciones en el embarazo causadas por la Diabetes Mellitus Gestacional, tanto para la madre como para el neonato. Entre ellas se encuentra la alta incidencia de defectos morfogénicos en el producto, alteraciones metabólicas y el riesgo de desarrollar diabetes mellitus a mediano o largo plazo. Sin embargo el conocimiento acerca de las implicaciones a nivel vascular en la descendencia es escaso, poco es sabido de los cambios que sufre la contractilidad del músculo liso vascular y los mecanismos intracelulares que contribuyen a alterar la sensibilidad de los vasos sanguíneos del hijo de la madre diabética. El presente estudio determinó los cambios en la funcionalidad de los receptores adrenérgicos alfa 1 en la arteria aorta torácica de crías de ratas Wistar diabéticas.

## HIPÓTESIS

La diabetes en el embarazo provoca alteraciones en la descendencia de las madres que cursaron con este padecimiento, además de modificar la respuesta funcional de los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos de las crías.

## OBJETIVO GENERAL

Identificar el impacto de la diabetes gestacional en la función contráctil de la progeñe de ratas Wistar.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar y caracterizar los subtipos de receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos que participan en la contracción de la arteria aorta torácica de ratas Wistar de 4 semanas de edad, cuyas madres cursaron con diabetes en el embarazo; usando los antagonistas selectivos: RS100329 ( $\alpha_{1A}$ ), ciclazocina ( $\alpha_{1B}$ ) y BMY 7378 ( $\alpha_{1D}$ ).
- Determinar si la funcionalidad de los subtipos de receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos en las crías se encuentra alterada debido a la condición diabética de sus madres durante la gestación.

## MATERIALES Y METODOS

### **Animales de estudio.**

Se usaron ratas hembra de la cepa Wistar, de un peso de entre 200 a 240 g, las cuales fueron divididas en dos grupos: el grupo control (C) y el grupo diabético (DM). Los animales se mantuvieron en una habitación con temperatura controlada (23-25 °C), con ciclos de luz: oscuridad (12:12), y provistas de agua y alimento *ad libitum*. Todos los procedimientos se realizaron con apego a la Norma Oficial Mexicana para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (NOM-062-Z00-1999) de la Secretaría de Agricultura de México.

La Diabetes Mellitus fue inducida por inyección vía intraperitoneal de una dosis única de estreptozotocina (55 mg/kg), dicha sustancia es un antibiótico con efectos diabetógenos, destruye selectivamente las células  $\beta$  pancreáticas, provocando una disminución de insulina, desencadenando hiperglicemia. El grupo control fue tratado solamente con el vehículo. Después de transcurridas 48 horas de la administración, y hasta el sacrificio de cada animal, fue medida la concentración de glucosa en sangre completa con un glucómetro y tiras reactivas, solo aquellas hembras con un nivel glicémico por encima de 200 mg/dl fueron consideradas como diabéticas.

Tanto las hembras diabéticas, como las control, fueron apareadas con machos jóvenes de la misma especie durante toda la noche. Veinticuatro horas después, se hizo el reconocimiento de un tapón vaginal y su presencia se consideró como el primer día de gestación, posteriormente fueron colocadas de manera individual en cajas de policarbonato, con agua y alimento *ad libitum*.

Fue registrada la fecha y el número de crías por camada, las cuales permanecieron con la madre hasta su destete. Las crías fueron divididas a su vez en dos grupos: crías de ratas diabéticas (CRD) y crías de ratas control (CRC).

### **Preparación del tejido.**

Todas las crías fueron sacrificadas a las  $4 \pm 1$  semanas de edad, utilizando una cámara de CO<sub>2</sub>. Se realizó una incisión en el abdomen, exponiendo así el tracto gastrointestinal y disecándose la arteria aorta, limpiándose de tejido graso y conectivo, se separó cuidadosamente en sus dos porciones anatómicas: torácica y abdominal, de las cuales solo se utilizó la primera en el protocolo experimental. Se cortó en anillos de 3 - 4 mm de longitud, removiendo el endotelio con un dispositivo metálico rugoso frotando la cara luminal, con el fin de evitar que la influencia relajante endotelial afectara la respuesta de los receptores adrenérgicos.

Los anillos se montaron en ganchos de acero inoxidable y fueron colocados en cámaras para tejido aislado, conteniendo 10 ml de solución Krebs, con la siguiente composición en (mM): NaCl, 118; KCl, 4.7; CaCl<sub>2</sub>, 2.5; MgSO<sub>4</sub>, 1.2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2; NaHCO<sub>3</sub>, 25; EDTA, 0.026 y glucosa, 11.1; a temperatura de 37 °C y pH de 7.4, con burbujeo constante de una mezcla O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (95:5 %). Se adicionaron además 600 µl de los bloqueadores rauwolscina ( $1 \times 10^{-6}$  M) y propranolol ( $1 \times 10^{-6}$  M), esto con el fin de antagonizar las respuestas mediadas por los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  y  $\beta$ , respectivamente, y de esta manera registrar solo la respuesta mediada por los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$ .

Cada anillo se sujeta por un extremo a la base de la cámara con el gancho de acero y por el otro a un transductor de tensión isométrica Grass FT03 (Astromed, RI, USA) acoplado a su vez a un sistema de adquisición de datos (MP 100; Biopac Systems Inc. Santa Bárbara, CA, USA), donde se registran los cambios de tensión provenientes de la preparación provocados por la presencia del agonista.

Los anillos recibieron una tensión inicial de 3 gramos a partir de la cual el músculo se contrae y se relaja. Después, se hace la sensibilización del tejido tres veces a intervalos de 20 minutos, con 100 µl de fenilefrina, agonista adrenérgico  $\alpha_1$ , a una concentración submáxima de ( $1 \times 10^{-8.5}$  M) en cámara, realizando lavados con solución Krebs entre la primera y segunda estimulación. Esto permite que la arteria se contraiga y se establezca la respuesta.

En la última sensibilización y para garantizar la remoción del endotelio, el tejido se expuso a una solución de carbacol ( $1 \times 10^{-6}$  M en cámara), los anillos que relajaron menos del 20% fueron considerados como anillos sin endotelio.

### **Curvas dosis- respuesta a la fenilefrina.**

Posterior a la sensibilización del tejido, se da un periodo de recuperación de una hora; durante este tiempo se hacen lavados cada 20 minutos con solución Krebs.

Después se realizaron curvas dosis- respuesta a la fenilefrina ( $1 \times 10^{-9}$  -  $3.1 \times 10^{-5}$  M). Se construyó una curva control utilizando solamente el agonista y se hacen otras tres curvas en presencia de antagonistas selectivos a los subtipos de receptores adrenérgicos  $\alpha_1$ : RS100329 ( $\alpha_{1A}$ ), ciclazocina ( $\alpha_{1B}$ ) y BMY 7378 ( $\alpha_{1D}$ ), todos a la concentración de  $1 \times 10^{-8.5}$  M. Estos se incuban 30 minutos antes y durante la realización de la curva a la fenilefrina y al final de esta se da un periodo de recuperación de una hora, realizando lavados cada 20 minutos. Se construyeron dos curvas mas siguiendo el mismo procedimiento pero la concentración de los antagonistas fue de  $1 \times 10^{-8.0}$  M y  $1 \times 10^{-7.5}$  M respectivamente, permitiendo el mismo tiempo de recuperación que en la primera, y realizando los lavados correspondientes. Los datos obtenidos de tal procedimiento fueron registrados y guardados para su posterior análisis.

## ANÁLISIS DE DATOS

Los datos experimentales representan la media  $\pm$  error estándar de 4-6 anillos aórticos de diferentes animales. Los experimentos se expresan en gramos de contracción a la respuesta máxima inducida por el agonista adrenérgico.

Los valores de  $CE_{50}$  (concentración efectiva 50) o de  $pD_2$  ( $-\log CE_{50}$ ) se determinaron en un análisis de regresión no lineal WinNonlin Professional Edition (Versión 2.1, Palo Alto, California, USA). Este análisis emplea un modelo sigmoideal para el ajuste de las curvas dosis – respuesta, de acuerdo a la ecuación:

$$E = E_{max} [A]^m / [A] + [CE_{50}]$$

Donde:

- E: representa el efecto farmacológico.
- [A]: representa la concentración del antagonista
- $CE_{50}$ ,  $m$  y  $E_{max}$ : representan los parámetros de localización, pendiente y asíntota, respectivamente.

Los valores de  $pA_2$  se obtuvieron por medio del análisis de Schild (Arunlakshana y Schild, 1959). Para este análisis se emplea la fórmula:

$$\log [(RC) - 1] = \log [B] - \log K_B$$

Donde:

- RC: Concentración del agonista que produce el 50 % de la respuesta máxima en presencia del antagonista, dividida por la concentración que produce el 50% de la respuesta máxima del agonista en ausencia del antagonista, siendo  $(CE_{ATG 50} / CE_{AG 50})$ .
- [B]: Concentración molar del antagonista.
- $K_B$ : Constante de disociación del complejo antagonista receptor, en el equilibrio.

Cuando la pendiente de Schild es igual a la unidad (o estadísticamente no diferente de la unidad), indica que el antagonista está actuando sobre una población de receptores, y cuando la pendiente es diferente a la unidad se sugiere que el antagonista interactúa con más de una población de receptores.

En este caso el  $pA_2$  no puede usarse como la afinidad del antagonista, para lo cual se emplea el cálculo de  $pK_B$  como una medida de afinidad, aplicando la fórmula:

$$pK_B = \log (RC - 1) - \log (ATG)$$

Donde:

- (ATG): Concentración del antagonista empleado.
- RC: Concentración del antagonista que produce el 50 % de la respuesta máxima en presencia del antagonista, dividida por la concentración que produce el 50% de la respuesta máxima del agonista en ausencia del antagonista, siendo  $(CE_{ATG\ 50} / CE_{AG\ 50})$ .

Para obtener diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ), entre cada grupo de ratas (diabéticas y controles) se realizó un análisis de varianza de dos vías, seguido de la prueba de Student- Newman-Keuls.

Los valores de afinidad reportados para cada antagonista  $\alpha_1$  adrenérgico se encuentran concentrados en la tabla No. 1.

<b>Antagonista</b>	<b><math>pK_B</math></b>		
	<b><math>\alpha_{1A}</math></b>	<b><math>\alpha_{1B}</math></b>	<b><math>\alpha_{1D}</math></b>
<b>RS100329 *</b>	9.6 ± 0.1	7.8 ± 0.2	7.9 ± 0.1
<b>(+) Ciclazocina **</b>	7.75 ± 0.2	8.85 ± 0.1	7.27 ± 0.1
<b>BMY 7378 *</b>	6.5 ± 0.2	6.9 ± 0.2	8.9 ± 0.5

Tabla No. 1. Valores de afinidad ( $pK_B$ ) publicados para los diferentes antagonistas  $\alpha_1$  adrenérgicos empleados. \* K A Mills, N Hausman, R Chess-Williams. \*\* Marucci G., Angeli P., Buccioni M., et al.

## REACTIVOS

Reactivos adquiridos en Sigma – Aldrich: Clorhidrato de fenilefrina ( $C_9H_{13}NO_2 \cdot HCl$ ), estreptozotocina ( $C_8H_{15}N_3O_7$ ), clorhidrato de propranolol ( $C_{16}H_{21}NO_2 \cdot HCl$ ), clorhidrato de rauwolscina ( $C_{21}H_{26}N_2O_3 \cdot HCl$ ), cloruro de carbamilcolina ( $C_6H_{15}N_2O_2Cl$ ) y los antagonistas: Dihidroclorhidrato de BMY 7378 ( $C_{22}H_{31}N_3O_3 \cdot HCl$ ), (+) - ciclazocina ( $C_{18}H_{25}NO$ ); excepto RS100329 ( $C_{20}H_{25}F_3N_4O_3 \cdot HCl$ ), adquirido en Tocris Bioscience. El agonista fenilefrina se disolvió en ácido ascórbico a  $1 \times 10^{-2}$  M. Todos los demás reactivos se disuelven en agua bidestilada. Las diluciones subsecuentes de fenilefrina se realizaron en solución Krebs.

## RESULTADOS

### Características de las crías

Fue observada una alta tasa de mortalidad en la descendencia de ratas que cursaron con diabetes durante el embarazo, algunas de las crías nacieron muertas, mientras que otras fallecieron pocos días después del alumbramiento. Este fenómeno no se observó en las CRC, pues el número de individuos por camada permaneció constante hasta el momento del sacrificio.

Se registraron los pesos al nacer y a las cuatro semanas de edad de ambos grupos de crías objeto del estudio. Dichas medidas fueron similares al nacimiento:  $5.82 \text{ g} \pm 0.06$  en promedio para CRC y  $5.89 \text{ g} \pm 0.16$  en promedio para CRD. Sin embargo, transcurridas cuatro semanas y antes del sacrificio de cada animal, los pesos registrados mostraron una marcada diferencia, pues las CRD alcanzaron tan solo un 25% aproximadamente del promedio del grupo control, dicho fenómeno sugiere un retardo en el crecimiento, atribuido quizá a la condición patológica previa de sus madres.

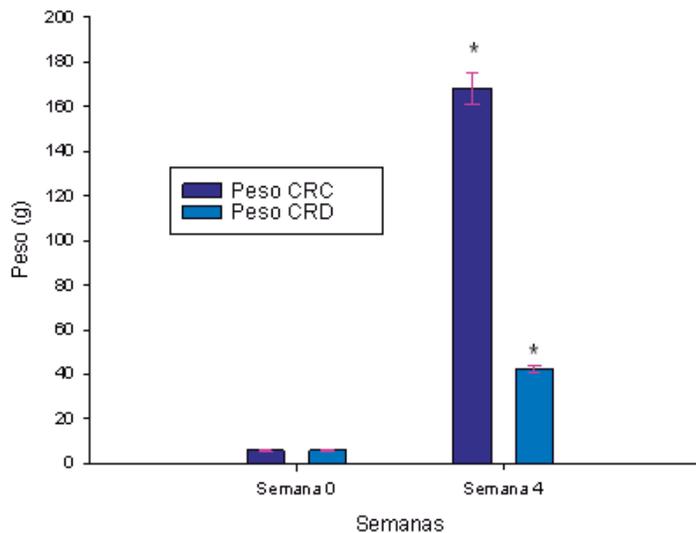


Figura No.16. Representa los pesos promedio, junto con sus errores estándar, de las crías descendientes de madres controles y diabéticas respectivamente a la semana 0 y a las 4 semanas de edad. Se observa significancia entre el grupo CRD vs. CRC a las 4 semanas  $*(p < 0.05)$ . Los datos experimentales representan la media  $\pm$  error estándar de 9-14 animales.

## Curvas concentración respuesta a fenilefrina en arteria aorta torácica de Crías de Ratas Control y Crías de Ratas Diabéticas.

### Sensibilidad ( $pD_2$ ) y $E_{max}$ .

Se realizaron curvas concentración-respuesta a fenilefrina, agonista adrenérgico  $\alpha_1$ , para determinar la sensibilidad ( $pD_2$ ) y el efecto máximo de la arteria aorta torácica en respuesta a dicho fármaco.

Se pudo apreciar que la fenilefrina produjo una contracción dependiente de la concentración, es decir, conforme aumenta la concentración de agonista, también aumenta la respuesta contráctil de los lechos vasculares de ambos grupos de ratas empleados, CRC y CRD.

La sensibilidad a fenilefrina, representada como  $pD_2$  ( $-\log CE_{50}$ ) fue mayor en los anillos de CRC respecto a las de CRD. Esto indica que en el grupo diabético se necesita una mayor cantidad de fármaco para producir el 50% del efecto máximo. Además, el efecto máximo ( $E_{max}$ ) se ve afectado de manera considerable en las CRD, siendo claramente menor respecto al grupo control. (Tabla No.2).

Parámetros	BMY 7378		RS100329		CZ	
	CRC	CRD	CRC	CRD	CRC	CRD
<i>m</i>	1,18	1,33	0,53	1,84	0,72	0,67
<i>pKB</i>	8,19	8,11	8,21	8,32	8,02	7,85
<i>E<sub>max</sub></i>	2,31 ± 0,31	0,95 ± 0,16	2,18 ± 0,30	0,96 ± 0,10	2,42 ± 0,38	0,97 ± 0,21
<i>pD2</i>	7,15	6,70	7,36	7,31	7,72	7,77

Tabla No.2. Valores de pendiente de la curva a fenilefrina con el antagonista correspondiente (*m*), afinidad del antagonista ( $pK_B$ ), efecto máximo ( $E_{max}$ ) y valores de sensibilidad al agonista ( $pD_2$ ).

### Antagonismo de RS100329

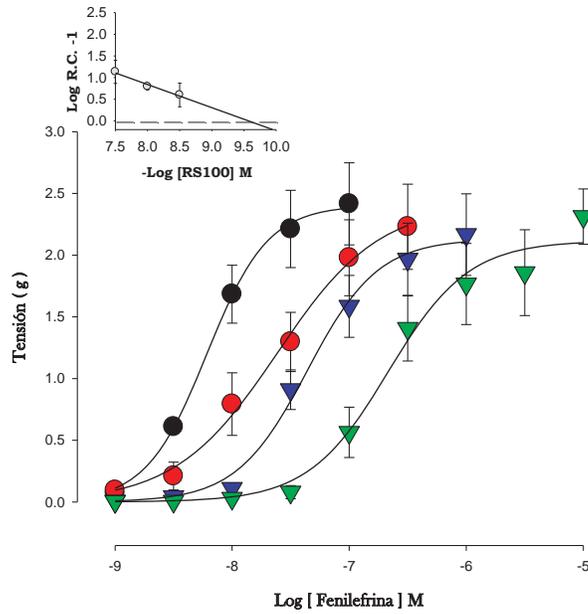
En la figura No. 13 se muestran las curvas concentración- respuesta a la fenilefrina en la arteria aorta torácica de crías de ratas control (CRC) y crías de ratas diabéticas (CRD), ambos grupos de cuatro semanas de edad. Dichas curvas se realizaron en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de RS100329 ( $3.1 \times 10^{-9}$  M,  $1 \times 10^{-8}$  M y  $3.1 \times 10^{-8}$  M), antagonista selectivo para los receptores  $\alpha_{1A}$ .

Se puede apreciar que dicho fármaco produjo, en ambos casos, un desplazamiento de las curvas de fenilefrina hacia la derecha, dependiente de la concentración, es decir, a una mayor concentración de RS100329 hay un mayor desplazamiento de la curva y el  $E_{max}$  se alcanza con una concentración más alta de agonista. Asimismo se trata de un antagonismo competitivo característico debido a que las curvas de antagonista fueron desplazadas paralelamente respecto a las curvas control.

Para determinar la afinidad por el antagonista RS100329 se determinaron los valores de  $pA_2$  por análisis de regresión de Schild, el valor de la pendiente fue diferente de 1, por tal motivo se calculó el valor de  $pK_B$ , el cual fue de 8.21 para CRC y 8.32 para CRD (Tabla No. 2), lo cual nos permite inferir, en base a la Tabla No.1, que el subtipo  $\alpha_{1A}$  está participando, aunque no de manera muy significativa, en la modulación de la contracción en respuesta a fenilefrina. Es apreciable que el valor de  $pK_B$  es ligeramente mayor en CRD, esto sugiere que en este grupo hay un aumento de la afinidad por este antagonista para el subtipo  $\alpha_{1A}$ .

Es claramente notable una disminución de aproximadamente 44% en la respuesta máxima en las CRD respecto al grupo control, sugiriendo una posible afectación en la funcionalidad o un decremento en la población de los receptores  $\alpha_{1A}$ , quizá debido a la previa condición diabética de sus madres.

a) CRIAS DE RATAS CONTROL (CRC)



b) CRIAS DE RATAS DIABETICAS (CRD)

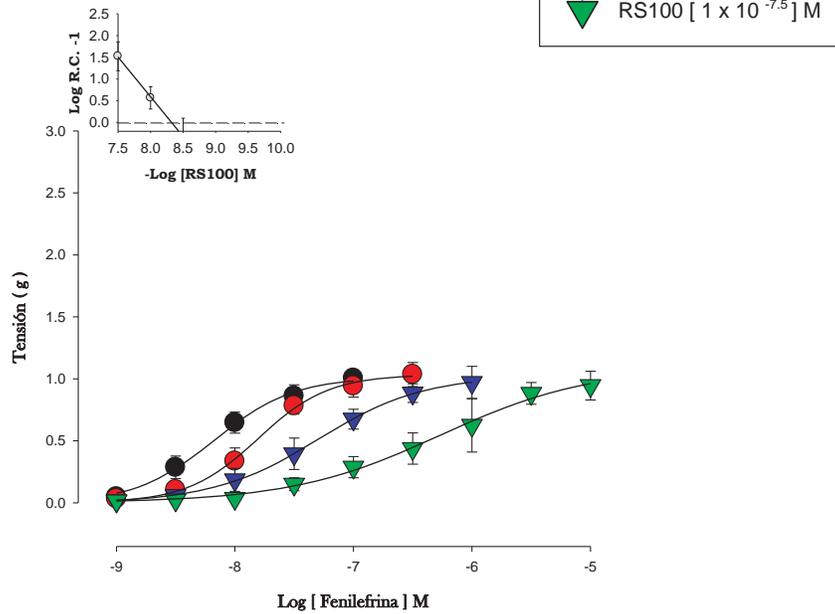


Figura No.13. Representa la respuesta contráctil a dosis crecientes de fenilefrina en presencia del antagonista RS100 a diferentes concentraciones:  $1 \times 10^{-8.5}$  M,  $1 \times 10^{-8.0}$  M,  $1 \times 10^{-7.5}$ . **a)** Ratas Wistar de cuatro semanas de edad (CRC). **b)** Ratas Wistar de cuatro semanas descendientes de madres diabéticas (CRD). Los datos experimentales representan la media  $\pm$  error estándar de 4-6 anillos aórticos de diferentes animales.

### **Antagonismo de ciclazocina**

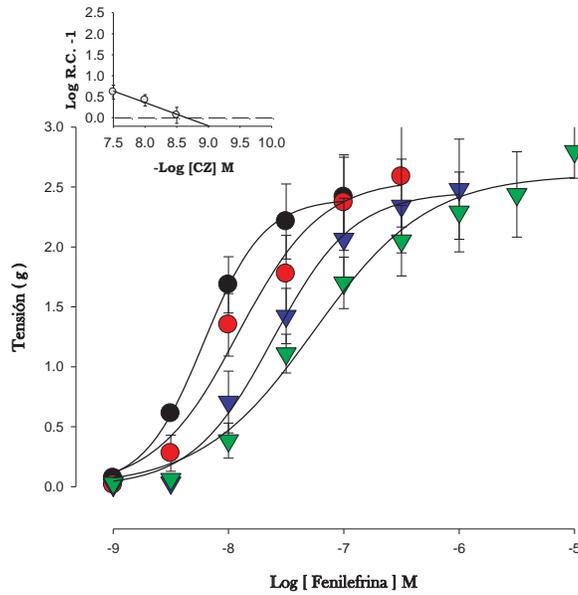
Las curvas concentración-respuesta a fenilefrina en aorta torácica de Crías de Ratas Control (CRC) y Crías de Ratas Diabéticas (CRD) de cuatro semanas de edad se muestran en la figura No.14, en ausencia y presencia del antagonista selectivo  $\alpha_{1B}$  ciclazocina, a concentraciones crecientes del mismo ( $3.1 \times 10^{-9}$  M,  $1 \times 10^{-8}$  M y  $3.1 \times 10^{-8}$  M).

Dicho fármaco presentó un antagonismo competitivo característico pues produjo un desplazamiento de manera paralela hacia la derecha de las curvas de fenilefrina, dependiente de la concentración, sin embargo el desplazamiento obtenido fue pequeño en ambos grupos de ratas, como para poder inferir que los receptores  $\alpha_{1B}$  adrenérgicos tienen poca participación en la contracción de la aorta torácica de los dos grupos de ratas estudiados.

Los valores de afinidad por el antagonista ( $pA_2$ ) se realizaron por el análisis de regresión de Schild, el valor de la pendiente obtenida fue diferente de la unidad, por lo que se recurrió al análisis alternativo para calcular  $pK_B$  (Furchgott, 1972), siendo de 8.02 y 7.85 para CRC y CRD, respectivamente, lo cual, según lo reportado en la Tabla No. 1, sugiere una escasa participación del subtipo  $\alpha_{1B}$  en la contracción mediada por fenilefrina en el vaso sanguíneo estudiado (arteria aorta torácica). Como puede observarse hay una disminución en la afinidad por la ciclazocina en CRD.

Es muy notable además una disminución del valor de  $E_{max}$  en CRD, de aproximadamente 40% respecto al grupo control, lo que podría sugerir una afección en la funcionalidad de los receptores  $\alpha_{1B}$  o una reducción de la población de estos en el lecho vascular estudiado.

a) CRIAS DE RATAS CONTROL (CRC)



b) CRIAS DE RATAS DIABÉTICAS (CRD)

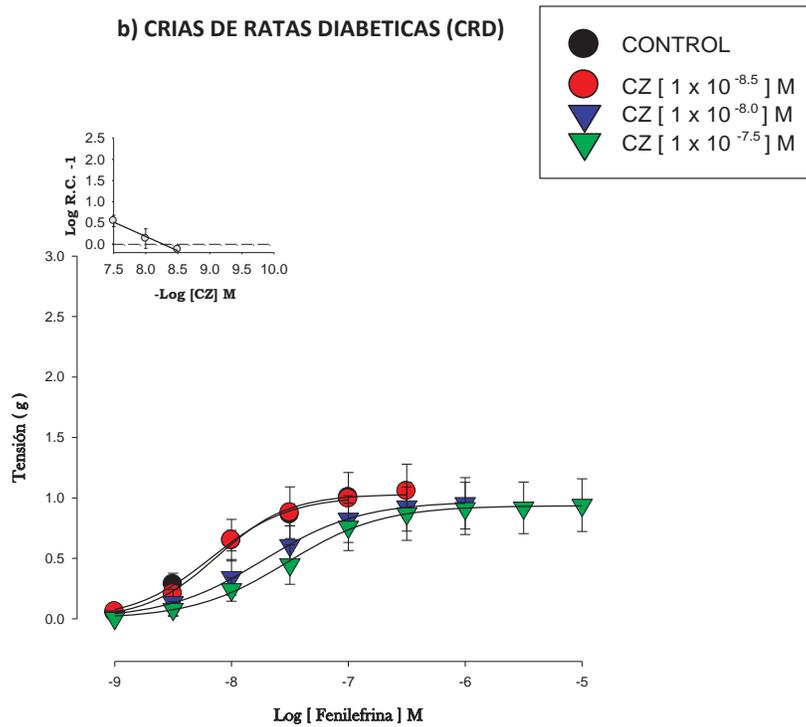


Figura No. 14. Representa la respuesta contráctil a dosis crecientes de fenilefrina en presencia del antagonista ciclazocina a diferentes concentraciones:  $1 \times 10^{-8.5}$  M,  $1 \times 10^{-8.0}$  M,  $1 \times 10^{-7.5}$ . a) Ratas Wistar de cuatro semanas de edad (CRC). b) Ratas Wistar de cuatro semanas descendientes de madres diabéticas (CRD). Los datos experimentales representan la media  $\pm$  error estándar de 4-6 anillos aórticos de diferentes animales.

### **Antagonismo de BMY 7378**

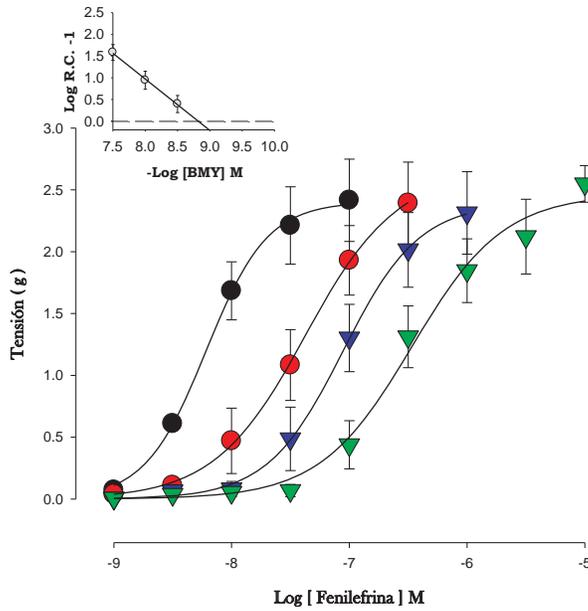
Las curvas concentración- respuesta a la fenilefrina en la arteria aorta torácica de crías de ratas control (CRC) y crías de ratas diabéticas (CRD) de cuatro semanas de edad se muestran en la figura No.15. Tales gráficas fueron realizadas en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de BMY7378 ( $3.1 \times 10^{-9}$  M,  $1 \times 10^{-8}$  M y  $3.1 \times 10^{-8}$  M), dicho fármaco es un antagonista selectivo para los receptores  $\alpha_{1D}$ .

Se puede apreciar que el antagonista produjo, en ambos casos, un desplazamiento paralelo de las curvas de fenilefrina hacia la derecha, dependiente de la concentración.

Al calcular los valores de  $pA_2$  por análisis de regresión de Schild, la pendiente obtenida fue diferente de 1, por tal motivo se realizó el análisis alternativo para el cálculo de  $pK_B$ , siendo de 8.19 para CRC y 8.11 para CRD (Tabla No. 2), lo cual nos permite inferir, en base a la Tabla No.1, que el subtipo  $\alpha_{1D}$  está participando de manera importante en la modulación de la contracción en respuesta a fenilefrina. Es apreciable que el valor de  $pK_B$  es un poco menor en CRD, esto sugiere que en este grupo hay una disminución de la afinidad por este antagonista para el subtipo  $\alpha_{1D}$ .

Al igual que en el caso de los demás antagonistas se observó una disminución en la respuesta máxima en las CRD, en este caso de aproximadamente 41% respecto al grupo control, permitiendo inferir la presencia de una posible afectación en la funcionalidad o una disminución en la población de los receptores  $\alpha_{1D}$ .

a) CRIAS DE RATAS CONTROL (CRC)



b) CRIAS DE RATAS DIABETICAS (CRD)

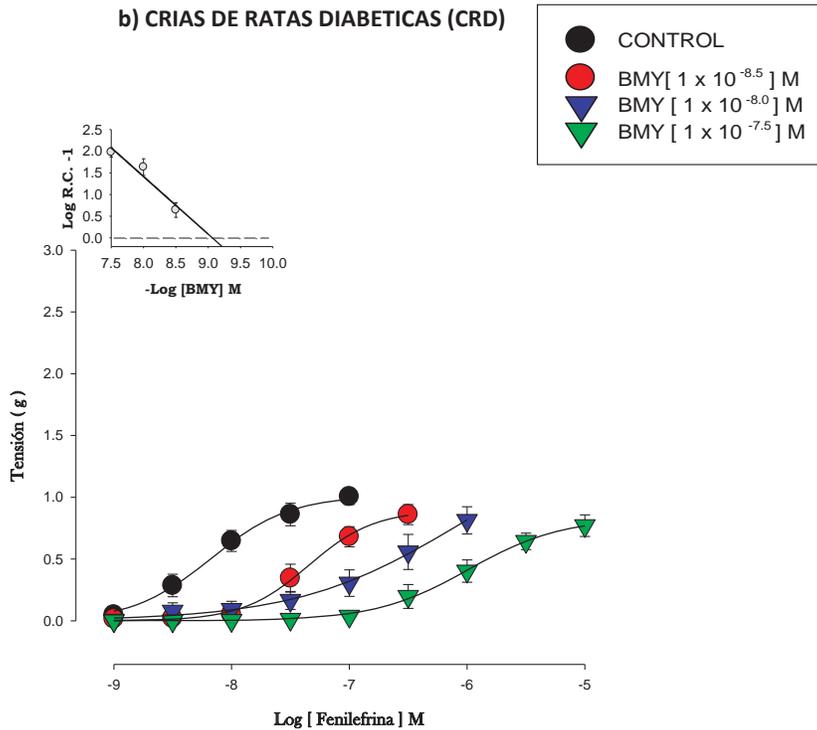


Figura No. 15. Representa la respuesta contráctil a dosis crecientes de fenilefrina en presencia del antagonista BMY 7378 a diferentes concentraciones:  $1 \times 10^{-8.5}$  M,  $1 \times 10^{-8.0}$  M,  $1 \times 10^{-7.5}$ . a) Ratras Wistar de cuatro semanas de edad (CRC). b) Ratras Wistar de cuatro semanas descendientes de madres diabéticas (CRD). Los datos experimentales representan la media  $\pm$  error estándar de 4-6 anillos aórticos de diferentes animales.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que la diabetes, inducida por estreptozotocina (55 mg/kg), padecida en la gestación, tiene notables consecuencias sobre las respuestas contráctiles de los diferentes subtipos de receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  en la arteria aorta de crías de ratas, así como en el crecimiento postnatal, por lo menos hasta las cuatro semanas de edad.

### Efectos postnatales

Boloker Judd, Gertz J. Shira et al. reportan que la aplicación de dosis altas de estreptozotocina en ratas gestantes resulta en el retardo del crecimiento de su descendencia, así como bajos niveles plasmáticos y pancreáticos de insulina; lo que concuerda con los datos obtenidos de las CRD a las cuatro semanas de edad, pues estas presentan un retardo en su desarrollo, evidenciado por los bajos pesos registrados en comparación con las CRC (Figura No.16).

Este fenómeno puede explicarse por la exposición del feto a un ambiente metabólico intrauterino anormal, lo cual podría disminuir por algún mecanismo la secreción de insulina (Boloker Judd, Gertz J. Shira et al), y dicha hormona, además de promover la translocación de los GLUT4 a la membrana plasmática, es un factor que controla el crecimiento y desarrollo celular (Pollard). Por lo tanto, si la secreción de insulina se ve disminuida, el crecimiento y desarrollo de algunos tejidos de las crías de ratas diabéticas podría verse afectado por tal motivo, como fue observado en esta investigación.

Estudios reportan que la estreptozotocina atraviesa la barrera placentaria, lo cual puede tener repercusiones directas en el desarrollo embrionario (Reynolds, W. A., Chez, R. A., Bhuyan, B. K., and Neil, G. L., 1974). Así que la inducción de diabetes al comienzo de la gestación por medio de dicho fármaco (dosis única de 55 mg/kg) pudo haber influido también en el retardo del crecimiento observado en las CRD.

### **Efecto en la respuesta contráctil**

Fue evidente una importante disminución en las respuestas contráctiles máximas de todos los anillos aórticos procedentes de CRD, pues estos presentaron solo 40% aproximadamente de la contracción observada en el grupo control.

Se han descrito numerosas complicaciones en la vida peri y postnatal del hijo de la madre diabética. Entre ellas se encuentra la reducción transitoria en la secreción de Hormona Paratiroidea, alteración que se presenta a los dos o tres días posteriores al nacimiento (Referencia de arriba). Dicha hormona es encargada de la regulación de las concentraciones extracelulares de  $Ca^{2+}$ , si su secreción es ineficiente, esto se traducirá en la disminución de los niveles plasmáticos del ión, fenómeno denominado hipocalcemia (Guyton). Como se tiene conocimiento, el calcio, en función de su concentración, desempeña un papel fundamental en la contracción del músculo liso vascular, por lo tanto, si se encuentra disminuida la disponibilidad de este catión, en consecuencia se tendrán respuestas contráctiles igualmente disminuidas (Luna Ortiz Pastor, Valdés Serrano Xenia, et al.). Esto podría explicar los resultados obtenidos en las curvas a fenilefrina, donde el efecto contráctil máximo decrece de manera considerable en las crías de ratas diabéticas, respecto a aquellas procedentes de madres sanas (Figuras 13, 14 y 15), sugiriendo una alteración en la homeostasis del calcio.

El retardo en el crecimiento postnatal podría representar otro factor al cual atribuir las diferencias observadas entre los grupos estudiados. Como se describió anteriormente, las CRD tuvieron un crecimiento deficiente respecto a los controles, al cumplir cuatro semanas de edad. Esta condición pudo repercutir de tal forma que la densidad de receptores adrenérgicos hubiera disminuido, así como el subtipo  $\alpha_1$  predominante en el tejido estudiado (aorta torácica) y por lo tanto provocar la disminución en las respuestas contráctiles, debido a que todos los órganos y tejidos de estas ratas fueron pequeños y tal vez inmaduros, incluyendo los vasos sanguíneos, de una longitud y un diámetro menor al que se observó en CRC.

En todas estas deducciones se descarta la influencia del endotelio por medio de sus sustancias vasoactivas, tanto contráctiles como relajantes (prostaglandinas, tromboxanos, óxido nítrico), debido a que se removió dicho órgano de las arterias estudiadas. Tampoco se considera la participación de otro tipo de receptores adrenérgicos ( $\alpha_2$  y  $\beta$ ), pues se realizó el bloqueo correspondiente para cada uno de ellos.

### **Caracterización de receptores $\alpha_1$ adrenérgicos**

Los valores de afinidad y las curvas a fenilefrina en presencia de antagonistas selectivos muestran la participación en la contracción de cada subtipo de receptor  $\alpha_1$  adrenérgico, dichos antagonistas se unen al receptor sin producir un efecto fisiológico, por lo que son de gran utilidad para clasificar estos receptores.

El subtipo de receptores adrenérgicos  $\alpha_{1A}$  no tiene una participación importante en la contracción en respuesta a fenilefrina de la arteria aorta torácica de crías de ratas Wistar de 4 semanas. La afirmación anterior se sustenta por el hecho de que el antagonista selectivo  $\alpha_{1A}$ , RS100329, no indujo un desplazamiento significativo de las curvas dosis-respuesta a fenilefrina, siendo notable una disminución del  $E_{max}$  en la descendencia de ratas diabéticas, fenómeno que fue descrito en párrafos anteriores. Sumado a esto, la afinidad calculada a partir de los datos obtenidos experimentalmente, tanto en CRC y CRD (Tabla No.2), están por debajo de los reportados en la literatura (Tabla No.1). De esta manera el desplazamiento observado se debe al antagonismo inespecífico del RS100329 en cualquiera de los otros dos subtipos presentes en los vasos estudiados y no en los receptores  $\alpha_{1A}$ , datos que concuerdan con los reportados por Castro Moreno en 2006.

Para el caso del subtipo  $\alpha_{1B}$  fue observado un desplazamiento poco significativo, incluso menor que para el subtipo  $\alpha_{1A}$ . Además se obtuvieron valores de afinidad  $pK_B$  por debajo de los reportados por Marucci G., Angeli P., Buccioni M., et al (Tabla No. 1) para su antagonista selectivo, (+) – Ciclazocina.

Lo anterior permite concluir que la contracción mediada por fenilefrina en la arteria aorta torácica de crías de ratas de un mes de edad es debida a la participación de otros receptores  $\alpha_1$ , más no a receptores del subtipo  $\alpha_{1B}$ , lo cual fue publicado también por Lázaro Suárez en el año 2005.

Finalmente, se pudo observar que el receptor con mayor participación, tanto para CRC y CRD, es el  $\alpha_{1D}$ , pues el antagonista selectivo para este subtipo, BMY 7378, indujo un gran desplazamiento de las curvas a fenilefrina, comparado con el que produjeron los otros antagonistas. Por otro lado, la afinidad ( $pK_B$ ) obtenida para BMY 7378 es semejante a la reportada en la tabla No. 1, sugiriendo de manera más clara la importante participación de los receptores adrenérgicos  $\alpha_{1D}$ , datos que coinciden con los obtenidos por Gotees et al., 1995; Hieble et al., 1995 y Villalobos et al., 1995, los cuales reportan que dicho subtipo es el responsable de la respuesta contráctil en la arteria aorta de la rata.

## CONCLUSIÓN

La diabetes inducida por estreptozotocina (55 mg/kg) al inicio de la gestación en ratas Wistar produce una importante tasa de mortalidad, además de un retardo en el crecimiento de las crías hasta las cuatro semanas de edad, teniendo como posibles causas la disminución de la hormona insulina como factor de crecimiento o un efecto secundario de la dosificación del fármaco empleado para inducir la hiperglicemia (estreptozotocina).

La condición patológica de las madres conduce a una disminución en la contracción mediada por fenilefrina en la porción torácica de la arteria aorta de su descendencia, atribuido a diversos factores como pueden ser: una alteración en la homeostasis del calcio, debido a una secreción insuficiente de hormona Paratiroidea; así como un decremento en la población de receptores adrenérgicos  $\alpha_1$ , principalmente del subtipo  $\alpha_{1D}$ , el cual predomina en el tejido estudiado, lo que pudiera ser consecuencia de una afectación en los receptores o del tamaño menor de la arteria aorta torácica de las crías de ratas diabéticas.

## BIBLIOGRAFIA

Aerts, L., Holemans, K., and Van Assche, A. "Maternal diabetes during pregnancy: Consequences for the offspring". *Diabet. Metab. Rev.*, 6, 1990: 147–167.

Almirón M.E., Gamarra S.C., González M.S. "Diabetes gestacional". *Revista de posgrado de la VIa Cátedra de Medicina*, núm. 152, diciembre 2005: 23-27.

American Diabetes Association. "Diagnosis and classification of diabetes mellitus". *Diabetes Care*, 2006: 29(1):43-8.

Barbour L.A., McCurdy C.E., Hernández T.L., Kirwan J.P., Catalano P.M., Friedman J.E. "Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes". *Diabetes Care*, Julio 2007, vol. 30, suplemento 2: S112-S119.

Boloker J., Gertz S.J., Simmons R.A. "Gestational Diabetes leads to the development of diabetes in adulthood in the rat". *Diabetes*, vol. 51, mayo 2002: 1499-1506.

Buckner S.A., Oheim K.W., Morse P.A., Knepper S.M., Hancock A.A. " $\alpha$ 1-adrenoceptor-induced contractility in rat aorta is mediated by the  $\alpha$ 1D subtype". *Eur. J. Pharmacol.*, 297, 1996: 241–248.

Caluwaerts S., Holemans K., van Bree R., Verhaeghe J., Van Assche F.A. "Is Low-Dose streptozotocin in Rats an Adequate Model for Gestational Diabetes Mellitus?" *Reproductive Sciences*, Mayo 1, 2003; 10(4): 216 - 221.

Carrapato M.R., Marcelino F. "The infant of the diabetic mother. The critical development windows". *Early Pregnancy* 2001; 5:57-8.

Catalano P.M., Kirwan J.P. "Maternal factors that determine neonatal size and body fat". *Cur.Diab. Rep.* 1, 2001: 71–77.

Catalano P.M., Tyzbit E.D., Wolfe R.R., Calles J., Roman N.M., Amini S.B., Sims E.A. "Carbohydrate metabolism during pregnancy in control subjects and women with gestational diabetes". *Am. J. Physiol.* 264, 1993:E60–E67.

Committee, D.A.C.O.D.M.E (2003) "Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus" *Diabetes Care* 25: 5-20.

Cueza J.M., Burkett E.S., Kerr D.S. Rodman H.V. "The newborn of diabetic rat: hormonal and metabolic changes in the postnatal period". *Pediatr. Res.* 16, 1982:632–637.

Docherty J.R. "Subtypes of functional  $\alpha$ 1-adrenoceptor". *Cellular and molecular life sciences* (2010) 67:405–417.

Ezenwaka C.E., Offiah N.V., Davis G. "Early metabolic defects for developing diabetes mellitus among offspring of patients with type 2 diabetes are independent of gender". *West Indian Med. J.* 49, 2000: 276–280.

Federación internacional de diabetes. IDF DIABETES ATLAS. Diabetes in the Young: a global perspective. Online [[www.diabetesatlas.org](http://www.diabetesatlas.org)] consultado el 30 de Julio de 2010.

Fingar, D.C., and J. Blenis. "Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression". *Oncogene* 23, 2004:3151–3171.

Flavahan, N.A., Vanhoutte P.M. " $\alpha$ -Adrenoceptor Classification in Vascular Smooth Muscle". *Trends Pharmacol. Sci.*, 7, 1986: 347–349.

Freinkel N, Metzger B.E. "Pregnancy as a tissue culture experience: the critical implications of maternal metabolism for fetal development. In *Pregnancy, Metabolism, Diabetes, and the Fetus*". Amsterdam, Excerpta Med., 1979: 2–23 (COBA Foundation Symposium no. 63).

Gauguier D., Bihoreau M.T., Ktorza A., Berthault M.F., Picon L. "Inheritance of diabetes mellitus as consequence of gestational hyperglycemia in rats". *Diabetes* 39, 1990:734–739.

Giraud, J., R. Leshan, Y.H., Lee & M.F. White. Nutrient-dependent and insulin-stimulated phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on serine 302 correlates with increased insulin signaling. *J. Biol. Chem.* 279, 2004:3447–3454.

Goetz A.S., King H.K., Ward S.D.C., True T.A., Rimele T.J., Saussy D.L. “BMY 7378 is a selective antagonist of the D subtype of  $\alpha_1$ -adrenoceptors “. *European Journal of Pharmacology*, volumen 272, publicaciones 2-3, enero de 1995: R5-R6.

Gómez Pérez F. J. “Epidemiología de la diabetes en México, en: avances en diabetes”. Primera Edición. 1999; 38-55.

Goodman & Gilman. “Las bases farmacológicas de la terapéutica”. 11<sup>a</sup> edición. Editorial Mc Graw Hill, 2007. Pp. 103-105.

Greene, M.W., H. Sakaue, L. Wang, D.R. Alessi, and R.A. Roth. Modulation of insulin-stimulated degradation of human insulin receptor substrate-1 by Serine 312 phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 278, 2003:8199–8211.

Guimaraes S., Moura D. “Vascular adrenoceptors: an update”. *Pharmacological Reviews*, 2001 53:319–356.

Guyton C. A., Hall E.J., “Tratado de Fisiología Médica”. 11<sup>a</sup> edición. Editorial McGraw Hill Interamericana, 2006. Pp. 961-969.

Han C., Li J., Minneman K.P. “Subtypes of  $\alpha_1$  adrenoceptors in rat blood vessels”. *European Journal of Pharmacology*, 190, 1990: 97-104.

Handwerger S., Freemark M. “The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development”. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 13, 2000:343–356.

Hieble J.P., Bylund B.B., Clarke D.E., Eikenburg D.C., Langer S.Z., Lefkowitz R.J., Minneman K.P., Ruffolo R.R. Jr. “International Union of Pharmacology. Recommendations for nomenclature of  $\alpha_1$  adrenoceptor: concensus update”. *Pharmacological Reviews*, 1995, 47: 267.

Holemans, K., Aerts, L., and Van Assche, F. A. "Evidence for an insulin resistance in the adult offspring of pregnant streptozotocin-diabetic rats". *Diabetología*, 34, 1991: 81–85.

Ibarra M., Terrón J.A., López-Guerrero J.J., Villalobos-Molina R. "Evidence for an age-dependent functional expression of  $\alpha_{1D}$  adrenoceptors in the rat vasculature". *European Journal of Pharmacology*, 322, 1997: 221-224.

Jawerbaum A., White V. "Animal Models in Diabetes and Pregnancy". *Endocr. Rev.*, Octubre 1, 2010; 31(5): 680 - 701.

Katzung B. G. "Farmacología básica y clínica". 10<sup>a</sup> edición. Editorial Manual Moderno. México D.F, 2007. Pp. 123-128.

King H., Aubert RE., Herman WH. "Global Burden of Diabetes 1995-2025. Prevalence, numerical estimates and projections". *Diabetes Care* 21, Num. 9: 1414-1431.

Kirwan J.P., Hauguel-De Mouzon S., Lepercq J., Challier J.C., Huston-Presley L., Friedman J.E., Kalhan S.C., Catalano P.M. "TNF-alpha is a predictor of insulin resistance in human pregnancy". *Diabetes* 51, 2002:2207–2213.

Kuhl C. "Etiology and pathogenesis of gestational diabetes". *Diabetes Care* 21 (Supl. 2), 1998:B19–B26.

Langer O., Yogev Y., Mart O., Xenakis E.M. "Gestational diabetes: the consequences of not treating". *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2005; 192: 989-97.

Martín A., Herrera E. "Different responses to maternal diabetes during the first and second half of gestation in the streptozotocin-treated rat". *Isr. J. Med. Sci.*, 27, 1991:442–448.

Mills K.A., Hausman N., Chess-Williams R. "Characterization of the  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtype mediating contractions of the pig internal anal sphincter". *British Journal of Pharmacology*, vol. 155, septiembre 2008: 110–117.

Monira B.H., Marshall I. "Characterization of  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes mediating contractions to phenylephrine in rat thoracic aorta, mesenteric artery and pulmonary artery". *British Journal of Pharmacology*, volumen 122, noviembre 1997: 849–858.

Oh W., Gelardi N.L., Cha C.J. "Maternal hyperglycemia in pregnant rats: its effect on growth and carbohydrate metabolism in the offspring". *Metabolism* 37, 1988:1146–1151.

Pollard T.D., Earnshaw W.C. "Cell Biology". Editorial Saunders, 2004. Pp. 445-454.

Ryan E.A., Enns L. "Role of gestational hormones in the induction of insulin resistance". *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 67, 1988:341–347.

Simmons R.A., Templeton L.J., Gertz S.J. "Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 diabetes in the rat". *Diabetes* 50, 2001:2279–2286.

Small, M., Cameron, A., Lunan, C. B., MacCuish, A. C. "Macrosomia in pregnancy complicated by insulindependent diabetes mellitus". *Diabetes Care*, 10, 1987: 594–599.

Stama W.B., Van der Graaf P.H., Saxenaa P.R. "Functional characterization of the pharmacological profile of the putative  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptor antagonist, (+)-cyclazosin". *European Journal of Pharmacology* vol. 361, publicación 1, noviembre 1998: 79-83.

Velázquez G.P., Vega M.G., Martínez M. M.L. "Morbilidad y mortalidad neonatal asociada a la diabetes gestacional". *Revista chilena de obstetricia y ginecología* 2010; 75(1): 35-41.

Williams T.J., Blue D.R, Daniels D.V. , Davis B., Elworthy T., Gever J.R., Kava M.S., Morgans D., Padilla F., Tassa S., Vimont R.L., Chapple C.R., Chess-Williams R., Eglén R.M., Clarke D.E., Ford A.P.D.W. "*In vitro*  $\alpha_1$ -adrenoceptor pharmacology of Ro 70–0004 and RS-100329, novel  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor selective antagonists". *British Journal of Pharmacology*, volumen 127, primera edición, Mayo 1999: 252–258.