



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO  
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS  
“DR. IGNACIO CHÁVEZ”  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD



Proyecto de tesis

**“EFECTO DE LA PROGESTERONA SOBRE LOS RECEPTORES  $\alpha_1$   
ADRENÉRGICOS VASCULARES DURANTE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL EN  
RATAS”**

Que para obtener el grado de Maestra en Ciencias de la Salud

*Presenta*

*Q.F.B. Marian Eurídice Martínez Cruz*

**Directores de tesis:**

*M. en C. Víctor Manuel Farías Rodríguez  
D. en C. Rafael Villalobos Molina*

*Morelia, Michoacán  
Julio de 2011*



# Índice

	Página
Abreviaturas	5
Índice de tablas	7
Índice de figuras	7
Agradecimientos	9
Resumen	14
<b>1. Introducción</b>	<b>15</b>
1.1. Progesterona	15
1.2. Receptores a la progesterona	17
1.2.1. Receptores nucleares	18
1.2.1.1. Mecanismo de acción genómico de la progesterona	20
1.2.2. Receptores membranales	21
1.3 Reguladores de la presión arterial	24
1.3.1 Receptores adrenérgicos	25
1.3.1.1 Clasificación de los receptores adrenérgicos	25
1.3.1.2 Regulación de la presión sanguínea por los receptores adrenérgicos	27
1.3.2 Óxido nítrico	28
1.3.3 Sistema renina angiotensina	30
1.3.3.1 Receptores a angiotensina.	31
1.4 Hipertensión arterial	32
<b>2. Justificación</b>	<b>34</b>
<b>3. Hipótesis</b>	<b>35</b>



4.	<b>Objetivo general</b>	35
4.1	<b>Objetivos particulares</b>	35
5.	<b>Materiales y métodos</b>	36
5.1	<b>Material biológico</b>	36
5.2.	<b>Reactivos con grado analítico</b>	36
5.3.	<b>Equipo</b>	36
5.4.	<b>Metodología</b>	36
5.4.1.	Animales	36
5.4.1.1	Ovariectomía	37
5.4.1.2	Inducción de hipertensión	38
5.4.1.3	Determinación de la presión arterial sistólica	38
5.4.1.4	Administración de acetato de medroxiprogesterona (MPA)	38
5.4.2.	Efecto de progesterona sobre la presión arterial, en la rata descerebrada y desmedulada.	39
5.4.3.	Efecto de la progesterona sobre la función de los receptores $\alpha_1$ adrenérgicos, en la arteria aorta torácica de ratas hipertensas.	41
5.4.4.	Efecto de la progesterona sobre la densidad proteica de los receptores $\alpha_1$ adrenérgicos, en la arteria aorta torácica de ratas hipertensas.	43
5.4.4.1	Homogenización	43
5.4.4.2	Determinación de la concentración de proteínas	44
5.4.4.3	Electroforesis	45
5.4.4.4	Transferencia	45
5.4.4.5	Bloqueo de las membranas e incubación con anticuerpos	45
5.4.4.6	Reacción quimioluminiscente	46
5.4.5.	Efecto de la progesterona sobre la producción de óxido nítrico en ratas hipertensas.	47
5.4.5.1	Colecta de muestras	47



5.4.5.2	Determinación de la concentración de nitratos y nitritos	47
6.	<b>Análisis de resultados</b>	48
7.	<b>Resultados</b>	50
7.1	Efecto de progesterona sobre la presión arterial, en la rata descerebrada y desmedulada.	50
7.2	Monitorización de la presión arterial	53
7.3	Efecto de la progesterona sobre la función de los receptores $\alpha_1$ adrenérgicos, en la arteria aorta torácica de ratas hipertensas.	54
7.4	Efecto de la progesterona sobre la densidad proteica de los receptores $\alpha_1$ adrenérgicos, en la arteria aorta torácica de ratas hipertensas.	72
7.5	Efecto de la progesterona sobre la producción de óxido nítrico en ratas hipertensas.	73
8.	<b>Discusión</b>	75
8.1	Efecto de progesterona sobre la presión arterial, en la rata descerebrada y desmedulada.	76
8.2	Efecto de la progesterona sobre la función de los receptores $\alpha_1$ adrenérgicos, en la arteria aorta torácica de ratas hipertensas.	79
8.3	Efecto de la progesterona sobre la densidad proteica de los receptores $\alpha_1$ adrenérgicos, en la arteria aorta torácica de ratas hipertensas.	85
8.4	Efecto de la progesterona sobre la producción de óxido nítrico en ratas hipertensas.	86
9.	<b>Conclusiones</b>	88
10.	Referencias bibliográficas	89



## Abreviaturas

AF1- AF-2	Dominios de transactivación
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
AR	Receptor adrenérgico
ATR	Receptor a angiotensina
C	Grados centígrados
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
CE <sub>50</sub>	Concentración efectiva 50
CEC	Cloroetil clonidina
cGMP	Monofosfato de adenosina cíclico
CMLV	Células del músculo liso vascular
COX	Ciclooxigenasa
CTRL	Grupo control
DBD	Dominio de unión al DNA
DE <sub>50</sub>	Dosis efectiva 50
DIM	Dimerización del receptor
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
E <sub>max</sub>	Efecto máximo
eNOS	Sintasa de óxido nítrico endotelial
GDP	Difosfato de guanosina
GTP	Trifosfato de guanosina
hsp	Proteína de choque térmico
HTA	Hipertensión arterial
i.m.	Intramuscular
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenosa
kDa	KiloDalton
kg	Kilogramo
LBD	Dominio de unión al ligando
LN	L-NAME, L <sup>ω</sup> -N-metil-arginin-éster
M	Concentración Molar
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
mmHg	Milímetro de mercurio
MPA	Acetato de medroxiprogesterona
mPR	Receptor membranal a progesterona
N	Concentración Normal
NCoR	Co-represor del receptor nuclear a progesterona
nm	Nanómetro
nNOS	Sintasa del óxido nítrico neuronal



NO	Óxido nítrico
NOS	Sintasa de óxido nítrico
nPR	Receptor nuclear a progesterona
OVX	Ovariectomía
PAD	Presión arterial diastólica
PAQR	Receptores de tipo progestin-adipo Q
PAS	Presión arterial sistólica
pD <sub>2</sub>	-log (CE <sub>50</sub> )
PLC	Fosfolipasa C
PR	Receptor a progesterona
PRE	Elementos en respuesta a progesterona
RAS	Sistema Renina-Angiotensina
SHR	Ratas espontáneamente hipertensas
SMRT	Receptor a hormonas tiroideas
SRC	Receptores a esteroides
TBST	Buffer de TRIS y Tween
µg	Microgramo
µl	Microlitro



## Índice de tablas

Tabla		Página
1.4.1	Clasificación de la hipertensión según el Instituto Nacional de Corazón, Pulmones y Sangre (NHLBI, EUA)	33
7.1	Dosis efectiva 50 (DE <sub>50</sub> ) y efecto máximo (E <sub>max</sub> ) para las ratas descerebradas y desmeduladas.	52
7.3.1	Valores de pD <sub>2</sub> (-log CE <sub>50</sub> ) y efecto máximo (E <sub>max</sub> ) en aorta de ratas hembras Wistar.	57
7.3.3	Valores reportados de afinidad estimada (pK <sub>B</sub> y pK <sub>i</sub> ) para antagonistas α <sub>1</sub> -AR en contracción inducida por el agonista selectivo fenilefrina en aorta de rata y en receptores clonados mediante experimentos de binding.	63
7.3.4	Valores de pK <sub>B</sub> calculados para BMY 7378 y RS 100329.	63

## Índice de figuras

Figura		Página
1.2	Mecanismos de acción de la progesterona.	18
1.2.1	Organización estructural de las isoformas del receptor de progesterona (PR), PR-A y PR-B.	19
1.2.2	Vías genómicas y no genómicas de activación por progesterona	23
5.4.2.1.	Distribución de animales para la determinación del efecto agudo de la progesterona en el modelo de rata descerebrada y desmedulada.	39
5.4.3.1.	Distribución de animales para la evaluación del efecto crónico de la progesterona en ensayos funcionales en órgano aislado.	41
7.1	Efecto de la progesterona sobre la presión arterial diastólica en ratas desmeduladas y descerebradas	50
7.2	Monitorización de presión arterial sistólica (PAS) en animales con tratamiento crónico de acetato de medroxiprogesterona	53
7.3.1.	Comparación de la respuesta a fenilefrina en las diferentes condiciones experimentales en anillos con y sin endotelio, aorta torácica de ratas hembras Wistar	56
7.3.2.	Evaluación de la función endotelial en los diferentes grupos de estudio mediante curvas dosis respuesta a fenilefrina en anillos con y sin endotelio, aorta torácica de ratas hembras Wistar.	59
7.3.3.	Evaluación de la función contráctil del músculo liso vascular en respuesta a estimulación de canales de potasio inducida por la adición de KCl 80 mM en arteria aorta torácica de ratas hembras Wistar	60



7.3.4	Caracterización farmacológica del receptor adrenérgico $\alpha_{1D}$ mediante curvas concentración – respuesta a la fenilefrina + BMY 7378 en aorta torácica de ratas hembras Wistar con endotelio.	66
7.3.5	Caracterización farmacológica del receptor adrenérgico $\alpha_{1D}$ curvas concentración – respuesta a la fenilefrina + BMY 7378 en aorta torácica de ratas hembras Wistar sin endotelio.	67
7.3.6	Caracterización farmacológica del receptor adrenérgico $\alpha_{1B}$ curvas concentración – respuesta a la fenilefrina + cloroetilclonidina en aorta torácica de ratas hembras Wistar con endotelio.	68
7.3.7.	Caracterización farmacológica del receptor adrenérgico $\alpha_{1B}$ curvas concentración – respuesta a la fenilefrina + cloroetilclonidina en aorta torácica de ratas hembras Wistar sin endotelio	69
7.3.8.	Caracterización farmacológica del receptor adrenérgico $\alpha_{1A}$ curvas concentración – respuesta a la fenilefrina + RS100329 en aorta torácica de ratas hembra Wistar con endotelio.	70
7.3.9.	Caracterización farmacológica del receptor adrenérgico $\alpha_{1A}$ curvas concentración – respuesta a la fenilefrina + RS100329 en aorta torácica de ratas hembras Wistar sin endotelio.	71
7.4.1	Efecto de la progesterona sobre la densidad proteica de los receptores $\alpha_1$ adrenérgicos en la aorta de ratas hipertensas.	72
7.5.1.	Determinación de la actividad de las sintasas de óxido nítrico mediante la cuantificación de nitratos y nitritos en orina de ratas hembras Wistar por el método de Griess.	75





## Agradecimientos

*Y desperté a la realidad... no estarías más conmigo, ahora tendría que escalar la montaña sola, seguir mis pasos y decidir mi futuro por mí misma, decidí caminar adelante y superarme, crecer para ser más, ser la persona que siempre soñé que sería... Caminé y te encontré acompañando mis pasos silenciosamente... conseguí cosas maravillosas en mi vida.*

*Siempre estás en mi mente Abuelito Remi y esto que inició por ti ahora es una satisfacción para mí y con orgullo te digo:  
¡Lo logré y voy en busca de más!*



*A mi familia...*

*Por su infinito apoyo, paciencia, amor, cariño y ternura, y por crear en mi el deseo de superación, gracias Arminda y Luis.*

*Andrea y Erubiel por sus palabras de aliento y brindarme la confianza para seguir adelante.*

*A Paty Rodríguez, la madre de los dos motores que me impulsan a seguir siendo un ejemplo para ellos.*

*Chris y Erus por brindarme cada día una sonrisa y llenar de alegría mi existencia.*

*A Remy<sup>‡</sup> y Aurora, Mary<sup>‡</sup> y Estanislao<sup>‡</sup>, por haber dado la vida a mis padres y por transmitirme a través de ellos que todo se puede lograr con el empeño necesario.*



*A mis amigos...*

*Juan Javier, Paty Castro, Itzell Gallardo, Araceli Arellano, Manuel López, por compartir conmigo sus conocimientos y brindarme su ayuda; por cada abrazo, cada palabra de aliento y muestra de afecto que me dieron, por ser mi segunda familia.*

*Lety Pérez quien siempre tuvo para mí una palabra de ánimo y los brazos abiertos llenos de comprensión y paciencia.*

*Al doctor, Maximiliano Ibarra, por todos sus comentarios, sugerencias y el apoyo que me brindó para el enriquecimiento de esta tesis.*

*Verito, Chivis, Nely, Ivonne, Liz, Yony, Elías mis mejores amigos por siempre estar a mi lado acompañándome y compartiendo alegrías y sinsabores de la vida.*



*A mis tutores y sinodales...*

*Al M en C. Víctor Manuel Farías Rodríguez y al D en C. Rafael Villalobos Molina por conducirme correctamente para desarrollar mi tesis e inculcarme el amor y la pasión por la ciencia.*

*A los miembros de mi comité tutorial, por sus comentarios acertados durante mis evaluaciones, que permitieron mejorar notablemente la calidad de esta tesis.*



---

---

*A las instituciones...*

*A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por brindarme los cimientos sobre los cuales construiré muchos éxitos profesionales más.*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México por todas las facilidades para desarrollar este trabajo de tesis.*

*Al personal del bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (UNAM) por el apoyo proporcionado para el cuidado y mantenimiento de los animales de experimentación, en especial a la jefa del bioterio, la M.V.Z. Leticia Flores Sánchez por sus enseñanzas para la realización de la cirugía de los animales.*



## Resumen

La progesterona es una hormona esteroide que controla eventos clave de la reproducción de los mamíferos, ésta es una hormona vasoactiva. Todas las actividades de la progesterona están mediadas por la interacción con sus receptores tanto a nivel membranaral como nuclear. El endotelio vascular produce una gran cantidad de sustancias vasodilatadores para contrarrestar los efectos constrictores del sistema nervioso simpático (SNS) en animales normotensos. Una alteración en esta producción conlleva a una enfermedad cardiovascular denominada hipertensión arterial. La prevalencia de esta patología en mujeres aumenta después de la quinta década de vida, sugiriendo que las hormonas juegan un papel protector ante tal enfermedad, pero el mecanismo por el cual actúan es aún incierto.

14

En este trabajo se planteó evaluar los efectos del tratamiento con progesterona sobre los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos vasculares en hipertensión inducida por deficiencia de óxido nítrico en ratas hembras ovariectomizadas de la cepa Wistar, realizando curvas dosis- respuesta en ratas descerebradas y desmeduladas y curvas concentración- respuesta a la fenilefrina en aorta torácica; además se analizó la densidad proteica de  $\alpha_1$  adrenoreceptores y la actividad de la sintasa de óxido nítrico.

En el modelo de rata descerebrada y desmedulada se observa aumento en la afinidad y potencia de la respuesta a agonistas de los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos debido a la administración de la progesterona en ratas hipertensas. Así mismo la respuesta a agonistas adrenérgicos aumenta en las ratas ovariectomizadas, respecto a los controles.

En aorta de ratas hembras los receptores que se encuentran mediando la respuesta contráctil son el  $\alpha_{1D}$ -AR y el  $\alpha_{1A}$ -AR puesto que el efecto máximo disminuye conforme incrementa la concentración de antagonista en los grupos tratados con progesterona y/o L-NAME. El receptor predominante en ratas hembras durante la hipertensión es el  $\alpha_{1A}$ -AR y su densidad proteica disminuye con la administración de progesterona. La actividad de la NOS aumentó en el grupo ovariectomizado.

Concluimos que la progesterona no genera respuestas vasoprotectoras en el animal íntegro, la respuesta contráctil está mediada por los receptores adrenérgicos  $\alpha_{1A}$ -AR y el  $\alpha_{1D}$ -AR; el  $\alpha_{1A}$ -AR es el que se encuentra presente en mayor proporción en la aorta de ratas hembras y disminuye con la administración de progesterona. La actividad de la sintasa de óxido nítrico (NOS) aumenta con la ovariectomía.



# 1. Introducción

## 1.1 Progesterona

La progesterona es una hormona esteroide indispensable para la procreación de los mamíferos, ya que controla eventos clave de la reproducción en la hembra, desde la ovulación a la implantación, el mantenimiento del embarazo y el crecimiento de las mamas (Chabert-Buffet y col., 2005; Gellersen y col., 2009).

La progesterona es conocida por su efecto relajante sobre el músculo liso miometrial; así, se ha descrito que la progesterona bloquea la acción de la oxitocina e inhibe la formación de uniones Gap (Goldman y col., 2005).

Por otro lado, la progesterona es la responsable del aumento de la fragilidad capilar y de facilitar el sangrado durante la menstruación (Thomas y col., 2003), esta acción parece estar relacionada con el incremento de la actividad del sistema renina-angiotensina durante la fase lútea del ciclo menstrual normal (Barbagallo y col., 2001).

Varios estudios indican que la progesterona ejerce acciones en el músculo liso vascular (Barbagallo y col., 2001; Wassmann y col., 2005; Otsuki y col., 2001; Thomas y col., 2003; Hodges y col., 1999; Koh y col., 2001; Rosano y col., 2000; Oelkers y col., 1999; Cutini y col., 2009; Selles y col., 2002); sin



embargo, hay gran controversia respecto a estos efectos, es decir, si su acción es vasodilatadora o vasoconstrictora.

Existen reportes que indican que la progesterona actúa como amortiguador, en respuesta a las señales vasoconstrictoras del calcio (Barbagallo y col., 2001, Selles y col., 2001), e incluso que la progesterona ejerce acciones no genómicas sobre la ciclooxigenasa 2 (COX-2) y la sintasa de óxido nítrico (NOS), al activar la tirosina cinasa y la fosfatidil inositol-3 cinasa (PI3K), que efectúan comunicación cruzada entre las COX y la NOS (Cutini y col., 2009, Selles y col., 2001). Así, la acción de progesterona no solo es liberar compuestos vasorrelajantes, sino que también inhibe la agregación plaquetaria que disminuye la formación de placas ateroscleróticas, siendo éste un evento dependiente de la activación de fosfolipasa C (PLC) (Cutini y col., 2009, Selles y col., 2002). Es bien conocido el efecto de los estrógenos como activadores de la NOS, y cuando se emplean en la terapia de reemplazo hormonal combinados con progesterona, se mejora la función endotelial (Koh y col., 2001; Rosano y col., 2000); además, disminuye el riesgo de padecer cáncer uterino e hiperplasia endometrial (Thomas y col., 2003).

Por otro lado, la progesterona es antagonista de los efectos vasoprotectores ejercidos por estrógenos que actúan sobre la eNOS (Wassmann y col., 2005), disminuyendo el flujo sanguíneo coronario y la vasodilatación, debido a que progesterona aumenta el estrés oxidativo al

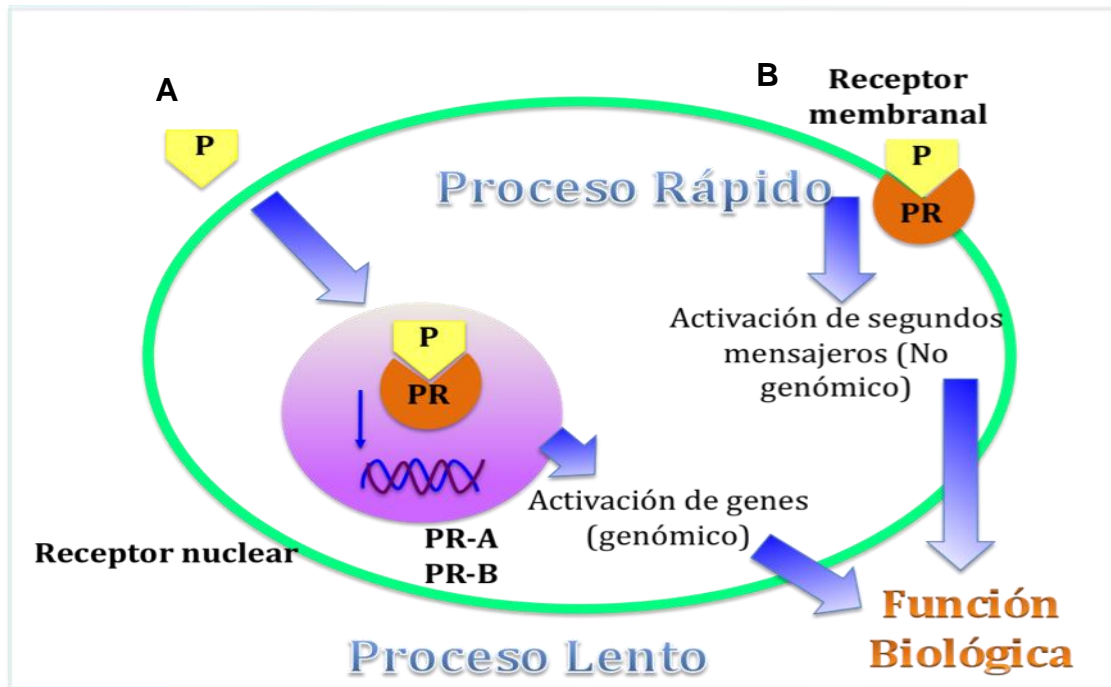




disminuir la actividad de superóxido dismutasa (Wassmann y col., 2005) que conduce al aumento en la expresión de citocinas proinflamatorias (Otsuki y col., 2001; Koh y col., 2001). Además, la progesterona se asocia con pérdida de  $\text{Na}^+$  y un aumento en la secreción de renina, lo que podría activar el sistema renina – angiotensina, produciendo vasoconstricción (Barbagallo y col., 2001; Oelkers y col., 1999; Wambach y Higgings, 1979).

## 1.2. Receptores a la progesterona

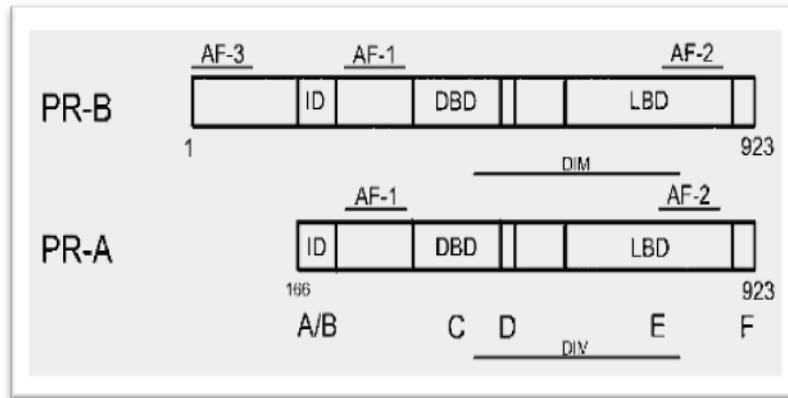
La progesterona ejerce acciones genómicas y no genómicas a través de la activación de segundos mensajeros (*figura 1.2*). Ambas acciones son reguladas por la interacción de progesterona con su receptor, ya sea al interior de la célula (receptor nuclear, PR) o en la membrana celular por interacción con el receptor membranal (mPR) (Gadkar-Sable y col., 2005, Chabbert-Buffet y col., 2004).



**Figura 1.2. Mecanismos de acción de la progesterona.** (A) Vía genómica y (B) Vía no genómica. P-Progesterona, PR- Receptor de progesterona, *Modificado de Gadkar-Sable, y col., 2005*

### 1.2.1. Receptores nucleares

Existen dos isoformas de los receptores a progesterona (PRs): la A y la B, (figura 1.2.1), pertenecen a la familia de receptores nucleares y poseen características de factores transcripcionales, son expresados de un mismo gen pero tienen dos codones de iniciación AUG, que permiten la generación de dos transcriptos, traduciendo las dos isoformas (Chabert-Buffet y col., 2004; Mulac-Jercevic y Connely, 2004).



**Figura. 1.2.1. Organización estructural de las isoformas del receptor de progesterona (PR), PR-A y PR-B.** Los números denotan la posición de los aminoácidos en cada proteína. AF-1, AF-2 y AF-3 son dominios de activación; DBD, es el dominio de unión al DNA; LBD, es el dominio de unión al ligando; ID, dominio inhibitorio; DIM, secuencias de importancia para la dimerización del receptor (Mulac-Jercevic y Connely, 2004).

La región amino terminal contiene dos dominios de transactivación (AF-1 y AF-3) que reclutan proteínas co-activadoras del receptor, para modular el nivel y especificidad de la activación del gen blanco, así como un dominio inhibitorio (ID) responsable de reclutar proteínas co-represoras de la inhibición transcripcional. La región más conservada (C) es la de unión al DNA (DBD), que en el caso de los PRs está en la parte central, consiste de 66-68 aminoácidos y se compone de dos estructuras dedos de zinc II, que facilitan la unión del receptor en secuencias cis del DNA y son el marco de la superfamilia de los receptores nucleares.



El receptor a la progesterona también posee un dominio de unión al ligando (LBD) altamente conservado, localizado cerca del DBD en el lado del extremo carboxilo (Mulac-Jercevic y Conneely, 2004; Bramley, 2003). Además de ser la región de unión a progesterona, esta secuencia (LBD) contiene un dominio de transactivación adicional (AF-2) requerido para el reclutamiento de co-activadores dependientes de hormonas, que permiten interaccionar el receptor inactivo con proteínas de choque térmico, las cuales llevan a dimerización del receptor (Vegeto y col., 1992; Fawell y col., 1990; Pratt y col., 1988; Webster y col., 1988).

#### **1.2.1.1. Mecanismo de acción genómico de la progesterona**

Una vez en la célula blanco, la progesterona induce un cambio de conformación del receptor (PR), de su forma inactiva a un receptor activo que se unirá al DNA. Este cambio se acompaña con la disociación de proteínas de choque térmico hsp-90, hsp-56 y hsp-70 (Bagchi y col., 1991) y la dimerización del receptor (Chabert-Buffet y col., 2004; Mulac-Jercevic y Connely, 2004). El homodímero PR activado, se une a secuencias específicas de DNA con la región promotora de genes de respuesta a la progesterona o elementos de respuesta a progesterona (PRE) (Chabert-Buffet y col., 2004). Se cree que la unión del agonista al PR también activa la transcripción directa sobre la maquinaria de transcripción o por asociación con co-activadores, ésta interacción aumenta la transcripción produciendo agonismo a niveles celular y



tisular. Los co-activadores podrían estar dentro de los amplificadores de la regulación transcripcional e incluirse en otros receptores esteroides (SRC) pertenecientes a la familia de receptores nucleares (Liu y col., 2002).

Los PR también interactúan con co-represores transcripcionales, como el co-represor del receptor nuclear (NCoR), el mediador silenciador del ácido retinoico y el receptor de hormonas tiroideas (SMRT) (Li y col., 2003).

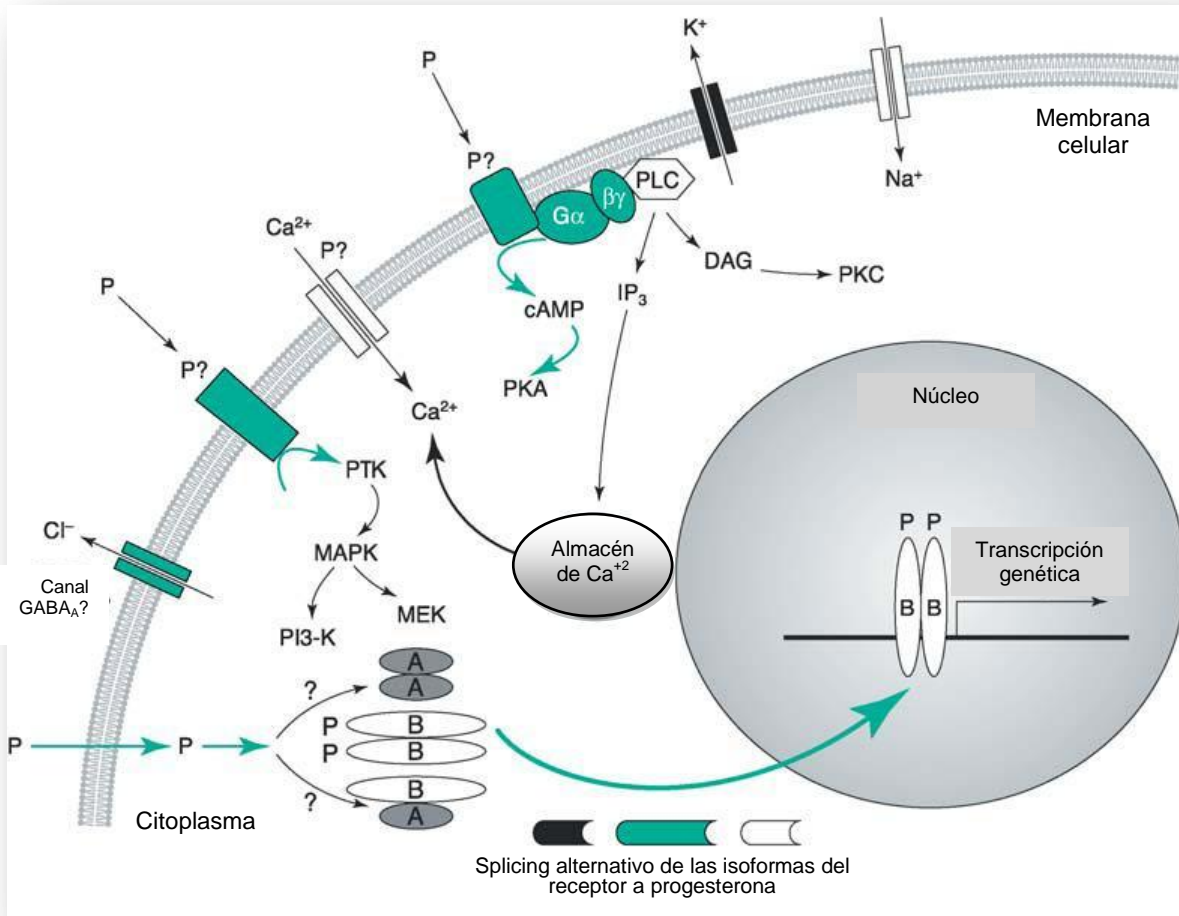
### 1.2.2. Receptores membranales

Si bien la mayoría de acciones de progesterona ocurren por el clásico mecanismo de las hormonas esteroides, la hormona también ejerce efectos rápidos sobre diferentes vías de señalización, independientes de regulación genética o transcripcional.

Existe evidencia acerca de que las acciones no genómicas de progesterona son producidas al activarse la fracción citoplásmica del receptor (nPR), en específico por la isoforma B. Las respuestas rápidas a la progesterona son detectadas en células y tejidos deficientes en nPR, como los linfocitos T, las plaquetas, el cuerpo lúteo de rata y en ratones PR “knockout” (Chabert-Bufferet y col., 2004; Mulac-Jercevic y Connely, 2004; Gadkar-Sable y col., 2004).



La progesterona estimula respuestas celulares independientes de la función reguladora transcripcional de los PRs, por al menos dos mecanismos distintos. El primer mecanismo depende de PR e involucra la activación de cascadas de fosforilación mediadas por PRs, por ejemplo la vía de Src/Ras/MAP cinasas para modular respuestas celulares de la hormona (Boonyaratanakornkit y col., 2001; Ballare y col., 2003) o la inhibición de la producción de cAMP, la activación de ERK1/2 o p38, así como la movilización de calcio (Chabert –Buffet y col., 2004). El segundo mecanismo es independiente de PRs y parece ser mediado por interacciones con receptores de membrana específicos (Figura 1.2.2).



**Figura 1.2.2. Vías genómicas y no genómicas de activación por progesterona.** Las diversas acciones membranales de progesterona ocurren al activarse diferentes cascadas de señalización, como la vía de las MAPK y del trifosfato de inositol (IP3). *Modificado de Bramley, 2003.*

Inicialmente se clonaron tres isoformas del mPR ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) en ovarios de peces y subsecuentemente se identificaron en una gran diversidad de especies incluida la humana, y se describen como receptores acoplados a proteínas G distintos de los clásicos PRs intracelulares, pertenecen a una familia de proteínas altamente conservadas, desde las eubacterias hasta los mamíferos



superiores, denominados receptores progestin-adipoQ (PAQRs) (Chabert – Buffet y col., 2004).

Los receptores membranales a progesterona en humanos se localizan en células endoteliales aórticas (Welter y col., 2003), hepatocitos (Baker y col., 2003), neuronas (Kopeikina- Tsiboukidou y col., 1986), glándulas mamarias (Richer y col., 2002), ovarios (Schreiber y col., 1979), espermatozoides (Luconi y col., 1998) y células granulosas (Peluso y col., 2001). En el ovocito de los anfibios, los mPR son responsables de reanudar la meiosis por incremento del calcio intracelular (Gadkar-Sable y col., 2004).

### 1.3. Reguladores de la presión arterial.

El tono vascular es resultado de interacciones entre mecanismos de control neurales y endoteliales (Török, 2008).

El endotelio sintetiza y libera un espectro de sustancias vasoactivas que modulan el tono vascular, la homeostasis, la respuesta inflamatoria y la angiogénesis. Los factores vasoactivos relajantes incluyen: óxido nítrico, prostaciclina, adenosina, péptido natriurético C, etc., y los factores contráctiles son: tromboxano A<sub>2</sub>, endotelina-1, angiotensina II, anión superóxido, entre otros (Vanhoutte y Tang, 2008). En animales normotensos, los factores vasodilatadores se producen en grandes cantidades permitiendo al endotelio oponerse al tono vasoconstrictor del sistema nervioso simpático. Las células



endoteliales se comunican con las células del músculo liso por uniones gap que permiten la extensión del tono electrotónico (Török, 2008).

A nivel fisiológico existen diversos sistemas encargados de mantener la presión sanguínea, como lo son la reactividad vascular a catecolaminas, el sistema renina-angiotensina, el óxido nítrico, entre otros. A continuación se describen con mayor detalle algunos de ellos.

### 1.3.1. Receptores adrenérgicos

Las catecolaminas interactúan con una familia bien conocida de receptores adrenérgicos (AR). Estos receptores son mediadores críticos de las respuestas del sistema nervioso simpático, y de respuestas involucradas en la homeostasis cardiovascular como: la vasoconstricción arterial y la contracción cardiaca. Los AR pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (Finch y Graham, 2006). Los AR se localizan en la membrana celular, donde reconocen a sus agonistas y transducen la señal hacia el interior de la célula (Finch y Graham, 2006).

#### 1.3.1.1. *Clasificación de los receptores adrenérgicos.*

Los AR se dividen en tres subfamilias:  $\alpha_1$ -AR,  $\alpha_2$ -AR y  $\beta$ -AR, su función se realiza al unirse a las catecolaminas y transducen la señal al estar acoplados y activar a las proteínas G heterotriméricas formadas por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  ( $G_{q/11}$ ,  $G_i$  y  $G_s$ , respectivamente), lo que promueve un intercambio de GTP por



GDP en la subunidad  $\alpha$  y su disociación de las subunidades  $\beta\gamma$ , activando a la fosfolipasa C ( $\alpha_1$ -AR), inhibiendo a la adenilato ciclasa ( $\alpha_2$ -AR) o activando a la adenilato ciclasa ( $\beta$ -AR) (Finch y Graham, 2006). A la fecha se han clonado 9 diferentes ARs  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ,  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$  (Phillipp y col., 2002).

Los tres  $\alpha_1$ -AR tienen afinidad similar por las catecolaminas, se expresan en las arterias y al unirse a sus agonistas median respuestas simpáticas, como la contracción del músculo liso vascular y cardíaco, y están involucrados en una gran variedad de síndromes cardiovasculares como la hipertensión, la insuficiencia cardíaca y la hipertrofia cardíaca (Waldrop y col., 2002; Ricci y col., 1998). Además de la regulación aguda de la presión sanguínea, las catecolaminas pueden inducir crecimiento endotelial al unirse a los  $\alpha_1$ -AR (Waldrop y col., 2002).

Los  $\alpha_2$ -AR y  $\beta$ -AR son activados por adrenalina, pero pueden ser diferenciados por fármacos con efectos opuestos sobre la adenilato ciclasa. Ambos receptores son homólogos entre sí, con la rodopsina y otros receptores con 7 dominios hidrofóbicos que representan los segmentos transmembranales (Kobilka y col., 1998, Frielle y col., 1988).

Por otro lado, los agonistas  $\beta_2$ -AR tienen una función importante en la terapia contra el asma, los antagonistas  $\beta_1$ -AR son medicamentos de primera



elección para pacientes con hipertensión, enfermedad coronaria o insuficiencia cardiaca crónica (Phillipp y col., 2002).

### **1.3.1.2. Regulación de la presión sanguínea por los receptores adrenérgicos**

Se ha identificado que la hipersensibilidad del músculo liso vascular deriva entre otras cosas por estímulos sobre los  $\alpha_1$ -AR y esto resulta ser el principal factor involucrado en el mantenimiento de la presión arterial durante la hipertensión en ratas espontáneamente hipertensas (SHR), y en otros modelos de hipertensión (Villalobos-Molina e Ibarra, 1999).

Los  $\alpha_1$ -AR se han caracterizado en una gran variedad de vasos. En particular, el  $\alpha_{1D}$ -AR se ha caracterizado con mayor detalle en arterias: aorta, carótida, mesentérica, femoral, iliaca y renal, mediando la contracción por agentes adrenérgicos contribuyendo al control de la presión arterial *in vivo* (Bracho-Valdés y col., 2009).

Se sabe que el mRNA del  $\alpha_{1D}$ -AR está ampliamente distribuido, como el mRNA para  $\alpha_{1A}$ -AR y el  $\alpha_{1B}$ -AR y que sólo es traducido en respuesta a ciertos estímulos, como la pérdida de otros  $\alpha_1$ -AR o en la hipertensión (Hague y col., 2006). Este receptor tiene actividad intrínseca (Rodríguez-Pérez y col., 2009) y muchos de sus antagonistas más comúnmente usados en realidad son agonistas inversos. Estos receptores se mantienen fosforilados en su estado



basal y los agonistas naturales adrenalina y noradrenalina, incrementan su fosforilación, teniendo un efecto similar la activación directa de la proteína cinasa C (García-Sáinz y col., 2001). La activación del  $\alpha_{1D}$ -AR induce contracción en una gran variedad de vasos, a lo que se le atribuye una probable función de control de la presión sanguínea: asimismo, diversos estudios realizados en ratas prehipertensas jóvenes y en adultas espontáneamente hipertensas sugieren que los  $\alpha_{1D}$ -AR vasculares están involucrados en la génesis y mantenimiento de hipertensión (García-Sáinz y Villalobos-Molina, 2004).

Por su parte, los  $\alpha_2$ -AR están involucrados en el control de la presión sanguínea en diferentes regiones aórticas. La activación no selectiva de los  $\alpha_2$ -AR usualmente genera una respuesta bifásica de la presión sanguínea: después de una breve fase de hipertensión, que es más pronunciada tras una rápida inyección intravenosa, la presión arterial disminuye por debajo de los niveles basales (Phillipp y col., 2002). Después de la administración oral de agonistas  $\alpha_2$ -AR, la acción hipotensora prevalece y este efecto se emplea para tratar la presión arterial elevada en pacientes hipertensos. De manera interesante, las dos fases de la respuesta presora están mediadas por dos diferentes receptores  $\alpha_2$  *in vivo* (Phillipp y col., 2002).

### 1.3.2. Óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es un radical libre de vida corta, que se considera mediador en una gran diversidad de funciones biológicas incluyendo las



cardiovasculares, nerviosas, reproductivas, respiratorias, gastrointestinales e inmunológicas. El NO es sintetizado en las células vasculares endoteliales por conversión de la L-arginina en L-citrulina + NO (Török, 2008). En el sistema cardiovascular, el NO es responsable de la vasodilatación dependiente de endotelio y la inhibición de la agregación plaquetaria (Moncada y Higgs, 2006). En el tejido vascular, el NO activa la guanilato ciclasa con un aumento en el monofosfato de guanosina cíclico (cGMP), lo cual lleva a la relajación del músculo liso vascular (Liao y col., 1996).

La conversión de L-arginina en L-citrulina es catalizada por la enzima NO sintasa, de la cual se conocen tres isoformas: la NOS endotelial (eNOS), la NOS neuronal (nNOS) y la NOS inducible (iNOS) (Nelson y col., 2000). Las NOS comparten la actividad catalítica de convertir L-arginina en L-citrulina, pero se pueden dividir en dos clases funcionales, basadas en la dependencia de calcio: las formas constitutivas eNOS y nNOS requieren calcio para su actividad, mientras que la iNOS es independiente de calcio (Nelson y col., 2000; Gobbetti y col., 1999). La sustancia comúnmente empleada para activar los receptores endoteliales es la acetilcolina que al unirse a los receptores muscarínicos desencadena la liberación de calcio lo que induce la activación de la eNOS (Török, 2008).

Se ha reportado en diversos estudios, que la inhibición de la síntesis de NO se asocia con hipertensión arterial y vasoconstricción renal.



La liberación de NO a la microcirculación ocurre de manera continua, moderando los efectos de la circulación local de vasoconstrictores circulantes, ayudando a regular la presión sanguínea y el flujo sanguíneo en un órgano específico (Ribeiro y col., 1992).

### 1.3.3. Sistema renina-angiotensina

El sistema renina-angiotensina (RAS) tiene una función muy importante en la regulación de procesos fisiológicos del sistema cardiovascular. La principal molécula efectora de RAS es la angiotensina II (Ang II) y ésta se ha descrito como una hormona que afecta la función de prácticamente todos los órganos incluyendo el corazón, los riñones, la vasculatura y el cerebro, participando en efectos benéficos o patológicos (Mehta y Griendling, 2007). La estimulación aguda con Ang II regula la homeostasis de sal/agua y la vasoconstricción, modulando la presión arterial, mientras que la estimulación crónica promueve hiperplasia e hipertrofia de las células del músculo liso vascular (CMLV) y del músculo cardíaco (Geisterfer y col., 1988). Además, la exposición prolongada a la Ang II genera hipertrofia y remodelación cardíaca, restenosis in-stent, reducción de la fibrinólisis y fibrosis renal (Mehta y Griendling, 2007).

Los mecanismos que controlan la formación y degradación de Ang II son importantes en la determinación de su efecto fisiológico final. El octapéptido Ang II se forma por conversión enzimática de angiotensinógeno a angiotensina I (Ang I) por la actividad de la aspartil proteasa de renina, y posteriormente, la



conversión de Ang I a Ang II por la enzima convertidora de angiotensina (ECA). La activación del receptor para renina también incrementa la conversión de angiotensinógeno a Ang I, con la activación resultante de las MAPKs. De manera interesante, un nivel alto del mRNA del receptor de renina está presente en el corazón y se han localizado receptores de renina en el endotelio de las arterias coronarias y renales (Nguyen y col., 2002). El efecto específico en los tejidos del aumento de Ang II y de la actividad de RAS depende de la expresión celular y activación de receptores a la angiotensina I (AT<sub>1</sub>Rs), cuya función es crítica en la fisiopatología de muchas enfermedades renales y cardiovasculares (Mehta y Griendling, 2007).

La Ang II generada por el RAS regula de forma importante la presión arterial sistémica. Se ha reportado que los componentes del RAS, como la actividad plasmática de renina, la concentración de renina en plasma y la liberación renal de renina pueden estar aumentadas en animales hipertensos, sugiriendo su participación en la patogénesis de la hipertensión e hipertrofia cardíaca (Figueroa-Guillén y col., 2009).

### 1.3.3.1. Receptores de Angiotensina

Los receptores para la Ang II son de dos tipos y pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, los receptores AT<sub>1</sub> (AT<sub>1</sub>R) y los receptores AT<sub>2</sub> (AT<sub>2</sub>R). Estos receptores comparten 34% de sus



características (Mehta y Griendling, 2007).

Los AT<sub>1</sub>R median la mayoría de las funciones de la Ang II y están ampliamente distribuidos en todos los órganos incluyendo hígado, adrenales, cerebro, riñón, corazón y vasculatura. El AT<sub>1</sub>R regula los efectos finales de Ang II en el tejido blanco (Mehta y Griendling, 2007).

Por otro lado, los AT<sub>2</sub>R inducen efectos antiproliferativos y proapoptóticos en las células vasculares del músculo liso, es decir, producen efectos antagónicos a los estímulos de los AT<sub>1</sub>R (Griendling y col., 1996). Los AT<sub>2</sub>R están altamente expresados en tejido fetal, incluida la aorta fetal, el mesénquima gastrointestinal, tejido conectivo, sistema esquelético, cerebro y médula adrenal; su expresión disminuye al momento del nacimiento, lo que sugiere que actúan en el desarrollo fetal y pueden ser inducidos más tarde en la vida adulta en condiciones patológicas, entre las que se incluyen insuficiencia e hipertrofia cardíaca (Shanmugam y col., 1996).

#### 1.4. Hipertensión arterial

La hipertensión es una enfermedad cardiovascular que se ha asociado con un aumento de catecolaminas circulantes en plasma, hipersensibilidad del sistema nervioso simpático, incremento del tono vascular y de las resistencias periféricas (Lyssand y col., 2008; Tanoue y col., 2002; Villalobos-Molina e Ibarra, 1999). Un regulador clave del sistema nervioso simpático son los receptores  $\alpha_1$ -



adrenérgicos ( $\alpha_1$ -AR), que se activan por catecolaminas endógenas (adrenalina y noradrenalina) para contraer el músculo liso vascular, aumentando las resistencias periféricas y la presión arterial (Lyssand y col., 2008).

El Instituto Nacional de Corazón, Pulmones y Sangre (NHLBI de E.U.A.) clasificó la presión arterial en adultos (mayores a 18 años) en varias categorías. La presión sanguínea normal está definida como la presión arterial sistólica (PAS) menor de 120 mmHg y la presión arterial diastólica (PAD) menor a 80 mmHg, mientras que la prehipertensión ha sido definida con PAS entre 120-139 mmHg y PAD 80-89 mmHg. La etapa uno de la hipertensión, se define con PAS 140-159 mmHg y PAD de 90-99 mmHg, mientras que la etapa dos con PAS mayor de 160 mmHg y PAD mayor a 100 mmHg (Tabla 1.4.1, Lye y col., 2009).

**Tabla 1.4.1. Clasificación de la presión arterial según el Instituto Nacional de Corazón, Pulmones y Sangre (Lye y col., 2009)**

	Presión arterial sistólica (mmHg)	Presión arterial diastólica (mmHg)
<b>Normotenso</b>	< 120	< 80
<b>Prehipertensión</b>	120-139	80-90
<b>Hipertensión I</b>	140-159	90-99
<b>Hipertensión II</b>	> 160	> 100

La hipertensión puede ser primaria o secundaria. La hipertensión primaria es de etiología multifactorial y se presenta en  $\approx 95\%$  de los casos, mientras que la hipertensión secundaria puede resultar de: embarazo, la apnea del sueño, el síndrome de Cushing, daño renal, menopausia, entre otras causas. Como se



mencionó, las causas de la hipertensión primaria no son muy claras, sólo se han identificado algunos factores que incrementan el riesgo de padecerla, como son hipercolesterolemia, diabetes mellitus, incremento fisiológico de la renina, desequilibrio en el perfil de hormonas sexuales, entre otros (Lye y col., 2009).

Según la Norma Oficial Mexicana NOM-030-SSA2-1999, la hipertensión arterial es una de las enfermedades crónicas con mayor prevalencia. En efecto, alrededor de 30% de la población de 20 a 69 años la padece, y cerca del 60% de los individuos afectados desconoce su enfermedad. Esto significa que en México hay más de 15 millones de hipertensos, y de ellas mas de 8 millones no han sido diagnosticadas. La hipertensión arterial es un importante factor de riesgo de las enfermedades cardiovasculares y renales (ENSANUT, 2006).

## 2. Justificación

La hipertensión arterial es un problema de salud pública a nivel nacional. Según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT, 2006), la prevalencia de HTA en mujeres aumenta a partir de los 50 años de edad, etapa que coincide con la menopausia y el subsecuente desbalance hormonal, lo que sugiere que las hormonas proveen protección durante las primeras décadas de la vida de la mujer ante tal patología; sin embargo, no se conoce el mecanismo preciso por lo que esto ocurre. Como se mencionó anteriormente, existen reportes que indican la acción vascular de progesterona, pero no se ha descrito



si la hormona modula la respuesta vascular a las catecolaminas, por lo que el presente trabajo representa una exploración de algunos de los procesos y mecanismos en los que está involucrada la progesterona a nivel de receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos vasculares durante la hipertensión arterial.

### 3. Hipótesis

La progesterona disminuye los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  vasculares durante la hipertensión.

### 4. Objetivo General

Evaluar los efectos de la progesterona en la hipertensión inducida por deficiencia de óxido nítrico en ratas hembras.

#### 4.1 Objetivos particulares

- Determinar el efecto de progesterona sobre la presión arterial, en la rata descerebrada y desmedulada.
- Determinar el efecto de la progesterona sobre la función de los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos, en la arteria aorta torácica de ratas hipertensas.
- Determinar el efecto de la progesterona sobre la densidad proteica de los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos, en la arteria aorta torácica de ratas hipertensas.
- Determinar el efecto de la progesterona sobre la producción de óxido nítrico en ratas hipertensas.



## **5. Materiales y métodos**

### **5.1. Material biológico**

Ratas hembra de la cepa Wistar de 200-250g.

36

### **5.2. Reactivos con grado analítico**

Todos los reactivos con grado analítico empleados en este trabajo fueron obtenidos de Sigma, Aldrich. N<sup>o</sup>-Nitro-L-Arginina metil éster (L-NAME), acetato de medroxiprogesterona, clorhidrato de fenilefrina, clorhidrato de rauwolscina, clorhidrato de (dl)-propranolol, cloroetilclonidina, clorhidrato de RS100329, clorhidrato de BMY7378, progesterona, clorhidrato de carbacol.

### **5.3. Equipo**

Balanza para animales, equipo para ensayos funcionales en sistema de órgano aislado (Biopac Systems), cámaras para electroforesis vertical (BioRad), cámara para transferencia (BioRad), transductor de presión acoplado a un sistema LETICA (pletismógrafo), bomba de respiración (Bioscience), sistemas de adquisición de datos MP100 Biopac Systems.

### **5.4. Metodología**

#### **5.4.1. Animales**

Las ratas tuvieron libre acceso a agua y alimento. Todos los procedimientos se llevaron a cabo conforme a la NOM-062-ZOO-1999 sobre el



manejo y cuidado de animales de laboratorio. Cada uno de los animales fue pesado y marcado para su distribución en grupos.

#### 5.4.1.1. Ovariectomía.

37

Uno de los principales modelos para simular el estado menopáusico en cuestión hormonal es mediante la ovariectomía. Dentro de los grupos experimentales se emplearon ratas a quienes se les realizó ovariectomía (OVX) bilateral bajo anestesia con ketamina (70 mg/ kg i.m.) y xilazina (7 mg/kg i.m.). Una vez que los animales fueron anestesiados, se realizó una incisión en la parte posterior del abdomen, se introdujeron unas pinzas y se localizó la trompa de Falopio y fue ligada cerca de la altura del ovario e inmediatamente se procedió a extirpar el ovario y suturar el tejido muscular subcutáneo mediante sutura continua y mediante sutura con puntos la piel del animal; así mismo, se realizó del otro lado la cirugía.

Posterior a la cirugía, las ratas recibieron ácido acetilsalicílico vía oral en el agua de beber (55 mg/ kg) por 3 días. Y se dejaron en recuperación de dos a tres semanas para asegurar la ausencia de hormonas ováricas circulantes, después de ese tiempo, se dividieron en grupos aleatoriamente para cada grupo y/o modelo de experimentación.



#### **5.4.1.2. Inducción de hipertensión**

En los animales de los grupos hipertensos, tanto controles como ovariectomizados, se indujo hipertensión en los animales por la administración de un inhibidor de las sintasas de óxido nítrico de L- NAME (Sigma Aldrich) en una dosis de 75 mg/kg/día/3 semanas vía oral en el agua de beber. Se corroboró la hipertensión de cada uno de los animales en estudio, al medir la presión arterial sistólica por pletismografía semanalmente, igualmente, se ajustó la dosis del fármaco de acuerdo al peso de los animales.

#### **5.4.1.3. Determinación de la presión arterial sistólica**

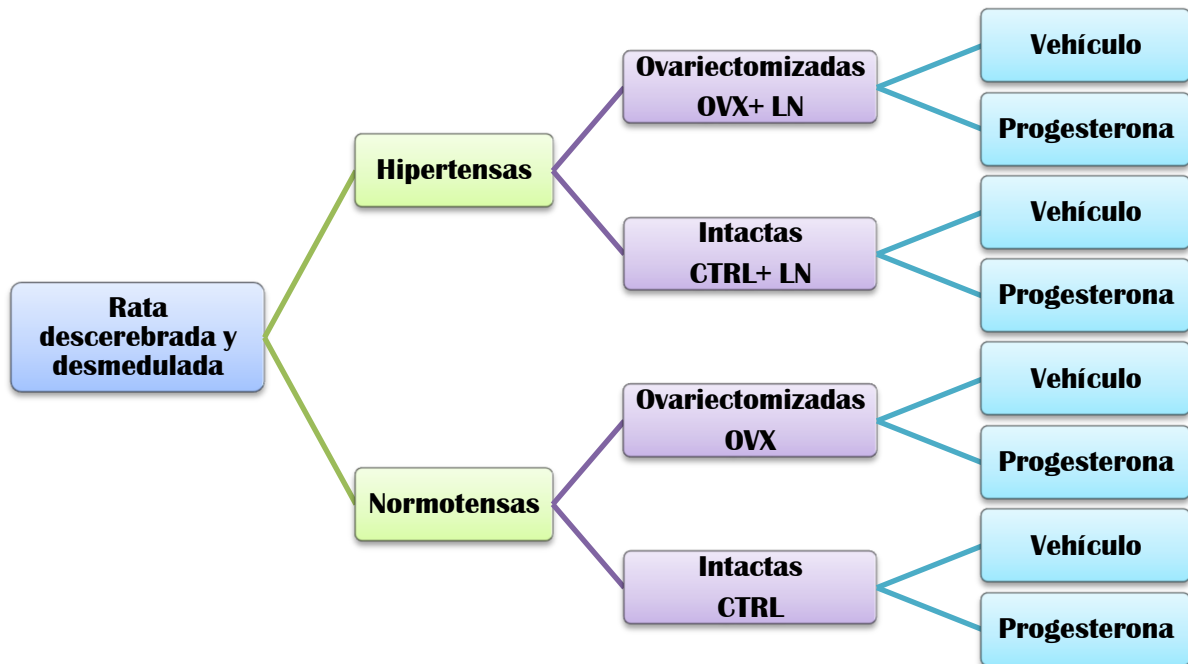
Se determinó la presión sanguínea semanalmente en la cola de la rata por pletismografía, usando un transductor de presión LETICA (Panlab, Barcelona, España), con temperatura controlada.

#### **5.4.1.4. Administración de acetato de medroxiprogesterona (MPA)**

Los animales de los grupos OVX+MPA e OVX+LN+MPA, fueron tratados con 15 mg/rata/semana/4 semanas de medroxiprogesterona por vía intramuscular (Roveri y col., 2000), tras la tercera semana de administración de L-NAME.

### 5.4.2. Efecto de la progesterona sobre la presión arterial en la rata descerebrada y desmedulada.

Para la evaluación del efecto agudo de la progesterona, se emplearon animales normotensos e hipertensos (tratados con L-NAME), tanto ovariectomizados como controles sin ovariectomía. La distribución de los mismos se muestra en la figura 5.4.2.1, (n=4):



**Figura 5.4.2.1.** Distribución de animales para la determinación del efecto agudo de la progesterona en el modelo de rata descerebrada y desmedulada.  
OVX= Ovariectomizadas, CTRL= Grupo control, LN= L-NAME

Cada animal se anestesió en una cámara saturada con éter etílico. Una vez anestesiados, se practicó una traqueostomía para dar respiración asistida durante el experimento con una bomba (Harvard ®). Posteriormente, se introdujo



un estilete metálico por la órbita ocular para destruir las estructuras cerebrales, encontrar el *foramen magnum* y llegar a la médula espinal para eliminar por completo la influencia del sistema nervioso central, de este modo sólo se observan las respuestas periféricas. Inmediatamente después se conectaron a la bomba de respiración (56 ciclos/ min; volumen 20 ml/ kg, Bioscience). Posteriormente, se canuló la arteria carótida para conectarla al transductor y realizar los registros de presión arterial con ayuda de un software computacional conectado a un sistema de adquisición de datos (MP100; Biopac Systems Inc. Santa Barbara, CA, USA), y se cortaron los nervios vagos. Asimismo, se canuló la vena femoral para la administración de fármacos.

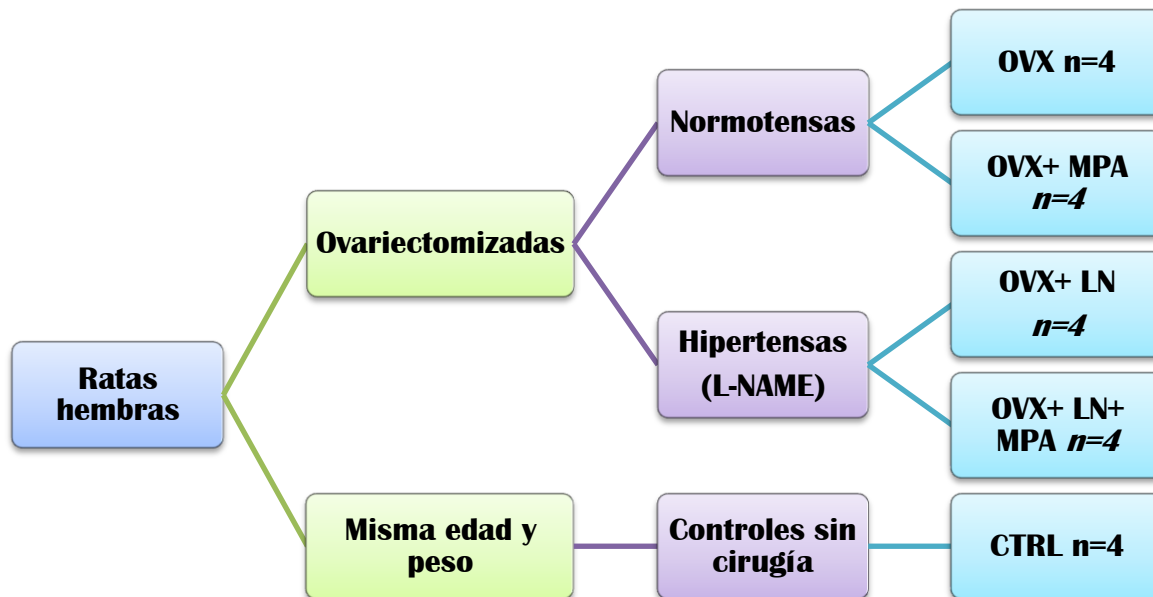
Una vez montados los animales, se permitió un periodo de estabilización de al menos 15 minutos, enseguida se administró la progesterona y/o vehículo, según fuera el caso y se esperaron 40 minutos para iniciar la curva dosis – respuesta a fenilefrina desde 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  hasta 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , iv.



### 5.4.3. Efecto de la progesterona sobre la función de los receptores $\alpha_1$ adrenérgicos en la aorta torácica de ratas hipertensas.

Las ratas se dividieron en cuatro grupos para el ensayo de pruebas funcionales en órgano aislado, la distribución se muestra en la figura 5.4.3.1:

41



**Figura 5.4.3.1.** Distribución de animales para la evaluación del efecto crónico de la progesterona en ensayos funcionales en órgano aislado.  
LN= L-NAME, OVX= Ovariectomía, MPA= Acetato de medroxiprogesterona.

Una vez finalizado el tratamiento para cada condición experimental, las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg/kg ip). Posteriormente se extrajo la arteria aorta torácica, retirándole el tejido conectivo y grasa para ser cortada en anillos de 3-4 mm de longitud. Los anillos se introdujeron en cámaras para órgano aislado con 10 ml de solución Krebs-Henseleit, con la siguiente



composición (mM): NaCl, 118; KCl, 4.7;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.2;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.2;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 2.5;  $\text{NaHCO}_3$ , 25.0; dextrosa, 11.7; EDTA, 0.026 (Ibarra y col., 2000).

Las cámaras para órgano aislado se mantuvieron a 37 °C, pH 7.4 y con burbujeo constante con una mezcla de 95%  $\text{O}_2$  y 5%  $\text{CO}_2$ . Cada anillo arterial se montó en dos ganchos de níquel, con uno de estos ganchos se fijó la preparación al fondo de la cámara y con el otro gancho se fijó a un transductor de tensión (Grass FT03 force displacement transducer; Astro-Med, Inc. West Warwick, RI, USA), conectado a un sistema de adquisición de datos (MP100; Biopac Systems Inc. Santa Barbara, CA, USA), para registrar cambios en la tensión isométrica desarrollados por los anillos arteriales.

Los anillos arteriales se sometieron a una tensión inicial de 3 g y se sensibilizaron 3 veces, a intervalos de 30 minutos, con una concentración submáxima de fenilefrina ( $1 \times 10^{-7}$  M) y se construyeron curvas concentración-respuesta a la fenilefrina ( $1 \times 10^{-9}$  –  $31.6 \times 10^{-6}$  M). Después de la primera curva a la fenilefrina (curva control) se realizaron curvas concentración-respuesta en presencia de concentraciones crecientes de RS100329, un antagonista selectivo de los  $\alpha_{1A}$ -AR, con cloroetilclonidina, un agente alquilante selectivo para los  $\alpha_{1B}$ -AR y agonista parcial de los  $\alpha_{1D}$ -AR, y con BMY 7378, un antagonista selectivo de los  $\alpha_{1D}$ -AR, 30 minutos antes y durante la curva al agonista.



Se emplearon concentraciones de  $3.1 \times 10^{-9}$  M,  $1 \times 10^{-8}$  M y  $3.1 \times 10^{-8}$  M de los antagonistas BMY 7378 y RS100329 y una concentración única de  $6.5 \times 10^{-6}$  M para cloroetilclonidina (CEC).

Todas las curvas se realizaron en presencia de rauwolscina ( $1 \times 10^{-7}$  M) y propranolol ( $1 \times 10^{-7}$  M), para antagonizar las respuestas mediadas por los  $\alpha_2$  y  $\beta$ -AR, respectivamente.

Las soluciones se prepararon diariamente y las concentraciones fueron calculadas de acuerdo con la base libre de las sustancias.

#### **5.4.4. Efecto de la progesterona sobre la densidad proteica de los receptores $\alpha_1$ adrenérgicos en la aorta torácica de ratas hipertensas.**

##### **5.4.4.1. Homogenización**

Las aortas aisladas de los animales de los 4 grupos ( $n = 4$  por grupo) se homogenizaron individualmente con un homogenizador (Polytron, Kinematica AG Littau; Switzerland) en solución Tris-HCl (0.1 M, pH 7.4), que contiene una mezcla de inhibidores de proteasas (PMSF, TLCK e IAA) y se centrifugaron a  $12000 \times g$  durante 5 min a  $4^\circ\text{C}$ .



#### 5.4.4.2. *Determinación de la concentración de proteínas*

La concentración de proteínas se determinó con el método de Lowry (Lowry y col., 1951), realizándose por duplicado en cada ocasión.

44

La curva de calibración se construyó agregando volúmenes correspondientes a 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50  $\mu\text{g}$  de proteína, a partir de una solución madre de 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de albúmina sérica bovina y se completó con agua destilada a un volumen total de 200  $\mu\text{l}$ . Para las muestras problema se tomaron 200  $\mu\text{l}$  del homogenizado.

Se preparó solución C formada por 50 ml de solución A (carbonato de sodio al 2% con hidróxido de sodio al 0.4% y tartrato de sodio y potasio al 0.02%) y 1 ml de solución B (sulfato de cobre pentahidratado al 0.5%); 1 ml de la mezcla así formada se agregó a las muestras y a los tubos de la curva control y se dejaron incubar 10 minutos a temperatura ambiente, al cabo de ese tiempo se adicionaron tanto a la curva de calibración como a las muestras problema 100  $\mu\text{l}$  de reactivo de Folin-Ciocalteu 1N se mezclaron bien, se dejaron incubar por 30 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 750 nm, en un espectrofotómetro con lámpara de luz visible.



#### 5.4.4.3. Electroforesis

Alícuotas de las muestras (200  $\mu$ l) se mezclaron con 10  $\mu$ l de buffer de carga con 10 % de  $\beta$ -mercaptoetanol (agente reductor) y con 10  $\mu$ l de urea y se hirvieron (a  $\approx$ 100°C durante 10 min) para desnaturalizar las proteínas.

45

Se prepararon geles SDS-PAGE al 10% y se realizó el cálculo correspondiente para cargar 50  $\mu$ g de proteína de la muestra y en un pozo se cargaron 10  $\mu$ l de marcador de peso molecular (Rainbow; Amersham). La electroforesis se corrió durante 2 h a 80 V, para separar las proteínas en función de su peso molecular a favor de un gradiente eléctrico.

#### 5.4.4.4. *Transferencia*

Una vez terminada la electroforesis, las proteínas separadas en el gel se transfirieron a membranas de PVDF (fluoruro de polivinildieno) empleando una cámara de transferencia en semiseco (Bio-Rad) durante 45 min a 15 V.

#### 5.4.4.5. Bloqueo de las membranas e incubación con anticuerpos

Una vez hecha la transferencia, las membranas se bloquearon con solución buffer de lavado TBST, con 5 % leche baja en grasas, durante 1 h a temperatura ambiente.



Posteriormente, las membranas se incubaron con anticuerpo policlonal de cabra contra los receptores adrenérgicos  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  o  $\alpha_{1D}$  ( $\approx 105$  kDa) o contra  $\beta$ -actina ( $\approx 43$  kDa; Santa Cruz Biotechnology), diluídos 1:3000 y 1:5000, respectivamente, TBST-leche 5% a 4°C durante toda la noche, con agitación continua.

Las membranas se lavaron 3 veces con TBST durante 10 min y se incubaron con anticuerpo secundario (anti-cabra; Santa Cruz Biotechnology) conjugado con peroxidasa de rábano, diluido 1:5000 en TBST-leche 5% durante 2 h a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces con TBST durante 10 min.

#### 5.4.4.6. Reacción quimioluminiscente

Las membranas se incubaron con sustrato quimioluminiscente (ECL Western Blot detection system; Amersham Biosciences), siguiendo las recomendaciones del fabricante, posteriormente se expusieron a una película (Hyperfilm, Amersham Biosciences) que se reveló inmediatamente dentro de un cassette (Spectroline; Spectronics Corporation).

Las películas se digitalizaron con un escáner ScanJet 3200C (Hewlett Packard) y las imágenes se guardaron en computadora. La intensidad de las bandas se determinó con un software de análisis de imágenes (Multi Gauge WinuE, Fujifilm Analysis Software) y se normalizaron con la intensidad de la  $\beta$ -actina (proteína control).



#### **5.4.5. Efecto de la progesterona sobre la producción de óxido nítrico en ratas hipertensas.**

##### **5.4.5.1. Colecta de muestras**

Para este ensayo se colectaron muestras de orina de los animales de cada grupo experimental empleados para ensayos funcionales en órgano aislado.

Los animales de cada grupo experimental fueron colocados dentro de cajas metabólicas con alimento y agua suficientes, 1 a 3 días previo a la fecha programada para el sacrificio, éstos permanecieron ahí durante 24 horas. Una vez concluido este tiempo, se colectó 1 ml de orina y se almacenó a -80 °C para su posterior análisis.

##### **5.4.5.2. Determinación de la concentración de nitratos y nitritos**

La medición de la concentración de nitratos y nitritos, en muestras tanto de orina como de suero, se realizó con un kit (Cayman Chemical Company, Ann Harbor, MI, USA.) por reacción colorimétrica basada en la reacción de Griess.

Se construyeron curvas de calibración por duplicado y se procesaron las muestras de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Tanto a las muestras como a las curvas de calibración se agregaron 10 µl de la mezcla de cofactores enzimáticos y 10 µl de la enzima nitrato reductasa. Enseguida se cubrió la placa



y se incubó a temperatura ambiente por 1 hr. Una vez transcurrida la incubación, se agregaron 50  $\mu$ l de reactivo de Griess R1 y 50  $\mu$ l de reactivo de Griess R2. Se dejaron reposar las placas por 10 minutos para permitir la formación del color a temperatura ambiente.

Los resultados se obtuvieron en un lector de ELISA midiendo la absorbancia entre 540 y 550 nm. Los valores obtenidos se ajustaron con los datos obtenidos de la curva de calibración.

## 6. Análisis de resultados

Los resultados que se muestran a continuación representan la media  $\pm$  error estándar de 4-6 animales. Se empleó un software estadístico (Sigma Plot, versión 11.0) para construir las gráficas y realizar el análisis estadístico.

Se aplicó la prueba de Dunnet para el análisis de significancia y se consideró como estadísticamente significativos los datos con una  $P \leq 0.05$ .

Para los ensayos funcionales en órgano aislado, los resultados se expresan como porcentaje del efecto máximo obtenido en la curva control, excepto en la curva comparativa de efectos máximos en las que se expresan los datos crudos en gramos.





El cálculo de la concentración efectiva 50 ( $CE_{50}$ ) como valor de  $pD_2$  ( $-\log CE_{50}$ ) se obtuvo por regresión lineal. Los valores de  $pK_B$  fueron calculados con la ecuación de relación de dosis (Furchgott, 1972).

$$K_B = [\text{Antagonista}] / (\text{Relación de dosis} - 1)$$

Donde:

[Antagonista] = Concentración molar del antagonista.

Relación de dosis = Concentración efectiva del agonista en ausencia del antagonista.

El análisis de los Western blots se hizo por densitometría con un software especializado, tomando como proteína control la densidad de la banda de  $\beta$ -actina, los resultados se expresan como porcentaje del grupo control.

En el caso de la determinación de la actividad de las NOS, se representan los datos como concentración  $\mu M$  de nitratos/nitritos.

## 7. Resultados

### 7.1. Efecto de la progesterona sobre la presión arterial en la rata descerebrada y desmedulada.

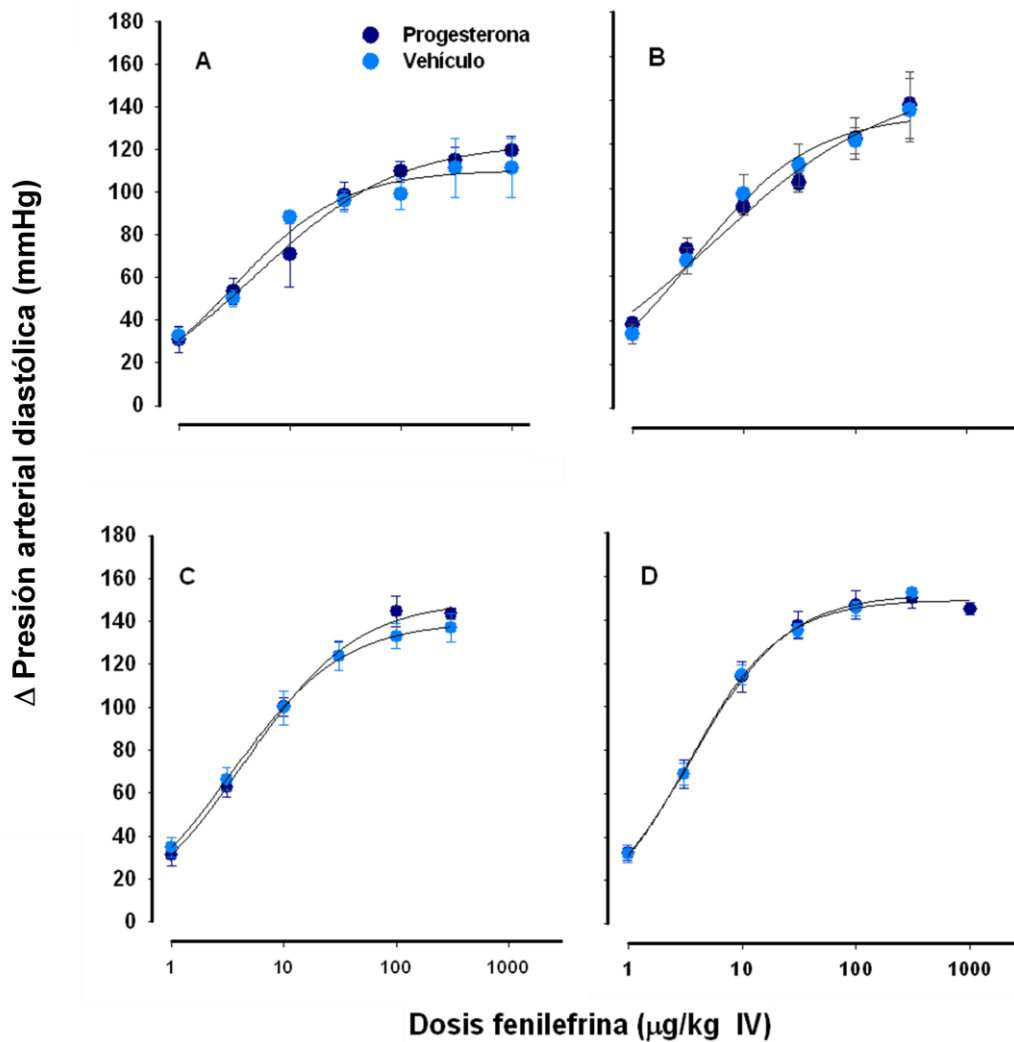


Figura 7.1. Efecto de la progesterona sobre la presión arterial diastólica en ratas descerebradas y desmeduladas. Curvas dosis- respuesta a la fenilefrina en presencia de progesterona y/o vehículo. A. Controles (sin cirugía), B. Ratas ovariectomizadas; C. Controles + L-NAME (75 mg/kg/ día/ 3 semanas) via oral y D. Ovariectomizadas + L-NAME (75 mg/kg/ día/ 3 semanas).



Debido a las características fisicoquímicas de la progesterona fue necesario solubilizarla en aceite de maíz (Thomas y col., 2003), para poder administrarla de manera eficaz vía intravenosa. En la figura 7.1 se muestran los datos obtenidos de la administración de progesterona y/o vehículo (aceite de maíz) intravenosa en el modelo de rata descerebrada y desmedulada, tanto en controles como en ratas tratadas con L-NAME. Podemos observar que la respuesta a fenilefrina en presencia de progesterona y/o vehículo en las ratas normotensas (fig. 7.1 A) y ovariectomizadas (fig. 7.1 B) es similar a la del vehículo por sí solo, lo que indica que el efecto observado no es debido a la acción de la progesterona. Asimismo, se puede ver que la respuesta es ligeramente mayor en las ratas ovariectomizadas (fig. 7.1 B, Tabla 7.1).

Por otro lado, en las figuras 7.1 paneles C y D se muestra la respuesta a fenilefrina de ratas hipertensas por L-NAME por tres semanas (75 mg/kg vía oral) controles sin cirugía (C) y ovariectomizadas (D). Se observa un fenómeno similar al de los animales normotensos, ya que la respuesta es muy similar entre progesterona y vehículo. De igual manera, el efecto máximo es significativamente mayor en el grupo ovariectomizado respecto al grupo control sin cirugía, lo que no ocurre en el caso de los grupos tratados con L-NAME (Tabla 7.1). Sin embargo, se observa desplazamiento hacia la izquierda al comparar los grupos hipertensos (C y D) con sus respectivos controles (A y B), fenómeno esperado al haber administrado un inhibidor de las NOS, con el que disminuyó la producción de NO e incrementó la sensibilidad vascular a estímulos



vasoconstrictores en los animales hipertensos; además disminuyó la DE<sub>50</sub> en comparación con los controles normotensos (Tabla 7.1). Sin embargo, no se observa disminución significativa de la DE<sub>50</sub> entre los animales del grupo (A) y el grupo (C).

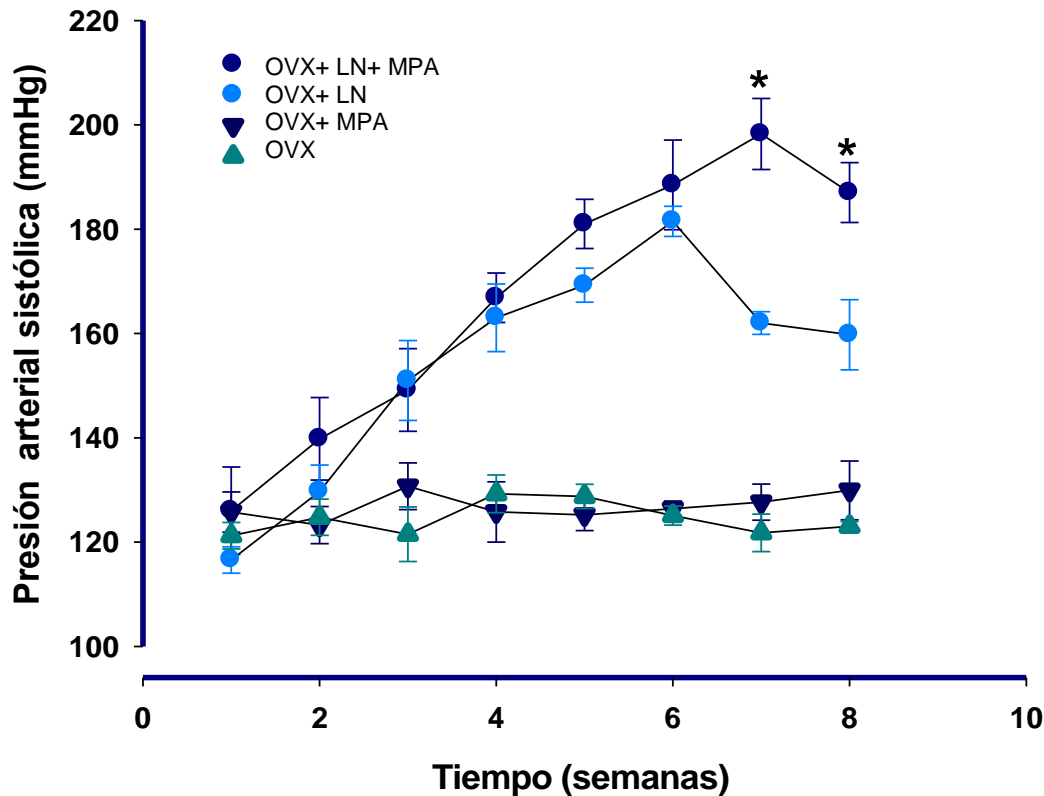
No existen diferencias significativas en la magnitud del efecto máximo entre los grupos hipertensos por L-NAME tanto ovariectomizadas como controles, pero sí entre los animales controles normotensos y los controles ovariectomizados (Tabla 7.1).

**Tabla 7.1. Dosis efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) y efecto máximo (Emax) para las ratas descerebradas y desmeduladas.**

GRUPO	DE <sub>50</sub> (µg/kg)	Emax (mmHg)
CTRL (A)	5.0±2.2	115.1±6.3
OVX (B)	7.4±3.8	137.8±5.2*
CTRL +LN (C)	5.9±1.6	144.4±7.1
OVX+LN (D)	3.6±0.5	149.5±4.5

Curva a fenilefrina en presencia de progesterona y vehículo. CTRL, grupo control normotensas sin cirugía; OVX, ovariectomizadas; CTRL+LN, grupo sin ovariectomizar tratado con L-NAME; OVX+LN, ovariectomizadas tratadas con L-NAME, \*Dunnet's test  $P < 0.05$  vs CTRL y en el caso de los grupos tratados con L-NAME, la comparación es respecto al grupo CTRL+LN.

## 7.2. Monitorización de la presión arterial



**Figura 7.2. Monitorización de presión arterial sistólica (PAS) en animales con tratamiento de acetato de medroxiprogesterona.** Se midió la PAS semanalmente por pletismografía. Los grupos OVX+LN y OVX+LN+MPA fueron tratados con L-NAME durante 7 semanas, La semana 4 corresponde a la primera administración de medroxiprogesterona, para los grupos OVX+ MPA y OVX+ LN+ MPA. \* Dunnett  $P < 0.05$  vs control hipertenso (OVX+LN)

OVX= Ovariectomizados, LN= L-NAME (75 mg/kg vo), MPA= Acetato de medroxiprogesterona (15

En la figura 7.2 se muestran los datos obtenidos de la monitorización de la presión arterial sistólica en los animales usados para ensayos funcionales en órgano aislado. Se puede observar que los grupos normotenso (OVX) y



normotenso + progesterona (OVX+ MPA) mantienen presión arterial sistólica (PAS), dentro de los límites de presión arterial sistólica normal ( $< 120$  mmHg), mientras que el grupo hipertenso (OVX+ LN) mantuvo valores de PAS mayores a 140 mmHg, a partir de la tercera semana de tratamiento con L-NAME. Por otra parte, el grupo hipertenso + progesterona (OVX+ LN+ MPA) mantuvo valores de PAS superiores a 160 mmHg a partir de la cuarta semana de tratamiento, en que inicio el tratamiento con medroxiprogesterona, lo que indica que el L-NAME produjo la hipertensión esperada y a la vez, se observa el incremento de esa condición en el grupo (OVX+LN+MPA), significativa, en las semanas 7 y 8.

### **7.3. Efecto de la progesterona sobre la función de los receptores $\alpha_1$ adrenérgicos en la aorta torácica de ratas hipertensas.**

Al terminar el tratamiento de cada condición experimental, se extrajo el segmento torácico de la aorta, y se cortó en anillos de 3-4 mm de longitud para los ensayos funcionales de órgano aislado. Los anillos arteriales se sometieron a una tensión inicial de 3 g y se construyeron curvas concentración-respuesta a fenilefrina, para después bloquear las respuestas de los  $\alpha_1$ -AR con antagonistas específicos para cada uno; cabe mencionar que todas las curvas se realizaron en presencia de rauwolscina ( $1 \times 10^{-7}$  M) y propranolol ( $1 \times 10^{-7}$  M), antagonistas  $\alpha_2$  y  $\beta$ , respectivamente.

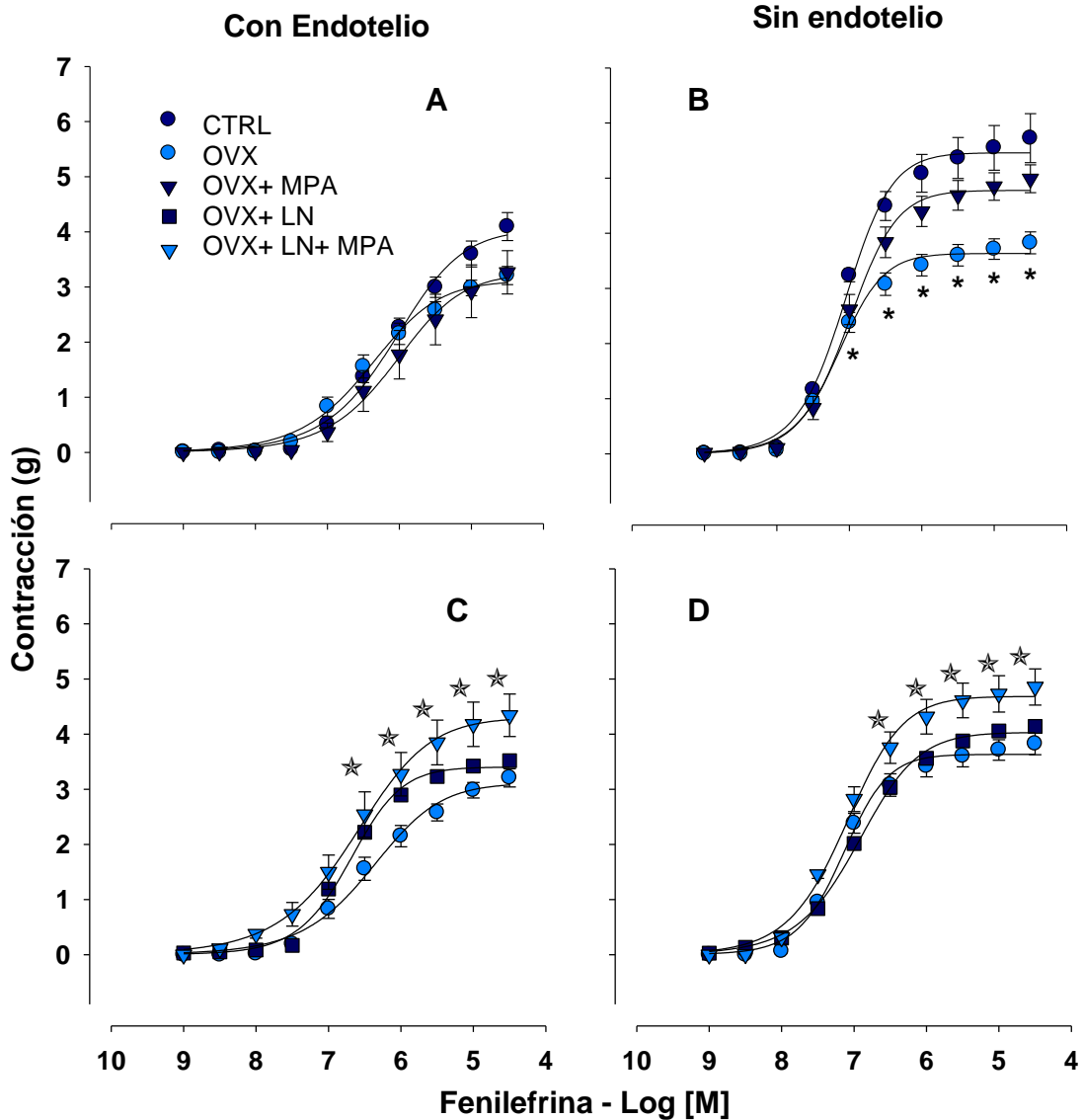
El análisis de la respuesta al agonista (fenilefrina), indica que ésta se modifica de acuerdo con cada condición experimental. En la figura 7.3.1, se



muestra la respuesta a fenilefrina en los diferentes grupos; así, en las gráficas A y B se comparan los grupos control (CTRL) y ovariectomizado (OVX), así como las ovariectomizadas + progesterona (OVX+MPA) en anillos con y sin endotelio. En el primer caso: anillos con endotelio (Figura 7.3.1A), se observó una ligera disminución en la respuesta de los grupos OVX y OVX+MPA, que indica diferencias en la respuesta endotelial a estímulos vasoconstrictores. Por otra parte, en los anillos sin endotelio (Figura 7.3.1B) se observa una disminución de la respuesta del grupo OVX respecto al grupo CTRL; sin embargo, las ratas administradas con progesterona tuvieron un efecto máximo similar al del grupo CTRL (Tabla 7.3.1), esto indica que además del endotelio pueden ocurrir alteraciones en la maquinaria contráctil del músculo liso vascular. En las gráficas 7.3.1C y 7.3.1D se compara la respuesta a fenilefrina entre ratas ovariectomizadas, las tratadas con L-NAME (OVX+LN) y con L-NAME+ Progesterona (OVX+LN+MPA), con y sin endotelio, respectivamente. Se observa que la reactividad vascular disminuye en el siguiente orden:

$$\text{OVX+LN+MPA} < \text{OVX+LN} < \text{OVX}$$

tanto en anillos con endotelio, como sin él; efecto esperado tras inhibir la sintasa de óxido nítrico (L-NAME 75 mg/ kg/ día/ 7 semanas).



**Figura 7.3.1. Evaluación de la función endotelial comparativo entre grupos experimentales.** Curvas concentración – respuesta a la fenilefrina, aorta torácica de ratas hembras Wistar. Los paneles A y C muestran respuestas de anillos con endotelio, mientras que los paneles B y D son las respuestas de anillos sin endotelio. La comparación se realiza entre grupos normotensos (CTRL, OVX y OVX+MPA) en los paneles A y B y en los paneles C y D se comparan los grupos hipertensos (OVX+LN y OVX+LN+MPA) con el control normotenso ovariectomizado (OVX) CTRL, grupo control sin ovariectomizar  $n=6$ ; OVX, ovariectomizadas  $n=4$ ; OVX+LN, ovariectomizadas tratadas con L-NAME  $n=4$ ; OVX+MPA, ovariectomizadas + progesterona,  $n=4$ ; HTP, ovariectomizadas + L-NAME + Progesterona  $n=4$ . \* Prueba de Dunnet,  $P<0.001$  vs CTRL ☆ Prueba de Dunnet,  $P<0.001$  vs OVX.



Asimismo, se observa que la  $CE_{50}$  a la fenilefrina disminuyó significativamente en los grupos con L-NAME ( $P < 0.05$  vs CTRL), mientras que en los grupos OVX y OVX+MPA no hubo diferencias significativas, en los anillos con endotelio. Por otra parte, en los anillos sin endotelio no hubo diferencias significativas en la  $CE_{50}$ , lo que indica que el efecto es endotelial por inhibición de las NOS y no sobre las células del músculo liso vascular (Tabla 7.3.1). En el caso de los efectos máximos, no se observan diferencias en los anillos con endotelio de los animales en las diferentes condiciones experimentales, con un patrón de agonismo completo; mientras que en los anillos sin endotelio, los grupos OVX y OVX+LN tuvieron disminución significativa por ausencia de vasodilatadores del endotelio, aunado a la inhibición de la síntesis de óxido nítrico (Tabla 7.3.1).

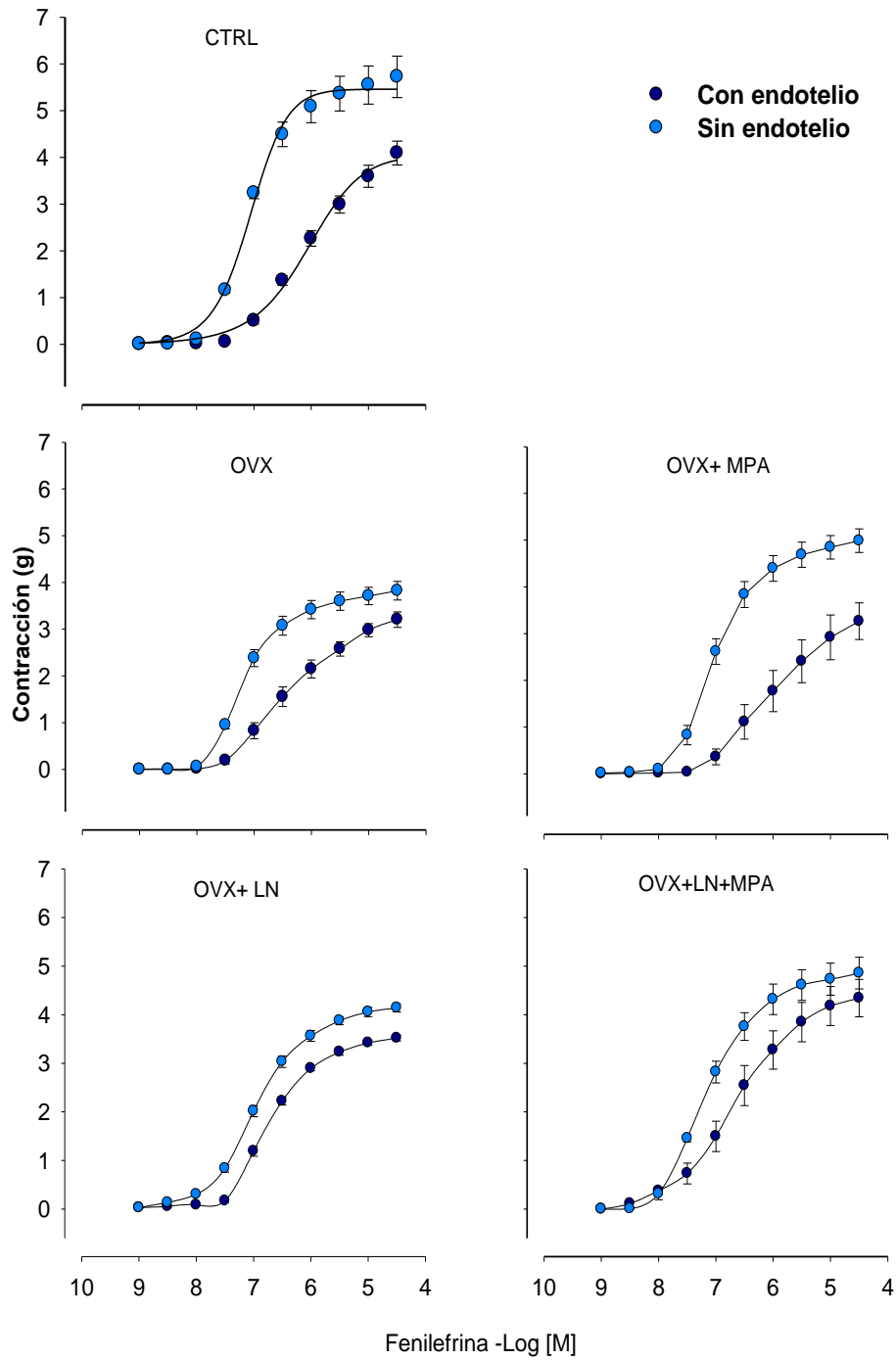
**Tabla 7.3.1. Valores de  $pD_2$  ( $-\log CE_{50}$ ) y efecto máximo ( $E_{max}$ ) en aorta de ratas hembras Wistar.**

	Fenilefrina			
	Con endotelio		Sin endotelio	
	$pD_2$	E max (g)	$pD_2$	E max (g)
CTRL	6.08±0.02	4.03±0.26	7.07±0.07	5.47±0.41
OVX	6.41±0.09	3,10±0.11	7.15±0.03	3.63±0.08*
OVX+ MPA	6.03±0.19	3.25±0.34	7.00±0.05	4.77±0.26
OVX+ LN	6.71±0.05*	3.40±0.06	6.95±0.03	4.03±0.08*
OVX+ LN+MPA	6.63±0.10*	4.29±0.38	7.12±0.01	4.68±0.31

Valores calculados de  $pD_2$  y Efecto máximo en la curva a fenilefrina. CTRL=grupo control normotensas sin cirugía; OVX= Ovariectomizadas; MPA, acetato de medroxiprogesterona (15 mg/kg i.m./ semana/ 3 semanas); LN,= L-NAME(75 mg/ kg/ día/ 7 semanas v.o. ). \*Prueba de Dunnet  $P < 0.05$  vs CTRL.

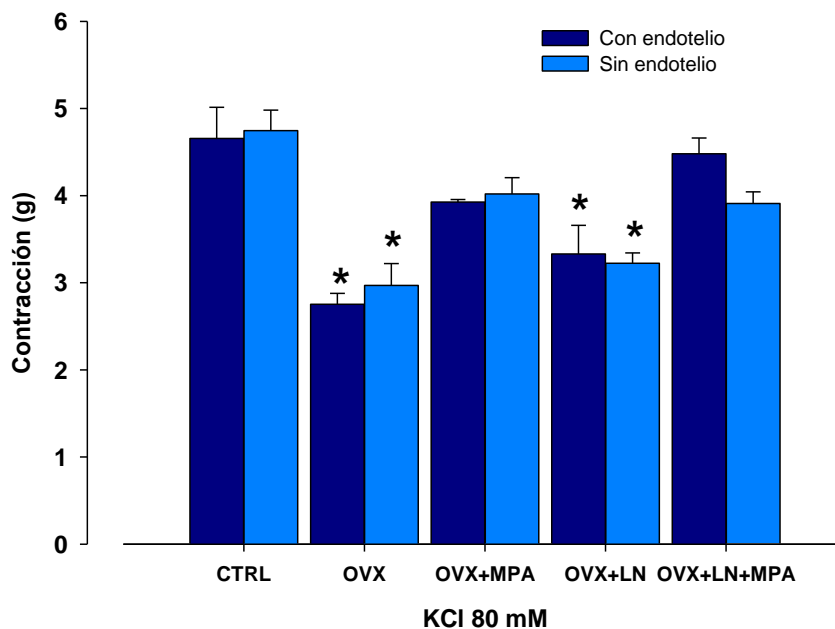


De igual manera, fue posible analizar la función endotelial en las diferentes condiciones experimentales, para ello se construyó la figura 7.3.2 donde se aprecian las diferencias en la reactividad de los anillos con y sin endotelio. Podemos observar que en el grupo CTRL disminuyó claramente la respuesta a causa del endotelio vascular; sin embargo, en el grupo ovariectomizado OVX, la respuesta con endotelio nos habla de que hubo disfunción endotelial, efecto que se ve atenuado con progesterona (como se observa en el grupo OVX+ MPA que tiene un patrón similar al del grupo CTRL). Por otro lado, los animales con L-NAME presentan un efecto máximo muy similar con endotelio como sin él; sin embargo, se distingue una respuesta mayor en el grupo con L-NAME y progesterona (OVX+LN+MPA) en comparación con el grupo con L-NAME únicamente (OVX+LN).



**Figura 7.3.2. Evaluación de la función endotelial en los diferentes grupos de estudio mediante curva a fenilefrina en anillos con y sin endotelio, aorta torácica de ratas hembras Wistar.** CTRL, grupo control sin ovariectomizar  $n=6$ ; OVX, ovariectomizadas  $n=4$ ; OVX+LN, ovariectomizadas + L-NAME  $n=4$ ; OVX+ MPA, ovariectomizadas+ progesterona,  $n=4$ ; OVX+LN+MPA, ovariectomizadas + L-NAME + Progesterona  $n=4$ .

Asimismo, se evaluó el efecto de los diferentes tratamientos a nivel del músculo liso vascular. En la figura 7.3.3 se muestra el efecto máximo al administrar KCl 80 mM, un agente despolarizante de la membrana que permite apertura de los canales de calcio y que induce contracción independiente de receptores. Podemos notar que en anillos con y sin endotelio, la OVX disminuyó significativamente la contracción inducida por KCl, efecto que se observa también en el grupo OVX+LN indicando la existencia de daño en la maquinaria contráctil, más no es significativa en los grupos OVX+MPA ni OVX+LN+MPA, lo que podría indicar que la medroxiprogesterona evitó el daño en el músculo liso vascular.



**Figura 7.3.3. Evaluación de la función contráctil del músculo liso vascular en respuesta a la estimulación de canales de potasio inducida por la adición de KCl 80 mM en arteria aorta torácica de ratas hembras Wistar.** CTRL, grupo control sin ovariectomizar  $n=6$ ; OVX, ovariectomizadas  $n=4$ ; OVX+LN, ovariectomizadas + L-NAME  $n=4$ ; OVX+ MPA, ovariectomizadas + progesterona,  $n=4$ ; OVX+ LN+ MPA, ovariectomizadas + L-NAME + Progesterona  $n=4$ . \* Dunnet's test  $P < 0.05$  vs CTRL.

A continuación, se procedió a evaluar la respuesta contráctil en presencia de antagonistas selectivos para los  $\alpha_1$ -AR.

En la figura 7.3.4, se muestran las curvas empleando BMY 7378 ( $3.1 \times 10^{-9}$  M hasta  $3.1 \times 10^{-8}$  M), antagonista selectivo para los  $\alpha_{1D}$ -AR, se representan las respuestas a fenilefrina de anillos aórticos torácicos con endotelio. Se observa que el grupo CTRL (sin cirugía) muestra un claro desplazamiento a la derecha, estadísticamente significativo ( $P < 0.001$  vs curva control) desde la concentración de BMY 7378 ( $3.1 \times 10^{-9}$  M), y la afinidad del receptor aumentó respecto al valor reportado, mientras que en el grupo OVX mostró un desplazamiento a la derecha estadísticamente significativo ( $P < 0.001$  vs curva control), solamente en la concentración de  $3.1 \times 10^{-8}$  M con similar afinidad al valor reportado (Parés-Hipólito y col., 2006); no es perceptible en el grupo OVX+MPA desplazamiento alguno, lo que sugiere hipersensibilización de la arteria; además disminuyó la afinidad por el receptor, lo que puede atribuirse al efecto de la progesterona administrada. Por el contrario, se puede notar un antagonismo claro de la respuesta contráctil en los grupos OVX +LN y OVX +LN +MPA del tipo no competitivo, con disminución del efecto máximo (Tabla 7.3.2). Esto sugiere que el  $\alpha_{1D}$ -AR participa mediando la respuesta contráctil en los animales de las diferentes condiciones experimentales.

En la figura 7.3.5, se muestran las gráficas de antagonismo por BMY 7378 ( $3.1 \times 10^{-9}$  M -  $3.1 \times 10^{-8}$  M) en los anillos aórticos torácicos sin endotelio, de los



animales en las diferentes condiciones experimentales y que, por tal condición, se producen respuestas contráctiles con un mayor efecto máximo, y en general un desplazamiento a la izquierda respecto a las curvas en presencia de BMY 7378 de anillos con endotelio (Figura 7.3.2), esto debido a la falta de sustancias vasodilatadoras producidas por éste en el primer caso. Al comparar entre sí las gráficas de las diferentes condiciones experimentales, el grupo CTRL muestra un desplazamiento significativo a la derecha ( $P < 0.001$  vs curva control) que indica un patrón de tipo competitivo, y con un valor de afinidad similar a los anillos sin endotelio (Tabla 7.3.4). Al igual que en la figura anterior, en el grupo OVX se observa un ligero desplazamiento a la derecha que indica el bloqueo del efecto máximo con un patrón de antagonismo competitivo, mayormente apreciable en la concentración de  $3.1 \times 10^{-8}$  M de BMY 7378 con un valor de afinidad semejante al del grupo CTRL (Tabla 7.3.4) y asimismo, ligeramente altos respecto al valor de referencia en la literatura (Tabla 7.3.3). Por otro lado, el grupo OVX+ MPA tiene un ligero desplazamiento hacia la derecha, que no se observa en los anillos con endotelio de la misma condición y presenta un valor de afinidad semejante al valor determinado para los dos grupos anteriores (Tabla 7.3.4). En cuanto a los grupos OVX+ LN y OVX+ LN+ MPA, se observa antagonismo competitivo, como en los demás grupos. El patrón de los grupos OVX+ LN y OVX+LN + MPA indica, al igual que en la figura anterior, que el bloqueo del  $\alpha_{1D}$ -AR en los animales hipertensos por L-NAME disminuye la respuesta contráctil, aunque presentan menor desplazamiento en comparación a los demás grupos, en especial al grupo control.

**Tabla 7.3.3.** Valores reportados de afinidad estimada ( $pK_B$  y  $pK_i$ ) para antagonistas  $\alpha_1$ -AR en contracción inducida por el agonista selectivo fenilefrina en aorta de rata y en receptores clonados mediante experimentos de binding (Parés-Hipólito y col., 2006).

	Fenilefrina	$\alpha_{1A}$	$\alpha_{1B}$	$\alpha_{1D}$
<b>RS100329</b>	7.00±0.04	9.60	7.50	7.90
<b>BMY 7378</b>	7.69±0.12	6.60	6.20	8.20

Las gráficas del bloqueo del  $\alpha_{1B}$ -AR con cloroetilclonidina (CEC), agente alquilante que antagoniza la respuesta, aparecen en la figura 7.3.6 para anillos con endotelio. En ella no se observan desplazamientos para todos los grupos experimentales, indicando que no hay bloqueo del receptor, pudiendo deberse a una respuesta relacionada con el género de los animales. Asimismo, en la figura 7.3.7, se representan las respuestas de los anillos aórticos sin endotelio a fenilefrina + CEC, donde se observa desplazamiento a la izquierda de todas las curvas con respecto a los anillos con endotelio en las mismas condiciones, con ello sugerimos que el  $\alpha_{1B}$ -AR no participa en la respuesta contráctil de la aorta de ratas hembras en nuestras condiciones experimentales.

**Tabla 7.3.4.** Valores de  $pK_B$  calculados para BMY 7378 y RS 100329.

	Con endotelio		Sin endotelio	
	BMY 7378	RS100329	BMY 7378	RS100329
<b>CTRL</b>	8.47±0.14	7.78±0.25*	8.50±0.07	8.08±0.13*
<b>OVX</b>	8.18±0.06	ND	8.56±0.22	8.38±0.30*
<b>OVX+ MPA</b>	7.39±0.06*	7.98±0.09*	8.55±0.52	7.98±0.52*
<b>OVX+ LN</b>	7.86±0.09	8.19±0.34*	8.04±0.02	7.97±0.25*
<b>OVX+ LN+ MPA</b>	8.69±0.29	8.50±0.29*	8.42±0.31	ND

ND corresponde a los grupos en los que no hubo desplazamiento en la curva + el antagonista, por lo que no se pudo determinar el valor de  $pK_B$ . \* Dunnet's test  $P < 0.05$  vs valor de  $pK_B$  reportado Tabla 7.3.3.



La figura 7.3.8 representa la respuesta a fenilefrina + el antagonista selectivo para  $\alpha_{1A}$ -AR, RS100329 ( $3.1 \times 10^{-9}$  M -  $3.1 \times 10^{-8}$  M) en la aorta torácica con endotelio de cada uno de los grupos. En el caso del grupo CTRL se distingue un claro desplazamiento a la derecha en todas las concentraciones del antagonista usadas, esto nos indica que este receptor está involucrado en la respuesta contráctil de la aorta en condiciones normales en la fisiología de la hembra; así, podemos observar una disminución significativa en relación con el valor de afinidad calculado y el reportado, mismo que se presenta en todas las condiciones experimentales, excepto en el grupo OVX (Tabla 7.3.4). Por otra parte, en el grupo OVX no hubo desplazamiento alguno, motivo por el cual fue imposible calcular el valor de afinidad por el receptor en este grupo experimental; además podríamos pensar que el  $\alpha_{1A}$ -AR estuviera disminuido en estas condiciones. Para el grupo OVX+ MPA se distingue un desplazamiento a la derecha, antagonismo de tipo no competitivo, puesto que en ninguna de las concentraciones del antagonista se alcanzó el efecto máximo de la curva control; para el grupo OVX+LN se muestra un claro desplazamiento a la derecha, con disminución del efecto máximo, lo que nos indica que el L-NAME modifica la respuesta ante este antagonista, y se observa antagonismo no competitivo. Éste mismo fenómeno ocurre con mayor claridad en el grupo OVX+ LN+ MPA, siendo más evidente el antagonismo no competitivo ejercido por el RS100329 con disminución de la respuesta máxima.





En la figura 7.3.9, se muestra la respuesta contráctil de anillos aórticos sin endotelio ante RS100329 ( $3.1 \times 10^{-9}$  M -  $3.1 \times 10^{-8}$  M). En general, al compararla con los anillos tratados con RS100329 con endotelio (figura 7.3.6), se distingue un desplazamiento de todas las curvas hacia la izquierda presentando también un mayor efecto máximo. Ahora bien, en este caso, los desplazamientos a la derecha en la gráfica del grupo control son más discretos indicando antagonismo de tipo competitivo y se observa disminución significativa de la constante de afinidad, respecto al valor reportado, en todos los grupos excepto en el grupo OVX+ LN+ MPA. Es posible visualizar un desplazamiento a la derecha con patrón de antagonismo competitivo para OVX, que se hace más evidente en la concentración de  $3.1 \times 10^{-8}$  M de RS100329; mientras que para el grupo OVX+ MPA no se observa desplazamiento respecto a la curva control, excepto en la mayor concentración del antagonista ( $3.1 \times 10^{-8}$  M). De igual manera, ocurre un desplazamiento a la derecha muy discreto en la aorta de ratas OVX+ LN, que no se percibe en las OVX+ LN+ MPA, motivo que imposibilitó el cálculo de la constante de afinidad en este grupo. Esto nos indica que el bloqueo de la respuesta contráctil con RS100329, en anillos aórticos sin endotelio, es mucho menos apreciable que en el caso de anillos con endotelio en las mismas condiciones, sugiriendo que el efecto sobre este receptor ocurre porque está presente en el endotelio vascular.

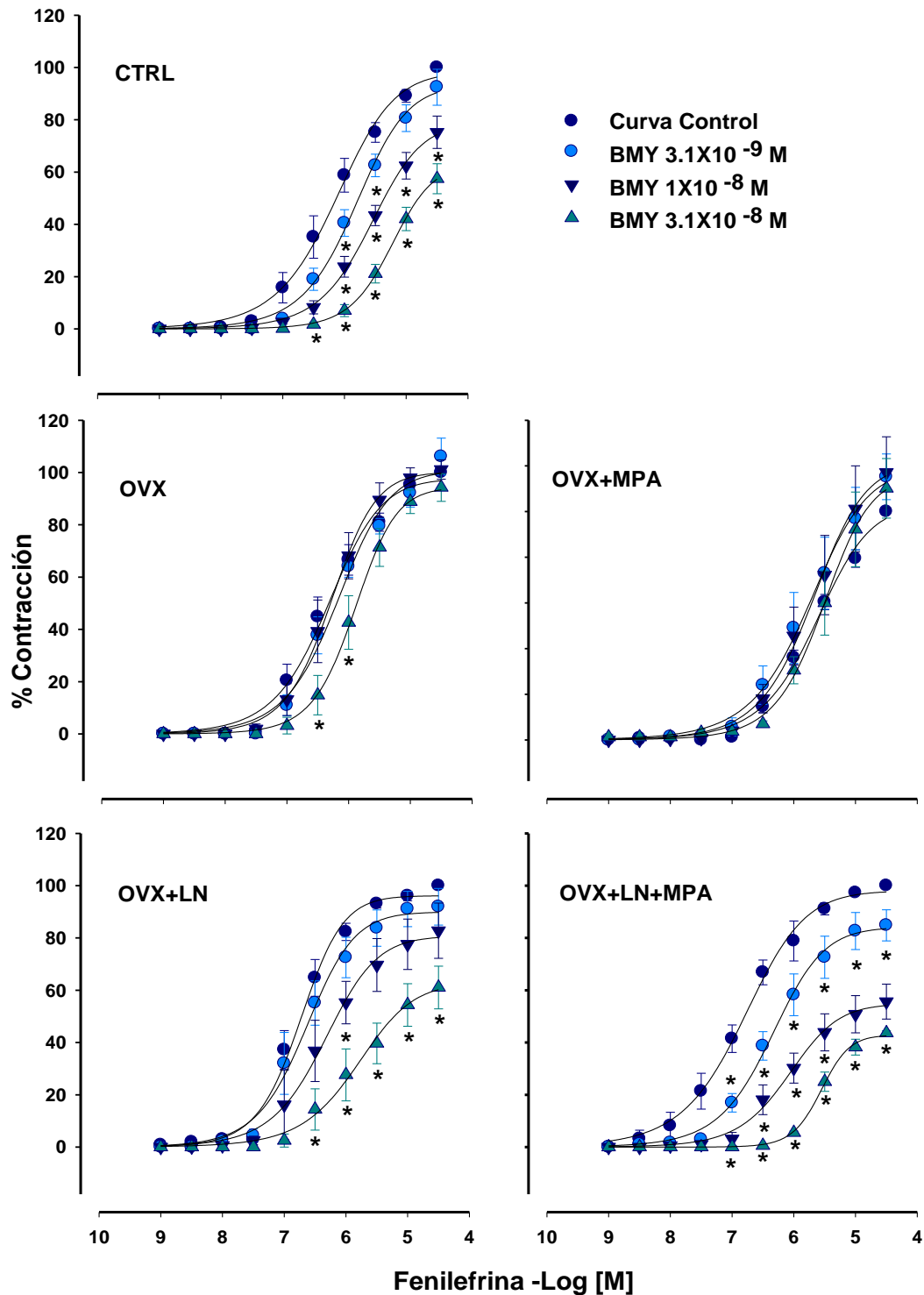
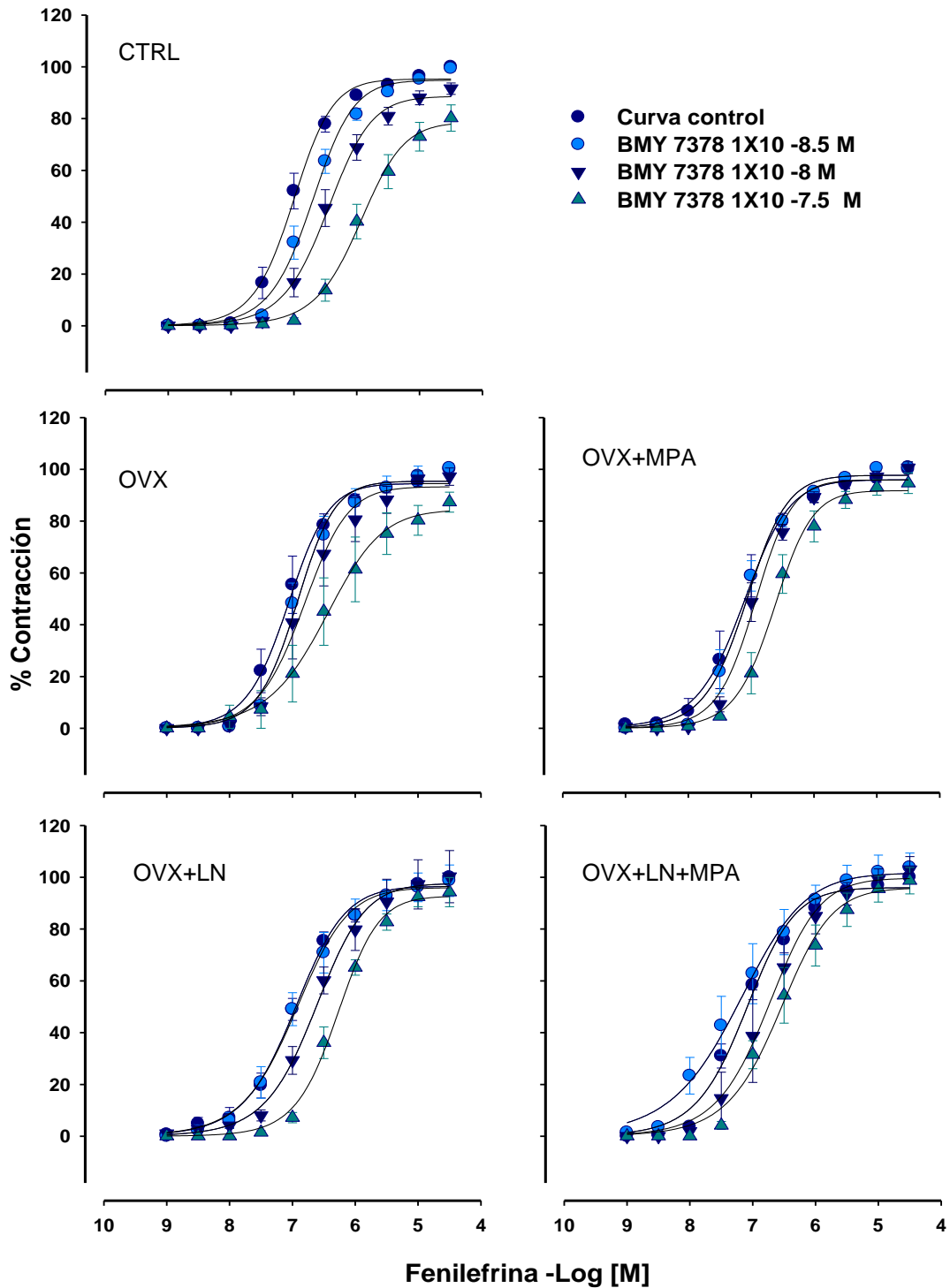
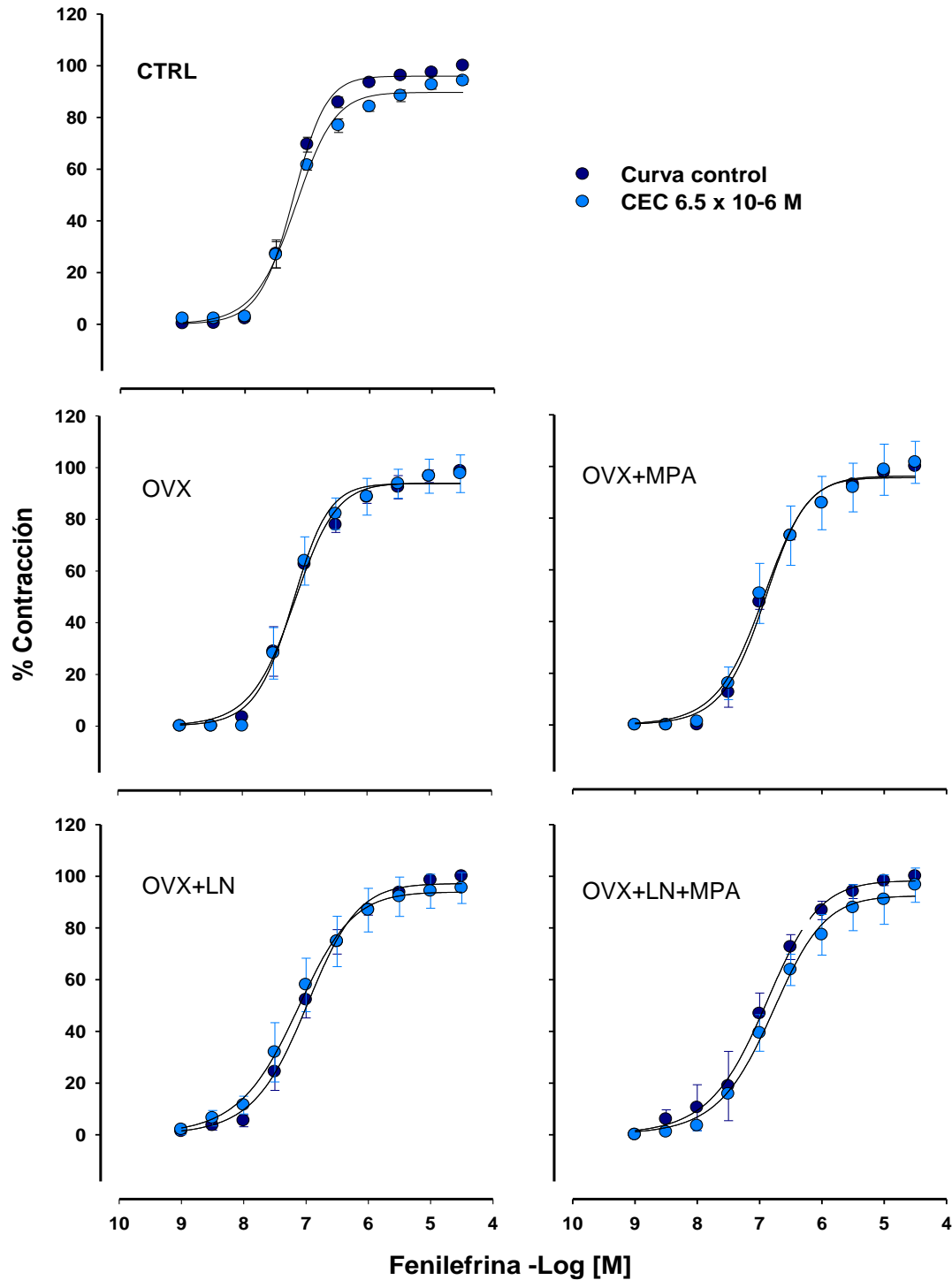


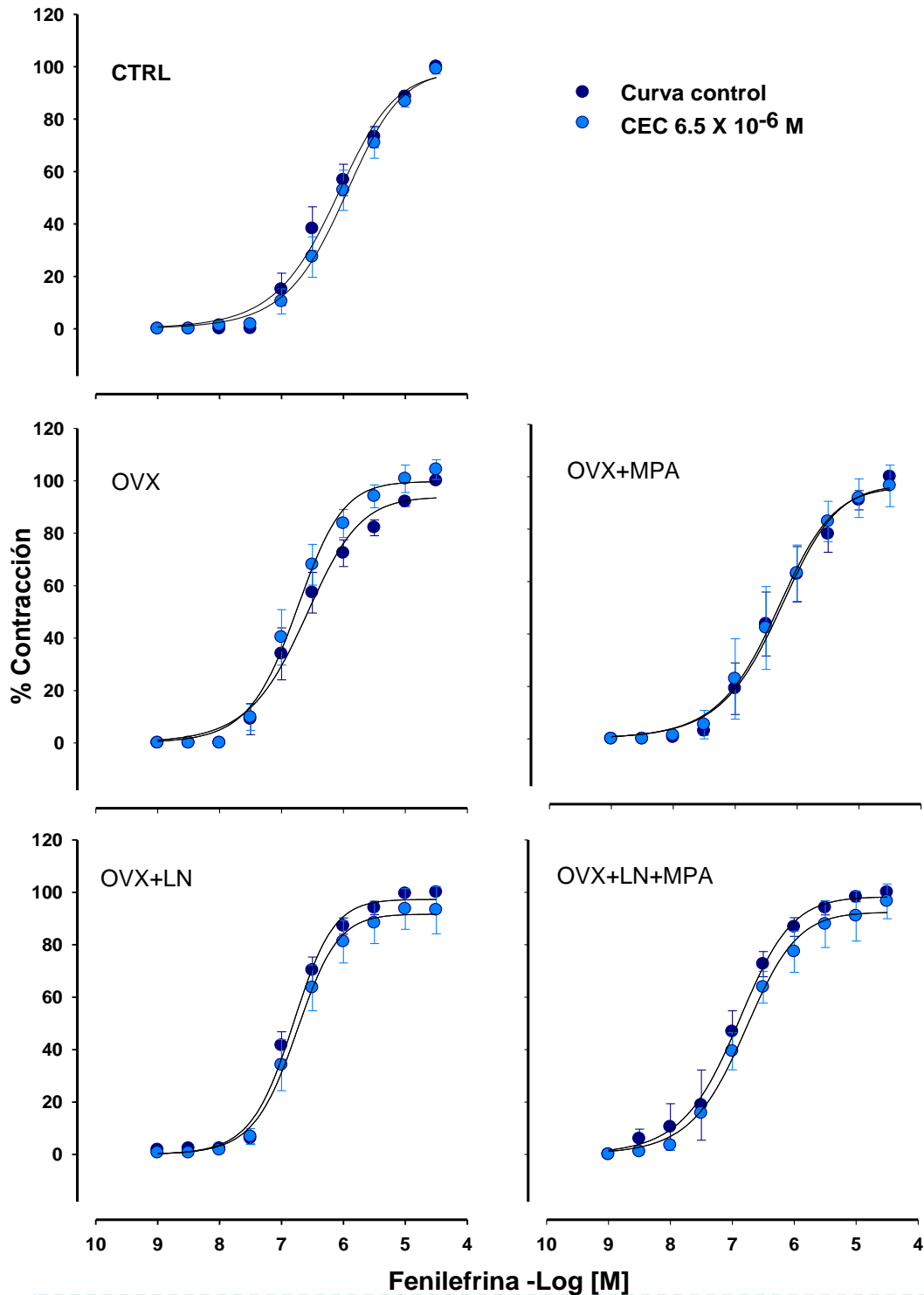
Figura 7.3.4. Caracterización farmacológica del receptor adrenérgico  $\alpha_{1D}$  mediante curvas concentración - respuesta a la fenilefrina + BMY 7378 en aorta torácica con endotelio de ratas hembras Wistar. CTRL, grupo control sin ovariectomizar  $n=6$ ; OVX= ovariectomizadas  $n=4$ ; OVX+LN= ovariectomizadas + L-NAME  $n=4$ ; OVX+MPA= ovariectomizadas + medroxiprogesterona,  $n=4$ ; OVX+LN+MPA= ovariectomizadas + L-NAME + medroxiprogesterona  $n=4$ . \* Prueba de Dunnet, estadísticamente significativo  $P<0.001$  vs curva control.



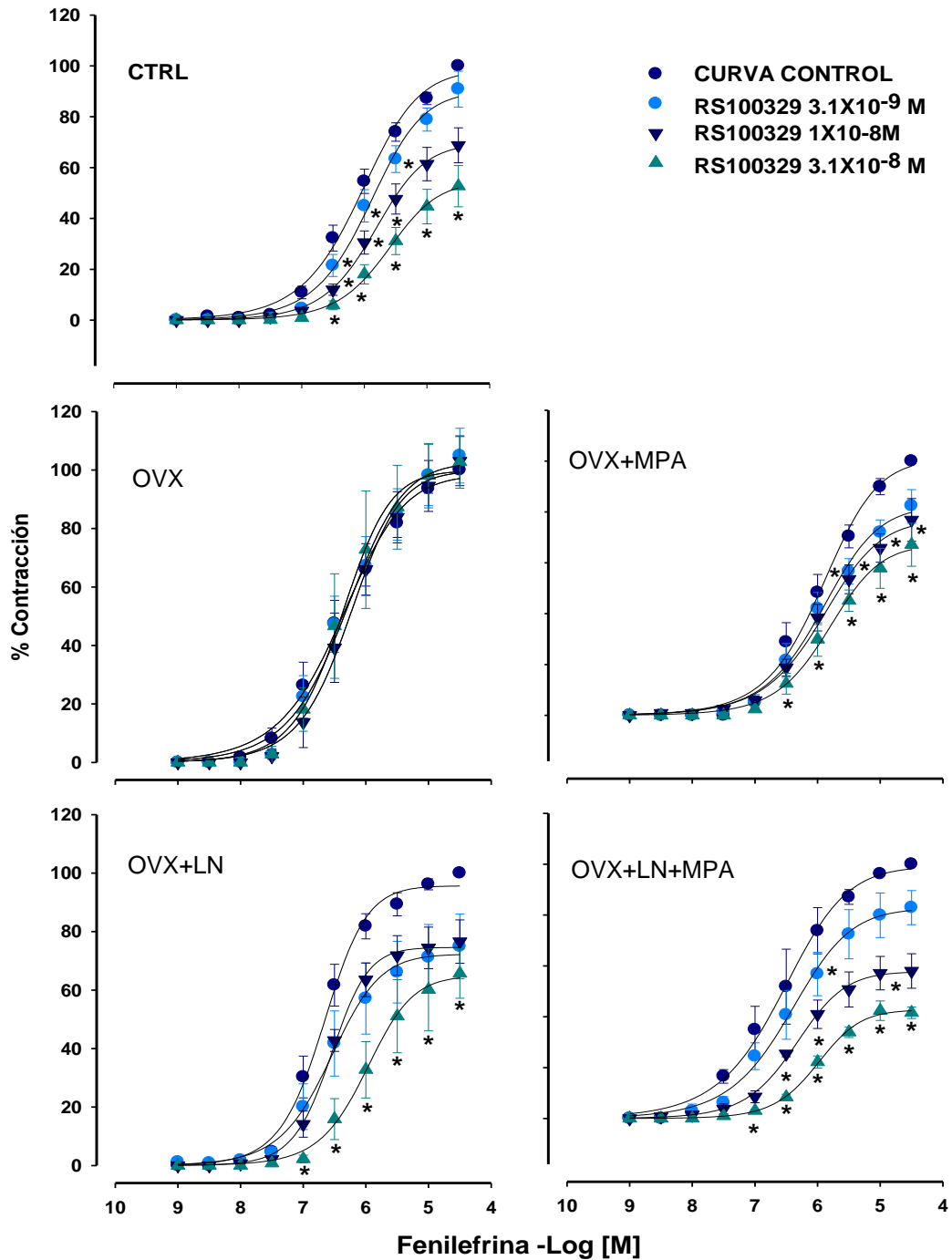
**Figura 7.3.5. Caracterización farmacológica del receptor adrenérgico  $\alpha_{1D}$  mediante curvas concentración – respuesta a la fenilefrina + BMY 7378 en aorta torácica sin endotelio de ratas hembras Wistar. CTRL, grupo control sin ovariectomizar  $n=6$ ; OVX, ovariectomizadas  $n=4$ ; OVX+ LN, ovariectomizadas + L-NAME  $n=4$ ; OVX+MPA, ovariectomizadas + medroxiprogesterona,  $n=4$ ; OVX+MPA+LN, ovariectomizadas + L-NAME + medroxiprogesterona  $n=4$ . \* Prueba de Dunnet, estadísticamente significativo  $P<0.001$  vs curva control.**



**Figura 7.3.6. Caracterización farmacológica del receptor adrenérgico  $\alpha_{1B}$  mediante curvas concentración – respuesta a la fenilefrina + cloroetilclonidina en aorta torácica con endotelio de ratas hembras Wistar.** CTRL, grupo control sin ovariectomizar  $n=6$ ; OVX, ovariectomizadas  $n=4$ ; OVX+LN, ovariectomizadas + L-NAME  $n=4$ ; OVX+MPA, ovariectomizadas + medroxiprogesterona,  $n=4$ ; OVX+LN+MPA, ovariectomizadas + L-NAME + medroxiprogesterona  $n=4$ . \* Prueba de Dunnet, estadísticamente significativo  $P<0.001$  vs curva control.



**Figura 7.3.7. Caracterización farmacológica del receptor adrenérgico  $\alpha_{1B}$  mediante curvas concentración – respuesta a la fenilefrina + cloroetilclonidina en aorta torácica sin endotelio de ratas hembras Wistar. CTRL, grupo control sin ovariectomizar  $n=6$ ; OVX, ovariectomizadas  $n=4$ ; OVX+LN, ovariectomizadas + L-NAME  $n=4$ ; OVX+MPA, ovariectomizadas + medroxiprogesterona,  $n=4$ ; OVX+LN+MPA, ovariectomizadas + L-NAME + medroxiprogesterona  $n=4$ . \* Prueba de Dunnet, estadísticamente significativo  $P<0.001$  vs curva control.**



**Figura 7.3.8. Caracterización farmacológica del receptor adrenérgico  $\alpha_{1A}$  mediante curvas concentración – respuesta a la fenilefrina + RS100329 en aorta torácica de ratas hembra Wistar con endotelio.** CTRL, grupo control sin ovariectomizar  $n=6$ ; OVX, ovariectomizadas  $n=4$ ; OVX+ LN, ovariectomizadas + L-NAME  $n=4$ ; OVX+ MPA, ovariectomizadas + medroxyprogesterona,  $n=4$ ; OVX+ LN+ MPA, ovariectomizadas + L-NAME + medroxyprogesterona  $n=4$ . \* Prueba de Dunnet, estadísticamente significativo  $P < 0.001$  vs curva control.

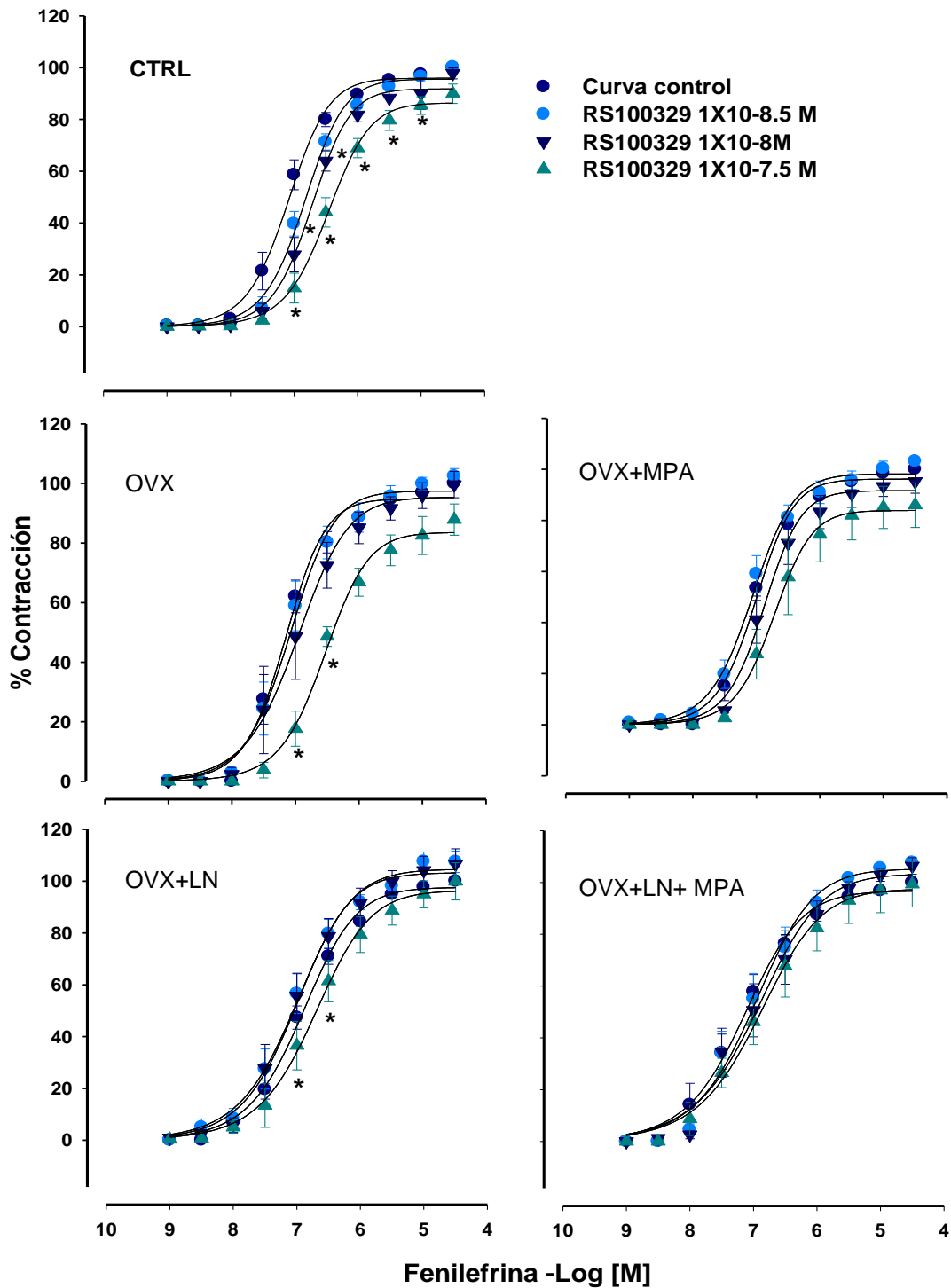
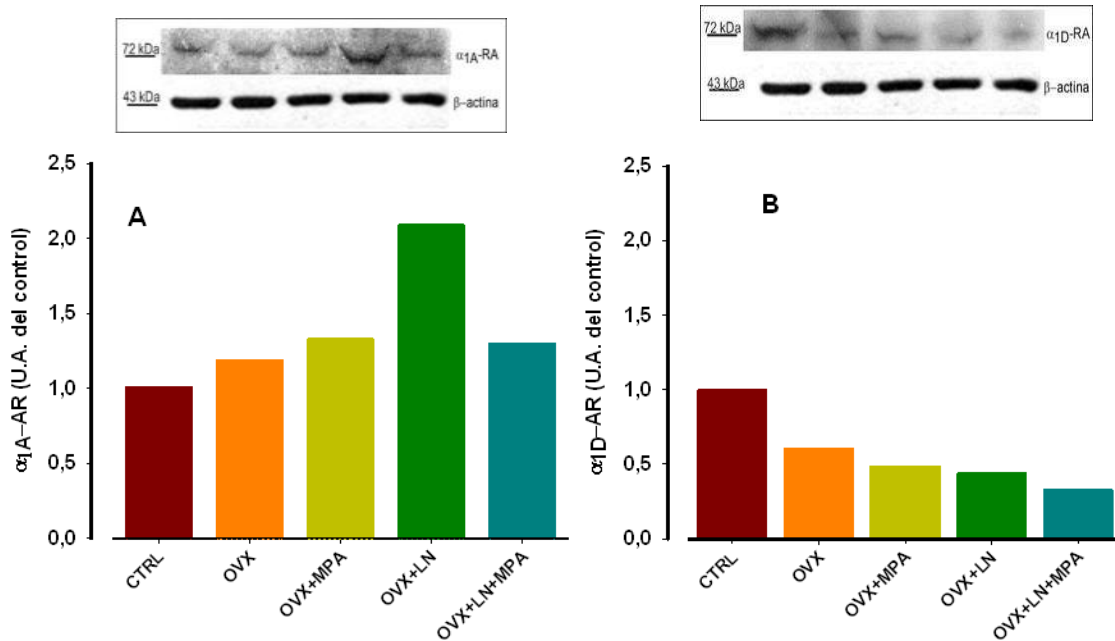


Figura 7.3.9. Caracterización farmacológica del receptor adrenérgico  $\alpha_{1A}$  mediante curvas concentración – respuesta a la fenilefrina + RS100329 en aorta torácica de ratas hembras Wistar sin endotelio. CTRL, grupo control sin ovariectomizar  $n=6$ ; OVX, ovariectomizadas  $n=4$ ; OVX+LN, ovariectomizadas + L-NAME  $n=4$ ; OVX+ MPA, ovariectomizadas + medroxiprogesterona,  $n=4$ ; OVX+ LN+ MPA, ovariectomizadas + L-NAME + medroxiprogesterona  $n=4$ . \* Prueba de Dunnet, estadísticamente significativo  $P<0.001$  vs control.

#### 7.4. Efecto de la progesterona sobre la densidad proteica de los receptores $\alpha_1$ adrenérgicos en la aorta torácica de ratas hipertensas.



**Figura 7.4.1. Efecto de la progesterona sobre la densidad proteica de los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos en la aorta de ratas hipertensas (n=4 por grupo).** CTRL, grupo control, OVX= grupo ovariectomizado, OVX+MPA= Ovariectomía+Acetato de medroxiprogesterona, OVX+ LN ovariectomizadas + L-NAME y OVX+ LN+ MPA, ovariectomizado + L-NAME + Medroxiprogesterona.

En la figura 7.4.1 se muestra la cuantificación de la densidad proteica, por Western blot, de los  $\alpha_1$ -AR en “pool” de aorta de ratas hembras.

En la gráfica A se representa el  $\alpha_1A$ -AR. Como se observa, en todos los grupos, comparados contra el control, incrementó ligeramente la densidad de este AR. Tal incremento es de mayor magnitud en el caso del grupo OVX+LN.





Ahora bien, en el grupo OVX+ LN+ MPA el  $\alpha_{1A}$ -AR está disminuido debido al efecto de la progesterona.

Por su parte el  $\alpha_{1D}$ -AR, disminuyó en todos los grupos respecto al control (Figura 7.4 B), indicando que la respuesta contráctil en todos ellos se encuentra mediada por la interacción con el  $\alpha_{1A}$ -AR en mayor proporción. Además, se puede notar que respecto a su control (OVX para OVX+MPA y OVX+ LN para OVX+ LN+ MPA) la progesterona disminuyó la expresión del el  $\alpha_{1D}$ -AR en ambos casos, aunque no se encuentra en mayor proporción en el grupo OVX+ LN como lo estaba en el caso anterior. En este receptor, se distingue que la ovariectomía modificó su expresión.

### **7.5. Efecto de la progesterona sobre la producción de óxido nítrico en ratas hipertensas.**

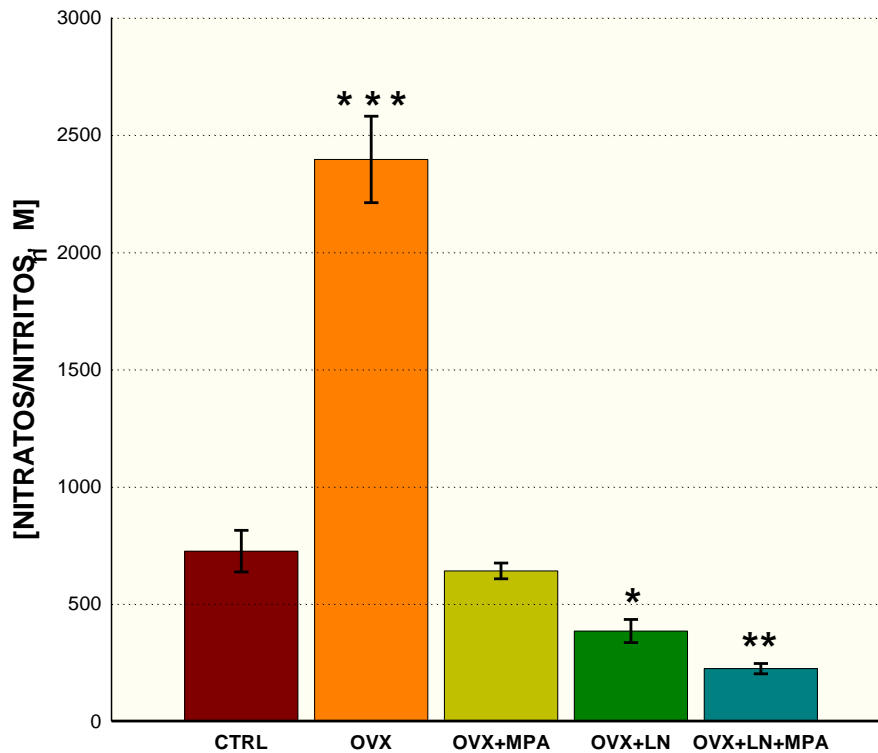
Una vez colectadas las muestras de orina para cuantificar nitratos y nitritos, se almacenaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y únicamente se descongelaron previo a la realización del ensayo.

En la figura 7.5.1 se muestran los datos comparativos entre los grupos experimentales de nitratos y nitritos urinarios, como metabolitos finales, de la actividad de las NOS/NO. Como se puede observar, los datos indican que la depleción hormonal producida por la ovariectomía incrementa la actividad de la NOS significativamente ( $P < 0.0001$  vs control). Sin embargo, la administración



de medroxiprogesterona en el grupo OVX+ MPA, disminuyó significativamente ( $P < 0.05$  vs control), debido a uno de los principales efectos de este fármaco a nivel vascular, ya que inhibe la actividad de las NOS. Asimismo, se observa disminución significativa en el grupo OVX+ LN+ MPA ( $P < 0.001$  vs grupo control), debida a la administración conjunta de L-NAME y medroxiprogesterona, y de igual forma se observa disminución no significativa en los nitratos/nitritos en el grupo OVX+ LN, por la administración de L-NAME.

Los resultados obtenidos de este ensayo permiten explicar en cierto grado, la ausencia de bloqueo ante diferentes antagonistas de los  $\alpha_1$ -AR en el grupo OVX, pues los datos experimentales indican que la cirugía a la que se sometieron los animales de este grupo, desencadenó la activación de la NOS con la subsecuente producción de NO, disminuyendo el efecto de las respuestas vasculares a estímulos vasoconstrictores.



**Figura 7.5.1. Determinación de la actividad de las sintasas de óxido nítrico mediante cuantificación de nitratos y nitritos en orina de ratas hembras Wistar por el método de Griess.** CTRL, grupo control sin ovariectomizar  $n=8$ ; OVX, ovariectomizadas  $n=4$ ; OVX+LN, ovariectomizadas + L-NAME  $n=6$ ; OVX+MPA, ovariectomizadas + medroxiprogesterona,  $n=5$ ; OVX+LN+MPA, ovariectomizadas + L-NAME+medroxiprogesterona  $n=6$ . Dunnet, estadísticamente significativo\*\*\*  $P < 0.0001$  vs CTRL \*\* $P < 0.001$  vs CTRL \* $P < 0.05$  vs CTRL.

## 8. Discusión

Existe gran controversia respecto al efecto de la progesterona a nivel vascular: mientras que algunos autores aseguran que ésta posee un efecto vasodilatador, con acciones directas sobre el endotelio vascular, otros aseguran que la hormona aumenta la respuesta contráctil ya que incrementa el estrés oxidativo y las especies reactivas de oxígeno.



De acuerdo con los resultados obtenidos podemos observar el efecto vascular de la progesterona desde otra perspectiva, dado que nos fue posible analizar sus efectos en el animal íntegro, sobre la aorta torácica aislada, la densidad proteica de  $\alpha_1$ -AR e incluso evaluar la actividad de la sintasa de óxido nítrico.

### **8.1. Efecto de progesterona sobre la presión arterial, en la rata descerebrada y desmedulada.**

Se determinó la acción de la progesterona sobre el animal íntegro, lo que permitió observar que la hormona no ejerce vasorrelajación, conducente a disminuir la presión arterial diastólica, al administrarla previa acción del agonista de  $\alpha_1$ -AR, fenilefrina, en ninguno de los grupos experimentales de este modelo.

Los resultados sugieren que el efecto observado no puede atribuirse completamente a la progesterona, ya que el vehículo por sí sólo produjo respuestas de similar magnitud.

Cabe destacar que la magnitud de las respuestas observadas es mayor, al compararla con lo reportado para ratas macho (Villalobos-Molina y col., 1999); sin embargo, existen reportes que indican que las respuestas contráctiles a fenilefrina en órgano aislado, como la aorta, son mayores en animales ovariectomizados debido a la ausencia de hormonas ováricas, con lo que se obtienen respuestas vasculares similares a las de los machos (Stallone, 1994).



Es posible suponer que lo mismo ocurre en el animal desmedulado y descerebrado ovariectomizado; sin embargo, se obtuvieron efectos similares en ratas control sin cirugía lo que sugiere que, a nivel cardiovascular, no hubo diferencias en la respuesta a fenilefrina debidas a las hormonas ováricas circulantes.

Se conoce la gran controversia respecto a las acciones vasculares de la progesterona, ya que hay datos en la literatura que indican que produce hipotensión; sin embargo, no se ha discernido con claridad el mecanismo por el cual la hormona produce este efecto, sólo se ha observado en ratas macho y en ovejas (Barbagallo y col., 2001; Pecins-Thompson y Kellen-Wood, 1997; Wambach y Higgins, 1979), por lo que resultan de gran interés los datos obtenidos en esta investigación, pues sugieren que las diferencias en la respuesta vascular a la fenilefrina sean debidas al género y/o especie de los animales experimentales. Por el contrario, otros reportes indican que la progesterona incrementa la presión arterial en ratas con hipertensión gestacional espontánea (Sharkey y col., 2004), en las que la concentración plasmática de progesterona alcanza el máximo que se puede tener en la vida reproductiva de las hembras; también se ha observado que progesterona no tiene acción hipotensora en ratas SHR (modelo genético de hipertensión) (Wambach y Higgins, 1979). Asimismo, es de considerar que la dosis administrada de progesterona en este estudio fue  $\approx 100$  veces mayor a la concentración fisiológica más alta de la hormona, que se alcanza durante la gestación



(Arkaravichien y Kendle 1990), de manera que es posible que el efecto de progesterona se observe a menores dosis *in vivo* o que esta dosis no sea idónea para activar los receptores membranales a la progesterona, o bien, que la progesterona administrada no llegó a su sitio de acción por haberse embebido en tejido adiposo, el cual actúa como reservorio fisiológico de un de agentes lipofílicos (Martorell y col., 2009), como la progesterona y el vehículo.

Ahora bien, ya que los efectos de las hormonas se correlacionan con 3 aspectos: *i)* los niveles de hormonas circulantes, *ii)* el calcio intracelular y la respuesta de las células del músculo liso vascular (CMLV) ante su estímulo y *iii)* la expresión de receptores a progesterona y estrógenos (Minshall y col., 2002), se analizó la respuesta inmediata a progesterona tras su administración, aunque no se detectaron cambios consistentes (datos no mostrados) en los diferentes grupos de estudio, por lo que se concluyó que no hay un efecto marcado debido a progesterona en el sistema cardiovascular de la rata descerebrada y desmedulada. Estos datos que se contraponen a lo reportado en la literatura, donde la hormona ejercía efectos a corto plazo sobre diferentes tejidos (Gellersen y col., 2009); así, no encontramos estos efectos sobre el sistema vascular más no se descartan los efectos sobre el sistema reproductor de la rata, los cuales no fueron evaluados en este trabajo.



## 8.2. Efecto de la progesterona sobre la función de los receptores $\alpha_1$ adrenérgicos, en la arteria aorta torácica de ratas hipertensas.

Debido a la controversia sobre los efectos vasculares de progesterona, se decidió analizar sus efectos en un tejido en específico: la aorta de rata hembra.

Los resultados obtenidos sugieren diversas variables por analizar, entre ellas el efecto de la ovariectomía que, según la literatura, tiene un papel muy importante en los resultados observados, ya que induce cambios importantes a nivel vascular, sobre todo en la liberación de sustancias producidas por el endotelio (Martorell y col., 2009).

Uno de los principales efectos de la progesterona es la ausencia de vasodilatación en modelos genéticos de hipertensión; sin embargo, existen reportes que indican que la interacción progesterona-receptor induce comunicación cruzada entre la síntesis de NO y de de prostanoides (Cutini y col., 2009; Martorell y col., 2009). El hallazgo de la disfunción endotelial que fue revertida con la administración de MPA en el grupo ovariectomizado, podría sugerir la síntesis y liberación de prostanoides por la activación de las enzimas COX-1 y COX-2 (Cutini y col., 2009) debiéndose probablemente a las modificaciones postraduccionales ocasionadas por la administración del progestágeno, lo cual podría indicar que en este caso, posee un comportamiento similar al de la hormona. Sin embargo, en las ratas hipertensas por L-NAME (OVX+LN y OVX+LN+MPA), no mejoró la función endotelial que sí ocurrió en las



ratas normotensas, lo que sugiere que la acción de MPA está estrechamente relacionada con la liberación de NO, más que con otra sustancia vasodilatadora liberada por el endotelio, puesto que el L-NAME inhibe la sintasa de óxido nítrico. Sin embargo, la progesterona incrementó el efecto máximo en ratas tratadas con L-NAME respecto a su control hipertenso (OVX+LN), lo que la podría relacionar a la acción de la medroxiprogesterona que *per se* inhibe la NOS (Minshall y col., 2002). Este efecto sólo se observó en ratas tratadas con L-NAME y no en normotensas, lo que indica que el MPA actúa sobre vasos que conservan intacta la función endotelial (producción de NO).

Por otro lado, se conoce la acción de progesterona sobre el sistema renina-angiotensina: aumenta la secreción de renina, así como su acción antagonista mineralocorticoide (Oelkers y col., 1999), que podría inducir, una vez bloqueada la síntesis de NO, el subsecuente incremento en la respuesta contráctil (Oelkers y col., 1999), ya que progesterona actúa como antagonista de los estrógenos en el aumento del flujo sanguíneo coronario y la vasodilatación (Wassman y col., 2005). Asimismo, existen datos sobre la actividad de MPA en la producción y liberación de agentes proinflamatorios como el factor nuclear NF $\kappa$ B, el TNF $\alpha$  y especies reactivas de oxígeno (Thomas y col., 2003), que podrían inducir la ausencia de vasodilatación aunada a la disfunción endotelial producida por la ovariectomía y al incremento de las respuestas contráctiles.





El análisis de la función del músculo liso vascular mediante contracción con KCl 80 mM, indica que la ovariectomía afectó de manera importante no solo la función endotelial sino también la maquinaria contráctil, sin embargo, la administración de MPA revirtió parcialmente el daño a las CMLV, probablemente por aumentar la proliferación celular a nivel vascular (Saitoh y col., 2005), y este es uno de los principales efectos antagónicos a la acción de progesterona por este progestágeno (Chwaliz y col., 2000).

Una vez analizado el efecto de progesterona sobre la respuesta contráctil a un agonista específico para  $\alpha_1$ -ARs (fenilefrina), se evaluó la respuesta de la aorta tratada con progesterona, en presencia de antagonistas específicos para cada uno de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos. Así, se identificaron dos  $\alpha_1$ -ARs como mediadores de la contracción en la aorta torácica de los animales en estudio: el  $\alpha_{1A}$ -AR y el  $\alpha_{1D}$ -AR cuyas respuestas fueron antagonizadas por los fármacos RS100329 y BMY 7378, respectivamente y se descartó la participación del  $\alpha_{1B}$ -AR que fue antagonizado con cloroetilclonidina.

De acuerdo con los datos reportados en la literatura, en ratas macho el principal  $\alpha_1$ -AR expresado en aorta es el  $\alpha_{1D}$ -AR (Villalobos-Molina e Ibarra, 1999) que fue caracterizado farmacológicamente; mientras que en los animales de experimentación se observa un incremento considerable de la participación del receptor  $\alpha_{1A}$ , de manera que se podría atribuir esta diferencia al género y/o cepa de los animales de experimentación, al procedimiento quirúrgico



(ovariectomía) que modifica la función endotelial y a los tratamientos en cada condición experimental, puesto que progesterona parece modular la expresión de este receptor en la aorta. Sin embargo, al analizar los valores de  $pK_B$  obtenidos tras la administración de BMY7378, en las curvas concentración-respuesta a fenilefrina de anillos sin endotelio para cada grupo experimental, se destaca que son muy cercanos a los reportados en la literatura para aorta torácica ( $pK_B \approx 8.2$ ), lo que indica que el  $\alpha_{1D}$ -AR también está presente en aorta de ratas hembra y media las respuestas vasculares a agonistas adrenérgicos.

Por otro lado, los desplazamientos a la derecha en las curvas concentración-respuesta, al adicionar el antagonista RS100329 selectivo para el  $\alpha_{1A}$ -AR en aorta de ratas hembra, indica que la respuesta contráctil en la aorta disminuyó de manera dependiente de la concentración del antagonista, similar a la arteria caudal de ratas macho (Parés-Hipólito y col., 2006). Al calcular los valores de afinidad del antagonista por el  $\alpha_{1A}$ -AR, expresado como  $pK_B$  y compararlos con la literatura, es posible distinguir que en anillos con endotelio el grupo OVX+L-NAME+MPA es el que presenta una mayor afinidad por su receptor ( $pK_B \approx 8.5$  vs 9.6, valor reportado por *Parés-Hipólito y col., 2006*), le sigue OVX+L-NAME ( $pK_B \approx 8.1$ ), lo que sugiere que la hipertensión + MPA aumenta la afinidad por el  $\alpha_{1A}$ -AR; sin embargo, en el control ( $pK_B \approx 7.78$ ) la afinidad del ligando por el receptor es menor en condiciones normales en las hembras e incrementa con los tratamientos. En los anillos sin endotelio, se observó el fenómeno inverso, los  $pK_B$  disminuyeron de la siguiente manera OVX



> OVX+MPA> OVX+LN y en el grupo OVX+LN+MPA no se pudo determinar el valor de  $pK_B$ , con ello podemos deducir que la condición hipertensiva disminuye la afinidad por el  $\alpha_{1A}$ -AR en las CMLV y afecta la función endotelial, de manera que podrían liberarse prostanooides y/o citocinas proinflamatorias, como el TNF $\alpha$  y factores de transcripción como el NF $\kappa$ B, que desencadenen la activación de cascadas de señalización (Saitoh y col., 2005); además, no debemos descartar la acción del MPA sobre el receptor nuclear a progesterona y la subsecuente activación de genes, incluso que se pudiera realizar la activación, mediante receptores membranales a progesterona de la vía de la PLC, la cual comparte con la vía de señalización de los receptores adrenérgicos (Mulac-Jersevic y Connely, 2004; Bramley, 2003).

Los datos obtenidos de los grupos control en todas las condiciones, permiten aseverar que la aorta de ratas hembra se comporta de igual manera que la de ratas macho, puesto que la afinidad por el  $\alpha_{1D}$ -AR es muy similar a la reportada ( $pK_B \approx 8.5$  vs 8.2 valor reportado, *Parés-Hipólito y col., 2006*); a diferencia de los datos obtenidos para el  $\alpha_{1A}$ -AR ( $pK_B \approx 7.8$  vs 9.6, *Parés-Hipólito y col., 2006*) en los que estos valores están muy por debajo del valor reportado.

También es de gran interés, la respuesta observada a cloroetilclonidina. Ésta al ser un agente alquilante, debe sus efectos a dos variables: la concentración y el tiempo de acción. Existen estudios (Ibarra y col., 2000) que indican que con la concentración empleada en este trabajo (6.5  $\mu$ M) y con el



tiempo de incubación utilizado (30 minutos), el bloqueo de la respuesta esperado involucra un gran desplazamiento a la derecha con disminución del efecto máximo, indicando un antagonismo de tipo no competitivo puesto que este agente bloquea la respuesta del  $\alpha_{1B}$ -AR, potenciando la del  $\alpha_{1A}$ -AR y disminuyendo la del  $\alpha_{1D}$ -AR. En este caso y al observar desplazamiento a la derecha por efecto de BMY7378 es de esperarse que la respuesta con cloroetilclonidina disminuyera dado que también antagoniza al  $\alpha_{1D}$ -AR, ello podría deberse a la disminución de la densidad proteica de este receptor ya que su afinidad no está disminuida. Lo que queda claro con los datos experimentales es que el receptor  $\alpha_{1B}$ -AR no participa en la respuesta contráctil en la aorta de ratas hembra.

Es bien sabido que las hormonas ováricas son uno de los principales factores responsables del mantenimiento de la presión arterial *in vivo*, mediante diversos mecanismos en los que resaltan la activación de la NOS, el aumento de la respuesta a agonistas adrenérgicos y las diferentes respuestas contráctiles en animales con composición hormonal intacta, comparadas con animales ovariectomizados (Pecins y col., 1997; Stallone y col., 2001, Mahmoud y col., 2004). En el caso particular de los  $\alpha_1$ -ARs, el efecto de progesterona observado en los ensayos funcionales en aorta, indica que ésta no modifica la afinidad del agonista por el receptor en los animales hipertensos; sin embargo, en los animales del grupo OVX+LN se observó un patrón del tipo no competitivo, que sugiere la presencia de más de un receptor adrenérgico involucrado, y que



podrían ser el  $\alpha_{1D}$ -AR y el  $\alpha_{1A}$ -AR, lo que cae en controversia con los datos reportados en la literatura que indican que el receptor mayormente expresado en aorta es el  $\alpha_{1D}$ -AR (Bracho-Valdés y col., 2009; García-Sáinz y col., 2001; Villalobos-Molina e Ibarra, 1999). Asimismo, se sabe que el progestágeno empleado tiene efectos a nivel del endotelio vascular inhibiendo la síntesis de NO (Minshall y col., 2002), y que su acción pueda ser debida a la interacción con un receptor diferente al de progesterona puesto que ejerce efectos antagónicos a los de la hormona por sí sola (Thomas y col., 2003).

### **8.3. Efecto de la progesterona sobre la densidad proteica de los receptores $\alpha_1$ adrenérgicos en la aorta torácica de ratas hipertensas.**

Los resultados obtenidos del ensayo por Western blot de las arterias de ratas hembra tratadas con MPA, revelan un incremento considerable de la expresión del  $\alpha_{1A}$ -AR en el grupo hipertenso (OVX+L-NAME), lo cual no ocurrió para el  $\alpha_{1D}$ -AR. Sin embargo, en ambos casos la administración de MPA disminuyó la proporción presente de estos receptores en aorta de ratas hembras ovariectomizadas. Esto resulta de gran interés, puesto que se ha reportado que a nivel vascular el receptor predominante en aorta de ratas macho es el  $\alpha_{1D}$ -AR (García-Sáinz y col., 2001; Villalobos-Molina e Ibarra, 1999), lo que sugiere que esta diferencia es debida al género de los animales de experimentación.



Por otro lado, contrario a lo que se ha reportado sobre los supuestos efectos antagónicos de MPA, respecto a la acción de la progesterona a nivel vascular, se observó que MPA indujo la disminución de  $\alpha_1$ -ARs y esto produce los efectos observados en las ratas tratadas con L-NAME+MPA y originó el patrón farmacológico observado: antagonismo no competitivo para anillos con endotelio y competitivo para los anillos sin endotelio; con valores de afinidad ligeramente altos a los reportados para el  $\alpha_{1D}$ -AR. Por otro lado, la proporción del  $\alpha_{1A}$ -AR vascular aumentó en comparación con el  $\alpha_{1D}$ -AR, sobre todo en el grupo OVX+L-NAME, más no así los valores de  $pK_B$  para éste receptor, ya que se encuentran por debajo de los datos reportados. Esto sugiere que el receptor mayormente involucrado en la hipertensión arterial, por deficiencia de NO en ratas hembra, es el  $\alpha_{1A}$ -AR y no el  $\alpha_{1D}$ -AR como se ha observado en ratas macho (García-Sáinz y col., 2001; Villalobos-Molina e Ibarra, 1999).

Reportes en la literatura indican que es probable que MPA no se una al mismo receptor que progesterona (Thomas y col., 2003); sin embargo, MPA induce el incremento en la afinidad por el  $\alpha_{1D}$ -AR y disminución del mismo, que podría estar relacionada con la acción de MPA sobre la expresión de  $\alpha_1$ -ARs.

#### **8.4. Efecto de la progesterona sobre la producción de óxido nítrico en ratas hipertensas.**

Con los resultados obtenidos se sugiere que el daño endotelial desencadenado por la ovariectomía, fue contrarrestado por el incremento en la producción de NO, que disminuyó con la administración del progestágeno, un



hecho esperado ya que se ha reportado que la medroxiprogesterona es un inhibidor de la NOS (Minshall y col., 2002), y con la administración de L-NAME (inhibidor de la NOS). Aun así, cabe resaltar el efecto sobre el grupo OVX tratado con MPA donde la presión arterial sistólica se mantuvo dentro del rango normal; sin embargo, el NO estuvo por debajo de los valores del grupo control, lo que indica que la acción de MPA, a diferencia de lo reportado de ser un agente con acciones opuestas a progesterona (Thomas y col., 2003), pudiera estar activando la síntesis de otras sustancias vasodilatadores producidas por el endotelio que permitieron mantener la PAS en niveles normales, teniendo una acción similar a la de progesterona en la inducción de síntesis de prostanoïdes, que podría estar mediada por comunicación cruzada entre la vía de las NOS y la de las COX (Cutini y col., 2009; Martorell y col., 2009).



## 9. Conclusiones

- La administración de progesterona no genera respuestas vasoprotectoras en el animal íntegro ovariectomizado ni en controles, es decir, no induce efectos a nivel de circulación periférica.
- En ensayos funcionales en aorta de ratas hembra ovariectomizadas hipertensas, la respuesta contráctil está mediada por los  $\alpha_{1A}$ -AR y  $\alpha_{1D}$ -AR y se descartó la participación del  $\alpha_{1B}$ -AR.
- El  $\alpha_{1A}$ -AR está presente en mayor proporción en la aorta de ratas ovariectomizadas, éste aumenta durante la hipertensión y, tanto el  $\alpha_{1D}$ -AR como el  $\alpha_{1A}$ -AR, disminuyen con la administración del acetato de medroxiprogesterona.
- La ovariectomía induce el incremento en la actividad de la sintasa de óxido nítrico (NOS).





## 10. Referencias bibliográficas

- Arkaravichien W and Kendle E. Critical progesterone requirement for maintenance of pregnancy in ovariectomized rats. *J Reprod Fert.* 1999; 90: 63-70.
- Bagchi MK, Tsai SY, Tsai M, O' Malley BW. Progesterone enhances target gene transcription by receptor free of heat shock proteins hsp60, hsp56 and hsp70. *Amer soc Microbiol.* 1991: 4998- 5004.
- Baker TK, VanVooren HB, Smith WC, Carfagna MA. Involvement of calcium channels in the sexual dimorphism of cadmium-induced hepatotoxicity. *Toxicol Lett.* 2003; 137: 185-192.
- Ballare C, Uhrig M, Bechtold T, Sancho E, Di Domenico M, Migliaccio A, Auricchio F, Beato M. Two domains of the progesterone receptor interact with the estrogen receptor and are required for progesterone activation of the c-Src/Erk pathway in mammalian cells. *Mol and Cell Biol.* 2003; 23: 1994 – 2008.
- Barbagallo M, Domínguez LJ, Licata G, Shan J, Bing L, Karpinski E, Pang PKT, Resnick LM. Vascular effects of progesterone. Role of cellular calcium regulation. *Hypert.* 2001; 37: 142-147.
- Boonyaratankornkit V, Scott MP, Ribon V, Sherman L, Anderson SM, Maller JL, Miller WT, Edwards DP. Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases. *Mol Cell.* 2001; 8: 269 – 280.
- Bracho-Valdés I, Godínez-Hernández D, Arroyo-Vicelis B, Bobadilla-Lugo RA, López-Sánchez P. Increased alpha-1 adrenoreceptor expression in pregnant rats with subrenal aortic coarctation. *Hypert in pregn.* 2009; 28; 4: 402-416.
- Bramley T. Non-genomic progesterone receptors in the mammalian ovary: some unresolved issues. *Reprod.* 2003; 125: 3-15.
- Chabbert-Buffet N, Meduri G, Bouchard P. Spitz IM. Selective progesterone receptor modulators and progesterone antagonists: mechanisms of action and clinical applications. *Hum Rep Up.* 2005; 11: 293-307.
- Chwalisz K, Brenner RM, Fuhrmann UU, Hess-Stump H, Elger W. Antiproliferative effects of progesterone antagonists and progesterone receptor modulator on the endometrium. *Stero.* 2000; 65: 741- 751.
- Cutini P, Sellés J, Massheimer V. Cross-talk between rapid and long term effects of progesterone on vascular tissue. *J Stero Biochem and Mol Biol.* 2009;



115: 36-43.

Fawell SE, Lees JA, White R, Parker MG. Characterization and colocalization of steroid binding and dimerization activities in the mouse estrogen receptor. *Cell*. 1990; 60: 953 – 962.

Figuroa-Guillén ES, Castro-Moreno P, Rivera-Jardón FF, Gallardo-Ortiz I, Ibarra-Barajas M, Godínez-Hernández D. Angiotensin II pressor response in the L-NAME-induced hypertensive pithed rat: role of the AT1 receptor. *Proc West Pharmacol Soc*. 2009; 52:00-00.

Finch A, Graham R. The  $\alpha_{1D}$ -Adrenergic Receptor: Cinderella or Ugly Stepsister. *Mol Pharmacol*. 2006; 69(1):1-4.

Frielle T, Daniel KW, Caron MG, Lefkowitz RJ. Structural basis of beta-adrenergic receptor subtype specificity studied with chimeric beta 1/beta 2-adrenergic receptors. *Proc Natl Acad Sci*. 1988; 85(24):9494-8.

Gadkar-Sable S, Shah C, Rosario G, Sachdeva G, Puri C. Progesterone receptors, various forms and functions in reproductive tissues. *Front in biosc*. 2005; 10: 2118- 2130.

García-Sáinz JA, Vázquez-Cuevas FG, Romero-Avila MT. Phosphorylation and desensitization of alpha 1d-adrenergic receptors. *Biochem J*. 2001; 1;353 (Pt 3): 603–610.

García-Sáinz JA, Villalobos-Molina R. The elusive  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptor: molecular and cellular characteristics and integrative roles. *Eur J Pharm*. 2004; (500) 1-3: 113-120

Geisterfer AA, Peach MJ, Owens GK. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res*. 1988; 62: 749 –756.

Gellersen B, Fernandes MS, Brosens JJ. Non-genomic progesterone actions in female reproduction. *Hum Rep Up*. 2009; 15(1): 119-138.

Gobbetti A, Boiti C, Canali C, Zerani M. Nitric oxide synthase acutely regulates progesterone production by in vitro cultured rabbit corpora lutea. *J of Endocrin*. 1999;160: 275–283

Goldman S, Weiss A, Shalev E, Progesterone receptor expression in human decidua and fetal membranes before and after contractions: possible mechanism for functional progesterone withdrawal. *Mol Hum Rep*. 2005; 11(4): 269-277.



- Griendling KK, Lassegue B, Alexander RW. Angiotensin receptors and their therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1996;36: 281–306.
- Hague C, Lee SE, Chen Z, Prinster SC, Hall RA, Minneman K. Heterodimers of  $\alpha_{1D}$ -adrenergic receptors form a single functional entity. *Mol Pharm.* 2006; 69:45–55.
- Hodges YK, Richer JK, Horwitz KB, Horwitz LD. Variant estrógeno and progesterone receptor messages in human vascular smooth muscle. *Circ.* 1999; 99: 2688- 2693.
- Ibarra M, Pardo J P, López-Guerrero J J, Villalobos-Molina R. Differential response to chloroethylclonidine in blood vessels of normotensive and spontaneously hypertensive rats: role of  $\alpha_{1D}$  and  $\alpha_{1A}$  adrenoreceptors in contraction. *Brit J of Pharm.* 2000; 129: 653-660.
- Kobilka BK, Kobilka TS, Daniel K, Regan JW, Caron MG, Lefkowitz RJ. Chimeric alpha 2-, beta 2-adrenergic receptors: delineation of domains involved in effector coupling and ligand binding specificity. *Sci.* 1998; 3;240(4857):1310-6.
- Koh KK, Jin DK, Yang SH, Lee SK, Hwang HY, Kang MH, Kim W, Kim DS, Choi IS, Shin EK. Vascular effects of synthetic or natural progesterone combined with conjugated equine estrogen in healthy postmenopausal women. *Circ.* 2001; 103:1961–1966
- Kopeikina-Tsiboukidou L, Delicostantinou G. Calcium-induced membrane metabolic alterations modify the sex steroids binding into dog brain synaptosomal plasma membranes. *Int J Biochem.* 1986; 18: 777-784.
- Ley General de Salud. NORMA Oficial Mexicana NOM-030-SSA2-1999, Para la prevención, tratamiento y control de la hipertensión arterial.
- Li X, Wong J, Tsai SY, Tsai M, O'Malley BW. Progesterone and glucocorticoid receptors recruit distinct coactivator complexes and promote distinct patterns of local chromatin modification. *Amer Soc Microbiol.* 2003; 23(11);3763–3773
- Li Z, Krause DN, Doolen S, Piper Duckles S. Ovariectomy eliminates sex differences in rat tail artery response to adrenergic nerve stimulation. *Am J Physio.* 1997; 272 (Heart Circ. Physiol. 41): H1819-H1825.



- Liao QP, Buhimschi IA, Saade G, Chwaliz K, Garfield RE. Regulation of vascular adaptation during pregnancy and post-partum: effects of nitric oxide inhibition and steroid hormones. *Hum Rep.* 1996; 11(12): 2777-2784.
- Liu Z, Auboeuf D, Wong J, Chen† JD, Tsai SY, Tsai M, O'Malley BW. Coactivator/corepressor ratios modulate PR- mediated transcription by the selective receptor modulator RU486. *Biochem.* 2002; 99(12): 7940-7944.
- Luconi M, Bonnacorsi L, Maggi M, Pecchioli P, Krausz C, Forti G, Baldi E. Identification and characterization of functional nongenomic progesterone receptors on human sperm membrane. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83: 877-885.
- Lye H, Kuan C, Ewe J, Fung W, Liong M. The Improvement of Hypertension by Probiotics: Effects on Cholesterol, Diabetes, Renin, and Phytoestrogens. *Int. J. Mol. Sci.* 2009; 10: 3755-3775.
- Lyssand JS, DeFino MC, Tang X, Hertz AL, Faller DB, Wacker JL, Adam ME, Hague C. Blood pressure is regulated by an  $\alpha_{1D}$ -adrenergic receptor/dystrophin signalosome. *J Biol Chem.* 2008; 283 (27): 18792-18800.
- Martorell A, Sagredo A, Aras-López R, Balfagón G, Ferrer M. Ovariectomy increases the formation of prostanoids and modulates their role in acetylcholine-induced relaxation and nitric oxide release in the rat aorta. *Card Res.* 2009; 84: 300-308.
- Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292: C82–C97.
- Minshall RD, Paycnik D, Browne DL, Hermsmeyer K. Nongenomic vasodilator action of progesterone on primate coronary arteries. *J Appl Physiol.* 2002; 97: 701- 708.
- Moncada S, Higgs EA. Nitric Oxide and the vascular endothelium. *Handb Exp Pharmacol.* 2006;(176 Pt 1):213-54.
- Mulac-Jericevic B, Conneely OM. Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Rep.* 2004; 128: 139–146.
- Nelson SH, Steinsland OS, Wang Yu, Yallampalli C, Dong L, Sánchez JM. Increased nitric oxide synthase activity and expression in the human uterine artery during pregnancy. *Circ Res.* 2000;87;406-411.
- Nguyen G, Delarue F, Burckle C, Bouzahir L, Giller T, Sraer JD. Pivotal role of the



renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest* 2002; 109: 1417–1427.

Oelkers WKH. Effects of estrogens and progestogens on the renin-aldosterone system and blood pressure. *Stero.* 1996; 61: 166-171.

Otsuki M, Saito H, Xu X, Sumitani S, Kouhara H, Kishimoto T, Kasayama S. Progesterone, but Not Medroxyprogesterone, Inhibits Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression in Human Vascular Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21: 243-248.

Parés-Hipólito J, Gómez-Zamudio JH, Gallardo-Ortiz IA, López-Guerrero JJ, Santamaría-Ortiz J, Ibarra M, Villalobos-Molina R. Selective agonists reveal alpha(1A)- and alpha(1B)-adrenoceptor subtypes in caudal artery of the young rat. *Auton Autacoid Pharmacol.* 2006;26(4):371-8.

Pecins-Thompson M, Keller- Wood, M. Effects of progesterone on blood pressure, plasma volume, and responses to hypotension. *Am. J. Physiol.* 1997; 272: R377-R385

Peluso JJ, Fernandez DP, Pappalardo A, White BA. Characterization of a putative membrane receptor for progesterone in rat granulosa cells. *Biol Reprod.* 2001; 65: 94- 101.

Phillipp M, Brede M, Hein L. Physiological significance of  $\alpha_2$ -adrenergic receptor subtype diversity: one receptor is not enough. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.* 2002; 283: R287-R295.

Pratt WB, Jolly DJ, Pratt DV, Hollenberg SM, Giguere V, Cadepond F, Schweizer-Groyer G, Catelli MG, Evans RM, Baulieu EE. A region in the steroid binding domain determines formation of the non-DNA binding 9S glucocorticoid receptor complex. *J of Biol Chem.* 1988: 263; 267 – 273.

Ribeiro MO, Antunes E. Nucci de G, Lovisolo SM, Zatz R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hipertensión. *Hypert.* 1992;20;298-303.

Ricci A, Bronzetti E, Conterno A, Greco S, Mulatero P, Schiavone MD, Tayebati SK, Veglio F, Amenta F.  $\alpha_1$ -adrenergic receptor subtypes in human. *Hypert.* 1999; 33: 707-712.

Richer JK, Jacobsen BM, Manning NG, Abel MG, Wolf DM, Horwitz KB. Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2002; 277: 1520-1528.



- Rodríguez-Pérez CE, Romero-Ávila MT, Reyes-Cruz G, García-Sáinz JA. Signaling properties of human  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors lacking the carboxyl terminus: intrinsic activity, agonist-mediated activation, and desensitization. 2009; 380(2):1432-1912
- Rosano GM, Webb CM, Chierchia S, et al. Natural progesterone, but not medroxyprogesterone acetate, enhances the beneficial effect of estrogen on exercise-induced myocardial ischemia in postmenopausal women. *J Am Coll Cardiol*. 2000; 36: 2154-2159.
- Roveri E, Chapo G, Grappiolo I, Puche RC. Effects of depot medroxyprogesterone acetate on the calcium metabolism of adult ovariectomized rats. *Med*. 2000; 60: 482-486.
- Schreiber JR, Hsueh JW. Progesterone "receptor" in rat ovary. *Endoc*. 1979; 105: 915-919.
- Selles J, Polini N, Alvarez C, Massheimer V. Nongenomic action of progesterone in rat aorta: Role of nitric oxide and prostaglandins. *Cell Sign*. 2002; 14: 431- 436.
- Selles J, Polini N, Alvarez C, Massheimer V. Progesterone and 17  $\beta$ -estradiol acutely stimulate nitric oxide synthase activity in rat aorta and inhibit platelet aggregation. *Life Sci*. 2001; 69: 815- 827.
- Shanmugam S, Corvol P, Gasc JM. Angiotensin II type 2 receptor mRNA expression in the developing cardiopulmonary system of the rat. *Hypert* 1996; 28: 91-97.
- Sharkey LC, Kirchain S, McCune SA, Simpson GIC, Archambault EZ, Boatright NK, Hicks E, Fray J. Progesterone increases blood pressure in spontaneous gestational hypertension in rats. *Am J Hyper*. 2005; 18: 36-43.
- Stallone JN, Salisbury RL, Fulton CT. Androgen-receptor defect abolishes sex differences in nitric oxide and reactivity to vasopressin in rat aorta. *J Appl Physiol* 2001; 91: 2602-2610.
- Stallone JN. Sex differences in nitric oxide-mediated attenuation of vascular reactivity to vasopressin are abolished by gonadectomy. *Eur J Pharmacol*. 1994; 259: 273-283.
- Tanoue A, Nasa Y, Koshimizu T, Shinoura H, Oshikawa S, Kawai T, Sunada S, Takeo S, Tsujimoto G. The  $\alpha_{1D}$ -adrenergic receptor directly regulates



- arterial blood pressure via vasoconstriction. *J Clin Invest.* 2002; 109: 765-765.
- Thomas T, Rhodin J, Clark L, Garces A. Progestines initiate adverse events of menopausal estrogen therapy. *Climat.* 2003; 6: 293-301.
- Török J. Participation of nitric oxide in different models of experimental hipertensión. *Physiol Res.* 2008; 57:813-825.
- Vanhoutte PM, Tang EHC. Endothelium-dependent contractions: when a good guy turns bad!. *J Physiol.* 2008; 586 (22): 5295-5304.
- Vegeto E, Allan GF, Schrader WT, Tsai M-J, McDonnell DP, O'Malley BW. The mechanism of RU486 antagonism is dependent on the conformation of the carboxy-terminal tail of the human progesterone receptor. *Cell.* 1992; 67: 703-713.
- Villalobos-Molina R and Ibarra M. Vascular  $\alpha_{1D}$ - Adrenoceptor: are they related to hypertension? *Achie of med Res.* 1999; 30: 347-352.
- Waldrop BA, Mastalerz D, Piascik MT, Post GR.  $\alpha_{1B}$  and  $\alpha_{1D}$ -adrenergic receptors exhibit different requirements for agonist and mitogen-activated protein kinase activation to regulate growth responses in rat 1 fibroblasts. *Pharm and exp therap J.* 2002; 300:83-90.
- Wambach G, Higgings JR. Antihypertensive effect of progesterone in rats with mineralocorticoid-induced hypertension. *Am. J Physiol.* 1979; 236(4): E366-E370.
- Wassmann K, Wassmann S, Nickenig G. Progesterone Antagonizes the Vasoprotective Effect of Estrogen on Antioxidant Enzyme Expression and Function. *Circ Res.* 2005;97:1046-1054
- Webster NJ, Green S, Jin J, Chambon P. The hormone-binding domains of the estrogen and glucocorticoid receptors contain an inducible transcription activation function. *Cell.* 1988; 54: 199 – 207.
- Welter BH, Saner KJ, Zhang F, Hansen E, Dupont B, Wei Y, Price TM. Cloning and expression of a novel, truncated, progesterone receptor. *Mol Cell Endoc.* 2003; 28: 155-163.