



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

**FUNCIÓN VASCULAR α_1 -ADRENÉRGICA
DURANTE LA DIABETES MELLITUS
EXPERIMENTAL**

TESIS QUE PRESENTA
Q.F.B. PATRICIA CASTRO MORENO

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

ASESORES DE TESIS:
**M.C. HÉCTOR URQUIZA MARÍN
D.C. RAFAEL VILLALOBOS MOLINA**

MORELIA MICHOACÁN, DICIEMBRE DE 2006

IIQB

La asesoría de esta tesis se hizo en el Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por el Maestro en Ciencias Héctor Urquiza Marín

La parte experimental de este trabajo se realizó en la Unidad de Biomedicina de la FES-UNAM campus Iztacala, bajo la dirección del DC. Rafael Villalobos Molina

Durante este trabajo se contó con la beca de maestría No.188699 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

AGRADECIMIENTOS

**M.C. HECTOR URQUIZA MARÍN
D.C. RAFAEL VILLALOBOS MOLINA
D.C. ZURIZADDAI HERNÁNDEZ GALLEGOS
D.C. ALFREDO SAAVEDRA MOLINA
D.C. ROSALIO MERCADO CAMARGO**

**A todo el equipo de trabajo del Dr. Villalobos (CINVESTAV, SUR-IPN)
(UBIMED, IZTACALA-UNAM).**

A los integrantes del laboratorio de farmacología del IIQB.

**Al Dr. Alfredo Saavedra por las facilidades otorgadas en su laboratorio
para finalizar la realización de este trabajo, así como a todo su equipo de
trabajo.**

**A los Dr's del IIQB que amablemente y con entusiasmo nos facilitaron sus
equipos de laboratorio.**

A Esther Anaya y Elizabeth Calderón.

**A mis compañeros de generación 2004-2006 de la maestría, Sonia,
Yesenia, Areli, Luz María, Lupita, Idolina, Rosenda, César, Arnoldo, Ali,
León y Carlos.**

A mis padres Salvador Castro y Elena Moreno.

A mis hermanos Irma, Gloria, Salvador y Gustavo.

**A todas las personas que de una u otra forma contribuyeron a la
realización de este trabajo de investigación.**

GRACIAS.....

DEDICATORIAS

A mis padres,
por la herencia que me han dado
para que siempre siga la lucha incansable
y conseguir todas las metas propuestas,
Elena Moreno y Salvador Castro

A mis hermanos,
por el apoyo y la complicidad en todo momento.
Irma, Gloria, Salvador y Gustavo.

Para Jonathan y Kelvin.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	III
ABREVIATURAS	IV
RESUMEN	VII
ABSTRACT	IX

CAPITULO 1 INTRODUCCIÓN

1.1. DIABETES MELLITUS	
1.1a Definición.....	1
1.1b. Clasificación de la diabetes.....	2
1.1c. Perspectiva actual de la diabetes mellitus.....	4
1.2. ASIMILACIÓN DE GLUCOSA, MODULACIÓN EN LA SÍNTESIS Y SECRECIÓN DE INSULINA	6
1.3. COMPLICACIONES QUE GENERA LA DIABETES MELLITUS	8
1.4. MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA PATOGENIA DE LAS COMPLICACIONES CRÓNICAS EN LA DIABETES MELLITUS	11
1.4a. Aumento en el flujo de la ruta del poliol.....	12
1.4b. Aumento de productos de la glicación avanzada.....	13
1.4c. Activación de la proteína quinasa C.....	14
1.4d. Alteraciones de la microcirculación.....	14
1.4e. Aumento de la actividad de la ruta de la hexosamina.....	14
1.4f. Alteración de las células endoteliales.....	15
1.4g. Modificación de las lipoproteínas.....	15

1.5. REGULACIÓN DEL TONO VASCULAR.....	15
1.6. RECEPTORES ADRENÉRGICOS.....	17
1.7. MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES.....	20
1.8. JUSTIFICACIÓN.....	23
1.9. HIPÓTESIS.....	24
1.10. OBJETIVOS.....	24
1.10a. Objetivo general.....	24
1.10b. Objetivos específicos.....	24

CAPITULO 2 METODOLOGÍA

2.1. DESARROLLO DE LOS MODELOS EXPERIMENTALES DE DIABETES MELLITUS	25
2.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	25
2.3. REACTIVOS.....	26
2.4. PREPARACIÓN DEL TEJIDO.....	27
2.5. CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA A FENILEFRINA.....	28
2.6. EXPRESIÓN DEL RNAm DE LOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS α_1 EN AORTA DE RATA WISTAR.....	29
2.7. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL POR EL MÉTODO DEL FENOL- CLOROFORMO.....	30

2.7a. Homogenización.....	30
2.7b. Separación de fases.....	30
2.7C. Precipitación del RNA	30
2.7d. Lavado y disolución del RNA.....	31
2.7e. Cuantificación de la concentración de RNA.....	31
2.8. TRANSCRIPCIÓN REVERSA (SÍNTESIS DE cDNA).....	32
2.8a. Tratamiento con DNAasa.....	32
2.8b. Inactivación de la DNAasas.....	32
2.8c. Adición de los cebadores.....	32
2.8d. Inhibición de RNAasas.....	32
2.9. AMPLIFICACIÓN del cDNA por PCR en TIEMPO REAL.....	33
2.10. ANÁLISIS POR WESTERN BLOT (ENSAYOS DE INMUNODETECCIÓN) DE LOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS α_1 EN ARTERIA AORTA.....	33
2.10a. Homogenización.....	33
2.10b. Determinación de la concentración de proteínas por el método de Lowry.....	34
2.10c. Electroforesis.....	34
2.10d. Transferencia de la proteína a la membrana PVDF.....	35
2.10e. Bloqueo de la membrana.....	35
2.10f. Reacción quimioluminiscente.....	36

CAPITULO 3 RESULTADOS

3.1. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	38
3.2 RESULTADOS.....	39
3.2a. Curvas concentración respuesta a fenilefrina en arteria aorta, carótida, mesentérica y caudal.....	39
3.2a.I Sensibilidad, CE ₅₀ y efecto máximo.....	39

3.2b. Curvas concentración respuesta en presencia de antagonistas en la arteria aorta.....	42
3.2b.I. Sensibilidad (pD_2) y efecto máximo (E_{max}) a la fenilefrina.....	42
3.2b.II. Determinación de la potencia de los antagonistas en la arteria aorta.....	43
3.2b. III. Antagonismo de BMY 7378.....	44
3.2b. IV. Antagonismo de RS100329.....	46
3.2c. Curvas concentración-respuesta en presencia de antagonistas en la arteria carótida	46
3.2c.I Sensibilidad (pD_2) y efecto máximo (E_{max}) a la fenilefrina.....	46
3.2c.II. Determinación de la potencia de los antagonistas en la arteria carótida.....	47
3.2c.III. Antagonismo del BMY 7378.....	48
3.2c.IV Antagonismo de 5-metil urapidil.....	48
3.2c.V. Antagonismo de RS 100329.....	49
3.2d. Curvas concentración-respuesta en presencia de antagonistas en la arteria mesentérica.....	51
3.2d.I. Sensibilidad (pD_2) y efecto máximo (E_{max}) a la fenilefrina.....	51
3.2d.II. Determinación de la potencia de los antagonistas en la arteria mesentérica.....	52
3.2d. III. Antagonismo del BMY 7378.....	52
3.2d. IV. Antagonismo de 5-metil urapidil.....	53
3.2d. V. Antagonismo de RS 100329.....	53
3.2e. Curvas concentración-respuesta en presencia de antagonistas en la arteria caudal.....	55
3.2e.I. Sensibilidad (pD_2) y efecto máximo (E_{max}) a la fenilefrina.....	55
3.2e.II. Determinación de la potencia de los antagonistas en la arteria caudal.....	56
3.2e.II. Antagonismo de BMY 7378.....	56

3.2e.IV. Antagonismo de 5-metil-urapidil.....	57
3.2e.V. Antagonismo de RS100329.....	57
3.2f. Determinación del RNAm de los receptores α_1 -adrenérgicos en arteria aorta.....	59
3.2g. Análisis de la expresión de los receptores adrenergicos α_1 en arteria aorta.....	62

CAPITULO 4 DISCUSIÓN

4.1 DISCUSIÓN.....	66
1. Sensibilidad y Emax en respuesta a la estimulación por fenilefrina.....	66
2. Determinación farmacológica de los receptores adrenérgicos α_1 en aorta de rata Wistar (Diabética y control).....	72
3. Determinación farmacológica de los receptores adrenérgicos α_1 en arteria carótida de rata Wistar (Diabética y control).....	75
4. Determinación farmacológica de los receptores adrenérgicos α_1 en arteria mesentérica de rata Wistar (Diabética y control).....	78
5. Determinación farmacológica de los receptores adrenérgicos α_1 en arteria caudal de rata Wistar (Diabética y control).....	81
6. Expresión del RNAm de los receptores adrenérgicos en la aorta de rata Wistar de 13 semanas de edad (diabética y control).....	83
7. Expresión de los receptores adrenérgicos α_1 en la aorta de rata Wistar (diabéticas y control).....	86

CAPITULO 5 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1. CONCLUSIONES.....	88
-------------------------------	-----------

5.2. PERSPECTIVAS.....	88
5.3. BIBLIOGRAFÍA.....	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Asimilación de la glucosa por la célula.....	8
Figura 2.	Metabolismo de la glucosa. Ruta del sorbitol.....	12
Figura 3.	División del sistema nervioso.....	17
Figura 4.	Esquema de un Receptor α_1 -adrenérgico.....	20
Figura 5.	Transducción de señal de los receptores α_1 -adrenérgicos.....	22
Figura 6.	Protocolo seguido en el experimento.....	26
Figura 7.	Curvas concentración-respuesta a fenilefrina en arteria aorta y carótida de ratas Wistar control y Wistar diabéticas.....	40
Figura 8.	Curvas concentración-respuesta a fenilefrina en arteria mesentérica y caudal de ratas Wistar control y Wistar diabéticas.....	42
Figura 9.	Curvas concentración-respuesta a fenilefrina en presencia de antagonistas BMY 7378 y RS100329 en arteria aorta de ratas Wistar y Wistar control	45

Figura 10.	Curvas concentración-respuesta a fenilefrina en arteria carótida en presencia de los antagonistas BMY7378, 5-Metil-Urapidil y RS100329.....	50
Figura 11.	Curvas concentración-respuesta a fenilefrina en arteria mesentérica en presencia de los antagonistas BMY7378, 5-Metil-Urapidil y RS100329.....	54
Figura 12.	Curvas concentración-respuesta a fenilefrina en arteria caudal en presencia de los antagonistas BMY7378, 5MU y RS100329.....	58
Figura 13.	Amplificación de RNAm para el receptor adrenérgico α_{1A} en arteria aorta de ratas Wistar y Wistar diabéticas.....	59
Figura 14.	Amplificación de RNAm para el receptor adrenérgico α_{1B} en arteria aorta de ratas Wistar y Wistar diabéticas.....	60
Figura 15.	Amplificación de RNAm para el receptor adrenérgico α_{1D} en arteria aorta de ratas Wistar y Wistar diabéticas.....	61
Figura 16.	Expresión del receptor adrenérgico α_{1A} en arteria aorta de ratas Wistar y Wistar diabéticas.....	63
Figura 17.	Expresión del receptor adrenérgico α_{1B} en arteria aorta de ratas Wistar y Wistar diabéticas.....	64
Figura 18.	Expresión del receptor adrenérgico α_{1D} en arteria aorta de ratas Wistar y Wistar diabéticas.....	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Casos de diabetes mellitus 2 en México.....	5
Tabla 2.	Concentraciones de los antagonistas utilizados.....	29
Tabla 3.	Valores de afinidad estimada.....	39
Tabla 4.	Valores de sensibilidad pD_2 , efecto máximo E_{max} en anillos de arteria Aorta, Carótida, mesentérica y caudal de ratas control y diabética.....	41
Tabla 5.	Valores de sensibilidad pD_2 , efecto máximo (E_{max}), afinidad (pA_2 o pK_B) y pendiente de la curva a fenilefrina con el antagonista BMY 7378 y RS 100329 en arteria aorta.....	43
Tabla 6.	Valores de sensibilidad pD_2 , efecto máximo (E_{max}), afinidad (pA_2 o pK_B) y pendiente de la curva a fenilefrina con el antagonista BMY 7378, 5metil urapidil y RS 100329 en arteria carótida.....	47
Tabla 7.	Valores de sensibilidad pD_2 , efecto máximo (E_{max}), afinidad (pA_2 o pK_B) y pendiente de la curva a fenilefrina con el antagonista BMY 7378, 5metil urapidil y RS 100329 en arteria mesentérica.....	51
Tabla 8.	Valores de sensibilidad pD_2 , efecto máximo (E_{max}), afinidad (pA_2 o pK_B) y pendiente de la curva a fenilefrina con el antagonista BMY 7378, 5 Metil Urapidil y RS 100329 en arteria caudal.....	56

ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina	IgG HPR	Inmunoglobulina G (Acoplado a la Enzima Peroxidasa)
ADA	Asociación Americana de Diabetes	IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
AGEs	Productos Finales de la Glicación Avanzada	INIDDM	Diabetes Mellitus Noinsulinodependiente
AR	Adrenoreceptor	IP₃	Inositol Trisfosfato
AT₁	Receptores para Angiotensina	IRS-1	Receptor de Insulina tipo1
ATP	Adenosintrifosfato	kDa	Kilodaltones
BSA	Albúmina Sérica Bovina	MLCK	Enzima Kinasa de la Cadena Ligera de la Miosina
cAMP	3',5'-adenosinmonofosfato Ciclico	5MU	5-Metil-Urapidil
cDNA	DNA Complementario	NA	Noradrenalina
CE₅₀	Concentración Efectiva 50	NADPH	Dinucleotido Fosfato de Nicotinamida y Adenina Reducido
CMD	Calmodulina	OMS	Organización Mundial de la Salud
DNA	Acido Desoxirribonucleico	pA₂	Afinidad aparente
DAG	Diacilglicerol	pD₂	Sensibilidad (Expresado como -Log CE ₅₀)
DEPC	Dietilpirocarbonato	PKA	Proteína Kinasa A
DM	Diabetes Mellitus	pK_B	Afinidad (Expresado Como -Log Pa ₂)
DM1	Diabetes Mellitus Tipo 1	PKC	Proteína Cinasa C
DM2	Diabetes Mellitus Tipo 2	PVDF	Fluoruro de Polivinildieno
DMG	Diabetes Mellitus Gestacional	RI	Resistencia a la Insulina
E_{max}	Efecto Máximo	RNAr 18s	RNA 18s Ribosomal
GAD	Ácido Glutámico Descarboxilasa	ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
GAPDH	Gliceraldehido-3-Fosfato Deshidrogenada	RT-PCR	Reverso Transcripción- Reacción en Cadena de la Polimerasa
GDP	Guanosindifosfato	U.A	Unidades Arbitrarias
GLUT	Transportador de Glucosa	UDP	Uridin Difosfato
GTP	Guanosintrifosfato	UI	Unidades Internacionales
HLA	Antígenos Leucocíticos Humanos	SDS- PAGE	Gel de Poliacrilamida-Dodecil Sulfato de Sodio
IDDM	Diabetes Mellitus Insulinodependiente	SNC	Sistema Nervioso Central
STZ	Estreptozotocina	VEGF	Vascular Endotelial Growth Factor
TGF	Transforming Growth Factor		

RESUMEN

Los receptores adrenérgicos se localizan en diversos tejidos en el organismo. Los subtipos de receptores α_1 intervienen en la regulación de la función vascular, esta función puede estar alterada en padecimientos crónicos que implican daño vascular, como la diabetes mellitus (DM); por tanto, el objetivo de este trabajo fue ver si los receptores α_1 que están implicados en la disfunción vascular durante la DM experimental en ratas Wistar.

Se usaron dos grupos de ratas Wistar machos, a un grupo se indujo diabetes (estreptozotocina, 55 mg/kg) y otro grupo se usó como control (citrato 7 mM). De cada grupo se disecaron las arterias aorta, carótida, mesentérica y caudal, se hicieron curvas concentración-respuesta a fenilefrina usando antagonistas selectivos: BMY7378, 5-metil-urapidil y RS100329. Por otro lado se cuantificó el RNAm por RT-PCR en tiempo real y la expresión protéica por Western Blot. Se encontró que en ratas diabéticas aumentó el efecto máximo y la sensibilidad a fenilefrina respecto al control de arterias aortas, carótida y caudal (pD_2 8.0, 7.3 y 6.6), mientras que en arteria mesentérica no hubo diferencia entre diabéticas y control. Usando los antagonistas encontramos que el receptor que participa en la respuesta contráctil, inducida por fenilefrina, es el α_{1D} en arterias aorta y carótida, obteniendo valores de pK_B altos, en arteria mesentérica los valores de afinidad nos hablan de una mezcla de los tres subtipos y en la arteria caudal, solo en ratas controles parece estar participando el subtipo α_{1A} y en diabéticas una mezcla de los tres subtipos. El RNAm de los subtipos α_{1B} , α_{1D} en arteria aorta es \cong doble de la expresión que

en ratas controles, y el subtipo α_{1A} disminuyó 47% que en el grupo control. La misma relación de expresión de mensajero se presentó al cuantificar el receptor, los α_{1B} y α_{1D} aumentaron y el α_{1A} disminuyó. Los resultados indican que la DM altera la expresión de los receptores α_1 , sugiriendo que el aumento contráctil en arterias de ratas diabéticas se debe a un incremento de los receptores α_{1D} y probablemente al α_{1B} .

ABSTRACT

Diabetes Mellitus (DM) is a disease characterized by hyperglycemia that leads to metabolic dysregulation and pathophysiologic complications, like diabetic nephropathy, blindness, liver and vascular dysfunction. The aim of this work was to determine the effect of the diabetic state on vascular α_1 -adrenoceptors function. *Methods:* Male Wistar rats were injected with streptozotocin (50 mg/kg) at 6 weeks of age, DM was present for 6 more weeks (440 mg glucose/dl); control rats had 12 weeks of age. Carotid, mesenteric and caudal arteries were obtained from 5 diabetic and 5 control rats. Phenylephrine-induced contraction was measured by standard procedures in isolated arterial rings. In order to identify the receptors involved in contraction, 5-methylurapidil and RS100329 (α_{1A} -adrenoceptor antagonists) and BMY7378 (α_{1D} -adrenoceptor antagonist) were used. Results show that carotid and aorta artery from DM rats express α_{1D} -adrenoceptors, caudal artery α_{1A} - and mesenteric artery may express $\alpha_{1A/L}$ -adrenoceptors. Was important determine mRNA and protein of those receptors to relate the function with the expression and if the DM state modifies them. α_{1A} RNAm expression to decrease 63%, whereas, increase α_{1D} , α_{1B} in diabetic rats. The protein quantification to be connected with prior result, to decrease α_{1A} , increases the protein expression α_{1D} and α_{1B} . We conclude than en diabetic rats, smooth muscle reactivity is increase because subtype α_{1D} adrenergic and probability α_{1B} over expression in artery aorta. Increased glucose and decrease insulin may play a crucial role in alteration of vascular function for adrenergic receptor family α_1 .

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. DIABETES MELLITUS: Definición, Clasificación y Perspectiva Actual

1.1a. Definición

La diabetes mellitus (DM), es una enfermedad sistémica crónico-degenerativa que encierra un amplio y heterogéneo conjunto de trastornos de etiología variada donde existe una alteración crónica del metabolismo de carbohidratos y, en menor grado, de proteínas y lípidos; lo cual conduce a hiperglicemia, hiperlipidemia e hiperaminoacidemia, (Expert Committee on the Diagnosis and Classification of DM, (Comitee, 2003). Esta enfermedad es causada por una deficiencia en la secreción insulina ya sea relativa o absoluta y/o una resistencia a la acción de esta hormona en los diversos tejidos del organismo (Harrison's, 2001; Pacheco, 2005).

La insuficiencia en la secreción y acción periférica de la insulina (resistencia a la insulina) es debida a diversas causas, como la destrucción de las células β del páncreas por una reacción inmunitaria, que es mediada por anticuerpos y por reacciones celulares.

La DM puede presentar síntomas característicos como poliuria (aumento de la excreción urinaria), polidipsia (necesidad de tomar agua) y polifagia (aumento del

apetito), visión borrosa y pérdida de peso. En forma más severa, si no se prescribe un tratamiento adecuado puede conducir a coma diabético y finalmente a la muerte.

1.1b. Clasificación de la diabetes

En julio de 1997, la Asociación Estadounidense de Diabetes (ADA, American Diabetes Association), con el aval de la Organización Mundial de la Salud (OMS), estableció la clasificación de la diabetes de la manera siguiente:

Diabetes mellitus:

Tipo I. Conocida como diabetes insulino-dependiente IDDM o DM1.

Tipo II. Conocida como no insulino-dependiente INIDDM o DM2 (Alberti y Zimmet, 1998; citado en (Goodman-Gilman, 2003) Expert Committee and Classification of Diabetes Mellitus, 2003

La DM1 se caracteriza por la dependencia total de insulina exógena y constituye del 3 al 5% de todos los casos reportados de esta enfermedad. Este tipo de diabetes puede ser por causas de tipo inmune o idiopática. Para el desarrollo de la DM1 tienen importancia tanto los factores genéticos como ambientales; aunque los factores genéticos están bien caracterizados y se relacionan con los genes que controlan la respuesta inmunitaria, se han detectado auto anticuerpos frente a proteínas en la membrana de las células β en etapas tempranas de la enfermedad o antes de que empiece el padecimiento; también se han descubierto anticuerpos contra la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD), esta enzima es similar a una proteína del virus Cocksackie B la cual se dirige a una fosfatasa presente en el interior de las células β . También se ha comprobado la presencia de anticuerpos contra la propia insulina, o

bien, anticuerpos contra la proteína de choque por calor y contra la albúmina sérica. Este tipo se relaciona con tipos de antígenos leucocíticos humanos (HLA) específicos. Aunque es importante señalar que aun se desconoce el desencadenante de la respuesta inmunitaria que conduce a esta enfermedad.

La DM2 es la forma más común de diabetes, comprende el 95% del total de las personas con esta afección y principalmente ocurre en individuos obesos, asociados con hipertensión y dislipidemia. Esta forma de DM es el resultado de la interacción de factores tanto genéticos como ambientales. Aunque en pocos casos, la DM2 involucra síndromes monogénicos, en los cuales el grupo de enfermedades en pacientes jóvenes es poco predecible, la mayoría de los casos involucra múltiples alteraciones genéticas.

La fisiopatología de la DM2 es multifactorial, pero se hacen evidentes tres defectos: disminución en la respuesta tisular a la acción de la insulina (resistencia a la insulina, RI), aumento en la producción hepática de glucosa y falla de las células β del páncreas para compensar la RI (The Expert Committee on Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003); por otro lado, también se ha reportado una disminución del 50 % del volumen total de las células β pancreáticas (Leahy, 1990; tomado de Goodman & Gilman 2003) que se manifiesta con secreción inadecuada de insulina.

Datos recientes indican que la proinsulina plasmática está aumentada en la DM2 hasta alrededor del 20 % de la insulina monorreactiva total. Además, las cifras de proinsulina aumentan en respuesta a cualquier estimulación de las células β .

Existen otros tipos de diabetes que no se clasifican en los tipos de DM anteriores; como aquel tipo de DM que está asociada con ciertas condiciones o síndromes como: enfermedad pancreática, condiciones hormonales, la enfermedad inducida por drogas o químicos, los síndromes genéticos y las anomalías en el receptor para insulina (Galloway, 1998).

Otro tipo es la Diabetes Mellitus gestacional (DMG) debida a una intolerancia a la glucosa que aparece durante el embarazo, esto es un importante factor de riesgo que conduce al desarrollo de DM2.

1.1c. Perspectiva actual de la Diabetes Mellitus

Actualmente las enfermedades crónico-degenerativas, representan un enorme e importante problema de salud pública. Entre los principales padecimientos se pueden citar enfermedades como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), entre otras; estas enfermedades ejercen un gran impacto en la salud individual y en altos costos de atención médica en todo el mundo.

La prevalencia mundial de la DM2 es de tipo epidémico y, si bien, afecta principalmente a individuos entre 40 y 60 años, existe un alarmante aumento de morbilidad en niños y adolescentes (Kaufman, 2002). En el año 2000 la prevalencia mundial de la DM2 fue de 171 millones de personas y se espera que se duplique para el año 2030; sin embargo, se cree que haya una subestimación del 90%, es decir, por cada paciente con DM hay nueve sin diagnosticar, donde ocho de esos nueve pacientes viven en países no industrializados (Diamond, 2003).

En el caso de México, la organización mundial de la salud (OMS) estimó que en el año 2000 había un 3% de la población con DM2. Sin embargo, la Encuesta Nacional de Salud 2000, mostró que la prevalencia en nuestro país era de 11.78%, en individuos de entre los 20 y 69 años de edad (Aguilar-Salinas et al., 2002).

Los nuevos casos de DM2 reportados en México por diferentes nosocomios en el año 2005 (Tabla 1) en la población general, fueron de 387,397 personas en todo el país.

El Instituto Mexicano de Seguro Social (IMSS) estima que los costos por el tratamiento y los derivados por la incapacidad de la DM2 generada es de aproximadamente USD \$1, 000, 000,000 por año (Alpizar, 1999)

La mortalidad anual de adultos con DM2 es del 5.4% y duplica la de los no diabéticos reduciendo la esperanza de vida de 5-10 años (Donnelly et al., 2000).

Tabla 1. CASOS DE DIABETES MELLITUS 2 EN MEXICO AÑO 2005.

Estado	Fuente de notificación									Total
	SALUD	IMSS-ORD	ISSSTE	IMSS-OP	DIF	PEMEX	SEDENA	SEMAR	OTRAS	
Aguascalientes	2 209	1 776	273	0	0	0	20	0	109	4 387
Baja California	4 337	6 581	567	25	0	0	61	5	908	12 484
Baja California Sur	690	915	154	0	0	0	191	0	0	1 950
Campeche	1 455	661	317	142	50	5	187	59	521	3 397
Coahuila	2 128	7 585	5 528	339	0	0	20	0	820	16 420
Colima	1 069	981	45	0	3	0	3	17	61	2 179
Chiapas	5 866	2 968	2 587	905	0	150	286	5	529	13 296
Chihuahua	2 021	6 568	472	251	0	0	60	0	3 020	12 392
Distrito Federal	16 818	7 900	13 489	0	324	175	1 000	55	841	40 602
Durango	2 770	3 785	5 646	282	0	0	66	0	144	12 693
Guanajuato	8 370	8 445	992	49	0	29	93	0	842	18 820
Guerrero	7 496	3 375	2 599	110	0	0	12	172	0	13 764
Hidalgo	3 170	1 379	586	606	0	50	78	0	111	5 980
Jalisco	7 501	15 482	834	96	238	25	145	5	9 500	33 826
México	15 595	13 460	5 065	15	4 896	364	648	0	4 977	45 020
Michoacán	4 652	2 606	1 239	583	0	0	104	20	0	9 204
Morelos	2 879	3 472	3 415	16	0	0	200	0	0	9 982
Nayarit	1 351	1 011	1 477	117	176	0	6	0	28	4 165
Nuevo León	2 815	5 428	475	0	0	58	153	0	4 587	13 516
Oaxaca	5 258	1 826	2 092	1 148	55	105	271	61	224	11 060
Puebla	5 146	10 075	2 965	796	124	11	24	0	1 509	20 650
Querétaro	1 912	2 292	162	8	6	0	0	0	91	4 469
Quintana Roo	667	413	460	0	0	0	33	0	0	1 573
San Luis Potosí	4 349	4 824	1 215	758	0	0	447	0	138	11 731
Sinaloa	4 825	3 949	487	183	617	10	389	167	1 889	12 516
Sonora	4 150	4 348	771	54	0	0	176	54	84	9 547
Tabasco	3 939	1 177	418	0	0	250	138	20	1 034	6 976
Tamaulipas	4 839	5 575	1 155	202	10	227	162	1	162	12 333
Tlaxcala	1 591	1 196	506	0	2	0	189	0	0	3 484
Veracruz	8 503	4 791	615	1 965	422	486	234	115	0	17 121
Yucatán	2 303	2 779	1 472	769	3	0	14	0	554	7 894
Zacatecas	1 797	1 225	349	454	100	0	9	0	1	3 855
TOTAL GLOBAL	142 381	138 848	58 427	9 881	7 026	1 945	5 419	776	32 684	397 387

FUENTE: Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica Dirección General de Epidemiología/ SSA

1.2. ASIMILACIÓN DE GLUCOSA, MODULACIÓN EN LA SÍNTESIS Y SECRECIÓN DE INSULINA.

El páncreas es la pieza clave en la regulación del metabolismo. Este órgano está constituido por aproximadamente 1 a 2 millones de islotes de Langerhans, los cuales secretan al menos cuatro péptidos con actividad hormonal, la insulina, el glucagón, la somatostatina y el polipéptido pancreático (Ganong, 2002)

Las células β del páncreas constituyen el 70 al 80 % de la población celular de los islotes pancreáticos. En estas células se sintetiza y secreta la insulina, hormona anabólica que regula el metabolismo intermedio de los carbohidratos, las proteínas y las grasas. El efecto fisiológico de la insulina es de largo alcance, con acciones rápidas, intermedias y retardadas. La principal función conocida de la insulina es su efecto hipoglucémico, aunque también interviene en el transporte de aminoácidos y de electrolitos, tiene acción sobre algunas enzimas y en el crecimiento. Aun cuando muchos nutrientes, hormonas y estímulos neuroendocrinos modulan la secreción de la insulina, la glucosa es el principal regulador de su síntesis y secreción.

La molécula de insulina consiste en dos cadenas de polipéptidos: la cadena A (de 21 aminoácidos) y la cadena B (de 30 aminoácidos). Ambas cadenas están conectadas por dos puentes disulfuro y un tercer puente disulfuro solo pliega a la cadena A.

La insulina estimula el transporte de glucosa, al menos en parte, al favorecer la traslocación (dependiente de energía, ATP) de vesículas intracelulares que contienen los transportadores de glucosa (GLUT) hacia la membrana plasmática. Este efecto es reversible, los transportadores vuelven al citoplasma en el momento que se elimina la

insulina. La secreción de insulina es un índice de la capacidad secretoria basal de las células β del páncreas. Se estima que la secreción basal de la insulina es de aproximadamente 1UI/h, que permite mantener cifras de glucosa normales durante el ayuno, modulando así la producción hepática de glucosa.

La glucosa entra a la célula por difusión facilitada, la insulina facilita el ingreso de la glucosa en las células cuando se aumenta el número de transportadores. A la fecha, se han caracterizado siete diferentes transportadores (GLUT-1 a GLUT-7), los cuales contienen de 492 a 524 aminoácidos y presentan diferente afinidad por la glucosa. Al parecer cada transportador está implicado en tareas especiales en las membranas de la célula (Ganong, 2002).

El ingreso de la glucosa se da una vez que ésta se capta vía el transportador 2 de glucosa (GLUT-2) por la célula β del páncreas (figura 1). A continuación, la glucosa es fosforilada por la glucocinasa, iniciando su metabolismo oxidativo y glucolítico, aumentando la concentración y producción de ATP en la célula. Esto provoca el cierre de los canales de K^+ sensibles a ATP, originando la despolarización de la membrana celular y como consecuencia apertura de los canales de Ca^{2+} y aumenta la concentración citoplasmática del Ca^{2+} , éste finalmente estimula la liberación de insulina vía exocitosis de los gránulos de secreción, es decir, el Ca^{2+} actúa como un secretagogo de insulina.

Las células β del páncreas tienen receptores para la insulina, estos receptores de insulina tipo1 (IRS-1) son activados por esta hormona y por acción autocrina modula su propia síntesis y secreción.

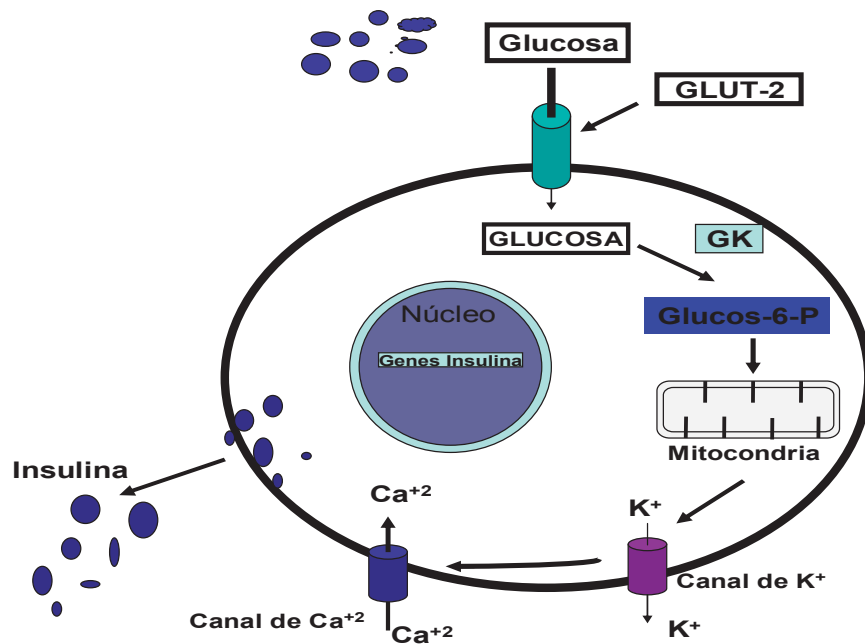


FIGURA 1. Esquema que representa la asimilación de la glucosa por la célula.

1.3. COMPLICACIONES QUE GENERA LA DIABETES MELLITUS.

La DM está asociada a complicaciones que llegan a ser un considerable problema de salud pública. La hiperglicemia es la causa inicial del daño a tejidos, así como las determinantes genéticas o la susceptibilidad individual que conducen a dichos daños. El deterioro de los tejidos por la hiperglicemia se presenta en subgrupos de tipos específicos de células como: células endoteliales de retina, células mesagiales del glomérulo renal, en neuronas y en nervios periféricos.

Se estima que 14% de los diabéticos desarrolla insuficiencia renal crónica, 10% neuropatía motriz, sensitiva y autonómica, 10% pie diabético (1/3 de los cuales terminará en amputación) y 2-5% ceguera. En los diabéticos, la alteración en el metabolismo de lípidos genera hipertensión, aterosclerosis y dislipidemia, lo cual eleva

la incidencia de cardiopatías y vasculopatías (Hernández y Olaíz, 2002). De estas últimas, las enfermedades vasculares tienen la mayor problemática de morbilidad y mortalidad en pacientes con diabetes mellitus (Schalkwijk y Stehouwer, 2005).

Los adultos con DM tienen un riesgo de 2 a 4 veces mayor de eventos cardiovasculares relativos a los que no tienen diabetes (Fox et al., 2004). Las enfermedades cardiovasculares se presentan arriba del 80% en pacientes diabéticos y conducen a mortalidad prematura (Winer y Sowers, 2004).

La DM tiene un progreso silencioso, comúnmente en un inicio esta enfermedad es asintomática y cursa inadvertida. En muchas ocasiones, cuando al paciente se le diagnostica este padecimiento es porque ya ha aparecido alguna complicación debido al aumento de glucosa en sangre.

De las complicaciones que se presentan durante la DM y que es de interés en este trabajo es aquella que implica las enfermedades vasculares. Dentro de estas alteraciones se encuentran las enfermedades microvasculares y macrovasculares (Goodman & Gilman, 2003). Estas complicaciones conducen a la incapacidad y deterioro en la calidad de vida en pacientes con DM.

La DM en humanos se ha asociado con hiperreactividad del músculo liso vascular, y muchos reportes lo han atribuido a un sin fin de posibles causas, como reporta Agrawal y col, quienes reportan que el aumento en la respuesta contráctil en arterias de ratas diabéticas puede ser debido una mayor actividad de los canales de calcio extracelulares en células de músculo liso vascular (Agrawal y McNeill, 1987), de otra forma, puede deberse a una alteración de la distribución del Ca^{+2} subcelular, o por un aumento del anión superóxido $\cdot O_2$ (Fleischhacker et al., 1999), aunque estas

alteraciones también pueden estar asociadas a la gran producción de factores angiogénicos y las citocininas por parte del hígado y que conducen al desarrollo de la aterosclerosis, pues en hígado de pacientes diabéticos se han encontrado genes sobre regulados que codifican para factores angiogenicos, endotelina, citocininas y factores de crecimiento derivados de plaquetas, así como proteínas morfogénicas de hueso (Takamura et al., 2004). De otra manera, también se han atribuido alteraciones en la función endotelial, cuando el endotelio carece de la capacidad para liberar agentes vasodilatadores (Schalkwijk y Stehouwer, 2005). También se ha publicado, que la función alterada del músculo liso vascular, es debido a la liberación de prostaglandianas vasoconstrictoras derivadas de células endoteliales conduciendo a un aumento del efecto contráctil en arterias de ratas diabéticas (Carvalho Leone y Coelho, 2004).

Las consecuencias de la hiperglicemia crónica durante la DM de todos lo fenotipos son divididos dentro de dos complicaciones: Las microvasculares y las macrovasculares (Hammes, 2003), dentro de cada una de estas complicaciones se tiene

COMPLICACIONES MACROVASCULARES:

1. Aterosclerosis coronaria acelerada
2. Aterosclerosis cerebrovascular acelerada
3. Enfermedad vascular de extremidades inferiores acelerada

COMPLICACIONES MICROVASCULARES:

1. Retinopatía
2. Nefropatía

3. Neuropatía

1.4. MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA PATOGENIA DE LAS COMPLICACIONES CRONICAS EN LA DIABETES MELLITUS.

El daño en los tejidos por el aumento de glucosa se presenta de manera predominante en ciertos tipos celulares, en estos tejidos es más común que se presenten las complicaciones durante la DM, esto es debido a que las células en estos tejidos son capaces de aumentar el transporte de glucosa, es decir, su concentración de glucosa se mantiene constante (Brownlee, 2005).

Las complicaciones de la DM pueden tener una base metabólica común. Aunque es posible que los factores genéticos estén involucrados, probablemente también las alteraciones metabólicas y funcionales interactúen en forma sinérgica en el desarrollo de microangiopatías y macroangiopatías.

La relación existente entre la hiperglicemia crónica y el daño vascular han establecido cuatro anormalidades bioquímicas independientes (Brownlee, 2001; Ahmed, 2005): Se aumenta el flujo de la ruta de los polioles, aumenta la formación de productos finales de la glicación avanzada (AGEs), activación de las isoformas de la protein cinasa C (PKC) y aumento en la ruta de la hexosamina. Estas rutas parecieran tener un denominador común la producción de súperoxido por la cadena transportadora de electrones en la mitocondria. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) mitocondrial parcialmente inhiben algunas enzimas glucolíticas como la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenada, GAPDH (Hammes, 2003).

La hiperglicemia mantenida en algunos tejidos puede activar vías metabólicas alternativas cuyos metabolitos pueden afectar la función celular, como por ejemplo las rutas que a continuación se mencionan.

1.4a Aumento en el flujo de la ruta del polioli

El consumo de glucosa por la vía del polioli que tiene lugar en tejidos como la membrana basal glomerular, el cristalino, la mielina y axón de nervios periféricos.

La figura 2 muestra la ruta del polioli, la enzima clave en esta ruta es la aldosa reductasa, la cual en condiciones normales tiene la función de reducir aldehidos tóxicos en la célula, pero cuando las concentraciones de glucosa son elevadas, esta enzima reduce la glucosa a sorbitol, el cual es oxidado a fructosa (Brownlee, 2005). Esta vía de manera simple consiste en:

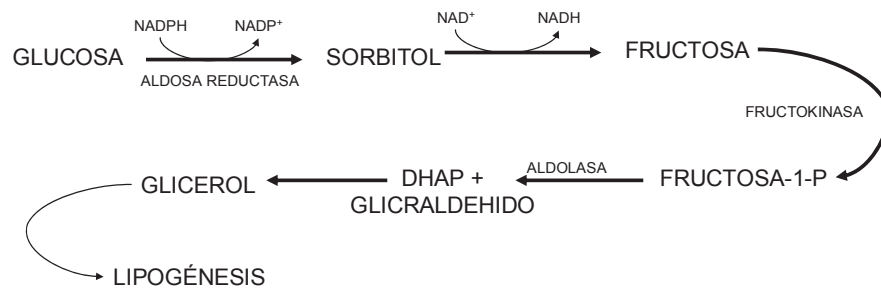


Figura 2. Representación esquemática del metabolismo de la glucosa. Ruta del sorbitol.

Un diabético con hiperglicemia crónica tiene aumentado el flujo de esta vía, por lo tanto, aumentan sorbitol y fructosa que quedan atrapados en el interior de la célula, pues la membrana es impermeable a estos polioles. Por otra parte la aldosa reductasa

reduce los niveles de NADPH celular lo que altera la producción de óxido nítrico endotelial y el balance redox.

1.4b. Aumento en la formación de productos de la glicación avanzada

La glicosilación no enzimática es la capacidad de la glucosa de unirse a proteínas sin necesidad de participación de enzimas. Como consecuencia se producen moléculas estables que afectan las proteínas circulantes, la membrana celular y las proteínas intracelulares.

La glicosilación daña a la célula por tres mecanismos:

1. Modificación intracelular de proteínas, principalmente, las involucradas en la transcripción de genes.
2. Los productos finales de la glicación avanzada pueden difundir fuera de la célula y modificar moléculas de la matriz extracelular.
3. Los precursores de los productos finales de la glicación avanzada difunden fuera de la célula y modifican las proteínas circulantes en la sangre tales como la albumina. Lo que puede causar la producción de citocinas inflamatorias y factores de crecimiento y esto causar patologías vasculares.

Los principales efectos de la glicosilación no enzimática son:

1. Menor degradación de proteínas glicosiladas
2. Glicosilación de los ácidos nucleicos, lo cual conduce a alterar la función del DNA (mutaciones).

3. Alteración a nivel de receptores; los macrófagos, los monocitos y las células endoteliales tienen receptores de membrana cuya glicosilación impide su función de reconocimiento de moléculas.

1.4c. Activación de la proteína kinasa C

La hiperglicemia mantenida produce activación de la proteína kinasa C (PKC), vía diacilglicerol, con daño de la microcirculación y nervios, aumento de la permeabilidad vascular y aumento de la expresión de factores de crecimiento como VEGF (vascular endothelial growth factor), TGF-beta (transforming growth factor).

Existen distintas isoformas de la proteína kinasa C, en distintos tejidos. La isoforma beta ha sido la más frecuentemente asociada al daño producido en la diabetes. Cuando esta enzima es activada por la hiperglicemia tiene una variedad de efectos en la expresión de genes, p. ej., aumenta la óxido nítrico sintasa, mientras la endotelina 1, disminuye.

1.4d. Alteración de la microcirculación

La DM en la microcirculación inicialmente produce una alteración en la dilatación de arteriolas y vénulas con aumento del flujo sanguíneo, este fenómeno es reversible si hay un buen control metabólico e irreversible durante la diabetes.

1.4e. Aumento de la actividad de la ruta de la hexosamina

Cuando la glucosa se eleva dentro de la célula, la mayor parte de la glucosa es metabolizada por la glucólisis. El metabolismo empieza con la formación de glucosa-6-

fosfato, después hay conversión a fructosa-6-fosfato y el resto sigue la ruta glicolítica, sin embargo, parte de las fructosas-6-fosfato formada se desvía a la ruta donde la enzima glutamina fructosa-6-fosfato amidotrasferasa la convierte a glucosamina-6-fosfato y finalmente a UDP (uridin difosfato) N-acetil glucosamina.

1.4f. Alteración de las células endoteliales

Durante la DM se presenta una alteración de las células endoteliales, lo cual conduce a disfunción vascular, además el endotelio es un importante factor que contribuye a la patogénesis de angiopatía diabética (Schalkwijk y Stehouwer, 2005), así mismo, hay alteraciones en las plaquetas y en la coagulación, lo cual contribuye al aumento del daño vascular. Se ha demostrado modificación en la reactividad plaquetaria por glicosilación de su membrana de estas células y de los productos liberados por ellas.

1.4g. Modificación de las lipoproteínas:

Las dos principales modificaciones en las lipoproteínas en los diabéticos son:

1. Glicosilación no enzimática
2. Modificación oxidativa de las lipoproteínas. Ambas determinan un mayor potencial aterogénico.

1.5. REGULACION DEL TONO VASCULAR

Las arterias son vasos gruesos y elásticos que nacen en los ventrículos del corazón y aportan sangre a los órganos del cuerpo, por ellas circula la sangre a una

presión adecuada debido a la elasticidad de sus paredes. Las arterias contribuyen en mantener la homeostasis del sistema cardiovascular, la cual se regula en parte a través del endotelio localizado en el interior de estos vasos sanguíneos. Este endotelio participa de manera importante en la conservación de la tono vascular mediante la secreción y liberación de diversas sustancias vasoactivas y moléculas de adhesión, por otra parte, las paredes de los vasos realizan importantes funciones que conducen a mantener un equilibrio adecuado de la contracción de las arterias, esto está regulado por el sistema nervioso, a través de los receptores adrenérgicos, principalmente los del tipo α_1 localizados en células de músculo liso de estos vasos.

En el control del tono vascular participa el sistema nervioso, el cual se divide en sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP), este último a su vez se subdivide en sistema nervioso autónomo y somático (figura 2). El sistema nervioso autónomo (SNA) se denomina también visceral o involuntario, pues es el sistema encargado de inervar a todos aquellos órganos viscerales y realiza funciones que no están bajo control voluntario, entre los tejidos que inerva el SNA está el músculo liso de los vasos sanguíneos, el cual es de interés en este trabajo.

El sistema autónomo periférico está constituido por dos grandes divisiones: Simpática y Parasimpática.

El sistema nervioso simpático desempeña un papel principal en la regulación del tono vascular mediante efectos selectivos y específicos, mientras el sistema parasimpático solo desempeña un papel menor en la regulación del tono vascular.

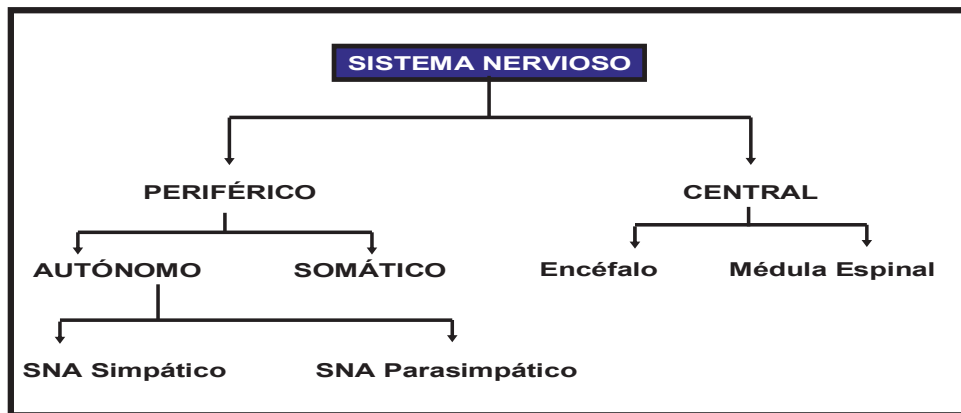


Figura 3. Esquema que representa la división del sistema nervioso

El neurotransmisor de todas las fibras parasimpáticas y de algunas simpáticas es la ACh (acetilcolina), mientras que todas las fibras simpáticas liberan el neurotransmisor noradrenalina (NA). El sistema simpático lleva a cabo la regulación del ambiente interno a través del mencionado neurotransmisor noradrenalina, el cual se une a con receptores que median su respuesta, este grupo de receptores heterogéneos son llamados receptores adrenérgicos (García-Sainz y Torres-Padilla, 1999), es así como estos dos sistemas contribuyen a la regulación de un tono vascular normal, es decir, el equilibrio constante del ambiente interno del organismo se encuentra bajo control en gran medida, por el sistema nervioso autónomo (Goodman & Gilman 2003).

1.6. RECEPTORES ADRENÉRGICOS

En la célula se inician las algunas de las acciones biológicas por interacción de diversas moléculas como neurotransmisores y hormonas a sitios de unión para llevar a

cabo un efecto. Estos sitios son macromoléculas llamadas receptores, los cuales se localizan en la membrana plasmática de la célula.

Basándose en un estudio de regulación de procesos fisiológicos por adrenalina y noradrenalina, (Alquist y col., en 1948 citado en Goodman y Gilman, 2003) postuló la existencia de más de un receptor adrenérgico; sabiendo que estas moléculas tenían reacciones relajantes y constrictoras en el músculo liso fue que se empezó a designar a los receptores como α y β en músculo liso.

Los receptores adrenérgicos son de tres tipos: α_1 , α_2 y β . Se ha sugerido para los receptores del tipo α_1 múltiples subtipos de receptores basados en diferentes potencias de los antagonistas, prazosina y fenoxibenzamina de ensayos in vitro, (Coates et al., 1982; Vanhoutte y Flavahan, 1986).

Actualmente la clasificación que se ha aceptado en base sus diferencias de afinidad a prazosina incluyen los subtipos ($\alpha_{1A}, \alpha_{1B}, \alpha_{1D}$) los cuales estudiamos en este trabajo, tres cDNAs de los α_1 -adrenoreceptores han sido aislados, así como la expresión de las proteínas como tal (Bylund et al., 1994) , cabe mencionar que existe un hipotético subtipo α_{1L} el cual sugiere un fenotipo funcional del adrenoreceptor α_{1A} (Bremner et al., 2001)

Los receptores adrenérgicos se encuentran en casi todos los tejidos periféricos y muchas poblaciones neuronales dentro del sistema nervioso central (Bylund et al. 1994) Los adrenoreceptores son de vital importancia para mediar respuestas fisiológicas, cuando se activan por ligandos endógenos como noradrenalina y adrenalina (Bremner, Griffith et al., 2001) Los subtipos de α_1 adrenoreceptores están involucrados y la activación en el caso especial de vasos sanguíneos, próstata y corazón produce una

contracción del músculo conduciendo a un equilibrio homeostático adecuado (Bremner et al.2001) Se ha encontrado el RNAm que codifica para estos subtipos de receptores α_1 adrenérgicos distribuido en diversos tejidos, sugiriendo funciones independientes (Scofield et al., 1995).

La NA liberada de las terminaciones nerviosas va a unirse a receptores adrenérgicos específicos a través de los cuales ejerce su acción en los vasos sanguíneos y en otros diversos órganos. La NA estimula principalmente a los receptores α -adrenérgicos y en menor grado a los β -adrenérgicos. La activación de los α_1 -adrenoreceptores implica la movilización de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares, así como del espacio extracelular, conduciendo a un aumento de Ca^{2+} citosólico que finalmente conduce a contracción de músculo liso vascular (Minneman et al., 1994)

Los receptores α_1 -adrenérgicos son proteínas de membrana, los cuales son miembros de una superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (Lefkowitz y Caron, 1988). Después de la estimulación de estos receptores por neurotransmisores simpáticos conduce a una cascada de señalización a través de la membrana celular, esto finalmente da lugar a la contracción del músculo liso vascular.

Estos adrenoreceptores se caracterizan por tener siete dominios transmembranales conectados por 3 asas intracelulares y 3 asas extracelulares, con un extremo amino terminal en el lado extracelular en el cual se localizan diversos sitios de glucosilación y un extremo carboxilo intracelular (Figura 3).

En el extremo carboxilo se localizan diversos sitios de fosforilación (por la PKA dependiente de cAMP), dependiendo de cada subtipo de receptor α_1 -adrenérgicos. La

fosforilación del receptor se lleva a cabo como señal de la desensibilización (Benovick et al 1986).

El número de aminoácidos de estos subtipos de receptores es de 466 para el α_{1A} , 519 aminoácidos para el α_{1B} y 572 para el α_{1D} . La localización del gen cromosomal para estos receptores son ADRA1C/8, ADRA1B/5 ADRA1A/20, respectivamente. Estos tres subtipos muestran una extensa secuencia homóloga y se relacionan con rodopsina (Bremner, Griffith et al., 2001); los agonistas y antagonistas se unen a sitios de los receptores α_1 adrenérgicos a una región altamente conservada (Cavalli et al., 1996).

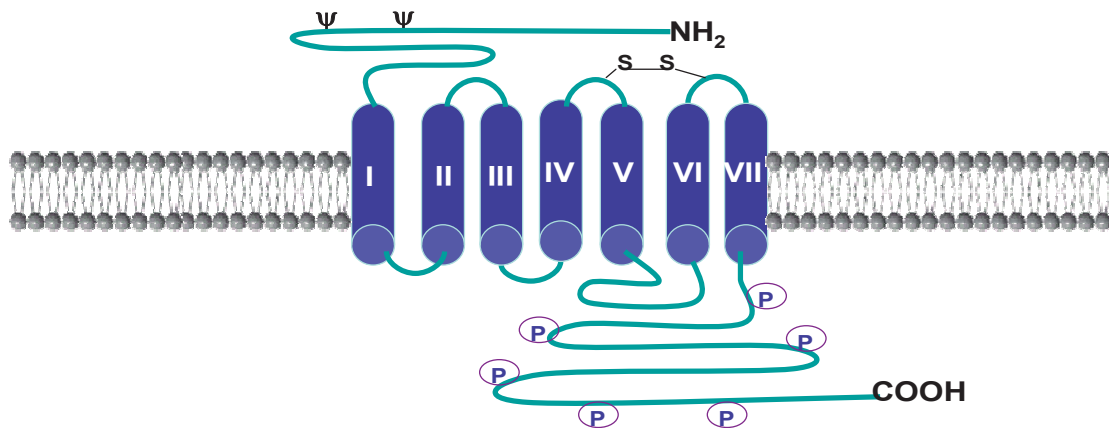


Figura 4. Esquema de un receptor α_1 adrenérgico.

En el lado extracelular S-S, representa puentes bisulfuro en dos asas extracelulares, en el lado amino hay dos sitios (ψ) de coincidencia para la glucosilación ligada a N, mientras el lado intracelular (P) están los sitios de fosforilación por la protein cinasa A, PKA.

1.7. MECANISMOS DE TRANSDUCCION DE SEÑALES

El mecanismo de trasducción de señales por los adrenoceptores α_1 se llevan a cabo cuando diferentes moléculas agonistas se unen a estos receptores y

posteriormente se acoplan a proteínas heterotriméricas unidas a nucleótidos de guanina (proteínas G).

Todas las células de los mamíferos expresan diversas proteínas G acopladas a receptores y efectores, estas median la señalización involucrada en muchos procesos fisiológicos y patológicos (Offermanns, 2003). Las proteínas G constiuyen una gran familia de proteínas; en el genoma humano se han identificado 720 genes que corresponden a esta superfamilia de proteínas G (Krasel et al., 2004; Wise et al., 2004). Estas proteínas se localizan en la membrana plasmática y catalizan el primer paso de conversión de una señal extracelular y su consecuente liberación de segundos mensajeros como DAG, IP₃, cAMP o Ca²⁺ citosólico. Las proteínas G, pueden reconocer una amplia variedad de señales incluidas luz, pequeños iones moléculas orgánicas y proteínas (Krasel, Vilardaga et al., 2004).

Los sistemas de traducción de señales se conforman de tres unidades principales el receptor, la proteína G y su efector (Krasel, Vilardaga et al., 2004). El sistema de trasducción de los receptores α_1 , está compuesto por los subtipos de receptores ($\alpha_{1A}, \alpha_{1B}, \alpha_{1D}$), las proteínas G (del tipo G_{q/11}) y su efector es la fosfolipasa C.

Dicha señalización se lleva a cabo cuando el receptor capta al ligando, noradrenalina o adrenalina (figura 4), este neurotransmisor produce un cambio conformacional al receptor y activa a una proteína G_{q/11}. Esta unión produce el recambio de GTP por GDP en la proteína G y conduce a la disociación de la subunidad alfa del heterotrimerio, la cual activa a una fosfolipasa C que hidroliza fosfolípidos de membrana para producir dos segundos mensajeros el diacil-glicerol (DAG) y el Inositol trisfosfato (IP₃).

El IP₃ tiene afinidad por receptores-canal que se encuentran localizados en el retículo sarcoplásmico y su unión conduce a la apertura del canal para la liberación de Ca²⁺ del retículo.

Cabe mencionar que para que se lleve a cabo un proceso de contracción es necesario que aumenten las concentraciones de Ca²⁺ intracelular (Cauvin et al., 1983) y este aumento proviene del Ca²⁺ intracelular o extracelular, para llevar a cabo la contracción del músculo liso vascular.

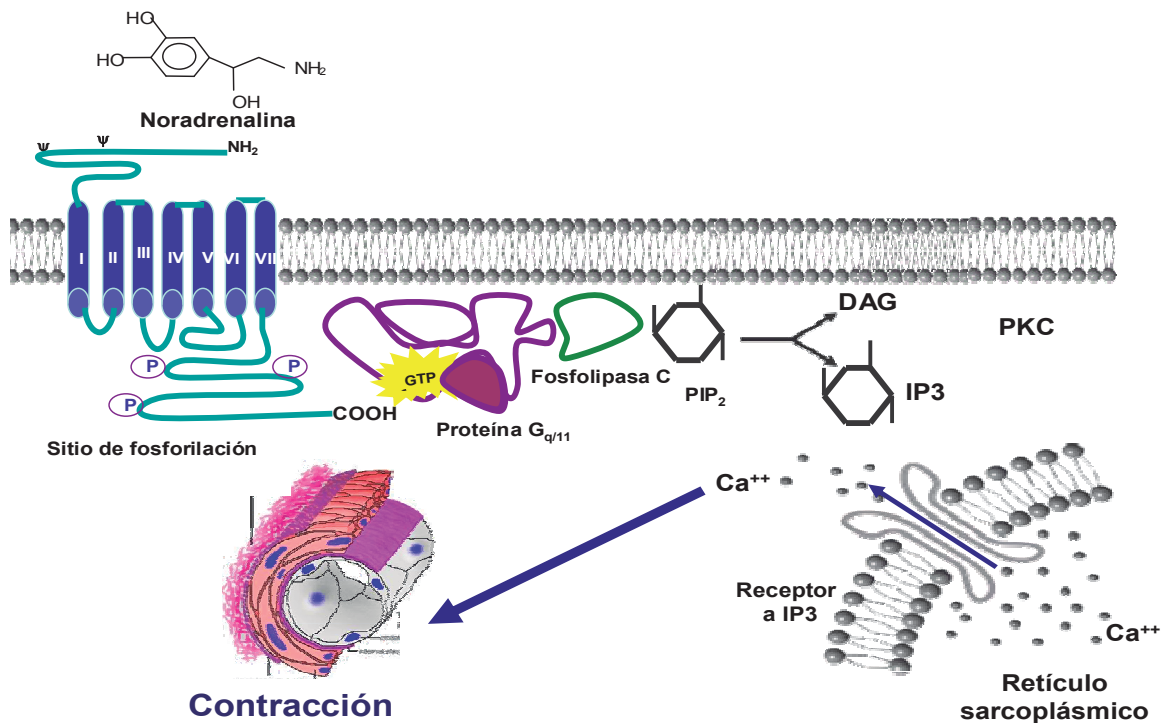


Figura 5. Transducción de señal de los receptores α_1 -adrenérgicos

El músculo liso contiene una maquinaria contráctil compuesta principalmente de dos proteínas, la actina y la miosina de estructura filamentosa. Para que se

desencadene todo el proceso fisiológico de la contracción, el Ca^{+2} necesita unirse a la calmodulina (CMD) que es la proteína mediadora más importante en las funciones del Ca^{2+} , la cual contiene 4 sitios de unión a Ca^{2+} (Means et al., 1991). Cuando se forma el complejo (Ca^{2+} -CMD) se une a la unidad catalítica de la enzima cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) y forman el complejo (Ca^{2+} -CMD- MLCK) holoenzimático que cataliza la transferencia de grupos fosfato de Mg^{+2} -ATP a la cadena ligera de la miosina (Schulman y Hanson, 1993) este proceso estimula la unión de actina a miosina.

1.8. JUSTIFICACIÓN

La DM está asociada con complicaciones que llegan a ser un problema de salud pública de magnitud considerable. Las alteraciones en la función del músculo liso vascular han sido implicadas en el desarrollo de complicaciones vasculares y disfunción circulatoria durante la DM.

Se han reportado innumerables trabajos que asocian las posibles causas de dichas alteraciones, sin embargo, poco es el conocimiento acerca de los cambios que sufre la contractilidad del músculo liso y los mecanismos intracelulares que contribuyen a alterar la sensibilidad de los vasos sanguíneos, durante la diabetes mellitus. Por consiguiente, en este trabajo se determinó la funcionalidad y la expresión de los receptores α_1 -adrenérgicos en la vascularatura de ratas Wistar macho, usando un modelo de DM en rata.

1.9. HIPÓTESIS

La diabetes mellitus modifica la respuesta funcional y la expresión de los adrenoceptores α_1 en arterias de rata Wistar.

1.10. OBJETIVOS

1.10a. Objetivo General:

Investigar los adrenoceptores α_1 que participan en la contracción de arterias aorta, carótida, mesentérica y caudal durante la DM experimental.

1.10b. Objetivos Específicos:

- Identificar el subtipo de adrenoceptor α_1 que predomina para la función contráctil en las arterias en estudio.
- Examinar la expresión de RNAm de los tres subtipos de α_1 -adrenoceptores en arteria aorta.
- Cuantificar la proteína de los tres subtipos de α_1 -adrenoceptores en arteria aorta.

CAPITULO 2

METODOLOGÍA

2.1. DESARROLLO DE LOS MODELOS EXPERIMENTALES DE DIABETES MELLITUS

Se utilizaron ratas Wistar macho de 6 semanas de edad, se tomó un grupo de 5 ratas como grupo control y otro grupo igual para inducir la diabetes de forma experimental. Para la inducción de la DM se inyectaron vía intraperitoneal una sola dosis de estreptozotocina 55 mg/kg (Sigma, S.A), las ratas controles se les administró solamente el vehículo a una concentración 7mM.

Después de 48 horas y hasta el sacrificio del animal se midió la concentración de glucosa en sangre completa con un glucómetro y tiras reactivas. Solo las ratas con glucosa sanguínea >200 mg/dl se consideraron como diabéticas.

2.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

En ambos grupos de ratas diabéticas y sanas como control. Se realizaron curvas concentración-respuesta al agonista fenilefrina (1×10^{-9} - $1 \times 10^{-4.5}$ M) para ver la sensibilidad en los tejidos estudiados. Por otro lado, se sometieron a contracción las arterias en estudio probando diferentes antagonistas selectivos para cada uno de los subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos.

En la segunda parte, se cuantificó el RNAm de los tres subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos por RT-PCR en tiempo real; así como la expresión proteica de estos receptores por Western Blot, en arterias aortas de rata diabéticas y no diabéticas.

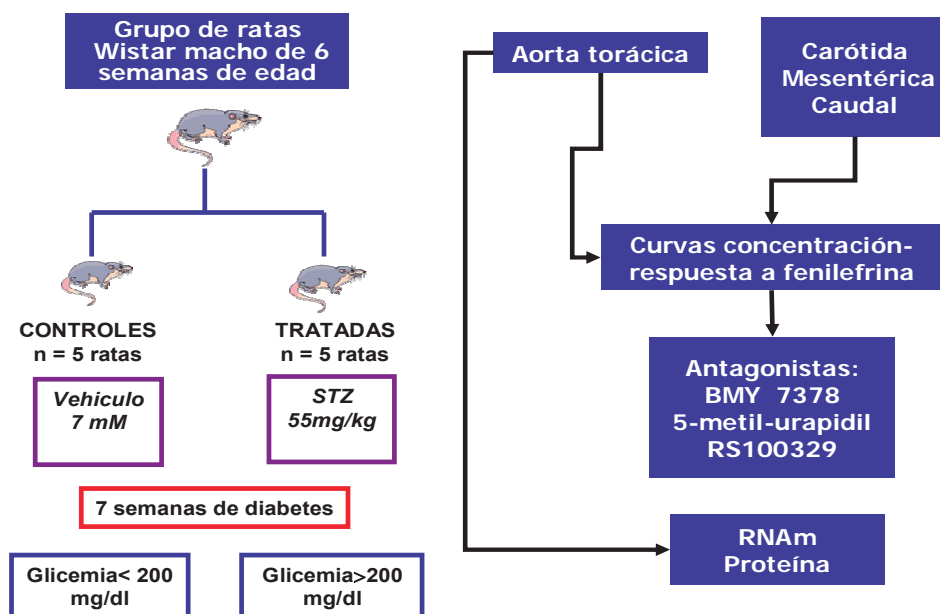


Figura 6. Esquema que muestra el protocolo seguido en el experimento.

2.3. REACTIVOS

Reactivos adquiridos en Sigma-Aldrich: Estreptozotocina, Fenilefrina, Rauwolscina, Propanolol, Carbacol y los antagonistas: BMY-7379, 5-metil-urapidil y RS10032. Todos los reactivos se disuelven en agua destilada excepto la estreptozotocina, este se diluye en una solución de citrato (50 mM, pH 4.5).

Las sondas Taq-Man[®], Assay on Demand[™], para PCR tiempo real se adquirieron de Applied Biosystems.

Los anticuerpos selectivos para cada uno de los subtipos de adrenoceptores se diseñaron en el laboratorio.

Actina y Luminol se adquirieron en Santa Cruz Biotechnology, Inc.

HRP Anti-conejo IgG fue adquirido por Zymed Laboratories Inc.

2.4. PREPARACIÓN DEL TEJIDO

Las ratas se sacrifican en una atmósfera de éter, después se procedió a disecar los vasos en estudio, se hace una incisión abdominal para extraer arteria mesentérica y aorta torácica, en el cuello para la arteria carótida y en la cola para la arteria caudal. Las arterias se limpian de tejido conectivo y grasa, después se cortan en anillos de aproximadamente 3-5 mm de longitud, inmediatamente se remueve el endotelio con un dispositivo metálico rugoso frotando la cara luminal. Esto con la finalidad de ver una respuesta del músculo liso vascular sin que intervengan factores relajantes provenientes del endotelio.

2.5. CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA A FENILEFRINA

Los anillos se colocaron en ganchos de nikrom y se montaron en cámaras para tejido aislado, la cual debe de tener las condiciones adecuadas de temperatura 37° C y burbujeo constante de O₂ (95%) y CO₂ (5%) , con 10 ml de solución Krebs con una composición en (mM) NaCl, 11.1; KCl, 4.7; CaCl, 2.5; MgSO₄, 1.2; KH₂PO₄, 1.2; NaHCO₃, 25; EDTA, 0.026 y glucosa 11.1; con un pH de 7.4 (Ibarra et al., 2000).

Cada anillo se sujeta por un extremo a la base de la cámara con el gancho de nikrom y por el otro lado a un transductor de tensión (FT03 Grass force displacement

transducer; Astro-Med, Inc. West Wawick, RI USA). El transductor a su vez se acopló a un sistema de adquisición de datos (MP100; Biopac systems Inc. Santa Bárbara (CA, EUA). Esto se realizó para registrar los cambios en la tensión isométrica que produzca en el músculo liso arterial.

Los anillos recibieron una tensión inicial de 3 g para la arteria aorta, la carótida y la mesentérica y 2 g para la arteria caudal. Después se hace la sensibilización del tejido 3 veces a intervalos de 30 minutos con una concentración submáxima de fenilefrina ($1 \times 10^{-7} \text{M}$) para arteria aorta y carótida, ($3.1 \times 10^{-6} \text{M}$) para arteria mesentérica y ($1 \times 10^{-5} \text{M}$) para arteria caudal. Esto permite que la arteria se contraiga y se establezca la respuesta. En la última sensibilización se probó la presencia de endotelio, al observar la respuesta relajante del tejido cuando se expone a una solución de carbacol ($1 \times 10^{-6} \text{M}$), los anillos que relajaron menos del 20 % de la contracción producida por el agonista y fueron considerados como anillos sin endotelio (Furchgott y Zawadzki, 1980).

Posterior a la sensibilización del tejido se da un lapso de 30 minutos para que el tejido se reestablezca; durante este tiempo se hacen lavados cada 15 minutos con solución Krebs, seguido de una incubación de otros 30 minutos con los bloqueadores Rauwolscina ($1 \times 10^{-6} \text{M}$) y Propranolol ($1 \times 10^{-6} \text{M}$). Esto con el fin de antagonizar las respuestas mediada por los receptores adrenérgicos α_2 y β , respectivamente, y de esta manera registrar solo una respuesta mediada por los receptores adrenérgicos α_1 .

Después se realizaron curvas concentración-respuesta a fenilefrina (1×10^{-9} - $3.1 \times 10^{-5} \text{M}$) un agonista adrenérgico α_1 . Se construyó una primera curva control utilizando solamente el agonista, y después se hacen otras tres curvas en presencia de antagonistas selectivos a los subtipos de receptores adrenérgicos: 5-metil-urapidil (α_{1A}),

RS100329 aún más selectivo (α_{1A}) y BMY 7378 (α_{1D}). Estos se incuban 30 minutos antes y durante la realización de la curva a fenilefrina.

Las concentraciones de los antagonistas empleados (Tabla 2) se seleccionaron tomando en cuenta reportes previos sobre la afinidad de estos por cada subtipo de receptor α_1 -adrenérgicos, que median la respuesta contráctil en aorta, carótida, mesentérica y caudal.

Tabla 2. Concentraciones de los antagonistas utilizados

	BMY7378 (α_{1D})	5metilurapidil (α_{1A}),	RS100329 aún más selectivo(α_{1A}),
Aorta	$1 \times 10^{-8}M$ $3.1 \times 10^{-8}M$ $1 \times 10^{-7}M$		$3.1 \times 10^{-8.0}M$ $1 \times 10^{-7.0}M$ $3.1 \times 10^{-7.0}M$
Carótida	$3.1 \times 10^{-9}M$ $1 \times 10^{-8.0}M$ $3.1 \times 10^{8.0}M$	$3.1 \times 10^{-9}M$ $1 \times 10^{-8.0}M$ $3.1 \times 10^{8.0}M$	$1 \times 10^{-8}M$ $3.1 \times 10^{-8}M$ $1 \times 10^{-7}M$
Mesentérica	$3.1 \times 10^{-9}M$ $1 \times 10^{-8.0}M$ $3.1 \times 10^{8.0}M$	$3.1 \times 10^{-9}M$ $1 \times 10^{-8.0}M$ $3.1 \times 10^{8.0}M$	$1 \times 10^{-8}M$ $3.1 \times 10^{-8}M$ $1 \times 10^{-7}M$
Caudal	$3.1 \times 10^{-8}M$ $1 \times 10^{-7}M$ $3.1 \times 10^{-7}M$	$3.1 \times 10^{-9}M$ $1 \times 10^{-8.0}M$ $3.1 \times 10^{8.0}M$	$1 \times 10^{-10}M$ $3.1 \times 10^{-9}M$ $1 \times 10^{-8}M$

2.6. EXPRESIÓN DEL RNAm DE LOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS α_1 EN ARTERIA AORTA DE RATA WISTAR

Tanto las ratas diabéticas como las ratas control (n = 5 por grupo) fueron sacrificadas y posteriormente se les disecó la arteria aorta para determinar la expresión del RNAm que codifica para los subtipos de receptores adrenérgicos α_1 empleando la técnica Transcripción Reversa (RT), seguido de una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real.

2.7. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL POR EL MÉTODO DEL FENOL-CLOROFORMO

2.7a. Homogenización

Después de que la arteria aorta se disecó, se limpio de tejido conectivo y grasa, se tomaron 50 -100mg de la arteria aproximadamente, en 1 ml de solución TRIZOL Reagent (GIBCO Life Technologies) y se hace la homogenización. Esto se hizo con ayuda de un homogenizador (Polytron; Biospec Products, Inc., Racine, U.S.A. o tipo Dounce).

2.7b. Separación de fases

Las muestras homogenizadas se incubaron por 5 min (15-30°C), se agregaron 200 µl de cloroformo para permitir la disociación completa de complejos nucleoproteínicos, se agitaron mecánicamente en un vórtex durante 15 segundos, se incubaron durante 3 min (15-30°C) y se centrifugaron a 10 000g durante 15 min (2-8°C).

Una vez separadas las tres fases, se transfirió la fase acuosa a un segundo tubo y se le agregaron 3 µl de glicógeno como acarreador para optimizar la precipitación con el isopropanol del RNA.

2.7c. Precipitación del RNA

A las muestras anteriores se les agregó 500µl de isopropanol seguida de una agitación en el vórtex, se incubó durante 20 min. (15-30°C), se centrifugaron a 12 000g

durante 10 min (2-8°C) y se les removió el sobrenadante dejando únicamente el “pellet” (botón de RNA) que se encuentra en el fondo del tubo.

2.7d. Lavado y disolución del RNA

El botón de RNA se lavó una vez con 1 ml de etanol al 75%, se agitó en el vórtex, se centrifugó a 14 000g durante 10 min para fijar el pellet, se removió el sobrenadante y se hizo un breve secado. Después se disolvió en 100 µl de agua DEPC (agua tratada con dietilpirocarbonato, libre de RNAsas).

2.7e. Cuantificación de la concentración de RNA

De cada uno de los RNA aislados, se tomó 1 µl y se agregaron 200 µl de agua DEPC y se leyó la absorbancia en un espectro ultravioleta, se tomaron las lecturas a 260nm y a 280nm y posteriormente se determinó el coeficiente 260/280 para evaluar la pureza del RNA, empleando como blanco 1ml de agua DEPC.

La concentración de RNA se calculó empleando la fórmula:

$$[\text{RNA } \mu\text{g}/\mu\text{l}] = \frac{\text{Abs}_{260/280} \times 40 \times 200}{1000}$$

Donde:

[RNA] representa la concentración de RNA en µg/µl;

Abs_{260/280} es el coeficiente de las absorbancias a 260-280nm;

40 es un factor de equivalencia, considerando que 1 unidad de absorbancia = 40 µg/ml de RNA;

1000 y 200 son factores de corrección para la dilución empleada.

2.8. TRANSCRIPCIÓN REVERSA (SÍNTESIS DE cDNA)

La transcripción reversa se realizó en un volumen total de 50 μ l que contenía 5 μ g de RNA.

2.8a. Tratamiento con DNAasa

Se tomó el volumen necesario para tener 5 μ g de RNA y se aforó con agua DEPC a 10 μ l, después se hizo una mezcla con 1 μ l Buffer 10X, 1 μ l de la enzima DNAasa incubando las muestras durante 15 min a temperatura ambiente.

2.8b. Inactivación de la DNAasas

A la mezcla producto del tratamiento con DNAasas se le agrega 1 μ l de EDTA 25 mM y se incuba a 65°C durante 10 minutos.

2.8c. Adición de los cebadores

Después se adiciona 1 μ l de Oligo dT y 0.5 μ l de hexanucleotidos (Random Primers), se incuba 65°C durante 5 minutos y después se pasó a hielo 5 minutos.

2.8d. Inhibición de RNAasas

A la mezcla anterior se le añadió una mezcla de 0.5 μ l de RNAout, 10 μ l de Buffer RT 5X, 5 μ l de DTT y 5 μ l de dNTPs 2 mM. Además se adiciona 1 μ l de RT Super Script II RT (Enzima Reverso Transcriptasa), para llevar a cabo la reacción se

incuba a 42°C durante 90 minutos y para inactivar la reacción a 72°C durante 10 minutos.

2.9. AMPLIFICACIÓN DEL cDNA POR PCR EN TIEMPO REAL

Después de la síntesis de la cadena de cDNA, 1 µl de cDNA se amplificó empleando sondas Taq-Man[®], Assay on Demand[™] diseñados por Applied Biosystems. Estos primers están dirigidos contra el gen con el locus ADRA1B para el subtipo α_{1B} con número de Assay RN014 101 343_m1; para el subtipo α_{1A} el locus es ADRA1A con número de Assay RN0056 78 76_m1; el subtipo α_{1D} , locus ADRA1D con número de Assay RN00 57 7931_m1.

Como gen control para normalizar los productos de la amplificación fue el gen Ribosomal 18S (57 pb), la amplificación de este se hizo para cada muestra el “primer” sentido fue 5'-GGG AGC CTG AGA AAC GGC-3' y el “primer” antisentido fue 5'-GGG TCG GGA GTG GGT AAT TT-3' y se amplificaron por PCR en Tiempo Real empleando syber-green[®] como fluoroforo.

La cuantificación de estos resultados se hicieron por el método de $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

2.10. ANÁLISIS POR WESTERN BLOT (ENSAYOS DE INMUNODETECCIÓN) DE LOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS α_1 EN ARTERIA AORTA

2.10a. Homogenización

Las arterias aortas de cada animal, diabéticas y control, se aislaron y se tomó una cantidad de 5mg de tejido aproximadamente. El tejido se homogenizó

individualmente en 1ml de solución R.I.P.A compuesta por: TRIS-HCL pH 7.4, NaCl 5 M, MINICOMPLETE Roche (Mezcla de Inhibidores de proteasas), TRITON X100 y SDS 20%; terminando este proceso se centrifugaron a 10,000g durante 5 minutos y se tomaron los sobrenadantes que contenían las proteínas.

2.10b. Determinación de la concentración de proteínas por el método de Lowry

La concentración de proteínas se determinó por el método modificado de Lowry (Lowry et al., 1951, tomado de Protein Methods., Daniel M Bollang 1991).

Primero se hizo una curva de calibración con albúmina sérica bovina (BSA). Para esta curva se usaron volúmenes que contenían 0.0, 12.5, 25, 50,75 y 100 µg de proteína a partir de una solución madre de 0.5 mg/ml de BSA y se les agrega 0.1 ml de reactivo de Folin; se agita y se deja reposar durante 10 minutos, se toma la lectura de absorbancia a 660nm para realizar la curva patrón. Para las muestras, se les dio el mismo tratamiento con la solución de Folin usando solo 25 µl de muestra y se hizo la lectura a la misma absorbancia.

Con lo resultados anteriores se construyó la curva de calibración en el programa de computo Excel (Microsoft Office) y por interpolación se estimó la concentración de proteínas de las muestras, empleando la ecuación de la línea recta.

2.10c. Electroforesis

Para separar las proteínas las muestras se prepararon como una mezcla (5:1) con un volumen correspondiente a 30 µg de proteínas más un buffer de corrida 6X

Laemlli (que contenía 0.125 M Tris HCl pH 6.8, SDS 10% 0.35 M, Glycerol 20%, 2-mercaptoetanol 2%, Azul de Bromofenol 0.03 mM).

Las muestras se hirvieron por 5 minutos para desnaturalizar a las proteínas y se centrifugaron a 10,000g durante 5 minutos. Después se adicionó una concentración de urea 5M a partir de una solución stock 8M, esto con el fin de desnaturalizar cualquier agregado de la proteína con otras proteínas.

Se prepararon geles para SDS-PAGE al 10% y se cargó una cantidad constante de proteína de 30 μ g de cada una de las muestras en diferentes pozos, además se cargan 10 μ l de marcador de peso molecular (Rainbow, Amersham). La electroforesis se llevó a cabo durante 2 horas entre 80-100 V, para separar las proteínas en función de su peso molecular en un campo eléctrico.

2.10d. Transferencia de la proteína a la membrana PVDF

Una vez terminada la electroforesis, las proteínas separadas por su peso molecular presentes en el gel se transfirieron a membranas PVDF (floruro de polivinildieno, Amersham Biosciences), utilizando buffer de transferencia (Trizma Base, Glicina, Metanol, SDS 10%). La electrotransferencia se hizo en una cámara de transferencia semiseca TRANS-BLOT (Bio-Rad), por 80 minutos 15V y 400 mA

2.10e. Bloqueo de la membrana

Una vez terminada la transferencia, las membranas fueron bloqueadas durante 1 hora con agitación constante en TBS-tween 5% leche (Tris 20mM, NaCl 137mM, tween 20., 0.05% y leche 5% baja en grasas) a temperatura ambiente.

Las membranas se incubaron con un anticuerpo policlonal de conejo contra el receptor adrenérgico α_{1D} de 80 kDa aproximadamente (Garcia-Sainz et al., 2001), dirigido a los aminoácidos LREWLLGPLQR del extremo carboxilo terminal, para el subtipo α_{1A} con un peso aproximado de 60kDa, la región a la que este anticuerpo se dirige es la MVLLSENASEGSNC del extremo amino terminal (Vazquez-Prado et al., 2000) ; α_{1B} cercano a los 80 kDa, dirigido al extremo carboxilo terminal SNMPLAPGHF (Vazquez-Prado et al., 1997) o contra Actina de 43 kDa; (Santa cruz Biotechnology) diluidos 3:10 000 para los adrenoceptores y 1:500 para actina, en TBS-T5% leche a 4° C durante toda la noche, en agitación constante.

Después la membrana se lavó con TBS 0.5% tween y se incubó con el segundo anticuerpo policlonal anticonejo IgG HPR (acoplado a la enzima peroxidasa) de Zymed Inc; en TBS-tween y 5% leche diluido a una concentración 1:10,000 en agitación constante durante 2 horas a temperatura ambiente. Pasando este tiempo la membrana se lavó 3 veces cada 15 minutos con TBS 0.5% tween, y un lavado final con TBS 1X; en agitación constante y a temperatura ambiente.

2.10f. Reacción quimioluminiscente

El revelado se realizó incubando la membrana en un sustrato de inmunofluorescencia Luminol[®] (Santa Cruz Biotechnology), siguiendo las recomendaciones del fabricante

Posteriormente, en un cassette de radiografía se sobrepone la membrana y se expone a una película, después de algunos minutos dependiendo de la intensidad de la banda, la película se sometió a un revelado.

Las películas se digitalizaron con ayuda de un escáner ScanJet 2200c (Hewlett Packard). La intensidad de las bandas se determinó empleando un software de análisis de imágenes (Image 1 N.I.H <http://srb.info.nih.gov/ij/>) y se normalizaron con la intensidad de la actina (proteína control de Santa Cruz Biotechnology)

CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1 ANÁLISIS DE RESULTADOS

En los experimentos de órgano aislado los datos representan el promedio \pm el error estándar de la media de 4-6 anillos aórticos de diferentes animales.

Los valores de CE_{50} (Concentración efectiva 50) o de PD_2 ($-\log CE_{50}$) se determinaron en un análisis de regresión no lineal WinNonlin Professional Edition (Versión 2.1, Palo Alto, California, USA). Dicho análisis emplea un modelo sigmoideal para el ajuste de las curvas concentración respuesta, de acuerdo a la ecuación:

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

Donde:

E: representa el efecto farmacológico

[A]: La concentración del agonista

CE_{50} , m y E_{\max} : Representan los parámetros de localización, pendiente y asíntota respectivamente.

Los valores de pA_2 se obtuvieron por medio del análisis de Schild (Arunlakshana y Schild, 1959). Cuando los valores de la pendiente (m) fueron diferentes de la unidad se calculó el valor de $pK_B = -\log pA_2$ (Furchgott, 1972).

Los valores de afinidad aparente calculados para cada antagonista fueron usados para comparar los valores de afinidad calculada pK_B .

Tabla 3. Valores de afinidad estimada

Fármacos	pK_B		
	α_{1A}	α_{1B}	α_{1D}
BMY 7378	6.37	6.78	8.63
5-metil-urapidil	8.58	6.97	7.49
RS 100329	9.70	8.00	8.00

Para obtener diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.005$), entre cada grupo de ratas (diabéticas y controles) se realizó un análisis de varianza de dos vías, seguido de la prueba Student-Newman-Keuls.

3.2 RESULTADOS

3.2a. CURVAS CONCENTRACION RESPUESTA A FENILEFRINA EN ARTERIA AORTA, CAROTIDA, MESENTÉRICA Y CAUDAL.

3.2a.I. Sensibilidad, CE_{50} Y Efecto Máximo

Para determinar la sensibilidad pD_2 y el efecto máximo de las diferentes arterias en respuesta a un agonista, se llevaron a cabo curvas concentración-respuesta a

fenilefrina (agonista adrenérgico α_1). En el experimento se pudo observar que la fenilefrina produjo una contracción dependiente de la concentración, es decir que conforme va aumentando la concentración de fenilefrina también aumenta la contracción de las arterias aortas, carótidas, mesentérica y caudal, de rata Wistar de 13 semanas de edad, diabéticas y no diabéticas como control.

En anillos de arteria aorta y carótida se aprecia que la sensibilidad a fenilefrina fue mayor en los anillos de ratas diabéticas respecto a las ratas control, (figura 4). Además, el efecto máximo también se ve afectado en arterias diabéticas, siendo un poco mayor en estas respecto a las arterias de rata control (tabla 4)

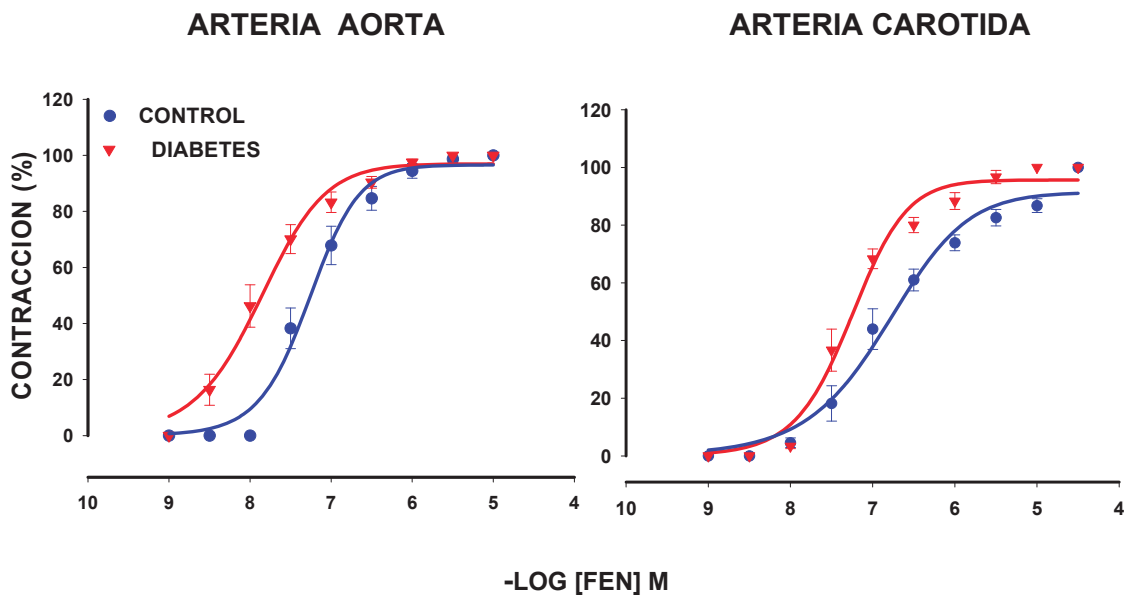


Figura.- 7 Curva concentración-respuesta a fenilefrina en arteria aorta y carótida de ratas Wistar (control) y Wistar diabéticas. El efecto del agonista se presenta como contracción en porcentaje. Los resultados son el promedio \pm e.e de 4 a 6 animales

Tabla 4. Valores de sensibilidad pD_2 , efecto máximo E_{max} en anillos de arteria Aorta, Carótida, mesentérica y caudal de ratas control y diabética.

	Arteria Aorta	Arteria Carótida	Arteria Mesentérica	Arteria Caudal
Ratas Control	$E_{max}= 3.40g$ $pD_2= 7.2$	$E_{max}= 1.1 g$ $pD_2= 6.6$	$E_{max}= 1.0 g$ $pD_2=6.6$	$E_{max}= 3.2g$ $pD_2= 5.97$
Ratas Diabéticas	$E_{max}= 4.0g$ $pD_2= 8.0$	$E_{max}= 1.3g$ $pD_2= 7.3$	$E_{max}= 1.2 g$ $pD_2= 6.6$	$E_{max}= 4.1 g$ $pD_2= 6.6$

Además en los valores de la tabla 4, se muestra la concentración necesaria para producir la mitad del efecto máximo (CE_{50}) y la sensibilidad representada como pD_2 ($-\text{Log } CE_{50}$) y se aprecia que en arteria aorta, carótida y caudal de rata diabética esta concentración es menor que en rata control, es decir, se necesita una menor cantidad de fármaco en arterias diabéticas para producir el 50 % del efecto máximo.

En la arteria mesentérica y caudal, podemos observar como la fenilefrina produjo una contracción dependiente de su concentración, en la figura 8 se aprecia que en la arteria mesentérica no hay una diferencia de sensibilidad pD_2 . El efecto máximo aunque en la figura no se puede apreciar, tiene un aumento mínimo en el valor de contracción en los anillos de ratas diabéticas respecto a los anillos de arterias control (tabla4).

Por otro lado, la arteria caudal sometida a contracción con fenilefrina muestra una diferencia de sensibilidad, es decir, las arterias caudales de ratas con 7 semanas de diabetes son más sensibles para producir un efecto contráctil a una menor cantidad de

fármaco, dicha sensibilidad se aprecia en la figura 8 y cuando se calcularon los valores de pD_2 6.6 para diabéticas y 5.97 para control.

Esto indica que en arterias de ratas con DM se necesita una menor cantidad de fármaco para producir el 50% del efecto máximo, también se observó un efecto máximo mayor en condiciones de DM, que en ratas control (tabla 4).

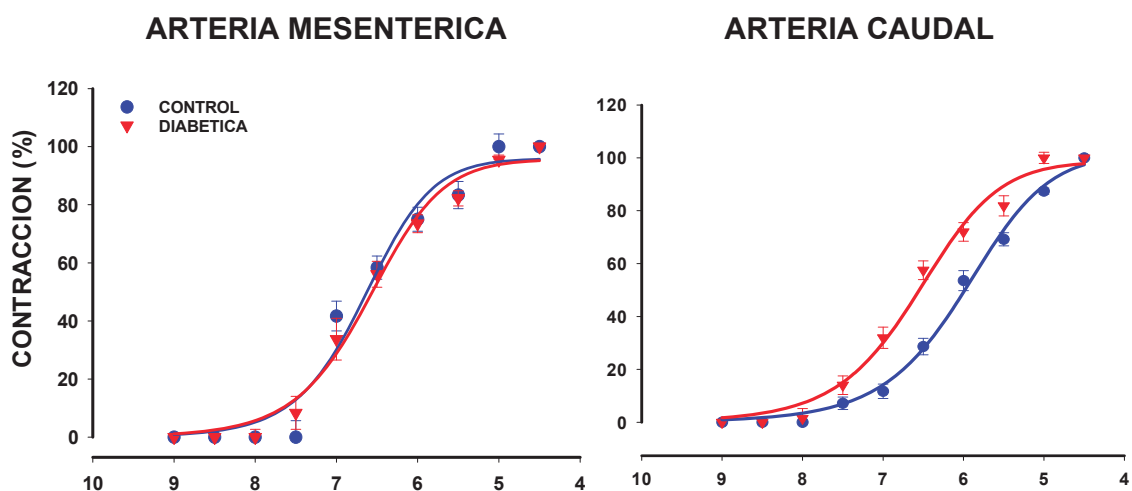


Figura.- 8 Curva dosis respuesta al agonista fenilefrina en arteria mesentérica y caudal de ratas Wistar control y Wistar diabéticas. El efecto del agonista se presenta como contracción en porcentaje. Los resultados son el promedio \pm e.e de 4 a 6 animales.

3.2b. CURVAS CONCENTRACION RESPUESTA EN PRESENCIA DE ANTAGONISTAS EN LA ARTERIA AORTA

3.2b.I. Sensibilidad (pD_2) y efecto máximo (E_{max}) a la fenilefrina

Se construyeron curvas concentración-respuesta a la fenilefrina (un agonista adrenérgico α_1) en anillos de arteria aorta sin endotelio de ratas de 13 semanas de edad, diabéticas y no diabéticas como control, esto para determinar los valores de pD_2

y el efecto máximo (figura 9). En este experimento se observó que la fenilefrina produjo una contracción dependiente de su concentración. También se pudo ver que la sensibilidad a la fenilefrina disminuyen en presencia de los antagonistas BMY en ratas control y con el antagonista RS en ratas diabéticas (Ver tabla 5). Por otro lado, también se pueden apreciar los valores de E_{max} en porcentaje y estos son mayores en arterias de rata control.

Tabla 5. Valores de sensibilidad pD_2 , efecto máximo (E_{max}), afinidad (pA_2 o pK_B) y pendiente de la curva a fenilefrina con el antagonista BMY 7378 y RS 100329 en arteria aorta.

Arteria Aorta	Control		Diabética	
	BMY	RS	BMY	RS
E_{max}	82.3 % ± 3.5	95.5 % ± 4	80.2 % ± 5	89.5 % ± 8
m	1.1*	1.1*	1.4*	1.4*
pD_2	6.32 ± 0.17	6.78 ± 0.29	7.4 ± 0.04	6.45 ± 0.15
pK_B	7.8	7.8	8.6	7.6

* Pendiente ≠ 1

3.2b.II. Determinación de la potencia de los antagonistas en la arteria aorta

Para investigar la participación de los diferentes subtipos de receptores α_1 adrenérgicos, se sometió a contracción la arteria aorta en respuesta al agonista fenilefrina, en ausencia (curva control) y en presencia de concentraciones crecientes de los antagonistas selectivos BMY7378 (1×10^{-8} , 3.1×10^{-8} , 1×10^{-7} M) y RS100329 (3.1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 3.1×10^{-7} M). En este ensayo se pudo observar como la fenilefrina produjo una contracción de manera dependiente de la concentración (figura9) y con cada uno de los antagonistas dicha contracción se ve afectada como se presenta a continuación.

3.2b. III. Antagonismo de BMY 7378.

En la figura 9 panel A, se muestran las curvas concentración-respuesta a la fenilefrina en arteria aorta de rata Wistar en condiciones diabéticas y no diabéticas con 13 semanas de edad, en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de BMY7378, antagonista selectivo para el subtipo α_{1D} y se puede observar que dicho fármaco produjo un desplazamiento de las curvas a fenilefrina hacia la derecha, dependiente de la concentración, es decir, a una mayor concentración de BMY7378 hay una mayor desplazamiento de la curva hacia la derecha y el efecto máximo E_{max} se vio disminuido en su presencia. También se puede apreciar como estas curvas fueron desplazadas paralelamente a las curvas control, lo cual nos indica que se trata de un antagonismo competitivo característico.

Haciendo la relación del desplazamiento con el análisis de Schild para ver los valores de afinidad aparente pA_2 , estos fueron de 8.5 para el tratamiento con BMY 7378 en ratas diabéticas (figura 9 panel A). Las pendientes fueron diferentes de 1, por tanto, se hizo el análisis alternativo, caculo de pK_B (Furchgott, 1972) y este valor también fue un poco mayor en ratas diabéticas respecto al de las ratas control (tabla 5).

Lo anterior indica que el receptor adrenérgico α_{1D} , parece estar participando en la respuesta contráctil mediada por fenilefrina en la aorta de rata Wistar de 13 semanas de edad, aunque la diabetes aumenta la afinidad de la población de receptores por el antagonista, presentado como un pK_B mayor en anillos de rata diabética y menor en ratas controles (tabla 4). Esto parece indicar que la población de receptores α_{1D} está aumentando durante la DM.

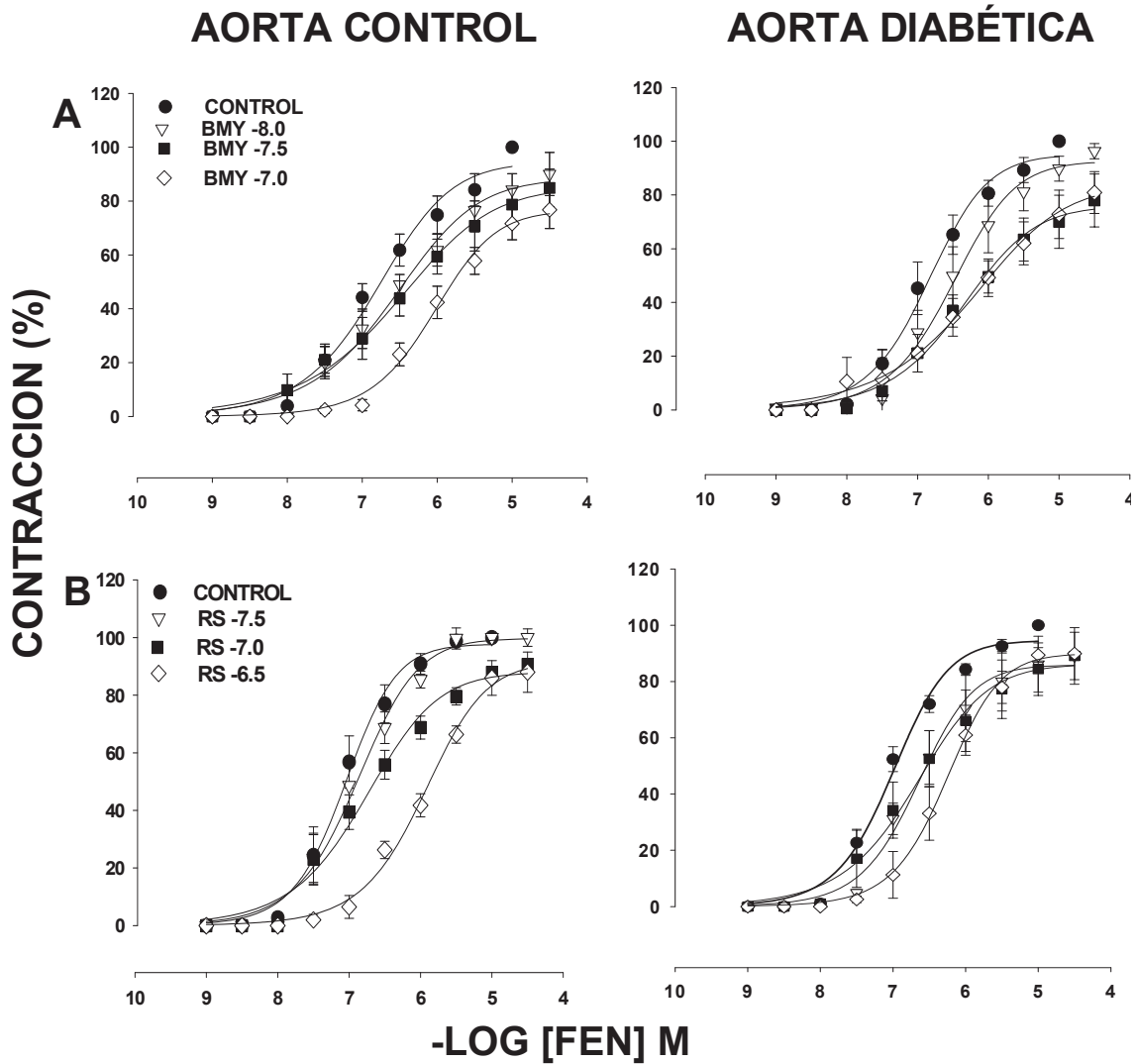


Figura.-9 Curva concentración-respuesta al agonista α_1 - adrenérgico (Fenilefrina) en presencia de BMY 7378 y RS100329 en arteria aorta de ratas Wistar diabéticas y Wistar control. El efecto del agonista se presenta como contracción en porcentaje. Los resultados son el promedio \pm e.e de 4 a 6 animales

3.2b. IV. Antagonismo de RS100329

Las curvas concentración-respuesta a fenilefrina en aorta de rata Wistar de 13 semanas de edad, se presentan en la figura 9 panel B, en ausencia y presencia del antagonista RS100329 selectivo para los receptores α_{1A} . En esta figura, se puede observar que este fármaco produce un desplazamiento de las curvas a fenilefrina a la derecha. Siendo más evidente este desplazamiento en anillos de rata control, el cual es más apreciable a mayor concentración de este antagonista.

Para determinar al subtipo de receptor α_1 que tiene afinidad por el antagonista RS100329S en arteria aorta se determinaron los valores de pA_2 por análisis de regresión de Schild (tabla 5, figura 9), los valores de la pendiente fueron diferentes de 1, por ello se calculó el valor de pK_B , el cual fue bajo (ver tabla 3), tanto en ratas diabéticas como en controles como para poder inferir que el subtipo α_{1A} está participando en la modulación de la contracción mediada por la respuesta a fenilefrina en arteria aorta, es apreciable que el valor de pK_B es menor en arterias de ratas diabéticas, esto nos sugiere que en la diabetes hay una disminución de la afinidad por este antagonista para el subtipo α_{1A} .

3.2c. CURVAS CONCENTRACION RESPUESTA EN PRESENCIA DE ANTAGONISTAS EN LA ARTERIA CARÓTIDA

3.2c.I. Sensibilidad (pD_2) y efecto máximo (E_{max}) a la fenilefrina

Se construyeron curvas concentración-respuesta a la fenilefrina agonista adrenérgico α_1 en anillos de arteria carótida sin endotelio de ratas Wistar de 13

semanas de edad, para determinar los valores de pD_2 y E_{max} . Se observó que la fenilefrina produjo una contracción dependiente de la concentración, además se pudo apreciar que el E_{max} disminuye en presencia de los tres antagonistas usados, siendo más evidente en anillos de ratas diabéticas. También se pudo observar que la sensibilidad a la fenilefrina fue modificada en presencia de los antagonistas, de manera más marcada en anillos de ratas diabéticas, a excepción con el antagonista RS100329, el cual se presenta con un valor un poco menor (tabla 6).

Tabla 6. Valores de sensibilidad pD_2 , efecto máximo (E_{max}), afinidad (pA_{20} o pK_B) y pendiente de las curvas a fenilefrina con el antagonista BMY 7378, 5metil urapidil y RS 100329 en arteria carótida.

Arteria carótida	Control			Diabética		
	BMY	5MU	RS	BMY	5MU	RS
E_{max}	90.8%± 2	86.6%± 4	86 %±5	86%± 1	71.7%±1	78.3%±4
m	1.5*	1.9*	1.6*	1.7*	1.9*	1.9*
pD_2	6.9 ± 0.1	6.9 ± 0.05	6.6±0.2	6.5±0.2	6.8 ± 0.1	7.8 ± 0.1
pK_B	8.2	6.8	6.7	8.5	7.6	7.7

* Pendiente $\neq 1$

3.2c.II. Determinación de la potencia de los antagonistas en la arteria carótida

Para determinar la participación de los diferentes subtipos de receptores adrenérgicos α_1 en arteria carótida de rata Wistar de 13 semanas de edad se determinó la contracción de este vaso en respuesta al agonista fenilefrina en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes del BMY 7378 y 5-metil urapidil (3.1×10^{-9} , 1×10^{-8} , 3.1×10^{-8} M), RS100329 (1×10^{-8} , 3.1×10^{-8} , 1×10^{-7} M); y se observó que la fenilefrina produjo una contracción dependiente de la concentración, es decir, hay un aumento de la contracción hasta alcanzar un efecto máximo E_{max} de contracción el cual

se ve afectado por la presencia de los antagonistas, los cuales desplazan las curvas concentración respuesta a fenilefrina hacia la derecha.

3.2c.III. Antagonismo del BMY 7378

La figura 10 panel A, muestra las curvas concentración-respuesta en arteria carótida de rata Wistar de 13 semanas de edad, de ratas diabética y control. Primero se llevo a cabo una curva control (sin antagonista) y después tres curvas con concentraciones crecientes del antagonista BMY 7378 (3.1×10^{-9} , 1×10^{-8} , 3.1×10^{-8} M), en lo cual se observa como a mayor concentración del antagonista hay un mayor desplazamiento de la curva a fenilefrina hacia la derecha, paralela a la curva control, lo cual nos indica un antagonismo competitivo típico.

Es de notar que las respuestas alcanzan el 100% de efecto máximo E_{max} (figura 10, tabla 6) en anillos de ratas control, sin embargo, en ratas diabéticas el E_{max} disminuye. Por otra parte los valores de pK_B calculados fueron altos (tabla 5), lo que nos indica que el receptor que participa en la respuesta contráctil en la arteria carótida es el subtipo α_{1D} y que en arterias diabéticas parece haber una mayor participación de este subtipo, pues se aprecia un aumento de la afinidad del antagonista BMY 7378 por el subtipo α_{1D} , siendo su pK_B de 8.5 (tabla 6).

3.2c.IV. Antagonismo de 5-metil urapidil

Se hicieron curvas concentración-respuesta a fenilefrina sin antagonista (curva control) y tres curvas más con diferentes concentraciones crecientes del antagonista 5-metil urapidil, en arterias carótida sin endotelio de ratas diabéticas y ratas control de 13 semanas de edad.

En el experimento anterior se apreció que el antagonista 5-metil urapidil desplaza las curvas a fenilefrina paralelamente a la derecha de la curva control hasta que se alcanza un efecto máximo, el cual está disminuido en las curvas de rata diabética, cuando se agregó este antagonista. Se calcularon las pendientes y resultaron diferentes de 1, por tanto, se calculo el pK_B (tabla 6), este valor es bajo en ambas condiciones diabéticas y no diabéticas (tabla3); esto indica que el subtipo adrenérgico α_{1A} parece no estar participando en la respuesta contráctil a fenilefrina en arteria carótida. Aunque en esta arteria de las ratas diabéticas es un poco mayor, esto puede indicar que puede haber un cambio de sensibilidad durante la DM.

3.2c.V. Antagonismo de RS 100329

El antagonista RS 100329 se utilizó para ver la participación del subtipo α_{1A} en arteria carótida en ratas diabéticas y no diabéticas como control. Se hizo una curva control sin el antagonista y tres con concentraciones crecientes con este, en el experimento se puede observar que las curvas a fenilefrina en presencia de RS 100329 se desplazan de manera paralela a la derecha a la curva control, esto nos habla de un antagonismo competitivo, es decir hay una competencia por el sitio receptor de la fenilefrina y el antagonista.

Por otro lado, también se calcularon los valores de pK_B , después de haber obtenido una pendiente diferente 1; estos valores fueron bajos comparados con la tabla 3, lo cual indica que el subtipo α_{1A} no participa en la contracción mediada por fenilefrina en la arteria carótida en ambos grupos, además en ratas diabeticas parece que el subtipo α_{1A} participa menos que en anillos de ratas control (tabla 6; figura 10).

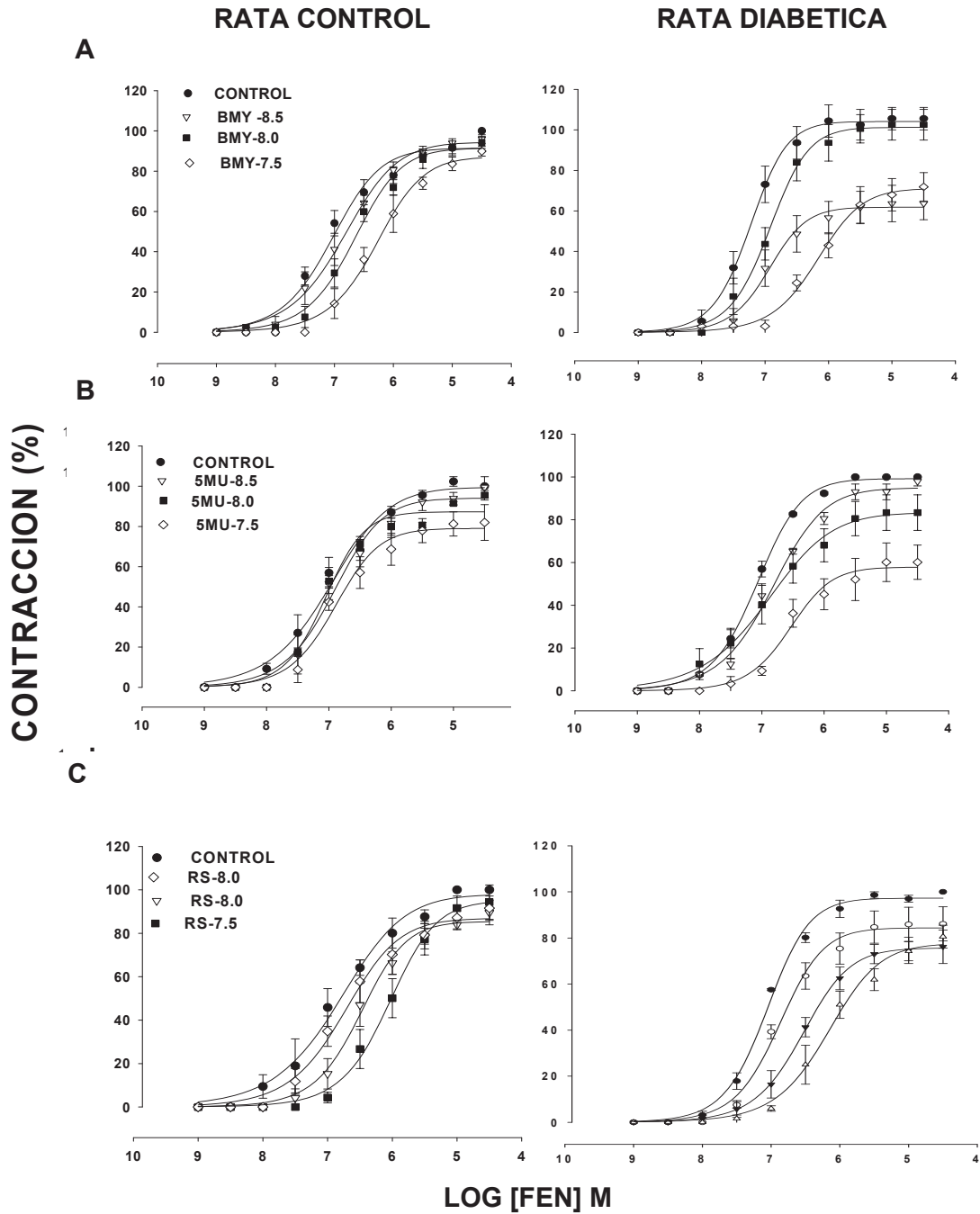


Figura10. Curvas concentración-respuesta al agonista fenilefrina en arteria carótida de ratas Wistar diabéticas y Wistar control en presencia de los antagonistas BMY7378, 5-Metil-Urapidil y RS100329. El efecto del agonista se presenta como contracción en porcentaje. Los resultados son el promedio \pm e.e de 4 a 6 animales

3.2d. CURVAS CONCENTRACION RESPUESTA EN PRESENCIA DE ANTAGONISTAS EN LA ARTERIA MESENERICA

3.2d.I. Sensibilidad (pD_2) y efecto máximo (E_{max}) a la fenilefrina

Se hicieron curvas concentración-respuesta a la fenilefrina en anillos de arteria mesentérica sin endotelio de ratas Wistar de 13 semanas de edad, para determinar los valores de pD_2 y E_{max} . Se observó que la fenilefrina produjo una contracción dependiente de la concentración, es decir, hay un aumento de la contracción conforme aumenta la concentración de fenilefrina hasta que se alcanza un efecto máximo y se pudo apreciar que este efecto no varía en condiciones de ratas diabéticas respecto al control, y que la sensibilidad a la fenilefrina no cambia en ambos grupos, pero si con el antagonista RS100329 y 5-metil-urapidil en condiciones de diabetes, esto es una diferencia mínima no significativa (Tabla 7).

Tabla 7. Valores de sensibilidad pD_2 , efecto máximo (E_{max}), afinidad (pA_2 o pK_B) y pendiente de la curva a fenilefrina con el antagonista BMY 7378, 5metil urapidil y RS 100329 en arteria mesentérica.

Arteria mesentérica	Control			Diabética		
	BMY	5MU	RS	BMY	5MU	RS
E_{max}	92.7%±1	75.3%±8	85.9%±3	95.2%±0.1	88.5%±6	97.1%±3
m	1.7*	1.1*	1.3*	1.7*	1.2*	1.2*
pD_2	6.5 ±0.04	6.5 ± 0.1	6.7±0.1	6.7 ± 0.2	7.1 ±0.16	7.0 ±0.09
pK_B	6.9	5.2	7.4	6.9	6.7	7.0

* Pendiente \neq 1

3.2d.II. Determinación de la potencia de los antagonistas en la arteria mesentérica

Para investigar la participación de los diferentes subtipos de receptores adrenérgicos α_1 en arteria mesentérica de rata Wistar de 13 semanas de edad se hicieron curvas-concentración respuesta al agonista fenilefrina en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes del BMY 7378, 5-metil urapidil (3.1×10^{-9} , 1×10^{-8} , 3.1×10^{-8} M) y RS100329 (1×10^{-8} , 3.1×10^{-8} , 1×10^{-7} M); se pudo observar que la fenilefrina produjo una contracción dependiente de la concentración y con el antagonista se observa lo siguiente.

3.2d. III. Antagonismo del BMY 7378

Las curvas concentración-respuesta de la figura 11, panel A, se realizaron en arterias de ratas Wistar de 13 semanas de edad, diabéticas y control, para la arteria mesentérica se llevó a cabo una curva control (sin antagonista) y tres con diferentes concentraciones crecientes del antagonista BMY 7378 (3.1×10^{-9} , 1×10^{-8} , 3.1×10^{-8} M). En este experimento se observó como la presencia de este antagonista desplaza las curvas concentración a fenilefrina a la derecha, esto nos habla de un antagonismo competitivo del antagonista contra el agonista por el sitio receptor, también se pudo apreciar como a mayor concentración del BMY7378 se produjo un mayor desplazamiento de la curva de fenilefrina hacia la derecha, es decir, con más cantidad de fármaco hay una ocupación superior de la población de receptores presentes en estas arterias, lo que provoca dicho desplazamiento.

También se puede observar en la figura 11 el 100% de efecto máximo E_{max} (tabla 7) en anillos de ratas diabéticas y control. Los valores de pK_B fueron calculados,

y estos fueron bajos para poder inferir que el receptor α_{1D} está participando en la respuesta contráctil en la arteria mesentérica (tabla 7).

3.2d. IV. Antagonismo de 5-metil urapidil

Se construyeron curvas concentración-respuesta a fenilefrina sin el antagonista como control y otras tres curvas, con diferentes concentraciones crecientes de 5-metil-urapidil, en anillos de arteria mesentérica de ratas diabéticas y no diabéticas de 13 semanas de edad de ratas control. Se aprecia que este antagonista desplaza las curvas a fenilefrina paralelamente a la derecha de la curva control, hasta alcanzar el efecto máximo, el cual está disminuido en las curvas de ratas diabéticas.

Después de construir las curvas anteriores, se calcularon las pendientes y fueron diferentes de 1, por tanto, se calculó el pK_B (tabla 7), este valor es bajo tanto en ratas diabéticas como en las no diabéticas, esto indica que el subtipo adrenérgico α_{1A} no está participando en la respuesta contráctil a fenilefrina en arteria mesentérica, aunque en esta arteria en condiciones diabéticas el valor de pK_B es un poco mayor, esto nos da una pauta de que durante la diabetes haya una mayor afinidad por cualquiera de los otros subtipos de receptores en este vaso.

3.2d. V. Antagonismo de RS 100329

Este antagonista se utilizó para confirmar la participación del subtipo α_{1A} en arteria mesentérica de rata Wistar de 13 semanas de edad en ratas diabéticas y no diabéticas como control. Se hizo una curva control sin el antagonista y tres curvas con concentraciones crecientes de RS100329, se puede apreciar que estas últimas curvas

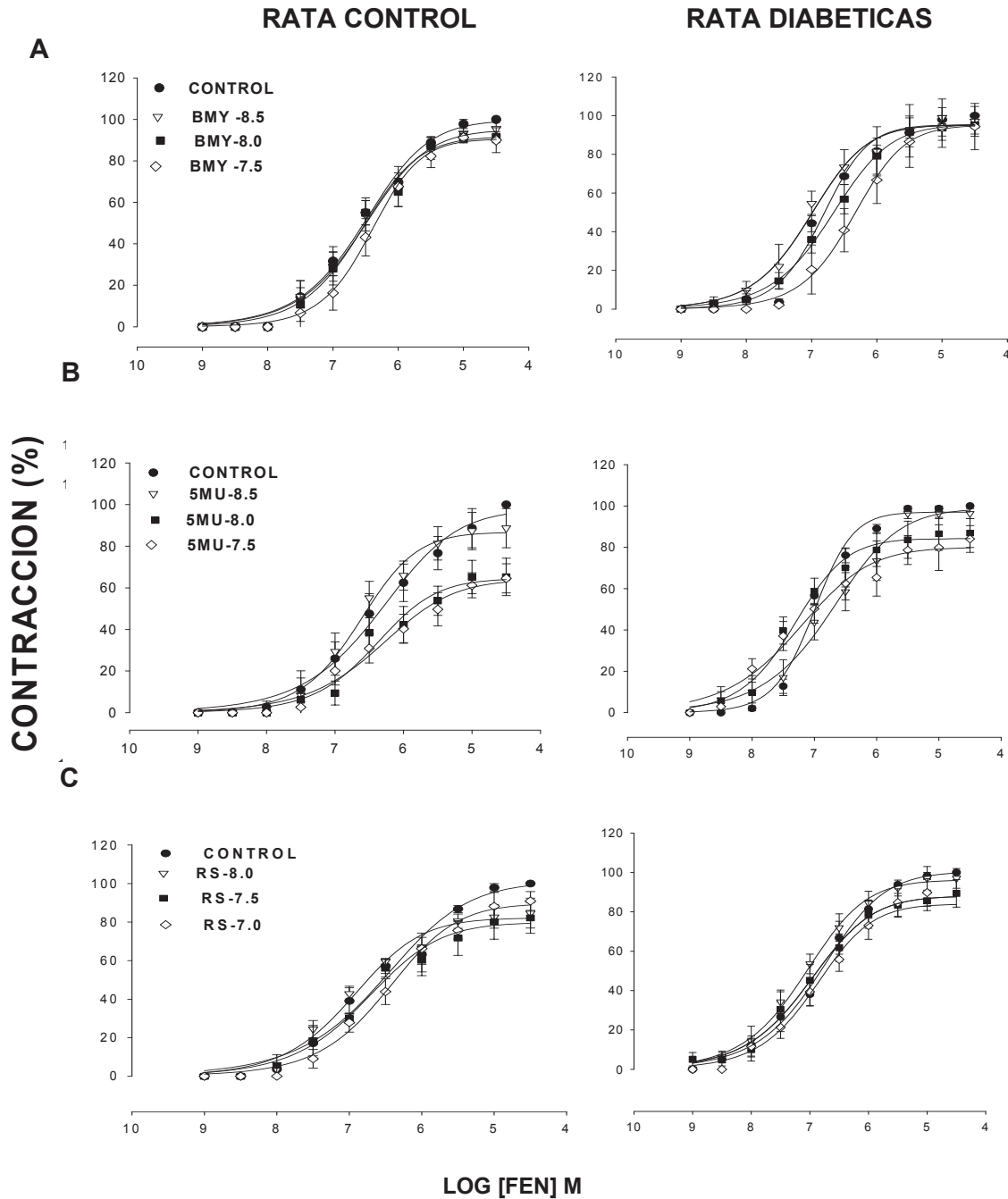


Figura 11 Curvas concentración-respuesta a fenilefrina en arteria mesentérica en presencia de los antagonistas BMY7378, 5-Metil-Urapidil y RS100329 de ratas Wistar diabéticas y Wistar control. El efecto del agonista se presenta como contracción en porcentaje. Los resultados son el promedio \pm e.e de 4 a 6 animales.

a fenilefrina se desplazan de manera paralela a la derecha de la curva control, esto nos habla de un antagonismo competitivo característico. Para estas curvas de la arteria mesentérica también se calcularon los valores de pK_B y estos fueron bajos, comparar con tabla 3, esto indica que el subtipo α_{1A} no participa de manera predominante en la contracción de la arteria mesentérica mediada por fenilefrina (tabla 7; figura 11)

3.2e. CURVAS CONCENTRACION RESPUESTA EN PRESENCIA DE ANTAGONISTAS EN LA ARTERIA CAUDAL

3.2e.I. Sensibilidad (pD_2) y efecto máximo (E_{max}) a la fenilefrina

Se hicieron curvas concentración-respuesta a fenilefrina en anillos de arteria caudal sin endotelio de ratas Wistar de 13 semanas de edad, en condiciones diabéticas y no diabéticas (control) para determinar los valores de pD_2 y E_{max} .

Se observó que la fenilefrina produjo una contracción dependiente de la concentración donde hay aumento de la contracción hasta que se alcanza un efecto máximo de respuesta y este efecto no varía en ratas diabéticas respecto al control.

3.2e.II. Determinación de la potencia de los antagonistas en la arteria caudal

Para investigar la participación de los diferentes subtipos de receptores α_1 adrenérgicos, se determinó la contracción de la arteria caudal en respuesta a un agonista, la fenilefrina, en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de los antagonistas selectivos BMY7378 (1×10^{-8} , 3.1×10^{-8} , 1×10^{-7} M) 5-metil-urapidil (3.1×10^{-9} , 1×10^{-8} , 3.1×10^{-8} M) y RS100329 (3.1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 3.1×10^{-7} M).

En este ensayo se pudo observar como la fenilefrina produjo una contracción de manera dependiente de la concentración, es decir, conforme aumenta la concentración de este antagonista también va aumentando la contracción de la arteria caudal hasta producir un efecto máximo, el cual no se ve afectado en condiciones de DM respecto al control (tabla 8)

Tabla 8. Valores de sensibilidad pD_2 , efecto máximo (E_{max}), afinidad (pA_2 o pK_B) y pendiente de la curva a fenilefrina con el antagonista BMY 7378, 5 Metil Urapidil y RS 100329 en arteria caudal.

Arteria caudal	Control			Diabética		
	BMY	5MU	RS	BMY	5MU	RS
E_{max}	94.3%±4	99.6%±1.3	90.2%±6.0	8.0%±0.4	86.4%±5	98.1%±5
m	1.5*	1.2*	1.3*	1.6*	1	1
pD_2	5.8 ±0.04	5.8 ± 0.09	5.7	5.9 ± 0.06	5.7 ±0.07	6.0
pK_B	6.2	7.4	9.0	7.2	$pA_2=8.0$	$pA_2= 8.0$

* Pendiente $\neq 1$

3.2e.II. Antagonismo de BMY 7378

Para saber la intervención del subtipo de receptores α_1 adrenérgicos de la arteria caudal primero se determinó la contracción de este vaso en respuesta al agonista fenilefrina, en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes del antagonista selectivo α_{1D} BMY7378 (3.1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 3.1×10^{-7} M). Con esto, se pudo observar que la fenilefrina produjo una contracción dependiente de la concentración, y que en presencia del antagonista BMY7378, la curva a fenilefrina no produjo ningún cambio respecto a la curva control sin antagonista, esto indica, que el receptor α_{1D} no está participando en la contracción de la arteria caudal mediada por la fenilefrina (tabla 8, figura 12), pues ni los valores de afinidad aparente se pudieron calcular, he ahí que se

hizo la afirmación de que el subtipo α_{1D} no participa en la respuesta contráctil de arteria caudal.

3.2e.IV. Antagonismo de 5-metil-urapidil.

Para determinar la funcionalidad el subtipo α_{1A} en la contracción mediada por fenilefrina en arteria caudal, usamos el antagonista selectivo para este receptor; el 5-metil-urapidil con tres concentraciones diferentes (3.1×10^{-9} , 1×10^{-8} , 3.1×10^{-8} M) el valor de pA_2 en anillos de rata diabética es bajo, al igual que el valor de pK_B para ratas controles y en ratas diabéticas se obtuvo un valor de pendiente igual a 1 obteniendo un valor de pA_2 8.

3.2e.V. Antagonismo de RS100329

En la figura 12 se muestran las curvas concentración-respuesta a fenilefrina en arteria caudal de rata Wistar de 13 semanas de edad, en ausencia y presencia del antagonista RS100329 que es muy selectivo de los receptores α_{1A} , se puede observar que este fármaco no produce desplazamiento a la derecha de la curva control a fenilefrina, como se presentaría en un antagonismo competitivo típico. A excepción del ligero desplazamiento que se observa en el efecto máximo.

Se obtuvieron valores de pA_2 por la regresión de Schild en ratas diabéticas (tabla 8, figura 12). En ratas controles se obtuvieron valores de pendiente diferentes de 1, por ello se calculó el valor de pK_B , el cual fue alto en estas ratas sugiere que el subtipo α_{1A} participa en la modulación en la contracción mediada por la respuesta a fenilefrina en ratas Wistar y también en ratas diabéticas, pues para estas se pudo calcular el valor de pA_2 obteniendo un valor de pendiente igual a 1.

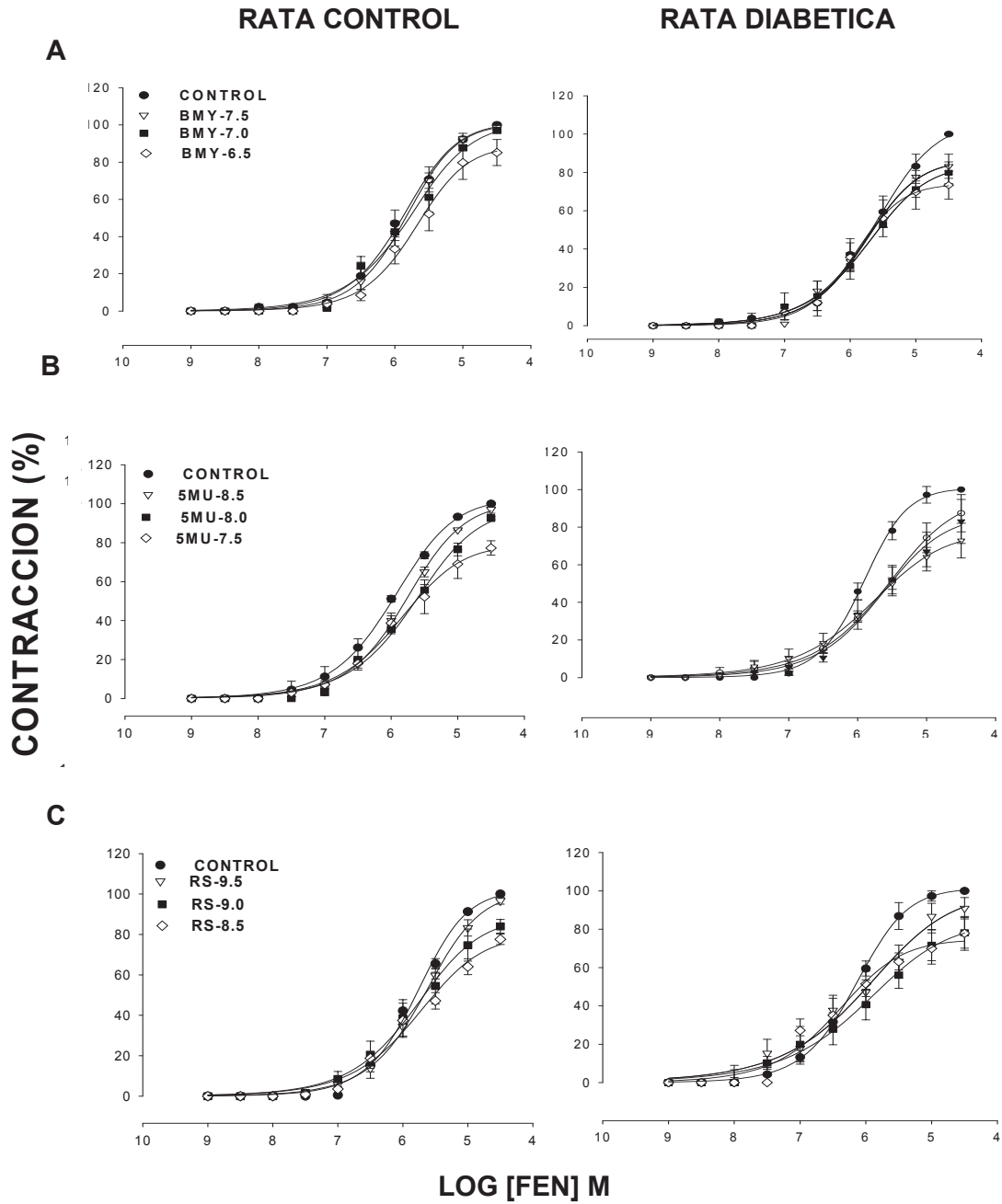


Figura 12. Curvas concentración-respuesta a fenilefrina en arteria caudal en presencia de los antagonistas BMY7378, 5-Metil-Urapidil y RS100329 de ratas Wistar diabéticas y Wistar control. El efecto del agonista se presenta como contracción en porcentaje. Los resultados son el promedio \pm e.e de 4 a 6 animales.

3.2f. DETERMINACION DEL RNAm DE LOS RECEPTORES α_1 -ADRENÉRGICOS EN ARTERIA AORTA

Para determinar la expresión del RNAm de los subtipos de receptores adrenérgicos α_1 , se utilizó la técnica de transcripción reversa seguida de amplificación por PCR tiempo real presentado en las figuras 13,14 y 15 para los subtipos α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} , respectivamente. Para esta determinación se emplearon sondas Taq-Man[®], Assay on Demand[™] diseñados por Applied Biosystems, los cuales contienen los primers específicos para cada gen que codifica para los subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos.

Expresión de RNAm de α_{1A} -AR en Aorta de rata Wistar

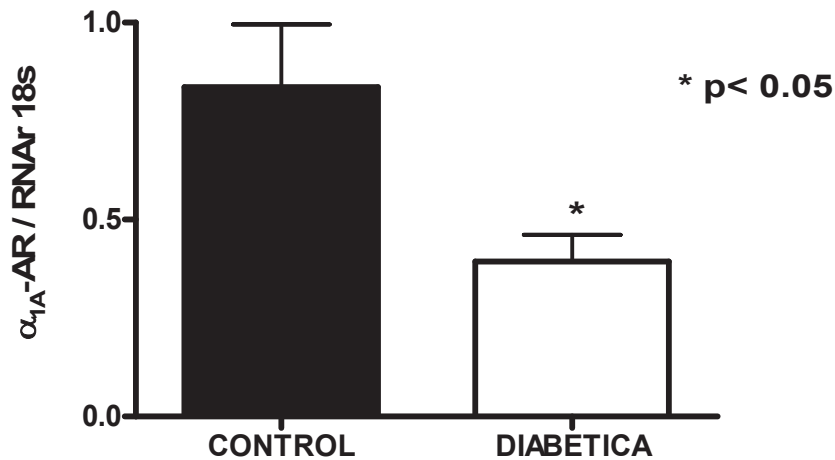


Figura 13. Amplificación de RNAm para el receptor adrenérgico α_{1A} en arteria aorta. Rata Wistar de 13 semanas de edad, diabéticas y no diabéticas (control). Los datos se normalizaron contra la expresión de un gen control (RNAr 18s). Las barras representan el promedio \pm el error estándar de 4 experimentos. * $p < 0.05$; t-Student.

En la figura anterior (figura 13) se muestra la amplificación del RNAm que codifica para el receptor adrenérgico α_{1A} expresado como cDNA α_{1a} en arterias aortas de rata Wistar con 13 semanas de edad, ratas diabéticas en la barra blanca y sin diabetes como ratas del grupo control, barra negra. En este experimento se observa que la expresión del RNAm del receptor α_{1A} adrenérgico disminuye en un 63.0 % en arterias de rata diabética respecto a las arterias de rata control, lo que nos indica que la DM en la rata Wistar está modificando la expresión de el subtipo α_{1A} a nivel RNAm.

Expresión de RNAm de α_{1B} -AR en Aorta de rata Wistar

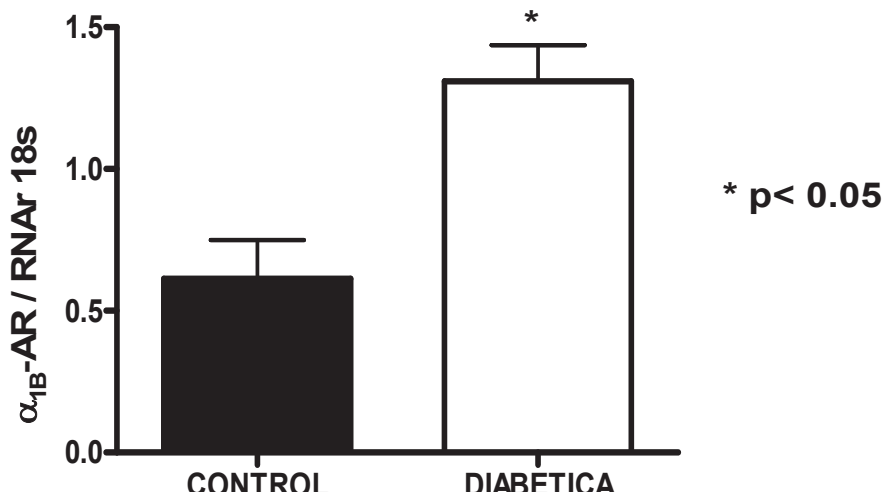


Figura 14. Amplificación de RNAm para el receptor adrenérgico α_{1B} en arteria aorta. Rata Wistar de 13 semanas de edad, diabéticas y no diabéticas (control). Los datos se normalizaron contra la expresión de un gen control (RNAr 18s). Las barras representan el promedio \pm el error estándar de 4 experimentos. * $p < 0.05$; t-Student.

Para el receptor adrenérgico α_{1B} , se realizó la amplificación de su RNAm a través de RT-PCR en tiempo real en la arteria aorta de rata Wistar de 13 semanas de edad, con y sin DM. La figura 14 muestra la expresión basal del RNAm del receptor adrenérgico α_{1B} , y se puede observar que dicha expresión es mayor en ratas diabéticas aumenta en un 100% su expresión respecto al control. Esto indica que en condiciones diabéticas está aumentando la expresión de este subtipo a nivel de RNAm.

Expresión de RNAm de α_{1D} -AR en Aorta de rata Wistar

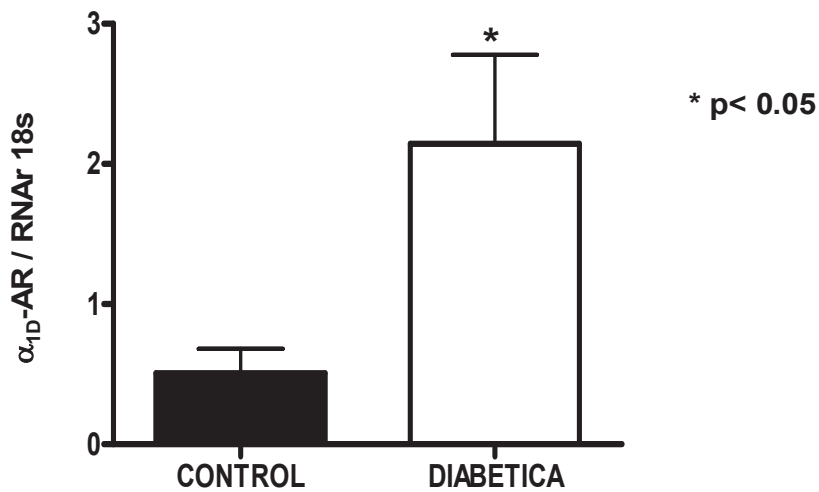


Figura 15. Amplificación de RNAm para el receptor adrenérgico α_{1D} en aorta. Rata Wistar de 13 semanas de edad, diabéticas y no diabéticas (control). Los datos se normalizaron contra la expresión de un gen control (RNAr 18s). Las barras representan el promedio \pm el error estándar de 4 experimentos. * $p < 0.05$; t-Student.

Por otro lado, la amplificación del RNAm que codifica para el receptor adrenérgico α_{1D} (cDNA α_{1d}) de rata Wistar con y sin DM de 13 semanas de edad se

muestra en la figura 15. En esta figura se observa una mayor expresión del RNAm que codifica para el subtipo adrenérgico α_{1D} en arterias de rata diabética respecto al control, por tanto, el estado diabético en rata Wistar aumenta la expresión de RNAm del subtipo α_{1D} .

3.2g. ANALISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES ADRENERGICOS α_1 EN ARTERIA AORTA

Para cuantificar la expresión proteica de los tres subtipos de receptores adrenérgicos α_1 , se realizó su determinación en arteria aorta de rata Wistar de 13 semanas de edad, sin diabetes (ratas control) y con 7 semanas de diabetes mellitus. Para este fin se hizo un análisis Western blot, primero se llevó a cabo una electroforesis (SDS-PAGE), seguida de una transferencia y una posterior inmunodetección, utilizando anticuerpos específicos contra los subtipos de receptores α_1 adrenérgicos y una reacción quimioluminiscente. Las bandas obtenidas tuvieron un peso aproximado de 85 kDa para el subtipo α_{1D} , 60kDa para el subtipo α_{1A} y 80 kDa para el subtipo α_{1B} . Los valores de la expresión de los subtipos de adrenoceptores se compararon contra una proteína de referencia la actina de 43 kDa aproximadamente.

El receptor adrenérgico α_{1A} de manera basal se expresa en menor cantidad en ratas diabéticas. En ratas diabéticas disminuyó la expresión de este subtipo en un 55%, aproximadamente respecto a su expresión en arterias aortas de ratas control (figura 16).

Expresión proteica del receptor α_{1A} en arteria aorta

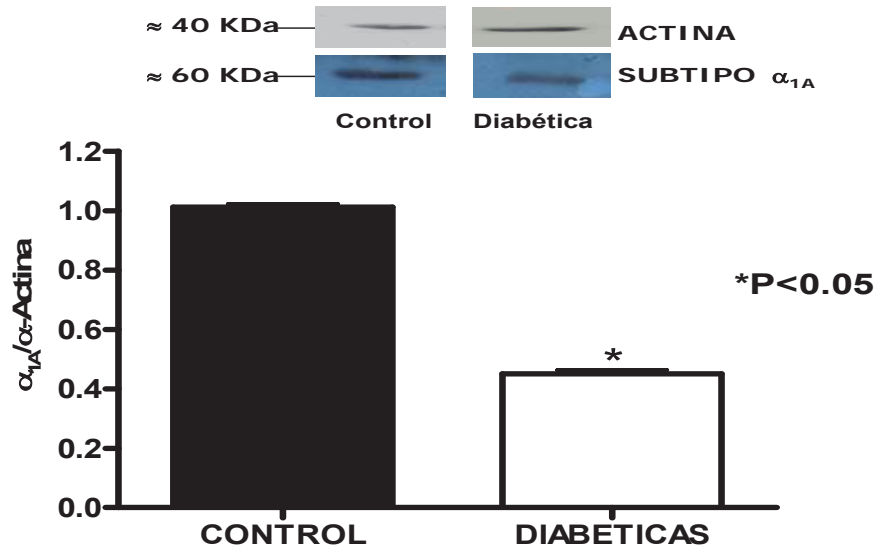


Figura 16. Expresión del receptor adrenérgico α_{1A} en arteria aorta de rata Wistar y Wistar diabéticas. Los datos fueron normalizados contra la proteína la actina. Las barras representan el promedio \pm el error estándar de 5 a 4 animales por grupo expresados en unidades arbitrarias (U.A). En la parte superior se presentan bandas correspondientes a un experimento típico. * $p < 0.05$ t-Student.

El receptor adrenérgico α_{1B} se vió un aumento en la expresión del gen que lo codifica por tanto, también se cuantificó la cantidad de proteína expresada en ratas con diabetes y sin diabetes como control y se encontró que la expresión de manera basal en ratas diabéticas presenta una mayor cantidad, es decir, aproximadamente hay un aumento del 85% más que en arterias de ratas control (figura 17).

Expresión proteica del receptor α_{1B} en arteria aorta

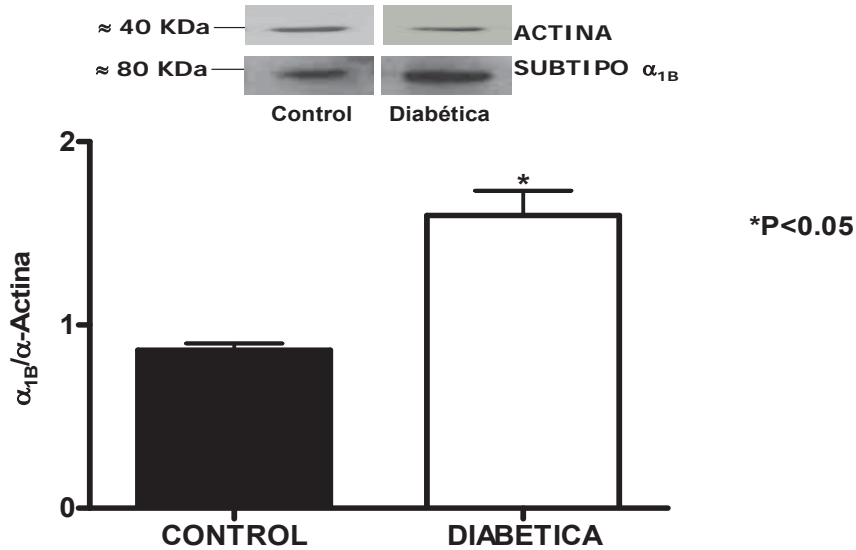


Figura 17. Expresión del receptor adrenérgico α_{1B} en arteria aorta de rata Wistar y Wistar diabética. Los datos fueron normalizados contra la proteína actina. Las barras representan el promedio \pm el error estándar de 5 a 4 expresados en unidades arbitrarias (U.A). En la parte superior se presentan bandas correspondientes a un experimento típico. * $p<0.05$ t-Student.

Por otra parte también se cuantificó la expresión del subtipo de receptor adrenérgico α_{1D} representado en la figura 18 como unidades arbitrarias, en la figura se puede observar que hay una mayor cantidad un 85% más en arterias aortas de rata diabética que en arterias de ratas control.

Expresión proteica del receptor α_{1D} en arteria aorta

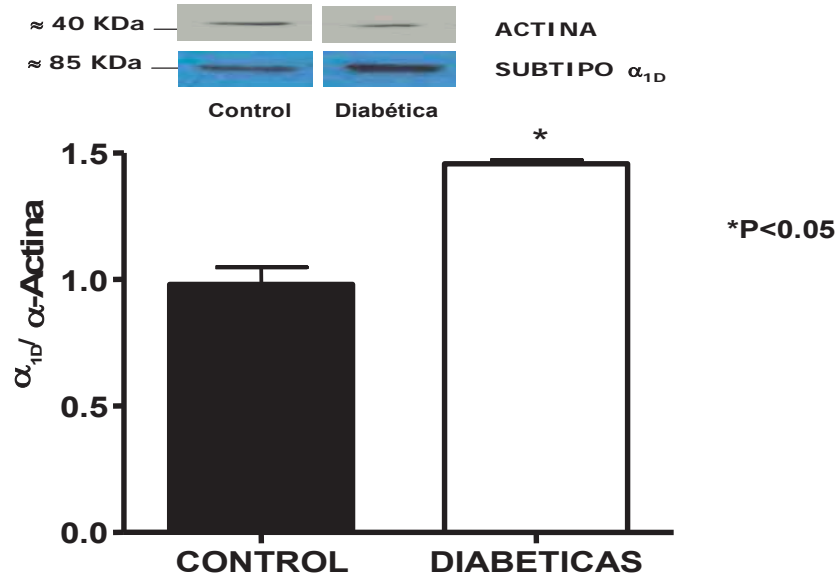


Figura 18 Expresión del receptor adrenérgico α_{1D} en arteria aorta de rata Wistar y Wistar diabéticas. Los datos fueron normalizados contra la expresión de la proteína actina. Las barras representan el promedio \pm el error estándar de 5 a 4 animales por grupo, expresados en unidades arbitrarias (U.A). En la parte superior se presentan bandas correspondientes a un experimento típico. *p<0.05 t-Student.

CAPITULO 4

DISCUSIÓN

4.1 DISCUSION

La diabetes mellitus está asociada con diversas complicaciones en todo el organismo de aquellos individuos que la padecen. Entre dichas complicaciones la que tiene mayor relevancia en cuanto a morbilidad y mortalidad se trata, son aquellas enfermedades que implican daño en los vasos sanguíneos, como todas las enfermedades cardiovasculares. El desarrollo de las alteraciones vasculares y la disfunción circulatoria durante la diabetes melitus, se han atribuido a modificaciones y variaciones de la función del músculo liso vascular por el aumento de cantidades anormalmente altas de glucosa sanguínea (Fleischhacker, Esenabhalu et al., 1999). Pero también, es evidente que a la fecha aun no se han dilucidado cuales son las causas que producen el daño de los vasos sanguíneos que conducen al aumento de complicaciones durante la DM; por tanto, el aporte de esta investigación es la siguiente.

1. Sensibilidad y E_{max} en respuesta a la estimulación por fenilefrina en arterias de rata Wistar.

El primer objetivo de este trabajo fue ver la participación de los receptores α_1 -adrenérgicos en arterias de ratas Wistar que puedan estar influyendo en el aumento de contracción durante la DM. Lo que se obtuvo en este estudio fue una diferencia de

sensibilidad a la fenilefrina en algunas arterias de ratas Wistar con 7 semanas de diabetes comparado con ratas Wistar de 13 semanas de edad sin diabetes como ratas control, además se ve que hay un ligero aumento en el efecto máximo en anillos diabéticos.

En ratas diabéticas, los resultados obtenidos para las arterias aorta, carótida y caudal presentaron un aumento de la sensibilidad a fenilefrina con valores de pD_2 de 8, 7.3 y 6.6, respectivamente. Mientras que en ratas control los valores de sensibilidad pD_2 a fenilefrina fueron de 7, 6.60 y 6.0, correspondientes a arteria aorta, carótida y caudal, respectivamente. Por otro lado, la arteria mesentérica no presentó cambios de sensibilidad y si en E_{max} con este agonista, el valor obtenido de pD_2 es 6.6 para ambos grupos de ratas, los valores de E_{max} se pueden consultar en la tabla 4. Con respecto a los valores de pD_2 se puede apreciar que durante la diabetes se necesita una menor cantidad de agonista (fenilefrina) para producir el 50% del efecto máximo de contracción alcanzado en las arterias en estudio, esto comparado con los valores obtenidos en anillos de arterias de rata control, excepto en el caso de la arteria mesentérica.

Estos cambios permitieron ver que efectivamente, en ratas diabéticas de 7 semanas de hay una mayor sensibilidad al agonista fenilefrina que se traduce en un aumento en la respuesta contráctil mediada por los receptores α_1 -adrenérgicos, lo cual concuerda con diversos autores (Agrawal y McNeill, 1987; Abebe et al., 1990), aunque es importante señalar que el aumento de la contracción está reportado a diferentes tiempos de DM y en diversos vasos sanguíneos, por tanto se pueden encontrar contradicciones en el acrecentamiento o disminución de la contracción del músculo liso

vascular, como es el caso de la arteria mesentérica en esta investigación, en la cual no se encontró ninguna diferencia comparado entre ratas diabéticas y control, pues en el 2004 Carvalho y colaboradores, mencionan que la sensibilidad a fenilefrina varía con el tiempo de exposición de la hiperglicemia, el tipo de vaso, con la cepa y la edad del animal (Carvalho Leone y Coelho, 2004).

Las diferencias de sensibilidad obtenidas en estos resultados, se pueden explicar porque están implícitos muchos mecanismos que conducen a estas respuestas, por ejemplo, aquellos donde participan una alteración de la vía traduccional de estos receptores, el acoplamiento del fármaco al receptor o bien, la cantidad y el tipo de receptores presentes en los vasos estudiados. En estas deducciones se descarta la influencia de las sustancias vasoactivas liberadas por el endotelio (Prostaglandinas, óxido nítrico, etc) que actúan en la contracción y relajación de la arteria (Furchgott, 1984; Ibarra et al., 1995), pues se hizo la remoción de este órgano (endotelio), además se bloqueó a los otros dos miembros de la familia de adrenoceptores (α_2 , β) con el fin de que esta contracción no esté influenciada por vasorrelajantes u otras receptores, así se puede decir, que el aumento de sensibilidad a la fenilefrina es mediado por los receptores α_1 -adrenérgicos.

Lo anterior da la pauta de que la respuesta contráctil mediada por fenilefrina puede ser debida a una población aumentada (incremento de E_{max}) y heterogénea de estos receptores, así como un subtipo de receptor α_1 -adrenérgico que predomina en dichos tejido y que realiza la función de contracción (Oriowo et al., 1987).

El parámetro que involucra un aumento en el efecto producido por un agonista, como anteriormente se mencionó es la densidad de receptores existentes en el tejido

estudiado, esto es propuesto por la teoría de ocupación de receptores planteada por Clark, la cual supone que el efecto de un fármaco es proporcional a la fracción de receptores ocupados por él (Goodman y Gilman., 1998), esto tiene relación con el ligero aumento del efecto máximo en anillos de ratas con DM, hasta aquí se podía inferir que probablemente hubiese un aumento de la cantidad de receptores o de solo un subtipo específico de α_1 -adrenoceptores. Lo anterior de igual manera, está avalado por otros autores, por ejemplo Satoh y col's en 1998, sugieren que las diferencias en los valores de pD_2 a norepinefrina (un agonista muy semejante al que se utilizó en este trabajo), para los receptores adrenérgicos α_1 es debido al resultado de diferencias en la población y densidad de estos subtipos de receptores en arterias de conejo (Satoh et al., 1998).

Así mismo, el aumento de la sensibilidad a diferentes agonistas (norepinefrina, metoxamina y fenilefrina) se ha reportado en vasos sanguíneos de ratas diabéticas y se considera que esta hipersensibilidad puede estar implicada en la patogénesis vascular durante la diabetes (Agrawal y McNeill, 1987).

Por otra parte, Villalobos-Molina en 1997 reportó que solo uno o dos subtipos de receptores parece expresarse y predominar en el músculo liso vascular mediando la contracción a agentes adrenérgicos (Villalobos-Molina et al., 1997), también esto lo ha sugerido Piascik cuando obtuvo resultados con el uso de ligandos radiactivos, anticuerpos específicos y en estudios funcionales (Piascik et al., 1995).

La otra explicación que se le puede dar a los diferentes valores de sensibilidad y aumento en el efecto máximo, es la expresión de los receptores en las arterias, la cual depende de las necesidades de los vaso sanguíneos que contribuyen a la demanda

regional en el flujo sanguíneo, para de esta manera mantener un equilibrio homeostático adecuado, pues existen reportes que mencionan que la arteria aorta adulta expresa funcionalmente de manera predominante el receptor adrenérgico α_{1D} ; la arteria carótida α_{1D} , mientras que la arteria mesentérica expresa una mezcla del subtipo α_{1D} y α_{1A} y la arteria caudal el subtipo α_{1A} (Villalobos-Molina y Ibarra, 1996). Con esto se puede explicar que quizá en la arteria mesentérica no haya una diferencia en la contracción, pues no hay un subtipo que predomine para la función contráctil, sino que sea una mezcla de dos o de los tres subtipos; esto indica que las respuestas adrenérgicas α_1 pueden estar mediadas por diferentes subtipos de receptores, además que la hiperglicemia cambia la expresión funcional de estas proteínas, solo en algunas arterias, dependiendo de cada una de las funciones y necesidades, por tanto, los receptores presentes en la arteria mesentérica parecen no estar afectados por el aumento de glucosa sanguínea.

Con respecto a los cambios observados en los valores de E_{max} en respuesta a fenilefrina no se aprecian cambios significativos, pero si hubo en ratas diabéticas respecto a las ratas control un ligero aumento del efecto máximo en todas las arterias estudiadas (tabla 4). Esto nos habla de que posiblemente hay un aumento de la reactividad vascular, por el aumento de receptores, la cual se manifiesta por un aumento de la sensibilidad al agonista y/o en el E_{max} .

Aunque cabe mencionar que el E_{max} está influenciado por las propiedades transduccionales del tejido, la eficiencia del acoplamiento estímulo-respuesta, la densidad de los receptores y la eficiencia del agonista (Enna, 1998) lo que se concluye que durante a diabetes estos parámetros están influenciados por la hiperglicemia.

Se ha reportado que la arteria carótida expresa funcionalmente el subtipo α_{1D} (Gomez-Zamudio et al., 2002) aunque los valores de sensibilidad parecieran no estar determinando la presencia funcional de este receptor, sino cualquier otro subtipo, pues el valor de pD_2 en ratas control es de 6.6 y 7.3 para los anillos de ratas diabéticas, y se esperarían valores mayores como los de aorta para confirmar que el subtipo predominante en la funcionalidad de este vaso se trata del subtipo α_{1D} , por tanto, si solamente se presentase el receptor α_{1D} , de manera predominante los valores de pD_2 serían mayores, es así que suponemos que hay más subtipos mediando contracción en carótida.

En arteria mesentérica, no hubo cambios entre el grupo de ratas diabéticas y ratas control, pero los valores pD_2 también fueron menores que en aorta, lo que nos sugiere que efectivamente hay una mezcla de receptores α_{1D} y α_{1A} que estén mediando la contracción por fenilefrina.

En la arteria caudal se obtuvieron diferencia de sensibilidad, y se obtuvieron ligeros cambios en E_{max} en anillos de rata diabética respecto al control, en la figura 7 no es apreciable tal fenómeno, pues el efecto del fármaco se graficó como porcentaje de contracción, por tanto, es recomendable ver la tabla 4. Los valores de PD_2 son muy bajos, pero esto puede ser explicado porque esta arteria expresa el receptor adrenérgico α_{1A} (Burt et al., 1995).

Tanto en la arteria aorta como en la arteria carótida los valores de sensibilidad son altos respecto a las otras dos arterias en estudio y este resultado, aun es más elevado en el grupo de ratas con DM, esto nos indicaba que posiblemente está sensibilidad mayor se deba a que durante la diabetes se esté alterando la expresión del subtipo

α_{1D} lo cual se pudo inferir pues anteriormente ya se ha reportado que estos dos vasos expresan de manera predominante y funcional el subtipo α_{1D} .

Con los resultados anteriores de las diferencias de pD_2 entre cada uno de los vasos estudiados en ambos grupos de ratas en orden de potencia fue aorta >carótida> mesentérica > caudal, esto concuerda con otros trabajos que ya ha sido reportado por otros autores en ratas Wistar, en una edad promedio a las usadas en esta investigación (Buckner et al., 1996) esto se puede debido a la población de receptor existentes, que predomina para la función contráctil, es decir, la sensibilidad a fenilefrina en arteria aorta tiene un valor mayor de sensibilidad a este agonista (pD_2), y este fármaco tiene mayor afinidad por el subtipo α_{1D} , pues se ha reportado que el tipo de receptor α_{1D} se encuentra en mayor cantidad en este arteria (Buckner, Oheim et al., 1996)

Con los resultados anteriores, se propuso el objetivo de ver cual de los receptores estaba participando en la respuesta obtenida con fenilefrina en cada una de las arterias estudiadas. Para este fin utilizamos antagonistas selectivos para el subtipo α_{1D} y α_{1A} a diferentes concentraciones BMY 7378 y RS100329, 5-metil-urapidil, respectivamente.

2. Determinación farmacológica de los receptores adrenérgicos α_1 en aorta de rata Wistar (Diabética y control)

Con un agonista selectivo (BMY7378) se valoró si el subtipo α_{1D} contribuye específicamente en la contracción músculo liso vascular en la arteria aorta de ambos grupos de ratas.

El antagonista BMY7378 se une a membranas que expresan copias del adrenoceptor α_{1D} es el cual tiene una afinidad >100 veces más, que para el receptor

α_{1A} o el α_{1B} (Piascik, Guarino et al., 1995) por tanto, es de gran utilidad para clasificar receptores α_1 adrenergicos. Este antagonista se une al receptor sin producir un efecto fisiológico, y en este trabajo se observó que cuando la arteria se sometió a contracción con una curva concentración-respuesta a fenilefrina, la presencia del BMY7378 produjo un desplazamiento de esta curva a la derecha, dependiendo de la concentración usada, es decir, a una concentración mayor del antagonista hay un mayor desplazamiento hacia la derecha. Las curvas alcanzaron el 100% del efecto máximo, y se desplazaron paralelamente a la curva control, lo cual caracteriza al BMY7378 como un antagonista competitivo por el sitio receptor del agonista.

Para poder observar la afinidad aparente entre el antagonista y el receptor se calculó el valor de pA_2 , el cual relaciona el desplazamiento que provoca el antagonista (CE_{50} en presencia de BMY/ CE_{50} de la curva control (sin antagonista); - 1) y la concentración del antagonista. Estos valores se presentan en la tabla 5.

También se determinó la pendiente, la cual fue mayor de 1, esto indica que las condiciones de equilibrio no se alcanzaron completamente entre los complejos que forman el receptor, el agonista y el antagonista (Ford et al., 1996). Esta condición de no equilibrio puede estar influenciada porque el antagonista utilizado tenga una baja afinidad por otros subtipos de receptores presentes en el vaso, que estén mediando la contracción en arteria aorta de rata diabética y control.

Con lo anterior, se calcularon los valores pK_B , análisis alternativo para pendientes de Schild diferentes de 1 y estos son de 8.6 en arterias diabéticas y 7.8 en ratas control. Estos valores dan una pauta de que la afinidad del antagonista por el receptor, y se puede apreciar que en ratas diabéticas es mayor el valor de pK_B , lo que

nos indica que probablemente en este estado esté cambiando una condición que aumente la afinidad fármaco-receptor, por ejemplo, que haya una eficiencia de acoplamiento mayor entre los receptores y el antagonista, o bien haya una densidad mayor de receptores.

En base con datos ya reportados de afinidades calculadas o pK_B (tabla3) se dedujo que los valores obtenidos de afinidad en este trabajo, para el BMY7378 fueron altos, por lo tanto, esto sugiere que el receptor α_{1D} adrenérgico se encuentra funcionalmente en la arteria aorta de rata Wistar de 13 semanas de edad y que las condiciones de hiperglicemia, puede estar afectando la densidad y la expresión del subtipo α_{1D} , pues el valor de pK_B es mayor que en los anillos de ratas control.

El antagonista RS100329 se utilizó para ver la participación del subtipo α_{1A} en la contracción mediada por fenilefrina, pues se ha reportado que este antagonista es aun más selectivo que el 5 metil-urapidil. La presencia del antagonista RS100329 desplazo las curvas concentración respuesta a fenilefrina, de manera dependiente de la concentración, en arterias aorta de rata Wistar, (ratas diabéticas y control). Para ver la el receptor que participa en dicho desplazamiento se realizó el cálculo para determinar la afinidad aparente pA_2 la cual es de 7.3 y 7.9, también se obtuvieron pendientes diferentes de 1, es decir el acoplamiento entre agonista-antagonista-receptor no lograron alcanzar un equilibrio (Ford, Arredondo et al., 1996) lo que indica que este antagonista tiene una baja afinidad por subtipos α_{1A} presentes funcionalmente en este vaso. Además los valores pK_B calculados para pendientes diferentes de 1 fueron de 7.8 para ratas control y 7.6 para ratas diabéticas. Estos valores sugieren que el subtipo α_{1A} no está presente funcionalmente en aorta, pues se ha estimado para RS100329 que

tienen que obtenerse valores de 9.1 ± 0.17 para el subtipo α_{1A} , 7.8 ± 0.09 α_{1B} y 7.8 ± 0.06 para α_{1D} . Por lo tanto se concluye que el desplazamiento se debe al antagonismo inespecífico del RS100329 por cualquiera de los otros dos subtipos presentes en la arteria aorta que estén mediando la respuesta contráctil. Así, se ultimó que en la arteria aorta de rata Wistar de 13 semanas de edad, la contracción producida por fenilefrina no está mediada por el subtipo α_{1A} y que en ratas diabéticas puede que esté participando menos en la contracción, pues se obtienen valores de pK_B aun menores que en ratas control.

3. Determinación farmacológica de los receptores adrenérgicos α_1 en arteria carótida de rata Wistar (Diabética y control)

En arteria carótida, también resultó interesante determinar cual receptor participa en la respuestas contráctil con la variable diabetes, comparada contra ratas no diabéticas y para tal fin se observó, que al hacer curvas concentración respuesta a fenilefrina en presencia del antagonista BMY7378 estas curvas se desplazan hacia la derecha de la curva control (sin antagonista), esto se trata de un antagonismo competitivo representativo, es decir, hay una unión del antagonista y la competencia con el agonista en el mismo sitio receptor.

Seguido de esto se calculó la afinidad aparente pA_2 8.5 para el grupo de ratas con DM y 7.3 para ratas control, para este fin se obtuvieron pendientes cercanas a 1 y se realizó un análisis alternativo para ver la afinidad del antagonista por el subtipo específico (tabla 6), con estos valores se habla de que el BMY7378 tiene gran acoplamiento por los receptores α_{1D} presentes en arteria caudal, así calculamos el valor

de pK_B el cual es de 8.2 para anillos control y 8.5 para anillos de ratas diabéticas; con base que se ha estimado la afinidad aparente para el antagonista BMY 7378 para los diferentes subtipos de receptores las cuales son 8.63 α_{1D} , 6.78 α_{1B} , 6.37 α_{1A} (tabla 3) dedujimos que el receptor que está mediando la respuesta contráctil es el subtipo α_{1D} , en arteria carótida y se puede apreciar que este valor en ratas diabéticas es mayor que en ratas control, ergo quizá en el grupo tratado haya una influencia del aumento de glucosa sanguínea en la afinidad con estos receptores.

En este vaso (arteria carótida) se ha reportado que expresa el subtipo α_{1D} de manera predominante para la contracción y en la figura 10, se observa un desplazamiento más marcado en anillos de rata diabética, lo que sugiere que el aumento de glucosa puede estar aumentando la afinidad del BMY7378 por el subtipo α_{1D} o por otro subtipo de receptor, al cual se esté uniendo este fármaco, el cual se relaciona con un aumento en el valor de pK_B y claramente se aprecia que se reduce E_{max} en un 30 % lo que sugiere que la diabetes parece producir cambios en la expresión del subtipo α_{1D} funcionalmente, pues esto habla de una aumento en la densidad de este subtipo, la cual se refleja como una aumento de la respuesta a fenilefrina y de la afinidad al BMY7378, mientras en anillos de rata control aun con el desplazamiento se alcanza el 100% del E_{max} lo que puede sugerir que efectivamente, en arterias carpotidas de ratas diabéticas hay un aumento de sensibilidad por el receptor α_{1D} .

Respecto al antagonista 5-metil-urapidil tiene 80 a 120 veces más afinidad por el subtipo α_{1A} que por cualquiera de los otros dos subtipo α_1 adrenérgicos (Graham et al., 1996). Por ello, lo utilizamos para ver si hay participación del subtipo α_{1A} , en la

contracción de la arteria carótida y lo se observa es que al hacer curvas concentración respuesta a fenilefrina, la presencia de este antagonista desplaza dichas curvas a la derecha de la control (curva sin antagonista) lo cual refleja un antagonismo competitivo típico.

Con los desplazamientos de estas curvas se calculó la afinidad aparente, pA_2 de 8.0 para ratas diabéticas y 7.0 para el grupo control, las pendientes fueron diferentes de 1, lo que habla de que no se logró alcanzar el equilibrio de acoplamiento entre los complejos formados por el receptor, el agonista y el antagonista (Ford, Arredondo et al., 1996) esta condición de no equilibrio puede estar influenciada por la baja afinidad del antagonista por los receptores adrenérgico α_1 funcionales en la arteria carótida.

Por otra parte, con los resultados anteriores se calcularon los valores de pK_B , y se obtuvo 7.6 para el grupo con DM y 6.8 para el grupo control, con estos valores se pudo determinar cual es el subtipo funcional en este vaso, para ello se han hecho cálculos de afinidad para el 5-metil-urapidil los cuales son 8.58 α_{1A} , 6.97 α_{1B} , 7.49 para el subtipo α_{1D} , haciendo una comparación de las afinades aparentes y las calculadas, se ultimó que el subtipo α_{1A} en base a los valores de afinidad no se encuentra funcionalmente en esta arteria si no que puede ser cualquier otro subtipo, el cual produce dicho desplazamiento.

Para tener más certeza si el subtipo α_{1A} está o no mediando la respuesta contráctil se usó un antagonista aun más selectivo para este subtipo α_{1A} , el RS100329. La presencia de este fármaco desplaza las curvas concentración respuesta a fenilefrina hacia la derecha, de manera dependiente de la concentración, de esta manera se aprecia un antagonismo entre el RS100329 y la fenilefrina por el sitio receptor. La

relación de este desplazamiento con la CE_{50} en presencia del RS100329 y la CE_{50} del control menos 1 y la concentración del antagonista produjo valores de afinidad aparente (pA_2) de 7.0 en el grupo control y 8.0 en ratas diabéticas (Tabla 6). Además se obtuvieron pendientes diferentes de 1, esto sugiere que no se alcanzó el equilibrio entre el acoplamiento receptor, agonista y antagonista.

Los valores de pK_B obtenidos fueron 6.7 para los anillos control y 7.7 para diabéticas, estos resultados son muy bajos comparados con la tabla 3, para poder decir que el subtipo α_{1A} esta mediando la contracción de la arteria carótida, pues se esperan valores de aproximadamente 9.7 para asegurar que este subtipo de receptor está mediando la contracción es el subtipo α_{1A} , esta discrepancia entre cada grupo se puede deber a que este antagonista también tiene una baja afinidad por cualquier otro subtipo de receptor α_1 adrenérgico que se encuentre presente en la arteria carótida.

4. Determinación farmacológica de los receptores adrenérgicos α_1 en arteria mesentérica de rata Wistar (Diabética y control)

En la figura 11 se aprecian las graficas correspondientes para los anillos de arteria mesentérica en presencia de diferentes antagonistas y claramente se puede apreciar que en todos los casos cuando estos fármacos están presentes producen un desplazamiento muy ligero o casi nulo de las curvas concentración a fenilefrina, y también en todos los casos el efecto máximo se alcanzó al 100%.

Aunque no hubo un antagonismo competitivo con todas las concentraciones de los fármacos, con la mayor concentración de cada uno de los antagonistas se pudo calcular la pendiente y la afinidad aparente (pA_2). Los valores de pA_2 fueron de 8.0, 7.9

7.6 para anillos control y de 8.0, 8.0 7.8 para anillos de rata diabética. En todos los caso las pendientes fueron diferentes de 1 y se hizo el análisis alternativo para pendientes diferentes de 1, con ello se calculó el pK_B el cual dió valores de afinidad para el BMY7378 de 6.9 para controles y diabéticas, este antagonista es selectivo del subtipo α_{1D} solo cuando se obtienen valores de pK_B de aproximadamente 8.63, por lo tanto, se puede decir que el valor obtenido se debe a que el BMY7378 se está uniendo a cualquiera de los otros subtipos presentes en este vaso y no al receptor α_{1D} , esto comprueba que este subtipo no está de manera predominante en arteria mesentérica, regulado su contracción.

Por otro lado los valores de pK_B para el 5-metil-urapidil fueron de 5.2 para anillos control y 6.7 para anillos diabéticos; estos valores son muy bajos para que este antagonista tenga afinidad por el subtipo α_{1A} comparado con valores de afinidad previamente estimados (tabla3), obteniendo lo anterior se usó un antagonista más selectivo para este subtipo, el RS100329 y los valores de afinidad reportados para este antagonista son de 9.1 ± 0.17 para el subtipo α_{1A} , 7.8 ± 0.09 α_{1B} y 7.8 ± 0.06 para α_{1D} . Por lo tanto, se dedujo que el desplazamiento se debe al antagonismo inespecífico del RS100329 por cualquiera de los otros dos subtipos presentes en la arteria aorta que estén mediando la respuesta contráctil y no exclusivamente al subtipo α_{1A} y conforme a los resultados del BMY7378 quizá el ligero desplazamiento se deba a la unión del subtipo α_{1B} .

Aunque cabe mencionar que el receptor α_{1A} presenta múltiples variantes que difieren en cuanto a tamaño y en sus dominios carboxilo terminales (Hirasawa et al., 1995) y no presentan diferencias farmacológicas ni de señalización. También se ha

propuesto un cuarto subtipo α_1 adrenérgico, el subtipo α_{1L} (Holck et al., 1983; Flavahan y Vanhoutte, 1986; Vanhoutte y Flavahan, 1986; Muramatsu et al., 1990) basado en criterios farmacológicos este receptor exhibe baja afinidad por antagonistas como prazosina y el RS17053, con esto posiblemente pueda ser que el ligero desplazamiento observado sea por este hipotético subtipo o bien, por una mezcla de los tres miembros de la familia sin embargo, este subtipo no se ha identificado por técnicas bioquímicas ni moleculares.

También se ha reportado que el receptor α_{1L} presenta un estado conformacional y energéticamente favorable del receptor α_{1A} (Ford, Arredondo et al., 1996). Así que la baja afinidad en este vaso coincide con reportes anteriores lo que sugiere que el subtipo hipotético α_{1L} o alguna otra variante del receptor α_{1A} participan en la respuesta contráctil en animales jóvenes. Así en este trabajo se encontraron diferentes características farmacológicas del subtipo α_{1A} dependiente de cada arteria, pues se ha descrito que este subtipo y el α_{1D} participan en la contracción de la arteria mesentérica de la rata adulta (Villalobos-Molina y Ibarra, 1996) y lo que se observa en este trabajo son las respuestas que presentaría un animal joven, donde el sistema cardiovascular es inmaduro. Lo anterior sugiere que durante la maduración de los tejidos y el daño por la DM los requerimientos del tono vascular y las respuestas asociadas a estimulación adrenérgica cambian, probablemente a la expresión funcional de los receptores α_1 adrenérgicos de forma diferente acorde a las necesidades del vaso sanguíneo.

5. Determinación farmacológica de los receptores adrenérgicos α_1 en arteria caudal de rata Wistar (Diabética y control)

Se ha reportado que la arteria caudal expresa funcionalmente el subtipo α_{1A} en rata adulta de manera predominante para su fucionalidad contráctil (Burt, Chapple et al., 1995). Así que se usaron los antagonistas específicos para caracterizar al subtipo α_1 adrenérgico que participan en la contracción de la arteria caudal, con ello se pudo observar que hubo muy poco desplazamiento de las curvas a fenilefrina en su presencia, solo se aprecia con la mayor concentración del antagonista y más evidente se hace ver la disminución del E_{max} .

Con la presencia del BMY7378 se observó que no hubo un desplazamiento de la curva a fenilefrina, esto concuerda con un reporte hecho por Piascik en 1995, quien afirma que el BMY7378 es un débil antagonista en la arteria caudal de la rata, produciendo pendientes menores a 1 (Piascik, Guarino et al., 1995) y efectivamente, en presencia del antagonista competitivo para los receptores α_{1D} no se pudieron calcular los valores de afinidad aparente (pA_2) o afinidad pK_B , esto sugiere que el subtipo α_{1D} no participa en la respuesta contráctil mediada por fenilefrina, lo que concuerda con datos reportados que afirman que el receptor α_{1D} no participa en la respuesta contráctil en arteria caudal, a pesar de que se puede detectar RNAm que codifica para el subtipo α_{1D} tiene un papel predominante en la función contráctil de la arteria caudal.

Lo que si se apreció con el tratamiento en presenciaa del BMY7378 es una ligera disminución en el efecto máximo, el cual está en función de la densidad de receptores, esto puede hablar de que el subtipo α_{1D} está presente en este vaso pero en cantidades

muy pequeñas y solo a grandes concentraciones de fenilefrina se produce una contracción, la cual no es antagonizada con el BMY7378 o bien, hay una disminución en la vía trasduccional o probablemente se debe a una menor eficiencia del fármaco.

Por otro lado, se utilizaron los antagonistas selectivos para los receptores α_{1A} , 5-metil-urapidil y RS100329. Con estos experimentos se determinó una contracción dependiente de la concentración a fenilefrina en la curva sin antagonista, pero en presencia de 5-metil-urapidil y RS100329 hay un ligero desplazamiento a la derecha y paralelo a la curva control esto nos habla de un antagonismo competitivo típico.

Con dicho desplazamiento, se hizo el análisis de Schild, el cual arroja 2 parámetros, el pA_2 y la pendiente. El pA_2 se refiere a la concentración del antagonista necesario para desplazar la curva del agonista, o bien, es la medida logarítmica de la potencia de un antagonista, la cual puede caracterizar la actividad, especificidad y la relación entre tiempo y acción. Por lo que la pendiente nos informa la naturaleza del antagonismo, es decir, del grado de antagonismo y del equilibrio. El valor de pA_2 para estos casos es de 8.0 y 6.4 para 5MU y RS100329, respectivamente, en anillos de rata diabética con una pendiente igual a 1, por tanto se concluye que durante la diabetes en arteria caudal hay un antagonismo competitivo y reversible, es decir, el tejido no tiene los mecanismos necesarios para asimilar el agonista cuando están presentes los antagonistas, por tanto, se puede inferir que el subtipo que predomina para la función contractil en arteria caudal es el receptor α_{1A} .

En los resultados obtenidos, se puede notar que en todos los caso los valores de pK_B son mayores en anillos diabéticos, en todas las arterias, lo cual nos sugiere que en diabetes se esté alterando la densidad de los receptores o de solo un subtipo en todos

los vasos estudiados. Por ello se procedió a cuantificar el RNAm que codifica para los tres subtipos de α_1 -adrenoceptores, pues existen reportes que indican que el RNAm está presente en todos los vasos sanguíneos aunque no se pueda atribuir una función farmacológica.

6. Expresión del RNAm de los receptores adrenérgicos en la aorta de rata Wistar de 13 semanas de edad (diabética y control)

En hígado de pacientes con DM2 se ha reportado que hay una alteración en la expresión de diferentes genes que conducen a un aumento en el riesgo de complicaciones vasculares sistémicas (Takamura, Sakurai et al., 2004). Por ello en este trabajo ahora se determinó si los genes que codifican para los subtipos de receptores adrenérgicos α_1 también están alterados. Para resolver problemas de diferencias en abundancia de genes ha sido usada la amplificación de RNAm a través de una Reverso Transcripción (RT) seguida de una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), por lo anterior, en este trabajo se determinó la expresión de los genes que codifican para los tres subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos en arteria aorta de rata Wistar diabética y control, usando sondas Taq-Man[®] las cuales contienen oligonucleótidos específicos para estos receptores.

Se han reportado diferencias en abundancia de RNAm de los subtipos adrenérgicos en muchos tejidos, tanto en rata como en humanos y estos oscilan entre 3 y 4 para α_{1A} , 1 o 0 para α_{1B} y 4 y 3 para el subtipo α_{1D} (Graham, Perez et al., 1996), aunque también hay reportes donde se indica que alguno de los subtipos de receptores aparecen en mayor abundancia que los otros dos, dependiendo de la cepa del animal

utilizado, como el caso de los vasos renales, donde se indica una predominancia del subtipo α_{1A} con una pequeña densidad de los receptores α_{1B} y α_{1D} (Salomonsson et al., 2001) el hígado de humanos, diversos tejidos en rata como próstata y uretra, expresan en mayor abundancia el subtipo α_{1A} (Giardina et al., 1996)

En este estudio se apreció que la expresión del RNAm del receptor adrenérgico α_{1A} disminuyó en un 63% en arterias de rata diabéticas, este resultado se refleja funcionalmente en arterias aortas de ratas diabéticas y aunque en ratas control no hay una disminución en la expresión del gen que codifica para el subtipo α_{1A} , también se observó que funcionalmente este subtipo no participa en la maquinaria contráctil de arterias aortas de ratas Wistar de 13 semanas de edad, esto confirma que el receptor α_{1A} no participa de manera predominante en la contracción de la arteria aorta, siendo más evidente en las arterias de ratas con DM, esto insinúa que el aumento de glucosa o la enfermedad por sí misma está alterando a que haya una disminución de la expresión del gen que codifica para este subtipo de receptor.

Aunque no se saben los mecanismos que intervienen en la disminución de dicha expresión para subtipo α_{1A} en arterias diabéticas. En tejidos que participa de manera predominante este receptor se ha reportado que los genes del α_{1a} -AR contienen elementos regulatorios que incluyen los que responden a insulina y a AMPc; estos agentes conducen al aumento de la expresión de los genes α_{1a} (Razik et al., 1997), es decir, la baja en la expresión del subtipo α_{1A} en ratas con DM, puede deberse a la disminución de la insulina circulante que hay durante la inducción de la enfermedad en las ratas Wistar.

Siguiendo con el mismo protocolo, también se determinó la expresión del gen que codifica para el subtipo α_{1B} , para lo cual se observó que en ratas con DM hay un aumento de un 113 % respecto al control. El RNAm del receptor adrenérgico α_{1D} también aumenta su expresión en un 322% más que en controles de manera basal. La presencia del receptor α_{1D} adrenérgico en la vasculatura depende de la edad de la rata, pues la edad del animal favorece la expresión funcional del receptor α_{1D} al observar que la respuesta presora máxima a la fenilefrina es mayor en animales adultos (Ibarra et al 1997) y posiblemente el envejecimiento de los tejidos está asociada más estrechamente con la DM, por ello hay un mayor expresión de los genes correspondientes a los receptores adrenergicos.

La angiotensina II, vía estimulación de sus receptores AT_1 favorece la transcripción y la expresión de los receptores α_1 -adrenérgicos (en particular el subtipo α_{1D}) en células de músculo liso vascular (Hu et al., 1995)

Se ha reportado que los tres RNAm de los receptores α_1 -adrenérgicos se expresan en diferentes cantidades en la arteria aorta de rata Wistar en condiciones normales, por ejemplo, los receptores adrenérgicos α_{1B} y α_{1D} se expresan en mayor cantidad que el receptor α_{1A} ; de esta manera en nuestro trabajo esta expresión no se puede apreciar en ratas controles, pues no se hizo la cuantificación entre ellos mismos, ya que los RNAm de los tres subtipos no varían, esto sugiere que en condiciones normales del animal los genes para los subtipos α_1 adrenérgicos posiblemente no cambien, aunque no necesariamente se vea reflejado en la función contráctil de este

vaso, esto se puede deber a que este RNAm no se traduzca a proteína o que simplemente la proteína como tal no participe en la respuesta contráctil a fenilefrina a la edad de la rata que se estuvieron trabajando los animales.

Con base en lo anterior, se ha publicado ampliamente que durante la diabetes mellitus se presenta hiperreactividad a diversos agonistas como (norepinefrina, metoxamina y fenilefrina) (Agrawal y McNeill, 1987) con esto, lo que se propone es que la hipersensibilidad de los vasos puede estar involucrada en las complicaciones vasculares durante la diabetes y que el aumento del RNAm del subtipo α_{1B} y α_{1D} está relacionado con dicha hipersensibilidad.

7. Expresión de los receptores adrenérgicos α_1 en la aorta de rata Wistar (diabéticas y control)

La expresión proteica de los receptores adrenérgicos α_{1A} disminuyó un 55% menos en aortas de rata diabética de manera basal; mientras que la expresión del subtipo α_{1B} aumenta un 85% comparados con las ratas control, por otro lado durante el aumento de glucosa se pudo observar que aumentó solo un 43% la expresión del receptor α_{1D} de manera basal respecto a las ratas control. El resultado para el subtipo α_{1B} resultó contrario a lo esperado por los resultados funcionales, pues se aprecia que el subtipo α_{1D} es el que predomina en la contracción de arteria aorta y quien muestra mayor sensibilidad en condiciones de diabetes, de esta manera no se ha reportado que el subtipo α_{1B} participe y aun así no existe. Se ha reportado que los tres receptores α_1 adrenérgicos se expresan en diferentes cantidades en la capa media de la aorta de rata, por ejemplo, los receptores adrenérgicos se expresan α_{1B} 1.3 y α_{1D} 3 veces más

que el receptor α_{1A} ; de esta manera en este trabajo esta expresión se apega a estos información, pues tanto α_{1B} y α_{1D} su expresión proteica está aumentada, incremento que se hace aun más evidente en condiciones de DM, esto sería atribuible al aumento contráctil que presenta la arteria aorta y quizá también la arteria carótida mediada por fenilefrina, pues ambos vasos son muy semejantes en cuanto a la población de receptores que predominan para la función contráctil. Aunque al subtipo α_{1B} no se le han atribuido una función en la contracción del músculo liso de la arteria aorta, no se descarta la posibilidad de que este receptor está mediando el aumento de la contracción durante la DM al igual que el subtipo α_{1D} y que ello esté contribuyendo al daño vascular como las complicación que se presentan durante el aumento crónico de la glucosa en la sangre de los pacientes con DM.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1. CONCLUSIONES

La DM en rata Wistar produce un aumento en la contracción de la arteria aorta, debido principalmente al aumento en la expresión del adrenoceptor α_{1D} , aunque no se descarta que el subtipo α_{1B} también esté participando en el aumento de dicha contracción. Por otra parte, la DM produce una mayor participación funcional de los subtipos de adrenoceptores α_{1B} y α_{1D} en la arteria carótida y α_{1A} en arteria caudal.

Mientras que en arteria mesentérica de ratas Wistar con 7 semanas de DM, no se presentan cambios en la respuesta contráctil mediada por fenilefrina.

5.2. PERSPECTIVAS

Con los resultados obtenidos en esta investigación queda abierta la posibilidad de indagar otros campos en las complicaciones que provoca la DM experimental y para tal punto, se tiene como perspectiva determinar estos receptores a diferentes tiempos de hiperglicemia, así como determinar RNAm y proteína de estos receptores α_1 -adrenérgicos en las arterias mesentérica, carótida y caudal. De esta manera se podría

definir si la expresión de los genes se mantiene constante o se altera con el tiempo de DM y si esto mismo sucede en otras arterias del animal.

Por otra parte, también sería interesante investigar si funcionalmente el receptor α_{1B} durante la DM, predomina en arteria aorta de ratas Wistar y en otras arterias en estudio. Además, probar algunos otros inductores de la transcripción como la insulina, pues se conoce que aumenta la expresión del subtipo α_{1A} ; para el subtipo α_{1D} dar tratamiento con un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), ya que la angiotensina II aumenta la expresión de este receptor y en la DM aumenta la angiotensina II; un inductor de la transcripción del subtipo α_{1B} es el AMPc, por tanto resultaría importante usar estas moléculas y medir la respuesta al receptor.

4.3. BIBLIOGRAFIA

- Abebe, W., K. H. Harris y K. M. MacLeod (1990). "Enhanced contractile responses of arteries from diabetic rats to alpha 1-adrenoceptor stimulation in the absence and presence of extracellular calcium." *J Cardiovasc Pharmacol* **16**(2): 239-48.
- Agrawal, D. K. y J. H. McNeill (1987). "Vascular responses to agonists in rat mesenteric artery from diabetic rats." *Can J Physiol Pharmacol* **65**(7): 1484-90.
- Aguilar-Salinas, C. A., R. Rojas, F. J. Gomez-Perez, E. Garcia, V. Valles, J. M. Rios-Torres, A. Franco, G. Olaiz, J. Sepulveda y J. A. Rull (2002). "Prevalence and characteristics of early-onset type 2 diabetes in Mexico." *Am J Med* **113**(7): 569-74.
- Ahmed, R. G. (2005). "The physiological and biochemical effects of diabetes on the balance between oxidative stress and antioxidant defense system." *Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences* **15**(1): 31-42.
- Alpizar, S. M. (1999). *Guía técnica para la detección de la Diabetes Mellitus*. México, DF, IMSS.
- Bremner, J. B., R. Griffith y B. Coban (2001). "Ligand design for alpha(1) adrenoceptors." *Curr Med Chem* **8**(6): 607-20.
- Brownlee, M. (2001). "Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications." *Nature* **414**(6865): 813-20.
- Brownlee, M. (2005). "The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism." *Diabetes* **54**(6): 1615-25.
- Buckner, S. A., K. W. Oheim, P. A. Morse, S. M. Knepper y A. A. Hancock (1996). "Alpha 1-adrenoceptor-induced contractility in rat aorta is mediated by the alpha 1D subtype." *Eur J Pharmacol* **297**(3): 241-8.
- Burt, R. P., C. R. Chapple y I. Marshall (1995). "Evidence for a functional alpha 1A- (alpha 1C-) adrenoceptor mediating contraction of the rat epididymal vas deferens and an alpha 1B-adrenoceptor mediating contraction of the rat spleen." *Br J Pharmacol* **115**(3): 467-75.
- Bylund, D. B., D. C. Eikenberg, J. P. Hieble, S. Z. Langer, R. J. Lefkowitz, K. P. Minneman, P. B. Molinoff, R. R. Ruffolo, Jr. y U. Trendelenburg (1994). "International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors." *Pharmacol Rev* **46**(2): 121-36.
- Carvalho Leone, A. F. y E. B. Coelho (2004). "Effects of prostanoids on phenylephrine-induced contractions in the mesenteric vascular bed of rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus." *Life Sci* **76**(3): 239-47.
- Cauvin, C., R. Loutzenhiser y C. Van Breemen (1983). "Mechanisms of calcium antagonist-induced vasodilation." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **23**: 373-96.
- Cavalli, A., F. Fanelli, C. Taddei, P. G. De Benedetti y S. Cotecchia (1996). "Amino acids of the alpha1B-adrenergic receptor involved in agonist binding: differences in docking catecholamines to receptor subtypes." *FEBS Lett* **399**(1-2): 9-13.
- Coates, J., U. Jahn y D. F. Weetman (1982). "The existence of a new subtype of alpha-adrenoceptor on the rat anococcygeus is revealed by SGD 101/75 and phenoxybenzamine." *Br J Pharmacol* **75**(3): 549-52.
- Committee, D. A. C. O. D. M. E. (2003). "Report Of The Expert Committee On The Diagnosis And Classification Of Diabetes Mellitus." *Diabetes Care* **25**:S5-S20: 5-20.
- Diamond, J. (2003). "The double puzzle of diabetes." *Nature* **423**(6940): 599-602.

- Donnelly, R., A. M. Emslie-Smith, I. D. Gardner y A. D. Morris (2000). "ABC of arterial and venous disease: vascular complications of diabetes." *Bmj* **320**(7241): 1062-6.
- Enna, S., Ferkany JW, Kenakin,T, Williams,M, Porsol,RD y Sullivan JP. (1998). Isolated tissue, capítulo 4, in current protocols in pharmacology, USA.
- Flavahan, N. A. y P. M. Vanhoutte (1986). "Effect of cooling on alpha-1 and alpha-2 adrenergic responses in canine saphenous and femoral veins." *J Pharmacol Exp Ther* **238**(1): 139-47.
- Fleischhacker, E., V. E. Esenabhalu, M. Spitaler, S. Holzmann, F. Skrabal, B. Koidl, G. M. Kostner y W. F. Graier (1999). "Human diabetes is associated with hyperreactivity of vascular smooth muscle cells due to altered subcellular Ca²⁺ distribution." *Diabetes* **48**(6): 1323-30.
- Ford, A. P., N. F. Arredondo, D. R. Blue, Jr., D. W. Bonhaus, J. Jasper, M. S. Kava, J. Lesnick, J. R. Pfister, I. A. Shieh, R. L. Vimont, T. J. Williams, J. E. McNeal, T. A. Stamey y D. E. Clarke (1996). "RS-17053 (N-[2-(2-cyclopropylmethoxyphenoxy)ethyl]-5-chloro-alpha, alpha-dimethyl-1H-indole-3-ethanamine hydrochloride), a selective alpha 1A-adrenoceptor antagonist, displays low affinity for functional alpha 1-adrenoceptors in human prostate: implications for adrenoceptor classification." *Mol Pharmacol* **49**(2): 209-15.
- Fox, C. S., S. Coady, P. D. Sorlie, D. Levy, J. B. Meigs, R. B. D'Agostino, Sr., P. W. Wilson y P. J. Savage (2004). "Trends in cardiovascular complications of diabetes." *Jama* **292**(20): 2495-9.
- Furchgott, R. F. (1972). The classification of adrenoceptors (adrenergic receptors). An evaluation from the standpoint of receptor theory. Berlin, Springer-Verlag.
- Furchgott, R. F. (1984). "The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **24**: 175-97.
- Furchgott, R. F. y J. V. Zawadzki (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." *Nature* **288**(5789): 373-6.
- Galloway, J. A. (1998). Diabetes Mellitus. Indianapolis, Indiana, Lilly laboratory for clinical research.
- Ganong, F. W. (2002). "Fisiología Médica"
- García-Sainz, J. A. y M. E. Torres-Padilla (1999). "Modulation of basal intracellular calcium by inverse agonists and phorbol myristate acetate in rat-1 fibroblasts stably expressing alpha1d-adrenoceptors." *FEBS Lett* **443**(3): 277-81.
- García-Sainz, J. A., F. G. Vazquez-Cuevas y M. T. Romero-Avila (2001). "Phosphorylation and desensitization of alpha1d-adrenergic receptors." *Biochem J* **353**(Pt 3): 603-10.
- Giardina, D., M. Crucianelli, R. Romanelli, A. Leonardi, E. Poggesi y C. Melchiorre (1996). "Synthesis and biological profile of the enantiomers of [4-(4-amino-6,7-dimethoxyquinazolin-2-yl)-cis-octahydroquinoxalin-1-yl]furan-2-ylmethanone (cyclazosin), a potent competitive alpha 1B- adrenoceptor antagonist." *J Med Chem* **39**(23): 4602-7.
- Gomez-Zamudio, J., M. L. Lazaro-Suarez, R. Villalobos-Molina y H. Urquiza-Marin (2002). "Evidence for the use of agonists to characterize alpha 1-adrenoceptors in isolated arteries of the rat." *Proc West Pharmacol Soc* **45**: 159-60.
- Goodman-Gilman, A. (2003). Las Bases Farmacológicas De La Terapéutica.
- Graham, R. M., D. M. Perez, J. Hwa y M. T. Piascik (1996). "alpha 1-adrenergic receptor subtypes. Molecular structure, function, and signaling." *Circ Res* **78**(5): 737-49.
- Hammes, H. P. (2003). "Pathophysiological mechanisms of diabetic angiopathy." *J Diabetes Complications* **17**(2 Suppl): 16-9.
- Harrison's (2001). Principios de Medicina Interna.
- Hernández, A. y F. Olaíz (2002). "La diabetes y el mexicano: un reto para la salud pública." *Ciencia* **53**: 8-17.

- Hirasawa, A., K. Shibata, K. Horie, Y. Takei, K. Obika, T. Tanaka, N. Muramoto, K. Takagaki, J. Yano y G. Tsujimoto (1995). "Cloning, functional expression and tissue distribution of human alpha 1c-adrenoceptor splice variants." FEBS Lett **363**(3): 256-60.
- Holck, M. I., C. H. Jones y G. Haeusler (1983). "Differential interactions of clonidine and methoxamine with the postsynaptic alpha-adrenoceptor of rabbit main pulmonary artery." J Cardiovasc Pharmacol **5**(2): 240-8.
- Hu, Z. W., X. Y. Shi, M. Okazaki y B. B. Hoffman (1995). "Angiotensin II induces transcription and expression of alpha 1-adrenergic receptors in vascular smooth muscle cells." Am J Physiol **268**(3 Pt 2): H1006-14.
- Ibarra, M., A. Meneses, V. Ransanz, C. Castillo y E. Hong (1995). "Changes in endothelium-dependent vascular responses associated with spontaneous hypertension and age in rats." Arch Med Res **26 Spec No**: S177-83.
- Ibarra, M., J. P. Pardo, J. J. Lopez-Guerrero y R. Villalobos-Molina (2000). "Differential response to chloroethylclonidine in blood vessels of normotensive and spontaneously hypertensive rats: role of alpha 1D- and alpha 1A-adrenoceptors in contraction." Br J Pharmacol **129**(4): 653-60.
- Kaufman, F. R. (2002). "Type 2 Diabetes in Children and Young Adults: A "New Epidemic"." Clin Diabetes **20**(4): 217-218.
- Krasel, C., J. P. Vilardaga, M. Bunemann y M. J. Lohse (2004). "Kinetics of G-protein-coupled receptor signalling and desensitization." Biochem Soc Trans **32**(Pt 6): 1029-31.
- Lefkowitz, R. J. y M. G. Caron (1988). "Adrenergic receptors. Models for the study of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins." J Biol Chem **263**(11): 4993-6.
- Livak, K. J. y T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-8.
- Means, A. R., F. Cruzalegui, B. LeMagueresse, D. S. Needleman, G. R. Slaughter y T. Ono (1991). "A novel Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase and a male germ cell-specific calmodulin-binding protein are derived from the same gene." Mol Cell Biol **11**(8): 3960-71.
- Minneman, K. P., T. L. Theroux, S. Hollinger, C. Han y T. A. Esbenshade (1994). "Selectivity of agonists for cloned alpha 1-adrenergic receptor subtypes." Mol Pharmacol **46**(5): 929-36.
- Muramatsu, I., T. Ohmura, S. Kigoshi, S. Hashimoto y M. Oshita (1990). "Pharmacological subclassification of alpha 1-adrenoceptors in vascular smooth muscle." Br J Pharmacol **99**(1): 197-201.
- Offermanns, S. (2003). "G-proteins as transducers in transmembrane signalling." Prog Biophys Mol Biol **83**(2): 101-30.
- Oriowo, M. A., J. A. Bevan y R. D. Bevan (1987). "Variation in sensitivity of alpha adrenoceptor-mediated contraction of the vascular smooth muscle of rabbit elastic and muscular arteries is related to receptor affinity." J Pharmacol Exp Ther **241**(1): 239-44.
- Pacheco, D. L. (2005). Bioquímica Médica
- Piascik, M. T., R. D. Guarino, M. S. Smith, E. E. Soltis, D. L. Saussy, Jr. y D. M. Perez (1995). "The specific contribution of the novel alpha-1D adrenoceptor to the contraction of vascular smooth muscle." J Pharmacol Exp Ther **275**(3): 1583-9.
- Razik, M. A., K. Lee, R. R. Price, M. R. Williams, R. R. Ongjoco, M. K. Dole, X. L. Rudner, M. M. Kwatra y D. A. Schwinn (1997). "Transcriptional regulation of the human alpha-1-adrenergic receptor gene. Characterization Of the 5'-regulatory and promoter region." J Biol Chem **272**(45): 28237-46.

- Salomonsson, M., M. Oker, S. Kim, H. Zhang, J. E. Faber y W. J. Arendshorst (2001). "Alpha1-adrenoceptor subtypes on rat afferent arterioles assessed by radioligand binding and RT-PCR." Am J Physiol Renal Physiol **281**(1): F172-8.
- Satoh, M., K. Enomoto, H. Niwano, H. Fujimura, Y. Toyama, I. Takayanagi y K. Koike (1998). "Regional differences in alpha1-adrenoceptor subtypes and mechanisms in rabbit arteries." Eur J Pharmacol **350**(1): 67-73.
- Scofield, M. A., F. Liu, P. W. Abel y W. B. Jeffries (1995). "Quantification of steady state expression of mRNA for alpha-1 adrenergic receptor subtypes using reverse transcription and a competitive polymerase chain reaction." J Pharmacol Exp Ther **275**(2): 1035-42.
- Schalkwijk, C. G. y C. D. Stehouwer (2005). "Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction." Clin Sci (Lond) **109**(2): 143-59.
- Schulman, H. y P. I. Hanson (1993). "Multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase." Neurochem Res **18**(1): 65-77.
- Takamura, T., M. Sakurai, T. Ota, H. Ando, M. Honda y S. Kaneko (2004). "Genes for systemic vascular complications are differentially expressed in the livers of type 2 diabetic patients." Diabetologia **47**(4): 638-47.
- Vanhoutte, P. M. y N. A. Flavahan (1986). "Effects of temperature on alpha adrenoceptors in limb veins: role of receptor reserve." Fed Proc **45**(9): 2347-54.
- Vazquez-Prado, J., L. C. Medina y J. A. Garcia-Sainz (1997). "Activation of endothelin ETA receptors induces phosphorylation of alpha1b-adrenoreceptors in Rat-1 fibroblasts." J Biol Chem **272**(43): 27330-7.
- Vazquez-Prado, J., L. C. Medina, M. T. Romero-Avila, C. Gonzalez-Espinosa y J. A. Garcia-Sainz (2000). "Norepinephrine- and phorbol ester-induced phosphorylation of alpha(1a)-adrenergic receptors. Functional aspects." J Biol Chem **275**(9): 6553-9.
- Villalobos-Molina, R. y M. Ibarra (1996). "Alpha 1-adrenoceptors mediating contraction in arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats are of the alpha 1D or alpha 1A subtypes." Eur J Pharmacol **298**(3): 257-63.
- Villalobos-Molina, R., J. J. Lopez-Guerrero y M. Ibarra (1997). "Alpha 1D- and alpha 1A-adrenoceptors mediate contraction in rat renal artery." Eur J Pharmacol **322**(2-3): 225-7.
- Winer, N. y J. R. Sowers (2004). "Epidemiology of diabetes." J Clin Pharmacol **44**(4): 397-405.
- Wise, A., S. C. Jupe y S. Rees (2004). "The identification of ligands at orphan G-protein coupled receptors." Annu Rev Pharmacol Toxicol **44**: 43-66.