



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS

PARTICIPACIÓN DEL CALCIO EXTRACELULAR EN LA
CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO LISO VASCULAR EN
RESPUESTA AL ESTÍMULO ADRENÉRGICO ALFA 1

TESIS QUE PRESENTA

QFB. ELISEO ESTRADA SUÁREZ

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

DIRECTORES DE TESIS

D.C DANIEL GODÍNEZ HERNANDEZ

D.C MAXIMILIANO IBARRA BARAJAS

FEBRERO DE 2013

ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras.....	5
Índice de tablas.....	7
Lista de abreviaturas.....	8
Resumen.....	10
I.- INTRODUCCIÓN.....	11
1.- SISTEMA NERVIOSO.....	11
1.1.- SISTEMA NERVIOSO PERIFÉRICO.....	11
2.- CATECOLAMINAS.....	13
2.1.- ESTRUCTURA, BIOSÍNTESIS Y ALMACENAMIENTO.....	13
2.2.- SECRECIÓN DE CATECOLAMINAS.....	16
2.3.- METABOLISMO E INACTIVACIÓN.....	17
3.- FUNCIÓN DE LAS CATECOLAMINAS.....	20
4.- RECEPTORES ADRENÉRGICOS.....	21
5.- RECEPTORES ADRENÉRGICOS α_1	24
6.- RECEPTORES ADRENÉRGICOS α_1 EN LOS VASOS SANGUÍNEOS.....	27
6.1.- VASOS SANGUÍNEOS.....	27
6.2.- MÚSCULO LISO.....	27

7.- CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO LISO VASCULAR EN RESPUESTA AL ESTÍMULO ADRENÉRGICO α_1	28
8.- ANTECEDENTES DIRECTOS.....	30
8.1.- PARTICIPACIÓN DE LOS DIFERENTES SUBTIPOS DE RECEPTORES ADRENÉRGICOS α_1 EN LA CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO LISO VASCULAR.....	30
8.2.- HERRAMIENTAS GENÉTICAS EN EL ESTUDIO DE LAS FUNCIONES DE LOS DIFERENTES SUBTIPOS DE RECEPTORES ADRENÉRGICOS α_1	37
8.3.- VÍAS TRANSDUCCIONALES EN EL ESTÍMULO DE LOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS α_1	41
II.- JUSTIFICACIÓN.....	44
III.- HIPÓTESIS.....	44
IV.- OBJETIVOS.....	45
1.- OBJETIVO GENERAL.....	45
2.- OBJETIVOS PARTICULARES.....	45
V.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
1.- TIPIFICACIÓN.....	46
a).- PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....	46
b).- EXTRACCIÓN DEL ADN GENÓMICO.....	46
c).- CUANTIFICACIÓN DE ADN.....	47
d).- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.....	48
e).- ELECTROFORESIS.....	51

2 Y 3.- MEDICIÓN PRESIÓN ARTERIAL Y FRECUENCIA CARDIACA.....	51
4.- EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	53
a).- PREPARACIÓN DEL TEJIDO.....	53
b).- OBTENCIÓN DE CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA.....	55
5.- REACTIVOS Y SOLUCIONES.....	57
6.- ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	59
VI.- VALIDACIÓN DEL MODELO.....	60
VII.- RESULTADOS.....	62
1.- PRESIÓN ARTERIAL.....	62
2.- FRECUENCIA CARDIACA.....	63
3.- EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	63
3.1.- CONTRACCIÓN AL CLORURO DE POTASIO.....	63
3.2.- CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA.....	65
VIII.- DISCUSIÓN.....	71
IX.- CONCLUSIONES.....	79
X.- PERSPECTIVAS.....	80
XI.- REFERENCIAS.....	81
XII.- ANEXOS.....	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Organización funcional del sistema nervioso.....	12
Figura 2.- Sistema nervioso central y periférico.....	12
Figura 3.- Estructura química de la noradrenalina y adrenalina.....	14
Figura 4.- Etapas de la síntesis enzimática de dopamina, noradrenalina y adrenalina.....	15
Figura 5.- Receptor colinérgico nicotínico.....	16
Figura 6.- Liberación de catecolaminas al torrente sanguíneo.....	17
Figura 7.- Transformación metabólica de las catecolaminas.....	19
Figura 8.- Movimiento de calcio intracelular en respuesta al estímulo adrenérgico α_1	23
Figura 9.- Estructura arterial.....	28
Figura 10.- Contracción inducida por noradrenalina en presencia y ausencia de propanolol.....	29
Figura 11.- Contracción inducida por noradrenalina en presencia y ausencia de yohimbina.....	30
Figura 12.- Comparación estructural de la fenilefrina y la noradrenalina.....	31
Figura 13.- Contracción inducida por concentraciones crecientes de fenilefrina en presencia del antagonista BMY 7378.....	32
Figura 14.- Efecto de la cloroetilclonidina sobre la respuesta contráctil a la noradrenalina en aorta de ratas Wistar, WKY y SHR.....	33
Figura 15.- Efecto de la cloroetilclonidina sobre la respuesta contráctil a la noradrenalina en arteria caudal de ratas Wistar, WKY y SHR.....	34

Figura 16.- Protección por BMY 7378 sobre la contracción inducida por noradrenalina en presencia de CEC en aorta de rata SHR.....35

Figura 17.- Acción del antagonista BMY 7378 en la respuesta presora inducida por fenilefrina en ratas WKY y SHR de diferentes edades.....36

Figura 18.- Incremento de la presión arterial en respuesta a la fenilefrina y noradrenalina en ratón anestesiado tipo silvestre y knockout α_{1B}38

Figura 19.- Respuesta contráctil a fenilefrina en arteria carótida de ratón tipo silvestre, knockout α_{1B} y knockout α_{1D}39

Figura 20.- Efecto del BMY 7378 y bunazosina en el incremento de la presión arterial inducido por noradrenalina en ratón tipo silvestre y knockout α_{1D} 41

Figura 21.- Posible mecanismo de modulación opuesta entre los receptores adrenérgicos α_142

Figura 22.- Transductor de presión y manguillo de látex en la arteria caudal de la cola del ratón.....52

Figura 23.- Sistema de adquisición de datos, registro del latido cardiaco y presión arterial.....52

Figura 24.- Cámara para órgano aislado.....54

Figura 25.- Mapa de amplificación de los fragmentos correspondientes para el gen del receptor α_{1D} y el gen mutado.....60

Figura 26.- Electroforesis en gel de agarosa para los fragmentos de amplificación correspondientes para el gen del receptor α_{1D} y el gen mutado.....61

Figura 27.- Participación del receptor α_{1D} sobre la presión arterial.....62

Figura 28.- Influencia del receptor α_{1D} sobre la frecuencia cardiaca.....63

Figura 29.- Contracción independiente de receptor.....64

Figura 30.- Contracción dependiente del agonista.....65

Figura 31.- Efecto de la CEC sobre la respuesta contráctil a fenilefrina.....66

Figura 32.- Efecto de la CEC sobre la respuesta contráctil a oximetazolina.....67

Figura 33.- Participación del calcio extracelular en la contracción del musculo liso vascular.....68

Figura 34.- Participación del calcio extracelular en estímulo del receptor adrenérgico α_{1A}69

Figura 35.- Participación del calcio extracelular en respuesta a la fenilefrina.....70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Receptores adrenérgicos y vías de señalización.....21

Tabla 2.- Respuesta de los órganos efectores a los impulsos nerviosos autonómicos.....25

Tabla 3.- Presión arterial y frecuencia cardiaca de ratón tipo silvestre y knockout α_{1A}40

Tabla 4.- Tabla de afinidades de diversas herramientas farmacológicas sobre los 3 subtipos de receptores adrenérgicos α_186

LISTA DE ABREVIATURAS

SN	Sistema nervioso
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SNA	Sistema nervioso autónomo
CA	Catecolaminas
ATP	Trifosfato de adenosina
VMATs	Transportador vesicular de monoaminas
Na ⁺	Ion sodio
Ca ²⁺	Ion calcio
NA	Noradrenalina
K ⁺	Ion potasio
MAO	Enzima monoamino-oxidasa
COMT	Enzima catecol-0-metil transferasa
Mg ⁺²	Ion magnesio
AVM	Acido vainillilmandélico
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
PLC	Fosfolipasa C
DAG	Diacilglicerol
IP ₃	Inositol-trifosfato
PIP ₂	Fosfatidil-inositol 4,5 bisfosfato

AMPC	Monofosfato de adenosina cíclico
5-MU	5-metilurapidil
CEC	Cloroetilclonidina
PKC	Proteína cinasa C
WKY	Wistar Kyoto
SHR	Ratas espontáneamente hipertensas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

RESUMEN

El sistema nervioso autónomo, a través de la actividad simpática, desempeña un papel importante en la regulación de la circulación periférica, así como en el control de la presión arterial. Esta regulación la logra a través de sustancias llamadas catecolaminas, que son hormonas que tienen efecto inotrópico y cronotrópico positivo sobre el corazón e influyen en la contracción vascular. La contracción vascular es debida principalmente a la estimulación de los receptores adrenérgicos α_1 . Estos receptores se distribuyen en una gran variedad de órganos y tejidos en el organismo y debido a la relación directa con el control de la presión arterial son blanco terapéutico para enfermedades cardiovasculares, incluida la hipertensión. Existen 3 subtipos de receptores α_1 : α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} . Debido a que los receptores adrenérgicos α_1 participan en la regulación de la presión arterial y en el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión son objeto de estudio para determinar la participación de cada subtipo en la contracción vascular. Sin embargo, en las arterias están presentes múltiples subtipos y no se cuenta con agonistas y antagonistas altamente selectivos, por lo cual se ha dificultado el estudio de las funciones de cada subtipo de receptor α_1 en la contracción vascular. En la actualidad se cuenta con herramientas genéticas que permiten abolir las funciones de receptores específicos y por ende aislar las funciones de otros. En el presente trabajo se realizaron experimentos con ayuda de una combinación de herramientas genéticas y farmacológicas encaminados a estudiar las funciones y vías de señalización particulares de cada subtipo de receptor adrenérgico α_1 en la contracción del músculo liso vascular. Los resultados mostraron que la pérdida de la función del receptor α_{1D} , en el ratón knockout α_{1D} , disminuyó significativamente los valores normales de presión arterial y frecuencia cardiaca en el animal íntegro. Aunado a esto, en los experimentos *in vitro* se observó una disminución en el efecto máximo de la contracción vascular, en respuesta al agonista fenilefrina, en el ratón knockout α_{1D} . En respuesta al agonista oximetazolina, se observó un efecto contrario al de la fenilefrina, ya que en el ratón knockout α_{1D} se observó una contracción vascular mayor que en el ratón tipo silvestre. Al realizar curvas concentración-respuesta a los diferentes agonistas en presencia de la CEC se observó una contracción restante que esta mediada por un receptor resistente al antagonismo de este agente. Por otra parte, en las curvas concentración-respuesta en presencia de verapamil (un bloqueador de canales de calcio extracelular) se observó una disminución en la respuesta de contracción vascular. Por último la combinación de los agentes verapamil y CEC abolieron la respuesta contráctil vascular promovida por los diferentes agonistas. Con base en los resultados anteriores podemos concluir que la contracción del músculo liso vascular esta mediada por los receptores adrenérgicos α_{1D} y α_{1A} y este último involucra la entrada de calcio extracelular.

I.- INTRODUCCIÓN

1.- SISTEMA NERVIOSO

El sistema nervioso (SN) es una red de tejidos de origen ectodérmico cuya unidad básica son las neuronas, este sistema se encarga de integrar información de los ambientes **interno (visceral)** y externo. Esta integración le posibilita llevar a cabo una acción coordinada de los efectores somáticos (músculo esquelético) y viscerales (**glándulas endocrinas, músculo liso y cardíaco**) lo que generará una conducta adaptativa flexible que promoverá la supervivencia del organismo (Rosler, 2003).

El SN se subdivide de manera un poco arbitraria, ya que todos sus elementos trabajan en conjunto y comparten funciones. Sin embargo, la manera tradicional en la que se subdivide es una herramienta útil para explicar las funciones de este sistema.

El SN se subdivide en sistema nervioso central (SNC) y **sistema nervioso periférico (SNP)** (figura 1). El SNC está constituido por el cerebro y la médula espinal que está contenida en la columna vertebral. El SNP está formado por los nervios que emergen del encéfalo y de la médula espinal y se distribuyen por todo el cuerpo (figura 2) (Ransom, 2005).

1.1.- SISTEMA NERVIOSO PERIFÉRICO

EL SNP se subdivide en sistema nervioso somático y sistema nervioso autónomo (SNA) (figura 1), siendo este último de nuestro interés ya que el SNA es la parte del SNP que regula y controla las funciones viscerales o funciones que se producen sin control consciente; **incluyendo la frecuencia cardíaca, la presión arterial**, la digestión, el metabolismo, la regulación de la temperatura corporal y las funciones reproductivas. El control visceral se logra a través del arco reflejo, que es la comunicación del SNC y los órganos periféricos a través de fibras neuronales viscerales eferentes y aferentes que transmiten los mensajes.



Figura 1.- Organización funcional del sistema nervioso (Tomado de Campos, 2008).

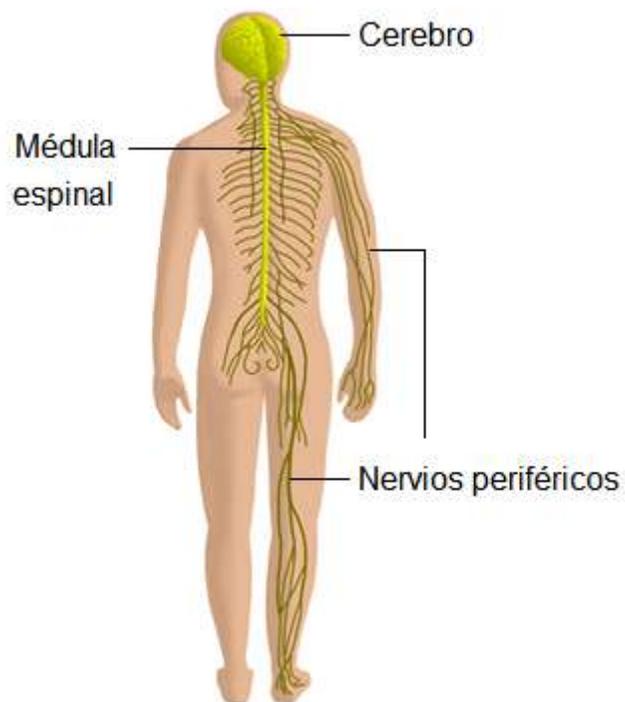


Figura 2.- Sistema nervioso central y periférico. El sistema nervioso central está constituido por el cerebro y la médula espinal. El sistema nervioso periférico lo conforman los nervios periféricos que se distribuyen en todo el cuerpo (tomado y modificado de Ransom, 2005).

El SNA tiene dos divisiones: **simpático** y parasimpático (figura 1). El sistema simpático y parasimpático en su mayoría tienen actividad antagónica uno del otro, sin embargo, en algunos casos tienen actividad complementaria (Westfall, 2010).

El sistema simpático consta de una cadena de ganglios paravertebrales situados a ambos lados de la columna vertebral, formando el tronco simpático. Al sistema simpático también se le conoce como **sistema adrenérgico o noradrenérgico** y prepara al cuerpo para reaccionar ante situaciones de estrés.

El sistema parasimpático lo forman ganglios aislados y usa acetilcolina, está encargado de almacenar y conservar la energía y es antagónico del sistema simpático después de una situación de estrés (Cardinali, 2003).

La actividad simpática del SNA participa directamente en la **regulación de la presión arterial**, a través de cambios en la liberación de sustancias adrenérgicas (**catecolaminas**) por las terminales nerviosas **simpáticas y la médula adrenal**. Estas sustancias tienen tejidos y órganos efectores que son: la musculatura lisa, el corazón, las glándulas exocrinas y endocrinas, el tejido adiposo, el hígado, el riñón y los órganos linfohematopoyéticos (Tanoue et al., 2002).

Los cambios en los niveles circulantes de **catecolaminas** afectan directamente la **resistencia periférica total de la vasculatura**, así como la frecuencia, fuerza de contracción y gasto cardiaco que son fenómenos de los cuales depende directamente la presión arterial.

2.- CATECOLAMINAS

2.1.- ESTRUCTURA, BIOSÍNTESIS Y ALMACENAMIENTO.

Las catecolaminas (CA) o adrenérgicos son un grupo de compuestos que poseen en su estructura el grupo catecol (orto-dihidroxibenceno) y una cadena lateral con un grupo amino (figura 3), las más importantes son la adrenalina y

noradrenalina (NA) que son sintetizadas y liberadas en las terminaciones nerviosas simpáticas y por la médula adrenal.

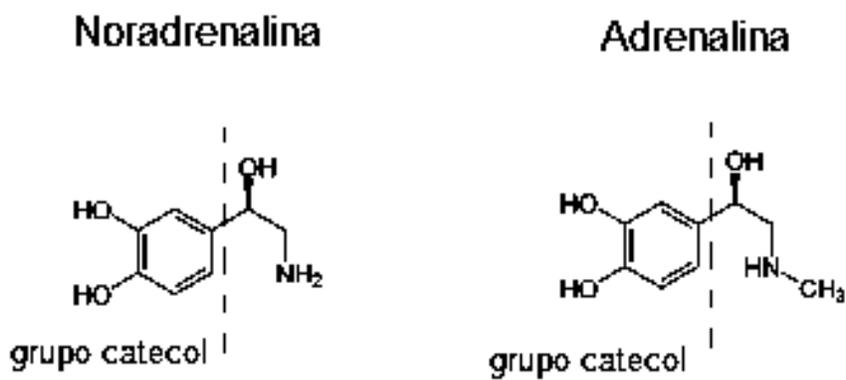


Figura 3.- Estructura química de la noradrenalina y adrenalina. (Tomado y modificado de Westfall, 2010).

Las CA son sintetizadas a partir de la tirosina, este aminoácido puede derivar directamente de la dieta o ser sintetizado en el hígado a partir del aminoácido fenilalanina. La tirosina ingresa a las células cromafines (feocromocitos) de la médula adrenal a través de un transporte activo. El proceso de síntesis de CA en los feocromocitos de la médula adrenal consta de 4 reacciones químicas catalizadas por enzimas (figura 4), estos pasos biosintéticos suceden en el citosol y en las vesículas electrodensas (gránulos cromafines).

Una vez llevada a cabo la síntesis de CA, estas son almacenadas en las vesículas o gránulos cromafínicos de las células de la médula adrenal, lo cual asegura su liberación regulada. Las CA se encuentran almacenadas formando un complejo con ATP para ser liberadas en respuesta a un estímulo (Arias, 2003).

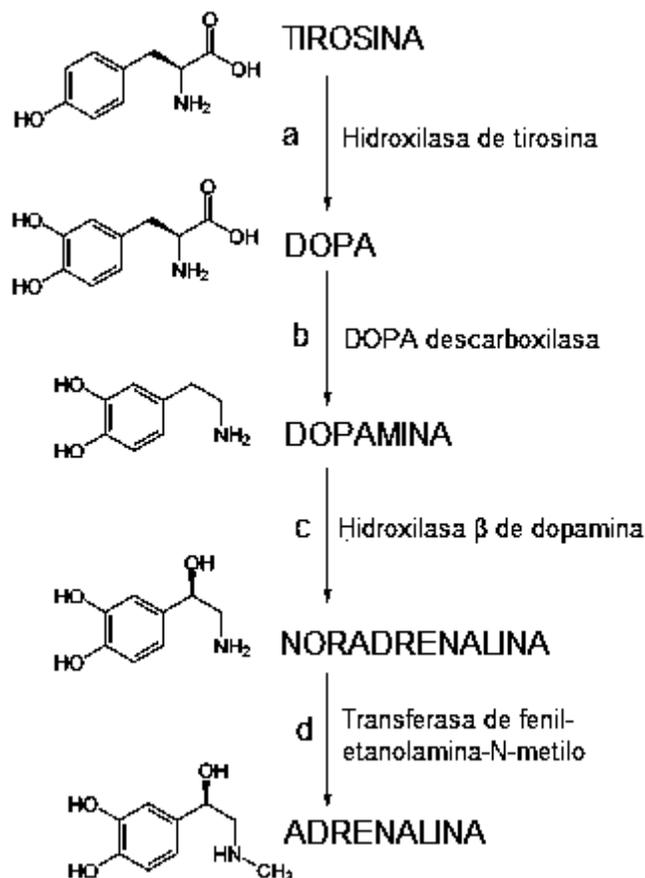


Figura 4.- Etapas de la síntesis enzimática de dopamina, noradrenalina y adrenalina. a).- hidroxilación catalizada por la enzima Tirosina-hidroxilasa, b).- descarboxilación por actividad de la descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos, c).- hidroxilación de la dopamina, d).- metilación, la noradrenalina es metilada en el nitrógeno de su grupo amino (Tomado y modificado de Westfall, 2010).

La captación de las CA en estas vesículas de almacenamiento se encuentra facilitada por un mecanismo de transporte activo que utiliza el transportador vesicular de monoaminas (VMAT). El VMAT-ATP funciona como una bomba que mantiene un amplio gradiente eléctrico. Por cada monoamina transportada el ATP se hidroliza y dos iones de hidrógeno se transportan desde la vesícula al citosol. Este transportador se expresa exclusivamente en las células neuroendocrinas. El almacenamiento de las CA es un proceso dinámico con constante liberación y recaptación (Westfall, 2010).

2.2.- SECRECIÓN DE CATECOLAMINAS

No se ha esclarecido la secuencia total de etapas por medio de las cuales el impulso nervioso efectúa la liberación de noradrenalina desde las fibras adrenérgicas. Sin embargo, en la médula adrenal, el acontecimiento desencadenante es la liberación del neurotransmisor acetilcolina por las fibras preganglionares, de las terminaciones nerviosas simpáticas, que inervan a la médula adrenal.

La acetilcolina, actuando sobre receptores llamados nicotínicos, produce la entrada de Na^+ y por consiguiente la despolarización de la membrana celular. Esto produce que se abran canales de calcio dependientes de voltaje, permitiendo el ingreso de Ca^{2+} al interior (figura 5). De esta manera, el aumento del calcio intracelular desencadena la secreción de CA por un mecanismo de exocitosis que implica el adosamiento de las vesículas electrodensas entre sí con la membrana plasmática; produciéndose una fusión de las mismas y descargando todo el contenido soluble (CA, péptidos opioides, etc.) del gránulo al espacio extracelular (figura 6). Luego de la exocitosis, en el caso de las células cromafines, las membranas vesiculares se despegan de la membrana plasmática y se reciclan formando nuevos gránulos electrodensos (Brandan, 2010).

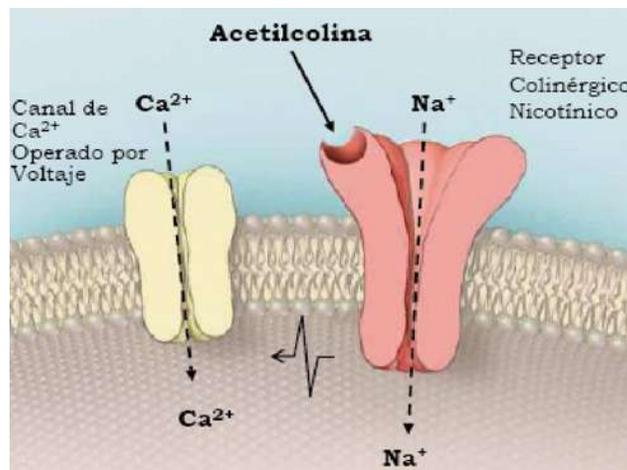


Figura 5.- Receptor colinérgico nicotínico. Despolarización de la membrana y entrada de calcio a la célula cromafínica (Tomado de Brandan, 2010).

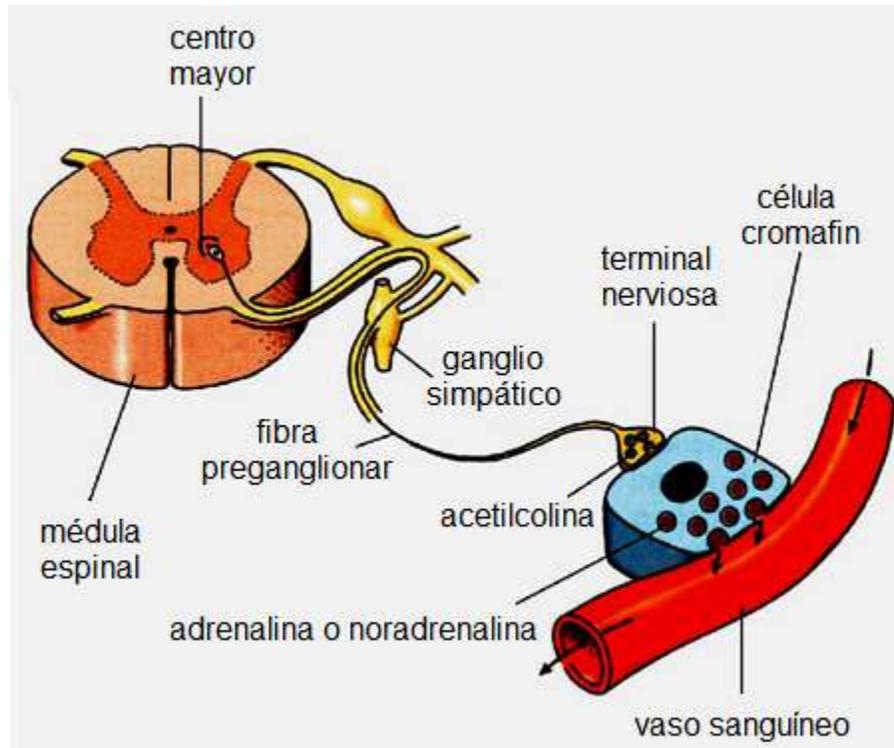


Figura 6.- Liberación de catecolaminas al torrente sanguíneo. El impulso eléctrico proveniente de sistema nervioso central desencadena la liberación de acetilcolina por las fibras preganglionares de las terminaciones nerviosas simpáticas que inervan a la médula adrenal, y así, se promueve la exocitosis de adrenalina y noradrenalina (Tomado y modificado de Brandan, 2010).

Por otra parte, aunque el mecanismo no se ha esclarecido, la liberación de noradrenalina por las fibras simpáticas también parece ser un estímulo para la secreción de ella misma por parte de la médula adrenal.

2.3.- METABOLISMO E INACTIVACIÓN

La vida media de las CA circulantes oscila entre 10 y 100 segundos. Aproximadamente el 50% de las CA circulantes en plasma se encuentran asociadas débilmente con la albumina. De esta manera, la concentración plasmática fluctúa ampliamente. El metabolismo e inactivación de las CA liberadas se produce mediante 3 mecanismos, no excluyentes entre sí, y son: la recaptura, la transformación metabólica (desaminación, metilación y conjugación) y la excreción renal (Brandan, 2010).

La inactivación por recaptura de la noradrenalina liberada es particularmente importante en las terminales nerviosas simpáticas post-ganglionares y es menos importante en la inactivación de la adrenalina circulante. En la terminal nerviosa simpática, el principal mecanismo que opera es la **recaptura** del neurotransmisor. Este es un proceso muy rápido, cuya eficiencia en los tejidos es proporcional a la densidad de la inervación simpática. Es un proceso de transporte a través de la membrana, saturable y que requiere energía. Tiene gran afinidad por la NA, pero puede incorporar otras sustancias de estructura similar. En la recaptura, interviene una Na^+/K^+ ATPasa, por lo que puede ser reducida por inhibidores de esta enzima como la ouabaína. Es inhibida específicamente por cocaína y por agentes antidepressivos tricíclicos como la desipramina (Arias, 2003).

Las CA también pueden ser captadas por tejidos extra neuronales (captación). Este proceso difiere marcadamente del anterior; ya que carece de especificidad, es independiente de la presencia de Na^+ y Ca^{2+} extracelulares y no es inhibido por cocaína. Todas las CA son sustratos aptos para este tipo de captación que no se relaciona con elementos nerviosos, si no con otras células: músculo cardíaco, músculo liso, células glandulares, etc. Este proceso es bloqueado por corticosteroides, por los metabolitos O-metilados de las CA y por β -haloalquilaminas, un grupo de drogas bloqueantes irreversibles de los receptores adrenérgicos α (Arias, 2003).

La **transformación metabólica** o degradación de las CA, ya sea que provengan de fuentes endógenas o exógenas, se hace por la intervención de las enzimas monoamino-oxidasa (MAO) y catecol-O-metiltransferasa (COMT) (figura 7). La MAO es una enzima localizada en su mayor parte en la membrana externa de las mitocondrias, catalizando la desaminación oxidativa de las CA. Las principales funciones de esta enzima es metabolizar las aminas de la dieta, las CA intraneuronales, las circulantes y sus metabolitos O-metilados. La MAO se encuentra principalmente en tejido neuronal, aunque también está presente en diversos tejidos (extraneuronal). Con base en la especificidad de sustrato, en la sensibilidad a inhibidores, análisis genéticos y anticuerpos monoclonales se han

descrito dos formas de MAO; los subtipos se han denominado MAO-A y MAO-B. El subtipo A tiene mayor afinidad por la NA.

La COMT es una enzima citoplasmática presente en tejidos neuronales o extraneuronales que transfiere grupos metilo de S-adenosil-l-metionina al grupo hidroxilo ubicado en la posición meta de las CA y otros compuestos catecólicos y que requiere Mg^{+2} . La COMT metaboliza las CA circulantes en el hígado y riñón y las localmente liberadas en el tejido efector. Se ha demostrado una importancia mayor de la O-metilación en el metabolismo de las CA circulantes y las liberadas localmente respecto de la desaminación oxidativa (Brandan, 2010).

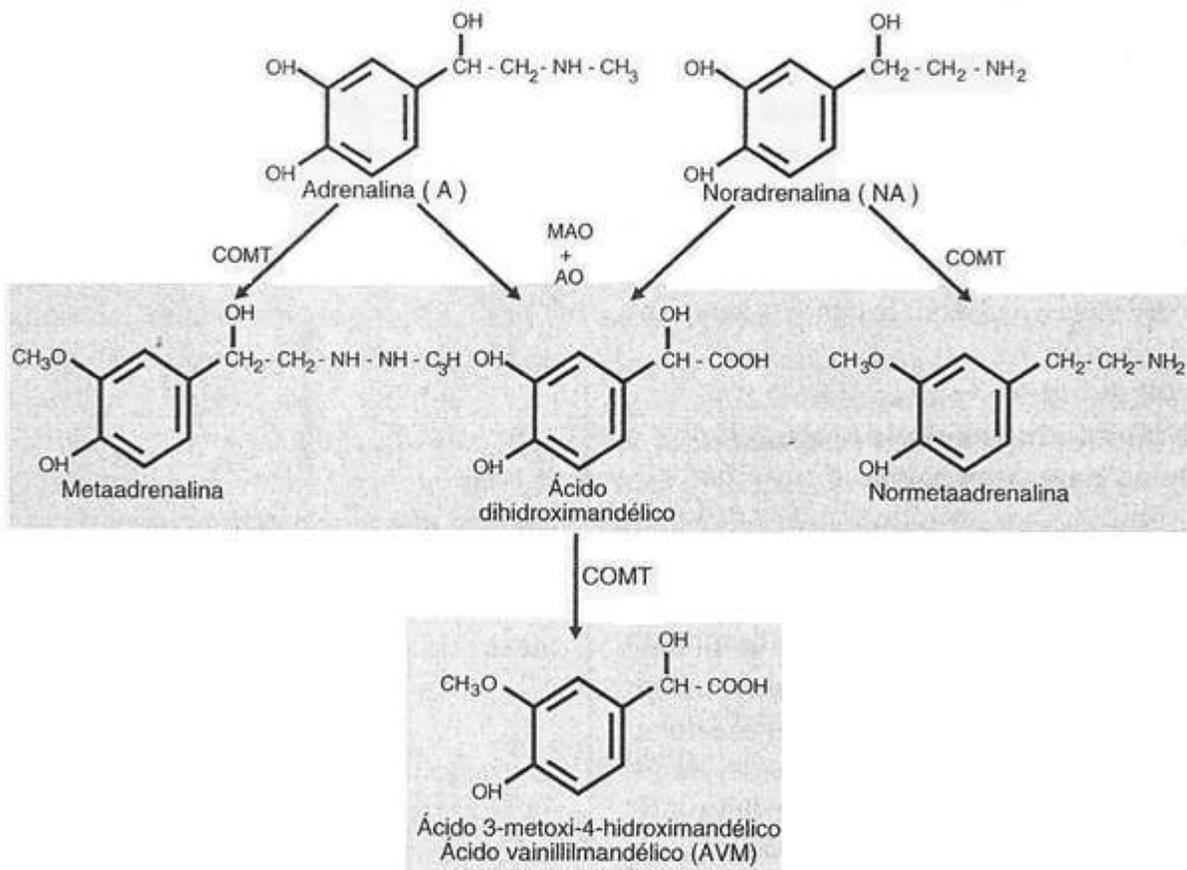


Figura 7.- Transformación metabólica de las catecolaminas. MAO, monoaminoxidasa; AO, aldehído oxidasa; COMT, catecol-o-metiltransferasa (Tomado de Arias, 2003).

Finalmente, en la orina se elimina un 5% de las catecolaminas en forma libre y un 95% en forma de los distintos metabolitos, de los cuales el principal es el ácido vainillilmandélico o AVM. La medición de catecolaminas, meta-adrenalinas y AVM en la orina, provee un valor de la producción total de catecolaminas por parte de la médula adrenal y las fibras simpáticas (Barrett, 2005).

3.- FUNCIÓN DE LAS CATECOLAMINAS

Las acciones sistémicas de las CA son mediadas por la unión de estos compuestos a receptores de membrana plasmática, de 7 dominios transmembranales acoplados a proteínas G (GPCR, por sus siglas en inglés) ampliamente distribuidos por todo el organismo y que se conocen como **receptores adrenérgicos** (Arias, 2003). Estos receptores ocasionan diferentes efectos dependiendo de los subtipos de proteína a quienes se encuentran asociados y al mecanismo de transducción de señal vinculado a la proteína G específica (tabla 1). Esto es importante debido a que los efectos fisiológicos producidos por las CA son variados y depende del receptor específico al cual se unen y del tejido. Es importante señalar que las CA circulantes, secretadas por la médula adrenal ejercen sus efectos exclusivamente en los tejidos periféricos y no en cerebro, puesto que no atraviesan fácilmente la barrera hematoencefálica (Brandan, 2010).

En general, las CA influyen en todos los órganos importantes del organismo. Sus efectos tienen lugar en segundos en comparación con los minutos, horas o días que caracterizan las acciones del sistema endocrino. Las CA participan en los mecanismos integrativos, tanto neurales como endocrinos. Se ha reconocido su participación en la respuesta al estrés, la regulación del **tono del músculo liso**, el **control de la presión arterial**, el metabolismo de los hidratos de carbono y lípidos, la termorregulación, así como en la secreción de diversas hormonas y en numerosos procesos centrales y periféricos (Tanoue et al., 2002).

De esta manera la actividad simpática dada por el sistema nervioso y la secreción de CA de la médula adrenal están coordinadas, aunque sus acciones no siempre son simultáneas y congruentes. En muchas situaciones de estimulación simpática intensa, como es el ejercicio o la exposición al frío, la médula adrenal se va estimulando progresivamente y las CA circulantes refuerzan los efectos fisiológicos del sistema nervioso simpático. Sin embargo, en otras situaciones actúan de forma independiente, así la hipoglucemia por ejemplo estimula prioritariamente a la médula suprarrenal como mecanismo de defensa, tratando de corregir la situación de hipoglucemia, mientras que la hipotensión estimula al sistema nervioso simpático, en un intento de mantener la presión sanguínea necesaria para permitir la perfusión sanguínea tisular.

Receptor adrenérgico	Proteína G asociada	segundo mensajero
α_1 Adrenérgicos α_{1A} , α_{1B} , y α_{1D}	Principalmente proteínas $G_{\alpha_q/11}$	Usualmente activa PLC α (activando la vía PKC mediante DAG e incremento de Ca^{2+} mediante IP $_3$).
α_2 Adrenérgicos α_{2A} , α_{2B} , y α_{2C}	Principalmente proteínas G_{α_i} y G_o	Disminuye la actividad de la adenilato ciclasa Activa canales de K^+ Inhibe canales de Ca^{2+} y activan PLC β o PLA $_2$
β Adrenérgicos β_1 , β_2 y β_3	Proteína G_s	Activa adenilato ciclasa

Tabla 1.- Receptores adrenérgicos y vías de señalización (Tomado y modificado de Barrett E. 2005).

4.- RECEPTORES ADRENÉRGICOS

Como se mencionó anteriormente las CA promueven efectos fisiológicos en el cuerpo a través de la estimulación de los receptores adrenérgicos. Los receptores

adrenérgicos son receptores que se encuentran presentes en la membrana plasmática, tienen 7 dominios transmembranales y pertenecen a la súper-familia de receptores acoplados a proteínas G. Estos receptores tienen gran relevancia ya que se han utilizado como blancos terapéuticos importantes para enfermedades tales como; asma, hipertrofia prostática, congestión nasal, obesidad, dolor y **enfermedades cardiovasculares** (Guimares, 2001).

Existen tres tipos de receptores adrenérgicos: α_1 -adrenérgicos, α_2 -adrenérgicos y β -adrenérgicos. Cada uno de ellos tiene subtipos de receptores. Para los receptores α_1 -adrenérgicos son; α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} . Para los α_2 -adrenérgicos son; α_{2A} , α_{2B} y α_{2C} . Por último los β -adrenérgicos se subdividen en β_1 , β_2 y β_3 (tabla 1).

Los receptores **adrenérgicos α_1** son de localización postsináptica y juegan un rol importante en la regulación de procesos fisiológicos, siendo importantes en mediar la **contracción del músculo liso vascular**, del árbol bronquial y de la pared uterina. Este tipo de receptores se encuentran acoplados a proteínas G α (G $\alpha_{q/11}$) que activan a la fosfolipasa C (tabla 1). En su mecanismo de acción, en última instancia provocan un **incremento en la concentración de Ca²⁺ intracelular** (figura 8), uniéndose este ion a la calmodulina cinasa que media la fosforilación de las cadenas ligeras de la miosina, produciendo **contracción del músculo liso**, siendo este fenómeno de contracción en los vasos sanguíneos objeto de estudio para el presente trabajo y el cual se describirá a detalle más adelante.

Los receptores adrenérgicos α_2 están localizados en las terminaciones nerviosas presinápticas y cuando se activan inhiben la liberación de NA. Estos receptores (α_{2A} , α_{2B} y α_{2C}), poseen una variedad de sistemas de segundos mensajeros. Pueden encontrarse asociados con proteínas G α_i y G $_0$ y pueden disminuir la actividad de la adenilato ciclasa, activar canales de K⁺, inhibir canales de Ca⁺² y activar la fosfolipasa C β o fosfolipasa A $_2$ (Tabla 1). Los receptores adrenérgicos α_2 fueron inicialmente caracterizados como receptores presinápticos que servían en una retroalimentación negativa que regulaba la liberación de

noradrenalina. Sin embargo, también están implicados en funciones postsinápticas y juegan un rol en la homeostasis de la presión sanguínea (tabla 2).

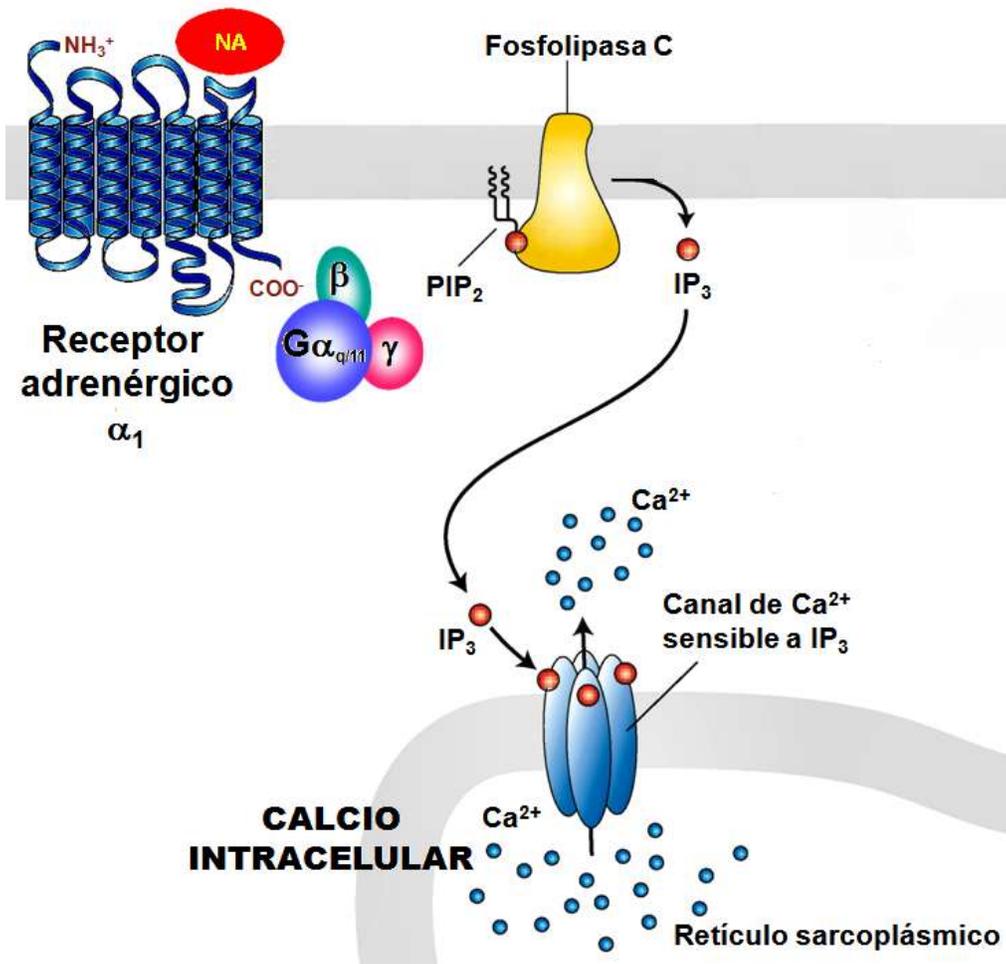


Figura 8.- Movimiento de calcio intracelular en respuesta al estímulo adrenérgico α_1 . El receptor adrenérgico α_1 es estimulado por la noradrenalina, esto produce un cambio conformacional que promueve la disociación de la proteína heterotrímica G liberándose la subunidad $\alpha_{q/11}$ de los otras 2 subunidades. La subunidad $\alpha_{q/11}$ promueve la actividad de la fosfolipasa C incrementando la producción de IP_3 , esto promueve la apertura de canales de calcio del retículo sarcoplásmico y se produce un aumento en la concentración de Ca^{2+} citoplasmático (Tomado y modificado de Godínez, 2005).

Los receptores β -adrenérgicos en su mecanismo de acción, están relacionados con el sistema de la adenilato ciclasa, cuya estimulación aumenta los niveles de adenosin monofosfato cíclico (AMPc). La estimulación del receptor β_1 -adrenérgico produce efectos cronotrópicos e inotrópicos positivos en el corazón, aumenta la

secreción de renina en el riñón y la lipólisis en adipocitos (tabla 2). El receptor β_2 produce la relajación del bronquio y del músculo liso uterino, la estimulación causa broncodilatación, vasodilatación, glucogenólisis, y aumenta la liberación de NA de las terminales nerviosas simpáticas. El receptor β_3 regula el gasto de energía y es el principal receptor involucrado en la lipólisis.

5.- RECEPTORES ADRENÉRGICOS α_1 .

Como se mencionó anteriormente las CA, a través del estímulo de los receptores adrenérgicos (α_1 , α_2 y β), promueven una gran variedad de cambios fisiológicos adaptativos y regulatorios en el cuerpo (tabla 2), sin embargo, la conductancia y **resistencia periférica vascular** es regulada principalmente por los **receptores adrenérgicos α_1** .

Los receptores adrenérgicos α_1 fueron primeramente divididos en 2 subtipos, α_{1A} y α_{1B} , debido a sus diferencias de afinidad por los agentes 5-metilurapidil (5-MU), WB-4111 y el antagonista irreversible cloroetilcloninina (CEC). El receptor α_{1A} mostró una afinidad alta por el 5-MU y WB-4111 y fue insensible a la CEC, mientras que el receptor α_{1B} fue sensible a CEC y baja afinidad a 5-MU y WB-411.

En la actualidad, por medio de análisis farmacológicos y clonación molecular se ha llegado a un consenso en la subdivisión de los receptores α_1 en 3 subtipos; α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} (Methven, 2009). En humanos, los receptores α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} codifican en diferentes genes localizados en los cromosomas 8, 5 y 20, respectivamente. Un cuarto receptor α_1 (α_{1L}) fue postulado, sin embargo, esto sólo fue basado exclusivamente en criterios farmacológicos (baja afinidad por prozosina y RS-17053). Este receptor α_{1L} parece jugar un papel en la regulación de la contracción en humanos, conejo, tracto urinario bajo, aorta de cobayo y arterias mesentéricas de rata. Sin embargo, este receptor hipotético no se ha podido identificar por métodos bioquímicos y de biología molecular. Por lo cual, en algunos estudios se propone que este receptor no deriva de un gen diferente, si no que puede representar un estado conformacional energéticamente favorable del receptor α_{1A} (Guimares, 2001).

ÓRGANO O SISTEMA	EFFECTO SIMPÁTICO ^a	TIPO DE RECEPTOR ADRENÉRGICO ^b
<i>Ojos</i>		
Músculo radial, iris	Contracción (midriasis)++	α_1
Músculo esfinteriano, iris		
Músculo ciliar	Relajación para la visión distante ⁺	β_2
Glándulas lagrimales	Secreción ⁺	α
<i>Corazón^c</i>		
Nudo sinoauricular	Aceleración de la frecuencia cardíaca++	$\beta_1 > \beta_2$
Aurículas	Incremento en la contractilidad y la velocidad de conducción++	$\beta_1 > \beta_2$
Nudo auriculoventricular	Incremento en la automaticidad y velocidad de conducción++	$\beta_1 > \beta_2$
Sistema de His-Purkinje	Incremento en la automaticidad y la velocidad de conducción	$\beta_1 > \beta_2$
Ventrículo	Incremento en la contractilidad, velocidad de conducción, automaticidad y velocidad de los marcapasos idioventriculares+++	$\beta_1 > \beta_2$
<i>Vasos sanguíneos (Arterias y arteriolas)^d</i>		
Coronarias	Constricción ⁺ ; dilatación ^e ++	$\alpha_1, \alpha_2; \beta_2$
Piel y mucosas	Constricción+++	α_1, α_2
Músculo de fibra estriada Cerebrales	Constricción; dilatación ^{e,f} ++	$\alpha_1; \beta_2$
Pulmonares	Constricción (mínima)	α_1
Vísceras abdominales	Constricción ⁺ ; dilatación	$\alpha_1; \beta_2$
Glándulas salivales	Constricción+++; dilatación ⁺	$\alpha_1; \beta_2$
Renales	Constricción+++	α_1, α_2
(Venas) ^d	Constricción++; dilatación++	$\alpha_1, \alpha_2; \beta_1, \beta_2$
	Constricción; dilatación	$\alpha_1, \alpha_2; \beta_2$
<i>Endotelio</i>		
<i>Pulmones</i>		
Músculo de fibra lisa en tráquea y bronquiolos	Relajación	β_2
Glándulas bronquiales	Disminución de la secreción y aumento de la secreción	α_1 β_2
<i>Estómago</i>		
Motilidad y tono	Disminución (por lo común) ⁱ +	$\alpha_1, \alpha_2; \beta_1, \beta_2$
Esfínteres	Contracción (por lo común) ⁺	α_1

Tabla 2.- Respuesta de los órganos efectores a los impulsos nerviosos autonómicos (Westfall 2010) (Continua).

ÓRGANO O SISTEMA	EFFECTO SIMPÁTICO ^a	TIPO DE RECEPTOR ADRENÉRGICO ^b
<i>Intestinos</i>		
Motilidad y tono	Disminución ^h +	$\alpha_1, \alpha_2; \beta_1, \beta_2$
Esfínteres	Contracción+	α_1
Secreción	Inhibición	α_2
<i>Vesícula y conductos biliares</i>	Relajación+	β_2
<i>Riñones</i>		
Secreción de renina	Disminución+; incremento++	$\alpha_1; \beta_1$
<i>Vejiga</i>		
Músculo detrusor	Relajación+	β_2
Trígono y esfínter	Contracción++	α_1
<i>Uréter</i>		
Motilidad y tono	Incremento	α_1
<i>Útero</i>	Contracción en embarazo; Relajación	α_1 β_2
	Relajación en la víscera sin embarazo	β_2
<i>Órganos de la reproducción del varón</i>	Eyacuación+++	α_1
<i>Piel</i>		
Músculos pilomotores	Contracción++	α_1
Glándulas sudoríparas	Secreción localizada ^k ++ Secreción generalizada+++	α_1
<i>Cápsula del bazo</i>	Contracción+++ Relajación+	α_1 β_2
<i>Médula suprarrenal</i>	— Secreción de adrenalina y noradrenalina	
<i>Músculo de fibra estriada</i>	Intensificación de la contractilidad; glucogenólisis; captación de K^+	β_2
<i>Hígado</i>	Glucogenólisis y gluco- neogénesis+++	$\alpha_1,$ β_2
<i>Páncreas</i>		α
Ácinos	Menor secreción+	α
Islotes (células β)	Menor secreción+++ Mayor secreción+	α_2 β_2
<i>Adipocitos^l</i>	Lipólisis+++ (termogénesis)	$\alpha_1, \beta_1, \beta_2, \beta_3$
	Inhibición de la lipólisis	α_2
<i>Glándulas salivales</i>	Secreción de K^+ y agua+	α_1

Tabla 2 (continuación).- Respuesta de los órganos efectores a los impulsos nerviosos autonómicos (Westfall 2010).

6.- RECEPTORES ADRENÉRGICOS α_1 EN LOS VASOS SANGUÍNEOS.

6.1.- VASOS SANGUÍNEOS

Los vasos sanguíneos son estructuras tubulares que forman parte del sistema circulatorio y transportan sangre a través del cuerpo por acción del corazón. Hay tres principales tipos de vasos sanguíneos; **las arterias**, las cuales distribuyen la sangre que sale del corazón al cuerpo, los capilares, los cuales hacen posible el intercambio de agua y químicos entre la sangre y los tejidos, y las venas que transportan la sangre de los capilares de regreso al corazón (Higashida, 2001).

Las arterias están constituidas por tres túnicas o capas, la túnica interior o íntima formada por el tejido endotelial, tejido conjuntivo areolar y tejido elástico; la **túnica media** es principalmente de células de **músculo liso** (figura 9), y este tipo de células es de importancia para el presente trabajo ya que en ellas se encuentran presentes los tres subtipos de receptores adrenérgicos α_1 , y estos receptores median la respuesta contráctil de los vasos sanguíneos. Por último, la túnica exterior o adventicia está formada por tejido fibroso.

6.2.- MÚSCULO LISO

El músculo liso o músculo no estriado se compone de células en forma huso y como anteriormente se explicó forma parte de la capa media de los vasos sanguíneos. El estímulo para la contracción del músculo liso está mediado por el sistema nervioso autónomo. El músculo liso además de estar presente en los vasos sanguíneos también se encuentra en los aparatos reproductor y excretor, en la piel y en órganos internos. Este tipo de músculo posee fibras de actina y miosina que son las responsables de la contracción. El proceso de contracción se activa por iones calcio y la energía requerida para dicha contracción es suministrada por la degradación de trifosfato de adenosina (ATP).

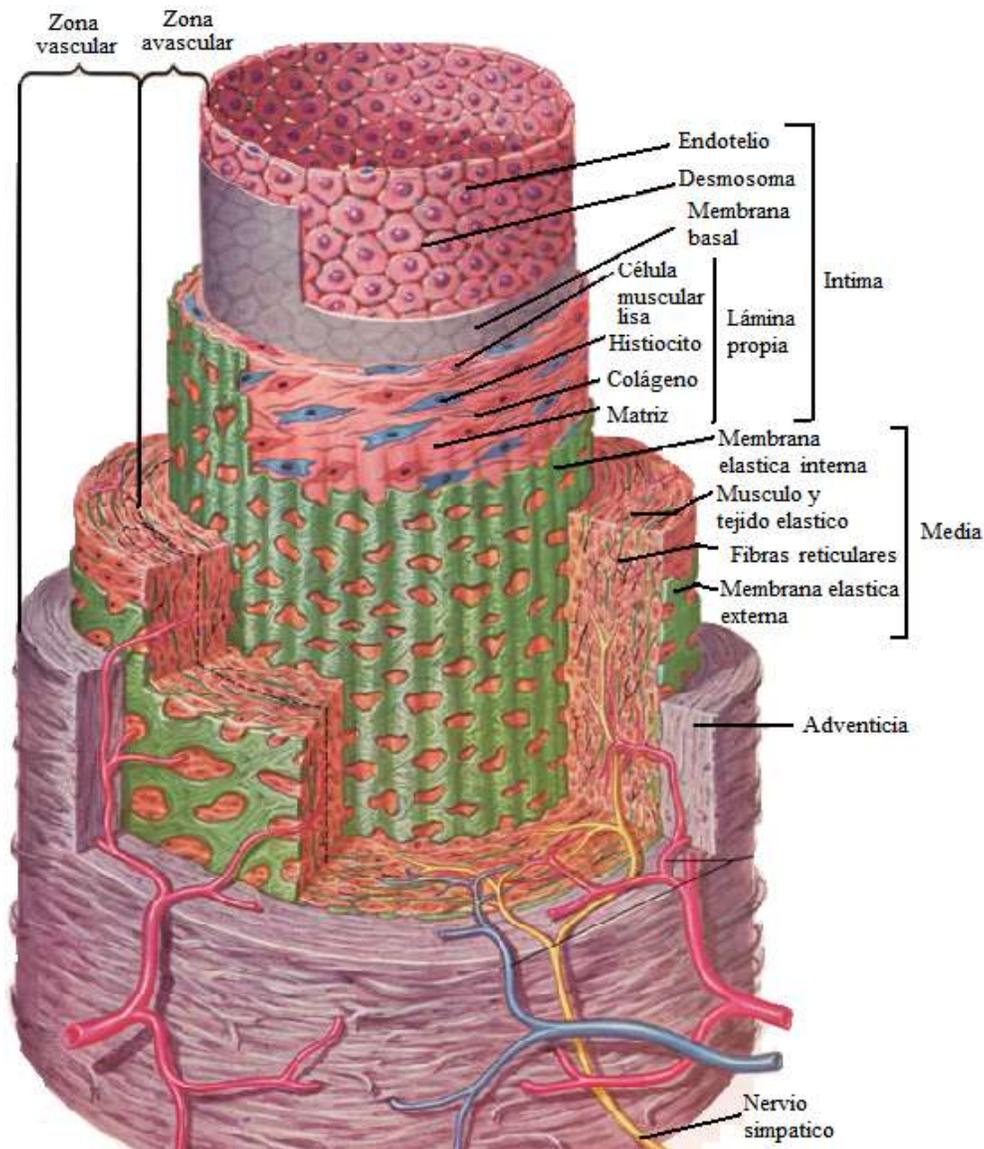


Figura 9.- Estructura arterial. Las arterias están formadas por tres capas principales: la íntima, la media y la adventicia. (Tomado y modificado de Netter, 2006).

7.- CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO LISO VASCULAR EN RESPUESTA AL ESTÍMULO ADRENÉRGICO α_1 .

Anteriormente se señaló que el sistema nervioso autónomo a través de la actividad simpática regula la presión arterial, y esta regulación es en parte por la regulación del tono vascular. El tono vascular está mediado por efecto de las

catecolaminas sobre los receptores adrenérgicos (α_1 , α_2 y β), de los cuales los receptores α_1 son los encargados principalmente de la contracción como se muestra en los experimentos de Sporkova y colaboradores (2010), donde se promueve una contracción inducida por concentraciones crecientes de noradrenalina en presencia de los agentes propanolol y yohimbina por separado (propanolol-antagonista selectivo de los receptores β , yohimbina-antagonista selectivo de los receptores α_2), y se observa que al bloquear los receptores β y α_2 no hay diferencia en la contracción con respecto al control (figura 10 y 11).

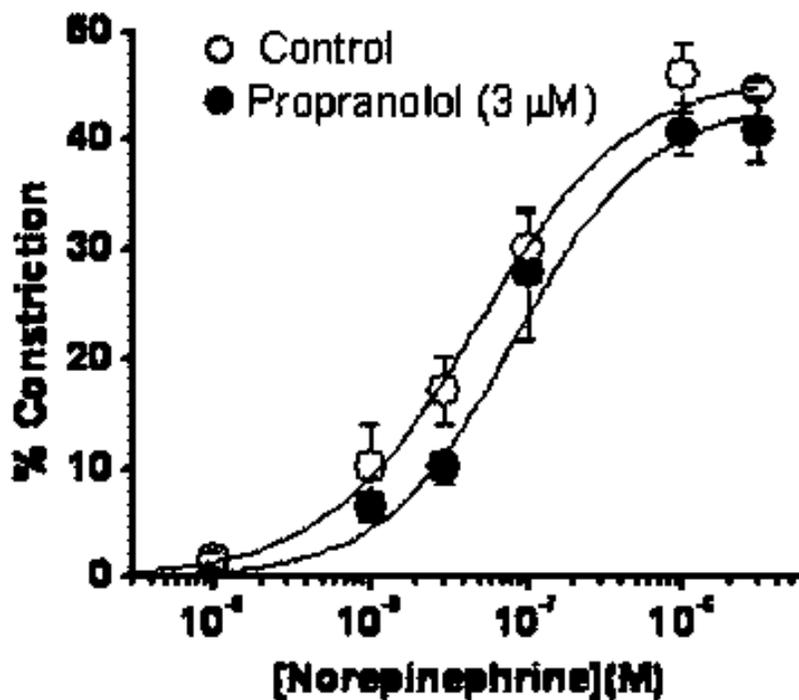


Figura 10.- Contracción inducida por noradrenalina en presencia y ausencia de propanolol. Arteria mesentérica. n=4 (Tomado de Sporkova et al., 2010).

Estos experimentos (figura 10 y 11) indican que los receptores adrenérgicos de importancia en la contracción vascular son los α_1 , sin embargo existen algunos reportes que indican que los receptores α_2 también participan en la contracción aunque de manera discreta, y esto depende del lecho vascular utilizado. Es por ello que el presente trabajo se centra en el estudio de la contracción del músculo liso vascular promovida por los receptores adrenérgicos α_1 .

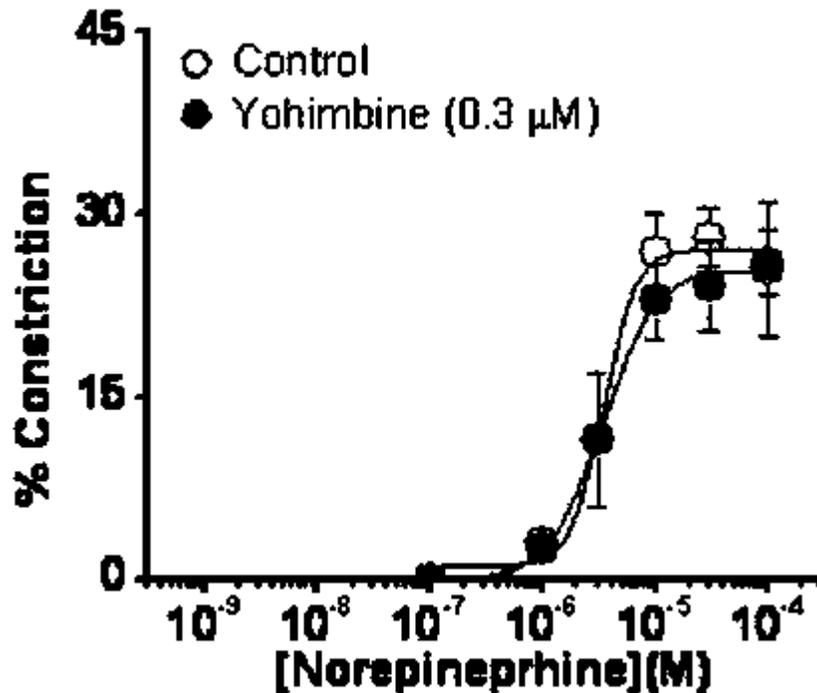


Figura 11.- Contracción inducida por noradrenalina en presencia y ausencia de yohimbina. Arteria mesentérica. n=4 (Tomado de Sporkova et al., 2010).

8.- ANTECEDENTES DIRECTOS

8.1.- PARTICIPACIÓN DE LOS DIFERENTES SUBTIPOS DE RECEPTORES ADRENÉRGICOS α_1 EN LA CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO LISO VASCULAR.

Como se mencionó anteriormente, por medio de análisis farmacológicos y clonación molecular se han identificado tres subtipos de receptores adrenérgicos α_1 (α_{1A} , α_{1B} y α_{1D}). Hasta hace unos años se sabía que los tres subtipos de receptores adrenérgicos α_1 participaban por igual para promover la contracción vascular, además de que se producía a través de la vía transduccional general (figura 8) descrita en la que los tres receptores están principalmente acoplados a la proteína $G_{\alpha q/11}$ para estimular la actividad de la fosfolipasa C y promover la hidrólisis de fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂) y producir inositol-trifosfato (IP₃) y diacil-glicerol (DAG) (Hein y Kobilka, 1995; Zhong y Minneman, 1999; García-Sáinz et al., 2000).

Estas moléculas actúan como segundos mensajeros mediando la **liberación de Ca^{2+} intracelular** y la activación de la proteína cinasa C, respectivamente. Sin embargo, estudios recientes indican que los 3 subtipos de receptores adrenérgicos α_1 tienen diferentes eficiencias de activación de la fosfolipasa C. De acuerdo con Theroux y colaboradores (1996), la tasa de acoplamiento-eficiencia para la liberación de Ca^{2+} intracelular después de la ocupación con un agonista en receptores α_1 recombinantes expresados en células embrionarias de riñón de humanos es; $\alpha_{1D} > \alpha_{1A} > \alpha_{1B}$.

Aunado a esto, se han dirigido estudios con herramientas farmacológicas (agonistas y antagonistas selectivos) para tratar de comprender las funciones particulares de cada subtipo de receptor adrenérgico α_1 en la contracción del músculo liso vascular. Un ejemplo de esto son los experimentos realizados por Chalothron y colaboradores, donde se utilizó un antagonista selectivo para el receptor α_{1D} (BMY 7378), y como se muestra en la figura 13, el BMY 7378 desplaza la curva a la derecha, ocupándose 100 veces más la concentración del agonista para alcanzar el 50% de la respuesta máxima (dosis efectiva 50).

Con estos experimentos Chalothron y colaboradores (2000) sugieren que el receptor α_{1D} juega un papel primordial en la contracción vascular. En estos experimentos, cabe resaltar que se usó el fármaco fenilefrina, que es una herramienta farmacológica ampliamente utilizada para el estímulo de los tres subtipos de receptores adrenérgicos α_1 . También se le conoce como fármaco simpaticomimético ya que produce respuestas similares a la noradrenalina. En su estructura, la fenilefrina es un análogo de las catecolaminas (figura 12).

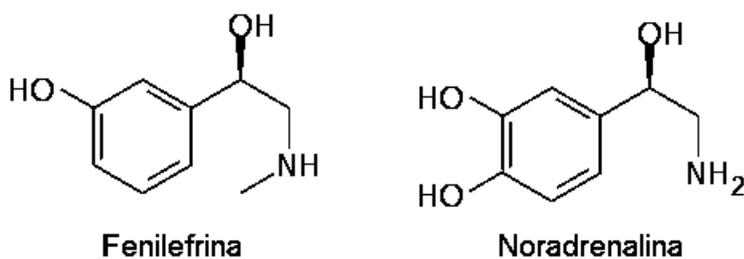


Figura 12.- Comparación estructural de la fenilefrina y la noradrenalina.

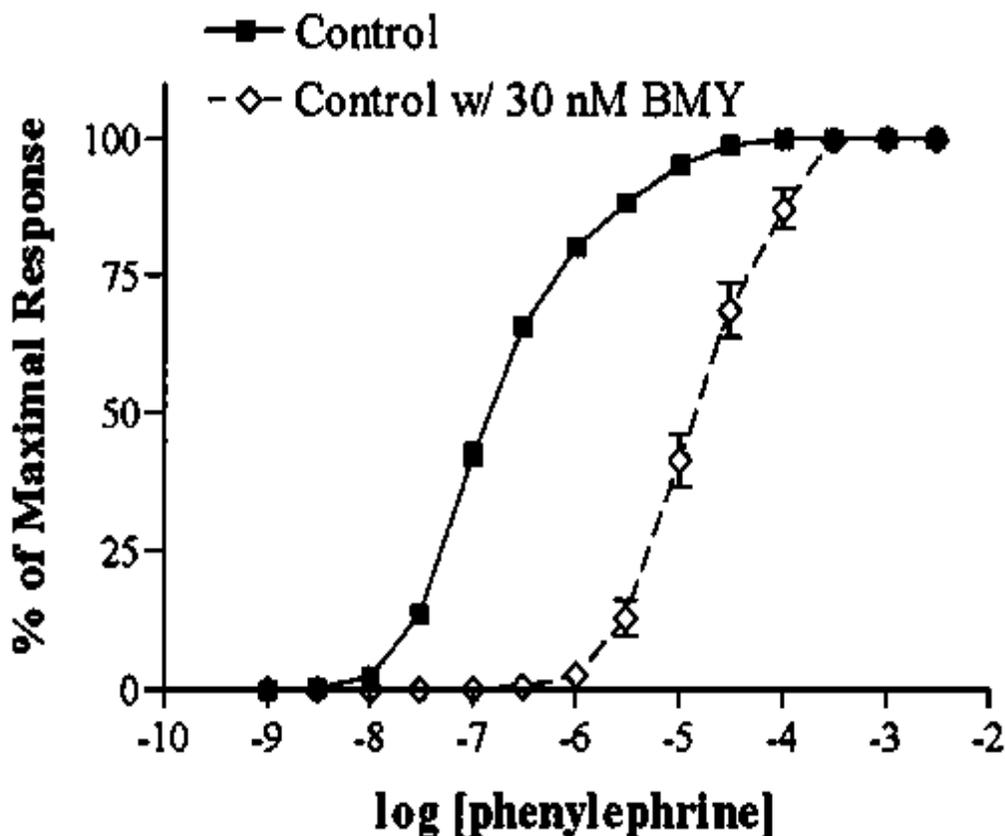


Figura 13.- Contracción inducida por concentraciones crecientes de fenilefrina en presencia del antagonista BMY 7378. Aorta torácica. n=23 (Chalothron et al., 2000).

Otros experimentos que nos permiten comprender más sobre las funciones particulares de cada subtipo de receptor adrenérgico α_1 en la contracción vascular, son los experimentos realizados por Ibarra y colaboradores (2000), donde se realizaron curvas concentración-respuesta a la noradrenalina en ausencia y presencia de diferentes concentraciones del antagonista cloroetilclonidina (CEC) en cepas de ratas y lechos vasculares diferentes. Este agente, la CEC alquila de manera preferencial e irreversible a los receptores α_{1B} , después a los receptores α_{1D} y se sabe que los receptores α_{1A} son resistentes a dicha alquilación, sin embargo, esto está sujeto a las concentraciones empleadas.

En las figuras 14 y 15, se observa el efecto de la CEC sobre la respuesta contráctil a la noradrenalina en arterias aorta y caudal de ratas Wistar, WKY (Wistar Kyoto) y SHR (ratas espontáneamente hipertensas). Como se observa en dichas figuras, la CEC desplaza mayormente las curvas a la derecha y a menores

concentraciones en la aorta comparada con las curvas de las arterias caudal (figura 14 y 15) correspondiente para cada cepa de rata. Esto puede ser explicado por el hecho de que en arterias de resistencia (arteria caudal) el receptor α_{1A} (receptor resistente a CEC) es el encargado mayoritariamente de la contracción, mientras que en arterias de conductancia o arterias de mayor calibre (aorta) el receptor α_{1D} es el principal.

Por otra parte, las respuestas restantes de contracción aun utilizando la concentración mayor de CEC indican que el receptor α_{1A} además del receptor α_{1D} , participa de manera importante en la contracción vascular.

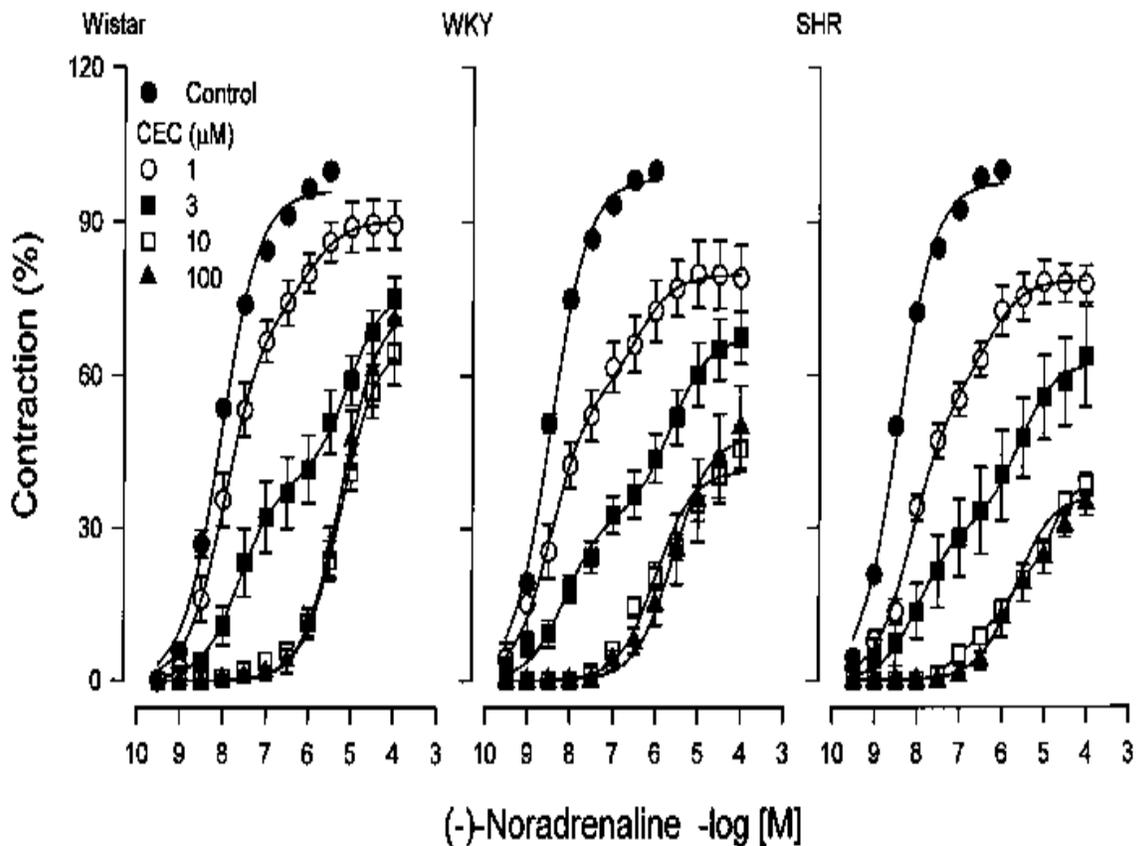


Figura 14.- Efecto de la cloroetilclonidina sobre la respuesta contráctil a la noradrenalina en **aorta** de ratas Wistar, WKY y SHR. Los anillos aórticos fueron incubados con las diferentes concentraciones de CEC durante 45 minutos para después realizarse las curvas concentración-respuesta a la noradrenalina. n= 4-6 (Ibarra et al., 2000).

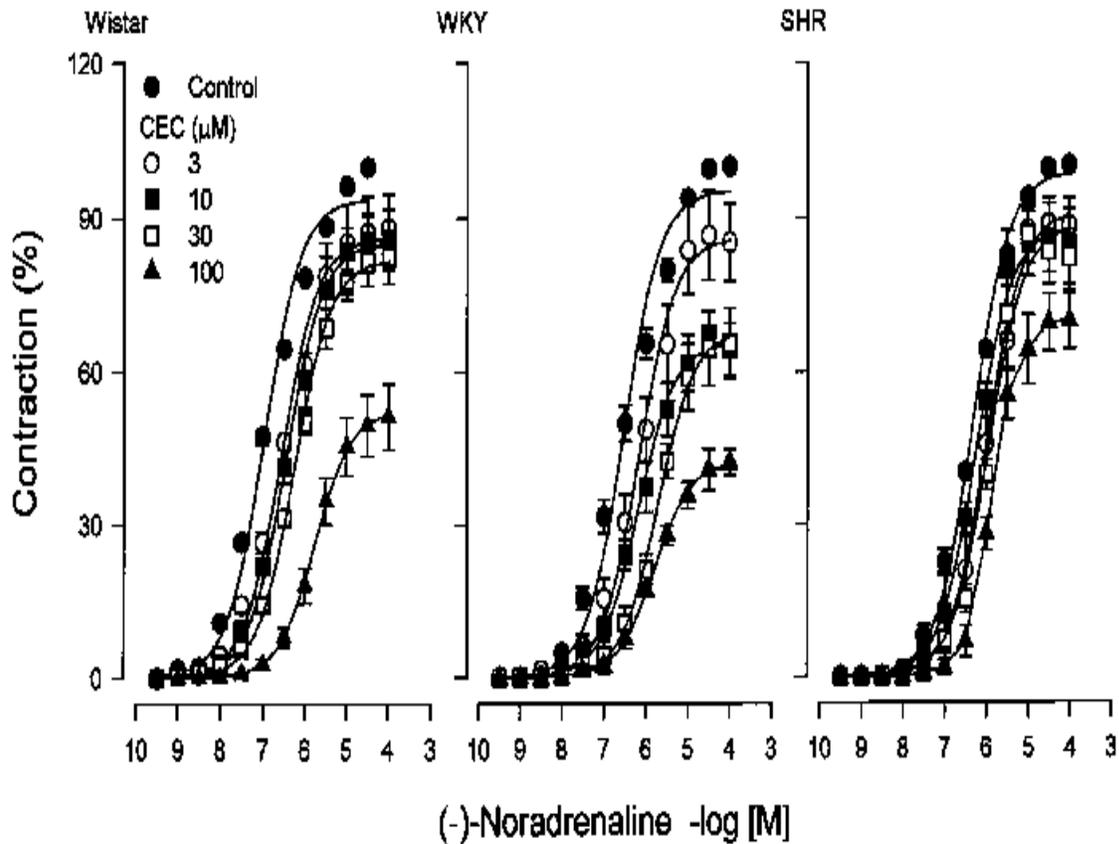


Figura 15.- Efecto de la cloroetilclonidina sobre la respuesta contráctil a la noradrenalina en arteria caudal de ratas Wistar, WKY y SHR. Los anillos aórticos fueron incubados con las diferentes concentraciones de CEC durante 45 minutos para después realizarse las curvas concentración-respuesta a la noradrenalina. $n = 4-6$ (Ibarra et al., 2000).

En esta misma serie de experimentos Ibarra y colaboradores (2000) realizaron curvas concentración-respuesta a la noradrenalina en presencia de la CEC pero con una previa protección para el receptor α_{1D} , utilizando el BMY 7378 (un antagonista α_{1D} ; figura 16). El hecho de que los tratamientos con CEC + BMY 7378 no son diferentes del control, indican que la disminución del efecto máximo y desplazamiento de la curva a la derecha por efecto de la CEC es solo por el antagonismo de los receptores α_{1D} , de esta manera también se puede inferir que los receptores α_{1B} parecen no estar involucrados en la contracción vascular.

En los experimentos antes descritos se utilizaron diferentes cepas de ratas, de las cuales vale la pena resaltar las ratas SHR, que significa ratas espontáneamente hipertensas por sus siglas en inglés. Estas ratas desarrollan

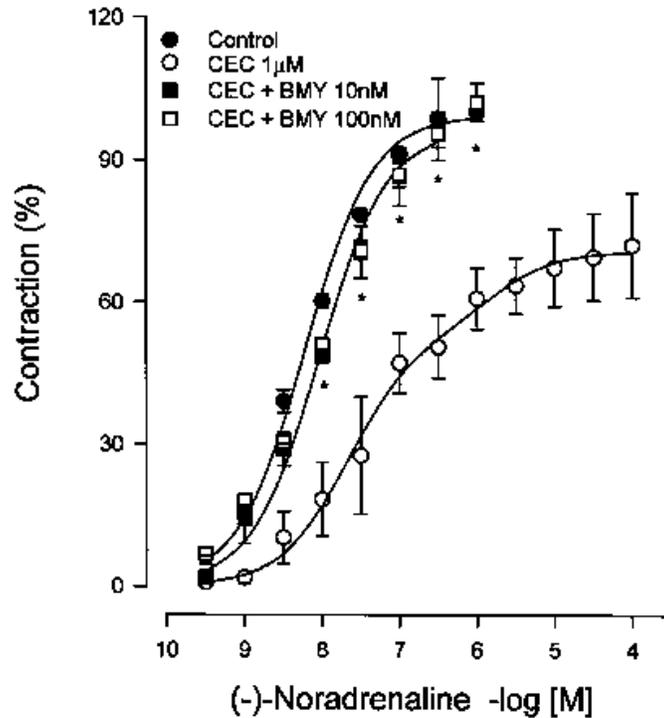


Figura 16.- Protección por BMY 7378 sobre la contracción inducida por noradrenalina en presencia de CEC en aorta de rata SHR. Los anillos aórticos fueron incubados con BMY 7378 antes y durante la exposición con CEC para después realizar curva concentración-respuesta a la noradrenalina. $n=4-6$. * $p<0.05$ vs CEC 1µM (Ibarra et., 2000).

conforme avanza su edad valores elevados de presión arterial. Por lo cual, estas ratas se han usado como un modelo de estudio para ver como los receptores adrenérgicos α_1 están involucrados en el desarrollo de la hipertensión.

Por otra parte, en los experimentos realizados por Villalobos-Molina y colaboradores (1999; figura 17), se midió el incremento de la presión arterial inducida por fenilefrina en ausencia y presencia del antagonista BMY 7378, en ratas desmedulas WKY y SHR de diferentes edades. Ellos observaron que el BMY 7378 en el caso de las ratas WKY solo logra un desplazamiento de la curva en las ratas de edad adulta. En el caso de las ratas hipertensas se observa un desplazamiento de la curva a la derecha en las ratas de un mes y este efecto se ve mayor en las ratas de 6 meses (figura 17). Con estos resultados los autores sugieren que la actividad del receptor adrenérgico α_{1D} pudiera estar incrementada conforme avanza la edad en el organismo y en patologías como la hipertensión.

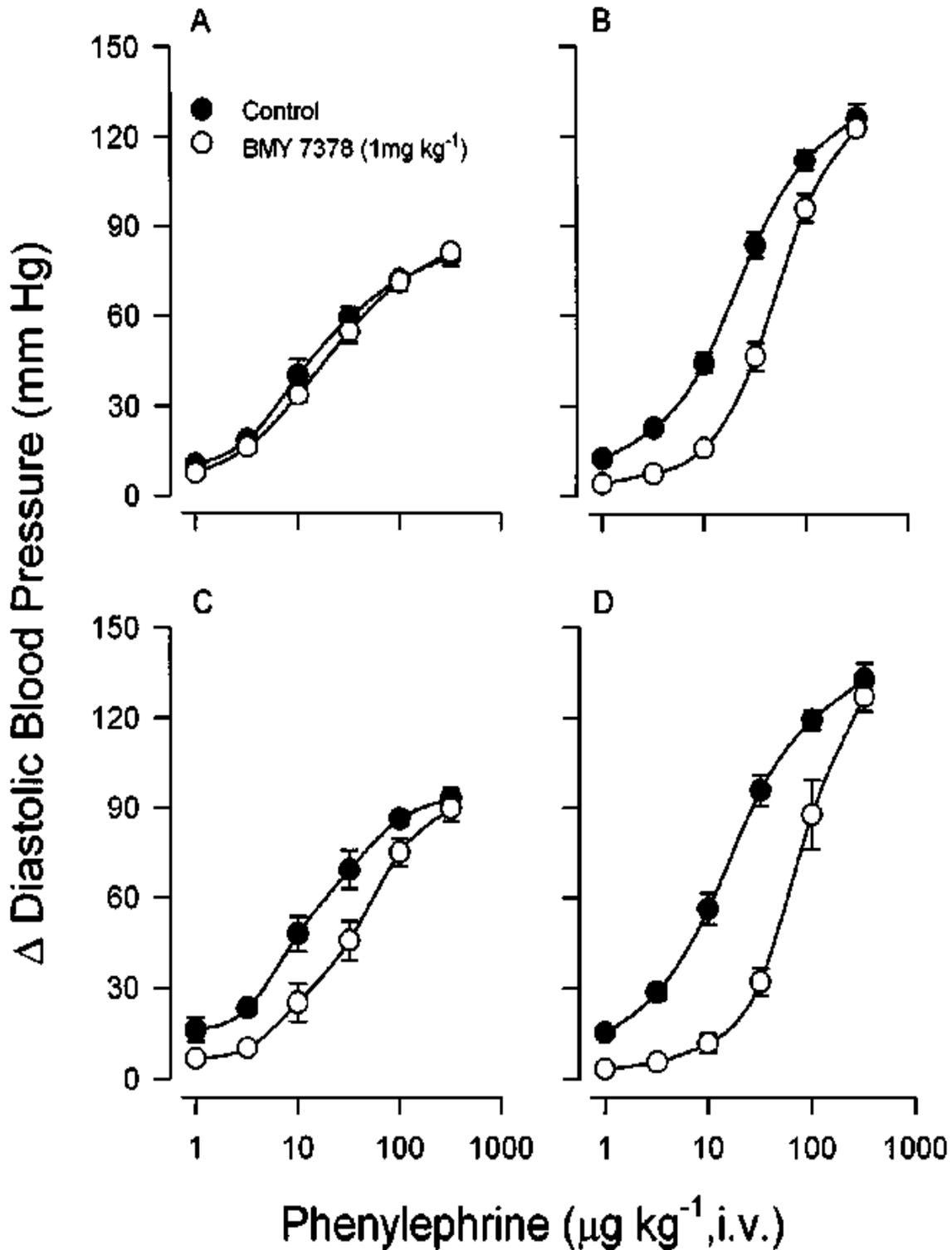


Figura 17.- Acción del antagonista BMY 7378 en la respuesta presora inducida por fenilefrina en ratas WKY y SHR de diferentes edades. (A) WKY de un mes; (B) WKY de 6 meses; (C) SHR de un mes; (D) SHR de 6 meses. $n=3-7$ (Tomado y modificado de Villalobos-Molina et al., 1999).

En los antecedentes antes descritos hemos visto que se han utilizado diferentes cepas de ratas y herramientas farmacológicas (agonistas y antagonistas) que nos han permitido obtener más información sobre las funciones particulares de cada subtipo de receptor adrenérgico α_1 en la contracción vascular y en el desarrollo de enfermedades tal como la hipertensión. Sin embargo, la contribución de cada subtipo de receptor α_1 en las respuestas fisiológicas inducidas por catecolaminas no se han caracterizado del todo, esto se debe en parte, a que los fármacos usados no son altamente selectivos para cada subtipo de receptor y posiblemente interactúen con otros receptores adrenérgicos y no adrenérgicos, además de que en muchos tejidos se expresan los 3 subtipos de receptores α_1 .

Por lo cual, otras herramientas de desarrollo reciente que han ayudado grandemente a dilucidar nuevas funciones y mecanismos de acción específicos para cada subtipo de receptor α_1 son la creación de animales con interrupción de genes específicos (animales knockout) que permiten abolir la función de algún subtipo de receptor y de esta manera aislar la respuesta específica de otro.

8.2.- HERRAMIENTAS GENÉTICAS EN EL ESTUDIO DE LAS FUNCIONES DE LOS DIFERENTES SUBTIPOS DE RECEPTORES ADRENÉRGICOS α_1 .

Los subtipos de receptores adrenérgicos α_1 genéticamente definidos son tres, α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} , y se sabe que pueden producir respuestas celulares similares, incluyendo la contracción del músculo liso vascular. Los estudios farmacológicos de los receptores α_1 sugieren que múltiples subtipos están presentes en las arterias, lo que dificulta el análisis de cada subtipo individualmente (Metheven et al., 2009).

Sin embargo, se han sido logrados cepas de ratones con cambios genéticos para la creación de knockouts para cada receptor (knockout α_{1A} , Rokosh y Simpson, 2002; knockout α_{1B} , Cavalli *et al.*, 1999; Knockout α_{1D} , Tanoue *et al.*, 2002), que han sido una herramienta útil para el diseño de estrategias en el análisis de cada subtipo de receptor.

El primer knockout logrado para los diferentes subtipos de receptores adrenérgicos α_1 fue el Knockout α_{1B} en 1997 por Cavalli y colaboradores. A estos ratones inicialmente se les midió el incremento de la presión arterial en respuesta a infusiones de fenilefrina y noradrenalina (figura 18). Los resultados mostraron una disminución en el incremento de la presión arterial en el ratón knockout α_{1B} comparado con el tipo silvestre, por lo cual Cavalli y colaboradores propusieron que el receptor α_{1B} participa en la regulación de la presión arterial, a través del control del tono vascular. Sin embargo, estudios posteriores en el ratón knockout α_{1B} indicaron que la carencia de este receptor no disminuye la presión arterial y la frecuencia cardiaca en el animal íntegro e incluso sugieren que el receptor α_{1B} no parece participar en la contracción vascular (figura 19) (Methven et al., 2009).

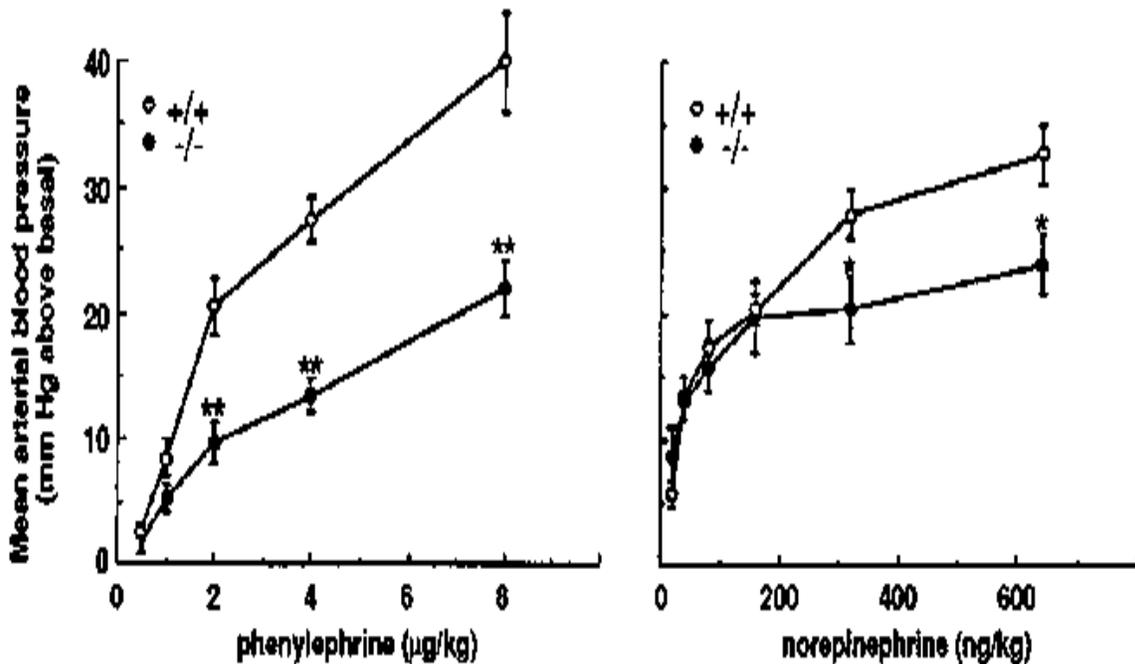


Figura 18.- Incremento de la presión arterial en respuesta a la fenilefrina y noradrenalina en ratón anestesiado tipo silvestre y Knockout α_{1B} . n=6. *p <0.05 vs tipo silvestre (Tomado y modificado de Cavalli et al., 1997).

Como podemos ver, existen datos controversiales en cuanto a la participación del receptor adrenérgico α_{1B} en la contracción vascular y en la regulación de la

presión arterial, por lo cual, queda la tarea de diseñar más experimentos encaminados a dilucidar mas sobre las funciones de este receptor.

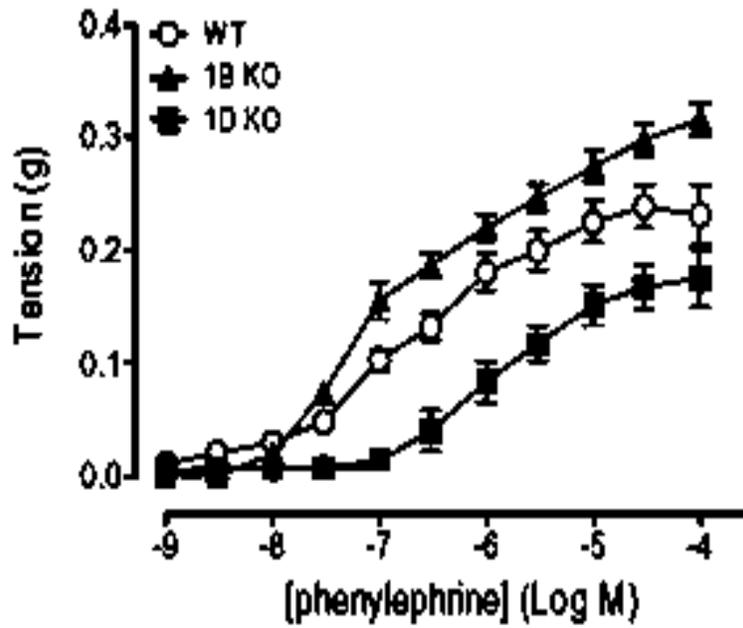


Figura 19.- Respuesta contráctil a fenilefrina en arteria carótida de ratón tipo silvestre, Knockout α_{1B} y Knockout α_{1D} . n=8 (Tomado y modificado de Methven L. 2009).

En el 2002 Rokosh y Simpson lograron la interrupción del gen para el receptor α_{1A} . A este ratón se le midió la presión arterial y la frecuencia cardiaca con ayuda de un manómetro y a través un catéter intra-arterial conectado a un sistema de adquisición de datos. Los resultados mostraron que el ratón knockout α_{1A} presenta valores significativamente menores de presión arterial comparados con el control en ambas metodologías, en la frecuencia cardiaca no se observaron diferencias (tabla 3).

Con estos resultados Rokosh y Simpson sugieren que el receptor α_{1A} es necesario para mantener los niveles normales de presión arterial. La hipotensión en el knockout α_{1A} es debida a una disminución en la respuesta contráctil vascular en respuesta a las catecolaminas (información no mostrada, Rokosh D. y Simpson P. 2002).

	Tail cuff manometer				Carotid artery catheter		
	Male		Female		WT	Het	KO
	WT	KO	WT	KO			
Systolic blood pressure, mmHg	114 ± 2	104 ± 5*	111 ± 2	102 ± 3*			
KO/WT, %		91		92			
Mean arterial pressure, mmHg					138 ± 3	127 ± 6*	121 ± 3*
KO/WT, %						92	88
Heart rate, beats per min	602 ± 10	636 ± 28	604 ± 14	630 ± 6	568 ± 33	565 ± 38	624 ± 16
KO/WT, %		106		104		99	110
N mice	12	5	9	10	9	6	8

Tabla 3.- Presión arterial y frecuencia cardiaca de ratón tipo silvestre y Knockout α_{1A} . *p <0.05 vs tipo silvestre (Tomada de Rokosh y Simpson, 2002).

El último knockout para los receptores adrenérgicos α_1 en lograrse fue para el receptor α_{1D} . Este se logró en 2002 en los trabajos de Tanoue y colaboradores. Al igual que en los knockout α_{1B} y α_{1A} , se analizó la presión arterial. El ratón knockout α_{1D} presentó valores de hipotensión comparados con el tipo silvestre (116.5 ± 2.2 mmHg, tipo silvestre; 99.1 ± 1.7 mmHg, knockout α_{1D}). Aunado a estos resultados se observó que el incremento en la presión arterial en respuesta a la noradrenalina se encontró disminuido en ausencia de este receptor comparado con el tipo silvestre (figura 20).

Queda claro que el desarrollo de nuevas herramientas ha ayudado a comprender mejor las funciones de los receptores adrenérgicos α_1 en la contracción del músculo liso vascular y en la regulación de la presión arterial. Sin embargo, aún queda la tarea de diseñar experimentos que nos permitan explorar hasta qué punto las funciones de los receptores adrenérgicos α_{1A} y α_{1D} son redundantes, sumatorias o incluso si dependen de vías transduccionales diferentes. Aunado a esto también queda la incógnita de cuáles son las funciones del receptor adrenérgico α_{1B} en la contracción del músculo liso vascular.

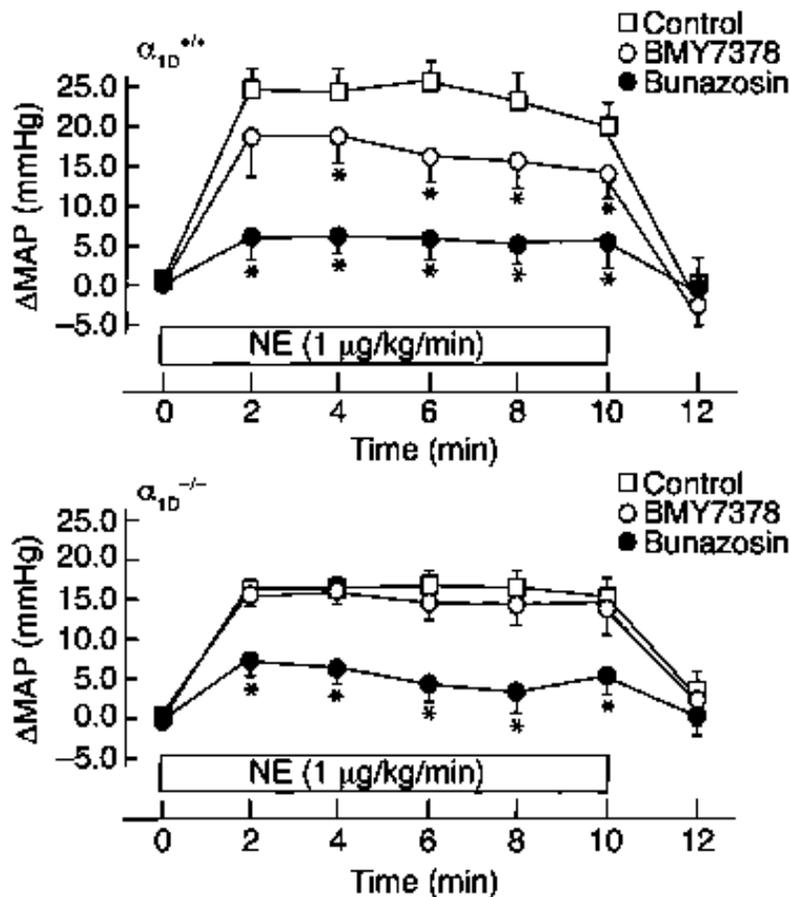


Figura 20.- Efecto del BMY 7378 y bunazosina en el incremento de la presión arterial inducido por noradrenalina en ratón tipo silvestre y Knockout α_{1D} . $n=8$. * $p < 0.05$ comparado contra infusión de noradrenalina (Tomado y modificado de Tanoue *et al.*, 2002).

8.3.- VÍAS TRANSDUCCIONALES EN ESTÍMULO DE LOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS α_1 .

Como se mencionó anteriormente, poco se sabe de las vías transduccionales de los receptores adrenérgicos α_1 , ya que hasta hace unos pocos años se creía que la contracción vascular promovida por estos receptores era única y exclusivamente a través de la vía a la que esta acoplada la proteína $G_{\alpha_{q/11}}$ ($G_{\alpha_{q/11}}$ -PLC-IP3- Ca^{2+}), que involucra el movimiento del ion calcio almacenado en el retículo sarcoplásmico (calcio intracelular) hacia el citoplasma de las células.

Sin embargo, estudios recientes han mostrado que los receptores adrenérgicos α_1 pueden estar acoplados a diferentes proteínas G y por lo tanto promover vías transduccionales con actividad funcional diferente. Experimentos que soportan esta idea entre otros son los realizados por O-Uchi y colaboradores (2008), donde a través de coimmunoprecipitación encuentran que el receptor α_{1B} se encuentra acoplado con la proteína G_0 y el receptor α_{1A} a las proteínas $G_{\alpha_{q/11}}$ y $G_{\alpha_{q/14}}$ (figura 21).

Posteriormente O-Uchi y colaboradores a través de una técnica que permite el estudio del flujo iones (Patch clamp), determinan el flujo del ion calcio extracelular hacia el citoplasma por efecto del estímulo de los receptores adrenérgicos α_{1A} y α_{1B} en presencia de un inhibidor de la formación de IP₃ que es el mensajero que promueve el movimiento de calcio intracelular (figura 21).

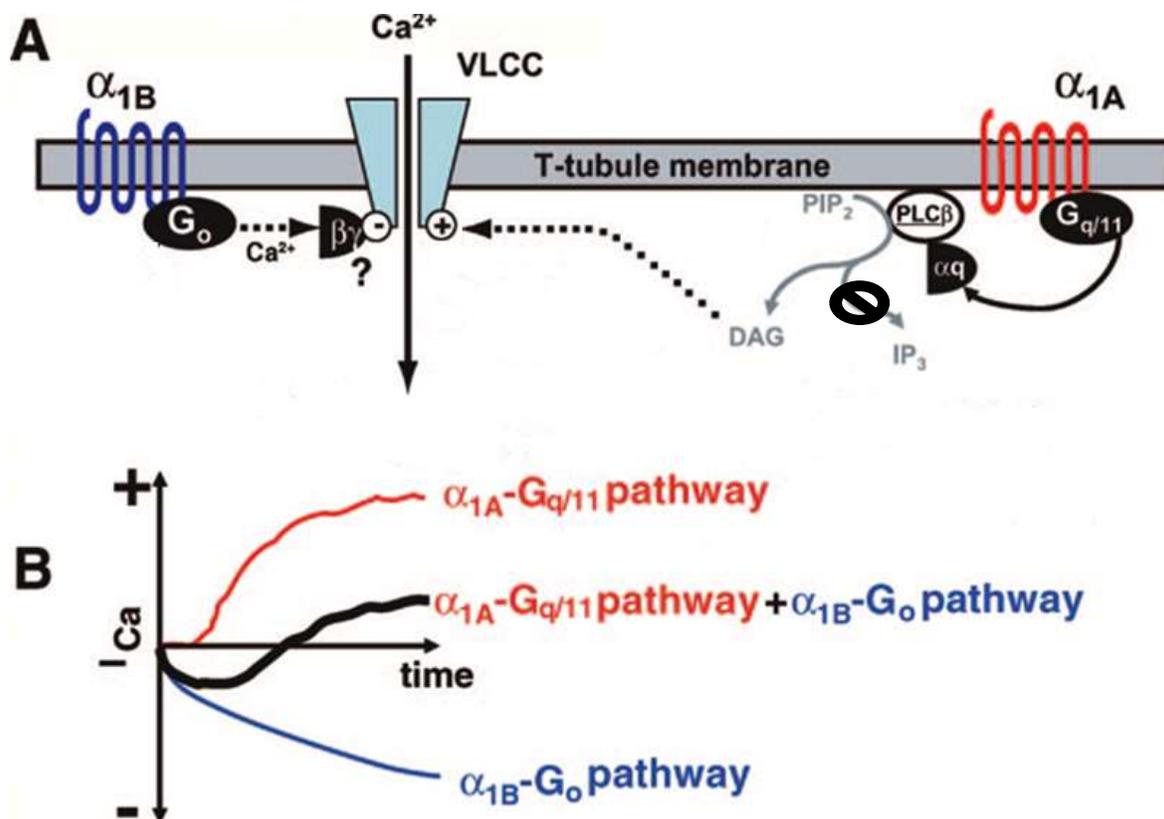


Figura 21.- Posible mecanismo de modulación opuesta entre los receptores adrenérgicos α_1 (tomado y modificado de O-Uchi et al., 2008).

Como se muestra en la figura 21 panel B, el estímulo del receptor adrenérgico α_{1A} promueve un aumento del ion calcio en el citoplasma, mientras que el estímulo del receptor adrenérgico α_{1B} promueve el efecto opuesto. Estos resultados sugieren que los receptores adrenérgicos α_1 no solo promueven el movimiento de calcio intracelular sino que también del calcio extracelular a través de la influencia sobre canales de calcio presentes en la membrana celular. Sin embargo, estos estudios fueron realizados en células de músculo cardiaco donde solo se expresan 2 de los 3 subtipos de receptores α_1 , además de que los receptores de importancia para la contracción cardiaca son los receptores β adrenérgicos.

De esta manera, el presente trabajo se centra en investigar la participación de los diferentes receptores adrenérgicos α_1 y del calcio extracelular en la contracción de las células de músculo liso vascular.

II.- JUSTIFICACIÓN

Debido a que los receptores adrenérgicos α_1 participan en la regulación de la presión arterial se han considerado como blanco terapéutico en la hipertensión.

Sin embargo, el hecho de que múltiples subtipos están presentes en las arterias y que no se cuenta con agonistas y antagonista altamente selectivos para todos los subtipos, se ha dificultado determinar la participación de cada subtipo en la regulación de la contracción del músculo liso vascular y de la presión arterial. Aunado a esto tampoco se han establecido mecanismos de señalización independientes para cada subtipo de receptor adrenérgico α_1

Por lo cual es de gran relevancia realizar estudios con una combinación de herramientas farmacológicas y genéticas que nos ayuden a entender las funciones particulares de cada subtipo de receptor α_1 .

III.- HIPÓTESIS

Los receptores adrenérgicos α_1 median la respuesta contráctil a través del calcio extracelular en el músculo liso vascular.

IV.- OBJETIVOS

1.- OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación de los receptores adrenérgicos α_1 y del calcio extracelular en la contracción del músculo liso vascular.

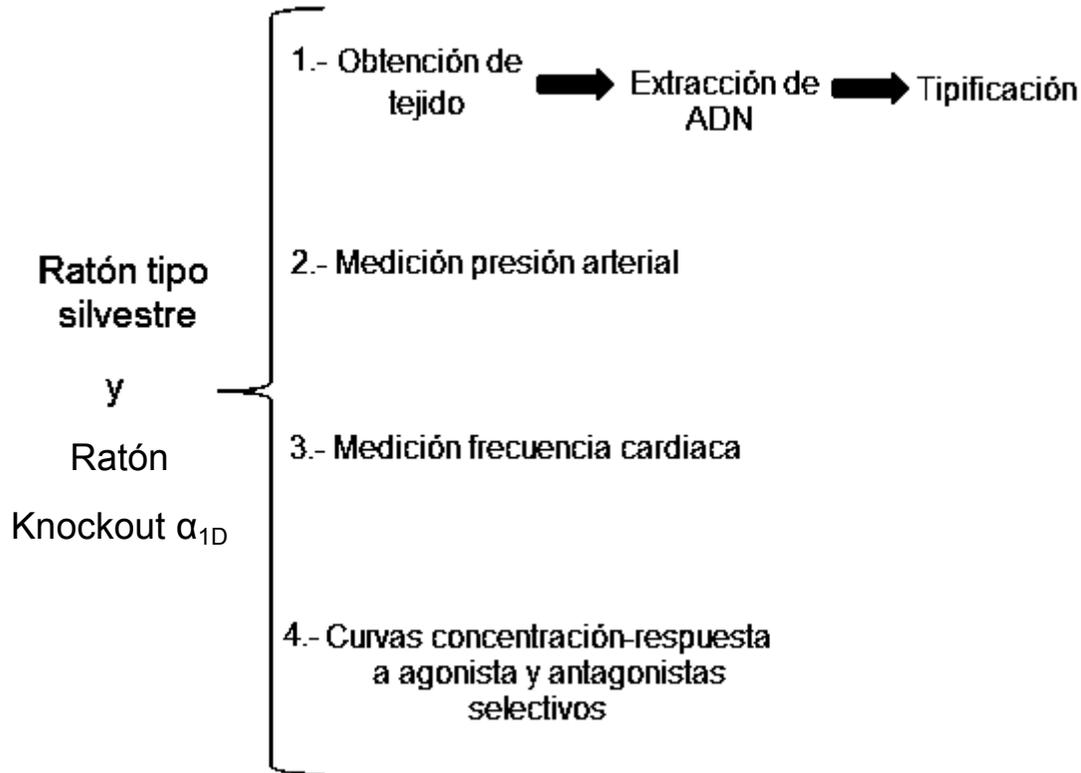
2.- OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar la contribución de los receptores adrenérgicos α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} a la contracción del músculo liso vascular.

Analizar la participación del calcio extracelular en la contracción del músculo liso vascular en respuesta a la estimulación adrenérgica α_1 .

V.- MATERIALES Y MÉTODOS

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



ANIMALES

En este estudio se utilizaron ratones tipo silvestre de la cepa C57/BL6 y ratones knockout α_{1D} de 30 ± 3 g de peso que estuvieron en jaulas con acceso libre a agua y alimento.

1).- TIPIFICACIÓN

a).- PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Bajo condiciones asépticas se obtuvieron 5mm de tejido de la punta de la cola del ratón, se colocó en un tubo estéril y se congeló a -70°C hasta su uso.

b).- EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

Se colocó cada muestra de la cola de ratón en un tubo nuevo estéril al cual se le agrego 1ml de buffer SNET y 20µl de solución de proteinasa K de 20mg/ml. Después se dejó en digestión a 57 °C con agitación durante un periodo de 12 a 16 horas.

Después de la digestión se tomaron 500µl del sobrenadante y se pasaron a un tubo nuevo estéril. Se añadió al tubo 500µl de una mezcla fenol: cloroformo: alcohol isoamilico (25:24:1). La muestra con la mezcla se agitó, en un agitador vortex durante 30 segundos y después se centrifugó durante 15 minutos a 15000 rpm a 4°C. Se tomaron 300 µl de la fase acuosa y se pasaron a un tubo nuevo estéril. A esta muestra se le añadieron 300µl de isopropanol frío, se mezcló por inmersión y se incubo durante 15 minutos en hielo seco.

Posterior a la incubación con hielo seco se centrifugó la muestra durante 15 minutos a 15000 rpm a 4°C. Una vez centrifugada la muestra se retiró el sobrenadante observando no tomar el pellet y se añadió 1ml de etanol al 70% frío. Se mezcló por inmersión y se incubo durante 15 minutos en hielo seco. Después se centrifugó durante 15 minutos a 15000 rpm a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se agregó una vez más 1ml de etanol para un mejor lavado del pellet. Se mezcló por inmersión nuevamente y se centrifugó en las condiciones previamente descritas (Sambrook, 2001).

Se retiro el sobrenadante y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente (10-15 minutos aproximadamente). Una vez seco el pellet se resuspendió en 50µl de agua estéril tratada con DEPC (nota: la cantidad de agua DEPC para la resuspensión depende del tamaño del pellet). Esta muestra de ADN se guardó a -20°C hasta su uso.

c).- CUANTIFICACIÓN DE ADN

Se tomaron 10µl de muestra de ADN y se agregaron 490µl de agua estéril para lograr una dilución 1:50. Esta dilución fue utilizada para realizar la lectura de absorbancia al UV de 260 y 280nm.

La concentración de ADN fue determinada tomando el valor de absorbancia a 260nm con ayuda de la siguiente fórmula:

$$[\text{DNA TOTAL}] = (A_{260\text{nm}}) (50 \mu\text{g/ml}) (\text{factor de dilución})$$

Teniendo en cuenta que 1 densidad óptica a 260nm es igual a 50µg/ml de ácidos nucleicos de doble cadena. Además de que en nuestro caso el factor de dilución es 50.

Por otra parte, el coeficiente de las absorbancias 260/280nm se tomo como parámetro para obtener información acerca de la pureza del ADN de nuestras muestras.

Parámetros:

Coeficiente absorbancia 260/280nm = 1.7 a 2.0 (ADN de buena calidad)

Coeficiente absorbancia 260/280nm menor a 1.7 (Contaminación con proteínas)

Coeficiente absorbancia 260/280nm mayor a 2.0 (Posible contaminación con RNA).

d).- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Se realizó una PCR de punto final para amplificar el fragmento del gen correspondiente al receptor α_{1D} tipo silvestre y el gen α_{1D} mutante. La longitud del fragmento de amplificación para el tipo silvestre es de alrededor de 280pb y de 600pb para el knockout α_{1D} .

Las secuencias de los oligonucleótidos usados son los siguientes:

α_{1D} Sentido

5'- CGC TGT GGT GGG AAC CGG CAG CGG -3'

α_{1D} Antisentido

5'- ACA CAG CTG CAC TCA GTA GCA GGT CA -3'

NEO Sentido

5'- CCT ACA TTT TGA ATG GAA GGA TTG -3'

Los oligonucleótidos fueron obtenidos de forma liofilizada y fueron rehidratados en buffer TE estéril. Se utilizó un volumen de buffer TE adecuado para llevar los oligos a un concentración final de 5 μ M.

Las mezclas de reacción son las siguientes:

Mezcla de reacción para el alelo α_{1D} tipo silvestre

Mezcla "A"

COMPONENTE	VOLUMEN
10X PCR buffer free of Mg	2.5 μ l
dNTP mixture (10 μ M stock)	2 μ l
ClMg (25 μ M stock)	1.25 μ l
Oligo α_{1D} Forward (5 μ M stock)	2 μ l
Oligo α_{1D} Reverse (5 μ M stock)	2 μ l
Taq Polymerase (5 unidades por 1 μ l)	0.3 μ l
Agua DEPC	13.95 μ l
Muestra de ADN (100ng/ μ l)	1 μ l
Volumen total	25 μ l

Mezcla de reacción para el alelo α_{1D} mutante

Mezcla "B"

COMPONENTE	VOLUMEN
10X PCR buffer free of Mg	2.5 μ l
dNTP mixture (10 μ M stock)	2 μ l
ClMg (25 μ M stock)	1.25 μ l
NEO Forward (5 μ M stock)	2 μ l
Oligo α_{1D} Reverse (5 μ M stock)	2 μ l
Taq Polymerase (5 unidades por 1 μ l)	0.3 μ l
Agua DEPC	13.95 μ l
Muestra de ADN (100ng/ μ l)	1 μ l
Volumen total	25 μ l

El programa de PCR fue el siguiente:

(1) 95°C ----- 4 minutos

(2) 94°C ----- 30 segundos

55°C ----- 30 segundos

72°C ----- 2 minutos

(30 ciclos)

(3) 72°C -----10 minutos

4°C -----10 minutos

Los productos de PCR fueron conservados a 4°C hasta su posterior uso.

e).- ELECTROFORESIS

Se realizó la técnica de electroforesis en gel de agarosa para la separación y visualización de los fragmentos amplificados en la PCR correspondientes al alelo α_{1D} tipo silvestre y el alelo α_{1D} mutante.

Los agentes utilizados para la electroforesis fueron los siguientes:

- Gel de agarosa al 1.5%.
- Buffer de corrida TAE 1X.
- Bromuro de etidio (agente intercalante).
- Buffer de carga (glicerol y azul de bromo-fenol)
- Escalera de pesos moleculares de 100pb

Una vez finalizada la electroforesis se procedió a exponer el gel a la luz ultravioleta durante 10 segundos y con un fotodocumentador se tomo la imagen del gel.

2 y 3.- MEDICIÓN PRESIÓN ARTERIAL Y FRECUENCIA CARDIACA

Se midió la presión arterial y la frecuencia cardiaca a todos los ratones de ambas cepas (C57/BL6 y knockout α_{1D}) utilizados para los experimentos *in vitro*. Cada ratón fue entrenado durante 3 días con sesiones de 4-6 horas con la finalidad de que este se acostumbre al manejo y trato. Las mediciones se realizaron siempre a la misma hora del día, en un cuarto libre de ruido y a una temperatura controlada de 27°C. Además previo a la medición cada ratón fue colocado en una jaula provista con un sistema de calefacción de 35-37°C con la finalidad de dilatar la arteria caudal del ratón y obtener una mejor sensibilidad para la medición de ambos parámetros.

El sistema de registro (LE 5007 Automatic Blood Pressure, LSI LETICA, Scientific Instruments, Pan Lab, España) consta de un sensor de movimiento que capta el latido cardiaco y un maguillo de látex inflable (figura 22) en donde se coloca la cola del ratón. El esfigmomanómetro conectado al maguillo suministra

la presión necesaria para que se infle rápidamente, obstruya la arteria caudal y posteriormente se desinfe de manera gradual y constante. Las señales provenientes del sensor y del esfigmomanómetro son captadas y graficadas simultáneamente por una computadora (figura 23) (Ruiz E. 2006).

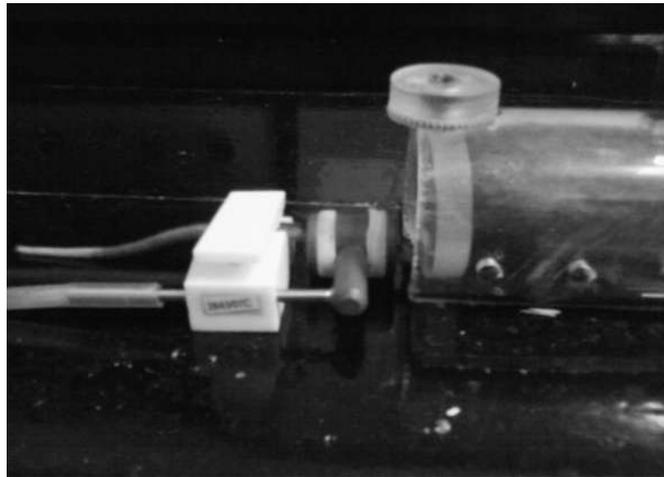


Figura 22.- Transductor de presión y manguillo de látex en la arteria caudal de la cola del ratón.

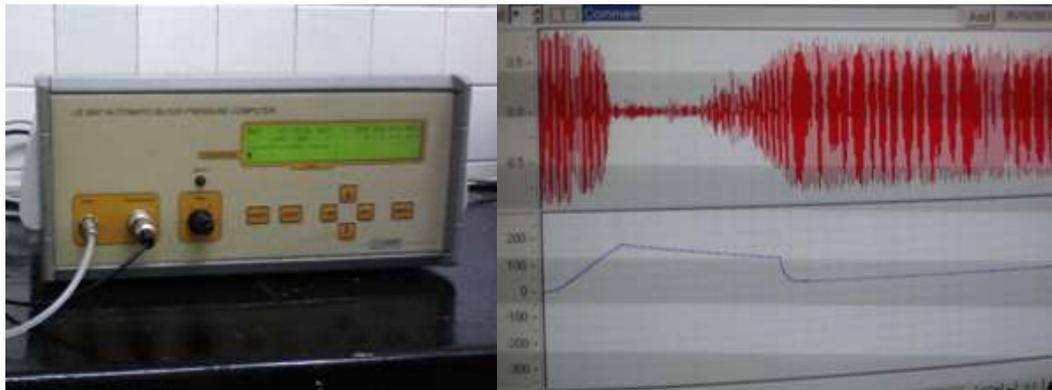


Figura 23.- Sistema de adquisición de datos, registro del latido cardiaco y presión arterial.

4).- EXPERIMENTOS *IN VITRO*

a).- PREPARACIÓN DEL TEJIDO

Los ratones de ambas cepas se sacrificaron y mediante una incisión abdominal se procedió a la exposición de la arteria aorta de la porción torácica. La arteria se disecó y se limpió de tejido graso. Posteriormente, la arteria se cortó en anillos de 4-6mm de longitud. Adicionalmente se procedió a la remoción del endotelio de los anillos frotando suavemente la superficie interna de la aorta con un dispositivo metálico rugoso.

Una vez obtenidos los anillos aórticos estos se introdujeron en cámaras para órgano aislado que contenían 10 ml de solución de Krebs-Henseleit con la siguiente composición (mM): NaCl, 11.8; KCl, 4.7; KH₂PO₄, 1.2; MgSO₄. 7H₂O, 1.2; CaCl₂.2H₂O, 2.5; NaHCO₃, 25.0; dextrosa, 5.8; EDTA, 0.026.

Las cámaras para órgano aislado se mantuvieron a 37°C, pH 7.4 y con burbujeo constante con una mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂. Cada anillo arterial se montó en dos ganchos de nikrom; con uno de estos ganchos se fijó la preparación al fondo de la cámara y con el otro gancho se fijó a un transductor de tensión (Grass FT03 force displacement transducer; Astro-Med, Inc. West Warwick, RI, USA), que estaba conectado a un sistema de adquisición de datos (MP100; Biopac Systems Inc. Santa Barbara, CA, USA), para registrar cambios en la tensión isométrica desarrollados por los anillos arteriales (Godínez, 2002, Godínez, 2005, Estrada, 2010).

Una vez montados los anillos se les dio una tensión pasiva inicial de 1.5g y se dejaron estabilizar por un lapso de 30 minutos. Después se sensibilizaron los anillos 2 veces a intervalos de 30 minutos con una concentración submáxima del agente contráctil fenilefrina (1×10^{-7} M). Lo anterior permitió contraer los anillos arteriales y descartar aquellos que pudieron sufrir algún daño mecánico durante el procedimiento de extracción y limpieza del tejido.



Figura 24.- Cámara para órgano aislado. En esta imagen se muestra un anillo de aorta sostenido con dos ganchos de nikrom; con uno de estos ganchos se fijó la preparación al fondo de la cámara y con el otro gancho se fijó a un transductor de tensión.

Adicionalmente, en la última sensibilización se corroboró la ausencia de endotelio, esto al no observar relajación de las arterias durante la exposición al agente vaso relajante carbacol (1×10^{-6} M). Posteriormente, se expuso el tejido a una solución con alto contenido de cloruro de potasio (Krebs-Henseleit KCl 80mM), esto con la finalidad de contraer la aorta en su totalidad y tomar este parámetro como referencia para presentar los resultados en porcentaje de contracción.

Por otra parte, todo el protocolo experimental se hizo bajo la presencia de yohimbina ($1 \times 10^{-6} \text{M}$) y propanolol ($1 \times 10^{-6} \text{M}$) que son antagonistas de los receptores α_2 y β adrenérgicos, respectivamente.

b).- OBTENCIÓN DE CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA

Una vez que el tejido fue preparado con toda la metodología anteriormente descrita, se procedió a la construcción de las curvas concentración-respuesta bajo las condiciones que a continuación se describen:

Primer bloque

Número de grupo	Condiciones
1	Tipo silvestre + Fenilefrina
2	Knockout α_{1D} + Fenilefrina
3	Tipo silvestre + Oximetazolina
4	Knockout α_{1D} + Oximetazolina

Segundo bloque

5	Tipo silvestre + Fenilefrina (control)
6	Tipo silvestre + Fenilefrina/CEC $0.316 \mu\text{M}$
7	Tipo silvestre + Fenilefrina/CEC $1 \mu\text{M}$
8	Knockout α_{1D} + Fenilefrina (control)
9	Knockout α_{1D} + Fenilefrina/CEC $0.316 \mu\text{M}$
10	Knockout α_{1D} + Fenilefrina/CEC $1 \mu\text{M}$

Tercer bloque

11	Tipo silvestre + Oximetazolina (control)
12	Tipo silvestre + Oximetazolina/CEC $1 \mu\text{M}$

13	Tipo silvestre + Oximetazolina/CEC 3.16 μM
14	Knockout α_{1D} + Oximetazolina (control)
15	Knockout α_{1D} + Oximetazolina/CEC 1 μM
16	Knockout α_{1D} + Oximetazolina/CEC 3.16 μM

Cuarto bloque

17	Tipo silvestre + Fenilefrina (control)
18	Tipo silvestre + Fenilefrina/Verapamil 1 μM
19	Knockout α_{1D} + Fenilefrina (control)
20	Knockout α_{1D} + Fenilefrina/Verapamil 1 μM

Quinto bloque

21	Tipo silvestre + Oximetazolina (control)
22	Tipo silvestre + Oximetazolina/Verapamil 1 μM
23	Knockout α_{1D} + Oximetazolina (control)
24	Knockout α_{1D} + Oximetazolina/Verapamil 1 μM

Sexto bloque

21	Tipo silvestre + Fenilefrina (control)
22	Tipo silvestre + Fenilefrina/CEC y Verapamil 1 μM
23	Knockout α_{1D} + Fenilefrina (control)
24	Knockout α_{1D} + Fenilefrina/CEC y Verapamil 1 μM

Las curvas concentración-respuesta a fenilefrina y oximetazolina se obtuvieron mediante la adición de concentraciones crecientes de los 2 agentes. Estas concentraciones tienen una relación de incremento de $\frac{1}{4}$ de logaritmo. La concentración inicial fue 1nM (1×10^{-9} M) y la final 0.1mM (1×10^{-4} M).

El agente cloretoilclonidina fue agregado a la preparación y se dejó en contacto con el tejido durante un periodo de 45 minutos, al término de este periodo se lavó el tejido con solución Krebs-Henseleit y se procedió a realizar la curva concentración-respuesta. Para el agente bloqueador verapamil también se incubó en la preparación durante 45 minutos, sin embargo, al término de este periodo la curva se realizó en presencia de este agente.

5.- REACTIVOS Y SOLUCIONES

Se utilizó agua bidestilada de la marca Argento Pura.

Reactivos para tipificación:

Proteinasa K de la marca Amresco. Isopropanol, etanol, mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamilico (25:24:1), TRIS-HCl pH 8.0, Dodecilsulfato sódico (SDS) y Dietilpirocarbonato (DEPC) de la marca Sigma-Aldrich.

Los oligos fueron secuenciados por la empresa Integrated DNA Technologies (IDT).

Kit Taq Polimerasa 500u de la marca Axygen

Agarosa de la marca Gibco BRL, Life Technologies.

Buffer TAE, Bromuro de etidio, glicerol, azul de bromo-fenol, escalera de pesos moleculares de 100pb de la marca Amresco.

Composición buffer SNET:

Sustancia	Concentración
TRIS-HCl pH 8.0	20mM
EDTA	5mM
NaCl	400mM
SDS	1% (w/v)

Composición buffer TE:

Sustancia	Concentración
TRIS-HCl pH 8.0	10mM
EDTA	1mM

Fármacos y reactivos para experimentos in vitro:

Clorhidrato de fenilefrina, clorhidrato de propanolol, cloruro de carbamilcolina (carbacol), oximetazolina, yohimbina, cloroetilclonidina y verapamil se adquirieron de la marca Sigma-Aldrich. Las soluciones de estos fármacos fueron hechas en agua bidestilada.

NaCl, KCl, KH_2PO_4 cristal, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ fueron adquiridos de la marca J.T Baker. Dextrosa, NaHCO_3 y EDTA fueron de la marca Reproquifin.

Composición solución Krebs-Henseleit:

Sustancia	Cantidad (g) para 1L.
Dextrosa	2.1
NaHCO_3	2.1
KCl	0.35
MgSO_4	0.29
NaCl	6.9
KH_2PO_4	0.16
$\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.37
EDTA	0.01

Composición solución Krebs-Henseleit con alto contenido de KCl:

Sustancia	Cantidad (g) para 1L.
Dextrosa	2.1
NaHCO ₃	2.1
KCl	5.97
MgSO ₄	0.29
NaCl	2.5
KH ₂ PO ₄	0.16
CaCl ₂ 7H ₂ O	0.37
EDTA	0.01

La mezcla 95% O₂ y 5% CO₂ fue de la marca Infra.

6).- ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los resultados de presión arterial y frecuencia cardiaca se agruparon por cepa de ratón y se graficó el promedio \pm el error estándar utilizando el programa Sigma Plot, versión 11.0. Para determinar diferencias estadísticas entre grupos se realizó la prueba t-student, siendo estadísticamente diferentes cuando el valor de “p” fue menor a 0.05.

Los resultados de las diferentes condiciones para los experimentos *in vitro* se agruparon y se graficó el promedio \pm el error estándar utilizando el programa Sigma Plot versión 11.0. Para la comparación estadística se realizó un análisis de varianza de 2 vías, prueba Tukey, siendo estadísticamente diferentes cuando el valor de “p” fue menor a 0.05.

VI.- VALIDACIÓN DEL MODELO

TIPIFICACIÓN

Una vez realizada la extracción de ADN se realizó la amplificación (PCR) de los fragmentos correspondientes para el gen del receptor α_{1D} y el gen mutado con ayuda de oligonucleótidos específicos para cada región (figura 25).

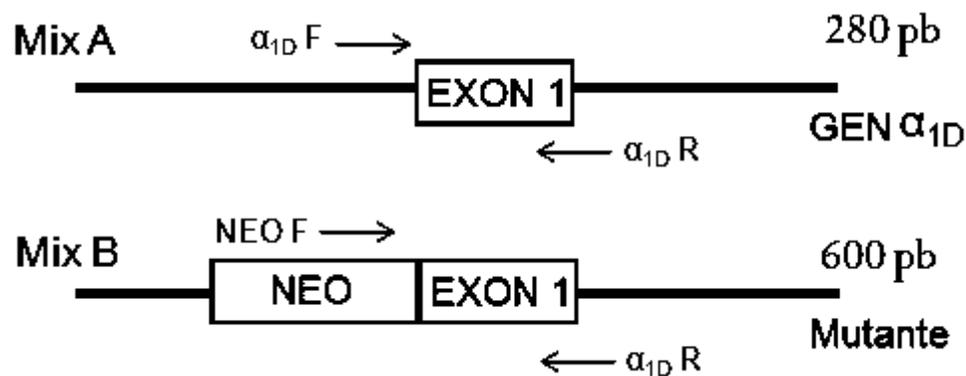


Figura 25.- Mapa de amplificación de los fragmentos correspondientes para el gen del receptor α_{1D} y el gen mutado (inserción de un casete de Neomicina). Los oligos sentido ($\alpha_{1D} F$) y anti sentido α_{1D} ($\alpha_{1D} R$) (Mix A) promueven la amplificación de un fragmento de 280pb y los oligos sentido Neo y anti sentido α_{1D} (Mix B) promueven la amplificación de un fragmento de 600pb (Tomado y modificado de Tanoue *et al.*, 2002).

Posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa a los fragmentos de amplificación obtenidos. Como se observa en la figura 26, cuando se utilizó muestra correspondiente de ratón tipo silvestre en combinación con el Mix A se obtuvo un fragmento de alrededor de 280pb. Por otra parte, cuando se utilizó muestra correspondiente de ratón Knockout α_{1D} en combinación con el Mix A, no se observó amplificación, por el contrario, al utilizar el Mix B se obtuvo una banda de amplificación de alrededor de 600pb. Estos resultados comprueban la presencia de la mutación en los ratones designados como knockout α_{1D} .

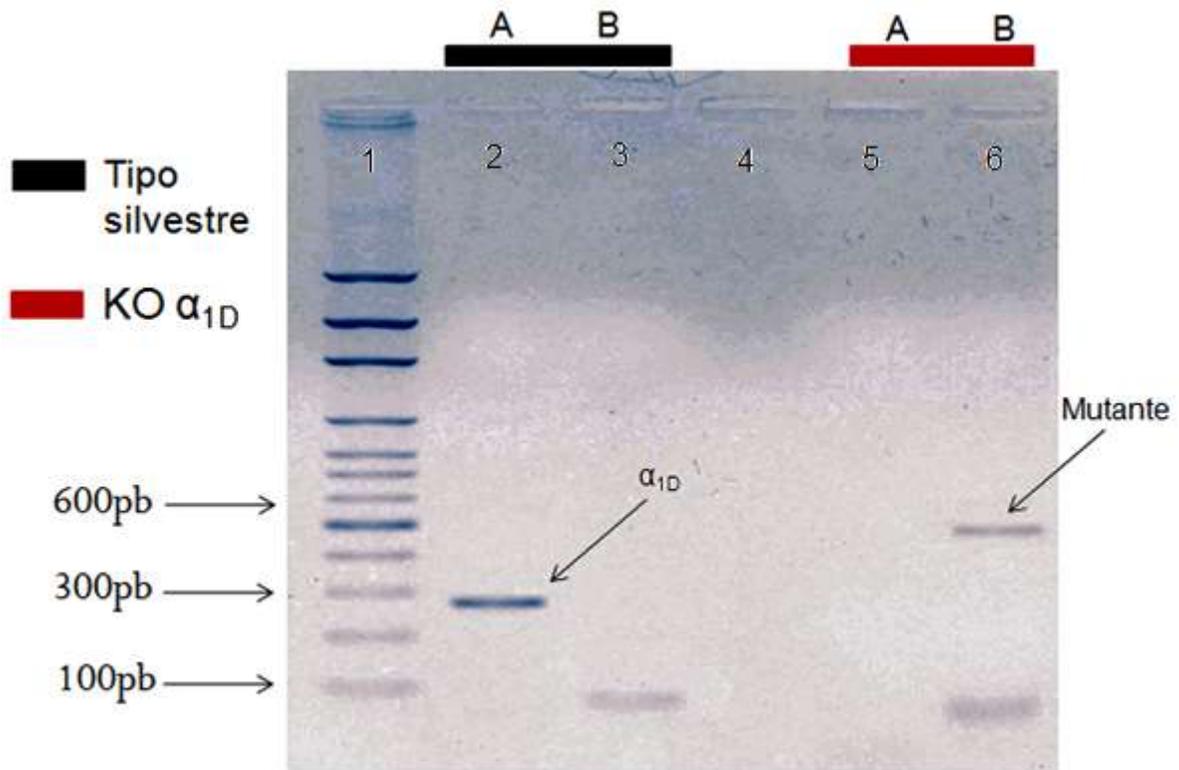


Figura 26.- Electroforesis en gel de agarosa para los fragmentos de amplificación correspondientes para el gen del receptor α_{1D} y el gen mutado. Imagen en negativo. Carril 1.- Marcador de tamaño molecular. Carril 2.- Muestra de ratón tipo silvestre con Mix A. Carril 3.- Muestra de ratón tipo silvestre con Mix B. Carril 5.- Muestra de ratón Knockout α_{1D} con Mix A. Carril 6.- Muestra de ratón Knockout α_{1D} con Mix B.

VII.- RESULTADOS

1.- PRESIÓN ARTERIAL

Se midió la presión arterial sistólica y diastólica a los ratones tipo silvestre (cepa C57BL6) y knockout α_{1D} , al analizar los datos se observó que los ratones knockout α_{1D} presentaron valores menores estadísticamente significativos de ambas presiones (97 mmHg sístole y 76 mmHg de diástole) comparados con los valores de presión arterial de los ratones tipo silvestre (125 mmHg sístole y 95 mmHg diástole) (figura 27).

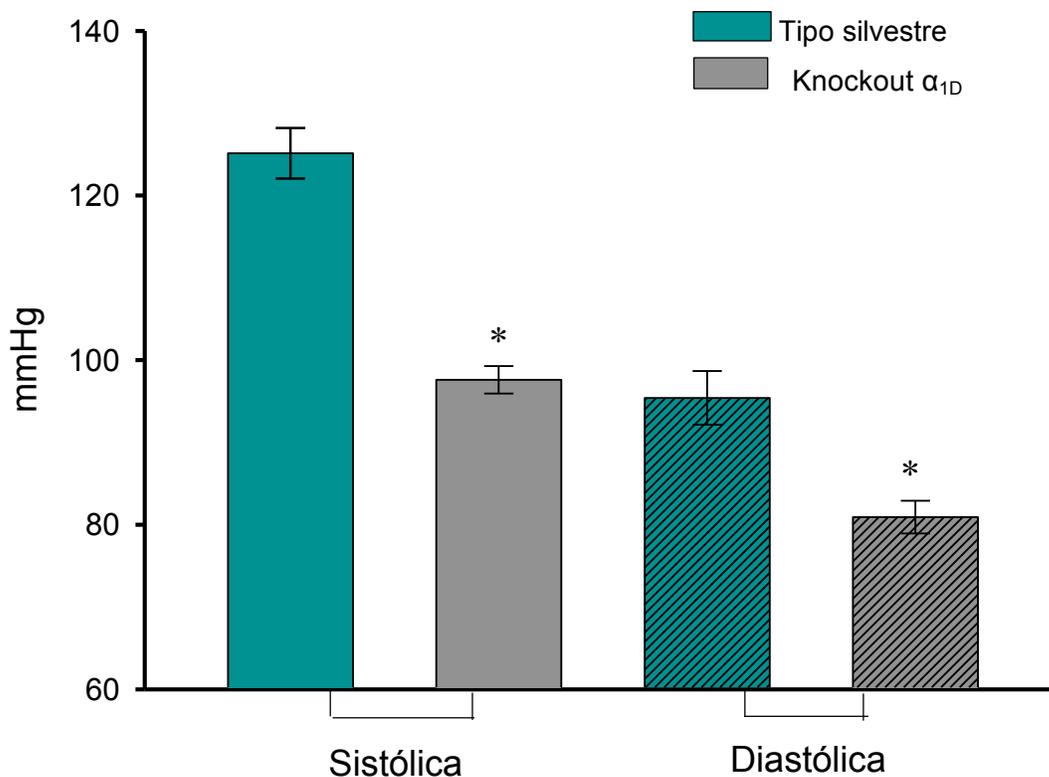


Figura 27.- Participación del receptor α_{1D} sobre la presión arterial. Presión arterial sistólica y diastólica de ratones tipo silvestre y knockout α_{1D} . Las barras representan el promedio \pm el error estándar de 34 ratones tipo silvestre y 34 knockout α_{1D} . * $p < 0.01$ vs tipo silvestre, t-student.

2.- FRECUENCIA CARDIACA

Un parámetro aunado a la medición de la presión arterial es la frecuencia cardiaca. Al analizar el número de latidos por minuto de ambas cepas de ratones se encontró una disminución del 12% en los ratones knockout α_{1D} en comparación con los ratones tipo silvestre (604 latidos/minuto para el tipo silvestre y 535 latidos/minuto para el Knockout α_{1D}) (figura 28).

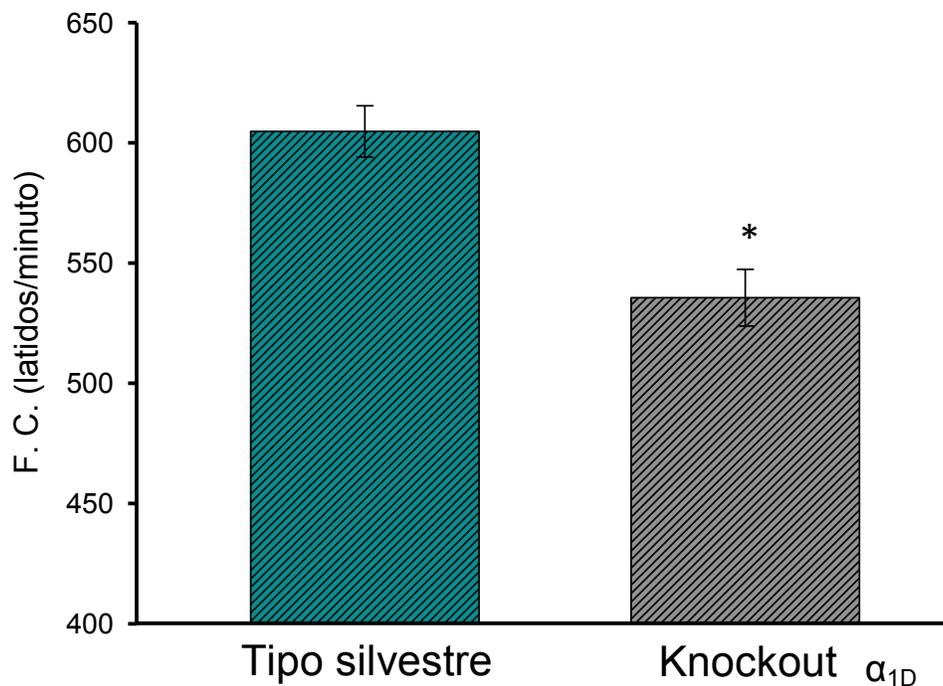


Figura 28.- Influencia del receptor α_{1D} sobre la frecuencia cardiaca. Las barras representan el promedio \pm el error estándar de 34 ratones tipo silvestre y 38 knockout α_{1D} . * $p < 0.01$ vs tipo silvestre, t-student.

3.- EXPERIMENTOS IN VITRO

3.1.- CONTRACCIÓN AL CLORURO DE POTASIO

Una vez montada la preparación de órgano aislado con la metodología antes descrita (revisar materiales y métodos), los anillos aórticos de ambas cepas de ratones fueron inducidos a una contracción denominada independiente de

receptor, ya que esta contracción se promueve con una solución con alto contenido de potasio (Krebs-Henseleit KCl 80mM).

Como se muestra en la figura 29, los anillos aórticos de ambas cepas de ratón tuvieron una contracción de alrededor de 1 gramo. Al no haber diferencias en la maquinaria contráctil vascular de ambos ratones, esta contracción se tomó como parámetro de referencia (100% de la capacidad contráctil) para normalizar los resultados en porcentaje de contracción.

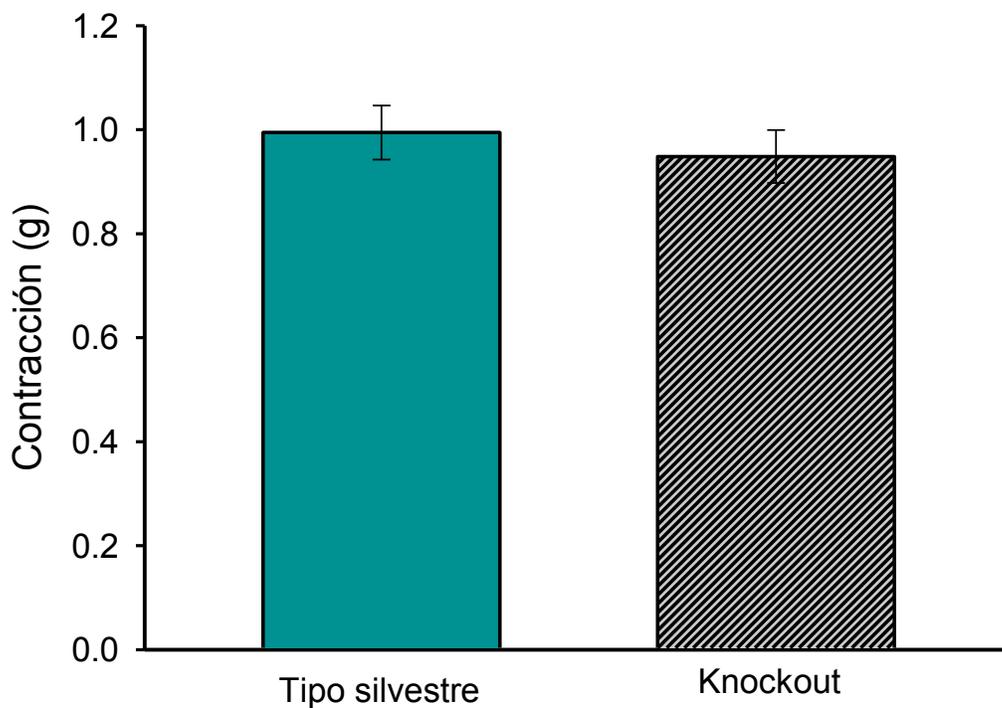


Figura 29.- Contracción independiente de receptor (contracción a KCl 80mM). Las barras representan el promedio \pm el error estándar de 34 ratones tipo silvestre y 38 knockout α_{1D} .

3.2.- CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA

Una vez que se corroboró que la maquinaria contráctil vascular en ambas cepas de ratones se encuentra presente y funcional se procedió a analizar la participación de los diferentes subtipos de receptores adrenérgicos α_1 en la contracción del músculo liso vascular.

Lo primero que se realizó fueron las curvas concentración-respuesta a los agonistas fenilefrina (agonista no selectivo α_1) y oximetazolina (agonista selectivo α_{1A}) en los anillos aórticos de ratón tipo silvestre y knockout α_{1D} . Como se muestra en la figura 30 A, se observó una disminución en el efecto máximo contráctil y un desplazamiento de la curva a la derecha en respuesta a la fenilefrina en la aorta de ratón knockout α_{1D} comparado con la aorta de ratón tipo silvestre. Por el contrario, en la figura 30 B, se observó un aumento de la contracción en respuesta a la oximetazolina en la aorta de ratón knockout α_{1D} con respecto a la aorta de ratón tipo silvestre.

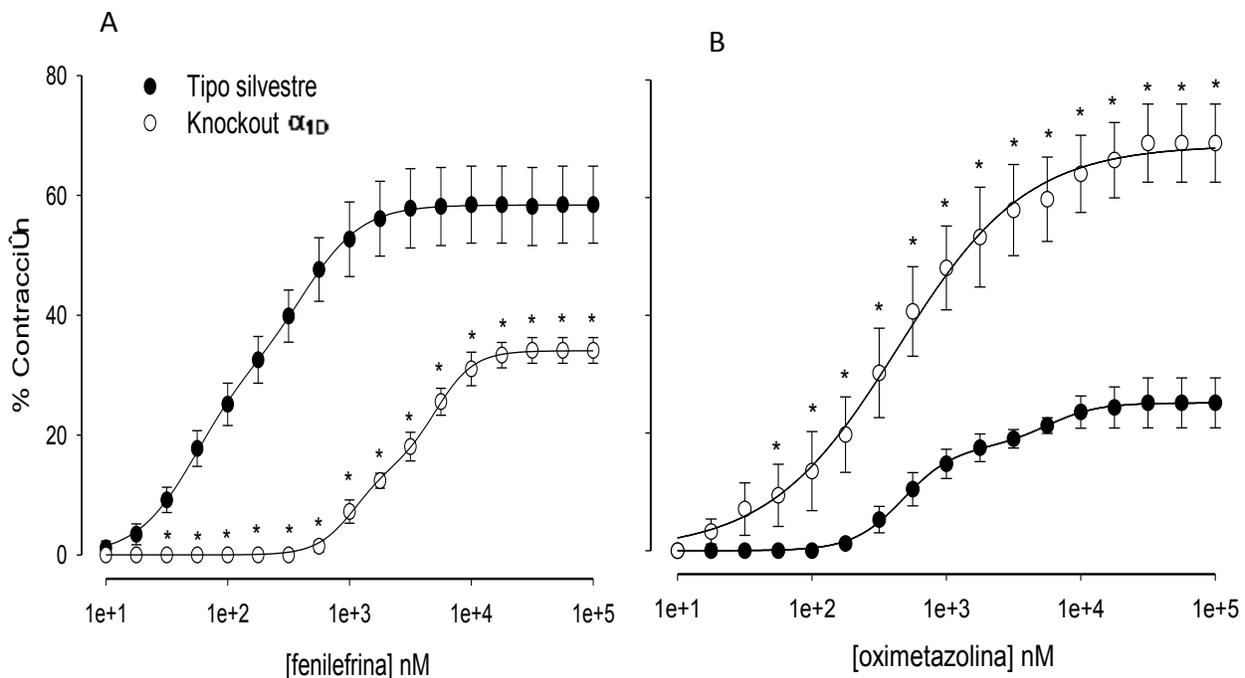


Figura 30.- Contracción dependiente del agonista. Curvas concentración-respuesta a fenilefrina (A) y oximetazolina (B) en anillos aórticos de ratón tipo silvestre (círculos negros) y ratón knockout α_{1D} (círculos abiertos). Cada punto representa el promedio \pm el error estándar de 6-8 experimentos. * $p < 0.05$ knockout α_{1D} vs Tipo silvestre, Tukey.

Continuando con los experimentos encaminados al estudio de la participación de los diferentes subtipos de receptores adrenérgicos α_1 en la contracción del músculo liso vascular están los resultados de las curvas concentración-respuesta a los agonistas fenilefrina y oximetazolina en presencia y ausencia del antagonista irreversible CEC en aorta de ambas cepas de ratones.

En la figura 31, panel A, se observa que la CEC en las dos concentraciones usadas logra una disminución del efecto máximo así como un desplazamiento de la curva a la derecha en la aorta de ratón tipo silvestre. En la figura 31, panel B se muestra que la CEC logra aun que de manera más discreta una disminución significativa del efecto máximo y esto solo en la concentración de $1\mu\text{M}$ de CEC.

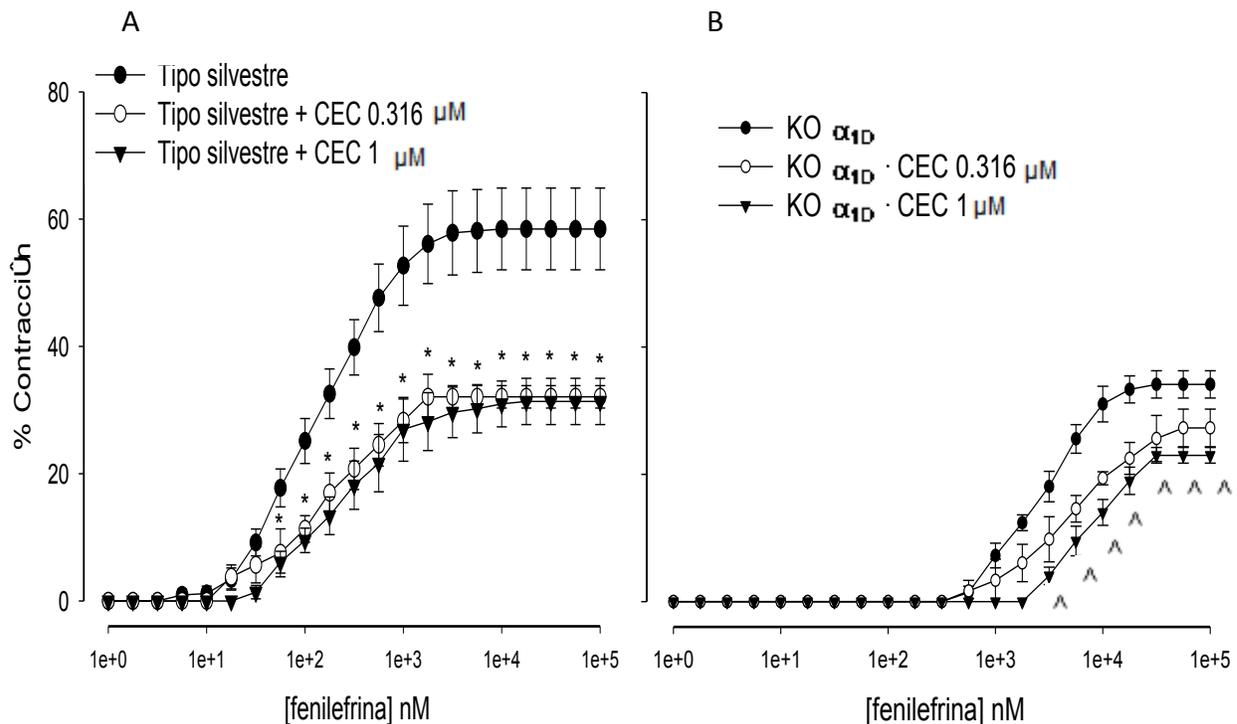


Figura 31.- Efecto de la CEC sobre la respuesta contráctil a fenilefrina. Cada punto representa el promedio \pm el error estándar de 6-8 experimentos. * $p < 0.05$ Tipo silvestre vs Tipo silvestre + CEC 0.316 y $1\mu\text{M}$. ^ $p < 0.05$ Knockout α_{1D} vs Knockout α_{1D} + CEC 0.316 y $1\mu\text{M}$. Tukey.

Continuando con esta serie de experimentos, en la figura 32 se observa el efecto de la CEC sobre la respuesta contráctil promovida por oximetazolina. Los

resultados mostraron que la CEC no tiene efecto sobre la respuesta contráctil promovida por oximetazolina, puesto que no se observan cambios en los dos tratamientos con CEC comparados con el control en los anillos aórticos de ambas cepas de ratones.

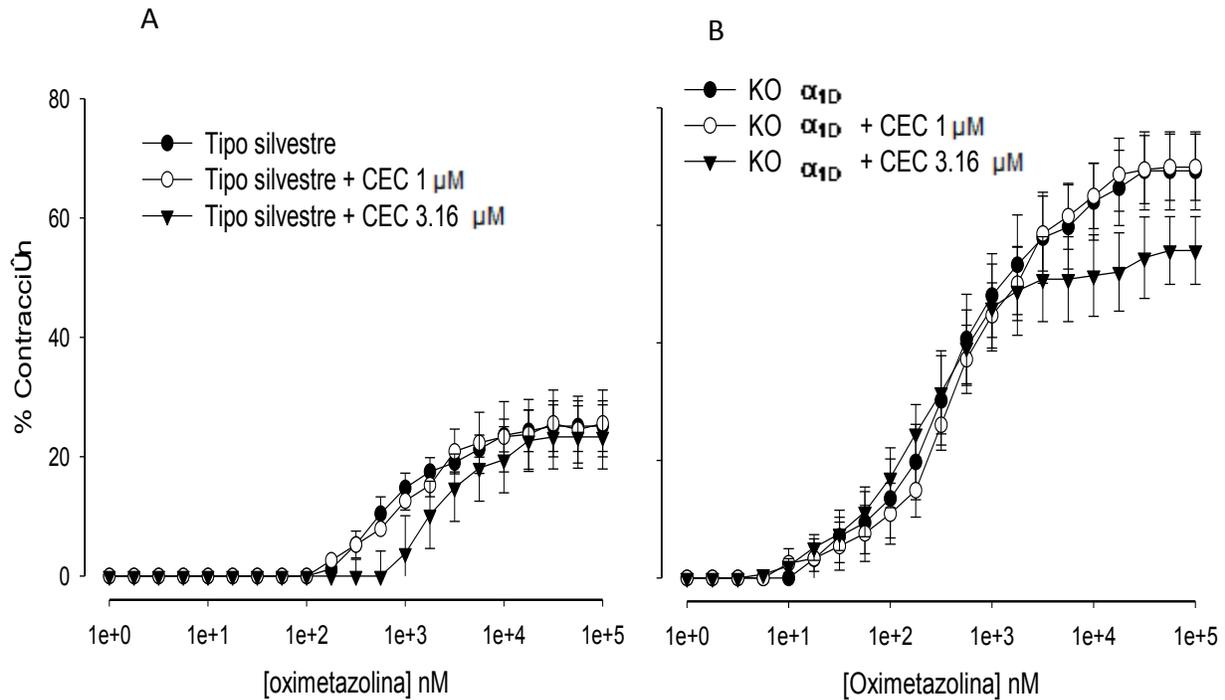


Figura 32.- Efecto de la CEC sobre la respuesta contráctil a oximetazolina. Cada punto representa el promedio \pm el error estándar de 6-8 experimentos.

Los siguientes experimentos *in vitro* realizados fueron aquellos encaminados en el estudio del papel del calcio extracelular en la contracción del músculo liso vascular. Para ello primeramente se realizaron curvas concentración-respuesta a los agonista fenilefrina y oximetazolina en presencia y ausencia del bloqueador de canales de calcio verapamil.

Como se muestra en la figura 33, el tratamiento con verapamil logra una disminución discreta pero significativa del efecto máximo contráctil y un desplazamiento de la curva a la derecha en los anillos aórticos de ambas cepas de ratones.

En la figura 34 se muestra el efecto del verapamil sobre la respuesta contráctil a oximetazolina en los anillos aórticos de ambas cepas de ratones. Como se muestra en dicha figura la respuesta de contracción promovida por la oximetazolina se ve seriamente afectada por el verapamil ya en los anillos de aorta de ratón tipo silvestre el efecto máximo disminuye en más de un 60%, y en el caso de la aorta de ratón knockout α_{1D} se abate la respuesta por completo.

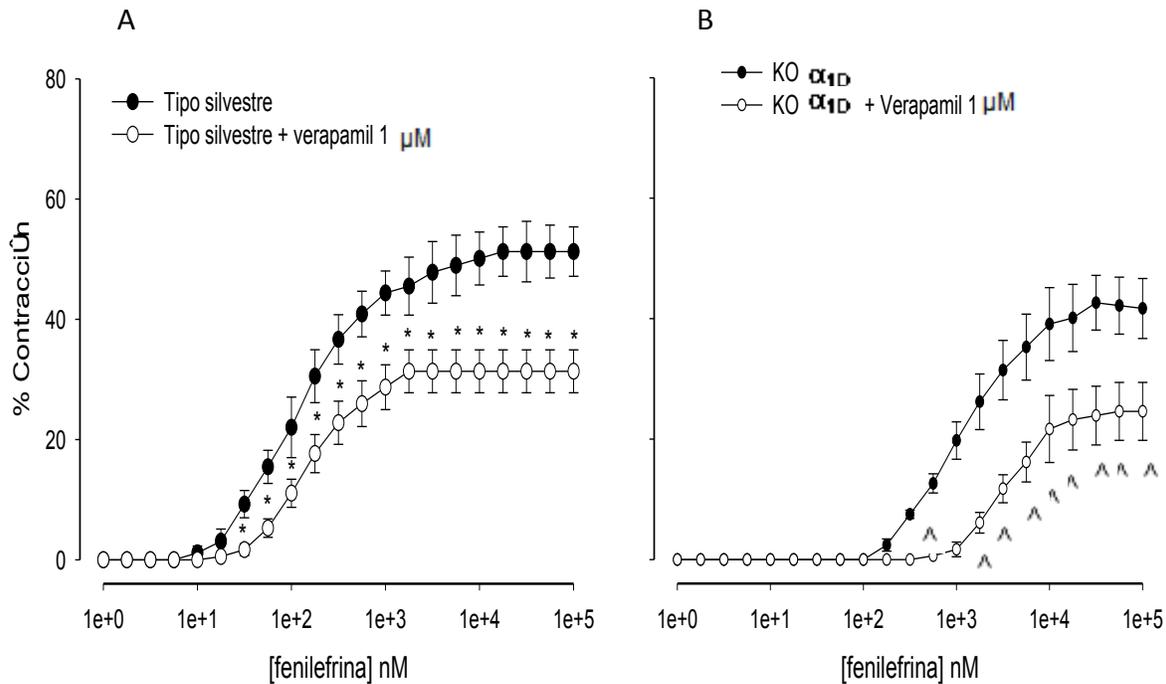


Figura 33.- Participación del calcio extracelular en la contracción del músculo liso vascular. Cada punto representa el promedio \pm el error estándar de 6-8 experimentos. * $p < 0.05$ Tipo silvestre vs Tipo silvestre + verapamil 1 μM . $\wedge p < 0.05$ knockout α_{1D} vs. knockout α_{1D} + verapamil 1 μM . Tukey.

Por último, se realizaron curvas concentración respuesta a la fenilefrina en presencia y ausencia de la combinación de los agentes CEC y verapamil (figura 35). Los resultados mostraron que la combinación CEC + verapamil logra abolir la respuesta contráctil remanente observada cuando solo se antagoniza con la CEC en respuesta a la fenilefrina en los anillos aórtico de ambas cepas de ratones.

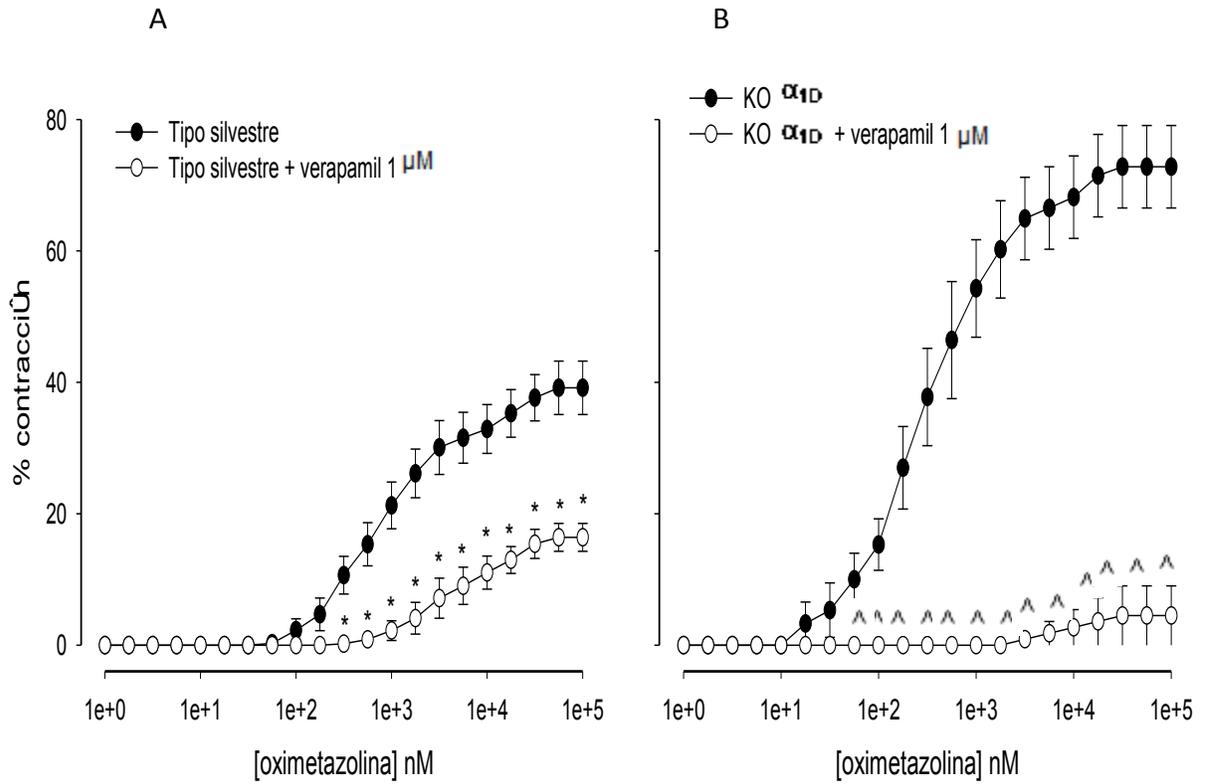


Figura 34.- Participación del calcio extracelular en estímulo del receptor adrenérgico α_{1A} . Cada punto representa el promedio \pm el error estándar de 6-8 experimentos. * $p < 0.05$ Tipo silvestre + verapamil 1 μ M vs tipo silvestre control. ^ $p < 0.05$ knockout α_{1D} + verapamil 1 μ M vs. knockout α_{1D} control. Tukey.

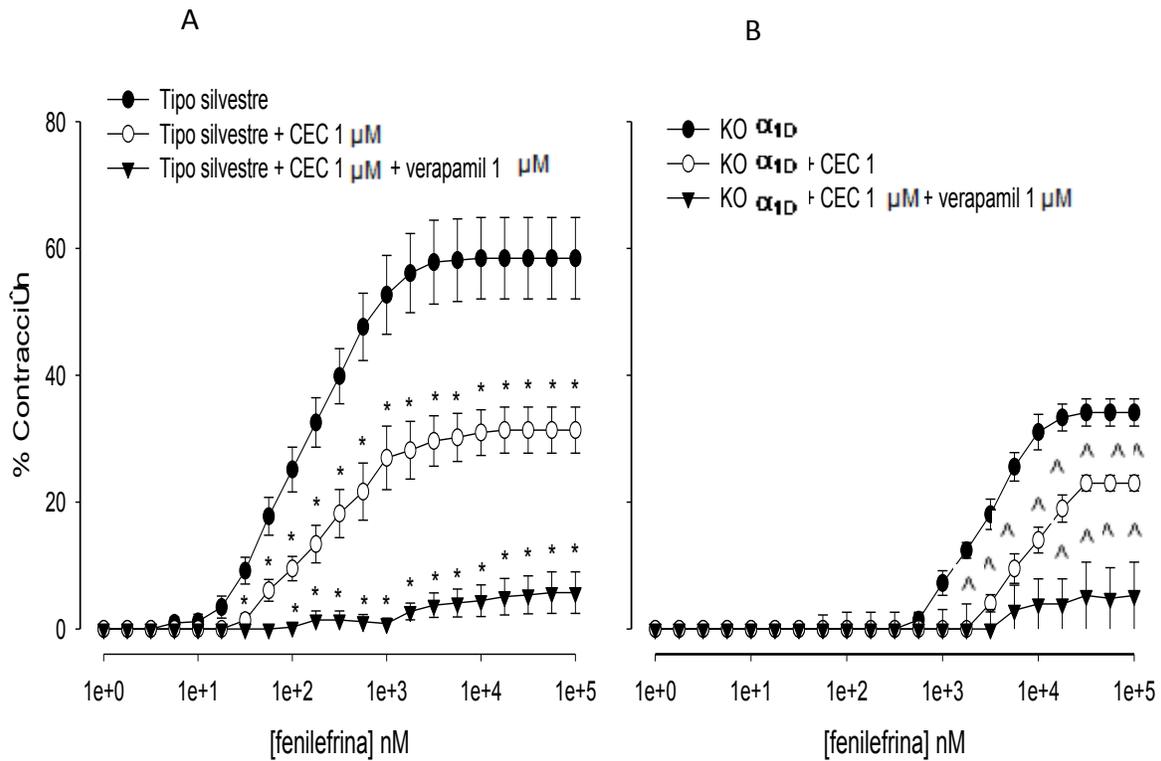


Figura 35.- Participación del calcio extracelular en respuesta a la fenilefrina. Cada punto representa el promedio \pm el error estándar de 6-8 experimentos. * $p < 0.05$ Tipo silvestre + CEC 1 μM y tipo silvestre + CEC 1 μM + verapamil 1 μM vs tipo silvestre control. ^ $p < 0.05$ knockout α_{1D} + CEC 1 μM y knockout α_{1D} + CEC 1 μM + verapamil 1 μM vs. knockout α_{1D} control, Tukey.

VIII.- DISCUSIÓN

A manera de resumen, los hallazgos obtenidos en este trabajo son:

Al realizar la medición de la presión arterial en el animal íntegro se encontró que los ratones knockout α_{1D} presentaron valores de presión arterial sistólica y diastólica significativamente por debajo de los valores presentados por los ratones tipo silvestre, siendo más marcada la disminución en la presión arterial sistólica con un decaimiento del 23%. Aunado a esto, tenemos los resultados de la medición de la frecuencia cardiaca, en donde los ratones knockout α_{1D} mostraron una disminución de 69 latidos por minuto correspondiente a un 12% comparados con los ratones tipo silvestre.

Por otra parte, en los experimentos in vitro, los resultados fueron los siguientes:

a).- La contracción a el cloruro de potasio fue alrededor de un gramo de tensión en los anillos aórticos de ambas cepas de ratones. b).- La contracción a la fenilefrina mostró una disminución en la contracción máxima así como un desplazamiento de la curva a la derecha en los anillos aórticos de ratón knockout α_{1D} comparados con el tipo silvestre. c).- En la contracción en respuesta a la oximetazolina se observo una mayor contracción y sensibilidad en los anillos de aorta del ratón knockout α_{1D} comparados con el tipo silvestre. d).- La CEC en las dos concentraciones utilizadas disminuyó el efecto máximo de contracción y desplazo la curva a la derecha en respuesta a la fenilefrina en los anillos aórticos de ratón tipos silvestre. e).- En los anillos de ratón knockout α_{1D} disminuyo el efecto máximo de contracción solo en la concentración de $1\mu\text{M}$ de CEC. f).- La CEC no tuvo efecto sobre la respuesta contráctil a la oximetazolina en los anillos aórticos de ambas cepas de ratones. g).- El verapamil disminuyo significativamente el efecto máximo de contracción y desplazo la curva a la derecha en respuesta a fenilefrina en los anillos aórticos de ambas cepas de ratones. h).- En respuesta a la oximetazolina el verapamil disminuyó casi en su totalidad la respuesta contráctil en el ratón tipo silvestre, mientras que en los anillos de aorta de ratón knockout α_{1D} el verapamil abolió la respuesta. i).- La combinación de los agentes CEC + verapamil

bloqueo en su totalidad la respuesta contráctil a la fenilefrina en los anillos aórticos de ambas cepas de ratones.

1.- PRESIÓN ARTERIAL

En la medición de la presión arterial encontramos una disminución significativa en los valores de presión arterial sistólica y diastólica de los ratones knockout α_{1D} comparados con los valores de presión encontrados en los ratones tipo silvestre, estos resultados nos permitieron apreciar que la ausencia de las funciones del receptor adrenérgico α_{1D} comprometen el mantenimiento de los valores normales de presión arterial. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Tanoue y colaboradores en el 2002, sin embargo, la disminución en la presión arterial encontrada en el presente trabajo es mayor a la reportada por Tanoue y colaboradores, esto puede ser debido a las diferencias de sensibilidad por los equipos utilizados o incluso por cuestiones ambientales donde se realizaron las mediciones.

Por otro lado, es bien sabido que en los animales donde se interrumpe la expresión de un receptor como el ratón knockout α_{1D} , pueden desarrollarse cambios para tratar de compensar la falta de las funciones de dicho receptor. En nuestro caso vale la pena resaltar que si existen cambios compensatorios en el ratón knockout α_{1D} , estos no son suficientes para normalizar los valores de presión arterial, lo cual evidencia que el receptor adrenérgico α_{1D} juega un rol fundamental en la homeostasis de la presión arterial.

2.- FRECUENCIA CARDIACA

Al realizar la medición de la frecuencia cardiaca los resultados mostraron una disminución significativa del 12% en los ratones knockout α_{1D} comparados con los ratones tipo silvestre. Estos resultados sugieren que el receptor adrenérgico α_{1D} participa aun que de manera discreta en el mantenimiento de los valores normales

de frecuencia cardiaca, sin embargo, no se sabe por medio de que mecanismo lo hace, ya que los receptores principalmente encargados de regular los fenómenos propios del corazón son los receptores adrenérgicos β .

Poco se sabe de la participación de los receptores adrenérgicos α_1 en el músculo cardiaco, sin embargo, algunos autores sugieren que estos receptores pueden promover la entrada del ion calcio al interior de las células cardiacas y por ende afectar los fenómenos de contracción y de frecuencia cardiaca (O-chi *et al.*, 2008. Yan-fang *et al.*, 2012). Por otra parte, los experimentos de Zuscik y colaboradores (2001) sugieren que a nivel del sistema nervioso central los receptores adrenérgicos α_1 están implicados en la transmisión de los impulsos nerviosos que desencadenan la descarga autonómica, por lo cual, se podría asociar una disminución de los niveles sistémicos de catecolaminas por la falta del receptor adrenérgico α_{1D} y, en consecuencia, una menor estimulación de los receptores adrenérgicos β del músculo cardiaco. Sin embargo, con nuestros experimentos y con la poca información descrita en la literatura no podemos determinar cuál es la razón de la disminución de la frecuencia cardiaca en el ratón knockout α_{1D} , por lo cual, queda la tarea de diseñar experimentos que nos permitan saber cómo las funciones de los receptores adrenérgicos α_1 , ya sea de manera directa y/o indirecta modifican la frecuencia cardiaca.

3.- CONTRACCIÓN AL CLORURO DE POTASIO

La contracción al cloruro de potasio en los anillos aórticos de ambas cepas de ratones fue de alrededor de 1 gramo de tensión, estos resultados sugieren que no hay diferencias en la maquinaria contráctil entre las dos cepas de ratones, sin embargo, en estudios preliminares histológicos de nuestro grupo de trabajo (datos no publicados), se observó una disminución en el tamaño de las células de músculo liso vascular de los ratones knockout α_{1D} comparadas con las células del ratón tipo silvestre. Con este hallazgo se podría inferir que la capacidad total contráctil de la vasculatura en el ratón knockout α_{1D} estaría disminuida, sin

embargo, no sabemos si de manera compensatoria haya un incremento en el número de células de músculo liso en el ratón knockout α_{1D} , compensando la respuesta contráctil, y no se observen diferencias en la contracción con respecto al ratón tipo silvestre, por lo cual, queda la puerta abierta para el diseño de estudios que nos permitan analizar el papel del receptor adrenérgico α_{1D} en el crecimiento del músculo liso vascular.

4.- PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS α_1 EN LA CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO LISO VASCULAR

En las curvas concentración-respuesta a la fenilefrina, encontramos una disminución considerable en el efecto máximo de contracción y un desplazamiento de la curva a la derecha en los anillos de aorta de ratón knockout α_{1D} comparado con los anillos de aorta de ratón tipo silvestre. La disminución en el efecto máximo de contracción sugiere que el receptor adrenérgico α_{1D} contribuye de manera importante en la contracción vascular, además, la respuesta contráctil restante presentada en el ratón knockout α_{1D} , por lo tanto está mediada por los otros dos subtipos de receptores adrenérgicos α_1 . Aunado a esto, el desplazamiento de la curva a la derecha sugiere que el receptor adrenérgico α_1 de mayor afinidad a la fenilefrina es el receptor adrenérgico α_{1D} ya que se ocupa una concentración 100 veces mayor para que la aorta de ratón knockout α_{1D} empiece a contraer.

Por otro lado, en las curvas concentración-respuesta a la oximetazolina, se observó el efecto contrario al presentado por la fenilefrina, es decir, hubo una mayor contracción y un desplazamiento de la curva a la izquierda en la aorta de ratón knockout α_{1D} comparado con la aorta de ratón tipo silvestre. Estos resultados sugieren que el receptor adrenérgico α_{1A} media principalmente la contracción en ausencia del receptor adrenérgico α_{1D} . El aumento en el efecto máximo de contracción y el aumento en la sensibilidad dado el desplazamiento de la curva a la izquierda en respuesta a la oximetazolina puede sugerir un aumento en el número de receptores adrenérgicos α_{1A} como efecto compensatorio en el ratón

knockout α_{1D} , lo cual apoya lo reportado por Lázaro-Suárez y colaboradores (2005), ya que ellos encuentran un mayor número de ARNm para el receptor adrenérgico α_{1A} en células de músculo liso vascular de ratón knockout α_{1D} comparado con el ARNm presente en células de ratón tipo silvestre.

Por otra parte, se observó que la aorta de ratón tipo silvestre contrajo en menor magnitud en respuesta a la oximetazolina comparado con la contracción dada por fenilefrina. Debido a que la oximetazolina es un fármaco usado principalmente para la estimulación específica del receptor adrenérgico α_{1A} , estos resultados proponen que cuando se encuentran presentes los tres subtipos de receptores adrenérgicos α_1 , el receptor adrenérgico α_{1D} media principalmente la contracción aórtica.

Con los hallazgos anteriormente descritos, ahora podemos asociar que la disminución en la presión arterial presentada en el ratón knockout α_{1D} , es en parte, a una disminución en la resistencia periférica debida a una menor contracción vascular.

5.- EFECTO DE LA CEC SOBRE LA RESPUESTA CONTRÁCTIL A FENILEFRINA Y OXIMETAZOLINA

En las curvas concentración-respuesta a la fenilefrina en presencia y ausencia del antagonista irreversible CEC en las aortas de ambas cepas de ratones, se observó una disminución en el efecto máximo contráctil, siendo esta disminución más evidente en la aorta de ratón tipo silvestre quedando solo una respuesta de contracción restante de aproximadamente 30%. De esta manera las respuestas restantes de contracción en ambas cepas de ratón sugieren que la contracción aórtica en parte está regulada por un receptor adrenérgico α_1 que es resistente a la alquilación por parte de la CEC (Ibarra *et al.*, 2000). Por otra parte, debido a que la disminución en el efecto máximo de contracción por parte de la CEC fue mayor en la aorta de ratón tipo silvestre comparado con la aorta de ratón knockout α_{1D} , se

puede sugerir que la pérdida de contracción debido a la CEC en su mayoría es por el antagonismo del receptor adrenérgico α_{1D} .

Los siguientes resultados obtenidos fueron las curvas concentración-respuesta a la oximetazolina en ausencia y presencia de la CEC. En estos experimentos encontramos que la CEC no tiene efecto sobre la respuesta contráctil dada por oximetazolina en la aorta de ambas cepas de ratón. Incluso en estos experimentos no se observan cambios en la contracción aun cuando se utilizó una concentración de CEC 3 veces mayor a la que produjo un bloqueo muy evidente en respuesta a la fenilefrina. Estos resultados sugieren que la respuesta contráctil resistente a la CEC está mediada por el receptor adrenérgico α_{1A} (Lazaro-Suárez *et al.*, 2005, Martínez-Salas *et al.*, 2011).

Por otra parte, como se mencionó en la introducción del presente trabajo existe controversia en cuanto a si el receptor adrenérgico α_{1B} participa o no en la contracción vascular. En nuestro trabajo se observó una disminución ligera en el efecto contráctil dado por la fenilefrina en la aorta de ratón knockout α_{1D} en presencia de la CEC, lo cual podría sugerir que el receptor adrenérgico α_{1B} participa discretamente en la contracción vascular, sin embargo, no podemos descartar que el receptor adrenérgico α_{1B} sólo este participando en la contracción debido a la ausencia del receptor adrenérgico α_{1D} .

De esta manera, hasta este punto los hallazgos encontrados en este trabajo proponen que cuando están presentes los tres subtipos de receptores adrenérgicos α_1 , el receptor adrenérgico α_{1D} promueve principalmente la contracción aórtica seguido del receptor adrenérgico α_{1A} .

6.- PARTICIPACIÓN DEL CALCIO EXTRACELULAR EN LA CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO LISO VASCULAR

En la literatura esta descrito que los receptores adrenérgicos α_1 promueven la contracción del músculo liso vascular a través de la vía de señalización que

involucra las proteínas $G\alpha_{q/11}$, PLC y el mensajero IP3 que promueve la apertura de canales de calcio del retículo sarcoplásmico, y así de esta manera, se logra el movimiento del ion calcio (intracelular) hacia el citoplasma de la célula. El ion calcio se une a la calmodulina cinasa que media la fosforilación de las cadenas ligeras de la miosina, produciendo un corrimiento entre las fibras de actina y miosina lo cual produce la contracción del músculo liso (Wu D. *et al.*, 1992, Guimaraes *et al.*, 2001, Cotecchia, 2010, Nguyen *et al.*, 2011). Sin embargo, algunos estudios proponen que los receptores adrenérgicos α_1 están asociados con diferentes proteínas G ($G\alpha_q$, $G\alpha_0$ y $G\alpha_i$) y por tanto pueden promover diferentes vías de señalización (Gurdal *et al.*, 1997, O-Uchin *et al.*, 2008). Es por ello que en el presente trabajo se analizó la participación del calcio extracelular en la contracción del músculo liso vascular.

Para ello primeramente se realizaron curvas concentración-respuesta a la fenilefrina en presencia y ausencia del bloqueador de canales de calcio verapamil. Los resultados mostraron una disminución significativa en el efecto máximo de contracción en la aorta de ambas cepas de ratones. Estos resultados sugieren que parte importante de la contracción del músculo liso vascular en estímulo de los receptores adrenérgicos α_1 esta mediada por el movimiento de calcio extracelular.

Por otra parte, para analizar más a fondo la participación del calcio extracelular en la contracción mediada por los receptores adrenérgicos α_1 , se realizaron curvas concentración-respuesta a la oximetazolina en presencia y ausencia de verapamil. Los resultados mostraron que el verapamil disminuye marcadamente la contracción en la aorta de ratón tipo silvestre, sin embargo, en la aorta de ratón knockout α_{1D} la contracción se bloqueo por completo. Estos resultados nos permiten sugerir que el receptor adrenérgico α_1 que promueve una vía de señalización que permite la entrada de calcio extracelular es el receptor adrenérgico α_{1A} . Sin embargo, aún cuando estos resultados sugieren fuertemente que el receptor adrenérgico α_{1A} promueve el movimiento de calcio extracelular se realizaron curvas concentración-respuesta a la fenilefrina en presencia y ausencia del tratamiento CEC + verapamil.

Esto nos permitió aislar la respuesta resistente a la CEC, que puede estar mediada por el receptor adrenérgico α_{1A} , para así posteriormente ver el efecto del verapamil sobre la respuesta contráctil de este receptor. Los resultados mostraron una inhibición completa de la contracción en las aortas de ambas cepas de ratones. De esta manera estos resultados complementan y refuerzan la idea de que el receptor adrenérgico α_{1A} promueve la contracción del músculo liso vascular a través de promover la entrada de calcio extracelular al citoplasma.

IX.- CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo mostraron que la fenilefrina se comporta como un agonista completo y la oximetazolina como agonista parcial en el ratón tipo silvestre, lo cual sugiere que el receptor adrenérgico α_{1D} es el encargado principalmente de la contracción del músculo liso vascular en el ratón tipo silvestre.

Por el contrario a los resultados antes mencionados, la oximetazolina se comporta como agonista completo y la fenilefrina como agonista parcial en el ratón knockout α_{1D} , lo cual sugiere que en ausencia del receptor α_{1D} la contracción del músculo liso vascular esta mediada principalmente por el receptor adrenérgico α_{1A} .

Por otra parte, los resultados de las curvas concentración-respuesta a la fenilefrina y oximetazolina en presencia y ausencia de la CEC sugieren que el receptor adrenérgico α_{1B} parece no estar involucrado en la contracción del músculo liso vascular.

Por último los resultados de las curvas concentración-respuesta a fenilefrina y oximetazolina en presencia y ausencia del bloqueador de canales de calcio verapamil en los anillos aórticos de ambas cepas de ratones, sugieren que el calcio extracelular participa de manera importante en la contracción promovida por los receptores adrenérgicos α_1 , sin embargo, con ayuda de la combinación de los agentes CEC + verapamil, los resultados sugieren que la participación del calcio extracelular en la contracción vascular esta mediada por el receptor adrenérgico α_{1A} .

Retomando los resultados antes mencionados y como resultado de este trabajo podemos concluir que la contracción del músculo liso vascular esta mediada por los receptores adrenérgicos α_{1D} y α_{1A} y este último involucra la entrada de calcio extracelular.

X.- PERSPECTIVAS

En todo trabajo de investigación la estrategia experimental se plantea con la finalidad de responder aquellas incógnitas planteadas en la hipótesis, sin embargo, al ir obteniendo resultados y respondiendo aquellas inquietudes planteadas, van saliendo nuevas cuestiones que en un principio no se tenían contempladas. En esa sintonía a lo largo del presente trabajo se observaron por mi y por mi equipo de trabajo detalles de los cuales se desprendieron nuevas incógnitas.

La primera cuestión por examinar en un futuro sería los niveles plasmáticos de catecolaminas en el ratón knockout α_{1D} , ya que en la literatura se describe que los receptores adrenérgicos α_1 a nivel del sistema nervioso central participan en la señalización que promueve la liberación de catecolaminas a nivel sistémico, de esta manera se podría asociar una disminución de los niveles circulantes de catecolaminas por la falta del receptor α_{1D} en el ratón knockout α_{1D} . También se podría asociar los niveles bajos de catecolaminas con la disminución de la frecuencia cardíaca encontrada en nuestros resultados.

Aunado a esto, se observó que los ratones knockout α_{1D} ganaron más peso corporal comparado con los ratones tipo silvestre. Nuevamente, en la literatura se describe que las catecolaminas están asociadas con el metabolismo de lípidos y carbohidratos, por lo cual podríamos asociar de nuevo niveles bajos de catecolaminas con el aumento mayor de peso en el ratón knockout α_{1D} . De esta manera sería interesante cuantificar parámetros del metabolismo de lípidos y carbohidratos en el ratón knockout α_{1D} .

Por último, este trabajo se centro en analizar las funciones los receptores adrenérgicos α_1 en la vasculatura, por lo cual queda la tarea de realizar experimentos funcionales en órganos como el riñón y el corazón.

XI.- REFERENCIAS

Rosler J. R. “Bloques constitutivos del sistema nervioso: neurona y glía”. Best and Taylor, Bases Fisiológicas de la Práctica Médica. 13ª edición. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2003. Pág. 801-816.

Ransom Bruce R. “Organization of the nervous System” Medical Physiology. Edición revisada. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Saunders; 2005. Pág. 257-278.

Campos Sepúlveda Alfonso Efraín. “Aspectos neuroanatómicos, neurofisiológicos, y neuroquímicos del SNA” Farmacología médica. México, DF. Editorial Médica Panamericana; 2008. Pág. 208-218.

Westfall Thomas C. y Westfall David P. “Neurotransmisión, Sistema nervioso autónomo y motor somático” Goodman & Gilman, Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Undécima edición, 2010. Pág. 137-178.

Cardinali Daniel P. “Sistema Nervioso Autónomo”. Best and Taylor, Bases Fisiológicas de la Práctica Médica. 13ª edición. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2003. Pág. 1017-1025.

Akito Tanoue, Yoshihisa Nasa, Takaaki Koshimizu, Hitomi Shinoura, Sayuri Oshikawa, Takayuki Kawai, Sachie Sunada, Satoshi Takeo, and Gozoh Tsujimoto. “The α_{1D} -adrenergic receptor directly regulates arterial blood pressure via vasoconstriction”. The Journal of Clinical Investigation. 109:765-775. 2002.

Arias Pablo “Glándula suprarrenal”. Best and Taylor, Bases Fisiológicas de la Práctica Médica. 13ª edición. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2003. Pág. 652-657.

Brandan Nora Cristina, Llanos Isabel, Ruiz Díaz Daniel y Rodríguez Andrea. “Hormonas Catecolamínicas Adrenales”. Cátedra de Bioquímica, Facultad de Medicina. 2010.

Barrett Eugene J. "The Adrenal Gland". Medical Physiology. Última edición. Philadelphia, Pennsylvania. Elsevier Saunders; 2005. Pág. 1049-1065.

Guimares Serafim y Moura Daniel. "Vascular Adrenoceptors: An Update". Pharmacological Reviews. 53: 319-356. 2001.

Godínez Hernández Daniel. "Efecto del captopril sobre la expresión de los receptores adrenérgicos α_1 vasculares durante la génesis de la hipertensión arterial en la rata. México, DF. Centro de investigación y de estudios avanzados del Instituto Politecnico Nacional. 2005.

Methven L, Simpson PC y McGrath JC. " $\alpha_{1A/B}$ -Knockout mice explain the native α_{1D} -adrenoceptor's role in vasoconstriction and show that its location is independent of the other α_1 -subtypes". British Journal of Pharmacology. 158: 1663-1675. 2009.

Higashida B. "Ciencias de la Salud". Cuarta edición. México, DF. McGraw-Hill Interamericana; 2001.

Netter H. Frank. Colección Ciba de Ilustraciones medicas. Tomo V Corazón. Barcelona, España. Editorial Salvad; 1983.

Sporkova Alexandra, Perez-Rivera Alex y Galligan James J. "Interacción between α_1 - and α_2 -adrenoreceptors contributes to enhanced constricción effects of norepinephrine in mesenteric veins compared to arteries". Eur. J. Pharmacol. 643 (2-3): 239-246. 2010.

Hein L. and Kobilka BK. "Adrenergic signal transduction and regulation". Neuropharmacology. 34 (4): 357-366. 1995.

Zhong H. and Minneman KP. "Alpha 1-adrenoceptor subtypes". Eur. J. Pharmacol. 134:1050-1056. 1999.

García-Sáinz JA, Vázquez-Prado J, Del Carmen Medina L. " α_1 -Adrenoceptors function and phosphorylation". Eur. J. Pharmacol. 389: 1-12. 2000.

Theroux TL, Esbenshade TA, Peavy RD, Minneman KP. "Coupling efficiencies of human alpha 1-adrenergic receptor subtypes: titration of receptor density and responsiveness with inducible and repressible expression vectors". *Mol. Pharmacol.* 10: 1476-1783. 1996.

Dan Chalothorn, Dan F. Mccune, Stephanie E. Edelman, Kimimasa Tobita, Bradley B. Keller, Robert D. Lasley, Dianne M. Perez, Akito Tanoue, Gozoh Tsujimoto, Ginell R. Post, y Michael T. Piascik. "Differential Cardiovascular Regulatory Activities of the α_{1B} - and α_{1D} -Adrenoceptor Subtypes". *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 305: 1045-1053. 2000.

Ibarra M, Pardo J. Pablo, Lopez-Guerrero J. Javier y Villalobos-Molina Rafael. "Differential response to chloroethylclonidine in blood vessels of normotensive and spontaneously hypertensive rats: role of α_{1D} - and α_{1A} -adrenoceptors in contraction". *British Journal of Pharmacology.* 129: 653-660. 2000.

Villalobos-Molina Rafael, López-Guerrero J. Javier y Ibarra Maximiliano. "Functional evidence of α_{1D} -adrenoceptors in the vasculature of young and adult spontaneously hypertensive rats". Departamento de Farmacología y Toxicología, Cinvestav-IPN, Apartado Postal 22026, México D. F. 14000, México. *British Journal of Pharmacology.* 126: 1534-1536. 1999.

Methven L, McBride M, Wallace GA y McGrath JC. "The $\alpha_{1B/D}$ -adrenoceptor knockout mouse permits isolation of the vascular α_{1A} -adrenoceptor and elucidates its relationship to the other subtypes". Integrative and Systems Biology, Faculty of Biomedical and Life Sciences, West Medical Building, University of Glasgow, Glasgow, UK. *British Journal of Pharmacology.* 158: 209-224. 2009.

Rokosh D. Gregg and Simpson Paul C. "Knockout of the $\alpha_{1A/C}$ -adrenergic receptor subtype: The $\alpha_{1A/C}$ is expressed in resistance arteries and is required to maintain arterial blood pressure". *PNAS.* 99 (14): 9474-9479. 2002.

Cavalli Antonella, Lattion Anne-Laure ,Hummler Edith, Nenniger Monique, Pedrazzini Thierry, Auber Jean-Francois, Michel Martin C, Yangs Ming, Lembo

Giuseppe, Vecchione Carmine, Mostardini Marina, Schmidt Andrea, Beermann Friedrich, and Cotecchia Susanna. "Decreased blood pressure response in mice deficient of the α_{1B} -adrenergic receptor". *Medical Sciences*. 94: 11589-11594. 1997.

O-Uchi Jin, Sasaki Hiroyuki, Morimoto Satoshi, Kusakari Yoichiro, Shinji Hitomi, Obata Toru, Hongo Kenichi, Komukai Kimiaki y Kurihara Satoshi. "Interaction of α_1 -adrenoceptor subtypes with different G proteins induces opposite effects on cardiac L-type Ca^{2+} channel". Department of cell physiology, Division of molecular cell biology, Division of cardiology, División of bacteriology, Jikei University School of Medicine, Tokyo, Japan. *Cellular Biology*, 102: 1378-1388. 2008.

Sambrook Joe, William Russell David David. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". Volumen 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.

Ruiz Leyja Estela D'Abril. "Participación de las ciclooxigenasas 1 y 2 en la contracción vascular renal durante la hipertensión". Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México. 2006.

Godínez Hernández Daniel. "Modulación endotelial de la contracción vascular en ratas normotensas e hipertensas durante el desarrollo: Participación del óxido nítrico y de las prostanglandinas". Centro de Investigación y de Estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Departamento de farmacología. México, D.F., 2002.

Estrada Suárez Eliseo. "Efecto de la glucosa a concentraciones elevadas sobre la respuesta contráctil a la fenilefrina en aorta torácica de rata". Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Químico Farmacobiología. Morelia, Michoacán, México. 2010.

Yan-fang LI, Fang-fang CAO, Fei LIU, Xue-yuan BAI y Yang LÜ. "Effects of Shexiangbaixin pills on the expression of cardiac α_1 - and β -adrenergic receptor subtypes in rat hearts with heart failure induced by myocardial infarction". *Chinese Medical Journal*, 12: 235-242. 2012.

Zuscik Michael J, Chalothorn Dan, Hellard David, Deighan Clare, McGee Ann, Daly Craig J, Waugh David J. J, Ross Sean A, Gaivin Robert J, Morehead Annitta J, Thomas James D, Plow Edward F, McGrath John C, Piascik Michael T. y Perez Dianne M. "Hypotension, Autonomic Failure, and Cardiac Hypertrophy in Transgenic Mice Overexpressing the α_{1B} -Adrenergic Receptor". *The Journal of Biological Chemistry*. 276 (17) 13728-13743. 2001.

Lázaro-Suárez M. L, Gómez-Zamudio J. H, Delgado-Buenrostro N. L, Tanoue A, Tsujimoto G. y Villalobos-Molina R. "Angiotensin II modifies the expression of α_1 -adrenoceptors in aorta smooth muscle cells of α_{1D} -adrenoceptor knockout mice". *Autonomic and Autacoid Pharmacology*, 31: 57-63. 2011.

Lázaro-Suárez M. L, Gómez-Zamudio J. H, Gallardo-Ortíz I. A, Tanoue A, Tsujimoto G, Farias-Rodríguez V. M. y Villalobos-Molina R. "Chloroethylclonidine reveals that α_{1A} -adrenoceptors mediate contraction in aorta of α_{1D} -adrenoceptor knockout mice". *Autonomic & Autacoid Pharmacology*, 25: 175-183. 2005.

Martínez-Salas S. G, Campos-Peralta J. M, Pardo J. P, Hernández-Muñoz R, Ibarra M, Tanoue A, Tsujimoto G. y Villalobos-Molina R. " α_{1D} -Adrenoceptor regulates the vasopressor action of α_{1A} -adrenoceptor in mesenteric vascular bed of α_{1D} -adrenoceptor knockout mice". *Autonomic & Autacoid Pharmacology*, 31: 64-71. 2011.

XII.- ANEXOS

HERRAMIENTAS FARMACOLÓGICAS						
AGONISTA	AFINIDAD (pKi)					
	a _{1A}		a _{1B}		a _{1D}	
A61603	7.8	0.4	ND		5.9	0.01
Oximetazolina	8.0	0.11	6.5	0.01	6.4	0.11
Fenilefrina	5.6	0.48	6.0	0.23	7.08	0.04
Noradrenalina	5.8	0.17	5.7	0.43	7.4	

ANTAGONISTA	AFINIDAD (pKi)					
	a _{1A}		a _{1B}		a _{1D}	
RS100329	9.6		7.5		7.9	
BMY7378	6.6	0.12	7.1	0.13	9.0	0.28
Prazosina	9.7	0.05	9.6	0.08	9.8	0.12
CEC	resistente		sensible		sensible	

Richard *et al.*, 2011. IUPHAR DATA BASE

Tabla 4.- Tabla de afinidades de diversas herramientas farmacológicas sobre los 3 subtipos de receptores adrenérgicos α_1 .