



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**HIPERTENSIÓN Y EMBARAZO: UN ESTUDIO VASCULAR DE
LOS RECEPTORES α_1 -ADRENÉRGICOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN FARMACOLOGÍA BÁSICA

PRESENTA:

Q.F.B. LETICIA PÉREZ ORDAZ

DIRECTORES

D. EN C. RAFAEL VILLALOBOS MOLINA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
U.N.A.M.

M. EN C. JUAN CARLOS CORTÉS GARCÍA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
U.M.S.N.H.

MORELIA, MICH., NOVIEMBRE 2008

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Farmacología Cardiovascular de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Proyecto apoyado en parte por los donativos 47481 del Conacyt y IN224408 de PAPIIT, DGAPA, UNAM.

ÍNDICE GENERAL

Índice general.....	i
Índice de figuras.....	iii
Índice de tablas.....	iv
Lista de abreviaturas.....	v
Resumen.....	vii
Abstract.....	viii
1. Introducción.....	1
1.1.Sistema nervioso.....	3
1.2.Neurotransmisores de la sinapsis del sistema nervioso autónomo .	6
1.2.1.Catecolaminas.....	6
1.3.Sistema cardiovascular.....	7
1.3.1.Vasos sanguíneos.....	8
1.4.Receptor.....	11
1.4.1.Receptores adrenérgicos.....	11
1.4.2.Receptores α_1 -adrenérgicos.....	12
1.4.3.Localización celular.....	13
1.4.4.Proteínas G.....	14
1.4.5.Mecanismo transduccional.....	15
1.4.6.Señalización a nivel nuclear.....	16
1.4.7.Regulación de la función de receptor.....	18
1.4.8.Función vascular de los receptores α_1 -adrenérgicos.....	19
2. Antecedentes específicos.....	21
2.1.Hipertensión.....	21
2.1.1.Hipertensión: eventos vasculares.....	22
2.1.2.Estatus endotelial y mediadores.....	24
2.2.Embarazo.....	25

2.2.1.Embarazo: efecto sobre el sistema cardiovascular	25
2.3.Hipertensión y embarazo.....	29
3. Planteamiento del problema	30
4. Hipótesis	30
5. Objetivos	31
6. Estrategia.....	32
7. Material y métodos	33
8. Resultados	37
9. Discusión	50
10. Conclusiones.....	55
11. Perspectivas.....	56
12. Referencias	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Divisiones del sistema nervioso	3
Esquema que representa el sistema nervioso autónomo y sus divisiones parasimpática y simpática	5
Síntesis y estructuras de catecolaminas	7
Conformación microscópica histológica de las arterias.....	10
Mecanismo de señalización transduccional.	16
Curva concentración-respuesta a la fenilefrina (1 nM -10 μ M) en anillos íntegros de aorta, segmentos torácico y abdominal de ratas SHR y Wistar que cursan con 7, 14 y 20 día de gestación.	40
Curvas concentración-respuesta a la fenilefrina y regresión de Schild (pA_2), en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de BMY7378 en arteria aorta segmento torácico de ratas Wistar y SHR con 7 días de gestación.....	41
Curvas concentración-respuesta a la fenilefrina y regresión de Schild (pA_2), en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de BMY7378 en arteria aorta, segmento abdominal de ratas Wistar y SHR con 7 días de gestación.....	42
Curvas concentración-respuesta a la fenilefrina y regresión de Schild (pA_2), en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de BMY7378 en arteria aorta, segmento torácico de ratas Wistar y SHR con 14 días de gestación.....	44
Curvas concentración-respuesta a la fenilefrina y regresión de Schild (pA_2), en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de BMY7378 en arteria aorta, segmento abdominal de ratas Wistar y SHR con 14 días de gestación.....	45
Curvas concentración-respuesta a la fenilefrina y regresión de Schild (pA_2), en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de BMY7378 en arteria aorta, segmento torácico de ratas Wistar y SHR con 20 días de gestación.....	47
Curvas concentración-respuesta a la fenilefrina y regresión de Schild (pA_2), en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de BMY7378 en arteria aorta, segmento abdominal de ratas Wistar y SHR con 20 días de gestación.....	48

ÍNDICE DE TABLAS

Los valores representan los promedios \pm EE del efecto máximo a la fenilefrina (Emax), afinidad del receptor por el agonista (pD_2) y afinidad del receptor por el antagonista BMY7378 (pA_2 o pK_B), en segmentos torácico y abdominal aórticos de ratas Wistar y SHR que cursan con 7 días de gestación. * $p < 0.05$ Wistar vs SHR en el segmento torácico. $\S p < 0.05$ Wistar vs SHR segmento abdominal..... 43

Los valores representan el promedio \pm EE del efecto máximo a la fenilefrina (Emax), afinidad del receptor por el agonista (pD_2) y afinidad del receptor por el antagonista BMY7378 (pA_2 o pK_B), en segmentos torácico y abdominal aórticos de ratas Wistar y SHR que cursan con 14 días de gestación. * $p < 0.05$ segmento torácico vs segmento abdominal de SHR. 46

Los valores representan el promedio \pm EE del efecto máximo a la fenilefrina (Emax), afinidad del receptor por el agonista (pD_2) y afinidad del receptor por el antagonista BMY7378 (pA_2 o pK_B), en segmentos torácico y abdominal aórticos de ratas Wistar y SHR con 20 días de gestación. 49

LISTA DE ABREVIATURAS

α_1 -ARs	Receptores α_1 -adrenérgicos
$[Ca^{2+}]_i$	Concentración de calcio citosólico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag II	Angiotensina II
BMY7378	8-[2-[4-(2-metoxipentil)-1-piperazinil]etil]-8-azaspiro[4,5]decano-7-9-diona dihidrocloruro
Ca^{2+}	Ion calcio
$CaCl_2$	Cloruro de calcio
CO_2	Dióxido de carbono
COX-1	Ciclooxygenasa 1
COX-2	Ciclooxygenasa 2
cPLA ₂	Fosfolipasa A ₂ citosólica
DAG	Diacilglicerol
EDHF	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
EDTA	Acido etilenediitrilo tetra-acético
GDP	Guanosina difosfato
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
GRKs	Cinasas de receptores acoplados a proteínas G
GTP	Guanosina trifosfato
iECA	Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina
IP ₂	Fosfatidilinositol 4,5,-bisfosfato
IP ₃	Inositol 1,4,5-trisfosfato
K ⁺	Potasio
KCl	Cloruro de potasio
KH_2PO_4	Fosfato monobásico de potasio
$MgSO_4$	Sulfato de magnesio
NaCl	Cloruro de sodio
$NaHCO_3$	Bicarbonato de sodio
NO	Oxido nítrico
pA_2	Afinidad aparente de un antagonista competitivo
pD_2	Logaritmo negativo de la concentración efectiva 50
PGH ₂	Prostaglandina H ₂
PGI ₂	Prostaglandina I ₂ (prostaciclina)
PKC	Proteína cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
receptores TP	Receptores a tromboxano A ₂
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
SHR	Rata espontáneamente hipertensa
SNA	Sistema nervioso autónomo
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico

SNS	Sistema nervioso somático
SONe	Sintasa de oxido nítrico endotelial
SRA	Sistema Renina Angiotensina
TxA ₂	Tromboxano A ₂
WHY	Rata Wistar Kyoto

RESUMEN

Hipertensión y embarazo: un estudio vascular de los receptores α_1 -adrenérgicos

Los receptores α_1 -adrenérgicos median la contracción del músculo liso vascular. Son activados por catecolaminas, adrenalina y noradrenalina para inducir un incremento en la concentración de calcio intracelular. Tres subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos forman esta familia (α_{1A} , α_{1B} y α_{1D}). Cambios en la respuesta contráctil del músculo liso vascular han sido establecidos en hipertensión y embarazo, y cuando estos factores fueron individualmente evaluados, respuestas incrementadas y disminuidas fueron observadas. Sin embargo, la respuesta de los receptores α_1 -adrenérgicos durante el embarazo en un modelo de hipertensión crónica no ha sido explorada. Los objetivos de este trabajo fueron: *i*) Determinar la respuesta contráctil inducida por la fenilefrina en anillos de arteria aorta de rata espontáneamente hipertensa (SHR) en diferentes tiempo de gestación; y *ii*) Evaluar el papel del receptor α_{1D} -adrenérgico en la respuesta contráctil. Se usaron anillos de arteria aorta (segmento anatómicos abdominal y torácico) de ratas embarazadas en 7, 14 y 20 días de gestación. Fueron construidas curvas concentración-respuesta a la fenilefrina (1 nM-10 μ M) en ausencia y presencia de BMY7378 (3, 10,30 nM), un antagonista selectivo de los receptores α_{1D} -adrenérgicos. Como control fueron usadas ratas Wistar embarazadas. Los resultados mostraron que la fenilefrina induce contracción de la arteria aorta de manera dependiente de la concentración, e independiente del segmento anatómico, tiempo de gestacional y cepa de rata. La comparación de la contracción máxima (E_{max}) entre segmentos anatómicos mostró que en SHR, la arteria abdominal desarrollo mayor contracción a la fenilefrina que la arteria torácica en los tres tiempo de gestación (2.25 \pm 0.07, 2.74 \pm 0.62* y 2.77 \pm 0.28 vs 1.67 \pm 0.30, 1.59 \pm 0.16 y 1.90 \pm 0.25 g, respectivamente), siendo estadísticamente significativa en el día de gestación 14 (* p <0.05). Mientras que en las ratas Wistar fue observada una mayor contracción del segmento abdominal comparado con el torácico (3.24 \pm 0.37, 3.25 \pm 0.18 y 2.71 \pm 0.19 vs 2.51 \pm 0.26, 2.22 \pm 0.26 y 2.65 \pm 0.29 respectivamente), sin mostrar diferencias estadísticamente significativas en ningún tiempo. Cuando fueron comparadas las cepas, la arteria torácica de SHR fue deferente (* p <0.05) que la de Wistar (1.67 \pm 0.30* vs 2.51 \pm 0.26); los mismo fue observado en la arteria abdominal (2.25 \pm 0.07* vs 3.24 \pm 0.37), ambos en el día 7 de gestación, y la torácica (1.59 \pm 0.16 vs 2.22 \pm 0.26) y abdominal (2.74 \pm 0.62* vs 3.25 \pm 0.15) en el día 14 de gestación; torácica (1.90 \pm 0.25 vs 2.65 \pm 0.29) y abdominal (2.77 \pm 0.28 vs 2.71 \pm 0.19) en el día 20 de gestación. Los valores de pD_2 para fenilefrina fueron de 6.87-7.3 entre grupos; mientas que los valores de afinidad por BMY 7378 fueron 7.09-9.80.

Las evidencias reportadas aquí sugieren que las ratas SHR exhiben un mecanismo adaptativo al embarazo, mostrado por un decremento de la resistencia vascular que podría ser explicado por desensibilización de los receptores α_{1D} -adrenérgicos, desacoplamiento de la vía transduccional y/o un decremento en el número de receptores. Sin embargo, estas posibilidades deber ser probadas.

ABSTRACT

Hypertension and pregnancy: a vascular study of α_1 -adrenoceptors

α_1 -Adrenoceptors mediate contraction of vascular smooth muscle. They are activated by catecholamines, adrenaline and noradrenaline, to induce an increase on the intracellular calcium concentration. Three α_1 -adrenoceptor subtypes complete that family (α_{1A} , α_{1B} and α_{1D}). Changes in contractile response of vascular smooth muscle have been established in hypertension and in pregnancy, and when these factors were individually evaluated, increased and diminished responses were observed, respectively. However, α_1 -adrenoceptors responses during pregnancy in a chronic hypertension model have not been explored. The aims of this work were: *i*) to determine contractile responses induced by phenylephrine in aorta arterial rings from spontaneously hypertensive rats (SHR), in different gestational times; and *ii*) to evaluate α_{1D} -adrenoceptors role in contractile response. Aorta arterial rings (abdominal and thoracic anatomical segments) from pregnant rats at 7, 14 and 20 gestation days were used. Concentration-response curves to phenylephrine (1 nM-10 μ M) in absence and presence of BMY7378 (3, 10 or 30 nM), a selective antagonist of α_{1D} -adrenoceptors, were constructed. Pregnant Wistar rats were used as controls. Results showed that phenylephrine induced aorta artery contraction in a concentration-dependent manner, and independent of anatomical segment, gestational time and rat strain. The comparison of maximum contraction (E_{max}) between anatomical segments shown that in SHR, abdominal artery developed greater contraction to phenylephrine than thoracic artery in all three gestation times (2.25 ± 0.07 , $2.74 \pm 0.62^*$ and 2.77 ± 0.28 vs. 1.67 ± 0.30 , 1.59 ± 0.16 and 1.90 ± 0.25 g, respectively), being statistically significant at gestation day 14 ($*p < 0.05$). Whereas in Wistar rats a higher contraction of abdominal segment compared to thoracic was observed (3.24 ± 0.37 , 3.25 ± 0.18 and 2.71 ± 0.19 vs. 2.51 ± 0.26 , 2.22 ± 0.26 and 2.65 ± 0.29 , respectively), showing no statistical difference at any time. When rat strains were compared, SHR thoracic artery was different ($*p < 0.05$) than Wistar ($1.67 \pm 0.30^*$ vs. 2.51 ± 0.26); the same was observed on abdominal artery ($2.25 \pm 0.07^*$ vs. 3.24 ± 0.37), both at gestation day 7, and thoracic (1.59 ± 0.16 vs. 2.22 ± 0.26) and abdominal (2.74 ± 0.62 vs. 3.25 ± 0.15) at gestation day 14; thoracic (1.90 ± 0.25 vs. 2.65 ± 0.29) and abdominal (2.77 ± 0.28 vs. 2.71 ± 0.19) at gestation day 20. pD_2 values for phenylephrine were 6.87-7.3, among groups; while affinity values displayed for BMY 7378, were 7.09-9.80 among groups. The evidences reported here suggest that SHR rats displayed a vascular adaptive mechanism to pregnancy, shown by a decrease of vascular resistance that could be accounted for as desensitization of α_{1D} -adrenoceptors, pathway transductional uncoupling and/or a decrease in the number of receptors. However, those possibilities should be tested.

1 Introducción

Los receptores α_1 -adrenérgicos son una subfamilia heterogénea de receptores acoplados a proteínas G, conformada por los subtipos α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} , cuya activación reversible por las aminas adrenérgicas está entre las funciones fisiológicas más importantes en el sistema cardiovascular. La estimulación de estos receptores, en el músculo liso vascular, produce contracción al aumentar la concentración de calcio citosólico ($[Ca^{2+}]_i$) (Salomonsson *et al.*, 2001).

En la arteria aorta de ratas se han identificado, a nivel RNAm, los tres subtipos; sin embargo, el papel funcional específico de cada receptor no ha sido completamente aclarado. En este sentido, trabajos reciente han mostrado que el subtipo α_{1D} desempeña un papel muy importante en la modulación de la respuesta contráctil, de una manera independiente de ligando, cuya finalidad es evitar cambios abruptos en el calibre de los vasos y consecuentemente cambios súbitos en el flujo sanguíneo (D'Ocon *et al.*, 2002). Aunado a lo anterior, la obtención de un ratón “knockout” para el receptor α_{1D} generó ratones hipotensos y con respuestas mediadas por receptores α_{1D} ausentes (Tanoue *et al.*, 2002). Así, se hace evidente el papel funcional del receptor α_{1D} -Adrenérgico en la respuesta contráctil del músculo liso vascular. No obstante, este mismo receptor ha sido implicado en procesos patológicos como la hipertensión, en donde se le ha detectado en la vasculatura de ratas SHR y al cual se le atribuye la hipersensibilidad que el tejido vascular presenta a la estimulación con noradrenalina (Villalobos-Molina *et al.*, 1996; Ibarra *et al.*, 1998; Villalobos-Molina *et al.*, 1999).

Por otro lado, el embarazo, un proceso fisiológico que involucra constantes cambios en el sistema cardiovascular materno, relacionado con un importante aumento de la frecuencia cardíaca, gasto cardíaco, volumen plasmático, profunda vasodilatación, baja reactividad vascular y disminución de la presión sanguínea,

eventos que han sido observados en mujeres, ratas y muchas otras especies animales que cursan con embarazo normal. De manera interesante, se sabe también que madres que cursan con hipertensión crónica, presentan la misma característica genotípica en el descenso de la presión arterial.

Por lo anterior, consideramos que el receptor α_{1D} -adrenérgico que está mediando la respuesta contráctil en la aorta de ratas embarazadas, facilita la disminución de la resistencia vascular y coadyuva a la vasodilatación y, consecuentemente, al descenso en la presión sanguínea, efecto característico del proceso de desarrollo fetal.

1.1 Sistema Nervioso

El sistema nervioso es una red compleja que permite a un organismo comunicarse con su ambiente. Esta red incluye componentes sensoriales que detectan cambios en los estímulos ambientales y componentes motores que generan movimiento, contracción de los músculos cardíaco y liso y secreción de las glándulas. Los componentes integrales del sistema nervioso reciben, almacenan y procesan información sensorial para luego organizar la respuesta motora apropiada.

El sistema nervioso para su estudio es dividido en sistema nervioso central (SNC), sistema nervioso periférico (SNP) y este a su vez se divide en sistema nervioso autónomo (SNA) [que a su vez se divide en sistema nervioso simpático y sistema nervioso parasimpático] y sistema nervioso somático (SNS) (Fig 1).

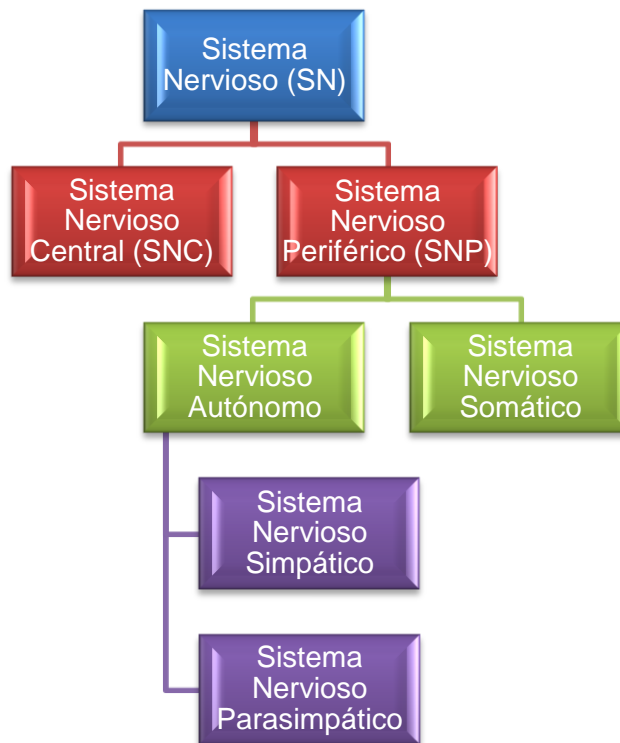


Fig.1. Divisiones del sistema nervioso

El SNC está conformado por el cerebro y la médula espinal; ambos están cubiertos por tres membranas denominadas meninges, dispuestas de afuera hacia dentro en el siguiente orden, dura madre, aracnoides y pia madre. Dentro del SNC algunas neuronas con función similar son agrupadas dentro de agregados, llamados núcleos.

El SNP consiste de las partes del sistema nervioso que están fuera de la dura madre, estos elementos incluyen receptores sensoriales para varias clases de estímulos, la porción periférica de la espina y los nervios craneales, también como todas las porciones periféricas del SNA. Los nervios periféricos que llevan mensajes de la periferia al SNC son los nervios aferentes y los nervios periféricos motores que llevan mensajes del SNC al tejido periférico son los nervios eferentes. Los ganglios periféricos son conjuntos de células nerviosas concentradas en pequeños grupos, localizados fuera del SNC.

El SNA es la porción que regula el control de la función visceral, incluyendo el ritmo cardíaco, la presión sanguínea, la digestión, regulación de la temperatura y la función reproductiva. Este sistema se divide anatómicamente en dos porciones: la división simpática (toraco-lumbar) y la parasimpática (cráneo-sacra) (fig. 2). Ambas se originan en núcleos dentro del SNC y emiten fibras preganglionares eferentes que salen del tallo encefálico o la médula espinal y terminan en los ganglios motores. Las fibras simpáticas preganglionares salen del SNC a través de los nervios raquídeos torácicos y lumbares; mientras que las fibras preganglionares parasimpáticas salen del SNC a través de los nervios craneales, así como la tercera y cuarta raíces raquídeas sacras.

La mayor parte de las fibras preganglionares simpáticas terminan en ganglios situados en las cadenas paravertebrales, a cada lado de la columna vertebral y el resto de estas fibras preganglionares terminan en ganglios prevertebrales, por delante de las vértebras. A partir de estos, las fibras simpáticas posganglionares llegan a los tejidos inervados.

Las fibras parasimpáticas preganglionares terminan en ganglios parasimpáticos que se localizan fuera de los órganos inervados. La mayor parte de las fibras parasimpáticas terminan en células ganglionares distribuidas de manera difusa o en redes en el interior de las paredes de los órganos inervados. Es de importancia recordar en este punto que los términos simpático y parasimpático son de tipo anatómico y no dependen del tipo de transmisor químico que se libera en las terminales nerviosas, ni del tipo de efecto (excitador o inhibitor) que la actividad nerviosa induzca.

SISTEMA NERVIOSO AUTÓNOMO

Sistema Nervioso Parasimpático

Sistema Nervioso Simpático

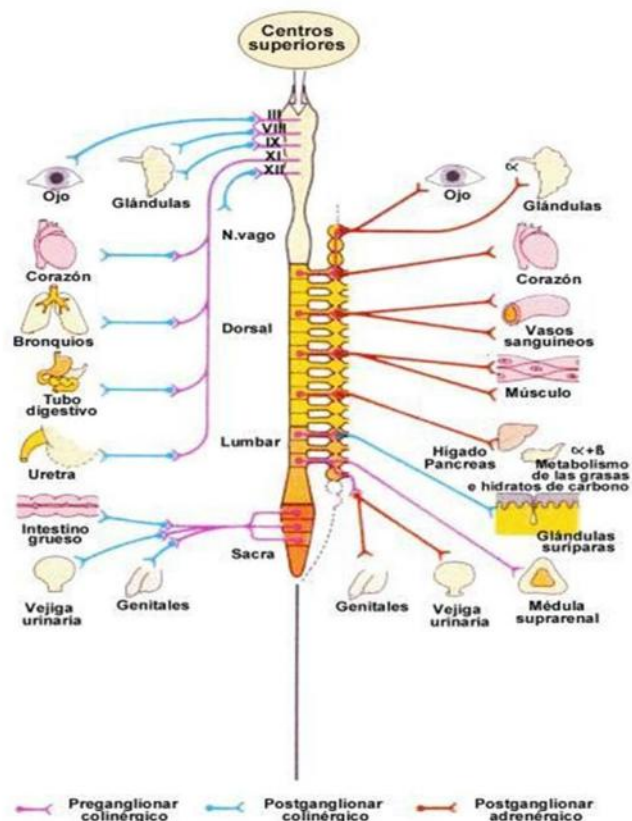


Fig. 2. Esquema que representa el sistema nervioso autónomo y sus divisiones parasimpática y simpática (<http://recursos.cnice.mec.es/biosfera/.htm>).

1.2 Neurotransmisores de las sinapsis del SNA

Los impulsos nerviosos desencadenan reacciones en músculo liso, cardíaco y estriado, glándulas exocrinas y neuronas postsinápticas, al liberar neurotransmisores químicos específicos.

1.2.1 Catecolaminas

Los nervios simpáticos tienen importancia en el control del sistema cardiovascular a través de la liberación de adrenalina y noradrenalina, las que actúan como hormona sistémica y como neurotransmisor, respectivamente. La noradrenalina es el transmisor de la sinapsis de los músculos lisos, inervados por neuronas motoras autonómicas simpáticas. La estimulación de estas neuronas periféricas aumenta la actividad cardíaca y de los órganos internos en las reacciones de lucha o huida. También se encuentra en las sinapsis del sistema nervioso central. La adrenalina es sintetizada y liberada a la sangre por la médula suprarrenal, órgano endocrino que tiene el mismo origen embrionario que las neuronas del sistema simpático. La adrenalina, la noradrenalina y el neurotransmisor relacionado dopamina, se sintetizan a partir de tirosina y su estructura química contiene un grupo catecol unido a una amina (fig. 3), por lo que se denominan catecolaminas. Los nervios que sintetizan y utilizan adrenalina o noradrenalina se denominan adrenérgicos (Lodish, *et al.* 2003).

En el sistema cardiovascular la adrenalina y la noradrenalina ejercen sus efectos por activación reversible de adrenoreceptores en membranas celulares del músculo liso vascular. Estas catecolaminas disparan respuestas inmediatas y también son capaces de promover acciones a largo plazo, tales como el crecimiento y proliferación. En las células del músculo liso vascular las

catecolaminas no solamente inducen contracción sino también influyen en la proliferación (García-Sáinz *et al.*, 1999).

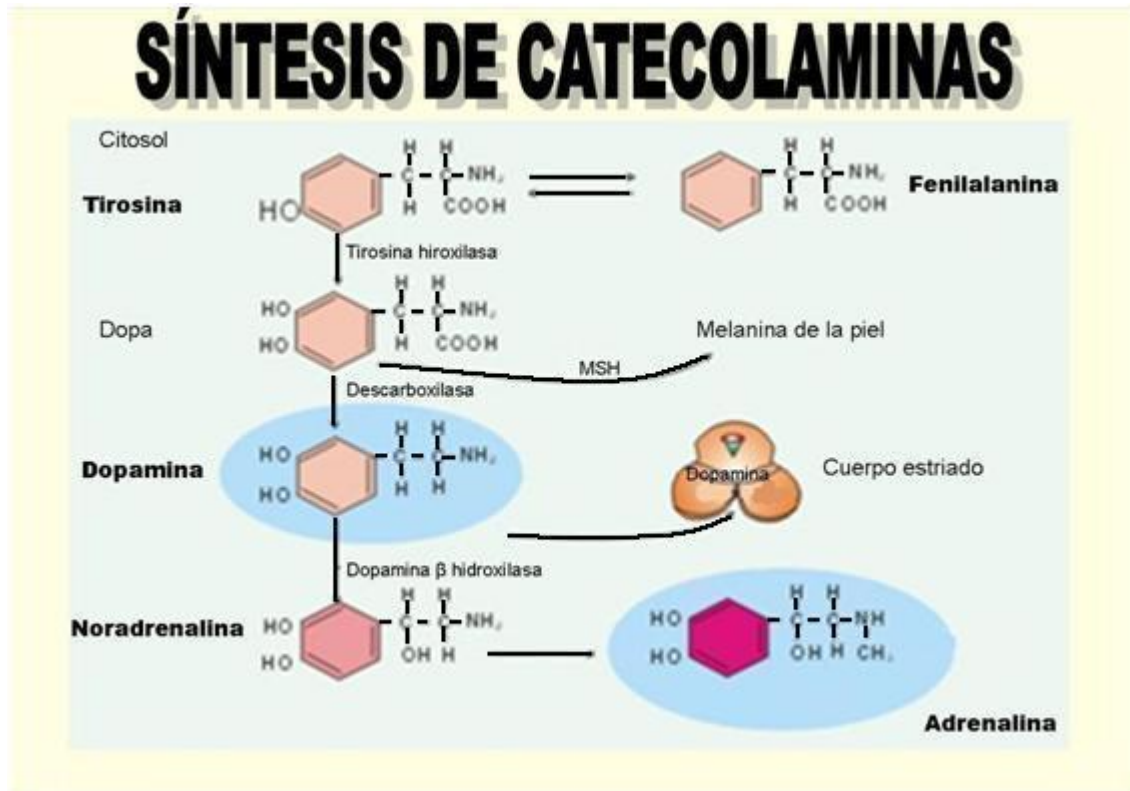


Fig. 3 Síntesis y estructuras de catecolaminas
Modificado de www.mfi.ku.dk/ppaulev/chapter30/images/30-5.jpg

1.3 Sistema cardiovascular

La función del sistema cardiovascular es suministrar sangre a los tejidos, proporcionar nutrientes esenciales para el metabolismo celular y eliminar los productos de desecho de las células. El corazón sirve como una bomba, que genera, por su contracción, la presión para impulsar la sangre a través de los vasos sanguíneos.

El sistema cardiovascular participa, además, en varias funciones homeostáticas: regula la presión arterial, transporta hormonas reguladoras desde sus puntos de secreción (glándulas endocrinas) hasta sus sitios de acción en los tejidos efectores y participa en la regulación de la temperatura corporal y, en estados fisiológicos alterados, como la hemorragia, el ejercicio y los cambios posturales, realizando los ajustes homeostáticos necesarios.

1.3.1 Vasos sanguíneos

Los vasos sanguíneos son las estructuras encargadas de transportar toda la sangre hasta las células. Se subdividen en arterias o vasos que transportan la sangre desde el corazón a otros órganos. Se caracterizan por disminuir progresivamente de diámetro y por subdividirse continuamente. Las venas, por su parte, son vasos que transportan la sangre desde los órganos hasta el corazón. A diferencia de las arterias, estos vasos se van uniendo progresivamente de modo que aumentan continuamente de diámetro. Finalmente los capilares son vasos que se encuentran en medio de las arterias y las venas.

La pared de los vasos sanguíneos consiste de tres capas: la íntima, la media y la adventicia. Los capilares, los cuales tienen solamente una capa íntima de células endoteliales descansando sobre una lamina basal, son la excepción. Respecto a la organización de las capas, se pueden distinguir cuatro bloques de construcción en la pared vascular: células endoteliales, fibras elásticas, fibras de colágeno y células de músculo liso. Además de estos componentes principales, fibroblastos, terminales nerviosas y células sanguíneas invaden la íntima y otros componentes extracelulares como proteoglicanos pueden estar presentes (Fig.4).

Las células endoteliales forman una sola capa continua que limita todos los segmentos vasculares. Las uniones complejas conservan las células endoteliales

juntas en arterias, pero son menos numerosas en venas. La organización de la capa de células endoteliales en capilares varia grandemente dependiendo del órgano.

Las fibras elásticas son como material de goma que explica casi toda la elasticidad de los vasos en la presión normal, y la elasticidad de otros tejidos como los pulmones. Tienen dos componentes: un centro de elastina y una cubierta de microfibrillas; el centro consiste de un polímero altamente insoluble de elastina, una proteína rica en aminoácidos no polares (glicina, alanina, valina, prolina). Después de ser secretado hacia el espacio intracelular, la elastina permanece en una configuración de cordones enrollados. Ellos se entrelazan covalentemente y ensamblan una red altamente elástica de fibras, capaz de estirarse más de 100% bajo condiciones fisiológicas. Las microfibrillas, están compuestas por glicoproteínas y tienen un diámetro aproximado de 10 nm, son similares a las encontradas en la matriz extracelular en otros tejidos. En las arterias, las fibras elásticas están arregladas como laminillas cilíndricas concéntricas. Una red de fibras elásticas es abundante por doquier excepto en los capilares verdaderos, vénulas y en las anastomosis arteriovenosas.

Las fibras de colágeno constituyen una cubierta de material mucho menos extensible que las fibras elásticas, como tejido entrelazado a los lados de la pared de un tubo de goma. La colágena puede ser distensible únicamente de 3-4% bajo condiciones fisiológicas. La unidad básica de las fibras de colágeno en vasos sanguíneos son moléculas tipos I y III, los cuales son colágeno fibrilar. Después de ser secretadas, estas moléculas de triple hélice se ensamblan en fibras que pueden ser de 10-300 nm de diámetro, estas a su vez se agregan en fibras de colágeno que pueden ser de algunas micras de diámetro y ser visibles con un microscópico de luz. Las fibras de colágeno están presentes a lo largo de la circulación excepto en los capilares. El colágeno y las fibras elásticas forman una red menos ordenada hacia la superficie interna de los vasos que en la superficie externa.

Células del músculo liso vascular, están presentes en todos los segmentos vasculares excepto en los capilares. En arterias elásticas, las células de músculo liso vascular se arreglan en espirales, mientras que en las arterias musculares, son arregladas en cualquiera de los dos anillos concéntricos o como hélices. Las células del músculo liso vascular relajadas no contribuyen apreciablemente a la tensión elástica de la pared vascular, la cual es principalmente determinada por la elastina y las fibras de colágeno. Las células del músculo liso vascular ejercen tensión, principalmente por contracción activa.

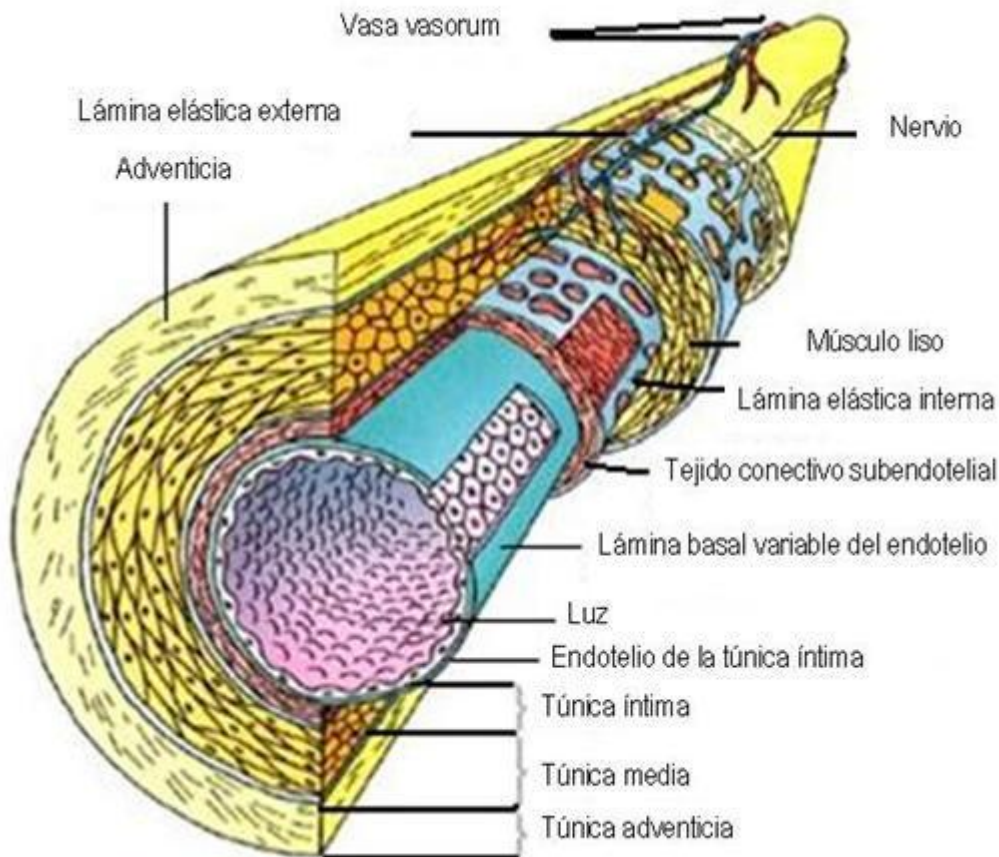


Fig. 4. Conformación microscópica histológica de las arterias.

1.4 Receptor

El concepto de receptor se originó a finales del siglo XIX con las observaciones independientes del médico y químico alemán Ehrlich y el fisiólogo inglés Langley, quienes encontraron que para que una sustancia activa produzca su efecto debe combinarse con un componente especial de la célula, la cual denominaron sustancia receptora.

En términos generales, un receptor es cualquier proteína a la que se fija una molécula extracelular específica (ligando), lo que inicia una respuesta celular (Lodish *et al.* 2004). El tipo de receptor y su mecanismo de acción determinan la naturaleza de la respuesta fisiológica y esta es específica del tipo de tejido y de célula.

Los receptores, por su ubicación, se clasifican en membranales e intracelulares, dentro de los primeros se consideran a los receptores acoplados a proteínas G, receptores - canales iónicos y receptores con actividad enzimática intrínseca.

Los receptores intracelulares, requieren que su ligando penetre a la célula y localice en el citoplasma o en el núcleo a su receptor, para generar un efecto celular de tipo genómico. Mientras tanto, los receptores acoplados a proteínas G, llevan a cabo su función a través de una serie de procesos bioquímicos que se desencadenan al interior de la célula, después que su ligando específico se une.

1.4.1 Receptores adrenérgicos

Los adrenoreceptores son un grupo heterogéneo de receptores que median acciones centrales y periféricas. Se localizan en la membrana celular, se activan por los agonistas noradrenalina y adrenalina produciendo una respuesta celular

(Docherty, 1998). Se dividieron en dos grandes categorías alfa (α) y beta (β) y más recientemente se subdividieron en tres familias α_1 , α_2 y β , basados en su farmacología, estructura y mecanismo de señalización (Bylund *et al.*, 1994). Cada una de las familias contiene tres o más subtipos y todos son miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G.

Los receptores α_1 -adrenérgicos constituyen una de las familias más ampliamente estudiadas, debido a su primordial importancia fisiológica en el control de la presión sanguínea, flujo sanguíneo, modulación neural, digestión, micción, respiración, reproducción, diámetro pupilar, procesos metabólicos y en la conducta (Docherty, 1998). En medicina, la familia de receptores α_1 -adrenérgicos es de particular interés terapéutico dado su importante papel en el control de la presión sanguínea (Piascik *et al.*, 1990; Blylund *et al.*, 1994; Minneman and Esbenshade, 1994).

1.4.2 Receptores α_1 -adrenérgicos

Se ha reportado que tres genes codifican los subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos (Cotecchia *et al.*, 1988; Schwinn *et al.* 1990; Lomasney *et al.*, 1991; Pérez *et al.*, 1991) conocidos como α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} . Los genes que codifican para cada subtipo son ADRA1C, ADRA1B y ADRA1D y se localizan en los cromosomas 8, 5 y 20, respectivamente (Alexander *et al.*, 2000).

Los receptores α_1 -adrenérgicos (α_1 -ARs) consisten de una única cadena polipeptídica que conforma 7 dominios transmembranales (Zhong *et al.*, 1999), constituidos de 20-28 aminoácidos hidrofóbicos conectados por asas hidrofílicas que se disponen alternadamente al ambiente intra y extra celular (Minneman and Esbenhade, 1994; Strader *et al.*, 1994; Bylund *et al.*, 1995; Gram. *et al.*, 1996; Guarino *et al.*, 1996). El extremo amino terminal de estos receptores esta localizado extracelularmente y contiene sitios consenso para glicosilación,

mientras el extremo carboxilo terminal esta localizado intracelularmente y contiene sitios consenso para fosforilación por algunas proteínas cinasas. La segunda y tercera asas intracelulares están probablemente involucradas en el acoplamiento de estos receptores con proteínas heterotriméricas G (García-Sáinz *et al.*, 1999). El número de aminoácidos que forman a cada uno de los receptores es de 466 para el α_{1A} , 519 para el α_{1B} y 572 para el α_{1D} en el humano y en rata 465, 515 y 560, respectivamente. Estos receptores poseen la característica de compartir una extensa secuencia homóloga de aminoácidos.

1.4.3 Localización celular

Clásicamente se ha pensado en los GPCRs como aquellos que, siendo expresados predominantemente sobre la membrana celular, son accesibles a los ligandos solubles en agua. Sin embargo, datos recientes han sugerido que la localización celular de GPCRs es más complicada que la previamente imaginada.

La distribución celular de α_1 -ARs en fibroblastos transfectados que expresan establemente cada uno de los subtipos, así como en cultivos primarios de células de músculo liso vascular, utilizando inmunotinción, revelaron que el receptor α_{1B} -AR es expresado predominantemente en la membrana celular, y que el subtipo α_{1A} -AR fue localizado en ambos regiones: intracelular y en la membrana. En tanto que el subtipo α_{1D} -AR fue pobremente detectado en la membrana celular. (Piascik M.T. and Perez D.M., 2001).

1.4.4 Proteínas G

Las proteínas G, heterotriméricas, están formadas por una subunidad α fijadora de GTP, que les confiere reconocimiento específico al receptor y al efector, un dímero de las subunidades β y γ que les confiere su ubicación en la membrana. Las proteínas G se unen a la cara citoplasmática de los receptores y estos responden a los agonistas provocando la fijación de GTP a la subunidad α . La GTP activa a la proteína G y le permite, a su vez, activar a la proteína efectora. La proteína G permanece inactiva hasta que hidroliza al GTP para formar difosfato de guanosina (GDP) y vuelve a su estado basal inactivo. Estas proteínas son transductores de señales que llevan información desde el receptor hasta una o más proteínas efectoras. Los receptores acoplados a proteínas G (GPCR), comprenden a los de varias aminas biogénicas, eicosanoides, péptidos hormonales, opiáceos, aminoácidos y muchos otros ligandos proteicos. Los efectores que son regulados por proteínas G comprenden enzimas como adenililciclase, fosfolipasa C, fosfodiesterasas y canales de iones de la membrana plasmática selectivos para Ca^{2+} y K^+ . Dado el número e importancia fisiológica, los GPCR constituyen objetivos muy utilizados para los fármacos, quizás la mitad de los fármacos que no son antibióticos están dirigidos hacia estos receptores (Buxton, 2007).

Los α_1 -AR interactúan con proteínas G de la familia $G_{q/11}$. Esto se hizo evidente al observar que $G_{\alpha q}$ o $G_{\alpha 11}$ pueden mediar la activación de fosfolipasa C inducida por cualquiera de los tres subtipos de receptores α_1 -AR (García-Sáinz *et al.*, 1999). Usando tecnología antisentido, se demostró que $G_{\alpha q}$ participa en la producción de fosfoinosítidos y movilización de calcio intracelular mediados por α_1 -AR, mientras que $G_{\alpha 11}$ está involucrada en el flujo de calcio mediado por α_1 -AR en miocitos del portal venoso de la rata (García-Sáinz *et al.*, 1999).

Hay también evidencia que las proteínas G, sensibles a toxina pertussis, participan mediando las acciones α_1 -adrenérgicas. Adicionalmente, se conoce que las proteínas $G_{\alpha o}$ interactúan con α_1 -ARs en la aorta de rata y que ellas pueden

participar mediando la contracción y la formación de inositolfosfato. Esto puede tener lugar a través de las subunidad α o del complejo $\beta\gamma$ de la proteína G (García-Sáinz *et al.*, 1999).

Una clase de proteínas G de alto peso molecular, llamada Gh ha sido descrita, las cuales parecen ser multifuncionales ya que poseen actividad transglutaminasa y de señalización. Evidencias adicionales mostraron que tales proteínas pueden mediar la activación de α_1 -AR a través de fosfolipasa C. Estas proteínas también parecen tener la capacidad de interactuar con los subtipos de receptores α_{1B} y α_{1D} pero no con α_{1A} .

1.4.5 Mecanismo transduccional

Los receptores α_1 -adrenérgicos están acoplados a proteínas $G_{q/11}$ para estimular la activación de la fosfolipasa C (PLC). Esta enzima cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5,-bisfosfato (IP_2) y la subsecuente formación de inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). Estas moléculas actúan como segundos mensajeros mediando la liberación intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$) y la activación de la proteína cinasa C (PKC), respectivamente (Fig. 5) (García-Sáinz *et al.*, 2000).

El Ca^{2+} se une a calmodulina y el complejo Ca^{2+} -calmodulina activa la cinasa de cadena ligera de miosina que fosforila a miosina. La miosina fosforilada puede entonces unirse a la actina, formar puentes transversos y generar tensión (Constanzo 2004).

Los tres subtipos de α_1 -AR clonados son capaces de generar fosfoinosítidos y señalizar con calcio. La diferencia parece existir en la efectividad con la cual los receptores activan esta ruta de señalización, sugiriendo variaciones en la actividad intrínseca entre los diferentes subtipos (García-Sáinz *et al.*, 1999).

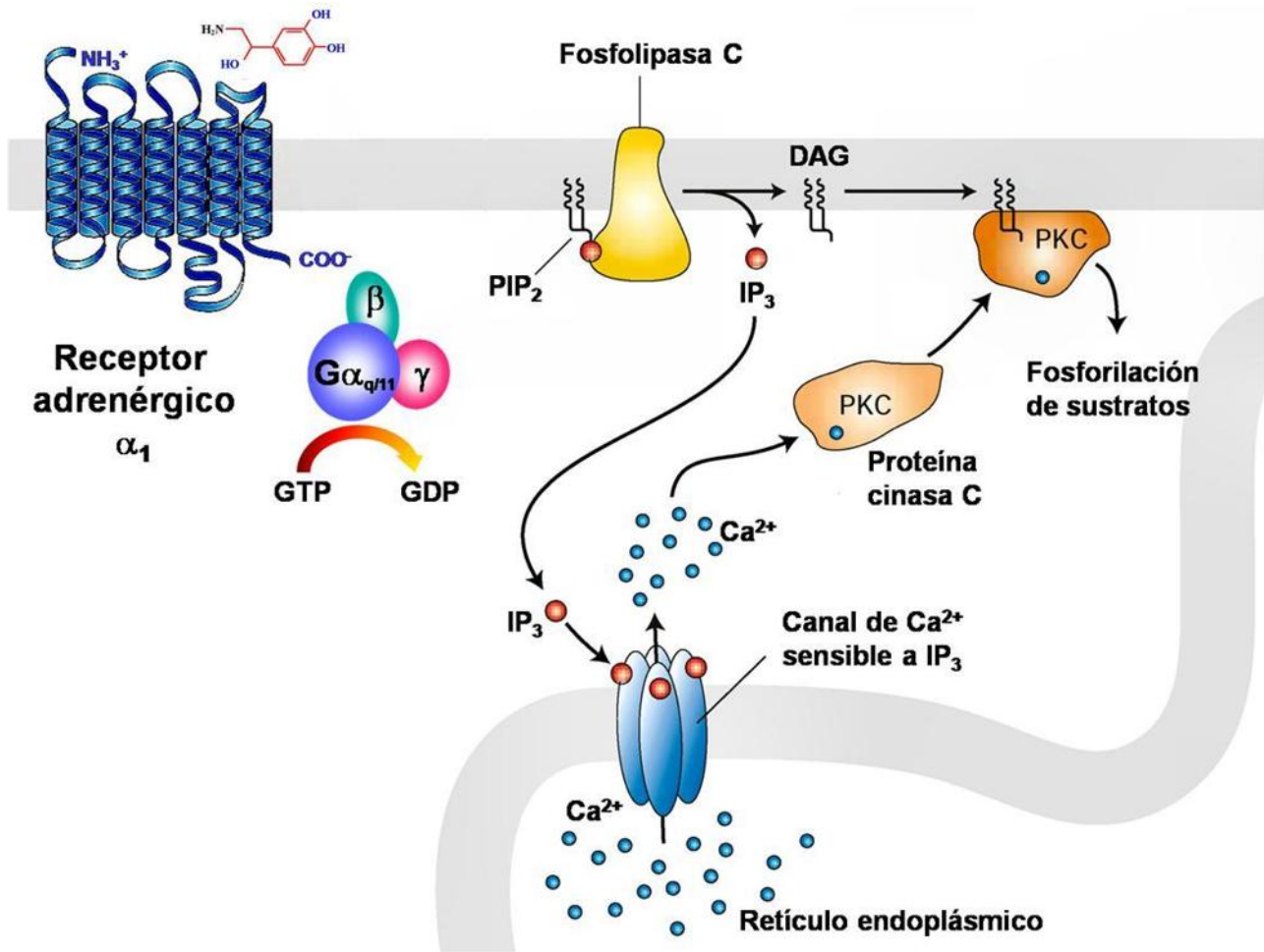


Fig. 5. Mecanismo de señalización transduccional para los receptores α_1 -adrenérgicos. Tomado y modificado de Godínez-Hernández 2005.

1.4.6 Señalización a nivel nuclear

Como se mencionó, se ha establecido que los α_1 -ARs están acoplados para señalar al generar fosfoinosítidos y liberación de calcio, sin embargo, esta ruta de señalización no explica completamente todas las acciones de los α_1 -ARs, dado

que su activación estimula múltiples vías, mismas que parecen involucrar diferentes proteínas G y depender del fenotipo de las células. Por esta razón, la señalización a nivel nuclear ha llegado a ser la principal área de investigación en años recientes.

Los α_1 -ARs, como otros receptores acoplados a proteínas G, activan respuestas mitogénicas en una variedad de tipos celulares y juegan un importante papel en la regulación del crecimiento y proliferación celular. Estudios realizados en cultivos de miocitos ventriculares de ratas neonatas, exhibieron que la estimulación con agonistas de α_1 -ARs induce hipertrofia y la sobre-expresión de una mutante constitutivamente activa del $\alpha_{1\beta}$ -AR en miocitos cardiacos conduce a hipertrofia miocárdica en animales transgénicos (Zhong et al., 1999). Otros hallazgos han exhibido que la activación de α_1 -AR mutantes que poseen actividad constitutiva son tumorigénicos, por lo que los genes de α_1 -AR podrían ser considerados como protooncogenes (García-Sáinz et al., 1999). En este sentido se ha observado que una acción inicial en respuesta a agentes que inducen el crecimiento y proliferación celular (hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento) es la expresión de genes tempranos como *c-fos* y *c-jun*. Esto ha permitido establecer que la activación de α_1 -ARs induce la expresión de *c-fos* y *c-jun* en una gran variedad de células incluyendo miocitos cardiacos, cultivos de células del músculo liso vascular de aorta de rata, hepatocitos y células transfectadas con diferentes subtipos de receptor. Los tres subtipos parecen ser capaces de inducir la expresión de *c-fos* y *c-jun*. La vía de señalización que incrementa la concentración de calcio intracelular y la activación de proteína cinasa C parecen estar participando (García-Sáinz et al., 1999)

Los α_1 -ARs estimulan la síntesis de DNA y la activación de proteína cinasa activadora de mitógeno (MAPK) involucrando la activación de fosfatidilinositol 3-cinasa vía una proteína G sensible a toxina pertussis.

1.4.7 Regulación de la función de receptor

Como hemos mencionado, los α_1 -ARs no solo median acciones fisiológicas, sino también toman parte en la patogénesis de enfermedades tales como hipertensión e hipertrofia prostática, por lo que el conocimiento de su estructura, función y regulación son importantes para las ciencias básicas y la práctica clínica diaria.

La modulación de la función de los receptores acoplados a proteínas G (desensibilización/resensibilización) es un evento clave en la adaptación de las células a los cambios en el medio interno de un organismo y al mantenimiento de la homeostasis. Entre los diferentes procesos celulares que parecen estar involucrados se incluyen receptores que desacoplan proteínas G, internalización, reciclaje a la membrana plasmática, degradación y regulación de la expresión genética del receptor, sucesos que ocurren en distinta temporalidad.

La atenuación de la función del receptor (desensibilización) es característica de los receptores acoplados a proteínas G y puede ser inducida por activación del mismo receptor (desensibilización homóloga) o de un receptor no relacionado (desensibilización heteróloga). Tales desensibilizaciones son asociadas a fosforilación del receptor y se ha sugerido a las cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) para la desensibilización homóloga y a las cinasas activadas por segundos mensajeros para la desensibilización heteróloga (García-Sáinz *et al.*, 2004)

Desensibilización homóloga en la cual únicamente los receptores activados por el agonista reducen su sensibilidad involucrando la fosforilación del receptor por GRKs y la unión a proteínas arrestina. Esto desacopla al receptor de la proteína G y aumenta su secuestro.

Desensibilización heteróloga en la cual la estimulación por un agonista atenúa la respuesta a un agente no relacionado, implicando principalmente fosforilación de receptores y otras entidades de señalización por diferentes cinasas incluyendo cinasas activadas por segundos mensajeros y receptores con actividad intrínseca de tirosina cinasa.

1.4.8 Función vascular de los receptores α_1 -adrenérgicos

En el sistema cardiovascular los receptores α_1 -adrenérgicos regulan la contracción cardiaca y arterial. En las arterias de ratas, se ha detectado la presencia de RNAm para los tres subtipos de α_1 -ARs, lo que demostró que los genes de estos se expresan; sin embargo, ensayos con radioligandos como marcadores, estudios funcionales y usando anticuerpos específicos contra los α_1 -ARs, para detectar su presencia en membrana permitió conocer que sólo 1 o 2 de los α_1 -ARs predominan en la contracción del músculo liso vascular. En este sentido, los receptores α_{1D} se expresan funcionalmente en las arterias aorta, carótida, mesentérica, iliaca, femoral y renal, donde median la contracción inducida por agentes adrenérgicos e *in vivo* tiene un importante papel en el control de la presión arterial. Además, en las arterias que expresan el subtipo α_{1D} como aquel predominante para la respuesta contráctil, pero no en los vasos sanguíneos que expresan al α_{1A} , se ha demostrado que existe una población de receptores constitutivamente activos, lo que quiere decir que los receptores no requieren noradrenalina para ser estimulados (Villalobos-Molina *et al.*, 2005), al parecer el subtipo α_{1D} posee una función moduladora, puesto que la respuesta contráctil del tejido a un estímulo adrenérgico puede ser sostenida cuando el agonista es removido, y de este modo prevenir cambios abruptos en el calibre de los vasos y consecuentemente cambios repentinos en el flujo de la sangre en respuesta a estímulos adrenérgicos (Gilbert *et al.*, 2002).

Avances en biología molecular han permitido la interrupción de genes y la consecuente generación de modelos de ratones “knockout”, los cuales se han utilizado para demostrar el papel fisiológico del receptor adrenérgico α_{1D} en el sistema cardiovascular, evidenciando que este receptor α_{1D} media la respuesta presora inducida por catecolaminas al regular, directamente, la vasoconstricción; adicionalmente se pudo establecer que la presión sanguínea de reposo en este mismo modelo es ligeramente menor que en sus controles silvestres, lo cual permitió sugerir el carácter constitutivo de este receptor en vasos sanguíneos de ratones (Tanoue *et al.*, 2002).

2 Antecedentes específicos

2.1 Hipertensión

La hipertensión es un problema de salud con consecuencias frecuentemente devastadoras, representa uno de los factores de riesgo más importantes para la arteriopatía coronaria y para los accidentes vasculares cerebrales; puede conducir a hipertrofia e insuficiencia cardíaca, disección aórtica e insuficiencia renal (Robins *et al.*, 2005). Se define como un aumento sostenido de la presión arterial $\geq 140/90$ mmHg, criterio que caracteriza a un paciente cuyo riesgo de afección cardiovascular relacionada con la hipertensión es lo bastante alto para ameritar atención médica (Brain *et al.*, 2007).

La presión arterial elevada suele provocarse por una combinación de varias anomalías (multifactorial). Pruebas epidemiológicas señalan que factores hereditarios, estrés y factores ambientales, así como alimenticios (aumento en el consumo de sal y disminución de potasio o calcio) contribuyen al desarrollo de la hipertensión. Esta patología afecta principalmente a adultos y ancianos.

Para el estudio de los mecanismos fisiopatológicos que subyacen a la enfermedad se han utilizado varios modelos experimentales; sin embargo, la rata espontáneamente hipertensa (SHR) generada por Okamoto & Oaki en 1963, semeja de manera aproximada los eventos cardiovasculares que ocurren en el ser humano, lo cual ubica a este modelo como la primera elección en el estudio de la hipertensión esencial humana.

Entre los factores que se han sugerido como involucrados en el desarrollo de la hipertensión en la rata SHR, un papel crítico es para el sistema simpático-adrenal,

con efectos sobre la reactividad de los vasos a la estimulación adrenérgica, el sistema renina-angiotensina y el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal.

2.1.1 Hipertensión: eventos vasculares

La hipertensión es una enfermedad caracterizada por incremento en la resistencia vascular periférica. A nivel vascular, se han asociado tres factores que contribuyen a la patogénesis de la hipertensión: *i*) cambios estructurales en la pared de los vasos sanguíneos, lo cual puede corresponder a un fenómeno adaptativo en respuesta a un incremento en la presión arterial, *ii*) la hipersensibilidad de los vasos a agentes vasoconstrictores, dada por la estimulación de receptores α_1 -adrenérgicos del músculo liso vascular, lo cual se ha sugerido como un elemento involucrado en el incremento y mantenimiento de la presión sanguínea en ratas SHR y otros modelos de hipertensión (Villalobos-Molina *et al.*, 1999) y *iii*) disfunción endotelial. Sin embargo, no se conoce si el incremento en la respuesta del músculo liso vascular a noradrenalina es un fenómeno que está relacionado a un incremento en el número de receptores α_1 y/o afinidad o cambios en eventos post-receptor, pues existe controversia en los resultados experimentales, ya que se han descrito: aumentos, disminuciones o inclusive, no cambios en la respuesta contráctil a la noradrenalina (Villalobos-Molina, *et al.*, 2005).

Como ya se ha mencionado, el músculo liso vascular expresa los tres subtipos conocidos de α_1 -ARs, es decir, α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} (Piascik *et al.*, 1994, 1995; Scofield *et al.*, 1995; Xu and Han, 1996), esta heterogeneidad de subtipos vasculares ha sido evidenciada por estudios farmacológicos y de biología molecular, mismos que ha permitido demostrar que el α_{1D} -AR está predominantemente involucrado en la respuesta contráctil de una variedad de arterias (Piascik *et al.*, 1995; Goetz *et al.*, 1995; Buckner *et al.*, 1996) y en este sentido, se ha sugerido su participación en el control de la presión sanguínea (Villalobos-Molina *et al.*, 1999).

Para establecer la participación de los α_1 -ARs que median la contracción en arterias de ratas normotensas y espontáneamente hipertensas, Villalobos-Molina y colaboradores, realizaron por primera vez un estudio funcional comparativo que demostró que los subtipos α_{1A} y α_{1D} se encuentran presentes en las arterias de ratas SHR y Wistar Kyoto (WKY) (Villalobos-Molina and Ibarra, 1996). En concordancia con esta hipótesis, otro reporte demostró que las arterias aorta y carótida de ratas WKY y SHR expresan predominantemente el subtipo α_{1D} , y las arterias mesentéricas expresan una mezcla de α_{1A} y α_{1D} en tanto que la arteria caudal expresa el subtipo α_{1A} ; al mismo tiempo que hubo hiper-reatividad en la respuesta inducida por noradrenalina de las arterias carótida y aorta de ratas SHR, sugiriendo que hay un mayor número de receptores α_{1D} y que este receptor está mejor acoplado a la maquinaria contráctil que el α_{1A} (Ibarra *et al.*, 1998). Más tarde, un estudio funcional *in vivo* conducido en ratas WKY y SHR descerebradas de 1 y 6 meses de edad, demostró la presencia de receptores α_{1D} en la vasculatura de ratas jóvenes pre-hipertensas, adultas SHR y su aparición relacionada con la edad en ratas adultas WKY. Lo que permitió sugerir que la presencia de este receptor en la resistencia vascular de ratas pre-hipertensas e hipertensas podría indicar que está involucrado en la patogénesis/mantenimiento de la alta presión sanguínea en ratas SHR. Además, el efecto presor inducido por fenilefrina en la vasculatura de ratas SHR fue mayor que en WKY, lo que podría indicar que el receptor α_{1D} está involucrado en la hiper-reatividad vascular (Villalobos-Molina *et al.*, 1999).

Por otro lado, la angiotensina II (Ang II), sintetizada por el sistema renina angiotensina (SRA) es otro elemento implicado en el proceso hipertensivo, en condiciones fisiológicas participa en la regulación de la presión arterial sistémica. La Ang II actúa como un potente vasoconstrictor para activar los receptores de angiotensina tipo AT_1 , sobre músculo liso vascular, afecta la remodelación vascular y cardíaca, la contractilidad cardíaca, el ritmo del pulso al incrementar el tono del sistema nervioso simpático (por liberación presináptica de noradrenalina), Los parámetros regulados por SRA, tales como la actividad de la renina

plasmática, concentraciones de angiotensinógeno y liberación de renina renal están elevados en ratas SHR jóvenes, lo que ha permitido sugerir que esto puede contribuir a la patogénesis de la hipertensión genética. En virtud de lo anterior, se ha cuestionado si existe una comunicación cruzada entre SRA y la vía adrenérgica periférica. Algunos trabajos dirigidos a resolver esta cuestión han evidenciado que en la vasculatura de ratas SHR de 4 semanas de edad se ha observado un incremento en la densidad de receptores α_1 -AR y Ang II antes del desarrollo de la hipertensión (Schiffin *et al.*, 1984). El efecto estimulante de Ang II sobre la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) de células del músculo liso vascular *in vivo* fue marcadamente disminuido por el co-tratamiento con prazosina un antagonista α_1 -adrenérgico. Otros estudios demostraron que altas dosis de captopril, un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (iECA), inhibió la hipersensibilidad de los vasos a fenilefrina, agonista α_1 -adrenérgico. Además, el bloqueo de SRA por medios farmacológicos con iECAs o antagonistas del receptor tipo AT₁ en ratas SHR jóvenes, puede atenuar o prevenir el desarrollo de la hipertensión (Villalobos-Molina *et al.*, 2005; Godínez-Hernández *et al.*, 2006).

Por otra parte, se demostró que la Ang II induce la expresión de α_1 -AR, principalmente del subtipo α_{1D} en células del músculo liso de aorta de rata (Hu *et al.*, 1995), y la activación de α_{1D} -AR incrementa la síntesis de proteínas en el músculo liso arterial (Faber *et al.*, 1997). Estos datos sugieren que la Ang II facilita la hipersensibilidad e hipertrofia del músculo liso aórtico a través de la expresión de α_{1D} -AR (Villalobos-Molina *et al.*, 2005).

2.1.2 Estatus endotelial y mediadores

Bajo algunas condiciones patológicas tales como la hipertensión, la relajación dependiente del endotelio esta deteriorada. La disfunción endotelial en la hipertensión presupone la disminución de factores relajantes como óxido nítrico

(NO), prostaglandina I₂ (prostaciclina, PGI₂) y el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), así como el aumento de factores contráctiles como prostaglandina H₂ (PGH₂), tromboxano A₂ (TxA₂) y otros prostanoides lo que implica la desregulación del tono vascular (Villalobos-Molina *et al.*, 2005). En la rata SHR se ha sugerido que la hipertensión es en parte, una causa del debilitamiento de la relajación dependiente del endotelio (Sekiguchi *et al.*, 2001). Reportes recientes proponen que existe contracción dependiente del endotelio que involucra la producción de especies reactivas de oxígeno, activación de ciclooxigenasa endotelial (COX-1), disfunción de un factor de contracción derivado del endotelio (EDCF) aún no identificado y la subsecuente estimulación de los receptores a tromboxano A₂ (receptores TP) localizados en las células del músculo liso (Lüscher & Vanhoutte 1986; AuchSchwelk *et al.*, 1990; Kato *et al.*, 1990; Ge *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 2002; 2003a, b; 2004). En este sentido Gluais y colaboradores identificaron a este EDCF como la prostaglandina I₂ (prostaciclina) (Gluais *et al.*, 2005).

2.2 Embarazo

El periodo de desarrollo fetal se llama embarazo o gestación, durante el cual las hembras gestantes exhiben un proceso de adaptación fisiológico, dando lugar a modificaciones a nivel anatómico, bioquímico y endocrino, mismos que se inician desde el momento de la concepción, y algunos de ellos persisten hasta después del alumbramiento.

2.2.1 Embarazo: efecto sobre el sistema cardiovascular

El embarazo normal está asociado con marcados cambios hemodinámicos como incremento del ritmo cardíaco, gasto cardíaco, volumen plasmático (Auger *et al.*, 2004) e incremento del flujo sanguíneo uterino y renal. Sin embargo, a pesar de estos incrementos, existe significativa disminución de la presión arterial y la

resistencia periférica (Khalil *et al.*, 1998; Clapp *et al.*, 1997; Sladek *et al.*, 1997). Además se presenta reducción en la sensibilidad presora del músculo liso vascular a la administración exógena de vasoconstrictores (Weiner *et al.*, 1997), tales como noradrenalina, adrenalina y angiotensina II, cuyo efecto presor es disminuido durante la gestación (Everett *et al.*, 1978; McLaughlin *et al.*, 1989; Raab *et al.*, 1956; Teeuw *et al.*, 1973). Adicionalmente se ha reportado que hay remodelación de la vasculatura que resulta en incremento en la distensibilidad (Osol *et al.*, 1993). Estas adaptaciones en el sistema cardiovascular materno ocasionan un incremento de 20-30 veces el flujo sanguíneo uteroplacentario e incremento de oxígeno y nutrientes necesarios para el desarrollo fetal. Cabe destacar que los mecanismos que podrían explicar tales modificaciones vasculares durante la gestación siguen siendo poco claros y contradictorios, razón por la cual se han sugerido varias hipótesis que pretenden explicar dicho efecto, entre las que se mencionan:

i. Oxido nítrico

Estos cambios hemodinámicos que experimenta el organismo materno han sido ligados a disminución en la constricción de los vasos sanguíneos y en la resistencia vascular periférica, lo que ha llevado a proponer que el incremento en la producción de vasodilatadores provenientes del endotelio tales como el óxido nítrico (ON), podría estar implicado en la adaptación asociada al embarazo. Como evidencia se ha encontrado que metabolitos del ON están elevados durante la gestación en la rata (Cronrad *et al.*, 1993). Así como en la aorta de rata preñada se identificó incremento del RNAm para la SONE (Goetz *et al.*, 1994) y la expresión proteica de SONE en el endotelio de arterias uterina y omental de ovejas (Magness *et al.*, 1997), en este mismo sentido, en la mujer embarazada se ha encontrado que la relajación dependiente de ON derivado del endotelio esta aumentada (Cochell *et al.*, 1997).

Ensayos de sensibilidad a noradrenalina *in vitro* en arterias uterina y carótida de cobayo, mostraron que las adaptaciones asociadas al embarazo son

específicas de la arteria uterina y que la reducción en la respuesta contráctil está relacionada con cambios en el endotelio vascular, cuyo modulador más importante es el factor de relajación derivado del endotelio (EDRF), el cual además se encuentra incrementado durante la gestación (Weiner *et al.*, 1991).

ii. Ambiente hormonal

Modificaciones en el sistema cardiovascular durante el periodo de gestación normal han sido también relacionadas a los cambios endocrinos, donde se ha propuesto que el estrógeno es el mediador potencial de los cambios vasculares inducidos por la gestación, dado su efecto establecido sobre la vasculatura y el incremento en su concentración durante el embarazo, así como su correlación con el aumento en la expresión de la sintasa de óxido nítrico endotelial (SONe) y por lo tanto el incremento de óxido nítrico (Zhang *et al.*, 2001). En este mismo contexto se sabe que el 17β -Estradiol ha mostrado incrementar el nivel de proteína de la SONE en cultivos de células endoteliales de aorta de bovino (Hishikawa *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1999).

Por otro lado, estudios funcionales demostraron atenuación en la sensibilidad a fenilefrina en arterias mesentéricas de ratas embarazadas, al mismo tiempo que ocurría un aumento en la sensibilidad a acetilcolina, ambos efectos se modificaron por el antagonismo de receptores a estrógenos, sugiriendo con ello que el óxido nítrico parece ser un factor determinante en la disminución de la respuesta presora a fenilefrina y al incremento en la sensibilidad a la relajación dependiente del endotelio durante el embarazo, y además, que los efectos mediados por óxido nítrico son estrógeno- dependientes (Zhang *et al.*, 2001).

iii. Prostanoides

Indiscutiblemente el endotelio desempeña un papel importante en la modulación de la resistencia vascular y del flujo sanguíneo, a través de su capacidad para producir tanto vasodilatadores como vasoconstrictores. Vasodilatadores como el ON y la prostaciclina I_2 (PGI_2) se hacen más

aparentes durante el embarazo, aunque existen reportes contradictorios. Ensayos funcionales llevados a cabo en anillos de arteria aorta de ratas gestantes, demostraron que el efecto vasoconstrictor inducido por fenilefrina se ve disminuido por efecto del embarazo y que esta atenuación es endotelio-dependiente, sin embargo, el tratamiento de los anillos con indometacina no alteró la respuesta, lo que les permitió sugerir que la atenuación de la respuesta contráctil durante el embarazo es dependiente del endotelio y la liberación de factores endoteliales responsables de esta alteración puede ser insensible a indometacina (Alomaka *et al.*, 1993). Por otro lado, comunicaciones más recientes, empleando ensayos moleculares, reportan que en cultivos de células endoteliales provenientes de arterias uterinas de ovejas preñadas, hay producción de vasodilatadores durante el embarazo asociada con incremento en la expresión del receptor a angiotensina II tipo AT₁, SONE, ciclooxigenasa 1 (COX-1) y fosfolipasa A₂ citosólica (cPLA₂) (Bird *et al.*, 2000). Además, en arteria aorta (segmento torácico y abdominal) y en la corteza y médula renales de ratas con 21 días de gestación, evaluaron la proteína de COX-1, COX-2 y SON III (SONe?), encontrando que en la rata embarazada hay un incremento de ambas isoformas de COX y de SON III en el segmento abdominal, mientras que no hubo cambio en COX-1 y COX-2 en la corteza y médula renales, en tanto que la SON III aumentó en la corteza renal, lo que sugiere que el embarazo no influye de manera homogénea en la totalidad de la arteria aorta y que un balance entre prostaglandinas y ON es responsable de la disminución en la reactividad vascular durante el embarazo en la rata (Bobadilla *et al.*, 2004)

2.3 Hipertensión y embarazo

Aunque se conoce que la hipertensión primaria es un factor de riesgo para el desarrollo de preeclampsia en mujeres, en animales de experimentación el embarazo es un potente antihipertensivo cuando se superpone a una variedad de modelos de hipertensión establecida en ratas, ya sea genética o inducida experimentalmente (Podjarny *et al.* 2004).

En modelos de hipertensión experimental y genética en ratas, invariablemente la presión sanguínea disminuye durante la gestación, por lo que se ha asociado este efecto a un fenómeno exclusivo del embarazo e independiente de la etiología de la hipertensión (Takeda, 1964). Hallazgos más recientes concuerdan con observaciones similares respecto al efecto hipotensor inducido por el embarazo en ratas SHR, aunque la disminución en los niveles de presión sanguínea ocurre tanto en gestantes normotensas como en hipertensas, la magnitud de descenso en la presión sanguínea sistólica parece ser mayor en SHR, además de presentar menor adaptación al volumen evidenciado por menor ganancia de peso y retención de sodio (Paracoli *et al.*, 2001).

Ensayos de la reactividad vascular a arginina⁸-vasopresina y noradrenalina en arteria mesentérica y vena porta de ratas Sprague-Dowley, Wistar Kyoto y SHR en el día 21 de gestación, han mostrado que la sensibilidad a ambos agentes vasoconstrictores es disminuida, observando que el efecto es similar en animales normotensos e hipertensos, lo que sugiere que el factor responsable de este fenómeno afecta al músculo liso vascular en arterias y venas (Massicotte *et al.*, 1987)

Cabe destacar que un alto porcentaje de los estudios realizados sobre el efecto que el embarazo induce en la reactividad vascular han sido enfocados a explicar el proceso de vasodilatación y no se ha explorado la participación de los receptores α_1 -adrenérgicos.

3 Planteamiento del problema

Se ha reportado que el receptor α_{1D} participan en la génesis y mantenimiento de la hipertensión, y que la angiotensina II aumenta la resistencia vascular e induce la expresión de receptores α_{1D} .

Por otro lado, conocemos que durante embarazo la presión sanguínea y la resistencia vascular disminuyen, independientemente del estado hipertensivo de la madre.

Por lo que resulta interesante explorar qué ocurre a nivel vascular con los receptores α_1 -adrenérgicos en la superposición de un proceso fisiológico a un estado patológico.

4 Hipótesis

El mecanismo que subyace a las respuestas vasculares en hembras gestantes hipertensas involucra una disminución en la respuesta adrenérgica mediada por los receptores α_{1D} .

5 Objetivos

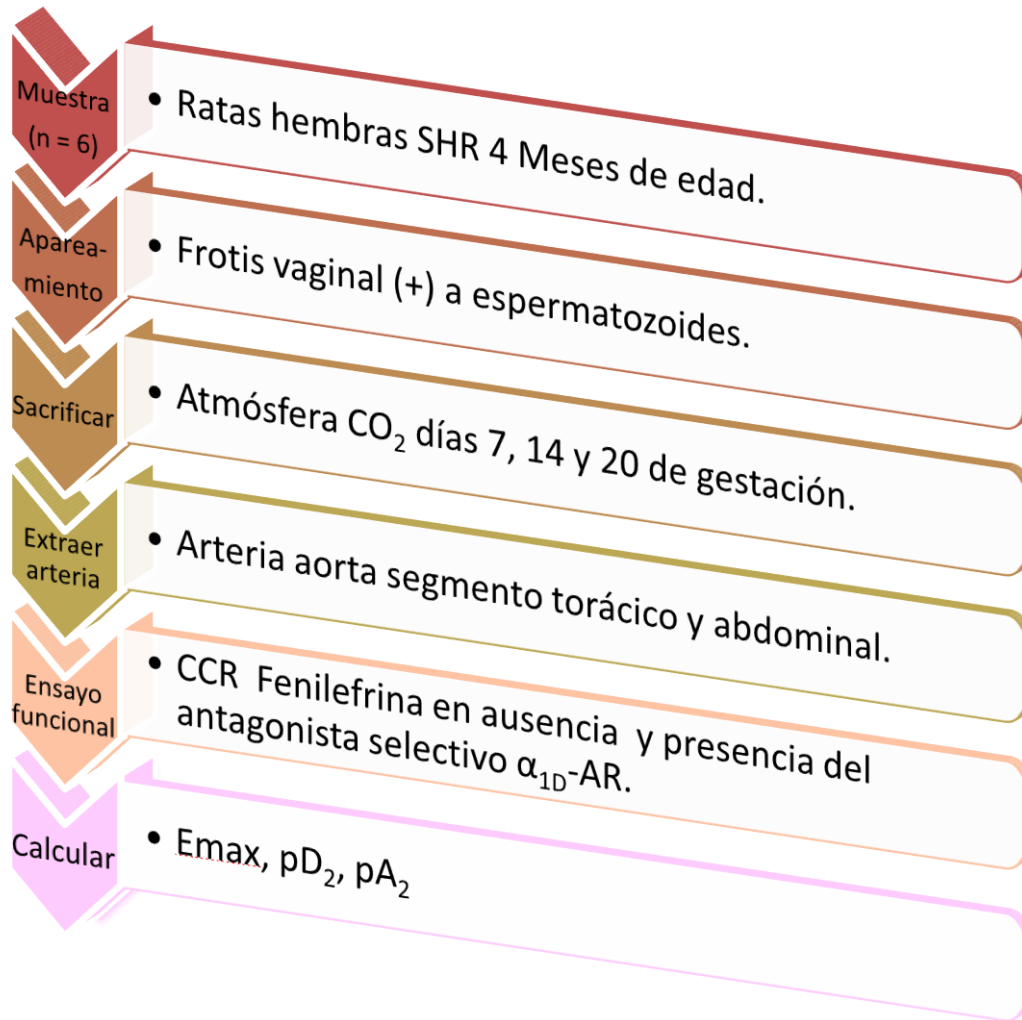
5.1 General

Evaluar la reactividad del músculo liso vascular inducida por estimulación de receptores α_1 -adrenérgicos en hembras gestantes que cursan con hipertensión crónica.

5.1.1 Particulares

- Determinar la respuesta contráctil inducida por fenilefrina en anillos íntegros de arteria aorta de rata SHR en diferentes periodos del embarazo.
- Evaluar la participación del receptor α_{1D} -adrenérgico en la respuesta contráctil.

6 Estrategia



7 Material y Métodos

7.1 Material biológico

Se emplearon ratas hembras vírgenes de las cepas SHR (donación de la FES-Iztacala, UNAM) y Wistar de 4 meses de edad como controles, los animales fueron alojados en cajas de policarbonato y mantenidas en condiciones controladas de temperatura y humedad dentro de un ciclo luz/oscuridad de 12/12 horas, así como alimento y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos se realizaron bajo la Norma Oficial Mexicana para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

7.2 Apareamiento

Las hembras fueron acopladas con machos Wistar fértiles normotensos y evaluadas diariamente para buscar la presencia de espermatozoides practicando un frotis en fresco, cuando este fue positivo se considero como el día uno de gestación, resultado que posteriormente fue confirmado por la observación de las crías *in utero*.

7.3 Preparación del tejido vascular

Los animales fueron sacrificaron bajo atmósfera de CO₂ a los 7, 14 y 20 días de gestación. Inmediatamente después de una laparotomía toraco-abdominal en la línea media se escindió la totalidad de la arteria aorta.

Las arterias se liberaron de tejido conectivo y grasa, se dividieron en sus segmentos anatómicos torácico y abdominal y se tomaron anillos de 4-5 mm de longitud, cada anillo se sujetó con ganchos de acero inoxidable y se fijó al fondo

de una cámara para órgano aislado de un extremo y del otro a un transductor de tensión isométrica Grass FT03 (Astromed, RI, USA), acoplado a un equipo de adquisición y digitalización de señales MP100 (BIOPAC INC. CA. USA). El tejido permaneció sumergido en 10 mL de solución de Krebs (concentraciones mM: NaCl, 118; KCl, 4.7; CaCl₂, 2.5; MgSO₄, 1.2; KH₂PO₄, 1.2; NaHCO₃, 25; EDTA, 0.026; Dextrosa, 11.6) y se mantuvo a 37°C, pH de 7.4, con oxigenación constante (O₂:CO₂, 19:1).

Una vez montado el tejido se le aplicó una tensión basal de 3 gramos y se procedió a realizar una prueba de viabilidad y sensibilización, durante la cual se expuso, 3 veces, a una concentración submáxima de fenilefrina (100 nM) y una vez que alcanzó la meseta de contracción, se lavó con solución de Krebs hasta que el trazo retornó a la basal. La tercera meseta de contracción fue precedida de una concentración de carbacol (1 μM) para determinar la integridad del tejido endotelial, la cual se consideró viable si este presentaba al menos un 60% de relajación. Finalmente el tejido se lavó con solución Krebs y se le dió un periodo de estabilización de 60 minutos recambiando la solución cada 20 minutos.

7.4 Curvas concentración respuesta

Se construyeron curvas concentración-respuesta acumulativas a fenilefrina (1 nM - 10 μM) con intervalos de medio logaritmo en presencia de propranolol (100 nM) y rauwolscina (100 nM), antagonistas adrenérgicos β y α₂, respectivamente, para obtener las curvas control. Una vez finalizada, el tejido fue lavado y estabilizado por 60 minutos, con lavados cada 20 minutos.

7.5 Participación del receptor α_{1D} -adrenérgico

Una vez que el tejido fue lavado y estabilizado se adicionó BMY 7378 (antagonista selectivo α_{1D}) en concentraciones de 3, 10 y 30 nM, se incubó por 30 minutos y se corrió nuevamente una curva concentración-respuesta acumulativa a fenilefrina en presencia de propranolol y rauwolscina.

7.6 Fármacos

Se prepararon soluciones frescas para cada experimento: fenilefrina, carbacol, rauwolscina, propranolol y BMY7378 (obtenidas de Sigma-Aldrich). Los fármacos fueron disueltos en agua destilada (solución madre) y las diluciones fueron preparadas en solución Krebs.

7.7 Análisis de datos

Los valores de pD_2 ($-\log CE_{50}$) y la contracción máxima fueron determinados por análisis de regresión no lineal usando el modelo de ajuste sigmoideal de las curvas concentración-respuesta, de acuerdo a la siguiente ecuación (Tallarida y Murray, 1981):

$$E = \frac{E_{max}[C]^m}{[C]^m + [CE_{50}]}$$

Donde:

E = Efecto farmacológico

[C]= Concentración del agonista

CE_{50} = Concentración del agonista que produjo el 50% del efecto máximo

E_{\max} = Asíntota del efecto máximo

m= Pendiente

El valor de pA_2 y las pendientes se obtuvieron por análisis de Schild (Arunlakshana & Schild, 1959), y en los casos que fue necesario el valor de pK_B fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación (Furchgott *et al.*, 1981)

$$pK_B = \frac{\sum_{i=1}^n \log (DR_i - 1)}{n} - \frac{\sum_{i=1}^n \log [B_i]}{n}$$

Donde:

DR_i = Relación de dosis (CE_{50} en presencia de antagonista/ CE_{50} en ausencia del antagonista)

1= Constante

$[B_i]$ = Concentración EC_{50} del antagonista

n= número de ensayos

Los datos son expresados como el promedio \pm EE (error estándar) de anillos de 4-6 diferentes animales por grupo. Los gráficos son expresados como el porcentaje de contracción para la comparación entre curvas

Un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) se usó para el análisis estadístico, seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls para comparación múltiple. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas con un valor de $p < 0.05$.

8 Resultados

8.1 *Curvas concentración respuesta*

Determinación de la reactividad vascular a la fenilefrina en anillos íntegros de aorta torácica y abdominal de ratas gestantes SHR y Wistar.

La fenilefrina indujo contracción en ambos segmentos anatómicos de la arteria aorta de ratas SHR y Wistar embarazadas, de manera dependiente de la concentración (Fig. 6).

La comparación a los 7 días de gestación entre segmentos anatómicos y entre cepas, permitió observar que el segmento abdominal es más reactivo que el segmento torácico de la aorta, sin alcanzar diferencias significativas en ninguna cepa; cuando comparamos el mismo segmento de diferente cepa encontramos que la parte torácica de la rata Wistar es más reactivo que el de SHR con $p < 0.05$ y que el segmento abdominal de rata Wistar también es más reactivo que el de SHR ($p < 0.05$, Tabla 1). Dado que el embarazo no es un proceso estático, cambios sucesivos han sido observados.

Las evaluaciones a los 14 días de gestación ponen de manifiesto que el segmento abdominal de Wistar continua siendo más reactivo que el torácico; sin embargo, esta diferencia no es estadísticamente significativa. En tanto que el segmento abdominal de SHR es más reactivo que el torácico de la misma cepa ($p < 0.05$). Mientras que no se encontraron diferencias estadísticas en la comparación de segmentos entre cepas, es decir, el segmento torácico de Wistar no es diferente del segmento torácico de SHR, y el segmento abdominal de Wistar tampoco es diferente del segmento abdominal de SHR (Tabla 2).

Las mediciones a los 20 días de gestación, evidenciaron una tendencia del segmento abdominal a ser más reactivo que el segmento torácico en ambas cepas, así como la tendencia del segmento torácico de la cepa Wistar a desarrollar mayor contracción, comparado con el de la cepa SHR. En tanto que la comparación entre los segmentos abdominales, la cepa Wistar por única vez presentó una ligera baja en la contracción a fenilefrina respecto a su homólogo en la cepa SHR. Sin embargo, ninguno de estos cambios alcanza valores significativos (Tabla 3). Aunado a estos resultados, los valores de pD_2 para la fenilefrina, calculados para cada cepa, segmento anatómico y durante los días de gestación evaluados, se mostraron consistentes (~ 7.1), lo que permite sugerir que el receptor α_1 -adrenérgico involucrado en la contracción inducida por fenilefrina es el mismo en ambas cepas, segmentos anatómicos y periodo de evaluación.

8.2 Participación del receptor α_{1D} -adrenérgico

Para confirmar que el subtipo α_{1D} está involucrado en la contracción, se desarrollaron experimentos con concentraciones crecientes de BMY7378, adicionados 30 minutos antes y durante las curvas a fenilefrina. Observamos que las curvas concentración-respuesta se desplazaron a la derecha por el BMY7378, de una manera dependiente de la concentración y el efecto máximo se alcanzó a los 7 días de gestación en el segmento torácico de ambas cepas y en el segmento abdominal de la SHR; mientras que el segmento abdominal de la rata Wistar desplazó a la derecha la curva a fenilefrina aunque este efecto no parece ser completamente claro (Figs. 7 y 8), probablemente debido a que en este segmento, existe participación importante de mediadores de origen endotelial que podrían estar comprometiendo la respuesta.

La evaluación a los 14 días de gestación evidenció un claro desplazamiento de la curva a fenilefrina, por efecto de BMY7378, de manera dependiente de la

concentración, en los segmentos torácico y abdominal de rata Wistar y en el abdominal de rata SHR, en tanto que el segmento torácico de rata SHR desplazó la curva a fenilefrina a la derecha, pero se obtuvo una caída no significativa de la respuesta contráctil que limita alcanzar el efecto máximo (Figs. 9 y 10), probablemente por desensibilización de los receptores.

En cuanto a los 20 días de gestación, el desplazamiento a la derecha de la curva a fenilefrina es muy claro en ambos segmentos de la cepa Wistar, en tanto en la cepa SHR es más evidente en el segmento torácico; mientras que en el abdominal el efecto máximo no se alcanzó, lo que reitera la posible desensibilización de los receptores adrenérgicos inducida por exposiciones sucesivas al agonista (Figs. 11 y 12).

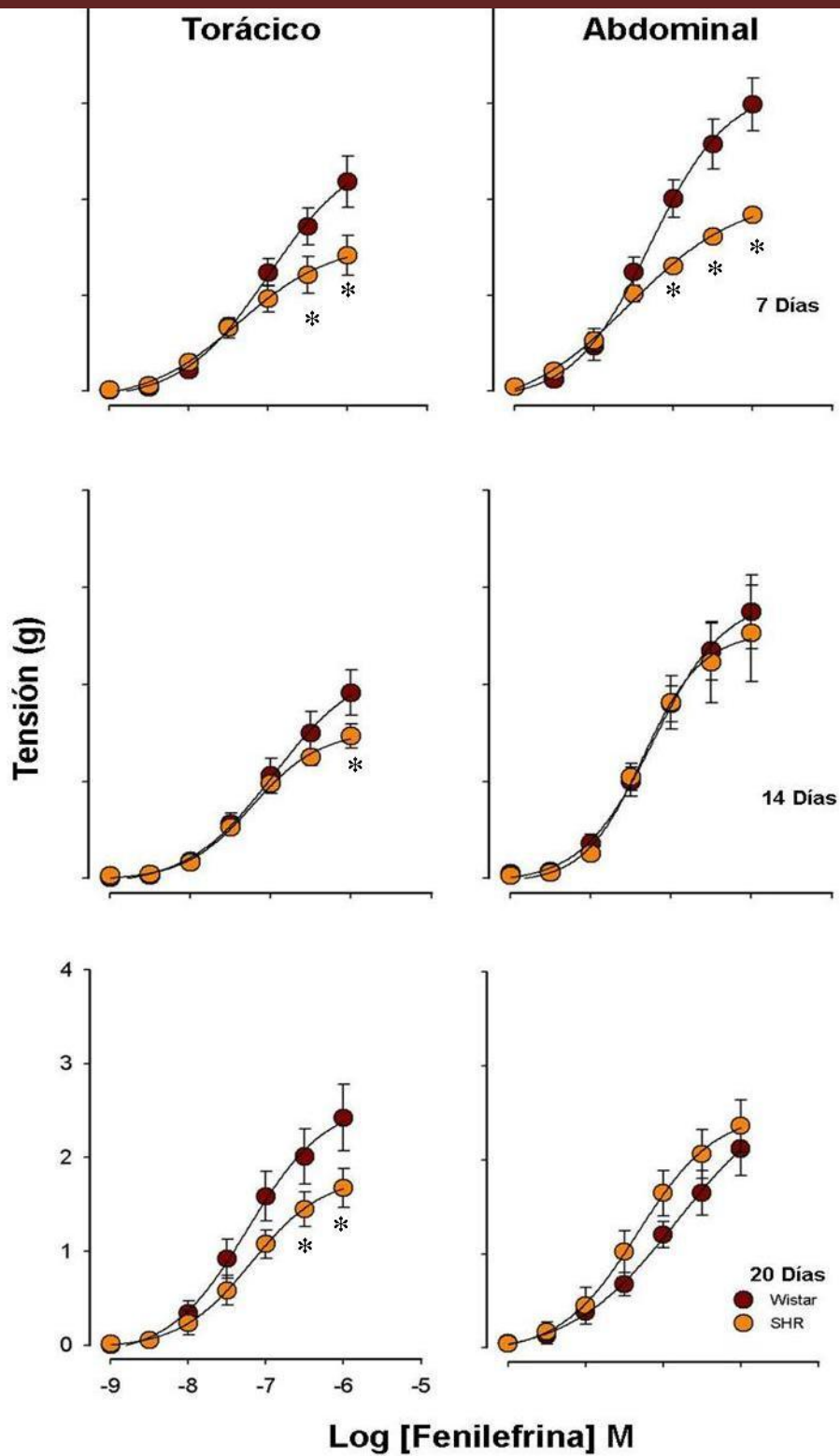


Fig. 6. Curva concentración-respuesta a fenilefrina (1 nM -10 μ M) en anillos íntegros de aorta, segmentos torácico y abdominal de ratas SHR y Wistar con 7, 14 y 20 día de gestación. Cada punto representa el promedio \pm EE de 4-6 experimentos, * p <0.05.

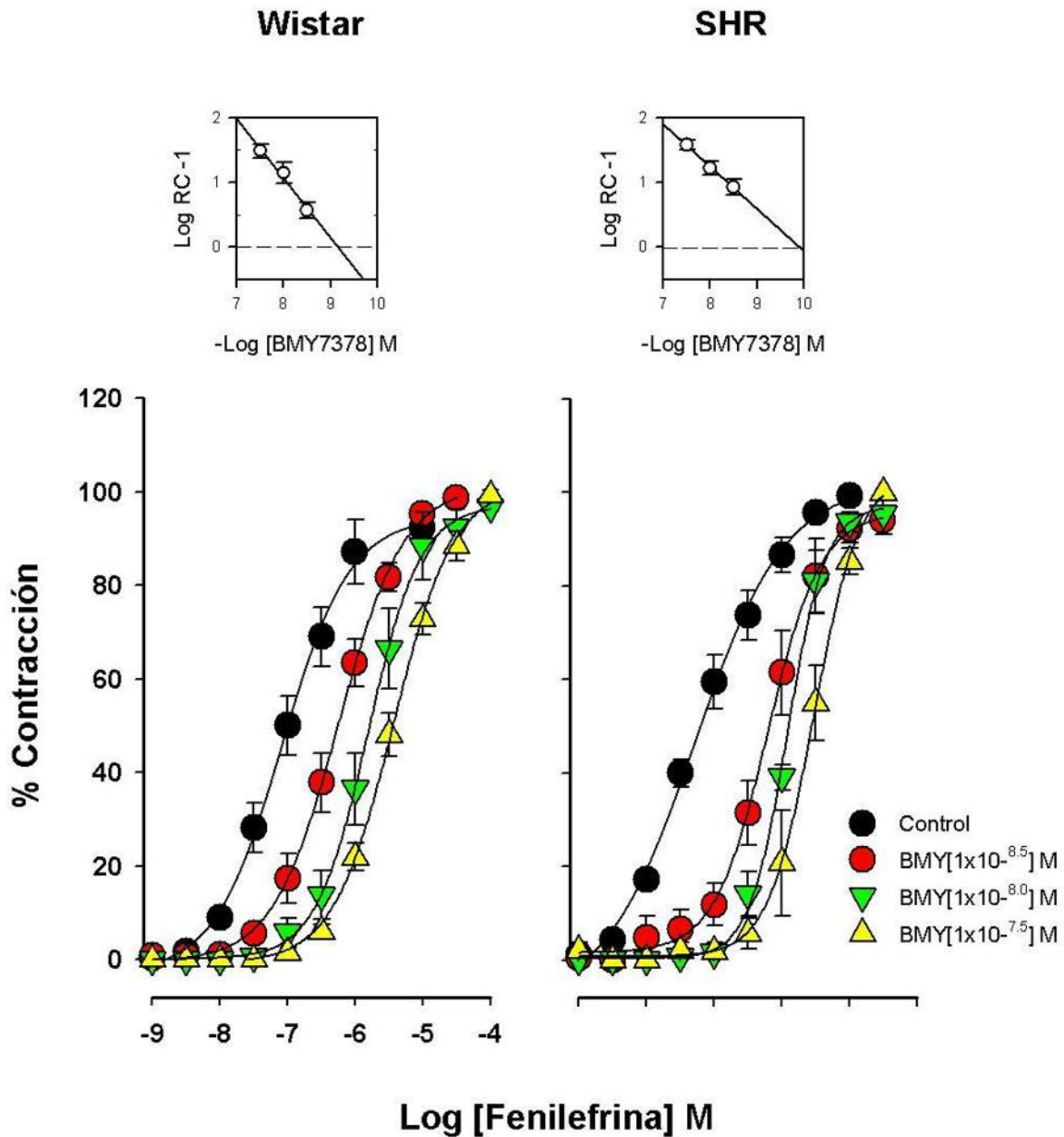


Fig. 7. Curvas concentración-respuesta a la fenilefrina y regresión de Schild (pA_2), en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de BMY7378 en arteria aorta segmento torácico de ratas Wistar y SHR con 7 días de gestación. Cada punto representa el promedio \pm E.E. de 4 diferentes experimentos.

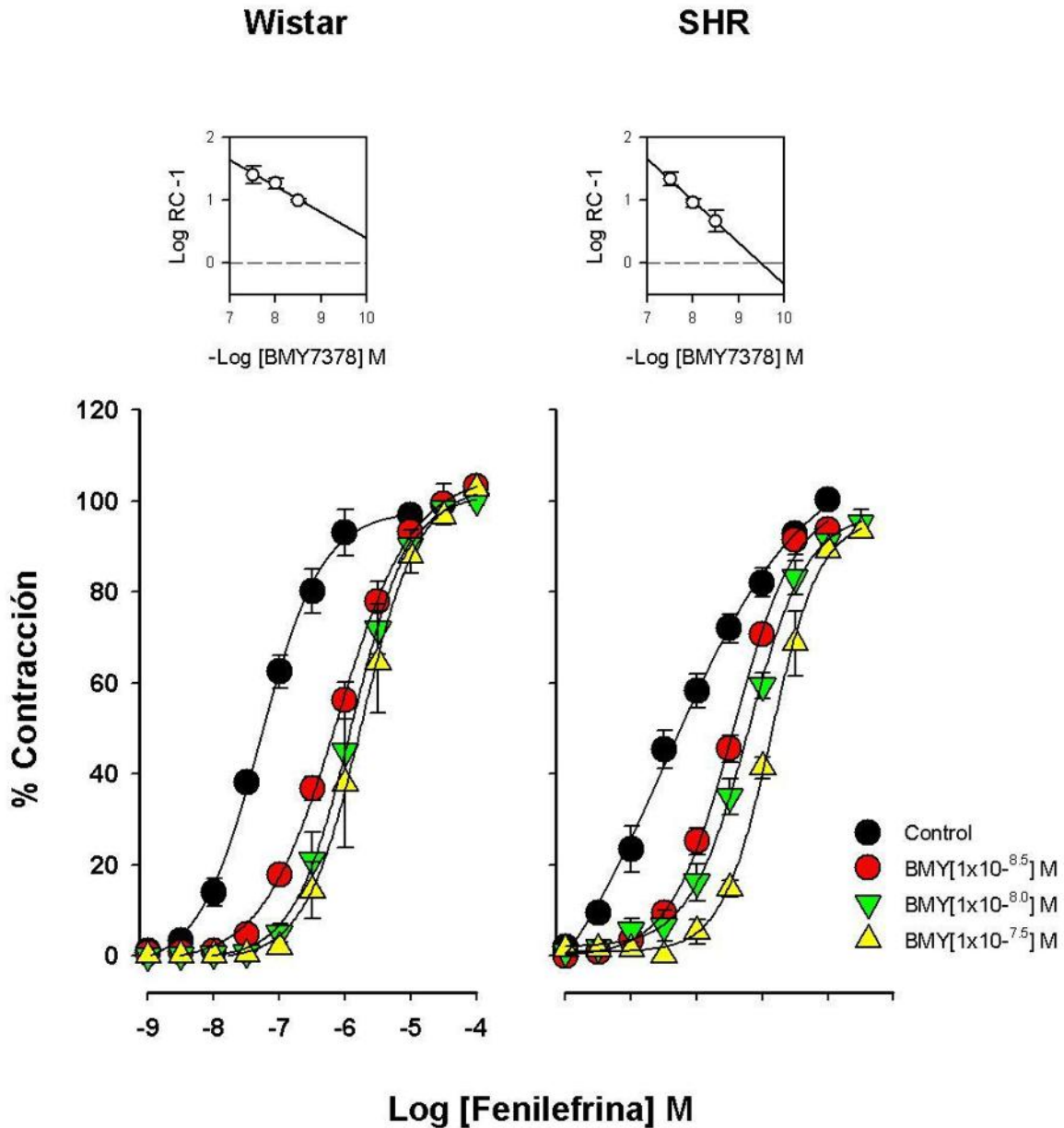


Fig. 8. Curvas concentración-respuesta a la fenilefrina y regresión de Schild (pA_2), en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de BMY7378 en arteria aorta, segmento abdominal de ratas Wistar y SHR con 7 días de gestación. Cada punto representa el promedio \pm E.E. de 4 diferentes experimentos.

	Segmento torácico		Segmento abdominal	
	Wistar	SHR	Wistar	SHR
E_{max} (g)	2.51 ± 0.26	1.67 ± 0.30*	3.24 ± 0.37	2.25 ± 0.07 [§]
pD₂	7.00 ± 0.20	7.16 ± 0.11	7.20 ± 0.06	7.20 ± 0.11
pA₂	9.16 ± 0.24	9.80 ± 0.40	-	9.49 ± 0.40
pK_B	-	-	7.15 ± 0.02	-

Tabla 1. Los valores representan los promedios ± EE del efecto máximo a la fenilefrina (E_{max}), afinidad del receptor por el agonista (pD₂) y afinidad del receptor por el antagonista BMY7378 (pA₂ o pK_B), en segmentos torácico y abdominal aórticos de ratas Wistar y SHR que cursan con 7 días de gestación. *p<0.05 Wistar vs SHR en el segmento torácico. [§]p<0.05 Wistar vs SHR segmento abdominal.

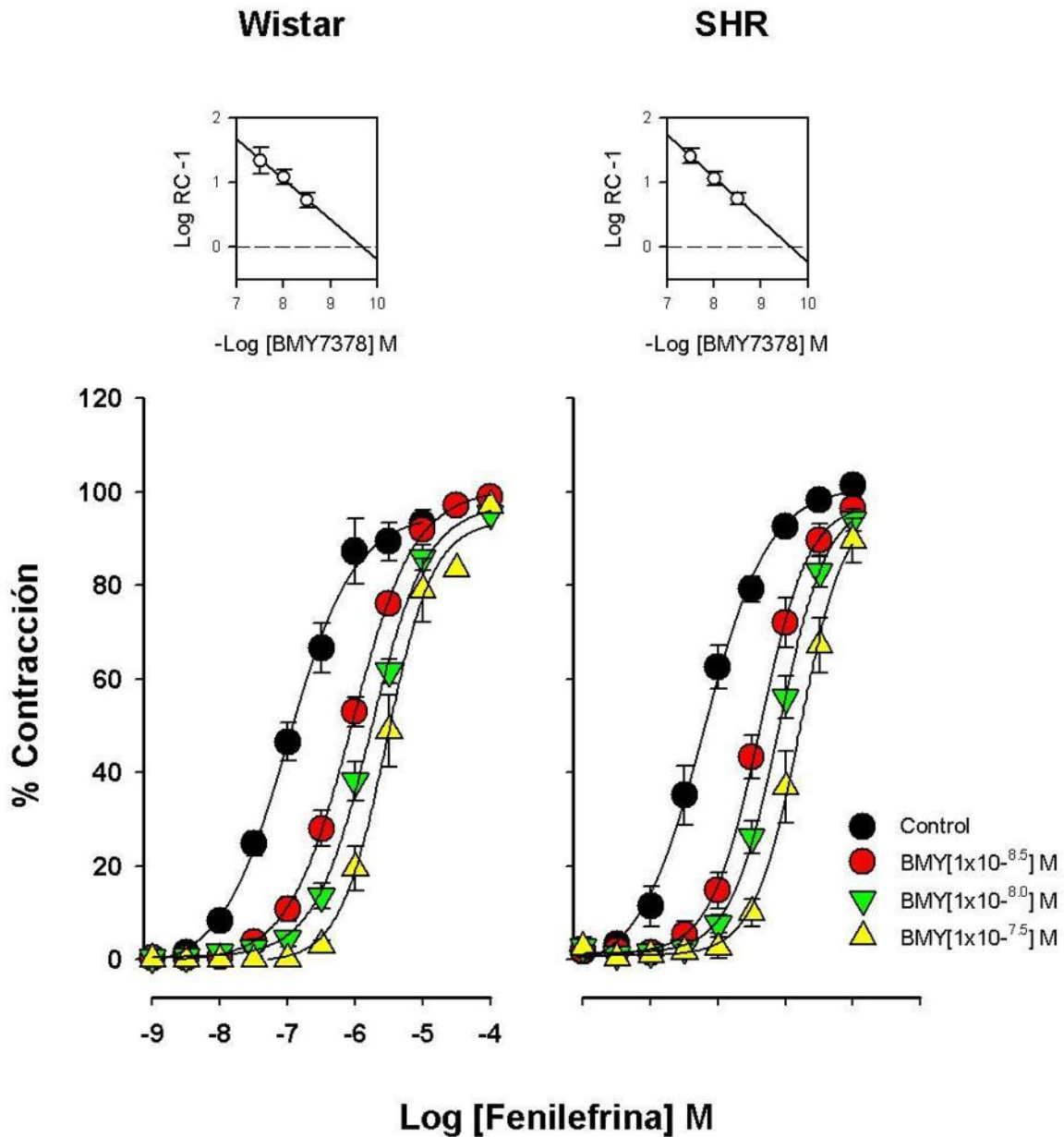


Fig. 9. Curvas concentración-respuesta a la fenilefrina y regresión de Schild (pA_2), en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de BMY7378 en arteria aorta, segmento torácico de ratas Wistar y SHR con 14 días de gestación. Cada punto representa el promedio \pm E.E. de 4-6 diferentes experimentos.

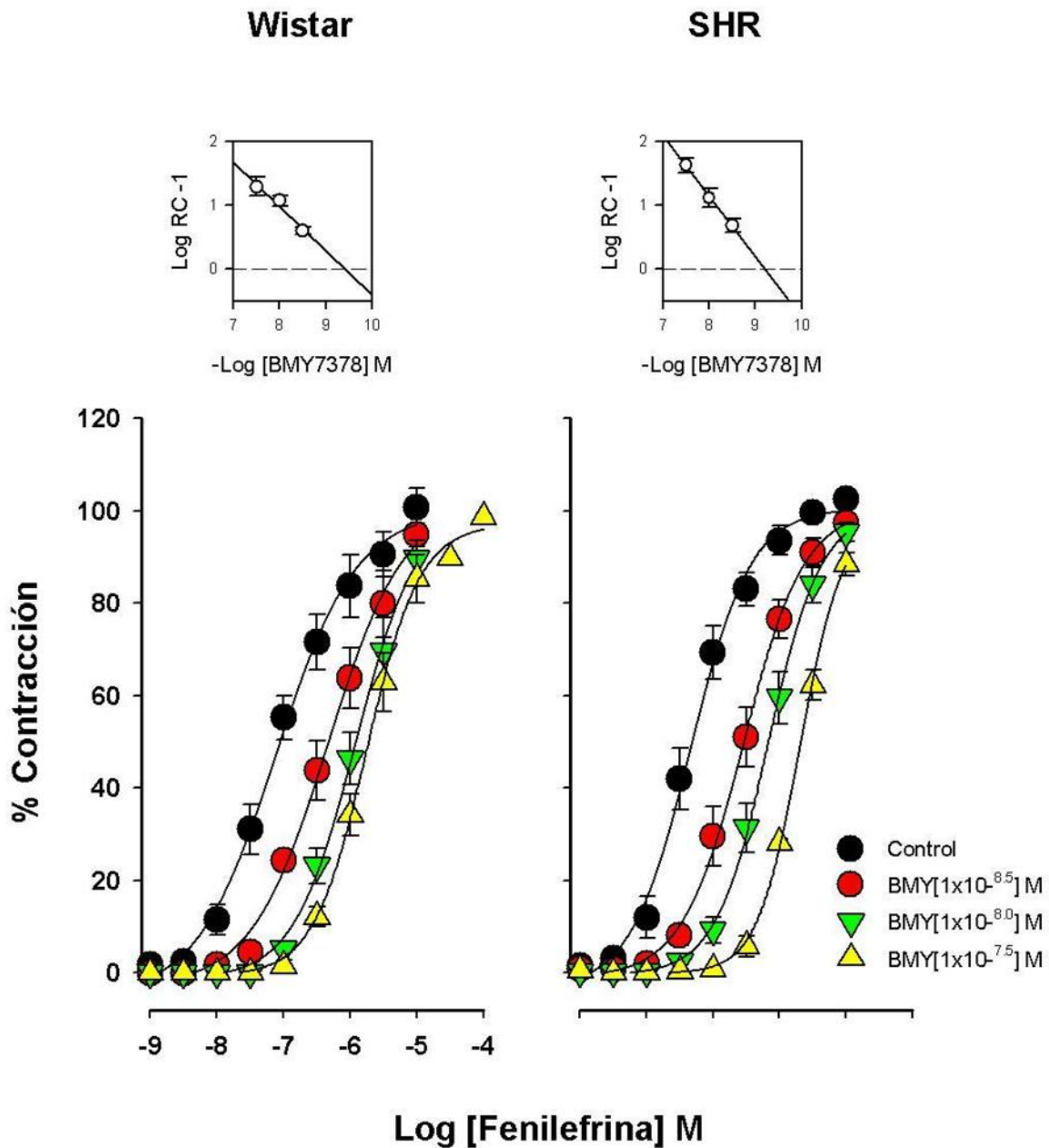


Fig. 10. Curvas concentración-respuesta a la fenilefrina y regresión de Schild (pA_2), en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de BMY7378 en arteria aorta, segmento abdominal de ratas Wistar y SHR con 14 días de gestación. Cada punto representa el promedio \pm E.E. de 3-4 diferentes experimentos.

	Segmento torácico		Segmento abdominal	
	Wistar	SHR	Wistar	SHR
E_{max} (g)	2.22 ± 0.26	1.59 ± 0.16	3.25 ± 0.18	2.74 ± 0.62*
pD₂	6.87 ± 0.11	7.20 ± 0.10	7.02 ± 0.12	7.31 ± 0.12
pA₂	9.69 ± 0.54	-	9.45 ± 0.38	9.21 ± 0.22
pK_B	-	7.15 ± 0.02	-	-

Tabla 2. Los valores representan el promedio ± EE del efecto máximo a la fenilefrina (E_{max}), afinidad del receptor por el agonista (pD₂) y afinidad del receptor por el antagonista BMY7378 (pA₂ o pK_B), en segmentos torácico y abdominal aórticos de ratas Wistar y SHR que cursan con 14 días de gestación. *p<0.05 segmento torácico vs segmento abdominal de SHR.

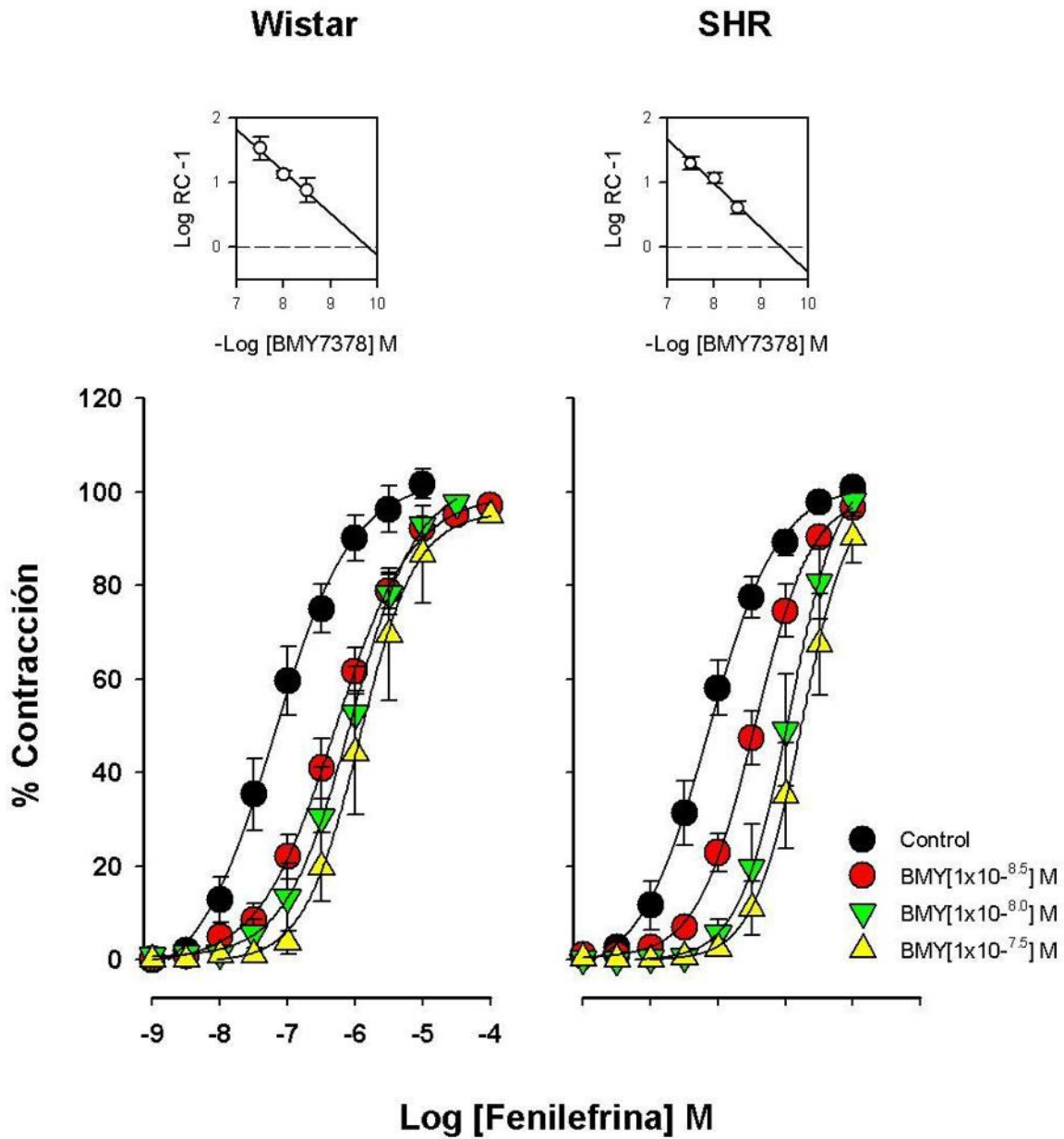


Fig. 11. Curvas concentración-respuesta a la fenilefrina y regresión de Schild (pA_2), en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de BMY7378 en arteria aorta, segmento torácico de ratas Wistar y SHR con 20 días de gestación. Cada punto representa el promedio \pm E.E. de 5 diferentes experimentos.

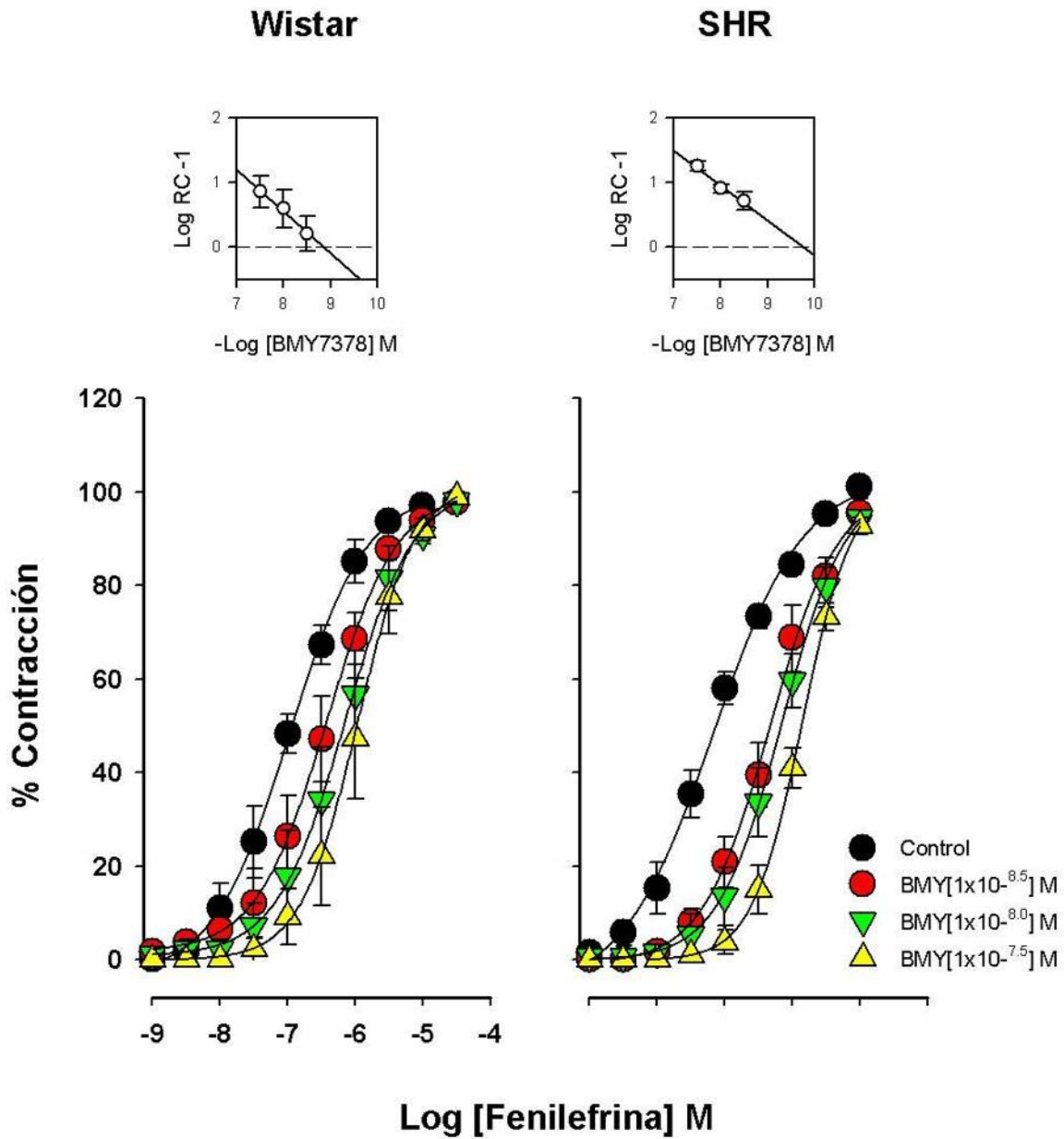


Fig. 12. Curvas concentración-respuesta a la fenilefrina y regresión de Schild (pA_2), en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de BMY7378 en arteria aorta, segmento abdominal de ratas Wistar y SHR con 20 días de gestación. Cada punto representa el promedio \pm E.E. de 4-5 diferentes experimentos.

	Segmento torácico		Segmento abdominal	
	Wistar	SHR	Wistar	SHR
E_{max} (g)	2.65 ± 0.29	1.90 ± 0.25	2.71 ± 0.19	2.77 ± 0.28
pD₂	7.15 ± 0.15	7.13 ± 0.10	6.93 ± 0.10	7.13 ± 0.10
pA₂	9.80 ± 0.6	9.26 ± 0.24	8.86 ± 0.52	-
pK_B	-	-	-	7.09 ± 0.02

Tabla 3. Los valores representan el promedio ± EE del efecto máximo a la fenilefrina (E_{max}), afinidad del receptor por el agonista (pD₂) y afinidad del receptor por el antagonista BMY7378 (pA₂ o pK_B), en segmentos torácico y abdominal aórticos de ratas Wistar y SHR con 20 días de gestación.

9 Discusión

El embarazo está asociado con reducción de la resistencia vascular y de la presión arterial en hembras normotensas e hipertensas, sin embargo, los mecanismos que subyacen a este fenómeno no han sido completamente aclarados.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el efecto que el embarazo ejerce sobre el músculo liso vascular es más acentuado en la cepa SHR, cuando comparamos el efecto de contracción máximo (E_{max}) inducido por la fenilefrina en anillos de músculo liso vascular íntegro de ambos segmentos anatómicos de la arteria aorta de ratas SHR y Wistar durante los 7, 14 y 20 días de gestación. Encontramos que la aorta de la cepa SHR es menos reactiva que la correspondiente de Wistar, en todos los tiempos, lo que se podría correlacionarse con reportes previos donde evaluaron la presión sanguínea sistólica durante la gestación en ratas hipertensas y normotensas y mostraron que en ambas cepas la presión sanguínea disminuye alrededor del día 17 de gestación; sin embargo, la magnitud del descenso es mayor en la cepa SHR (Paracoli *et al.*, 2001). En este mismo sentido, el ratón “knockout” para la SONE (hipertenso), evaluado durante el embarazo, reveló disminución en la presión arterial durante la gestación, alcanzando valores similares a los de ratones silvestres (Kalundavelu *et al.*, 2006).

A nivel molecular, la disminución en E_{max} podría estar asociada con cambios en la densidad de receptores α_1 -adrenérgicos o modificaciones en la eficacia de acoplamiento fármaco-receptor, en este sentido, Kenakin menciona que los fármacos con alta eficacia (agonista completo), como la fenilefrina, producen una respuesta máxima con una ocupación relativamente baja del receptor. No obstante, su respuesta puede verse afectada por cambios en la densidad del receptor y/o por alteraciones en la eficiencia de acoplamiento fenilefrina- receptor, por lo que podríamos sugerir que una disminución en la expresión de receptores

α_{1D} -adrenérgicos que media la respuesta contráctil de la arteria aorta de ratas SHR (Villalobos-Molina et al., 1996; Ibarra et al., 1998; Gisbert et al., 2002) o sobreexpresión de los subtipos α_{1A} y α_{1B} podrían estar disminuyendo la función de α_{1D} .

El análisis del efecto por región anatómica evidencia que el segmento abdominal es hiper-reactivo al compararlo con el torácico, en ambas cepas, probablemente este efecto se deba a cambios en las propiedades transduccionales del tejido lo que sugiere una respuesta regionalizada segmento-dependiente, que podría ser explicado por una mayor participación de mediadores vasoconstrictores provenientes del endotelio en el segmento abdominal, en este sentido algunos autores han mostrado que la contracción inducida por angiotensina II, en la aorta abdominal pero no en la aorta torácica de rata Wistar embarazada se potenció por un mediador de origen prostanoide y cuyo efecto fue abatido por la indometacina, además un aumento en la síntesis proteica de COX-1, COX-2 y SONE fueron demostrados (Ortiz, 2005; Bobadilla *et al.*, 2004-2005).

Reportamos además que, la sensibilidad a la fenilefrina esta disminuida durante la gestación, evidenciada por valores de afinidad a los 7 días de gestación (torácica: $pD_2=7.16 \pm 0.11$; abdominal: $pD_2=7.20 \pm 0.11$); 14 días de gestación (torácica: $pD_2=7.20 \pm 0.10$; abdominal: $pD_2=7.31 \pm 0.12$) y a los 20 días de gestación (torácica: $pD_2=7.13 \pm 0.10$; abdominal $pD_2=7.13 \pm 0.10$) para la rata SHR, en tanto que en la rata Wistar los 7 días de gestación (torácica: $pD_2=7.00 \pm 0.20$; abdominal: $pD_2=7.20 \pm 0.06$); 14 días de gestación (torácica: $pD_2=6.87 \pm 0.11$; abdominal: $pD_2=7.02 \pm 0.12$) y a los 20 días de gestación (torácica: $pD_2=7.15 \pm 0.15$; abdominal $pD_2=6.93 \pm 0.10$), interesantemente, estos datos fueron consistente es decir, no se observaron diferencias estadísticamente significativas durante la gestación entre cepas, segmentos anatómicos y ni durante todos los periodos evaluados. Sin embargo, comparado estos valores con los reportados por otros autores encontramos que en anillos de aorta sin endotelio, la afinidad para fenilefrina en la rata SHR ($pD_2=8.4 \pm 0.20$) (Godínez-Hernández *et*

al., 2006) y para la rata Wistar (torácica: $pD_2=7.74$; abdominal: $pD_2=7.35$), lo que está en correlación con investigaciones previas donde reportan que el embarazo está asociado con disminución en la respuesta vascular a noradrenalina (Weiner *et al.*, 1991; Chu, *et al.*, 1993; Kahalil *et al.*, 1998); además, prevalece disminuida la sensibilidad presora a la administración exógena de agentes vasoconstrictores, como noradrenalina, adrenalina y angiotensina II (Everett *et al.*, 1978; McLaughlin *et al.*, 1989; Raab *et al.*, 1956; Teeuw *et al.*, 1973), lo que podría explicarse en parte por una disminución en la densidad y/o la función de receptores que están mediando la respuesta contráctil, así como, la participación de mediadores endoteliales que pueden influir en la respuesta y su impacto sobre el tono vascular que está dado por el equilibrio que guardan las sustancias vasodilatadores y vasoconstrictoras en el lecho vascular.

Dado que las evidencias anteriores sugerían que una posible disminución del receptor α_{1D} -adrenérgico o una sobreexpresión de los subtipos α_{1A} y α_{1B} , evaluamos la participación del receptor α_{1D} como el mediador de la contracción inducida por la fenilefrina en la aorta de rata SHR, dado que está plenamente establecido el papel funcional que este subtipo α_{1D} posee sobre el tejido vascular aórtico (Villalobos-Molina *et al.*, 1996; Ibarra *et al.*, 1998; Tanoue *et al.*, 2002), así como la identificación de una población constitutivamente activa, a la cual se le ha atribuido desempeñar un papel modulador en la respuesta contráctil del tejido vascular a un estímulo adrenérgico, efecto que puede ser sostenido de manera independiente de ligando y de este modo prevenir cambios abruptos en el calibre de los vasos y consecuentemente cambios súbitos en el flujo sanguíneo y por lo tanto desempeñar un papel vital en el control de la presión arterial (Gisbert *et al.*, 2002).

Se sabe que el BMY 7378 es un antagonista selectivo de los receptores α_{1D} -adrenérgicos, que exhibe una afinidad del orden de 126 veces más selectivo para α_{1D} que para α_{1A} y 100 veces más selectivo para α_{1D} que para α_{1B} , (Goetz *et al.*, 1995). Por tal razón, ha resultado ser una herramienta útil para diferenciar entre

los subtipo de receptores α_1 -adrenérgicos. En este contexto, los resultados que mostramos aquí demuestran que el receptor α_{1D} media la contracción inducida por la fenilefrina en la aorta de ratas embarazadas de ambas cepas, hallazgo que se hizo aparente por encontrar valores de pA_2 altos para BMY 7378 que oscilaron entre 8.86 ± 0.52 - 9.80 ± 0.6 en la mayoría de los casos lo que demuestra una vez más el carácter funcional que desempeña este receptor. Sin embargo, valores de afinidad intermedios para BMY 7378 también fueron observados dentro de los días 7, 14 y 20 de gestación: la aorta abdominal de la rata Wistar ($pK_B=7.15 \pm 0.02$), la aorta torácica de rata SHR ($pK_B=7.15 \pm 0.02$) y la aorta abdominal de la SHR ($pK_B=7.09 \pm 0.02$), sugiriendo que: una población heterogénea de receptores está mediando la respuesta contráctil en estos lechos vasculares y estadios específicos de la gestación, lo que implicaría que el embarazo induce efecto sobre la síntesis proteica de receptores α_1 -adrenérgicos promoviendo regulación a la baja de los receptores α_{1D} y a la alta de los subtipo α_{1A} y/o α_{1B} . No obstante, evidencias controversiales han sido reportadas, así encontramos quienes concuerda que la disminución en la respuesta vasoconstrictora asociada al embarazo no está ligada a regulación a la baja de receptores a vasoconstrictores (Parent *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 2002) y quienes asumen que la gestación reduce la expresión de los receptores α_1 -adrenérgicos, específicamente del receptor α_{1D} (López *et al.*, 2007). Discrepancias que podrían ser debidas a la utilización de diferentes animales de experimentación y lechos vasculares. Lo que en este ensayo se hace evidente es la modulación de la función de los receptores α_1 - adrenérgicos, un evento clave en la adaptación de las células a los cambios en el medio interno de un organismo y al mantenimiento de la homeostasis. Entre los diferentes procesos celulares que parecen estar involucrados se incluyen fosforilación, internalización, reciclaje a la membrana plasmática, degradación y regulación de la expresión genética, sucesos que ocurren en distinta temporalidad (García-Sáinz *et al.*, 2004). En estas circunstancias se presenta atenuación de la función del receptor α_{1D} durante todos los tiempos de gestación evaluados en ratas SHR y Wistar lo que sugiere incremento en la actividad de la proteína cinasa C (PKC) lo que subsecuente llevaría a la fosforilación de receptores como un primer paso en la cascada de

eventos que regulan su función. Sin embargo, paradójicamente también está asociada con un incremento en la contracción del músculo liso vascular. En este contexto, se sabe que 6 isoformas de PKC (α , β _I, β _{II}, δ , ϵ , y ζ) han sido identificadas en la arteria uterina de ovejas embarazadas, presentando regulación a la alta para PKC- β y PKC- ζ y regulación a la baja para PKC- α y PKC- ϵ , estas últimas han sido implicadas en la contracción del músculo liso vascular favoreciendo un incremento en la sensibilidad al Ca^{2+} (Zhang *et al.*, 2006). Sin embargo, el desacoplamiento del receptor a su mecanismo de señalización transduccional, así como, la posibilidad de dimerización proteica entre receptores deben ser considerados, como probables mecanismos involucrados en la disminución de la función del receptor α_{1D} durante el embarazo.

Considerando las evidencias reportadas aquí, parecen indicar que un proceso de desensibilización de receptores α_{1D} -adrenérgicos está activamente operando. Además, valores intermedios en la afinidad por BMY 7378 fueron observados, efecto que podría ser atribuido a la participación de mediadores endoteliales, así como, un incremento en la expresión en los receptores α_{1A} y/o α_{1B} . Sin embargo, en este estudio estamos limitados para asignar un peso específico a cada uno de estos elementos por lo cual más estudios deberán realizarse. No obstante, estas variaciones permitieron observar que el embarazo es un proceso dinámico con constantes cambios y finos ajustes, que a la postre conducen a la conclusión exitosa del desarrollo fetal.

Finalmente, basados en nuestra observación y algunos puntos de la literatura, sugerimos que la desensibilización de los receptores α_{1D} -adrenérgicos facilita la vasodilatación reduciendo la resistencia vascular y favoreciendo el descenso de la presión sanguínea durante el embarazo.

10 Conclusiones

El embarazo induce disminución en la sensibilidad a la fenilefrina en el músculo liso vascular aórtico.

Existe una regulación diferencial en el tono vascular dependiente del segmento de la aorta, es decir, hay respuestas regionalizadas.

El receptor adrenérgico α_{1D} es el principal responsable de mediar la respuesta contráctil del músculo liso vascular de la arteria aorta de ratas SHR y Wistar durante el embarazo.

La rata SHR posee la capacidad de adaptarse a las condiciones vasculares propias del embarazo, a través de la disminución en la resistencia vascular, que puede deberse a la desensibilización de los receptores α_{1D} -adrenérgicos, al desacoplamiento de éstos de sus vías transduccionales o a una disminución en el número de receptores. Sin embargo, las posibilidades anteriores deben probarse experimentalmente.

11 Perspectivas

Cuantificar la cantidad de proteína y de RNA mensajero del receptor α_{1D} -adrenérgico en la arteria aorta de ratas SHR y Wistar gestantes.

Evaluar la participación de los mediadores endoteliales involucrados en los cambios adaptativos durante el embarazo en ratas SHR y Wistar.

Explorar la posible formación de homo/heterodímeros entre los receptores α_1 -adrenérgicos y su influencia sobre la modulación de la respuesta contráctil del músculo liso vascular durante el embarazo.

12 Referencias

1. Alexander, S.P.H. and Peters, J.A. 2000. Receptor and Ion Channel Nomenclature Supplement. Trends in Pharmacological Sciences.
2. Aloamaka CP, Ezimokhai M, Cherian T, and Morrison J. 1993. Mechanism of pregnancy-Induced attenuation of contraction to phenylephrine in rat aorta. *Experimental Physiology*. 78:403-410.
3. Arunlakshana O. & Schild HO. 1959. Some quantitative uses of drug antagonists. *Br. J. Pharmacol.* 14:48-58.
4. Auch-Schwelk W, Katusic ZD & Vanhoutte PM. 1990. Tromboxane A₂ receptor antabonists inhibit endothelium-dependent contractions. *Hypertension*. 15:699-777.
5. Auger K, Beauséjour A, Brochu M, and St-Louis J. 2004. Increased Na⁺ intake during estation in rats is associated with enhanced vascular reactivity and alterations of K⁺ and Ca²⁺ function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287:G1848-H1856.
6. Bird IM., Sullivan JA., Di T., Cale J M, Zhang L, Zheng J, and Magness RR. 2000. Pregnancy-Dependent Changes in Cell Signaling Underlie Changes in Differential Control of Vasodilator Production in Uterine Artery Endothelial Cells. *Endocrinology* 141: 1107–1117.
7. Bobadilla RA, Bracho I, Pérez VM, Anguiano L and López P. 2004. Pregnancy Induced Changes in Cox-1, Cox-2 and NOSIII Vascular and Renal Expression. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 47:25-27.
8. Brain B, and Hoffman. Cap. 32. Terapéutica de la hipertensión. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la Terapéutica. Ed. 11. Edit. Mc GrawHill. México. 2007. P.845.
9. Buckner SA, Oheim KW, Morse PA, Knepper SM, Hancock AA. 1996. α_1 -adrenoceptors-induced contractility in rat aort is mediated by the α_{1D} subtype. *Eur. J. Pharmacol.* 2797:241-248.

-
10. Buxton I.. Cap. 1. Farmacocinética y Farmacodinamia.. Goodman & Gilman. Las Bases farmacológicas de la Terapéutica. Ed. 11. Edit. McGraw Hill. México. 2007. P.28.
 11. Bylund DB, Regan JW, Faber JE, Hieble J, Triggle CT and Ruffolo RR Jr. 1995. Vascular α -adrenoceptors: From the gene to the human. *Can J Physiol Pharmacol.* 73:533-543.
 12. Bylund DB. Eikenberg, D.C., Hieble, J.P., Lange, S.Z., Lefsoowitz R.J. Minneman KP. Molinoff P.B. Ruffolo R.R. Jr. Trendelenburg U. 1994. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol. Rev.* 46, 121-136.
 13. Chu ZM, & Beilin LJ. 1993. Mechanism of vasodilatation in pregnancy: studies of the role of prostaglandins and nitric-oxide in changes of vascular reactivity in the in situ blood perfused mesentery of pregnant rats. *Br. J. Pharmacol.* 109:322-329.
 14. Clapp JF., III and Capeless E. 1997 Cardiovascular function before, during, and after the first and subsequent pregnancies. *Am J Cardiol* 80: 1469-1473.
 15. Cockell AP and Paston L. 1997. Flow-mediated vasodilatation is enhanced in normal pregnancy but reduce in preeclampsia. *Hypertension* 30: 247-251.
 16. Conrad KP., Joffe GM, Kruszyna H, Kruszyna R., Rochelle LG, Smith RP, Chave JE, and Mosher MD. 1993. Identification of increased nitric oxide biosynthesis during pregnancy in rats. *FASEB J* 7: 566-571.
 17. Constanzo L. Cap. 1. Fisiología Celular. Fisiología. Ed.1^a. Edit. McGraw-Hill Interamericana. México. 2004. P. 40.
 18. Cotecchia S. Schwinn DA., Rnadall RR. Lefkowitz RJ., Caron MG and Kobika BK. 1988. Molecular cloning and expression of the cDNA for the hamster α_1 – adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85:7159-7163.
 19. Docherty JR. 1998. Suptypes of functional α_1 and α_2 -adrenoceptors. *Eur J Pharmacol.* 306 :1-15.
 20. Dogterom J and De Jong W. Diminished pressor response to noradrenaline of the perfused tail artery of pregnant rats. 1974. *Eur J Pharmacol* 25 :267-269.
-

-
21. Everett RB, Worley RJ, MacDonald PC, Chand S, and Gant NF. 1978. Vascular reactivity in angiotensin II in human pregnancy. *Semin. Perinatol.* 2:3-13.
 22. García-Sáinz., Vázquez-Prado J., Medina LC. 2000. α_1 -adrenoceptors: function and phosphorylation. *Eur J Pharmacol.* 389:1-12.
 23. García-Sáinz JA, Vázquez-Prado J and Villalobos-Molina R. 1999. α_1 -Adrenoceptors: Subtypes, Signaling, and Roles in Health and Disease. *Archives of Medical Research.* 449-458.
 24. Ge T, Hughes H, Junquero DC, Wu KK, Vanhoutte PM & Boulanger CM. 1995. Endothelium-dependent contractions are associated with both augmented expression of prostaglandin H synthase-1 and hypersensitivity to prostaglandin H₂ in the SHR aorta.
 25. Gisbert R, Ziani K, Miguel R, Noguera A, Ivorra D, Anselmi E and D'Ocon P. Pathological role of a constitutively active population of α_{1D} -adrenoceptors in arteries of spontaneously hypertensive rats. 2002. *British Journal of Pharmacology.* 135:206-216.
 26. Gluais P, Lonchampt M, Morrow JD, Vanhoutte PM and Feletou M. 2005. Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin. *British Journal of Pharmacology.* 146:834-845.
 27. Goetz AS, King HK, Ward SDC, Tuer TA, Rimele TJ, Saussy DL Jr. BMY 7378 is a selective antagonist of the D subtype of α_1 -adrenoceptor. 1995. *Eur J Pharmacol* 272:R5.
 28. Goetz RM, Morano I, Calovini T, Studer R, and Holtz J. 1994. Increased expression of endothelial constitutive nitric oxide synthase in rat aorta during pregnancy. *Biochem Biophys Res Commun.* 205:905-910.
 29. Godínez-Hernández D, Gallardo-Ortiz A, López-Sánchez P and Villalobos-Molina R. 2006. Captopril therapy decreases both expression and function of α_{1D} -adrenoceptors in pre-hypertensive rat aorta. *Autonomic & Autacoid Pharmacology.* 26:21-29.
 30. Gram RM., Perez DM., Hwa J. and Piascik MT. 1996. α_1 – adrenergic receptor subtype: Molecular spectrum, function and signaling. *Circ Res.* 78:737-749.
-

-
31. Guarino RD., Perez DM and Piascik MT. 1996. The α_1 – adrenergic receptors. Cell Signaling. 8:323-333.
 32. Hishikawa K, Nakaki T, Marumo T, Suzuki H, Kato R, and Saruta T. 1995. Up-regulation of nitric oxide synthase by estradiol in human aortic endothelial cells. FEBS Lett 360:291-293.
 33. Holden DP, Ficking SA, Whitley GS, Nussey SS. 1998. Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, a natural inhibitor of nitric oxide synthase, in normal pregnancy and preeclampsia. Am J Obstet Gynecol. 178:551-556.
 34. Hu ZW, Shi XY, Okazaki M and Hoffman BB. 1995. Angiotensin II induces transcription and expression of α_1 adrenergic receptors in vascular smooth muscle cell. Am. J. Physiol. 268:H1006-H1014.
 35. Ibarra M. López-Guerrero JJ. Villalobos-Molina R. 1998. Further evidence for the predominance of α_{1D} -adrenoceptors in arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats. Pharmacol Rev Commun. 10:135-142.
 36. Kato T, Iwama Y, Okamura K, Hashimoto H, Ito T & Sakate T. 1990. Prostaglandin H_2 may be the endothelium-derived contracting factor released by acetylcholine in the aorta of the rat. Hypertension. 15:475-481.
 37. Kenakin T. 1997. *Pharmacologic analysis of drug-receptor interaction*. third edition ed. Philadelphia and New York: Lippincott - Raven publishers;
 38. Khalil RA, Crews JK, Novak J, Kassab S, Granger JP. 1998. Enhanced Vascular Reactivity During Inhibition of Nitric Oxide Synthesis in Pregnant Rats. Hypertension. 31:1065-1069.
 39. Kim HP, Lee JY, Jeong JK, Bae SW, Lee HK, and Jo L. Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor α localized in caveolae. 1999. Biochem Biophys Res Commun 263:257-262.
 40. Kulandavelu S, Qu D, Lee Adamson S. 2006. Cardiovascular Function in Mice During Normal Pregnancy and in the Absence of Endothelial Nitric Synthase. Hypertension. 47:1175-1182.

-
41. Lodish, H, Berk a, Zoírslu SL, Matsudaria P, Baltimore D, Dardenell. Cap.21.Células nerviosas. *Biología Celular y Molecular*. Ed. 4°. Edit. Panamericana. España. 2003. P.949.
 42. Lomasney JW, Cotecchia S, Lorenz W, Leung W-Y, Schwinn DA, Yang-Feng TL, Brownstein M, Lefkowitz RJ and Caron MG. 1991. Molecular cloning and expression of the cDNA for the α_{1A} – adrenergic receptor. *J Biol Chem*. 266:6365-6369.
 43. Lüscher TF & Wanhouutte PM. 1986. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 8:344-348.
 44. Magness RR, Phernetton TM, Zheng J and Bird IM. 1997. Endothelial vasodilator production by auterine and systemic arteries. II. Prengnacy effects on NO synthase expression. *Am J Physiol Heart Circ. Physiol*. 272:H1730-H1740.
 45. Massicotte G, St-Louis J, Parent A, Schifflin EL. 1987. Decreased in vitro responses to vasoconstrictors during pregnancy in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 65:2466-2471.
 46. McLaughlin MK, Kave TM, and Cooke R. 1989. Vascular catecholamine sensitivity during pregnancy in the ewe. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 160:47-53.
 47. Minneman and Esbenhade. 1994. Alpha 1 – adrenergic receptor subtype. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 34:117-133.
 48. Osol G and Cipolla M. 1993. Pregnancy-induced changes in the three-dimensional mechanical properties of pressurized rat uteroplacental (radial) arteries. *Am J Obtet Gynecol* 168: 268-274.
 49. Ortiz ZV. 2005. Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias: Influencia del embarazo sobre los receptores a angiotensina II (AT1-AT2). Escuela Superior de Medicina. IPN.
 50. Paracoli JC, Cunth RMV, Santori MS, Da Silva FRJ. 2001. Effects of hipertensión on maternal adaptations to pregnancy: experimental study on spontaneously hypertensive rats. *Sao Paulo Medical Journal*. 119(2):54-8.

-
51. Parent A, Schiffing E, and St-Luis J. Receptors for Arg⁸-vasopressin, angiotensin II, and atrial natriuretic peptide in the mesenteric vasculature of pregnant rats. 1991. *Can J Physiol Pharmacol* 69:137-144.
 52. Pérez MD, Piascik MT, Malik N, and Graham RM. 1991. Solution-phase library screening for the identification of rare clones: Isolation of an α_{1D} – adrenergic receptor cDNA. *Mol Pharmacol* 40:876-883.
 53. Piascik MT, Butler BT, Pruitt TA., 1990. The role of alpha 1-adrenoceptor subtypes in the regulation of arterial blood pressure. *Aur. J. Pharmacol.* 180, 381-386.
 54. Piascik MT, Guarino FD, Smith MS, Soltis EE, Saussy DL Jr, Perez DM. The specific contribution of the novel alpha-1D adrenoceptor to the contraction of vascular smooth muscle. 1995. *J Pharmacol Exp Ther.* 275:15839.
 55. Piascik MT and Perez DM. 2001. α_1 -Adrenergic Receptors: New Insights and Directions. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 298:403-410.
 56. Piascik MT, Smith MS, Soltis EE, Peez DM. Identification of the mRNA for the novel α_{1D} -adrenoceptor and two other α_1 -adrenoceptors in vascular smooth muscle. 1994. *Mol Pharmacol.* 46:30.
 57. Podjarmy E, Losonczy G and Baylis Ch. 2004. Animal Models of Preeclampsia. *Semin Nephrol.* 24:596-606.
 58. Poston O, McCarthy AL, and Ritter JM. 1995. Control of vascular resistance in the maternal and feto-placental arterial beds. *Pharmacol Ther* 65:215-239.
 59. Raab, W, Schroeder G, Wagner R., and Giguee W. 1956. Vascular reactivity and electrolytes in normal and toxemic pregnancy. *J. Clin. Endocrinol.* 16: 1196-1200.
 60. Roy B, Sicotte B, Brochu M, and St-Lois J. 1995. Effects of nifedipine and Bay K 8644 on myotropic responses in aortic rings of pregnant rats. *Eur J Pharmacol* 280:1-9.
 61. Salomonsson M, Oker M, Kin S, Zhang H, Faber JE, and Arendshorst WJ. 2001. α_1 -Adrenoceptor subtypes on rat afferent arterioles assessed by
-

-
- radioligand binding and RT-PCR. *Am J Physiol Renal Physiol.* 281:F172-F178.
62. Schiffrin EL, Thome FS and Genest J. 1984 Vascular angiotensin II receptor in SHR. *Hypertension.* 6:682-688.
63. Schoen FJ. 2005. Vasos sanguíneos. Cap. 11. Robbins y Cotran. *Patología estructural y funcional.* Ed. 7. Edit. Elsevier. P. 530.
64. Scofield MA, Liu F, Abel PW, Jeffries WB. Quantification of steady state mRNA for alpha-1 adrenergic receptor subtypes using reverse transcription and a competitive polymerase chain reaction. 1995. *J Pharmacol Exp Ther* 75:1035.
65. Sekiguchi F, Miyake Yoshimasa, Hirakawa A, Nakahira T, Yamaoka M, Shimamura K, Yamamoto K and Sunano S. 2001. Hypertension and Impairment of Endothelium-Dependent Relaxation of Arteries from Spontaneously Hypertensive and L-NAME-Treated Wistar Rats. *J. Smooth Muscle Res* 37(2):67-79.
66. Sladek SM, Megness RR and Conrad K. Nitric oxide and pregnancy. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 272: R441-R463.
67. Strader CD., Frong MT. Tota MR., Underwood D and Dixon RAF. 1994. Structure and function of G-protein-Coupled receptor. *Annu Rev Biochem.* 63:101-132.
68. Takeda T. 1964. Experimental Study on the Blood Pressure of Pregnant Hypertensive Rats. *Jap Circ Journal.* 28:49-53.
69. Tanoue A, Kaba M, Miyawaki S, Koshimizu T, Hosoda Ch, Oshikawa S and Tsujimoto G. 2002. Role of the α_{1D} -Adrenergic Receptor in the Development of Salt-Induced Hypertension. *Hypertension.* 40:101-106.
70. Tanoue A, Nasa Y, Koshimizu T, Shinoura H, Oshikawa S, Kawai T, Sunada S, Takeo S and Tsujimoto G. 2002. The α_{1D} -Adrenergic receptor directly regulates arterial blood pressure via vasoconstriction. *J. Clin. Invest.* 109:765-775.
71. Villalobos-Molina R, Godínez-Hernández D, Gallardo-Ortiz IA, López-Sánchez P. Participación de los Adrenoceptores α_{1D} Vasculares y la Angiotensina II en la Hipertensión Arterial. 2005. *Mensaje Bioquímico.* XXIX:81-93.
-

72. Villalobos-Molina R and Ibarra M. 2005. Increased expression and function of vascular alpha α_{1D} -adrenoceptors may mediate the pro-hypertensive effects of angiotensin II. *Mol. Interv.* 5(6):340-2.
73. Villalobos-Molina R and Ibarra M. 1996. α_{1D} -adrenoceptors mediating contraction in arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats are of the α_{1D} - or α_{1A} - subtypes. *Eur. J. Pharmacol.* 298:257.
74. Villalobos-Molina R. and Ibarra M., 1999. Review Article. *Archives of Medical Research* 30: 347-352.
75. Wang S, Datta S, and Segal S. 2002. Pregnancy Alters Adrenergic Mechanisms in Uterine Arterioles of Rats. *Obstetric Anesthesia.* 94:1304-1309
76. Weiner C, Zhu Liu K, Thompson L, Herrig J, and Chestnut D, 1991. Effect of pregnancy on endothelium and smooth muscle: Their role in reduced adrenergic sensitivity. *Heart Circ. Physiol.* 30:H1275-H1283.
77. Weiner CP, and Thompson LP. 1997. Nitric oxide and pregnancy. *Semin Perinataol* 21: 367-380.
78. Xin X, Yang N, Eckhart AD and Faber JE. 1997. α_{1D} -Adrenergic receptors and mitogen-activated protein kinase mediate increases protein synthesis by arterial smooth muscle. *Mol. Pharmacol.* 51:764:775
79. Xu K, Han C. Quantification of three α_1 -adrenoceptor subtypes in rat aorta by solution hybridization. 1996. *Lif Sci.* 21:PL343.
80. Yang D, Féletou M, Boulanger CM, Wu HF, Levens N, Zhang JM & Vanhoutte PM. 2002. Oxygen-derived free radicals mediate endothelium-dependent contractions to acetylcholine in aorta from spontaneously hypertensive rats- *Br-J. Pharmacol.*136:104-110.
81. Yang D, Féletou M, Levens N., Zhang JN & Vanhoutte PM. 2003b. A diffusible substance(s) mediates endothelium-dependent contraction to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension.* 41:143-148.

-
82. Yang D, Gluais P, Zhang JN, Vanhoutte, PM & Félétou M. 2004. NO and inactivation of the endothelium-dependent contracting factor released by acetylcholine in SHR. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 43:815-820.
83. Yang D, Levens N, Zhang JN, Vanhoutte PM & Félétou M. 2003a. Specific potentiation of endothelium-dependent contraction in SHR by tetrahydrobiopterin. *Hypertension.* 41:136-142.
84. Zhang H, Xiao D, Longo LD, and Zhang L. 2006. Regulation of α_1 -adrenoceptor-mediated contractions of uterine arteries by PKC: effect of pregnancy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 291: H2282-H2289.
85. Zhang Y, Stewart KG, and Davidge ST. 2001. Endogenous estrogen mediates vascular reactivity and distensibility in pregnant rat mesenteric arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 280: H956-H961.
86. Zhong H. and Minneman K.P. 1999. Review α_1 -Adrenoceptor subtype. *Eur J. Pharmacol.* 375:262-276.