



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**Facultad de Medicina
UBIMED FES-IZTACALA**

**“EFECTO DE LA ANGIOTENSINA II EN LA VASCULATURA DE
RATÓN 1D^{-/-} - ADRENÉRGICO”**

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

M. en C. MARTHA LUCIÁ LÁZARO SUÁREZ

TUTOR PRINCIPAL:
DR. RAFAEL VILLALOBOS MOLINA
Facultad de Medicina

COMITÉ TUTOR:
DR. JESÚS ADOLFO GARCÍA SAINZ
Instituto de Fisiología Celular

DR. JUAN PABLO PARDO VÁZQUEZ
Facultad de Medicina

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A *Jaime* con todo mi amor, respeto, admiración y profundo agradecimiento por estar siempre a mi lado.

Con todo el amor y agradecimiento a mi Padres: *Lucía Suárez Contreras* y *Tomás Lázaro Jacobo* que me han apoyado siempre para alcanzar mis metas y son grandes ejemplos a seguir.

A mis queridos hermanos Juan José, Lucrecia, Angela, y Juan Gualberto con quienes he crecido y compartido momentos entrañables.

AGRADECIMIENTOS

A mi Tutor *Rafael Villalobos Molina*. Gracias por su confianza, paciencia, apoyo y amistad a lo largo de todo este tiempo, por motivarme y alentarme en gran medida desde mis primeros pasos en la Investigación.

A los miembros de mi Comité Tutor por guiarme en este proceso:

Al Doctor Jesús Adolfo García Sainz por el tiempo dedicado en cada uno de mis avances y por abrirme las puertas de su laboratorio.

Al Doctor Juan Pablo Pardo Vázquez por estar al pendiente de mis avances y por enriquecer el trabajo con sus valiosos análisis, comentarios y sugerencias.

Al Posgrado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México "UNAM" Sede "Facultad de Medicina" por el apoyo brindado y las facilidades prestadas durante toda mi estancia en el Doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología "CONACYT" por la beca 203145 otorgada para el financiamiento de mis estudios.

A la Unidad de Biomedicina de la FES Iztacala de la UNAM por todas las facilidades otorgadas en sus laboratorios.

A mis compañeros y amigos de laboratorio: mis sisters *Victoria y Jade, Jessica, Aurora, Citlalli, mi gran amigo Francisco Vázquez Cuevas, Rita e Ismael*.

Al Doctor *Maximiliano Ibarra Barajas* por sus enseñanzas, amistad y apoyo en todo momento.

A la Doctora *Claudia González Espinoza* por toda su ayuda, paciencia y experiencia en la determinación de genotipos y por dejarme trabajar en su laboratorio.

A *Juan Javier López Guerrero* por su amistad y el rico café.

Al Doctor *Rogelio Arellano Ostoá* por las facilidades brindadas en su laboratorio.

A la Doctora *Teresa Romero* por su apoyo y enseñanzas en los estudios de movilización de calcio.

A la Doctora *Leticia Flores* por todas las facilidades brindadas en el Bioterio de la FES Iztacala.

INDICE GENERAL

INDICE DE TABLAS	V
INDICE DE FIGURAS.....	VI
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Circulación sistémica	1
1.2 Hipertensión	1
1.2.1 Causas identificables de Hipertensión	3
1.2.2 Hipertensión Primaria	3
1.3 Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona	4
1.3.1 Acciones fisiológicas de angiotensina II	4
1.3.2 Síntesis de angiotensina II	4
1.3.3 Receptores para angiotensina	6
1.3.4 Receptores AT1	7
1.3.5 Receptor AT2	8
1.3.6 Señalización AT1.....	8
1.3.7 Fosfolipasa A2	9
1.3.8 Fosfolipasa C.....	10
1.3.9 Fosfolipasa D.....	11
1.3.9.1 Fosforilación de tirosinascinasas.....	11
1.3.9.2 Activación de tirosinas cinasas no-receptor (no-RTK).....	11
1.3.9.3 Januscinasas, tirosina cinasas y activación de STAT	12
1.3.9.4 cinasas de adhesión focal y tirosina cinasa 2, ricas en prolina	12
1.3.9.5 Fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K).....	12
1.3.9.6 Receptores tirosina cinasa (RTK).....	13
1.3.9.7 Proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK).....	13
1.3.9.8. Proteínas G pequeñas (familia Rho).....	14
1.4 Receptores adrenérgicos	14
1.4.1 Receptores α_1 -adrenérgicos.....	14
1.4.2 Agonistas y antagonistas α_1 -adrenérgicos.....	16
1.4.3 Localización y función.....	17
1.4.4 Señalización.....	18
1.4.5 Oligomerización de los subtipos α_1 -adrenérgicos.....	19
1.4.6 Modelos murinos genéticamente modificados.....	20

1.4.7	Receptores α_1 -adrenérgicos y su relación con la hipertensión.....	21
	1.5 Estructura arterial.....	22
	1.6 Células de músculo liso vascular.....	22
2	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
3	JUSTIFICACIÓN.....	24
4	HIPÓTESIS.....	25
5	OBJETIVO GENERAL.....	25
5.1	Objetivos específicos.....	25
6	MATERIALES Y METODOS.....	26
6.1	Animales.....	26
6.2	Determinación de genotipo.....	26
6.3	Aislamiento y cultivo de células musculares de aorta torácica	26
6.4	Inmunocitoquímica	27
6.5	Western blot.....	28
6.6	Purificación de ARN total.....	29
6.6.1	Obtención de ADNc por transcripción reversa.....	29
6.6.2	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.....	30
6.6.3	Diseño de cebadores.....	31
6.7	Experimentos <i>in vitro</i>	33
6.7.1	Reactividad vascular.....	33
6.7.2	Reactividad renal y mesentérica.....	34
6.7.3	Movilización de Ca^{+2} intracelular	34
6.8	Reactivos.....	34
6.8.1	Cultivo celular e inmunocitoquímica.....	34
6.8.2	<i>In vitro</i>	35
6.8.3	Western blot.....	35
6.8.4	Purificación de ARN total.....	35
6.8.5	Obtención de ADNc.....	35
6.8.6	PCR tiempo real.....	35
7	RESULTADOS.....	36
7.1	Confirmación de genotipo.....	36
7.2	Reactividad vascular en anillos arteriales	37
7.3	Reactividad vascular de mesenterio y riñón	40
7.4	Cultivo primario de células de músculo liso de aorta (CMLA).....	43
7.5	Expresión de los receptores α_1 -adrenérgicos en células de músculo liso de aorta	43

7.6 Movilización de Ca^{+2} intracelular en CMLA.....	51
8 DISCUSIÓN.....	53
8.1 Confirmación de genotipo.....	53
8.2 Reactividad de lechos vasculares por angiotensina II.....	53
8.3 Obtención de cultivos primarios de CMLA.....	56
8.4 Expresión basal de los α_1 -adrenérgicos en CMLA.....	58
8.5 Efecto de angiotensina II en la expresión de los α_1 -adrenérgicos en CMLA de ratones WT y $\alpha_{1D}^{-/}$	59
8.6 Inmunocitoquímica de los receptores α_1 -adrenérgicos en CMLA de ratón WT.....	62
8.7 Movilización de Ca^{+2} intracelular en CMLA.....	63
9 CONCLUSIONES	64
10 PERSPECTIVAS.....	65
11 BIBLIOGRAFIA.....	66
12 ANEXO.....	79

INDICE DE TABLAS

Tabla.1. Clasificación de presión arterial para adultos mayores de 18 años.....	2
Tabla.2. Causas identificables de hipertensión.....	3
Tabla.3. Secuencia de los aminoácidos precursores de angiotensina II .	5
Tabla.4. Receptores α_1 -adrenérgicos.....	14
Tabla 5. Cebadores y condiciones de amplificación para determinación de genotipo.....	25
Tabla.6. Cebadores utilizados para las reacciones de amplificación en tiempo real.....	30
Tabla.7. Valores de pD_2 para fenilefrina en arterias aorta y mesentérica, y presión de perfusión en órganos WT y $\alpha_{1D}^{-/-}$	40
Tabla.8. Valores de pD_2 para angiotensina en arterias aorta y mesentérica, y presión de perfusión en órganos.....	40
Tabla.9. Condiciones optimizadas para la PCR tiempo real.....	42

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del sistema Renina-angiotensina.....	5
Figura 2. Análisis de integridad del ARN total.....	30
Figura 3. Gráfico de amplificación de PCR a tiempo real.....	32
Figura 4. Productos de amplificación específicos para genotipificación	36
Figura 5. Curva concentración-respuesta a fenilefrina y angiotensina II en anillos de aorta de ratones WT y $\alpha_{1D}^{-/-}$	37
Figura 6. Curva concentración-respuesta a fenilefrina y angiotensina II en anillos de arteria mesentérica de ratones WT y $\alpha_{1D}^{-/-}$	38
Figura 7. Curva concentración-respuesta a fenilefrina en anillos de arteria aorta de ratones WT incubados 1h con angiotensina II.....	39
Figura 8. Curvas concentración-respuesta a fenilefrina y angiotensina II en la presión de perfusión de mesenterio de ratones WT y $\alpha_{1D}^{-/-}$	40
Figura 9. Curvas concentración-respuesta a fenilefrina y angiotensina II en la presión de perfusión en riñón de ratones WT y $\alpha_{1D}^{-/-}$	41
Figura 10. Imagen de células en confluencia y prueba positiva contra α -actina.....	43
Figura 11. Curva de concentración de cebadores	44
Figura 12. Productos de amplificación específicos para los genes α_{1a} , α_{1b} , α_{1d} , y 18s.....	44
Figura 13. Registro de temperatura de fusión del producto de amplificación.....	45
Figura 14. Abundancia relativa de ARNm para los α_1 -adrenérgicos en CML WT y $\alpha_{1D}^{-/-}$	46
Figura 15. Efecto de angiotensina II en la expresión de ARNm, Para los α_1 -ARs en CML 1D+/+	47

Figura 16. Efecto de angiotensina II la expresión de ARNm Para los α_1 -ARs en CML $\alpha_{1D}^{-/-}$	47
Figura 17. Efecto de angiotensina II en la expresión de proteína para los α_1 -ARs en CML $1D^{+/+}$	48
Figura 18. Efecto de angiotensina II en la expresión de proteína para los α_1 -ARs en CML $\alpha_{1D}^{-/-}$	49
Figura 19 Inmunocitoquímica de los α_1 -ARs en CML WT.....	50
Figura 20. Movilización de $[Ca^{2+}]_i$ en CMLV WT y $\alpha_{1D}^{-/-}$ Curvas concentración-respuesta a norepinefrina.....	51
Figura 21. Registro de fluorescencia en CML WT estimuladas con fenilefrina.....	52
ANEXO	79
Registros de movilización de Ca^{2+} intracelular en espectrofluorómetro.....	79
AmplicónAT1	79

RESUMEN

La angiotensina II es un octapéptidomultifuncional, regula la presión arterial, es un potente vasoconstrictor y ejerce funciones a nivel celular como modulador de la apoptosis, el crecimiento celular, la migración, etc. Tales efectos son mediados por 2 tipos de receptores; AT₁ y AT₂. Existe una importante interacción entre los receptores AT₁ y los α_1 -adrenérgicos. Ambos tipos de receptores pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G. En ratón hay 2 subtipos AT₁; AT_{1a} y AT_{1b}, y 3 subtipos de α_1 –adrenérgicos (α_{1A} , α_{1B} y α_{1D}) presentes en la mayoría de las arterias y vasos de resistencia. Se describe al subtipo α_{1D} -adrenérgico como el principal involucrado en la génesis y mantenimiento de la hipertensión en ratas SHR y los ratones knockout de este subtipo ($\alpha_{1D}^{-/-}$) presentan presión arterial baja, así como disminución en las respuestas vasoconstrictoras a catecolaminas. Los ratones que presentan altos niveles de angiotensina II circulante, muestran incremento en los niveles del receptor α_{1D} . En este trabajo se evaluó el efecto contráctil y presor de la angiotensina II en las arterias aorta y mesentérica, así como en el lecho mesentérico y el riñón al estar ausente el receptor α_{1D} , así como su efecto en la expresión de los receptores α_1 -adrenérgicos en células de músculo liso aórtico. Los datos obtenidos muestran que la angiotensina II produce contracción tejido específica en mesenterio perfundido y riñón. La angiotensina II interacciona con los receptores α_{1D} - AR para regular la presión de perfusión renal, ya que observamos un desplazamiento de la curva dosis-respuesta para la angiotensina II hacia la derecha en riñón de ratones $\alpha_{1D}^{-/-}$. A nivel molecular, la angiotensina II incrementó el transcrito del receptor α_{1B} y de la proteína del α_{1A} en células control, mientras que en células $\alpha_{1D}^{-/-}$, hubo una disminución del mensajero α_{1B} y un incremento en la proteína del α_{1A} . La movilización de calcio intracelular aporta evidencia sobre la existencia de receptores AT₁, sin embargo, su activación no está destinada a producir contracción en aorta. En conclusión, la angiotensina II y los receptores α_1 -adrenérgicos interaccionan a diferentes niveles, las respuestas reno-vasculares de la angiotensina II en ratón, están mediadas por los receptores α_1 -adrenérgicos. El efecto contráctil de la Angiotensina II es específico en riñón y el mesenterio. La angiotensina II en células de músculo liso de aorta modifica la expresión de los receptores α_{1A} y α_{1B} -adrenérgicos.

ABSTRACT

Angiotensin II is a multifunctional octapeptide that regulates blood pressure; it is a potent vasoconstrictor and acts at cellular level in apoptosis, cell growth, migration, etc. These effects are mediated by two types of receptors; AT1 and AT2. There is an important interaction between the AT1 and α_1 -adrenergic receptors. Both types of receptors belong to the family of G-protein coupled receptors. In mouse there are 2 AT1 subtypes, (AT1a and AT1b) and 3 α_1 -adrenoceptor subtypes (α_{1A} , α_{1B} and α_{1D}) present in most arteries and resistance vessels. The α_{1D} -adrenergic subtype has been described as the main receptor involved in the genesis and maintenance of hypertension in SHR rats, and the knockout mice in this subtype ($\alpha_{1D}^{-/-}$) have low blood pressure and decreased vasoconstrictor responses to catecholamines. Mice with high levels of circulating angiotensin II, show increased levels of receptor α_{1D} . In this study we evaluated the contractile and pressor effect of angiotensin II in the aorta and mesenteric arteries, mesenteric bed and kidney when the α_{1D} receptor is absent and its effect on the expression of α_1 -adrenergic receptors in smooth muscle cells. The data obtained show that angiotensin II causes tissue specific contraction in mesentery and perfused kidney. Angiotensin II interacts with α_{1D} -AR receptors to regulate renal perfusion pressure, as we observed a shift of the angiotensin II effect on kidney $\alpha_{1D}^{-/-}$. At the molecular level, angiotensin II increased α_{1B} transcript and α_{1A} protein in control cells, while in cells $\alpha_{1D}^{-/-}$, there was a decrease in α_{1B} messenger RNA and an increase in protein subtype α_{1A} . The intracellular calcium mobilization provides evidence of the existence of AT1 receptors, however, their activation did not produce contraction in aorta. In conclusion, angiotensin II and α_1 -adrenergic receptors interact at different levels, reno-vascular responses to angiotensin II in mice are mediated by α_1 -adrenergic receptors. The contractile effect of angiotensin II is specific for kidney and mesentery. Angiotensin II in smooth muscle cells of aorta modifies the expression of the α_{1B} and α_{1A} -adrenergic receptors.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Circulación sistémica

Cada reactividad cardíaca expelle un bolo de 70 ml de sangre hacia la circulación sistémica arterial, perfundiendo órganos con nutrientes y oxígeno. Según la ley de Ohm, la fuerza de propulsión que ejerce presión sobre las paredes vasculares depende del gasto cardíaco (cantidad de sangre bombeada por el corazón), y la resistencia al flujo sanguíneo que oponen los vasos sanguíneos; sin embargo, esta ley resulta muy simple para los sistemas biológicos, ya que una gran variedad de sistemas fisiológicos interaccionan de forma compleja para regular la presión sanguínea. Entre estos sistemas se encuentran los barorreceptores, los cuales detectan cambios agudos de presión en los vasos sanguíneos; los péptidos natriuréticos, producidos por cerebro y corazón que responden al incremento de presión en estos órganos; el sistema renina-angiotensina-aldosterona, que regula el volumen sanguíneo y el tono vascular; el sistema cinina-caliceína, que afecta el tono vascular y el manejo renal de sal; el sistema adrenérgico, que regula la fuerza y la frecuencia cardíacas, así como el tono vascular; los factores producidos por los vasos sanguíneos, que causan vasodilatación como óxido nítrico, o reactividad, como la endotelina. Estos sistemas actúan de manera integrada para asegurar la perfusión adecuada de todos los tejidos y órganos, a pesar de que varía enormemente la demanda metabólica (Lifton y cols., 2001).

1.2 Hipertensión

La hipertensión es uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, que son las principales causas de mortalidad a nivel mundial. Es un padecimiento silencioso que se caracteriza por aumento crónico de la presión arterial y que, en su inicio, no presenta manifestaciones clínicas (Wolf-Maier y cols., 2003). Según la Organización

Mundial de la Salud, la hipertensión se diagnostica al presentar valores de presión sistólica ≥ 140 mmHg y/o presión diastólica ≥ 90 mmHg. De acuerdo con estos criterios la prevalencia actual de hipertensión arterial en México es de 31.5%, y es más alta en adultos con obesidad (42.3%) que en adultos con índice de masa corporal normal (18.5%), y en adultos con diabetes (65.6%) que sin esta enfermedad (27.6%) (ENSANUT 2012). Durante la ENSANUT 2012 se observó que del 100% de los adultos hipertensos, el 47.3% desconocía que padecía hipertensión. La hipertensión en México varía de acuerdo con regiones, localidades y nivel socioeconómico (NSE), registrándose una prevalencia significativamente más alta ($p < 0.05$) en la región norte del país (36.4%), que en el sur (28.5%), en las localidades urbanas (31.9%) que en las rurales (29.9%), y en el NSE alto (31.1%) comparado con el bajo (29.7%) (ENSANUT 2012).

Debido al alarmante incremento en el número de personas que padecen de hipertensión a nivel mundial, así como el aumento en las enfermedades cardiovasculares asociadas con incrementos en la presión sanguínea, considerada anteriormente normal, el Comité para la Prevención, Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipertensión en los Estados Unidos de América, ha introducido una nueva clasificación que incluye el término de “prehipertensión” para aquellos individuos con presión arterial sistólica de 120-139 mmHg y 80-89 mmHg de presión arterial diastólica (Tabla 1). Con estas medidas se pretende identificar a individuos para los que una intervención temprana, mediante la adopción de un estilo de vida saludable, les ayude a disminuir la velocidad en la progresión de presión arterial hacia la hipertensión, o prevenir la hipertensión completamente.

Tabla.1. Clasificación de presión arterial para adultos mayores de 18 años, tomada de JNC7.

CLASIFICACIÓN DE PRESIÓN ARTERIAL	PRESIÓN SISTÓLICA mmHg	PRESIÓN DIASTÓLICA mmHg
NORMAL	<120	y <80
PREHIPERTENSIÓN	120–139	o 80–89
HIPERTENSIÓN ESTADO 1	140–159	o 90–99
HIPERTENSIÓN ESTADO 2	>160	o >100

1.2.1 Causas identificables de Hipertensión

Las causas en el incremento de la presión arterial pueden ser, algunas veces, identificables por procedimientos de diagnóstico adicional, y están relacionadas con la alteración en la secreción de hormonas, defectos congénitos, terapia crónica con esteroides u otros fármacos. A la hipertensión provocada por algún defecto en un órgano o sistema se le conoce como hipertensión secundaria.

En la mayoría de los casos, los valores de presión arterial se pueden normalizar siempre y cuando se corrija la causa que origina el estado hipertensivo. En la siguiente tabla se enlistan algunas causas más frecuentes en el incremento de la presión arterial y el diagnóstico que se lleva a cabo (Tabla 2).

Tabla.2. Causas identificables de hipertensión, tomada de JNC7.

DIAGNÓSTICO	PRUEBA DIAGNÓSTICA
Enfermedad crónica del riñón	Índice de filtración glomerular estimada
Coartación de la aorta	Angiografía
Síndrome de Cushing y exceso en glucocorticoides	Prueba de supresión de dexametasona
Inducida por tratamiento farmacológico	Historial farmacológico
Feocromocitoma	Nivel de Metanefrina y Normetanefrina/24 hrs.
Aldosteronismo primario y otros excesos en mineralocorticoides	Nivel de aldosterona en orina/24hrs u otros mineralocorticoides
Hipertensión renovascular	Angiografía, resonancia magnética y estudio Doppler
Apnea del sueño	Estudio del sueño con saturación de O ₂
Enfermedad tiroidea o paratiroidea	TSH y PTH en suero

1.2.2 Hipertensión Primaria

Cuando un individuo padece de hipertensión sin causa identificable, se dice que tiene hipertensión primaria, esencial o idiopática y se presenta en el 80-95% de los individuos con hipertensión. La dificultad para descubrir los mecanismos que llevan al estado hipertensivo radica en la gran cantidad de sistemas que participan en la regulación de la presión arterial: adrenérgico, renal, hormonal, y vascular; además, estos sistemas se relacionan de manera compleja (Harrison, 2008).

1.3 Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

1.3.1 Acciones fisiológicas de angiotensina II

La angiotensina II constituye el principal péptido del sistema renina-angiotensina (SRA); es una hormona de acción pleiotrópica que tiene varios efectos: 1) promueve la reabsorción de agua y Na^+ en los segmentos tubulares distales de la nefrona aumentando así el volumen de líquido extracelular (es un secretagogo de aldosterona), 2) aumenta el intercambio Na^+/H^+ en el túbulo contorneado proximal promoviendo la reabsorción de Na^+ , 3) Actúa en el hipotálamo aumentando la sensación de sed y estimulando la secreción de arginina-vasopresina también conocida como hormona antidiurética, regulando la excreción renal de agua, 4) provoca vasoconstricción de las arteriolas, aumentando así la resistencia periférica total y la presión arterial, 5) induce hipertrofia de las células del túbulo renal, y aumenta la actividad del sistema nervioso simpático renal (Boron & Boulpaep, 2005; Hunyady & Catt, 2006)

A nivel celular, la angiotensina II modula la reactividad, el crecimiento celular, la apoptosis y la diferenciación, regula la migración celular y el depósito de la matriz extracelular proinflamatoria, estimula la producción de varios factores de crecimiento, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), y vasoconstrictores como la endotelina (ET-1), transactiva receptores de factores de crecimiento como el receptor al factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFR), etc. (Touyz & Berry, 2002).

1.3.2 Síntesis de angiotensina II

La angiotensina II se produce a través del clásico Sistema Renina-Angiotensina (SRA) renal a nivel sistémico, y localmente a través del SRA tisular.

El angiotensinógeno es una glicoproteína plasmática (α_2 -globulina) de 452 aminoácidos, sintetizada en el hígado y liberado constitutivamente al torrente sanguíneo. La renina es una proteasa, sintetizada por células de músculo liso especializadas, localizadas en la arteriola aferente llamadas células yuxtglomerulares o granulares del riñón; es la encargada de formar a la

angiotensina I al hidrolizar el enlace peptídico entre los aminoácidos Leucina-Valina del angiotensinógeno. La angiotensina I, es un decapeptido biológicamente inactivo, es sustrato de la ECA (enzima convertidora de angiotensina), que remueve el dipéptido Histidina-Leucina del carboxilo terminal, para liberar el octapéptido angiotensina II. La ECA se expresa en el endotelio vascular pulmonar (Boron&Boulpaep, 2005; Zaman y cols.,2002).

Existen otras enzimas que al igual que la ECA, sintetizan angiotensina II, incluyendo a la serina proteasa Cimasa, a partir de angiotensina I; así como las enzimas tonina, tripsina, calicreína, catepsina G, capaces de generar angiotensina II directamente del angiotensinógeno (Zaman y cols., 2002)(Ver figura 1).

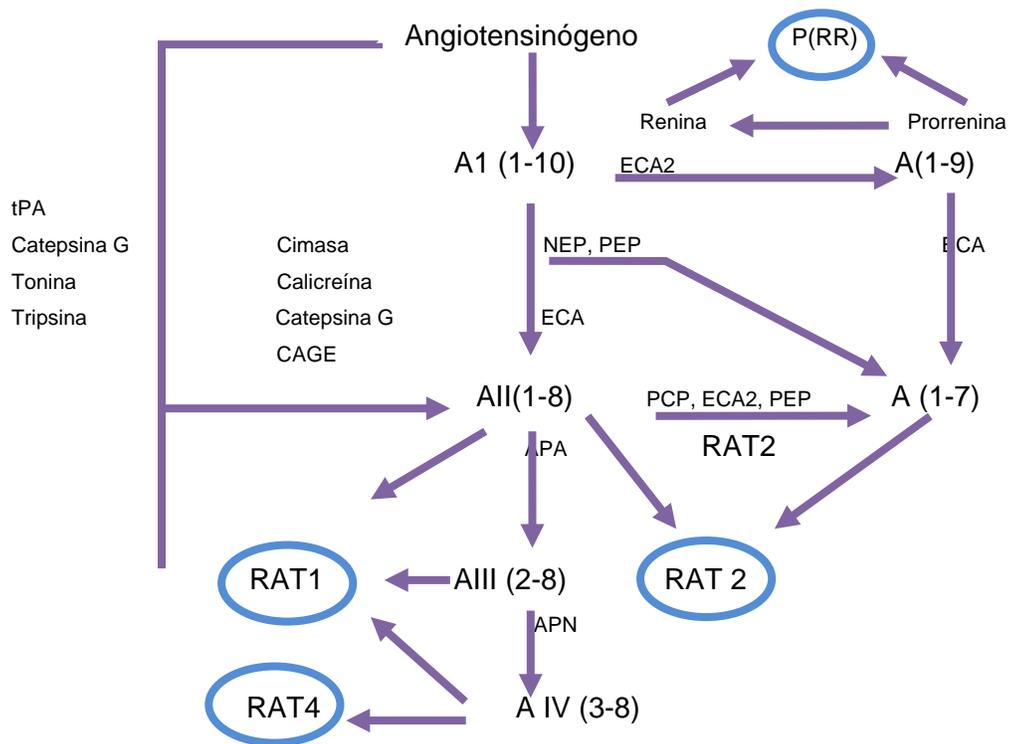


Figura.1. Representación esquemática del sistema Renina-Angiotensina. A-1, A-II, A-III, AIV, A(1-7), A(1-9): Angiotensinas I, II, III, IV, 1-7 y 1-9; APA: amino peptidasa A; APN: aminopeptidasa N; CAGE: Enzima generadora de angiotensina sensible a quimostatina; ECA: enzima convertidora de angiotensina; ECA2: enzima convertidora de angiotensina tipo 2; NEP: endopeptidasa neutra; PEP: propilendopeptidasa; P(RR): receptor de prorrenina/renina; PCP: propilcarboxipeptidasa; tPA activador tisular del plasminógeno. Tomada y modificada de Touyz y Schiffrin, 2000.

La angiotensina I también puede ser hidrolizada por prolil-endopeptidasas y carboxipeptidasas para formar el heptapéptido vasodilatador angiotensina (1-7); alternativamente la ECA2, carboxipeptidasa homóloga de la ECA, rompe un solo residuo de angiotensina I para generar angiotensina (1-9), la cual puede ser hidrolizada por ECA para obtener angiotensina (1-7). Los productos de degradación de angiotensina II carecen del grupo amino en el residuo de asparagina (angiotensina III), y de los residuos Asp-Arg (angiotensina IV) (Oliveira y cols., 2005) (Tabla 3).

Tabla.3. Secuencia de los aminoácidos precursores de angiotensina II(De Gasparo y cols., 2000).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Angiotensinógeno	Asp	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Phe	His	Leu	Leu	Val	Tyr	Ser
Ang I	Asp	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Phe	His	Leu				
Ang II	Asp	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Phe						
Ang III (2,8)					Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Phe			
Ang IV (3,8)							Val	Tyr	Ile	His	Pro	Phe		
Ang 1-7	Asp	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro							

1.3.3 Receptores para Angiotensina

La Angiotensina II se une a dos receptores membranales con alta afinidad: AT₁ y AT₂, ambos receptores, de siete dominios transmembranales, pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G que se han clonado y caracterizado farmacológicamente. Los AT₁ y AT₂ se pueden distinguir por sus perfiles de unión a ligandos. El receptor AT₁ muestra alta afinidad por los antagonistas candesartán (pIC₅₀ 9.5-9.7), irbesartán (pIC₅₀ 8.8-9.0), eprosartán (pIC₅₀ 8.4-8.8), olmesartán (pIC₅₀ 8.1), y losartán (pIC₅₀ 7.4-8.7), entre otros (Timmermans y cols., 1991; Vanderheyden y cols., 1999); mientras que el AT₂ se une específicamente al péptido agonista CGP42112 (pK_d 10.6) y al antagonista no peptídico PD123319 (pK_d 8.7-9.2) (de Gasparo y cols., 1994).

1.3.4 Receptores AT₁

Los receptores AT₁ en humano, rata y ratón contienen 359 aminoácidos, y un peso molecular de 41 kDa. En el roedor se han encontrado dos subtipos, AT_{1A} y AT_{1B}, que comparten más del 95% de identidad en su secuencia de aminoácidos. Estos son similares en términos de sus propiedades de activación y unión a ligandos; sin embargo, difieren en su distribución tisular, localización cromosómica, estructura genómica y regulación transcripcional (De Gasparo y cols., 2000; Hunyady y cols., 2001). Ningún otro de los receptores AT₁ clonados en mamífero, incluyendo los de vaca, conejo, cerdo, perro y humano, parecen tener subtipos como en rata y ratón.

El gen que codifica para el receptor AT₁ en el humano se localiza en el cromosoma 3, en la rata se localiza en los cromosomas 17 y 2, y en el ratón en los cromosomas 13 y 3 (AT_{1A} y AT_{1B}), respectivamente (De Gasparo y cols., 2000).

Estudios de hibridación *in situ* revelaron que, en ratón adulto, los receptores AT_{1A} se expresan en riñón, hígado, glándula suprarrenal, aorta, ovario, cerebro, testículos, pulmones, corazón, y tejido adiposo (Burson y cols., 1994; Kitami y cols., 1992). La glándula pituitaria anterior expresa solamente al receptor AT_{1B}. En la glándula suprarrenal coexisten transcritos de los receptores AT_{1A} y AT_{1B} en la zona glomerulosa y solamente transcritos del subtipo AT_{1A} en la médula. En riñón hay ARNm de los receptores AT_{1A} en células mesangiales y yuxtaglomerulares, túbulos proximales, *vasa recta*, y células intersticiales, mientras que el ARNm para el receptor AT_{1B} se expresa únicamente en células mesangiales y yuxtaglomerulares.

La expresión AT₁ en humano ocurre en vasculatura renal, glomérulo y la *vasa recta* (Goldfarb y cols., 1994), tejido adiposo (Engeli y cols., 1999), y endometrio, placenta y células endoteliales vasculares fetales (Cooper y cols., 1999).

Las respuestas celulares tras la activación del AT₁ incluyen: reactividad de músculo liso, secreción de aldosterona, activación neuronal, neuro-secreción, transporte de iones, crecimiento celular y proliferación (De Gasparo y cols., 2000).

1.3.5 Receptor AT₂

El receptor AT₂, comparte el 34% de identidad en su secuencia de nucleótidos con los AT₁ en humano, rata y ratón se localiza en el cromosoma 10 y codifica para una proteína de 363 aminoácidos (Mukoyama y cols., 1993).

Los AT₂ se expresan en tejidos fetales y al parecer participan en la remodelación de órganos, induciendo apoptosis de células no necesarias, y se ha sugerido que juegan un papel importante en el desarrollo del uretero y el sistema colector renal. Su expresión disminuye después del nacimiento (TouzyBerry, 2002) y se detecta en páncreas, corazón, riñón, ovario, cerebro y vasos sanguíneos, apareciendo en sitios de inflamación y daño tisular u otras formas de estrés celular como hipertrofia cardiaca experimental, cicatrización e isquemia. Estos receptores parecen ser regulados por cationes intracelulares, particularmente Na⁺, y en condiciones fisiológicas pueden antagonizar los efectos mediados por los AT₁R, inhibiendo el crecimiento celular, induciendo apoptosis y vasodilatación, promoviendo la diferenciación celular y la reparación tisular (Touzy Berry, 2002).

Se han descrito otros dos receptores para angiotensina II: los AT₃ y los AT₄. El receptor AT₃ se ha descrito en líneas celulares (neuroblastoma) y no se une a los ligandos losartan ni PD123319 (Chaki & Inagami 1992; Oliveira y cols., 2007). El receptor AT₄ se une a la angiotensina IV (Swanson et al., 1992), pero no se une a losartan ni a PD123319. Estos dos receptores no se han caracterizado completamente, ni se han incluido en la clasificación definitiva de receptores de la IUPHAR (International Union of Pharmacology) para los receptores de angiotensina.

1.3.6 Señalización AT₁

La unión ligando-receptor activa proteínas G por intercambio de GTP por GDP, con la liberación de las subunidades α y $\beta\gamma$, las cuales median acciones río abajo en la señalización celular.

Los AT₁ interactúan con varias proteínas G heterotriméricas, incluyendo: G_{q/11}, G_i, G_{α12}, y G_{α13}. Las isoformas de proteínas G se acoplan a distintas cascadas de señalización. La activación de la proteína G_{q/11}, causa una rápida hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5, bisfosfato, dependiente de la activación de la fosfolipasa C (PLC) y la formación de inositol 1,4,5 trisfosfato (IP₃), que moviliza Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico; así como de diacilglicerol (DAG) y estimulación de la proteína cinasa C (PKC). El IP₃ formado por la PLC, es un mensajero citoplásmico difusible, que se une a un receptor localizado en el retículo sarcoplásmico y esta unión induce la apertura de canales de Ca²⁺, permitiendo que el catión almacenado se libere en el citoplasma celular (Touyz y Berry, 2002). El aumento en el Ca²⁺intracelular constituye la vía de señalización inicial para activar la calmodulina dependiente de Ca²⁺ y de la fosforilación de la cadena ligera de la miosina, permitiendo la interacción actina-miosina con hidrólisis de ATP, y generando la fuerza contráctil (Huges, 1998). La activación de la PLC se correlaciona temporalmente con el inicio de la reactividad en células de músculo liso vascular aisladas, así como en arterias de resistencia intactas (Huges, 1998).

El receptor AT₁ también se acopla a cascadas de señalización intracelulares que se extienden hacia el núcleo celular. Estas vías regulan la transcripción de genes y la expresión de proteínas que controlan respuestas de crecimiento y proliferación celular en varios tejidos (Touyz y Berry, 2002).

1.3.7 Fosfolipasa A₂ (PLA₂)

La Angiotenina II también activa a la PLA₂, responsable de liberar ácido araquidónico de fosfolípidos de membrana. El ácido araquidónico es metabolizado por las ciclooxigenasas, lipooxigenasas o citocromo cp450, para formar eicosanoides en los tejidos vascular y renal. Los eicosanoides sintetizados por la PLA₂ desempeñan mecanismos vasculares y renales, importantes en la regulación de la presión arterial.

La activación de PLA₂ por angiotensina II es un evento dependiente de [Ca²⁺]_i, proteína cinasa II dependiente de Ca²⁺- calmodulina y proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Bonventre y cols., 1992; Nasjletti y cols., 1997).

1.3.8 Fosfolipasa C (PLC)

La Angiotensina II activa a la fosfolipasa C en el interior de la membrana plasmática, la cual hidroliza fosfatidil inositol 4,5 bisfosfato para liberar dos productos que actúan como segundos mensajeros: el inositol 1,4,5 trisfosfato (IP3) soluble en agua y el diacilglicerol (DAG) que permanece asociado a la membrana plasmática. El IP3 dispara la liberación de Ca²⁺ del retículo endoplásmico y la combinación de DAG con concentraciones elevadas de Ca²⁺ [10⁻⁶M] activan a la proteína cinasa C. Una vez activada la PKC fosforila proteínas que contienen residuos de serina y treonina embebidos en secuencias consenso reconocidas por PKC. Sus proteínas blanco incluyen; proteínas del citoesqueleto, enzimas y proteínas nucleares que regulan la expresión de genes (Lehninger., 2008).

1.3.9. Fosfolipasa D (PLD)

Las vías de señalización río abajo, asociadas con la activación de la PLD por la angiotensina II en células de músculo liso vascular, son dependientes de PKC, involucran la movilización de [Ca²⁺]_i y la entrada de Ca²⁺ dependiente de tirosina cinasa. La señalización vía PLD inducida por angiotensina II se relaciona con hipertrofia cardíaca, proliferación de células de músculo liso vascular y reactividad (Dhalla y cols., 1997; Touyz y Schiffrin, 1999).

Intenso trabajo en el campo de la señalización de angiotensina II ha mostrado que la activación de los AT₁ se asocia con el aumento en la fosforilación de proteínas cinasas y la activación de las MAPK. Estos procesos asocian a la angiotensina II con características mitógenase inflamatorias (TouzyBerry, 2002).

1.3.9.1 Fosforilación de tirosinacinasas

La Angiotensina II estimula la fosforilación de muchas tirosina cinasas no-receptor, incluyendocinasas de la familia Src (JAK y TIK), FAK, tirosina cinasa dependiente de Ca^{2+} (Pyk2), P130Cas y fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K). Adicionalmente, angiotensina II activa receptores con actividad de tirosina cinasas (RTK), tales como EGF γ , PDGFR e IGFR (Matsusaka y cols., 1997; Kim y Iwao, 2000; Berk y Corson, 1997).

Actualmente se conocen al menos 14 cinasas relacionadas con la familia Src, de las cuales la c-Src de 60kDa es el prototipo. C-Src es abundante en células de músculo liso vascular y se activa rápidamente por angiotensina II, desempeña un papel muy importante en la fosforilación de la PLC- γ y la formación de IP₃.

1.3.9.2 Activación de tirosinas cinasas no-receptor (no-RTK)

La cinasa Src, el Ca^{2+} intracelular y la PKC regulan la fosforilación inducida por angiotensina II de p130Cas (molécula de señalización involucrada en la adhesión mediada por integrinas). La Src también se asocia con activación, inducida por angiotensina II, de Pyk2 y cinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs), así como de otras proteínas río abajo incluyendo pp120, paxilina, JAK2, transductores y activadores de la transcripción 1 (STAT1), G α , caveolina y proteína adaptadora Shc. Adicionalmente, Src se requiere para reorganización del citoesqueleto, la migración y el crecimiento celular (Sayeski y cols., 1998). La activación de c-Src por angiotensina II podría ser un mediador importante en la función alterada de células de músculo liso vascular durante la hipertensión (Touzy Berry, 2002).

1.3.9.3 Janus cinasas, tirosina cinasas y activación de STAT

La activación AT₁ estimula JAK2 y TIK2, miembros de la familia JAK; las proteínas JAK son mediadoras clave en la expresión de ARN mensajero. La activación de JAK vía AT₁ fosforila proteínas p91/84 (STAT1 α/β), p113 (STAT2) y p92 (STAT3), que son factores de transcripción denominados así por sus siglas en inglés (Signal Transducers and Activators of Transcription), y una vez fosforiladas se traslocan al núcleo, donde activan la transcripción de genes (Ihle, 1995; Marrero y cols., 1997).

1.3.9.3 Cinasas de adhesión focal y tirosina cinasa 2, ricas en prolina

La angiotensina II promueve la migración celular e induce cambios en la morfología y volumen celular al activar vías de señalización dependientes de FAK (focal adhesión kinases). Los complejos de adhesión focal actúan como estructuras supra-moleculares para el ensamblaje de mediadores de la transducción de señales. La tirosinacinasas mejor caracterizada y localizada en los complejos de adhesión focal es la FAK, que participa en la formación de vasos sanguíneos. Un miembro de la familia FAK, Pyk2 o también llamada cinasa- β de adhesión celular, se activa por receptores AT₁ y es dependiente del aumento en [Ca²⁺]_i.

1.3.9.4 Fosfatidil Inositol 3 Cinasa (PI3K)

La PI3K es una proteína heterodimérica compuesta de una subunidad adaptadora (p85) y de una subunidad catalítica (p110). La PI3K cataliza la fosforilación de fosfoinosítidos en la posición 3'. Los productos principales de PI3K participan en la supervivencia celular, el metabolismo, el tráfico membranal y se ha identificado que juegan un papel muy importante en regular el crecimiento de células de músculo liso vascular. La inhibición de la PI3K con Wortmannina y el LY294002 bloquean la hiperplasia producida por angiotensina II en células de rata,

sugiriendo un papel muy importante de esta cinasa de lípidos en el crecimiento de células de músculo liso vascular (Saward y Zahradka, 1997).

1.3.9.5 Receptores tirosina cinasas (RTK)

Existe evidencia de que las respuestas mitogénicas tras activación del receptor AT₁ pueden ser mediadas por activación de RTK, aunque no se una directamente la angiotensina II. Este proceso de transactivación se ha observado para EGFR (epidermal growth factor receptor), PDGFR (Plateled-derived growth factor receptor), IGFR (Insulin-like growth factor receptor). La transactivación de EGFR parece ser un proceso dependiente de [Ca²⁺] intracelular, mientras que la transactivación de PDGFR es independiente de [Ca²⁺] (Prenzel y cols., 1999).

1.3.9.6 Proteínas Cinasas Activadas por Mitógenos (MAPK).

Las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) forman una familia de proteínas cinasas que median la transducción nuclear de señales extracelulares por fosforilación de proteínas intracelulares, activan factores transcripcionales, aumentan la expresión de genes y respuestas celulares tróficas.

Las MAPKs de mamífero se agrupan en 6 familias: a) ERK1/2, también conocida como p42kDa MAPK y p44kDa MAPK, respectivamente; b) Proteínas cinasas JNK activadas por estrés (JNK/SAPK); c) MAPK p38; d) ERK6; e) ERK3 y f) ERK5, también llamada (Big MAPK 1) (Robinson y Cobb, 1997).

La Angiotensina II activa los tres principales miembros de la familia de MAPK: ERK1/2, JNK y MAPK p38. La ERK1/2 estimulada por angiotensina II se asocia con el aumento en la expresión de *c-fos*, *c-myc* y *c-jun*, síntesis de ADN, diferenciación, crecimiento celular, y organización del citoesqueleto (Robinson y Cobb, 1997).

1.3.9.7 Proteínas G pequeñas (Familia Rho)

La angiotensina II activa proteínas monoméricas pequeñas de unión a nucleótidos de guanina (21KDa) en células de músculo liso vascular. La familia de proteínas G pequeñas comprende a cinco miembros: Ras, Rho, factores de ribosilación de ADP, Rab y Ran; la subfamilia Rho (RhoA, Rac1 y Cdc42) se asocia con señalización por angiotensina II (Touyzy Berry, 2002).

La angiotensina II también activa Racl, la cual participa en la organización del citoesqueleto, crecimiento celular, inflamación y regulación de la NAD(P)H oxidasa (Touyz y Berry, 2002). En células de músculo liso vascular, la angiotensina II aumenta la producción de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) al activar la NAD(P)H oxidasa (Touyz y Schiffrin, 1999).

1.4 Receptores adrenérgicos

Los receptores adrenérgicos, de siete dominios transmembranales, son responsables de mediar las respuestas a las catecolaminas endógenas adrenalina y noradrenalina, y se acopla a proteínas G. Estos receptores constituyen una familia y se dividen en tres tipos principales, basándose en su secuencia de aminoácidos, y en su afinidad por agonistas y antagonistas en: α_1 , α_2 y β . Los receptores adrenérgicos incluyen nueve productos génicos distintos, tres α_1 (α_{1A} , α_{1B} y α_{1D}), tres α_2 (α_{2A} , α_{2B} , α_{2C}) y tres β (β_1 , β_2 , y β_3), los cuales tienen propiedades farmacológicas y secuencia de aminoácidos distintos (Chen y Minneman, 2005).

1.4.1 Receptores α_1 -adrenérgicos

Las catecolaminas liberadas de las terminales nerviosas provocan la reactividad del músculo liso vascular por activación de los receptores α_1 -adrenérgicos (α_1 -ARs). Los tres α_1 -ARs conocidos; α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} , se expresan en varios órganos incluyendo cerebro, corazón, bazo, hígado, riñón, próstata, y vasos sanguíneos, en los cuales ejercen una amplia gama de procesos fisiológicos y

patológicos importantes, como: neurotransmisión simpática, reactividad uterina, regulación del tono vascular, reactividad del sistema genitourinario, metabolismo hepático de la glucosa, inotropía y cronotropía del miocardio, desarrollo de hipertrofia cardíaca y de músculo liso, e hiperplasia prostática benigna (García-Sáinz y cols., 1999; Hieble y cols., 1995; Koshimizu y cols., 2003).

Los tres receptores comparten 75% de homología en su secuencia de aminoácidos; esta similitud se encuentra principalmente en sus zonas transmembranales, pero no así en sus asas y regiones amino y carboxilo terminal, lo cual les confiere características y funciones tejido-específicas (Morris y cols., 2004; Xhaard y cols., 2006). En la siguiente tabla se enlista información adicional de los tres α_1 -ARs (Tabla 4).

Tabla.4. Receptores α_1 -adrenérgicos. Base de datos IUPHAR, 2011.

Receptor	Especie	Aminoácidos	Localización Cromosómica	Nombre del Gen
α_{1A}	Humano	466	8p21-p11.2	ADRA1A
	Rata	466	15p12	Adra1a
	Ratón	466	14D1	Adra1a
α_{1B}	Humano	519	5q23-q32	ADRA1B
	Rata	514	10q21	Adra1b
	Ratón	515	11B1.1	Adra1b
α_{1D}	Humano	572	20p13	ADRA1D
	Rata	561	3q36	Adra1d
	Ratón	562	2F1	Adra1d

Los α_1 -ARs se caracterizan por tener alta afinidad por prazosina ($pA_2 > 9$); sin embargo, en varios tejidos aislados (próstata de canino), prazosina y RS-17053 muestran baja potencia, y con ello se ha sugerido la existencia de un cuarto receptor, denominado α_{1L} , que presenta baja afinidad por prazosina, aunque este receptor no se ha clonado (Daniel y cols., 1999).

1.4.2 Agonistas y antagonistas α_1 -adrenérgicos.

Estudios funcionales usando agonistas y antagonistas, aportaron la primera información referente a la existencia de los diferentes α_1 -ARs, lo que permitió determinar sus perfiles farmacológicos (Morrow y Creese., 1986), su localización y confirmar estos hallazgos con una serie de estudios moleculares. Los tres receptores clonados fueron: α_{1b} , aislado de una línea celular de músculo liso vascular de hámster, el cual mostró tener un perfil farmacológico que corresponde al receptor α_{1B} nativo (Cotecchiay cols., 1988). El siguiente receptor en ser clonado fue el α_{1a} , aislado de cerebro de bovino, el cual presenta un perfil farmacológico idéntico al receptor nativo α_{1A} ; sin embargo, se observó que el receptor recombinante es parcialmente inactivado por el agente alquilante cloroetilclonidina, lo que llevó a pensar que se trataba de un nuevo receptor, al cual designaron como α_{1c} (Schwinn y cols., 1990). Otro receptor aislado de corteza cerebral de rata, que presentaba mayor sensibilidad al WB4101 que el receptor α_{1b} recombinante (Lomasney y cols., 1991) y menor sensibilidad a ser alquilado por cloroetilclonidina, fue inicialmente designado como α_{1a} ; por otro lado, en estudios independientes, encontraron a un receptor recombinante idéntico en rata que tenía un perfil farmacológico muy distinto al mostrado por este receptor α_{1A} nativo (Pérez y cols., 1991), lo cual indicó que se trataba de un tercer receptor, el cual fue nombrado como α_{1D} .

Algunos de los agonistas que muestran selectividad para el α_{1A} -AR incluyen a: [125 I]HEAT (pK_d 10), oximetazolina (pK_i 8-8.2), y antagonistas como; 5-metilurapidil (pK_i 8.9-9.2), (+) níguldipina (pK_i 9.1-10), (-)YM617 (pK_i 10.7), RS-100329 (pK_i 9.6), WB 4101 (pK_i 10.2) (IUPHAR database, 2011).

Los compuestos [125 I]HEAT (pK_d 10.2), oximetazolina (pK_i 6.5), fenilefrina (pIC_{50} 6.3-7.5) muestran baja afinidad y actividad intrínseca para el α_{1B} -AR, el antagonista (+) ciclazosina muestra alta afinidad (pK_i 9.9) para este receptor en estudios de unión a radioligandos con receptores recombinantes; sin embargo, en

tejido aislado carece de selectividad. Un péptido de 19 aminoácidos, rho-TIA (pK_i 8.4), se ha reportado como antagonista no competitivo (Base de datos IUPHAR, 2011).

Algunos de los agonistas más usados para estudiar al subtipo α_{1D} -AR son: [125 I]HEAT (pK_d 9.5), (-)noradrenalina (pK_i 7.4), (-)adrenalina (pK_i 7.2), y los antagonistas BMY7378 (pK_i 8.7-9.1) y YM 17 (pK_i 10.2). (Minneman, 1994).

1.4.3 Localización y función

Estudios sobre la función en la que participa cada α_1 -AR establecen que el α_{1A} -AR es responsable de mediar respuestas inotrópicas positivas en cardiomiocitos de rata (Yu y cols., 1994; Endoh y cols., 1996; Nagashima y cols., 1996); así como reactividad de la arteria uterina en cerdo (Nair y cols., 1996), arterias caudal, renal y mesentérica de rata, vasos deferentes (Villalobos-Molina e Ibarra, 1996; Lachnit y cols., 1997; Stassen y cols., 1997; Burt y cols., 1998; Docherty y cols., 1998), venas umbilicales, uretra y próstata de humano (Errasti y cols., 1999; Moriyama y cols., 1997; Marshall y cols., 1995; Taniguchi y cols., 1997). Los estudios funcionales sobre el α_{1A} -AR, han permitido el desarrollo de fármacos selectivos para el tratamiento de la hipertrofia prostática benigna. Un estudio en el ratón “knock out” del α_{1A} -AR, donde sustituyeron este gen por el gen reportero lacZ, permitió su localización en lechos vasculares periféricos, identificando heterogeneidad en su expresión a lo largo de los vasos sanguíneos individuales. Estos hallazgos indican que existen mecanismos del sistema nervioso simpático para el control preciso del flujo sanguíneo a lo largo de los vasos (Hague y cols., 2003).

Se sugiere que el α_{1B} -AR regula la reactividad de miocitos cardíacos de la aurícula derecha y próstata humana, vaso y aorta de rata y ratón, vénulas de músculo esquelético de rata, arteria uterina de cerdo, arterias de resistencia cutáneas y cuerpo cavernoso de conejo, y ejerce respuestas presoras en ratones descerebrados y desmedulados (Civantosy Artiñano, 2001).

Por otro lado el α_{1D} -AR participa en la reactividad de las arterias ilíaca, aorta, arteriolas de músculo esquelético (Piascik y cols., 1995), carótida, mesentérica, renal (Villalobos-Molina e Ibarra., 1996; Villalobos-Molina y cols., 1997), y pulmonar de rata; así como en la aorta y vena mesentérica canina (Daniel y cols., 1999; Kwan y cols., 1999).

1.4.4 Señalización

En los últimos años se ha hecho evidente que la estimulación de los α_1 -ARs activa múltiples vías de señalización, más allá de la proteína $G_{q/11}$ -PLC; sin embargo, el conocimiento en esta área todavía es limitado. Se ha reportado que la estimulación de los α_{1B} y α_{1D} -ARs puede activar a la fosfolipasa A2 en células COS-1 (Perez y cols., 1993). En células NIH3T3, la activación de α_{1A} - y α_{1B} -ARs pero no del α_{1D} -AR estimula p21-ras, PI3K y MAPK (Hu y cols., 1999). Un estudio de microarreglos reveló que los α_1 -ARs expresados en fibroblastos de rata, tienen efecto diferencial en los genes del ciclo celular, ya que el α_{1B} -AR media la progresión del ciclo celular y los α_{1A} -y α_{1D} -ARs participan en el arresto del ciclo celular (González-Cabrera y cols., 2004). Estudios en cardiomiocitos muestran que la activación α_1 -adrenérgica, induce respuesta hipertrófica acompañada de activación de genes de respuesta temprana (c-fos, c-jun, erg-1), proteínas contráctiles como la miosina de cadena ligera-2, y reactivación de genes embrionarios como el factor auricular natriurético (ANF), cadena pesada de la β -miosina, y α -actina (Iwaki y cols., 1990; Knowlton y cols., 1993).

Diversos estudios aportan evidencia de que ambas vías PLC-MAPK y la señalización a través de Rho inducidas por α_1 -ARs, participan en respuestas hipertróficas de cardiomiocitos (Sah y cols., 1996). Los α_1 -ARs promueven la activación de RhoA vía un mecanismo que requiere G_{12} y el factor de intercambio de nucleótidos de guanina AKAP-Lbc, en cardiomiocitos de rata, siendo una vía que regula la hipertrofia (Appert-Collin y cols., 2007). Todos estos estudios

sugieren que existen diferencias importantes entre cada receptor al causar diferentes patrones de activación (Hague y cols., 2003).

1.4.5 Oligomerización de los subtipos α_1 -AR

Los α_1 -ARs cumplen con las propiedades funcionales clásicas para todos aquellos receptores acoplados a proteínas G: 1) unión al ligando, 2) activación del receptor y desacoplamiento de la proteína G, y 3) desensibilización. Más allá de estas características, existe un gran número de paradigmas recientemente descritos para los receptores acoplados a proteínas G, que incluyen: a) actividad constitutiva, b) oligomerización y, c) interacción con proteínas de señalización. Estas características funcionales agregan varios niveles de complejidad en la señalización y regulación de los receptores α_1 -adrenérgicos, lo cual podría explicar los mecanismos de acción respecto a su especificidad funcional en varios tejidos (Cotecchia y cols., 2010).

La idea de que los receptores acoplados a proteínas G funcionan como unidades monoméricas ha cambiado en la última década. El uso de técnicas biofísicas e inmunológicas, como FRET (fluorescence resonance energy transfer), BRET (bioluminescence energy transfer) y co-inmunoprecipitación, facilitan la identificación de proteínas que interaccionan directamente con receptores acoplados a proteínas G, condición necesaria para su respuesta farmacológica, función y/o expresión en la membrana celular. En sistemas recombinantes de α_1 -ARs se ha demostrado homo y hetero-oligomerización. Los α_{1A} - y α_{1B} -ARs pueden formar homo-oligómeros, y la co-expresión del α_{1D} -AR con el α_{1B} -AR o el β_2 -AR puede favorecer la expresión en la membrana celular, ya que la mayoría del α_{1D} -AR se localiza intracelularmente, cuando se expresa solo en diversas líneas celulares. La dimerización entre los α_{1B}/α_{1D} -ARs modifica el perfil farmacológico del α_{1D} -AR, el cual pierde afinidad por su antagonista selectivo BMY7378; además, el dímero α_{1B}/α_{1D} se comporta como una sola entidad funcional con incremento en la respuesta a norepinefrina, con respecto a su entidad como monómero. La oligomerización podría representar un mecanismo adicional que

regula las respuestas fisiológicas de los diferentes α_1 -ARs, los cuales se co-expresan en las mismas células (Cotecchia y cols., 2010). Otros estudios han reportado que el α_{1D} -AR interacciona con la transglutaminasa II (Chen y cols., 2006), gC1q-R (Xu y cols., 2006), y la subunidad μ_2 del complejo adaptador de clatrina AP2 (Diviani y cols., 2003).

1.4.6 Modelos Murinos Genéticamente Modificados

La falta de compuestos altamente selectivos para determinar la función de cada α_1 -AR, dentro del sistema cardiovascular, encaminó el desarrollo de ratones modificados genéticamente.

Con el primer ratón “knockout” (KO) para el α_{1B} -AR, se marcó la pauta para una serie de estudios que caracterizaron cada uno de los α_1 -ARs. El ratón KO para el α_{1B} -AR, mostró un efecto presor a fenilefrina disminuido, con presión normal en reposo de 114 ± 2 mmHg (Cavalli y cols., 1997). Se crearon los modelos KO para los α_{1A} - y α_{1D} -ARs, los cuales muestran en reposo menor presión sanguínea y respuestas a fenilefrina también disminuidas (KO α_{1A} , 104 ± 5 mmHg y KO α_{1D} , 99.1 ± 1.7 mmHg). Se atribuye un papel importante en la regulación del tono vascular a los α_{1A} - y α_{1D} -ARs ya que, adicionalmente, estos se expresan como subtipos principales en las arterias de resistencia (α_{1A}) y de conductancia (α_{1D}) (Rokosh y cols., 2002; Tanoue y cols., 2002). Los estudios en ratones modificados genéticamente han provisto de una visión interesante en la hipertrofia y función cardíaca, los α_{1A} - y α_{1B} -ARs se expresan en cardiomiocitos, predominando el α_{1A} -AR en humanos y el α_{1B} -AR en roedores. Los ratones que sobreexpresan el α_{1B} -AR constitutivamente activo, desarrollan hipertrofia cardíaca sin cambios en la presión arterial (Milano y cols., 1994). Por otro lado, los ratones con doble interrupción en los genes α_{1A} y α_{1B} , muestran menor crecimiento del corazón después de nacer, menor gastocardiaco, y mayor mortalidad después de aumentar la sobrecarga de presión, con lo que se muestra que estos dos receptores son indispensables para el crecimiento y correcta función del corazón después del nacimiento (O’Connell y cols., 2003).

Recientemente se obtuvieron por cruzamiento entre ratones KO para cada α_1 -AR ($\alpha_{1A}^{-/-}$, $\alpha_{1B}^{-/-}$ y $\alpha_{1D}^{-/-}$), ratones con los tres receptores truncos (triple KO). Estos ratones cursan con presión arterial sistólica baja (~90 mmHg), y carecen de respuesta contráctil a norepinefrina; sin embargo, aumentan las respuesta vasculares a $\text{PGF}_{2\alpha}$ y a 5-HT en aorta torácica, comparada con la cepa silvestre (WT), así como sobreexpresión de los receptores 5HT_{2A} (Sanbe y cols., 2007; Sanbe y cols., 2009). Estos hallazgos sugieren que los α_1 -ARs regulan la expresión de otros vasoconstrictores, evidenciadas al estar ausentes.

1.4.7 Receptores α_1 -adrenérgicos y su relación con la hipertensión

Los mecanismos que inducen al desarrollo de la hipertensión no están del todo claros; sin embargo, a nivel vascular se han asociado varios factores, como son: la disfunción endotelial, los cambios estructurales en las paredes de los vasos sanguíneos y la hipersensibilidad a estímulos contráctiles (Ibarra y cols., 1998). La activación del sistema nervioso simpático juega un papel determinante en el incremento de la presión arterial. La aorta y carótida aisladas de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) mostraron que las arterias aorta y carótida de las ratas hipertensas se contraen a concentración baja de norepinefrina y que este fenómeno no ocurría en las arterias mesentérica y caudal. Es interesante que, en las arterias en las que se observó hipersensibilidad, predomina funcionalmente el α_{1D} -AR (Ibarra y cols., 1998). Se ha sugerido que la hipersensibilidad del músculo liso vascular a estimulación α_{1D} -adrenérgica desempeña un papel importante en la génesis y el mantenimiento de la hipertensión en ratas SHR (Villalobos-Molinay cols., 1999). Los estudios de arterias aisladas han identificado una población de α_{1D} -AR constitutivamente activa en aorta de rata, donde este predomina funcionalmente (Gisbert y cols., 2000), en aorta y mesentérica de ratas SHR, donde la actividad constitutiva es mayor, esta es abatida por el antihipertensivo captopril (inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina) hay una lenta recuperación del tono basal tras la eliminación del estímulo adrenérgico únicamente en las arterias donde predomina

el α_{1D} -AR (Gisbert y cols., 2002). Por otro lado, en los ratones KO para el α_{1D} -AR, se trató de inducir hipertensión por nefrectomía subtotal y la ingesta de sal-DOCA al 1% (acetato de deoxicorticosterona) durante 35 días: los ratones silvestres mostraron hipertensión y la mitad murieron por edema, mientras que los ratones knock out incrementaron su presión arterial sin llegar al estado hipertensivo y todos sobrevivieron al tratamiento, lo que sugiere que el α_{1D} -AR desempeña un papel muy importante en el desarrollo de hipertensión por ingesta alta en sal y que los antagonistas selectivos α_{1D} -adrenérgicos podrían tener un potencial terapéutico en la hipertensión (Tanoue y cols., 2002).

1.5 Estructura arterial

Las arterias constan de tres capas: 1) la *túnica íntima*: en contacto directo con la sangre y constituida por una monocapa de células endoteliales, que la separa la lámina elástica interna (Ross, 1993), 2) la *túnica media*: capa intermedia del vaso sanguíneo, formada por células musculares lisas reforzadas por tejido conectivo elástico (Stevens y Lowe., 2006), las células musculares que tienen la maquinaria contráctil de los vasos sanguíneos, y 3) la *túnica adventicia*: capa externa de los vasos sanguíneos, compuesta por fibroblastos (más del 99%), fibras de colágena y elastina; además, tiene terminaciones nerviosas y ocasionalmente células cebadas y macrófagos (Faber y cols., 2001).

1.6 Células de músculo liso vascular

Las células de músculo liso son indispensables para el buen funcionamiento de los vasos sanguíneos. Mediante reactividad y relajación, las células alteran el diámetro luminal, lo cual posibilita al sistema circulatorio el mantener la presión sanguínea apropiada (Boron y Boulpaep, 2005).

La $[Ca^{+2}]_i$ libre en músculo liso vascular, es el principal determinante para la reactividad de las células. Una consecuencia del aumento en la $[Ca^{+2}]_i$, es

favorecer la formación del complejo calcio-calmodulina-cinasa de la cadena ligera de la miosina, que fosforila a la cadena ligera de la miosina y permite su unión a la actina, que por deslizamiento de sus filamentos produce la reactividad (Horowitz y cols., 1996; L'Heureux y cols., 2001). Las células de músculo liso vascular, además de la reactividad tienen otras funciones, que son muy importantes en la remodelación de los vasos sanguíneos en condiciones fisiológicas, como en el embarazo y el ejercicio, en estos casos, las células de músculo liso vascular sintetizan grandes cantidades de componentes que forman la matriz extracelular y aumentan la migración y proliferación (Rensen y cols., 2007). Debido a estas propiedades, las células de músculo liso no solamente se ajustan a corto plazo a la regulación del diámetro del vaso, sino también a la adaptación a largo plazo, a través de remodelación estructural cambiando el número de células y la composición del tejido conectivo (Rensen y cols., 2007).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se han descrito varios tipos de interacción entre el sistema renina-angiotensina y el sistema nervioso simpático a diferentes niveles, compartiendo una función prominente en implicaciones fisiopatológicas. La evidencia experimental sugiere que la angiotensina II incrementa la neurotransmisión noradrenérgica en la arteria caudal de ratas SHR (Cox y cols., 1996); así como en bazo y aurícula de ratón (Cox y cols., 1999). En el SNC la angiotensina II estimula la síntesis, recaptura y liberación de norepinefrina en el hipotálamo y el núcleo del tallo cerebral (Quadri y cols., 1991; Stadler y cols., 1992).

A nivel celular, la incubación de células de músculo liso vascular de rata con angiotensina II aumentó la expresión del receptor α_{1D} -AR (Zhuo-Wei y cols., 1995). Estos hallazgos concuerdan con los estudios realizados en ratas SHR pre-hipertensas (1 mes de edad) tratadas con captopril, el cual disminuyó la expresión del ARN mensajero y de la proteína para el α_{1D} -AR en la aorta (Godínez-Hernández y cols., 2006). Por otro lado se encontró que en el ratón knock out para el receptor de aril hidrocarburos (AhR^{-/-}), el cual presenta un incremento (9 veces) en la angiotensina II plasmática, además de hipertrofia cardíaca e hipertensión

(Lund y cols., 2003) la expresión del mensajero y la proteína del α_{1D} -AR se encuentran aumentados en un 77-80% (Villalobos-Molina y cols., 2008). Sin embargo, estos datos son controversiales ya que estudios previos con cardiomiocitos de ratas neonatas, mostraron que la angiotensina II disminuyó la expresión del α_{1A} -AR y no cambió la expresión de los receptores α_{1B} -y α_{1D} -ARs (Hong-Tai y cols., 1997).

A nivel renal existe una densa inervación adrenérgica (Felder y cols., 1983) que juega un papel importante en el mantenimiento de las funciones renales y la presión arterial sanguínea (Bello-Reuss, 1975; Squire y cols., 1993; Dendorfer y cols., 2002). Se ha descrito que las catecolaminas regulan la hemodinámica renal, principalmente por vasoconstricción, mediada por activación de α_1 -ARs (Drew y Whiting., 1979). Tal activación incrementa la resistencia vascular, la redistribución del flujo sanguíneo de la corteza hacia la médula, aumentando la velocidad de secreción de renina (Bucley y cols., 1979; Galbusera y cols., 1988; Osborn y cols., 1983). Algunos estudios han sugerido que el aumento en el tono simpático renal, incrementa la vasoconstricción debido a un aumento en la actividad del SRA promoviendo una interacción cruzada entre receptores AT_1 y α_1 -adrenérgicos en la vasculatura renal de ratas normales (Abdulla y cols., 2009).

3. JUSTIFICACIÓN

Tomando en consideración que la angiotensina II influye de manera importante en la actividad simpática vía α_{1D} -AR y que ésta tiene diversas funciones fisiológicas y patológicas en el sistema cardiovascular, resulta interesante averiguar si la angiotensina II modifica la expresión de los α_{1A} - y α_{1B} -ARs en células de músculo liso vascular de ratones $\alpha_{1D}^{-/-}$, así como observar si se modifica la respuesta de los receptores AT_1R y α_1 -ARs en ausencia del α_{1D} -AR, al evaluar la respuesta vascular en aorta y mesentérica, lecho mesentérico y riñón, así como la movilización de $[Ca^{+2}]_i$.

4. HIPÓTESIS

Angiotensina II, modifica la expresión de los receptores α_{1A} y α_{1B} adrenérgicos en cultivos primarios de células de músculo liso de aorta y la reactividad vascular para angiotensina II se encuentra modificada en ratones knock out $\alpha_{1D}^{-/-}$ -AR.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de angiotensina II a nivel funcional y molecular en células de músculo liso y lechos vasculares de ratón knock out $\alpha_{1D}^{-/-}$ -AR.

5.1 *Objetivos específicos*

- 1) Evaluar la respuesta vascular a angiotensina II y fenilefrina en las arterias aorta y mesentérica, lecho mesentérico y riñón de ratones C57Black/6J y $\alpha_{1D}^{-/-}$ -AR.
- 2) Obtención de cultivos primarios de Células de músculo liso vascular de ratones C57Black/6J y $\alpha_{1D}^{-/-}$ -AR.
- 3) Determinar la movilización de calcio intracelular.
- 4) Evaluar el efecto de angiotensina II sobre la expresión (ARNm y proteína) de los receptores α_{1A} - y α_{1B} -ARs en cultivos primarios de células de músculo liso de aorta de ratones C57Black/6J y $\alpha_{1D}^{-/-}$ -AR.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Animales

Se usaron ratones macho de 12-13 semanas de edad, cepa C57Black/6J ($\alpha_{1D}^{+/+}$) y ratones derivados de esta cepa a los cuales se interrumpió el gen que codifica para el α_{1D} -AR ($\alpha_{1D}^{-/-}$). Estos ratones fueron donados por los Drs. A. Tanoue y G.Tsujimoto. Los ratones se mantuvieron en microaisladores que proporcionan un ambiente libre de patógenos, y condiciones controladas de temperatura, humedad, con agua y alimento a saciedad.

6.2 Determinación de genotipo

Los genotipos homocigotos, silvestre $\alpha_{1D}^{+/+}$ y $\alpha_{1D}^{-/-}$ se confirmaron purificando el ADN cromosomal en biopsias de cola de ratón y por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con los siguientes cebadores y condiciones de amplificación (Tabla 5).

Tabla 5. Cebadores y condiciones de amplificación para determinación de genotipo.

Cebador	Secuencia (5' →3')	Temperatura de alineamiento	Tamaño del amplicón	Número de ciclos
α_{1D} Sentido	CGCTGTGGTGGGAACCGGCAGCGG	65°C	300 pb	35
α_{1D} Antisentido	ACACAGCTGCACTCAGTAGCAGGTCA			
Neo Sentido	AGGATCTCCTGTTCATCTCACCTTGCTCCTG	65°C	492 pb	35
Neo Antisentido	AGAACTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGGCG			

6.3 Aislamiento y Cultivo de Células Musculares de Aorta Torácica

Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, la arteria aorta torácica fue removida y colocada en PBS estéril, se limpió de tejido conectivo y graso, el endotelio se eliminó frotando ligeramente la luz de la arteria con una pinza

dentada. Para remover la capa adventicia, la arteria se transfirió a una solución salina balanceada estéril (Hank's), que contenía 159 U/ml de colagenasa tipo II durante 5 min a 37°C. Transcurrido el tiempo, la capa adventicia se removió completamente de la arteria con unas pinzas; una vez obtenida la capa muscular libre de endotelio y adventicia, se disgregó en solución Hank's que contenía las enzimas elastasa tipo IV (2.3 U/ml) y colagenasa tipo II (159 U/ml), durante 40 min a 37°C. Las células se centrifugaron a 3500 rpm por 5 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y las células se suspendieron en 2ml de medio DMEM alto en glucosa, suplementado con 10% suero bovino fetal inactivado y solución al 5% de antibiótico-antimicótico (GIBCO 15240-062, Penicilina G, sulfato de estreptomicina y anfotericina B).

Las células se sembraron en cajas petri estériles de 10 cm de diámetro (1 arteria por caja), se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda y con 5% CO₂. A los 7 días de cultivo, las células llegaron a confluencia del 80-90%, la división celular se arrestó 12 horas antes de usar el cultivo en cada experimento, para lo cual el medio fue cambiado por DMEM alto en glucosa con antibiótico-antimicótico sin suero y se procedió a tratar a las células con angiotensina II durante 1 hora. La angiotensina II [100nM] se disolvió en solución Hank's. Las células control se incubaron en medio de arresto y con solución Hank's sin angiotensina II, durante el mismo tiempo de incubación.

6.4 Inmunocitoquímica

Se confirmó el fenotipo de células de músculo liso vascular por inmunocitoquímica contra α -actina. Las células musculares se sembraron en cubreobjetos de 1 cm de diámetro, estériles; se lavaron con PBS y se fijaron con formaldehído al 3% durante 40 min, se enjuagaron repetidas veces con PBS durante 5 min y se neutralizaron con NH₄Cl [50mM] 1 ml por 10 min, se lavaron con PBS y se permeabilizaron en hielo con acetona fría durante 30 seg, se lavaron con PBS por 20 min en agitación constante, se bloquearon con albúmina 2 h, se lavaron y se agregó el anticuerpo primario contra α -actina(1:2000) incubando toda

la noche a 4°C. Posteriormente se lavaron con PBS y se agregó el anticuerpo secundario anti- cabra acoplado al fluoróforo FITC incubando 40 min más, se lavaron exhaustivamente y se montaron los cubreobjetos añadiendo una gota de glicerol/PBS (1:1) y cubriendo con otro cubreobjetos limpio, se sellaron y se protegieron de la luz hasta su análisis en el microscopio confocal.

Para la detección de los α_1 -ARs, el procedimiento fue el mismo, solo se utilizaron los 3 anticuerpos contra los α_1 -ARs a dilución 1:3500, y de anticuerpo secundario se utilizó anti-conejo acoplado al fluoróforo CY5 y/o FITC (1:200).

Para detectar el citoesqueleto, y como medio de contraste, se usó el fluoróforo Faloidina-rodamina 50 μ l (stock 0.1 mg/250 μ l), se incubó 40 min, se lavaron las preparaciones exhaustivamente y se procedió a montar y visualizar en el microscopio confocal Leica.

6.5 Western Blot

Las células de 7 días de cultivo (control y tratadas) se lavaron con PBS estéril y se despegaron de las cajas petri con una espátula, se homogenizaron en buffer RIPA (10 mM Tris-HCl pH7.4, 1mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.1% Tritón, 0.1% SDS), e inhibidor de proteasas (Minicomplete, Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA). La concentración de proteína total se determinó por el método de Lowry. Se tomaron 50 μ g de proteína y se diluyeron en buffer Laemlli, se separaron las proteínas en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (10% SDS) y se transfirieron a una membrana de PVDF (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Las membranas se bloquearon por 1 h a temperatura ambiente en T-BST (20 mM Tris, pH 7.4, 0.1% Tween 20) con leche Svelty® (Nestlé) al 5%, se enjuagaron con T-BST y se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos contra los α_{1A} -, α_{1B} -, α_{1D} -ARs (dilución 1:3500), y el anticuerpo policlonal de conejo contra β -actina (43 KDa, Santa Cruz Biotechnology) (dilución 1:1000). Las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a la peroxidasa de rábano (1:1000), durante 1 ha temperatura ambiente, las membranas se lavaron varias veces con TBS-T y se

incubaron con luminol, la detección de la bioluminiscencia fue por autorradiografía en placas fotográficas. Se hizo el análisis densitométrico de las bandas usando el programa Multi Gauge 3.0 (FLA-FUJIFILM).

6.6 Purificación de ARN total

Se purificó el ARN total de las células de 7 días de cultivo, con Trizol® (Invitrogen), las células se homogenizaron con el homogenizador Pro 200 (Pro Scientific Inc.) en hielo a 4°C. Posteriormente se indujo la separación de la fase acuosa por emulsificación con cloroformo. Se recuperó la fase acuosa y se precipitó el ARN total con isopropanol en presencia de glucógeno como acarreador. El ARN precipitado se resuspendió en agua Milipore tratada con dietil pirocarbonato para eliminar la actividad de las RNasas. La concentración de ARN total se determinó por espectrofotometría. Se realizó el análisis de integridad del ARN por electroforesis en gel desnaturizante.

6.6.1 Obtención de ADNc por transcripción reversa

Antes de la obtención del ADNc, se verificó la integridad del ARN total en un gel de agarosa en condiciones desnaturizantes y la imagen se muestra en la figura 2. La primera cadena de ADN complementario se sintetizó con la enzima transcriptasa reversa a partir de 5 µg de ARN, previamente tratado con 1.5 U de DNasa I recombinante libre de RNasas (Roche Applied Science, Mannheim Germany), para eliminar el ADN cromosomal contaminante. Como cebador se utilizó 1 µg de oligo (dT) y 1.5 µg de hexanucleótidos. La reacción usó 2mM de dNTPs, transcriptasa reversa (Roche), e inhibidor de RNasas (Invitrogen), en un volumen total de 50 µl, a 42°C. Se confirmó la ausencia de contaminación, incluyendo un tubo sin transcriptasa reversa (-RT).

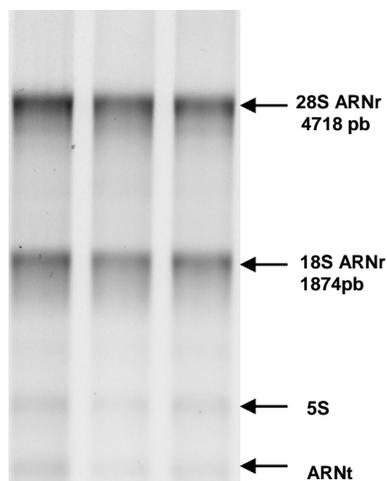


Figura 2. Análisis de integridad del ARN total.

6.6.2 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

El monitoreo de fluorescencia producida en la PCR es la base de la PCR en tiempo real, donde un incremento significativo en la fluorescencia durante la fase exponencial de la reacción se correlaciona con la cantidad de ADNc en estudio. Uno de los marcadores fluorescentes más utilizados para la PCR en tiempo real es el fluorocromo SYBR® Green, tiene fluorescencia indetectable cuando está en su forma libre, pero una vez unido a DNA de doble cadena, comienza a emitir fluorescencia (Livak y cols., 2001). La ventaja de usar SYBR® Green es que se pueden usar cebadores para cualquier gen que se quiera estudiar, siendo más económico que el uso de sondas específicas para cada gen. Sin embargo, la especificidad puede disminuir si hay amplificación de productos no específicos (“primer-dimer”), para hacer frente a esta situación se debe hacer un análisis del producto en la curva de fusión (*Melt curve*), cuya forma se relaciona con el contenido de GC, tamaño de los amplicones y la secuencia de los mismos. Este análisis permite que los productos no específicos puedan ser discriminados de los amplicones específicos. Para obtener resultados confiables en la PCR tiempo real es importante optimizar la reacción. Los criterios más importantes para la optimización son especificidad, sensibilidad, eficiencia y reproducibilidad. Los factores que deben ser optimizados son la mezcla maestra de reactivos, diseño de cebadores que dé un producto de amplificación pequeño (menor a 150pb),

concentración de cebadores y su temperatura de alineamiento, concentración de muestra y concentración de fluorocromo. También es útil realizar electroforesis en gel de agarosa para corroborar la longitud del producto de amplificación.

6.6.3 Diseño de cebadores

Los cebadores utilizados para cada receptor se diseñaron contra las secuencias del ADN complementario de cada uno de ellos. La secuencia de cada gen se consultó en la base de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). La secuencia de cada cebador, la posición de la secuencia en el gen, el tamaño del amplicón y el número de acceso del ADN complementario en el NCBI se enlistan en la siguiente tabla (Tabla 6).

Tabla 6. Cebadores utilizados para las reacciones de amplificación en tiempo real.

Cebador	Secuencia (5' → 3')	Posición	Tamaño del amplicón	Número de acceso
α_{1A} Sentido	ACTGGGCCTTTGGCAGGGTGTCTG	1205 a la 1283	79 pb	NM_013461
α_{1A} Antisentido	AGGCCCATGATGGACGCTGTGC			
α_{1B} Sentido	ACACCGGCCACAACACATCAGCA	263 a la 354	92 pb	NM_007416
α_{1B} Antisentido	TGTGGAGTTGCTCGAGGTCTGGTTG			
α_{1D} Sentido	TGGTATCTGTGGGACCGCTACTAGG	776 a la 932	152 pb	NM_013460
α_{1D} Antisentido	TACACGCGGCAGTACATGACCACG			
AT _{1A} Sentido	CTGGATGATGCTGTCTGGCCGGA	4 a la 104	100 pb	BC036175
AT _{1A} Antisentido	AGAGCTGGTACTGGCTTCAGCCAC			
18s Sentido	GGGAGCCTGAGAAACGGC	437 a la 504	68pb	NR_003278
18s Antisentido	GGGTCGGGAGTGGGTAATTT			

El ADN complementario, sintetizado por transcripción reversa, se amplificó por PCR en tiempo real, con cebadores específicos para cada receptor y cebadores para el gen de referencia 18S ribosomal. La reacción de amplificación se realizó usando la mezcla maestra Platinum[®] SYBR[®]Green qPCR Super Mix-UDG (Invitrogen), que contiene la enzima Taq DNA polimerasa, buffer de reacción, MgCl₂ y dNTPs.

La cuantificación de los cambios en la expresión génica se determinó usando el método de Livak y cols.(2001). El método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ hace uso del parámetro Ct

(threshold cycle) definido como el ciclo en el cual la fluorescencia emitida durante la fase exponencial de la reacción, cruza el umbral establecido por el operador, significativamente por encima de la línea base (Figura 3).

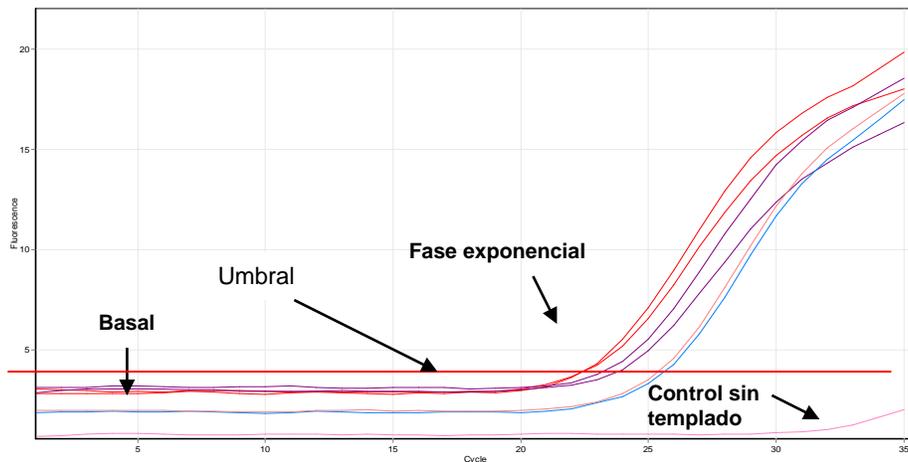


Figura 3. Gráfica de amplificación de PCR a tiempo real. El eje de las Y, representa la cantidad de fluorescencia normalizada y el eje de las X el número de ciclos. La línea basal se refiere a los ciclos iniciales donde no se detectan cambios en la cantidad de fluorescencia, el umbral es donde se produce un cambio significativo en la fluorescencia y el corte entre el umbral y la curva de amplificación determinan el Ct o ciclo umbral, que se emplea para la cuantificación. El cálculo de Ct siempre se realiza en la fase exponencial de la reacción.

El número de ciclos donde la curva de fluorescencia atraviesa el umbral establecido corresponden al valor Ct que se utiliza en los cálculos.

El método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ es un análisis que compara, de manera relativa, la abundancia de un ARNm normalizado con la abundancia de un transcrito de referencia (18S ribosomal) en dos o más condiciones de estudio.

Para este análisis usamos la siguiente fórmula:

$$2^{-(Ct \text{ gen } x (\alpha_1\text{-AR}) - Ct \text{ gen referencia (18S)})_{\text{tiempo } x} - (Ct \text{ gen } x (\alpha_1\text{-AR}) - Ct \text{ gen ref erencia (18S)})_{\text{tiempo } 0}}$$

6.7 Experimentos *in vitro*

6.7.1 Reactividad vascular

Se disecaron las arterias aorta, y mesentérica de ratones macho $\alpha_{1D}^{+/+}$ y $\alpha_{1D}^{-/-}$ de 12-13 semanas de edad, se limpiaron de tejido conectivo y graso, se les removió el endotelio y se cortaron en anillos, los cuales se colocaron en ganchos de acero inoxidable y se montaron por un extremo al fondo de una cámara para órgano aislado, que contiene solución Krebs a 37°C, pH 7.4 y oxigenación constante (95%O₂: 5%CO₂), y por el otro extremo a un transductor de tensión isométrica Grass FT03 (Astromed, West Warwick, RI, USA), acoplado a un sistema de análisis MP100 (Biopac Instruments, Inc., Santa Bárbara, CA, USA). Los datos se procesaron con el programa Acqknowledge (Biopac). Los anillos de arteria aorta se sometieron a tensión óptima de 1.5 gramos, a partir de la cual se pudieran contraer o relajar; mientras que los anillos de arteria mesentérica se sometieron a tensión óptima de 1 gramo. Cada 30 min los anillos se sometieron a concentración sub-máxima de fenilefrina ($1 \times 10^{-7}M$), por 3 ocasiones para sensibilizar el tejido a las condiciones experimentales. En la tercera sensibilización, los anillos se expusieron a carbacol ($1 \times 10^{-6}M$), con el fin de verificar la completa remoción del endotelio.

6.7.2 Reactividad renal y mesentérica

Se anestesió a los ratones con pentobarbital sódico (50 mg/Kg) y bajo un microscopio estereoscópico (Zeiss) se canuló la arteria renal, se conectó a una bomba de perfusión acoplada a un transductor de presión Biopac, haciendo pasar solución Krebs oxigenada (95%O₂:5%CO₂) a 37°C y pH 7.4, hacia el riñón a 4 ml/min de perfusión, se le retiró la cápsula fibrosa que lo cubre y se dejó estabilizar 30 min., antes de la curva concentración-respuesta a los agonistas.

Para perfundir el mesenterio se canuló la arteria mesentérica principal y se conectó a la bomba de perfusión, acoplada a un transductor de presión Biopac,

haciendo pasar solución Krebs a 3ml/min, se separó del intestino y se dejó estabilizar 30 min antes de realizar la curva concentración-respuesta a los agonistas.

6.7.3 Movilización de calcio intracelular

Las células musculares de aorta de ratones $\alpha_{1D}^{+/+}$ y $\alpha_{1D}^{-/-}$ de 7 días de cultivo, se arrestaron de crecimiento celular al ser incubadas con el medio de cultivo sin suero durante 12 h. Una vez transcurridas las 12 h, se lavaron con solución PBS estéril, se incubaron las células en el medio Krebs/Hepes/BSA/CaCl₂ 7.85% más el agente quelante de calcio Fura 2AM [5 μ M], y ácido plurónico al 0.1% para incrementar la permeabilidad de las células durante 1 hora a 37°C. Se lavaron las células 3 veces con PBS, se tripsinizan 1 min y se detiene la reacción con solución Krebs/Hepes/BSA, se homogenizan las células y se lavan 5 veces. Las células de cada caja pertri se suspendieron en 5 ml de solución Krebs/Hepes. Las mediciones de calcio se realizaron en un espectrofluorómetro. Para los ensayos en microscopio de fluorescencia se utilizó el agente FLUO-4 y se observaron las células ancladas a cubreobjetos de cristal.

6.8 Reactivos

6.8.1 Cultivo celular e inmunocitoquímica

Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose 1X No. Cat. 11965 (Gibco ®)

Elastasa IV 4.61 U/mgP (Worthington Biochemical Corporation)

Colagenasa II 317 U/mgP (Worthington Biochemical Corporation)

Hank's balanced salt solution. No. Cat. 24020-117 (Invitrogen)

Antibiótico-antimicótico 100X No. Cat. 15240-062 (Gibco ®)

Penicilina G sódica 10,000 U/mL, sulfato de estreptomicina 10,000 μ g/mL y

anfotericina B 25 μ g/mL como fungizona®).

6.8.2 *In vitro*

Fenilefrina HCl, rauwolscina HCl, (±)-propranolol HCl, carbamilcolina HCl (carbacol), norepinefrina HCl, angiotensina II, obtenidos de Sigma-Aldrich Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Los reactivos utilizados para preparar la solución Krebs-Ringer fueron grado analítico y se prepararon en fresco para cada experimento.

6.8.3 Western blot

Minicomplete, Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA.

Membrana de PVDF (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)

Leche Svelty® (Nestlé)

Los reactivos utilizados para preparar las soluciones buffer: PBS, RIPA, T-BST, así como la poliacrilamida, SDS y Laemlli fueron grado analítico y se prepararon en fresco para cada ensayo.

6.8.4 Purificación de ARN total

Trizol® (Invitrogen)

Cloroformo ®(Invitrogen), isopropanol ® (Invitrogen) y glucógeno (Fermentas)

DNasa I recombinante libre de RNasas (Roche Applied Science, Mannheim Germany).

Agarosa ® (Invitrogen)

6.8.5 Obtención de ADNc

Oligo (dT), hexanucleótidos, dNTPs (Gibco, No. Cat 402256), inhibidor de RNasas; todos estos de ® (Invitrogen).

Transcriptasa Reversa (Roche Applied Science, Mannheim Germany).

6.8.6 PCR Tiempo real

Platinum® SYBR®Green qPCR Super Mix-UDG (Invitrogen)

Los cebadores específicos para cada gen fueron sintetizados por ® (Invitrogen).

7. RESULTADOS

7.1 Confirmación de genotipo

Para asegurarnos que las cepas de ratón conservaban sus genotipos homocigotos $\alpha_{1D}^{+/+}$ y $\alpha_{1D}^{-/-}$, se procedió a confirmar el genotipo tomando las secuencias y condiciones de amplificación facilitadas por Tanoue y cols. (2005); sin embargo, encontramos múltiples bandas que correspondían a la unión inespecífica de los cebadores diseñados para amplificar la porción interrumpida del gen α_{1D} -adrenérgico, por el gen de resistencia a neomicina, por lo que decidimos realizar la reacción de PCR duplex con los cebadores que flanquean el gen que codifica al α_{1D} -AR, junto con un juego de cebadores distinto para el gen de resistencia a neomicina y modificando parámetros como la temperatura de alineamiento, número de ciclos y concentración de cebadores.

Nuestras condiciones de amplificación nos permitieron obtener bandas únicas, una de 300 pares de bases (pb) correspondiente al genotipo silvestre, mientras que la banda que amplifica en 492pb corresponde al genotipo $\alpha_{1D}^{-/-}$ homocigoto, como lo muestra la figura 4.

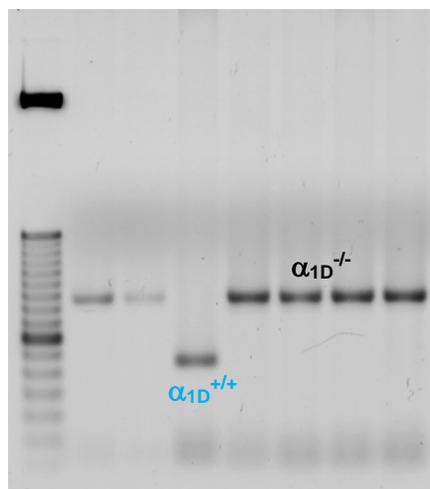


Figura 4. Electroforesis en gels de agarosa al 2% donde se muestran los productos de amplificación, específicos para el genotipo de ratones $\alpha_{1D}^{-/-}$ que corresponde a la banda de 492 pb, y el genotipo silvestre $\alpha_{1D}^{+/+}$ que corresponde a la banda de 300 pares de bases. El marcador de pares de bases se encuentra a la izquierda.

7.2 Reactividad vascular en anillos de aorta y mesentérica

Para analizar la reactividad vascular vía activación de los AT₁Ry α_1 -ARs, se aislaron las arterias aorta (arteria de conducción) y mesentérica (arteria de resistencia) de ratones $\alpha_{1D}^{+/+}$ y $\alpha_{1D}^{-/-}$, se realizaron curvas concentración-respuesta a angiotensina II y fenilefrina. En aorta de ratones $\alpha_{1D}^{+/+}$, la reactividad en respuesta a fenilefrina fue dependiente de la concentración, alcanzando su efecto máximo en 1 ± 0.12 g; en la aorta e ratones $\alpha_{1D}^{-/-}$, la respuesta a fenilefrina fue también dependiente de la concentración pero está desplazada hacia la derecha, y alcanza solamente la mitad del efecto máximo mostrado en ratones $\alpha_{1D}^{+/+}$. El péptido angiotensina II, no indujo un efecto contráctil importante en las aortas de los ratones $\alpha_{1D}^{+/+}$ y $\alpha_{1D}^{-/-}$ (Fig. 5).

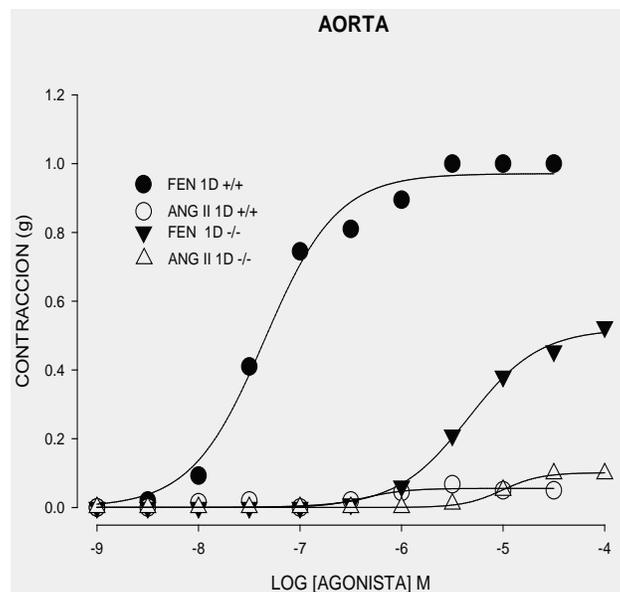


Figura 5. Curva concentración-respuesta a fenilefrina y angiotensina II en anillos de aorta de ratones $\alpha_{1D}^{+/+}$ (●,○) y $\alpha_{1D}^{-/-}$ (▼,△). n= 4-7.

La reactividad expresada como contracción en gramos, producida en la arteria mesentérica de ratones $\alpha_{1D}^{+/+}$ y $\alpha_{1D}^{-/-}$ fue dependiente de la concentración a fenilefrina; sin embargo, en la mesentérica de ratones $\alpha_{1D}^{+/+}$ fenilefrina produjo reactividad a menor concentración, con un efecto máximo menor al mostrado por la mesentérica de $\alpha_{1D}^{-/-}$, por el contrario; la fenilefrina fue menos potente, desplazando ~ 12.74 veces hacia la derecha en la mesentérica de $\alpha_{1D}^{-/-}$. Por otro lado, la angiotensina II no produjo reactividad en arteria mesentérica de ninguna de estas cepas de ratones (Fig. 6).

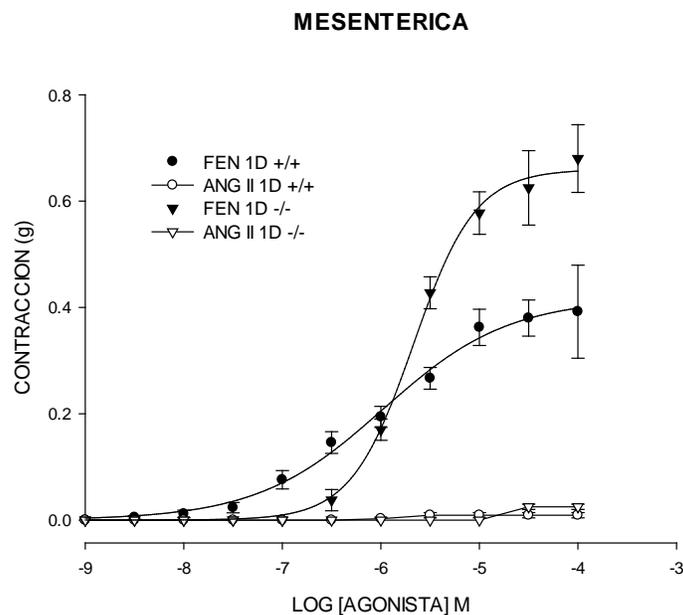


Figura 6. Curva concentración-respuesta a fenilefrina y angiotensina II en anillos de arteria mesentérica de ratones $\alpha_{1D}^{+/+}$ (\bullet, \circ) y $\alpha_{1D}^{-/-}$ ($\blacktriangledown, \Delta$). n=4-7.

Con el fin de averiguar si la incubación de aorta con angiotensina II modificaba la respuesta adrenérgica, procedimos a incubar durante una hora las arterias con el octapéptido, y una vez transcurrido el tiempo, enjuagamos y realizamos una curva concentración- respuesta a fenilefrina, observando que dicha reactividad no se modificaba (Fig. 7).

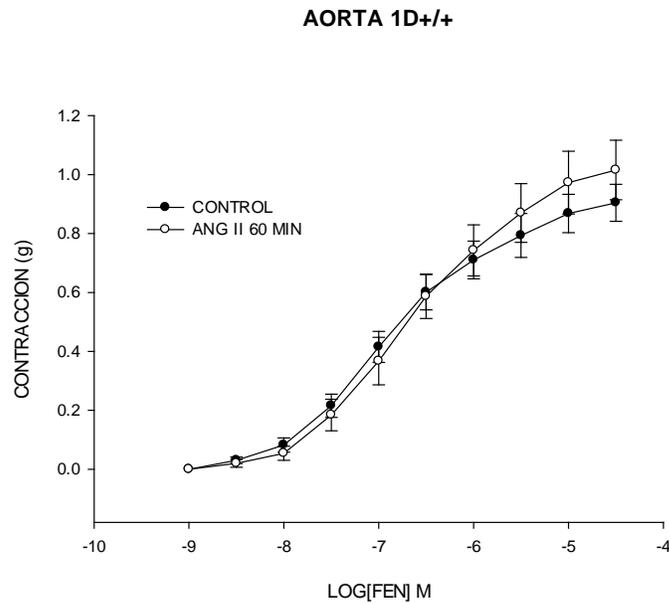


Figura7. Curva concentración-respuesta a fenilefrina en anillos de arteria aorta de ratones $\alpha_{1D}^{+/+}$ incubados durante 1 h con angiotensina II (● Control, ○ tratados) n=4-7.

7.3 Reactividad vascular de mesenterio y riñón.

La reactividad vascular medida como presión de perfusión, en mesenterio de ratones $\alpha_{1D}^{+/+}$ fue de 44.9 ± 0.6 mmHg a nivel basal, mientras que el mesenterio de ratones $\alpha_{1D}^{-/-}$ mostró una presión de perfusión basal menor (35.8 ± 2.7 mmHg, $p < 0.05$). La presión de perfusión incrementó de manera dependiente de la concentración al agonista fenilefrina, en ambas cepas de ratones. Se observó un desplazamiento de ~ 16 veces hacia la derecha en la curva a fenilefrina en mesenterio de $\alpha_{1D}^{-/-}$. La angiotensina II, mostró un efecto presor en la perfusión de este órgano que no se observó en la arteria aorta, y fue más potente que fenilefrina; sin embargo, el efecto máximo alcanzó alrededor del 10% del efecto producido por el agonista adrenérgico en las dos cepas de ratones (Fig. 8).

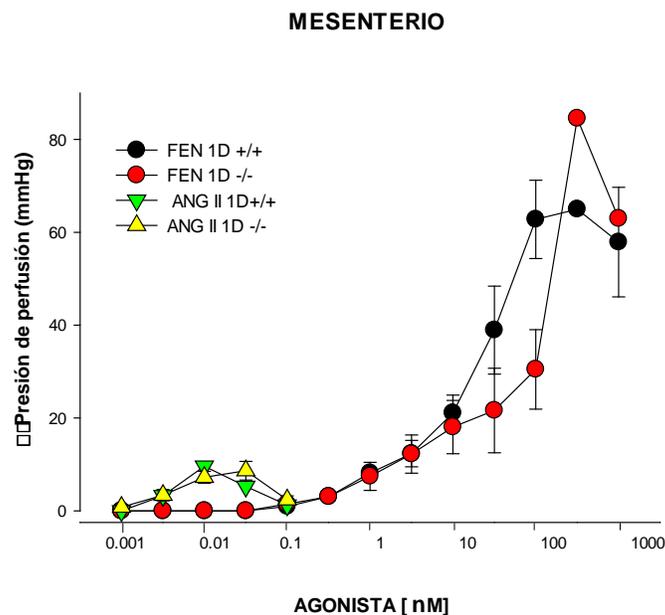


Figura 8. Curvas concentración-respuesta a fenilefrina y angiotensina II en la presión de perfusión de mesenterio de ratones $\alpha_{1D}^{+/+}$ y $\alpha_{1D}^{-/-}$. Concentración del agonista expresada en nanomolas. n= 6.

En riñón perfundido, la presión de perfusión basal fue de 91.2 ± 2.6 mmHg en ratones $\alpha_{1D}^{+/+}$ y de 90.4 ± 1.9 mmHg en ratones $\alpha_{1D}^{-/-}$. La fenilefrina incrementó la presión de perfusión, de manera dependiente de la concentración, en los riñones de ratones $\alpha_{1D}^{+/+}$ y $\alpha_{1D}^{-/-}$, sin embargo; la curva de fenilefrina muestra un ligero desplazamiento hacia la derecha, que no es significativamente diferente en el riñón de ratones $\alpha_{1D}^{-/-}$ comparada con la curva en riñón $\alpha_{1D}^{+/+}$. El efecto máximo alcanzado con fenilefrina en riñón de ratones $\alpha_{1D}^{-/-}$ fue significativamente menor al obtenido en riñones $\alpha_{1D}^{+/+}$ (Fig.9).

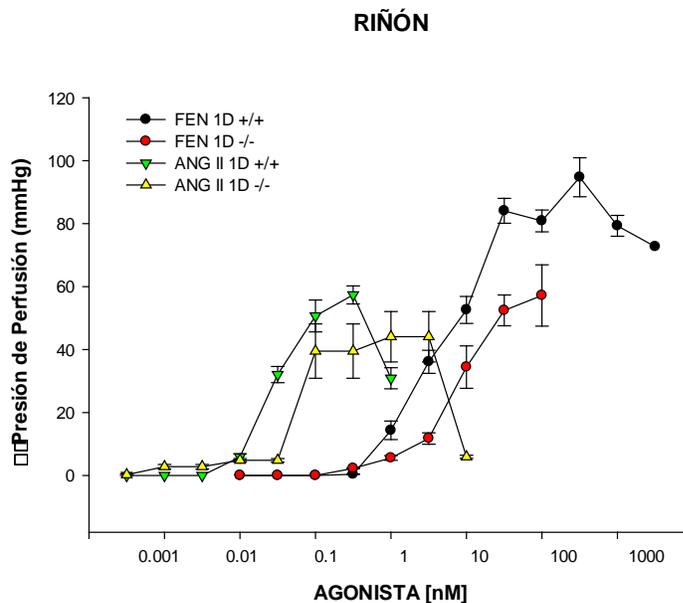


Figura 9. Curvas concentración-respuesta a fenilefrina y angiotensina II en la presión de perfusión en riñón de ratones $\alpha_{1D}^{+/+}$ y $\alpha_{1D}^{-/-}$. Concentración del agonista expresada en nanomolas. n=7.

Por su parte, angiotensina II ejerció un efecto presor dependiente de la concentración en los riñones $\alpha_{1D}^{+/+}$ y $\alpha_{1D}^{-/-}$. De manera interesante, en los riñones $\alpha_{1D}^{-/-}$, el efecto de angiotensina II se desplazó hacia la derecha, comparada con riñón de ratones $\alpha_{1D}^{+/+}$, y el efecto máximo también se vió disminuido de manera significativa (Fig.9).

En la tabla 7 se enlistan los valores de potencia relativa de fenilefrina y el efecto máximo en la reactividad de aorta y mesentérica, en la presión de perfusión de mesenterio y riñón de ratones $\alpha_{1D}^{+/+}$ y $\alpha_{1D}^{-/-}$.

Tabla7. Valores de pD_2 . n =4-7 ratones por grupo. $\alpha_{1D}^{+/+}$ (silvestre), $\alpha_{1D}^{-/-}$. E_{max} = Efecto máximo de fenilefrina expresado en gramos de reactividad en arterias aorta y mesentérica. Presión de perfusión en órganos expresada en milímetros de mercurio (mmHg). * $p < 0.05$

FENILEFRINA	$pD_2 \alpha_{1D}^{+/+}$	$pD_2 \alpha_{1D}^{+/+}$	$pD_2 \alpha_{1D}^{-/-}$	$E_{max} \alpha_{1D}^{-/-}$
AORTA	6.2 ± 0.2	1 ± 0.1	5.2 ± 0.14*	0.5 ± 0.1*
MESENERICA	6.3 ± 0.3	0.7 ± 0.1	5.7 ± 0.1*	0.4 ± 0.1*
MESENERIO PERFUNDIDO	7.5 ± 0.2	65.0 ± 1.1	6.2 ± 0.4*	84.5 ± 0.1
RIÑÓN PERFUNDIDO	8.2 ± 0.1	94.8 ± 6.1	8.1 ± 0.2	58 ± 9.7*

La tabla 8 resume los valores de potencia relativa y efecto máximo con angiotensina II, en la reactividad de las arterias aorta y mesentérica, así como los valores en la presión de perfusión de mesenterio completo y riñón de ratones $\alpha_{1D}^{+/+}$ y $\alpha_{1D}^{-/-}$.

Tabla8. Valores de pD_2 . n =4-7 ratones por grupo. $\alpha_{1D}^{+/+}$ (silvestre), $\alpha_{1D}^{-/-}$. E_{max} = Efecto máximo de angiotensina II expresado en gramos de reactividad en arterias aorta y mesentérica. Presión de perfusión en órganos expresada en milímetros de mercurio (mmHg). * $p < 0.05$

ANGIOTENSINA II	$pD_2 \alpha_{1D}^{+/+}$	$E_{max} \alpha_{1D}^{+/+}$	$pD_2 \alpha_{1D}^{-/-}$	$E_{max} \alpha_{1D}^{-/-}$
AORTA	Nd	0.06 ± 0.02	Nd	0.09 ± 0.03
MESENERICA	Nd	Nd	Nd	Nd
MESENERIO PERFUNDIDO	9.20 ± 0.1	9.6 ± 0.0	10.3 ± 0.82	8.6 ± 0.0
RIÑÓN PERFUNDIDO	10.5 ± 0.1	57.4 ± 2.4	9.2 ± 0.7*	45 ± 0.8*

7.4 Cultivo primario de células de músculo liso de aorta (CMLA)

Se usaron células confluentes de 7 días de cultivo. Para evitar que el cultivo de células musculares se contaminara con fibroblastos y/o células endoteliales, la adventicia y el endotelio fueron removidos, cuidadosamente y por completo, antes de la disociación de la capa media, y la pureza del cultivo se verificó por tinción positiva contra α -actina, específica para músculo liso (Fig. 10).

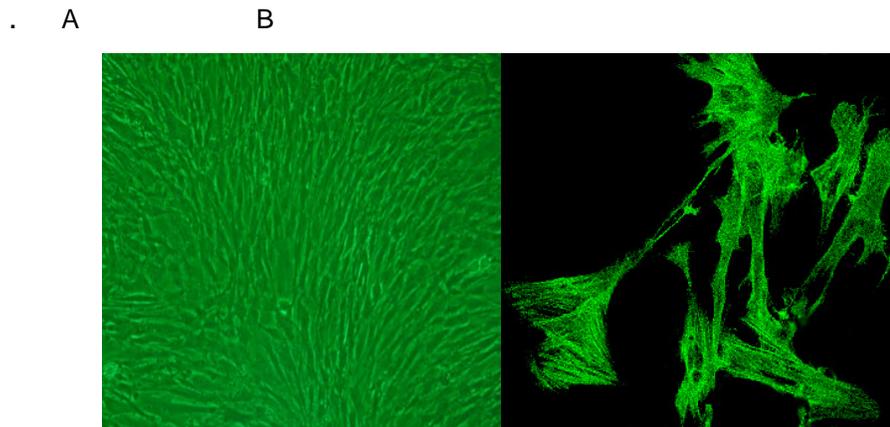


Figura 10. A) Imagen de células en confluencia, B) prueba positiva contra α -actina.

7.5 Expresión de los receptores α_1 -adrenérgicos en células de músculo liso de aorta.

Para los estudios de expresión génica, la reacción de PCR en tiempo real requirió de condiciones óptimas para su correcta ejecución.

Con el objetivo de que la concentración de los cebadores no fuera un factor limitante en la reacción de PCR en tiempo real, se realizaron curvas de concentración para cada juego de cebadores, como se muestra en la figura 11.

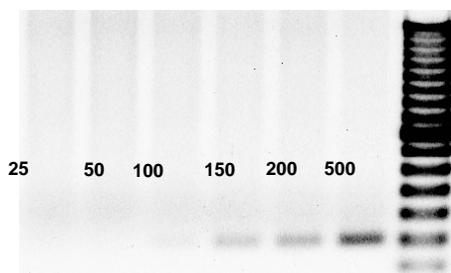


Figura 11. Curva de concentración de cebadores [nM].

Las temperaturas óptimas de alineamiento y las concentraciones adecuadas de cada cebador, así como las temperaturas de fusión para cada gen amplificado, se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Condiciones optimizadas para la PCR tiempo real.

Receptor	Temperatura de alineamiento	[Cebador]	Análisis de Melt
α_{1a}	61°C	200 nMolas	88°C
α_{1b}	62°C	100 nMolas	89°C
α_{1d}	60°C	150 nMolas	89°C
18s	60°C	50 nMolas	88°C

Una vez determinadas las condiciones de amplificación, se confirmó el tamaño y la especificidad de cada producto de amplificación en geles de agarosa, como lo muestra la figura 12.

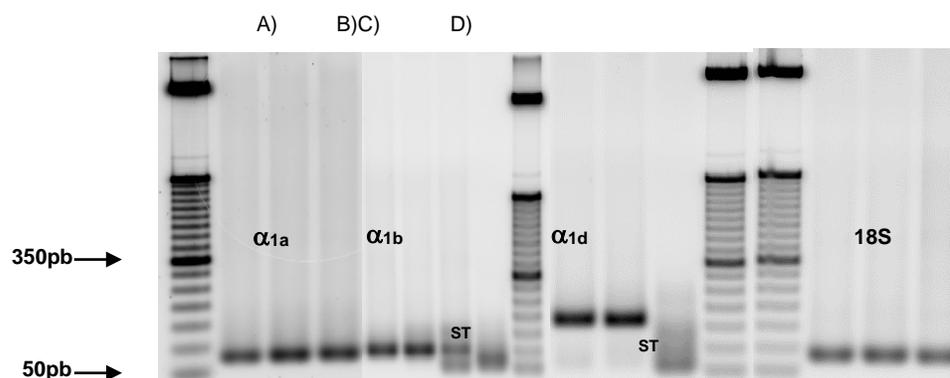


Figura 12. Electroforesis en geles de agarosa al 2% donde se muestran los productos de amplificación específicos para los genes A) α_{1a} (79pb), B) α_{1b} (92pb), C) α_{1d} (152pb) y D) gen de referencia 18S ribosomal (68 pb). ST=sin templado. A la izquierda de cada gel se muestra el marcador de pares de bases.

Uno de los principales controles en la reacción de PCR en tiempo real es la obtención del pico único en el análisis de “melt” o temperatura de fusión. Como se observa en la siguiente imagen representativa, todas las muestras tienen el mismo punto de fusión y solamente el control sin templado no amplifica (Fig.13).

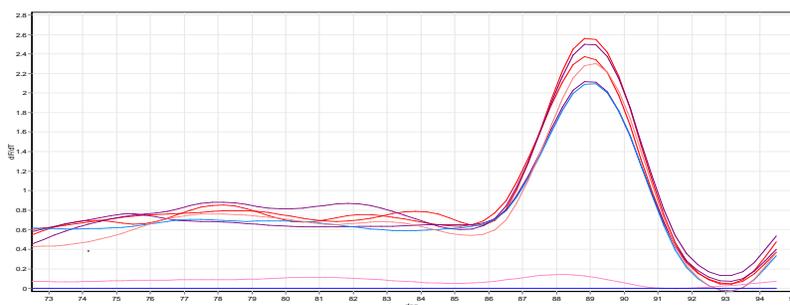


Figura 13. Registro de temperatura de fusión del producto de amplificación (Análisis de Melt).

Una vez estandarizadas todas las condiciones de amplificación para cada uno de los genes, se determinó la expresión basal de ARN mensajero para los 3 α_1 -ARs, en células de músculo liso de aorta obtenidas de ratones $\alpha_{1D}^{+/+}$ y $\alpha_{1D}^{-/-}$ cultivadas durante 7 días.

La abundancia de cada receptor se normalizó con la expresión del gen de referencia: 18S ribosomal. La especificidad de cada reacción de amplificación se determinó por análisis de “melt” (punto de fusión), y fueron 88°C 89°C y 89°C para los α_{1A} -AR, α_{1B} -AR y α_{1D} -AR, respectivamente. La electroforesis de cada producto de amplificación mostró una banda del tamaño del amplicón esperado, sin bandas inespecíficas o ambiguas, como se muestra en las imágenes de la figura 12.

En células $\alpha_{1D}^{+/+}$ se detectaron los 3 α_1 -ARs y se determinó su expresión, encontrándose las siguientes proporciones: α_{1A} -, 1.27 ± 0.30 ; α_{1B} -, 1.1 ± 0.21 ; y α_{1D} -, 1.49 ± 0.44 . En células $\alpha_{1D}^{-/-}$, se encontró un transcrito del α_{1D} -AR y el receptor predominante fue el α_{1A} -AR (1.83 ± 0.53), sobre los otros dos, α_{1B} -AR, 0.64 ± 0.12 , y α_{1D} -AR, 0.47 ± 0.11 (Fig. 14).

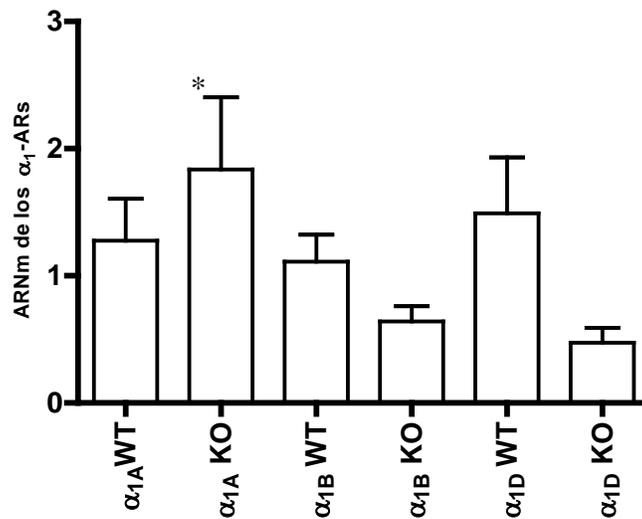


Figura 14. Abundancia relativa de ARNm para los 3 receptores α_{1A} , α_{1B} , y α_{1D} -adrenérgicos, en células de músculo liso de aorta de ratones $\alpha_{1D}^{+/+}$ (WT) y ratones $\alpha_{1D}^{-/-}$ (KO), datos normalizados con el gen de referencia 18S ribosomal. n= 11. *p<0.05.

En respuesta al péptido angiotensina II, la expresión del ARN mensajero para los α_1 -ARs en células de aorta de ratones $\alpha_{1D}^{+/+}$, fue la siguiente: para los α_{1A} -AR y α_{1D} -AR no hubo diferencias significativas; sin embargo, el α_{1B} -AR incrementó 1.97 ± 0.11 , $p < 0.05$ (Fig. 15).

Respecto a las células $\alpha_{1D}^{-/-}$ el mensajero del α_{1A} -AR, permaneció como el control (sin angiotensina II), mientras que el α_{1B} -AR disminuyó (0.55 ± 0.1 $p < 0.05$), la angiotensina II no produjo cambio en la expresión del transcrito α_{1D} -AR (Fig.16).

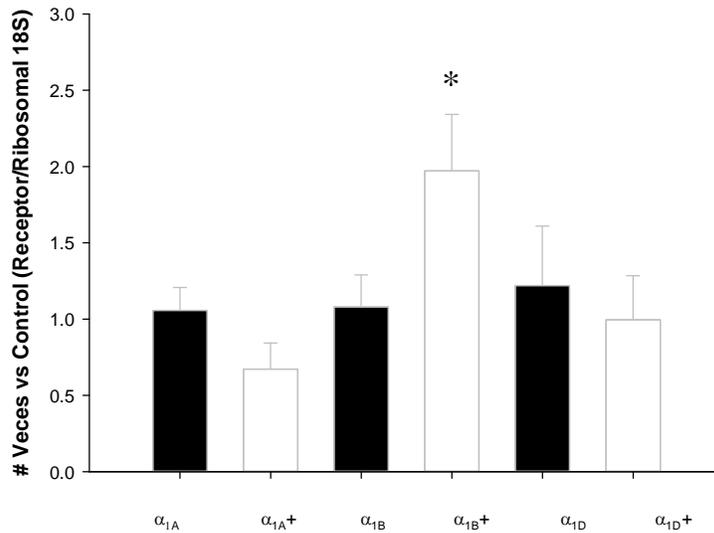


Figura 15. Efecto de angiotensina II [100nM] en la expresión de ARN mensajero para los α_1 -ARs en células de músculo liso de aorta de ratones $\alpha_{1D}^{+/+}$, normalizada con el gen de referencia 18S ribosomal y en relación con la expresión a tiempo 0 (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}). Los datos son la media \pm error estándar. n = 9-11

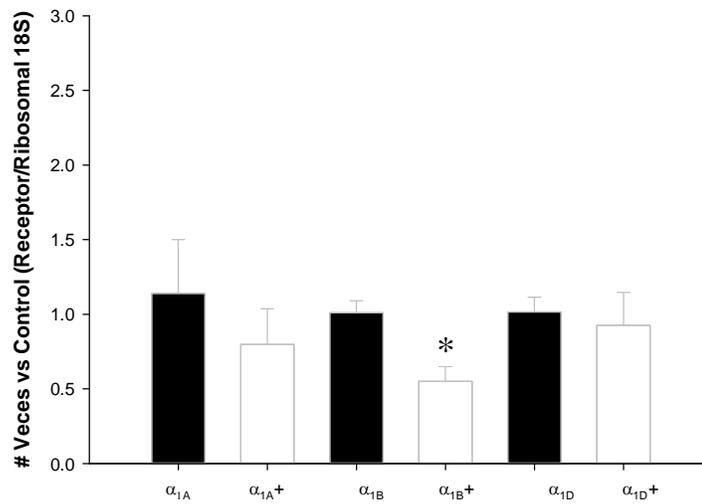


Fig.16. Efecto de angiotensina II [100nM] en la expresión de ARN mensajero para los α_1 -ARs en células de músculo liso de aorta de ratones $\alpha_{1D}^{-/-}$, normalizada con el gen de referencia 18S ribosomal, y en relación con la expresión a tiempo 0 (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}). Los datos representan la media \pm error estándar. n= 9-11.

Los ensayos de Western blot detectaron proteínas con peso molecular de 51-52 kDa, 75 kDa y 70-80 kDa, las cuales corresponden a los α_{1A} -AR, α_{1B} -AR, y α_{1D} -AR, respectivamente. En células de músculo liso de aorta de ratones $\alpha_{1D}^{+/+}$, la angiotensina II aumentó la expresión del α_{1A} -AR 86%, mientras que los α_{1B} -AR y α_{1D} -AR no cambiaron significativamente (Fig.17).

Respecto a las células $\alpha_{1D}^{-/-}$, angiotensina II incrementó la expresión de la proteína del α_{1A} -AR 107%; sin embargo, los α_{1B} -AR y α_{1D} -AR permanecieron sin cambio (Fig. 18).

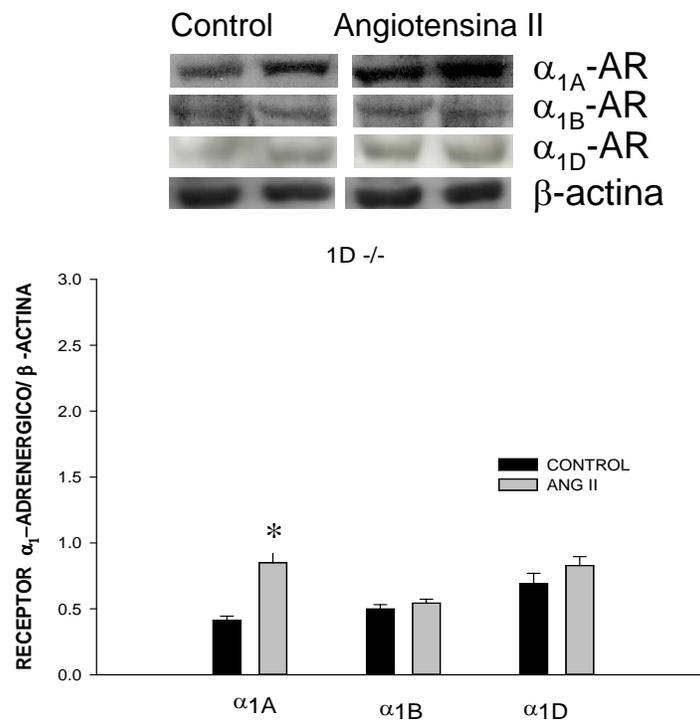


Fig. 17 Efecto de angiotensina II en la expresión de proteína de los α_1 -ARs (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}) en células de músculo liso de aorta de ratones $\alpha_{1D}^{+/+}$, normalizada con la proteína β -actina. n =5, *p<0.05.

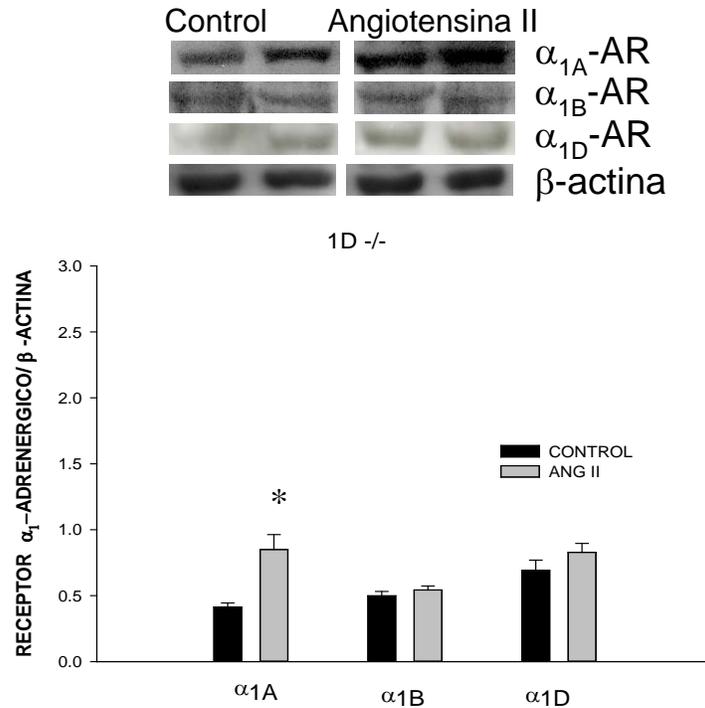


Fig.18. Efecto de angiotensina II en la expresión de proteína de los α_1 -ARs (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}) en células de músculo liso de aorta de ratones $\alpha_{1D}^{-/-}$, normalizada con la proteína β -actina. n=5, * $p < 0.05$.

La expresión como proteína de los α_1 -ARs, inducida con angiotensina II, se analizó adicionalmente en células de músculo liso de aorta $\alpha_{1D}^{+/+}$ con inmunocitoquímica y microscopía confocal: el citoesqueleto de actina se visualizó en todas las células por tinción con Faloidina rodaminada (rojo). La intensa inmunotinción del α_{1A} -AR en células tratadas revela que angiotensina II incrementó la expresión de este receptor (Fig. 19B). El receptor se detectó en citoplasma y región perinuclear. En las células control, la baja inmunofluorescencia del receptor se detectó en citoplasma (Fig.19A). La inmunocitoquímica para el α_{1B} -AR muestra una señal intensa en células control y en tratadas con angiotensina II (Fig.19C,y 19D, respectivamente) detectándose en todo el citoplasma y alrededor del núcleo. La expresión del α_{1D} -se localizó en citoplasma y zona perinuclear (Fig.19E); sin embargo, la angiotensina II indujo un patrón de expresión abundante alrededor del núcleo (Fig.19F).

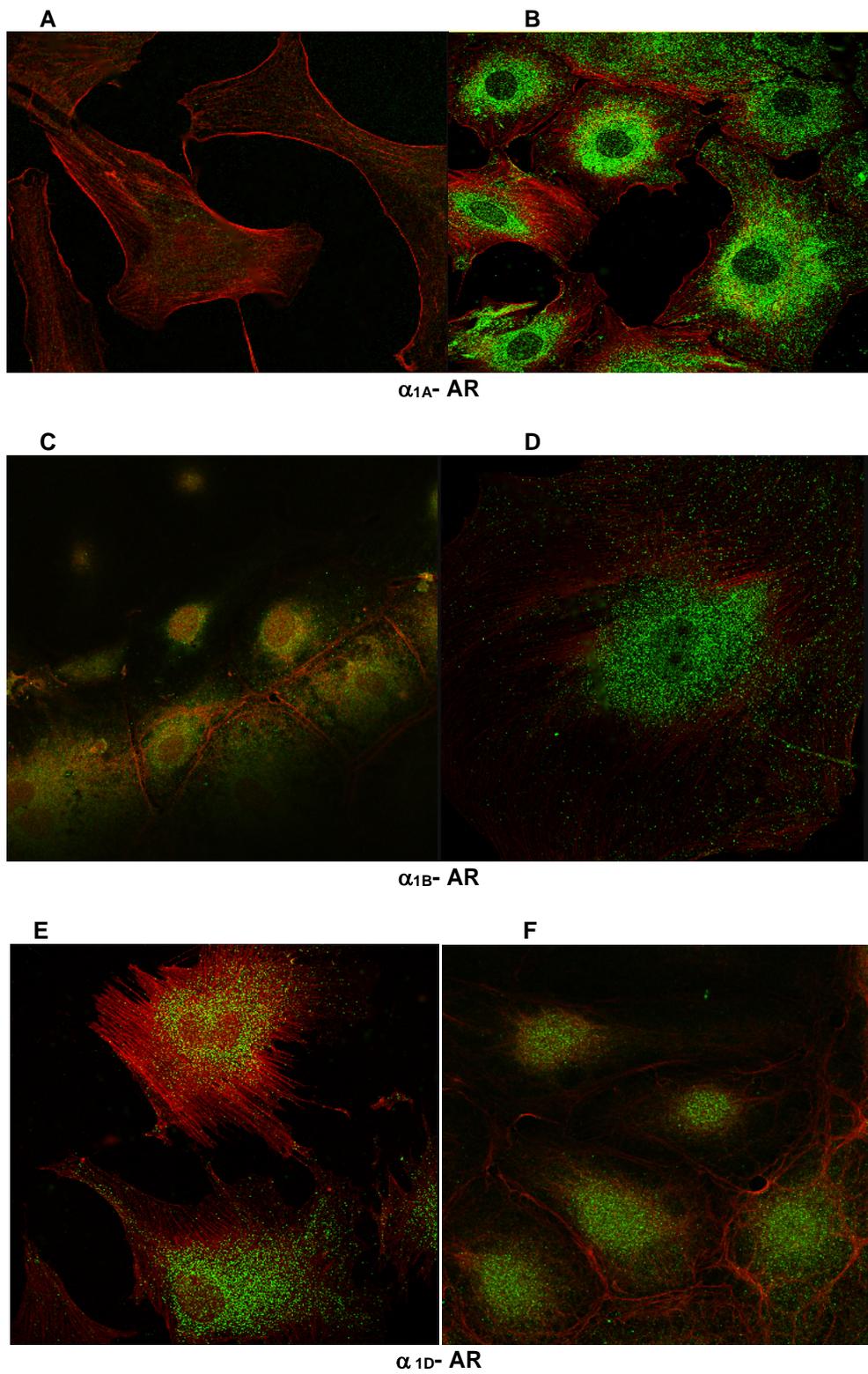


Figura 19. Inmunocitoquímica de los α_1 -ARs en células de músculo liso de aorta de ratones $\alpha_{1D}^{+/+}$: Control (A, C, E), Angiotensina II (B, D, F). Las imágenes se visualizaron con microscopio confocal.

7.6 Movilización de Ca^{2+} intracelular en CMLV

Tratando de averiguar si la baja respuesta obtenida para angiotensina II en los anillos de aorta y mesentérica se debían a defectos en la movilización de calcio intracelular, se procedió a monitorear los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidos por norepinefrina y angiotensina II, por espectrofotometría, usando CMLV de ratones $\alpha_{1D}^{+/+}$ y $\alpha_{1D}^{-/-}$ cargadas con FURA-2-AM.

El aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fue dependiente de la concentración de norepinefrina en ambos tipos de células, alcanzando mayor movilización las células $\alpha_{1D}^{+/+}$ comparadas con las $\alpha_{1D}^{-/-}$.

La movilización de Ca^{2+}_i inducida por angiotensina II, mostró una señal muy débil; sin embargo, la movilización $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por el ácido lisofosfatídico LPA (por sus siglas en inglés: Lysophosphatidic acid) en estas mismas células indicaron que la maquinaria contráctil estaba intacta.

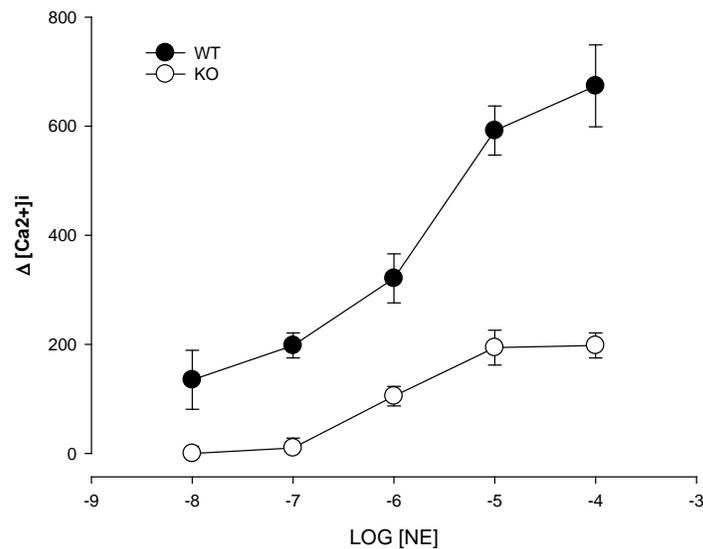


Figura 20. Delta de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en CMLV de aorta, tomadas de ratones $\alpha_{1D}^{+/+}$ y $\alpha_{1D}^{-/-}$. Curvas concentración-respuesta a norepinefrina. $n=3$.

Las señales de Ca^{2+} registradas por espectrofotómetro en un grupo de células no fueron suficientes para observar claramente la respuesta con angiotensina II, al ser muy débil la señal, decidimos usar un método más sensible, como la microscopía de fluorescencia, que permite analizar la movilización de

Ca²⁺_i en células individuales. Se cargaron las CMLV con FLUO-4-AM. Se graficaron los registros con datos de 15 a 20 células de cultivos independientes (fig. 20).

La figura 21 A muestra la respuesta producida por angiotensina II [1nM] y fenilefrina [1nM] en CMLV de ratones $\alpha_{1D}^{+/+}$, ambos agonistas incrementaron la fluorescencia basal de manera monofásica; sin embargo, en el curso temporal de la movilización de Ca²⁺_i, angiotensina II induce un incremento rápido y transitorio de Ca²⁺_i (21A) a diferencia de la movilización de Ca²⁺_i producida por fenilefrina, que es más lenta y sostenida (21B).

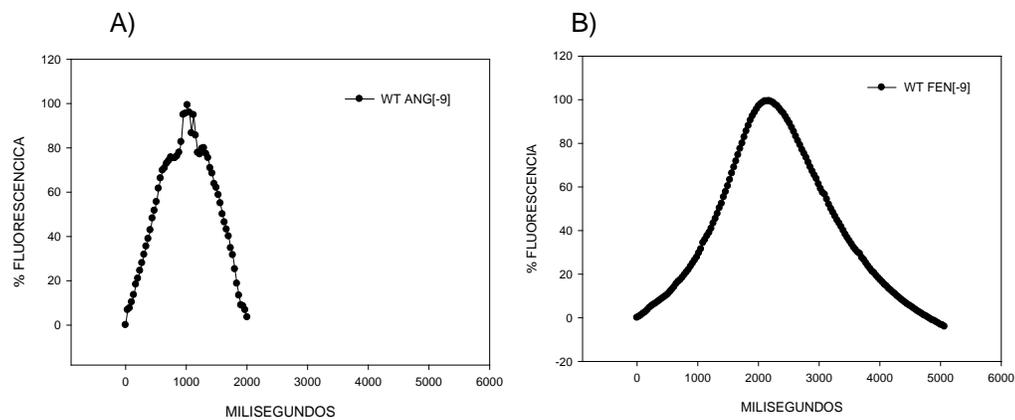


Figura 21. A) Registro de fluorescencia en CMLV $\alpha_{1D}^{+/+}$ cargadas con FLUO-4 y estimuladas con angiotensina II, B) movilización de Ca²⁺_i en CMLV $\alpha_{1D}^{+/+}$ estimuladas con fenilefrina.

8. DISCUSIÓN

8.1 Confirmación de genotipo $\alpha_{1D}^{-/-}$

Para asegurar la progenie y el uso de ratones con genotipos $\alpha_{1D}^{+/+}$ y $\alpha_{1D}^{-/-}$, homocigotos en cada uno de los protocolos experimentales, procedimos a confirmar el genotipo como se indica en materiales y métodos. Se cambiaron las condiciones de amplificación, que fueron estandarizadas por Tanoue y cols. (2005), ya que observamos productos de amplificados inespecíficos, con múltiples bandas, las cuales no permitían definir con certeza los genotipos, para ello fue necesario cambiar el par de cebadores que flanqueaban la interrupción del gen, contenida en el primer exón del gen del receptor α_{1D} -AR con el gen de resistencia a neomicina, y que por reacción de PCR se obtenía una banda teórica de 600 pb, por un nuevo par de cebadores que flanquean al gen de resistencia a neomicina que da un producto de amplificación de 492 pb, y que permite discriminar claramente entre los genotipos $\alpha_{1D}^{+/+}$ y $\alpha_{1D}^{-/-}$ homocigotos, así como heterocigotos. Esta estandarización ha sido un control indispensable, que nos permitió realizar con seguridad todos los experimentos presentados.

8.2 Reactividad de lechos vasculares por angiotensina II

En este trabajo analizamos el efecto de angiotensina II en la reactividad de las arterias aorta y mesentérica. Los datos muestran un efecto poco eficaz de angiotensina II para mediar la reactividad en ambas arterias. Un gran número de reportes generalizan el efecto vasoconstrictor de angiotensina II a nivel vascular (Metha y Griendling, 2006); sin embargo, observamos que es un efecto tejido-específico. Sabemos que la poca respuesta no se debe a la ausencia del AT_{1R} , ya que confirmamos su existencia en las aortas de ratones $\alpha_{1D}^{+/+}$ y $\alpha_{1D}^{-/-}$ con RTPCR y Western blot (imagen en anexo). Nuestros resultados apoyan los obtenidos por Russell & Watts (2000) en aorta de ratones $\alpha_{1D}^{+/+}$, donde la reactividad vascular a diferentes agentes contráctiles registran un efecto discreto

de angiotensina II que fue abatido por losartán [$1\mu\text{M}$], con lo que sugirieron que si hay receptores AT_1 funcionales y concuerda con el pequeño efecto contráctil que nosotros observamos en las arterias aorta y mesentérica. Por otro lado, estudios comparativos realizados por Zhou y cols.(2003), en diferentes arterias de ratón, muestran que angiotensina II [100 nM] produjo 4.9% del efecto contráctil, comparado con el producido por K^+ [60 mM] en aorta abdominal, mientras que en la arteria femoral alcanzó 3.4%, la arteria carótida contrajo 0.6% y la aorta torácica 0.3%, sus análisis de ARNm por RT-PCR mostraron que la aorta torácica tiene menos transcrito para el AT_1R que la aorta abdominal, por lo que se sugiere que los vasos sanguíneos se contraen de manera específica ante angiotensina II, dependiendo de la abundancia del AT_1R .

En nuestros experimentos la respuesta para angiotensina II no varió por posible presencia de endotelio o activación del AT_2R , con efecto vasodilatador. Otros estudios han reportado que con el uso del antagonista AT_2 PD123319 y/o L-NAME, inhibidor no selectivo de las óxido nítrico sintasas, la vasoconstricción por angiotensina II no aumentó y sugiere que la falta de respuesta al péptido no es por AT_2R que contrarresten tal efecto (Russell & Watts, 2000; Zhou y cols., 2003).

La movilización de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tras activación α_1 -adrenérgica y de los AT_1R , es otro parámetro de funcionalidad celular que permite observar la maquinaria contráctil en células de músculo liso de aorta de ratones $\alpha_{1D}^{+/+}$ y $\alpha_{1D}^{-/-}$; sin embargo, su efecto es muy breve comparado al efecto mostrado por activación α_1 -ARs, ya que lo pudimos observar durante solamente dos segundos con la ayuda de una técnica altamente sensible que es la microscopía de fluorescencia, y no fue posible observar claramente con espectroscopía, ni en aortas aisladas.

Por otro lado, con el objetivo de evaluar funcionalmente la interacción entre el SRA y el sistema nervioso simpático en riñón y lecho mesentérico de ratones $\alpha_{1D}^{+/+}$ y $\alpha_{1D}^{-/-}$, analizamos los cambios de presión de perfusión por estimulación α_1 -adrenérgica con fenilefrina y con angiotensina II. El agonista fenilefrina permitió observar el incremento en la presión de perfusión del lecho vascular mesentérico vía α_1 -adrenérgica, indicando que el SNS regula el tono vascular en los ratones $\alpha_{1D}^{+/+}$ y $\alpha_{1D}^{-/-}$ y que la falta del α_{1D} -AR hace notoria la potencia menor de este

agonista comparada con el $\alpha_{1D}^{+/+}$ (ver tabla 7); aun así, el α_{1D} -AR no es el único importante para incrementar la presión de perfusión mesentérica. Otros estudios muestran que la potencia del agonista A61603 (selectivo α_{1A} -AR) es ~235 veces mayor que la de fenilefrina en elevar la presión de perfusión del ratón Tac (SW)fBR y, con el bloqueo por el antagonista selectivo RS100329, determinaron que en ese lecho predomina y expresa funcionalmente el α_{1A} -AR (Martínez-Salas y cols., 2007).

Las terminales nerviosas simpáticas que contienen norepinefrina están en contacto directo con la membrana basal peritubular de todos los segmentos del túbulo renal, así como con las células del aparato yuxtaglomerular, dejando claro que cualquier alteración en la descarga nerviosa simpática renal con cambios en la liberación de neurotransmisores, puede influir directamente en la función del transporte tubular renal así como la secreción de renina (DiBona y cols., 2005). Los nervios simpáticos renales inervan tres principales neuro-efectores en el riñón: un aumento en la actividad nerviosa simpática renal lleva al incremento de la secreción de renina, por estimulación de los β_1 -AR en las células granulares yuxtaglomerulares, aumentando la reabsorción tubular renal de sodio (es decir, disminuyendo la excreción urinaria de sodio), vía α_{1B} -AR en las células epiteliales tubulares, y disminuyendo el flujo sanguíneo renal a través de la estimulación α_{1A} -adrenérgica en los vasos de resistencia renales (DiBona y cols., 2005).

En el presente trabajo estudiamos la hemodinámica renal ante angiotensina II y fenilefrina (agonista α_1 -AR) en riñones aislados de ratones $\alpha_{1D}^{+/+}$ y $\alpha_{1D}^{-/-}$. La fenilefrina incrementó la presión de perfusión, en función de la concentración, en riñones de ambas cepas de ratones, y en los $\alpha_{1D}^{-/-}$ la curva se desplazó hacia la derecha (++) veces comparada con $\alpha_{1D}^{+/+}$, sugiriendo que el α_{1D} -AR participa de manera importante en el control de la presión de perfusión en ratón; sin embargo, existe evidencia experimental que muestra que los α_{1A} -AR y α_{1D} -AR participan en la vasoconstricción de riñones perfundidos de rata (Blue y cols., 1995), y el predominante es el α_{1A} -AR (Awe & Adeagbo, 2007).

La angiotensina II incrementó con alta potencia la presión de perfusión de los riñones $\alpha_{1D}^{+/+}$ y $\alpha_{1D}^{-/-}$, observándose un ligero desplazamiento de la curva de

angiotensina II hacia la derecha en $\alpha_{1D}^{-/-}$, comparada con el control, haciendo evidente la contribución importante del α_{1D} -AR en las respuestas renovasculares de angiotensina II en ratón, dándonos información específica sobre el subtipo con el que interacciona.

Con estos datos, sugerimos que la vasoconstricción por angiotensina II, en riñones de ratón, es potenciada por activación de los α_{1D} -AR, encontrándose una comunicación cruzada entre los receptores α_1 -AR y los receptores AT₁, como lo demostraron experimentos realizados en arteriolas aferentes incubadas con norepinefrina al observar un aumento en la reactividad de vasos por parte de la angiotensina II (10 pM) la cual, fue inhibida con el antagonista selectivo α_1 -adrenérgico, prazosina (Lai y cols., 2009). Otros estudios describen que en riñones de ratas diabéticas hay mayor sensibilidad por angiotensina II, y al inhibir a la ECA y antagonizar a los AT₁R con enalapril y losartán, respectivamente, aumentó la DE₅₀ para noradrenalina, ya que prazosina disminuyó la sensibilidad y el efecto máximo inducido por la angiotensina II (García y cols., 2003).

8.3 Obtención de cultivos primarios de células musculares de aorta de ratón.

Tras la estandarización de la técnica para el aislamiento, purificación y cultivo de las células musculares de aorta de ratón, observamos varios fenómenos: al ser cultivadas hasta por un mes, observamos que retienen las propiedades de células nativas, incluyendo respuestas funcionales que permiten analizar diferencias en la movilización de $[Ca^{2+}]_i$ entre los genotipos $\alpha_{1D}^{+/+}$ y $\alpha_{1D}^{-/-}$ tras activación α_1 -adrenérgica. Esta característica nos permite considerar a las células como un modelo útil para estudiar las vías de señalización del $[Ca^{2+}]_i$ a nivel celular y subcelular, mediante la captura de imágenes digitales *in vivo* y con el uso de indicadores fluorescentes sensibles a Ca^{2+}_i . Las células en baja confluencia muestran un retículo sarcoplásmico bien desarrollado, que pueden usarse para estudiar funcional y espacialmente los diferentes almacenes de Ca^{2+}_i y canales.

Técnicas de biología molecular como: transfección, interrupción o delección, así como electrofisiológicas: “patch-clamp” pueden ser aplicadas. Además, las células se pueden usar para realizar pruebas de futuros agentes terapéuticos en receptores, canales iónicos y transportadores. La metodología que utilizamos para la obtención del cultivo primario es útil para aislar células de diferentes lechos vasculares. Nosotros verificamos que nuestro cultivo celular estuviera libre de fibroblastos y células endoteliales mediante tinción positiva contra α -actina.

Observamos diversos fenotipos de CML coexistiendo en aorta de ratón, los cuales muestran morfología claramente distinguible. Las células de músculo liso de aorta, se observaron usualmente elongadas o fusiformes, una vez disociadas enzimáticamente y tras uno o dos días de cultivo se anclaron a la base de la caja Petri y se tornaron aplanadas, y comenzaron a dispersarse y proliferar. Tras confluencia, observamos dos fenotipos: 99% de las células son fusiformes, y la minoría (1%) tienen forma menos alargada que ha sido referida como epiteliode o romboide (Rensen y cols.,2007). Con estas observaciones podemos decir que la arteria aorta de ratón expresa principalmente células musculares del tipo contráctil, ya que de acuerdo a su morfología, las células se han clasificado en contráctiles (fusiformes) o sintetizadoras (romboides) (Hao, 2003; Chamley-Campbell, 1979). Las células sintetizadoras contienen gran número de organelos involucrados en la síntesis de proteínas, mientras que estos son remplazados por filamentos contráctiles en las células fusiformes. Sin embargo, estos dos tipos de células tienen diferentes características proliferativas y migratorias, generalmente las sintetizadoras muestran mayor velocidad de crecimiento y actividad migratoria que las contráctiles (Hao, 2003).

Resulta importante conocer los subtipos de células musculares presentes en los diferentes lechos vasculares, ya que se ha estudiado mediante el uso de líneas celulares estables: Sp-SMC y Ep-SMC, que la diversidad de efectos biológicos mostrados por angiotensina II se origina por variación fenotípica en las células musculares. La movilización de $[Ca^{2+}]_i$ mediada por activación AT_1 , proviene de almacenes intracelulares en ambos fenotipos celulares; sin embargo la entrada de calcio sensible a nifedipina es exclusiva de las epiteliodes, y que

la apoptosis inducida por angiotensina II resultó ser específica para células epiteloides, ya que redujo dramáticamente el número de estas, pero no el de las fusiformes (Bascands y cols., 2001).

8.4 Expresión basal de los α_1 -AR en CMLV

Estudios en células musculares de aorta de rata, muestran la expresión de los 3 α_1 -ARs (Zhuo Wei y cols., 1995, Faber y cols., 2001, Gericke y cols., 2007). En este trabajo usamos cultivo primario de células de músculo liso vascular de aorta (CMLV) de ratón $\alpha_{1D}^{+/+}$ y $\alpha_{1D}^{-/-}$, observando que en nuestros cultivos, se expresan los 3 α_1 -ARs (α_{1A} -, α_{1B} - y α_{1D} -).

En las CMLV de ratón WT, observamos que la expresión basal de cada receptor tiene la misma proporción entre ellos. Por otro lado, estudios de unión a radioligandos y RT-PCR en CMLV de rata han descrito que la expresión basal de los transcritos de los α_1 -AR muestran el siguiente orden en abundancia: α_{1B} - > α_{1D} - > α_{1A} -, y la expresión del α_{1A} -AR disminuye considerablemente en cultivo (Faber y cols., 2001). Nuestros datos contrastan en la expresión basal asociada a la diferencia entre especies; así como a las condiciones de cultivo, ya que las células de nuestros estudios fueron cultivadas durante 7 días sin hacer ningún pase, con el objeto de preservar lo mejor posible las características fenotípicas y genotípicas de las células, a diferencia del estudio citado donde usaron células hasta de 5 pases.

En las células $\alpha_{1D}^{-/-}$, el transcrito del α_{1A} -AR fue más abundante, dato interesante ya que esta abundancia podría relacionarse con lo reportado en estudios funcionales, donde la reactividad de la aorta de ratones $\alpha_{1D}^{-/-}$ es mediada por el α_{1A} -AR (Lázaro-Suárez y cols., 2005). Se sabe que la estimulación del α_{1A} -AR en el intestino, vasos de la piel, arteria femoral, y lecho mesentérico vascular de ratón provoca reactividad (Rokosh y cols., 2002; Martínez-Salas y cols., 2007), y es un importante mediador del efecto presor de fenilefrina en ratas Wistar y ratón anestesiados y desmedulados (Ibarra y cols., 1997; Qi y cols., 2002; Zacharia y cols., 2005; López-Guerrero y cols., 2005). Cabe señalar que al α_{1A} -AR se le ha

asociado con un incremento en la actividad trófica de catecolaminas, después de daño inducido por balón en la arteria carótida de rata, sugiriendo que este podría participar significativamente en el desarrollo de hipertrofia vascular (Teeters y cols., 2002).

8.5 Efecto de angiotensina II en la expresión de los α_1 -AR en CMLV de ratones $\alpha_{1D}^{+/+}$ y $\alpha_{1D}^{-/-}$

Varios estudios apoyan la idea de que el aumento en la expresión de los α_1 -ARs puede estar involucrado en la hipertensión, específicamente cuando la angiotensina II es elevada.

Los estudios en el ratón $AhR^{-/-}$ para el receptor de Aril hidrocarbonos, muestran hallazgos inexplicables hasta el momento, ya que estos ratones tienen niveles elevados de angiotensina II circulante, son hipertensos y presentan hipertrofia cardíaca (Lund y cols., 2003), y analizando la expresión del α_{1D} -AR en aorta, se encontró que el ADNc y la proteína α_{1D} -AR están aumentados (77-80%), comparados con los ratones WT (Villalobos-Molina y cols., 2008). Por otro lado, en estudios en cardiomiocitos de ratas neonatas la angiotensina II disminuye la expresión α_{1A} -AR, y no cambia la expresión de los α_{1B} -AR y α_{1D} -AR (Hong-Tai y cols., 1997).

Nuestro estudio muestra que angiotensina II incrementó el transcrito α_{1B} -AR en las células $\alpha_{1D}^{+/+}$, lo cual podría estar influenciado por la presencia del α_{1D} -AR ya que en contraste, al estar ausente funcionalmente en el ratón $\alpha_{1D}^{-/-}$, disminuye la expresión α_{1B} -AR. Resulta interesante este hallazgo, ya que sugiere la interacción entre estos dos α_1 -ARs al influir o regular su mutua expresión; así como la interacción adicional con los receptores de angiotensina II. Así, las evidencias reportadas de interacción entre los α_{1B} -AR y α_{1D} -AR, sugiere consecuencias funcionales muy importantes. Se ha reportado que una gran fracción de los α_{1D} -AR se localizan intracelularmente, y una pequeña cantidad se localizan en la membrana celular (Daly y cols., 1998; McCune y cols., 2000): esta localización en la membrana celular se favorece tras la formación de un

heterodímero con el α_{1B} -AR, sugiriendo que este podría asistir al α_{1D} -AR en su transporte hacia la membrana celular. Adicionalmente, cuando estudiaron los heterodímeros α_{1B} -AR/ α_{1A} -AR y α_{1B} -AR/ α_{1D} -AR, la densidad en los sitios de unión a radioligandos aumentó significativamente, así como la proteína de los α_{1A} -AR y α_{1D} -AR, sugiriendo que la heterodimerización es una condición funcional para la mejor interacción entre ligandos y α_1 -ARs (Uberti y cols., 2003; Uberti y cols., 2004). Recientemente se ha reportado la formación de un heterodímero entre los α_{1D} -AR y AT₁R en ratas preclámpicas (González-Hernández y cols., 2010). Por otro lado, aunque el ARN mensajero para el α_{1B} -AR en células $\alpha_{1D}^{+/+}$ con angiotensina II está aumentado, no se observan cambios en la proteína, esta relación no lineal podría deberse a que el tiempo de la exposición a angiotensina II no fue suficiente para observar cambios en la expresión de la proteína, o que la regulación en la traducción de este receptor es finamente regulada.

El mecanismo por el cual la expresión de α_{1B} -AR por angiotensina II es distinta en células musculares de ratón $\alpha_{1D}^{+/+}$ y $\alpha_{1D}^{-/-}$, como lo muestran nuestros resultados, es un fenómeno difícil de explicar. Se sabe que la transcripción del gen α_{1b} -AR es controlada por tres promotores, así como elementos regulatorios en *cis* (factores de transcripción), los cuales incluyen: factor nuclear 1 (NF-1), CP1, HIF-1, AP2, y CRE en células hepáticas de rata (Gao y Kunos., 1994). Estudios en hígados regenerados de rata indican que el control transcripcional del gen α_{1b} -AR depende de la concentración de NF-1, ya que una baja concentración de NF-1 regula a la baja la expresión del gen α_{1b} -AR (Gao y Kunos., 1996). Sin embargo, se ha reportado que NF-1 es un activador transcripcional para algunos genes y un silenciador para otros, de manera tejido específica (Gao y Kunos., 1998). Los tres promotores para este gen son muy distintos y regulados de maneras específicas, lo cual sugiere que la regulación de este gen es dirigida por una combinación de mecanismos que actúan en *trans* (factores que se unen a dominios regulatorios de ADN) y modulan la transcripción del gen α_{1b} -AR en condiciones fisiológicas y patológicas.

El análisis del promotor para el gen α_{1b} -AR en ratón reveló que el alineamiento con el promotor P2 de rata tiene 90% de identidad y la presencia de varios sitios de unión a diversos factores, como: NF-1, HF-1 (Hipoxic Factor) y CRE (c-AMP- response element) también son conservados, mostrando que la inducción por hipoxia y el AMPc son reguladores universales en la función del promotor α_{1b} -AR en rata y ratón; sin embargo, se encontraron varios elementos específicos para ratón, incluyendo dos sitios para el factor hepático C/EBP, y un sitio NF-E1 (Zuscik y cols., 1999), lo cual podría explicar las diferencias de expresión entre especies.

Por otro lado, estudios en cardiomiocitos en cultivo muestran que existen diferencias en la regulación de la expresión de α_1 -ARs nativos, ya que la exposición prolongada a norepinefrina (12-72 hs) reprimió el ARN mensajero para los α_{1B} -AR y α_{1D} -AR; mientras que el α_{1A} -AR aumentó y los agonistas inductores de hipertrofia (endotelina-1, PGF2 α y forbol-12-miristato13-acetato) también incrementaron la expresión del α_{1A} -AR y reprimieron al α_{1B} -AR (Rokosh, 1996).

Nuestros resultados aportan evidencia adicional donde angiotensina II induce la expresión diferencial de los α_1 -AR en CMLV, al incrementar la expresión del α_{1A} -AR.

El análisis del promotor α_{1A} -AR en cardiomiocitos de ratón muestra que su actividad es regulada por el elemento transcripcional MCAT; sin embargo, este gen no se transcribe en cardiomiocitos de rata neonata, ni se activa por agonistas α_1 -AR ni otros estímulos hipertróficos (O'Connell y cols., 2001). Hasta la fecha no existen estudios que muestren el papel hipertrófico que juegan los α_{1A} -AR en células de músculo liso vascular de ratón, todos los estudios han sido dirigidos en cardiomiocitos de rata y de ratón.

Resultaría interesante averiguar si el incremento en la expresión del α_{1A} -AR en CMLV de ratón, por acción de angiotensina II, activa cascadas de señalización a factores de crecimiento que posiblemente activen otras vías de señalización, ya que se ha reportado en células PC12 transfectadas de manera estable con el α_{1A} -AR, que la estimulación con norepinefrina causó un incremento

en la fosforilación en tirosina de Stat 1 (Zhong y cols., 1999). Una vez fosforiladas, las Stats dimerizan y se translocan al núcleo, donde se unen a secuencias consenso de ADN específicas y alteran la transcripción (Zhong y cols., 1999).

Se conocen muy pocos receptores acoplados a proteínas G que activen Stats, entre ellos está AT₁R para angiotensina II, aunque el mecanismo se desconoce (Ali y cols., 1997).

8.6 Inmunocitoquímica de los receptores α_1 -adrenérgicos en CMLV de ratón

$\alpha_{1D}^{+/+}$:

La microscopía confocal nos permitió visualizar la expresión y localización de los α_1 -ARs, donde el α_{1A} -AR se localizó en el citoplasma en células control, aunque en pequeña cantidad y no hubo inmunoreactividad en la membrana celular, el cual es un patrón de localización inesperado. Esto podría indicar que las células en cultivo, donde carecen de estimulación de algún agonista, mantienen baja expresión del receptor y distinta localización, ya que la angiotensina II redistribuyó con intensidad la señal de inmunofluorescencia. En estudios sobre células HEK 293 (células embrionarias de riñón humano) transfectadas con el α_{1A} -AR, lo detectaron en la membrana celular e intracelularmente, y la exposición a fenilefrina lo internalizó (Chalothorn y cols., 2002); sin embargo, en CMLV de aorta de rata, el α_{1A} -AR se localiza en el citoplasma e incrementó la inmunotinción con el número de pases, detectándose alrededor del núcleo. En nuestras condiciones, el receptor se observó en el citoplasma y la angiotensina II promueve su localización perinuclear.

La intensa inmunoreactividad para el α_{1B} -AR en el citoplasma de células control, así como en células con angiotensina II, indican que este receptor es muy abundante, apoyando lo reportado en células musculares de las arterias femoral y renal de rata. Mientras que el α_{1D} -AR se localizó en la zona perinuclear, en células control, y con angiotensina II, y está de acuerdo con lo reportado en células HEK 293 y en CMLV de rata (Hrometz y cols., 1999).

8.7 Movilización de Ca²⁺ intracelular en CMLV

Las distintas técnicas para estudiar un evento nos permiten visualizarlo desde diferentes ángulos, en este caso, la microscopía de fluorescencia nos ha permitido caracterizar, aunque de manera breve, la movilización de calcio intracelular de las células musculares de aorta de ratón estimuladas con angiotensina II, fenómeno que en aorta aislada ha sido difícil de evaluar al tratar de observarlo en relación con la contracción. El poder observar la movilización de calcio intracelular en células de músculo liso de aorta de ratón responde a dos cuestiones básicas muy importantes: 1) el transcrito de los AT₁R que encontramos es traducido a proteína en este tejido y 2) Los AT₁R aunque son pocos, son funcionales.

9. CONCLUSIONES

Los receptores AT_1 se expresan en células musculares de aorta de ratón.

El efecto contráctil de angiotensina II es tejido-específico, ya que en aorta (arteria de conducción) y en mesentérica (arteria de resistencia), el péptido no produjo reactividad, mientras que en riñón si se observó cambio en la presión de perfusión.

La movilización de calcio intracelular producida por angiotensina II en células musculares de aorta de ratón es funcional.

Los resultados indican que angiotensina II aumentó la expresión del transcrito α_{1B} -AR, en presencia del α_{1D} -AR; sin embargo, en ausencia del α_{1D} -AR, el mensajero α_{1B} -AR disminuyó en células de músculo liso de aorta.

La traducción a proteína del α_{1A} -AR aumentó por angiotensina II, independientemente de la presencia o ausencia del α_{1D} -AR. El mecanismo por el cual ocurren estos eventos necesita estudios adicionales para ser aclarado.

10. PERSPECTIVAS

Evaluar la aportación de cada α_1 -AR en la vasoconstricción inducida por angiotensina II en riñón de ratones $\alpha_{1D}^{-/-}$.

Estudiar los mecanismos de regulación para la expresión de α_{1A} -AR por angiotensina II.

Resultaría interesante averiguar si el incremento en la expresión del receptor α_{1A} -AR en CMLV de ratón, por acción de angiotensina II, activa cascadas de señalización a factores de crecimiento, que posiblemente activen otras vías de señalización.

Analizar en arterias el posible papel hipertrófico del receptor α_{1A} -AR y su relación con angiotensina II.

11. BIBLIOGRAFÍA

Ali MS, Sayeski PP, Dirksen LB, Hayzer DJ, Marrero MB and Bernstein KE. Dependence of the motif YIPP for the physical association of jak2 kinase with the intracellular carboxyl tail of the angiotensin II AT1 receptor. *J. Biol. Chem.* 1997: 272; 23382-23388.

Appert-Collin A, Cotecchia S, Nenniger-Tosato M, Pedrazzini T, Diviani D. The A-kinase anchoring protein (AKAP)-Lbc-signaling complex mediates alpha1 adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy. 2007: 104(24); 10140-5.

Armenia A., Munavvar. A.S., Abdullah. N.A., Helmi. A. & Johns E.J. The contribution of adrenoceptor subtypes in the renal vasculature of diabetic spontaneously hypertensive rats. *British Journal of Pharmacology.* 2004: 142; 719-726.

Awe S.O. & Adeagbo A.S.O. Vascular α 1-adrenoceptors in isolated perfused rat kidney: influence of ageing. *Autonomic & Autacoid Pharmacol.* 2007:27; 19-26.

Barquera Simón, Campos-Nonatos Ismael, Hernández –Barrera Lucía, Villalpando Salvador, Rodríguez-Gilabert César, Durazo-Arvisú Ramón, Aguilar-Salinas Carlos A. Hypertension in Mexican adults: results from the National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud Pública de México.* 52, (S1) 2010: S63-S71.

Bascands Jean-Loup, Girolami Jean-Pierre, Trolly Muriel, Escargueil-Blanc Isabelle, Nazzal Dani, Salvayre Robert, Blaes Nelly. Angiotensin II induces phenotype-dependent apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 2001:38; 1294-1299.

Berk BC & Corson M A. Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle. Role of tyrosine kinases. *Circulation Research.* 1997: 80; 607-616.

Blue D.R., Bonhaus D.W., Ford A.P.D.W., Pfister J.R., Sharif N.A., Shieh I.A., Vimont R.L., Williams T.J. & Clarke D.E. Functional evidence equating the pharmacologically-defined α_{1A} - and cloned α_{1C} -adrenoceptor: studies in isolated perfused kidney of rat. *Br. J. Pharmacol.* 1995:115; 283-294.

Bonventre JV . Phospholipase A2 and signal transduction. *Journal of the American Society of Nephrology.* 1992: 3; 128-150.

Boron & Boulpaep. *Medical Physiology.* Updated edition 2005. Capítulo 22. Elsevier Saunders.

Bucley. N.M., Brazeau. P., Gootman.P.M. & Frasier. L.D. Renal circulatory effects of adrenergic stimuli in anesthetized piglets and mature swine. *Am. J. Physiol.* 1979: 237; H690-H695.

Burson JM, Aguilera G, Gross KW and Sigmund CD. Differential expression of angiotensin receptor 1A and 1B in mouse. *Am J Physiol.* 1994: 276;E260 – 267

Burt RP, Chapple CR, Marshall I. Alpha1A-adrenoceptor mediated contraction of rat prostatic vas deferens and the involvement of ryanodine stores and Ca²⁺ influx stimulated by diacylglycerol and PKC. *Br J Pharmacol.*1998:123(2);317-25.

Milano C A, Paul C, Dolber, Howard A Rockman, Richard A Bond, Mark E Venable, Lee F. Allen, and Robert J. Lefkowitz. Myocardial expression of a constitutively active α_{1B} -adrenergic receptor in transgenic mice induces cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994: 9; 10109-10113.

Cavalli A, Lattion AL, Hummler E, Nenniger M, Pedrazzini T, Aubert JF, Michel MC, Yang M, Lembo G, Vecchione C, Mostardini M, Schmidt A, Beermann F, Cotecchia S. Decreased blood pressure response in mice deficient of the alpha1b-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.*1997:94(21);11589-94.

Chaki S and Inagami T. Identification and characterization of a new binding site for angiotensin II in mouse neuroblastoma neuro 2A-cells.. *Biochem B. Res Commun.* 1992: 182; 388-394.

Chamley-Campbell J, Campbell GR, Ross R. The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev* 1979:59;1-61.

Chen Z, Hague C, Hall RA, Minneman KP. Syntrophins regulate alpha 1D-adrenergic receptors through a PDZ domain-mediated interaction. *J Biol Chem.*2006: 281(18); 12414-20. Epub 2006 Mar 13.

Civantos Calzada B, De Artiñano A. Alpha adrenoceptors subtypes.. *Pharmacological research.* 2001: 44;195-208.

Cooper AC, Robinson G, Vinson GP, Cheung WT and Broughton Pipkin F. Expression of the Renin-Angiotensin System in a Human Placental Cell Line
20;467–474.

Cotecchia S, Scheer A, Diviani D, Fanelli F, De Benedetti PG. Molecular mechanisms involved in the activation and regulation of the alpha 1-adrenergic receptor subtypes. *Farmacol.*1998: 53(4);273-7.

Cotecchia S. The α_1 -adrenergic receptors: diversity of signaling networks and regulation. *J Recept Signal Transduct Res.* 2010: 30(6)

Cox S L, Story D F, & Ziogas J. Angiotensin II receptor involved in the enhancement of noradrenergic transmission in the caudal artery of the spontaneously hypertensive rat. *Br. J Pharmacol.* 1996: 119; 965-975.

Cox S L, Trendelenburg A U & Starke K. Prejunctional angiotensin receptors involved in the facilitation of noradrenaline release in mouse tissues. *Br. J Pharmacol.* 1999:127; 1256-1262.

Daly CJ, Milligan CM, Milligan G, Mackenzie JF, Mcgrath JC. Cellular localization and pharmacological characterization of functioning alpha-1 adrenoceptors by fluorescent ligand binding and image analysis reveals identical binding properties of clustered and diffuse populations of receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998: 286(2); 984-90.

Daniel E. E., R. Dale Brown, Y. F. Wang, A. M. Low, H. Lu-Chao, and C.-Y. Kwan. A -Adrenoceptors in canine mesenteric artery are predominantly 1A subtype: Pharmacological and Immunochemical Evidence. *J PET.* 1999: 291; 671-679.

De Gasparo M, Catt K.J, Inagmi T, Wright W, Unger Th. International Union of Pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev.* 2000: 52; 415-472.

Dhalla NS, Xu Y-J, Sheu S-S, Tappia PS & Panagia V. Phosphatidic acid: a potential signal transducer for cardiac hypertrophy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 1997: 29; 2865-2871.

Diviani D, Lattion AL, Abuin L, Staub O, Cotecchia S. The adaptor complex 2 directly interacts with the alpha1b-adrenergic receptor and plays a role in receptor endocytosis. *J Biol Chem.* 2003: 278(21); 19331-40.

Docherty JR. Subtypes of functional alpha1- and alpha2-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol.* 1998:13; 361(1):1-15.

Drew. G.M. & Whiting. Evidence for two distinct types of postsynaptic alpha-adrenoceptor in vascular smooth muscle in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 1979: 67; 207-215.

Endoh M. Cardiac alpha 1 adrenoceptors that regulate contractile function: subtypes and subcellular signal transduction mechanisms. *Neurochem Research.* 1996: 21(2); 217-219.

Engeli S, Gorzelniak K, Kreutz R, Runkel N, Distler A and Sharma A. M Co-expression of renin-angiotensin system genes in human adipose tissue. *J Hypertens* 1999: 17; 555-560.

Errasti AE, Velo MP, Torres RM, Sardi SP, Rothlin RP. Characterization of alpha1-adrenoceptor subtypes mediating vasoconstriction in human umbilical vein. *Br. J. Pharmacol.* 1999;126(2); 437-4

Faber JE, Yang N, Xin X. Expression of alpha-adrenoceptor subtypes by smooth muscle cells and adventitial fibroblasts in rat aorta and in cell culture. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 298(2); 441-52.

Felder.R.a., Pelayo. J.C., Calcagno.P.L., Eisner. G. M.& Jose P.A. alpha adrenocpetors in the developing kidney. *Pediatr. Res.* 1983; 17:177-180.

Galbusera, M., Garattini. S., Remizzi G. & Mennini T. Catecholamine receptor binding in rat kidney: effect of aging. *Kidney Int.* 1988; 33; 1073-1077.

García-Sáinz, J.A. y M.E. Torres-Padilla. Modulation of basal intracellular calcium by inverse agonists and phorbol myristate acetate in rat-1 fibroblasts stably expressing alpha-1 adrenoceptors. *FEBS Lett.* 1999; 443; 277-281.

García VMC, Monasterolo LA, Elías MM. Renal vascular responsiveness to angiotensin II at an early stage of diabetes: interaction between intrarenal noradrenergic and renin-angiotensin systems. *Acta Diabetol.* 2003; 40 (3); 130-136.

Gisbert R, Noguera MA, Ivorra MD, D'Ocon P. Functional evidence of a constitutively active population of alpha (1D)-adrenoceptors in rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 295(2); 810-7.

Gisbert R, Ziani K, Miquel R, Noguera MA, Ivorra MD, Anselmi E, D'Ocon P. Pathological role of a constitutively active population of alpha(1D)-adrenoceptors in arteries of spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 2002; 135(1); 206-16.

Gao Bin and Kunos George. Transcription of the rat alpha 1B adrenergic receptor gene in liver is controlled by three promoters. *JBC.* 1994; 269; 15762-15767.

Gao Bin, Jiang Liu and Kunos George. Transcriptional regulation of alpha 1b adrenergic receptors (α 1-AR) by Nuclear Factor 1(NF1): a decline in the concentration of NF1 correlates with the downregulation of α 1-AR gene expression in regenerating liver. *Mol. Cell.Biol.* 1996;16; 5997- 6008.

Gao Bin and Kunos George. Cell-type specific transcriptional activation and suppression of the α 1b adrenergic receptor gene middle promoter by nuclear factor1. *JBC.* 1998; 273; 31784-31787.

Godínez-Hernández D, Gallardo-Ortíz IA, López-Sánchez P, Villalobos-Molina R. Captopril therapy decreases both expression and function of alpha-

adrenoceptors in pre- hypertensive rat aorta. *Auton Autacoid Pharmacol.* 2006; 26(1); 21-9.

Goldfarb DA, Diz DI, Tubbs RR, Ferrario CM and Novock AC (1994) Angiotensin-II receptor subtypes in the human renal cortex and renal cell carcinoma. *J Urol* 151:208–213.

González-Cabrera PJ, Shi T, Yin J, McCune DF, Rorabaugh BR, Perez DM. Differential Regulation of the cell cycle by alpha 1-adrenergic receptor subtypes. *Endocrinology.* 2004; 145; 5157-5167.

Hao H, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML. Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23; 1510-20.

Hague C, Bernstein LS, Ramineni S, Chen Z, Minneman KP, Hepler JR. Selective inhibition of alpha1A-adrenergic receptor signaling by RGS2 association with the receptor third intracellular loop. *J Biol Chem.* 2005; 29:27289-95.

Hague C, Lee SE, Chen Z, Prinster SC, Hall RA, Minneman KP. Heterodimers of alpha1B- and alpha1D-adrenergic receptors form a single functional entity. *Mol Pharmacol.* 2006; 69(1); 45-55.

Hague C., Chen Z., Uberti M., Minneman K. P. α_1 -Adrenergic receptors subtypes: non- identical triplets with different dancing partners? *Life Science* 2003; 74; 411-418

Harrison's. Principles of internal medicine. Dennis L. Kasper, Eugene Braunwald, Anthony S. Fauci, Stephen L. Hauser, Dan L. Longo, J. Larry Jameson, y Kurt J. Isselbacher. 2008. 16th edition,

Hieble JP, Bylund DB, Clarke DE, Eikenburg DC, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Ruffolo RR Jr. International Union of Pharmacology. X. Recommendation for nomenclature of alpha 1-adrenoceptors: consensus update. *Pharmacol Rev.* 1995; 47(2); 267-70

Horowitz A, Menice C. B. Laporte R, Morgan K. G. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiological reviews* 1996; 76; 967-1003.

Hosoda C, Tanoue A, Shibano M, Tanaka Y, Hiroyama M, Koshimizu TA, Cotecchia S, Kitamura T, Tsujimoto G, Koike K. Correlation between vasoconstrictor roles and mRNA expression of alpha1-adrenoceptor subtypes in blood vessels of genetically engineered mice. *Br J Pharmacol.* 2005; 146(3); 456-66.

Hu ZW, Shi XY, Lin RZ, Hoffman BB. Contrasting signaling pathways of alpha1A- and alpha1B-adrenergic receptor subtype activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Ras in transfected NIH3T3 cells. *Mol Endocrinol*. 1999;13(1); 3-14.

Huges AD. Molecular and cellular mechanisms of action of angiotensin II (AT1) receptors in vascular smooth muscle. *J of human Hypertension*. 1998; 12; 275-281

Hunyady L, Gáborik Z, Vaquelin G, Catt K. J. Structural requirements for signaling and regulation of AT1-receptors. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2002; 2; S16-S23.

Ibarra M, Pardo JP, Lopez-Guerrero JJ, Villalobos-Molina R. Differential response to chloroethylclonidine in bloodvessels of normotensive and spontaneously hypertensive rats: role of alpha 1D- and alpha 1A-adrenoceptors in contraction. *Br J Pharmacol*. 2000; 129(4); 653-60.

Ibarra, M., J. J. López-Guerrero y R. Villalobos-Molina. Further evidence of the predominance of α_{1D} -adrenoceptors in arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Pharmacol Rev Comm*. 1998; 10; 135-142

Ihle JN. Cytokine receptor signalling. *Nature* 1995. 377: 591-594.

Iwaki K, Sukhatme VP, Shubeita HE, Chien KR. Alpha- and beta-adrenergic stimulation induces distinct patterns of immediate early gene expression in neonatal rat myocardial cells. Fos/ jun expression is associated with sarcomere assembly; Egr-1 induction is primarily an alpha 1-mediated response. *J Biol Chem*. 1990; 15, 265(23):13809-17.

Kasper Hauser, Braunwald Longo, Fauci Jameson. Principles of Internal Medicine. Harrison on line. Enfermedades del aparato cardiovascular. Sección 4. Capítulo 230. 16th ed., Mc Graw Hill.

Kim S & Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacological Reviews*. 2000; 52; 11-34.

Kitami Y, Okura T, Marumoto K, Wakamiya R and Hiwada K. Differential gene expression and regulation of type-1 angiotensin II receptor subtypes in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1992. 188: 446–452.

Knowlton KU, Michel MC, Itani M, Shubeita HE, Ishihara K, Brown JH, Chien KR. The alpha 1A-adrenergic receptor subtype mediates biochemical, molecular, and morphologic features of cultured myocardial cell hypertrophy. *J Biol Chem*. 1993; 268(21); 15374-80.

Koshimizu TA, Tanoue A, Hirasawa A, Yamauchi J, Tsujimoto G. Recent advances in alpha1-adrenoceptor pharmacology. *Pharmacol Ther*. 2003; 98(2); 235-44.

Kwan DC. Heterogeneity of vascular smooth muscle alpha-adrenoceptors in canine blood vessels. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1999; 26(10); 822-3.

L'Heureux N., Stoclet J.C., Auger F.A., Laugaud G.J., Germain L., Andriantsiotohaina R. A human tissue-engineered vascular media: a new model for pharmacological studies of contractile responses. *FASEB J*. 2001; 15; 515-524.

Lachnit WG, Tran AM, Clarke DE, Ford AP. Pharmacological characterization of an alpha 1A-adrenoceptor mediating contractile responses to noradrenaline in isolated caudal artery of rat. *Br J Pharmacol*.1997; 120(5); 819-26.

Lai Y E, Föhling M, Ma Z, Källskog Ö, Persson P B, Patzak A, Persson AEG, and Hultström M. Norepinephrine increases calcium sensitivity of mouse afferent arteriole, thereby enhancing angiotensin II-mediated vasoconstriction. *Kidney International*. 2009; 76: 953-959.

Lázaro-Suárez ML, Gómez-Zamudio JH, Gallardo-Ortíz IA, Tanoue A, Tsujimoto G, Farias-Rodríguez VM, Villalobos-Molina R. Chloroethylclonidine reveals that alpha (1 A)-adrenoceptors mediate contraction in aorta of alpha (1 D)-adrenoceptor knockout mice. *Auton Autacoid Pharmacol*. 2005; 25(4);179-83.

Lehninger. Principles of Biochemistry. L.Nelson David, M Cox Michael. 5th edition, 2008. Capitulo 4. Freeman.

Lifton R.P, Gharavi A.G, Geller D.S. Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* 2001;104; 545-556.

Livak K. J, Schmittgen T. D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔct} Method. *Methods*. 2001; 25; 402-408.

Lomasney JW, Cotecchia S, Lorenz W, Leung WY, Schwinn DA, Yang-Feng TL, Brownstein M, Lefkowitz RJ, Caron MG. Molecular cloning and expression of the cDNA for the alpha 1A-adrenergic receptor. The gene for which is located on human chromosome 5. *J Biol Chem*.199; 266(10);6365-9.

Lund, A.K., M.B. Goens, N.L. Kanagy y M.K. Walker Cardiac hypertrophy in aryl hydrocarbon receptor null mice is correlated with elevated angiotensin II, endothelin-1 and mean arterial blood pressure. *Toxicol Applied Pharmacol*. 2003;193; 177-187.

Marrero MB, Schieffer B, Li B, Sun J, kinase/signal transducer and activator of transcription and mitogen-activated protein kinase cascades in angiotensin II and platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry*. 1997; 272; 24684-24690.

Marshall I, Burt RP, Chapple CR. Noradrenaline contractions of human prostate mediated by alpha 1A-(alpha 1c-) adrenoceptor subtype. *Br J Pharmacol.*1995: 115(5); 781-6

Martínez-Salas S. G., Campos-Peralta J.M., Pares-Hipolito J., Gallardo-Ortíz A., Ibarra M., Villalobos-Molina R. α_{1A} -adrenoceptors predominate in the control of blood pressure in mouse mesenteric vascular bed. *Autonomic & autacoid Pharmacology.* 2007: 27; 137-142.

Matsusaka T & Ichikawa I. Biological functions of angiotensin and its receptors. *Annual. Review of Physiology.* 1997. 59: 395-412.

Mccunne Dan F, Edelman Stephanie E, Olges Jennifer R, Post Ginell R, Waldrop Bruce A, Waugh David J.J, Perez Dianne M, and Piascik Michael T. Regulation of the cellular localization and signaling properties of the α_{1D} - and α_{1B} -adrenoceptors by agonists and inverse agonists. *molecular Pharmacology.* 2000: 57; 659-666.

Mehta PK and Griendling K K. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007: 292; C82–C97.

Milano CA, Dolber PC, Rockman HA, Bond RA, Venable ME, Allen LF, Lefkowitz RJ. Myocardial expression of a constitutively active alpha 1B-adrenergic receptor in transgenic mice induces cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.*1994: 11; 91(21):10109-13.

Minneman KP, Theroux TL, Hollinger S, Han C, Esbenshade TA. Selectivity of agonists for cloned α_1 -adrenergic receptor subtypes. *Mol. Pharmacol.* 1994: 46; 929-936.

Moriyama N, Nasu K, Takeuchi T, Akiyama K, Murata S, Nishimatsu H, Yano J, Tsujimoto G, Kawabe K. Quantification and distribution of alpha 1-adrenoceptor subtype mRNAs in human vas deferens: comparison with those of epididymal and pelvic portions. *Br J Pharmacol.*1997: 122(6);1009-14.

Morrow AL, Creese I.Characterization of alpha 1-adrenergic receptor subtypes in rat brain: a reevaluation of [3H] WB4104 and [3H]prazosin binding. *Mol Pharmacol.* 1986: 29(4); 321-30.

Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi M, Sasamura H, Pratt RE and Dzau VJ. Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J Biol. Chem.* 1993: 268; 24539-24542.

Nagashima M, Hatton Y, Akaishi Y, Tohse N, Sakuma Y, Kitabatake A, Kanno M. α_1 -adrenoceptor subtypes mediating ionotropic and electrophysiological effects in mammalian myocardium. *Am J Physiol.* 1996: 271; H1423-H1432.

Nair R, Dyer DC, Pharmacological Characterization of alpha 1 adrenoceptors in porcine uterine artery. *Eur J Pharmacol.* 1996: 312; 45-51.

Nasjletti A. The role of eicosanoids in angiotensin-dependent hypertension. *Hypertension.* 1997: 31 (Part 2); 194-200.

O'Connell TD, Ishizaka S, Nakamura A, Swigart PM, Rodrigo MC, Simpson GL, Cotecchia S, Rokosh DG, Grossman W, Foster E, Simpson PC. The alpha 1A/C and alpha 1B-adrenergic receptors are required for physiological cardiac hypertrophy in the double knockout mouse. *J Clin Invest* 2003: 111; 1783-1791.

O'Connell TD, Rokosh DG, Simpson PC. Cloning and characterization of the mouse alpha1C/A-adrenergic receptor gene and analysis of an alpha1C promoter in cardiac myocytes: role of an MCAT element that binds transcriptional enhancer factor-1 (TEF-1). *Mol Pharmacol.* 2001: 59(5); 1225-34.

Oliveira L, C. M. Costa-Neto, C. R. Nakaie, S. Schreier, Shimuta S I, and Paiva M. C. A. The Angiotensin II AT1 Receptor Structure-Activity Correlations in the Light of Rhodopsin Structure. *Physiol Rev.* 2007: 87; 565–592.

Osborn J.L., Holdaas A., Thames M.D., & Dibona G.F. Renal adrenoceptor mediation of antinatriuretic and renin secretion responses to low frequency and renal nerve stimulation in the dog. *Circ. Res.* 1983: 53; 298-305.

Perez DM, Deyoung MB, Graham RM, Coupled of expressed alpha 1B- and alpha 1D-adrenergic receptor to multiple signaling pathways is both G protein and cell type specific. *Mol Pharmacol* 1993: 44; 784-795.

Piascik MT, Guarino RD, Smith MS, Siltis EE, Saussy DL, Pérez DM. The specific contribution of the novel α_{1D} -adrenoceptor in the contraction of vascular smooth muscle. *J pharmacol Exp Ther.* 1995: 275; 1583-9

Prenzel N, Zwick E, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch C & Ullrich A. EGF receptor transactivation by G protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature.* 1999: 402; 884-888.

Quadri F., Badoer E., Stadler T., Unger T. Angiotensin II-induced noradrenaline release from anterior hypothalamus in conscious rats: a brain microdialysis study. *Brain Res.* 1991: 563;137-141.

Rensen S.S.M, Doevendans P.A.F.M., van Eys G.J.J.M. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Netherlands Heart Journal* 2007. 15:100-108.

Richard A. Bond, David B. Bylund, Douglas C. Eikenburg, J. Paul Hieble, Rebecca Hills, Kenneth P. Minneman, Sergio Parra. Adrenoceptors: α_{1A} -adrenoceptor. IUPHAR database (IUPHAR-DB), <http://www.iuphar-db.org>. object tld= 22, 23, 24.

Robinson MJ & Cobb MH. Mitogen- activated protein kinase pathways. Current Opinion in Cell Biology. 1997: 9; 180-186.

Rokosh DG, Stewart AFR, Chang KC, Bailey BA, Karliner JS, Camacho SA, Long CS and Simpson PC. α_1 -adrenergic receptor subtype mRNAs are differentially regulated by α_1 -adrenergic and other hypertrophic stimuli in cardiac myocytes in culture and *in vivo*. JBC 1996: 271(10);5839-5843.

Rokosh DG, Simpson PC. Knockout of the alpha 1A/C-adrenergic receptor subtype: the alpha 1A/C is expressed in resistance arteries and is required to maintain arterial blood pressure. Proc Natl Acad Sci USA 2002: 99; 9474-9479.

Russell A and Watts S. Vascular Reactivity of Isolated Thoracic Aorta of the C57BL/6 Mouse. JPET, 2000 vol. 294 no. 2 598-604

Sah VP, Hoshijima M, Chien KR, Brown JH. Rho is required for Galphaq and alpha1-adrenergic receptor signaling in cardiomyocytes. Dissociation of Ras and Rho pathways. J Biol Chem. 1996: 271(49); 31185-90

Salomonsson M, Oker M, Kim S, Zhang H, Faber J E, and Arendshorst J. α_1 -adrenoceptor subtypes on rat afferent arterioles assessed by radioligand binding and RT-PCR. (2001) Am J Physiol Renal Physiol 281: F172-F178.

Sanbe A, Tanaka Y, Fujiwara Y, Miyauchi N, Mizutani R, Yamauchi J, Cotecchia S, Koike K, Tsujimoto G, Tanoue A. Enhanced vascular contractility in alpha1-adrenergic receptor-deficient mice. Life Sci. 2009: 22;84(21-22):713-8.

Sanbe A, Tanaka Y, Fujiwara Y, Tsumura H, Yamauchi J, Cotecchia S, Koike K, Tsujimoto G, Tanoue A. Alpha1-adrenoceptors are required for normal male sexual function. Br J Pharmacol. 2007: 152(3); 332-40.

Sattar M. A & Johns E.J. Characteristics of α_1 -adrenoceptors in the rat renal vasculature. Br. J. Pharmacol. 1991: 104;318P.

Sattar M. A & Johns E.J. Evidence for α_1 -adrenoceptor subtype mediating adrenergic vasoconstriction in Wistar normotensive and stroke-prone spontaneously hypertensive rat kidney. J. Cardiovasc. Pharmacol. 1994a: 23; 323-239

Sattar M. A & Johns E.J. α_1 -adrenoceptor subtype mediating adrenergic vasoconstriction in kidney of 2K1C Goldblatt and DOCA salt hypertensive rats. J. Cardiovasc. Pharmacol. 1994b: 24; 420-428.

Saward L & Zahradka P (1997). Angiotensin II activates phosphatidylinositol 3-kinase in vascular smooth muscle cells. Circulation Research. 81: 249-257.

Sayeski PP, Ali MS, Harp JB, Marrero MB & Bernstein KE. Phosphorylation of p130Cas by angiotensin II is dependent on c-Src, intracellular Ca²⁺, and protein kinase C. *Circulation Research*. 1998; 82: 1279-1288.

Schwinn DA, Lomasney JW, Lorenz W, Szklut PJ, Fremeau RT Jr, Yang-Feng TL, Caron MG, Lefkowitz RJ, Cotecchia S. Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel alpha 1-adrenergic receptor subtype. *J Biol Chem*. 1990 15;265(14):8183-9.

Stadler T., Veltmar A, Quadri F., Unger T. Angiotensin II evokes noradrenaline release from the paraventricular nucleus in conscious rats. *Brain Res*. 1992: 569; 117-122.

Stassen FR, Willemsen MJ, Janssen GM, DeMey JG. Alpha 1-adrenoceptor subtypes in rat aorta and mesenteric small arteries are preserved during left ventricular dysfunction post-myocardial infarction. *Cardiovasc Res*.1997: 33(3); 706-13.

Swanson GN, Hanesworth JM, Sardinia MF, Coleman JK, Hall KI, Miller-Wing AV, Cook VI, Harding ECE and Harding JW. Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3-8), a putative angiotensin IV receptor. *Regul Pept* 40:409–419.

Taniguchi N, Ukai Y, Tanaka T, Yano J, Kimura K, Moriyama N, Kawabe K. Identification of alpha 1-adrenoceptor subtypes in the human prostatic urethra. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*.1997: 355(3); 412-6

Tanoue A, Nasa Y, Koshimizu T, Shinoura H, Oshikawa S, Kawai T, Sunada S, Takeo S, Tsujimoto G. The alpha 1D-adrenergic receptor directly regulates arterial blood pressure via vasoconstriction. *J Clin Invest* 2002: 109; 765-775.

Tanoue A., Koba M., Miyawaki S., Koshimizu T, Hosoda C, Oshikawa S, Tsujimoto G. Role of the α 1D-adrenergic receptor in the development of salt-induced hypertension. *Hypertension* 2002: 40; 101-106.

Teeters J C, Erami C, Zhang H, and Faber J E. Systemic α 1A-adrenoceptor antagonist inhibits neointimal growth after balloon injury of rat carotid artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002: 284; H385- H392.

The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. U.S. Department of Health and Human Services. National Institutes of Health. National Heart, Lung, and Blood Institute. National High Blood Pressure Education Program. NIH Publication. 2004: No. 04-5230

Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. *Trends Pharmacol Sci*. 1991;12; 55-62.

Touyz R. M and Schiffrin E. L. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev.* 2000: 52(4); 639-72.

Touyz R. M. & Berry C. Recent advances in angiotensin II signaling. *Brazilian J. of medical and biological research.* 2002: 35; 1001-1015.

Touyz RM & Schiffrin EL. Ang II stimulated generation of reactive oxygen species in human vascular smooth muscle cells is mediated via PLD-dependent pathways. *Hypertension.* 1999: 34 (Part 2): 976-982.

Uberti Michelle A, Hague Chris, Oller Heide, Minneman Kenneth P, and Hall Randy A. Heterodimerization with β 2-Adrenergic receptors promotes surface expression and functional activity of α _{1D}-adrenergic receptors. *JPET.* 2004: 313; 16-23.

Uberti Michelle A, Hall Randy A, and Minneman Kenneth P. Subtype-specific dimerization of α ₁Adrenoceptors: Effects on receptor expression and pharmacological properties. *Molecular Pharmacology.* 2003: 64; 1379-1390.

Vázquez-Prado J, Villalobos-Molina R. Alpha 1-adrenoceptors: subtypes, signaling, and roles in health and disease. *Arch Med Res.* 1999: 30(6); 449-58.

Villalobos-Molina R, López-Guerrero JJ, Ibarra M. Chloroethylclonidine is a partial alpha1-adrenoceptor agonist in aorta and caudal arteries of the Wistar Kyoto rat. *Eur J Pharmacol.* 1998: 12; 351(1):49-52.

Villalobos-Molina R, Vázquez-Cuevas FG, López-Guerrero JJ, Figueroa-García MC, Gallardo-Ortiz IA, Ibarra M, Rodríguez-Sosa M, Gonzalez FJ, Elizondo G. Vascular alpha-1D-adrenoceptors are overexpressed in aorta of the aryl hydrocarbon receptor null mouse: role of increased angiotensin II. *Auton Autacoid Pharmacol.* 2008: 28(2-3); 61-7.

Villalobos-Molina R., López-Guerrero J.J. & Ibarra M. Alpha 1D- and alpha 1A-adrenoceptors mediated contraction in the rat renal artery. *Eur. J. Pharmacol.* 1997: 322; 225-227.

Villalobos-Molina R, Ibarra M. Alpha 1 adrenoceptors mediating contractions in arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats are of the alpha 1D or alpha 1A subtypes. *Eur J Pharmacol.* 1996: 298; 257-263.

Wolf-Maier, K., Cooper, R.S., Banegas, Jr., Giampaoli S., Hanswerner H., Joffres M., Poluter N., Primatesta P., Rodríguez- Artalejo F., Stegmayr B., Tahmm M., Tuomilehto J., Vanuzzo D., Vescio F. Hypertension prevalence and blood pressure levels in 6 European Countries, Canadá, and the United States. *JAMA* 2003: 289; 2363-2369.

Xhaard H, Rantanen VV, Nyrönen T, Johnson MS. Molecular evolution of adrenoceptors and dopamine receptors: implications for the binding of catecholamines. *J Med Chem.* 2006; 49(5); 1706-19.

Xin X, Yang N, Eckhart AD, Faber JE. Alpha1D-adrenergic receptors and mitogen-activated protein kinase mediate increased protein synthesis by arterial smooth muscle. *Mol Pharmacol.* 1997;51(5); 764-75.

Xu Q, Xu N, Zhang T, Zhang H, Li Z, Yin F, Lu Z, Han Q, Zhang Y. Mammalian toll-like receptor subcellular localization, internalization, and signaling of alpha(1a)-adrenergic receptors. *Mol Pharmacol.* 2006; 70(2); 532-41.

Yamamoto Y, Koike K. Characterization of alpha1-adrenoceptor-mediated contraction in the mouse thoracic aorta. *Eur J Pharmacol.* 2001; 424(2); 131-40.

Yu GS, Han C. Role of α_{1A} - and α_{1B} - adrenoceptors in phenylephrine induced positive inotropic response in isolated rat left atrium. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1994; 24; 745-752.

Zacharia J, Hillier C, Tanoue A, Tsujimoto G, Daly C J, McGrath J C, & MacDonald A. Evidence for involvement of α_{1D} -adrenoceptors in contraction of femoral resistance arteries using knockout mice. *British Journal of Pharmacology.* 2005;146; 942-951.

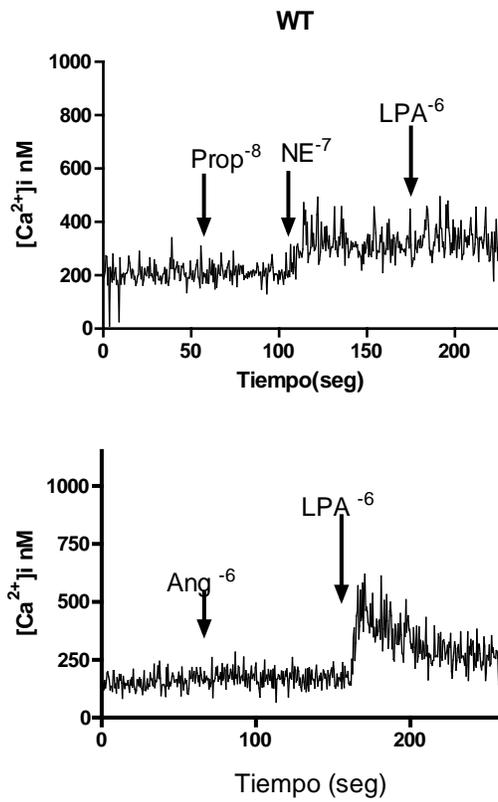
Zaman A. M, Oparil S, and Calhoun D. A. Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system. *Nature reviews. Drug discovery.* 2002; 1; 621- 636.

Zhuo-Wei H, Xiao-You S, Okazaki M, and Hoffman B B. Angiotensin II induces transcription and expression of α_1 -adrenergic receptors in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 1995; 268; H1006-H1014.

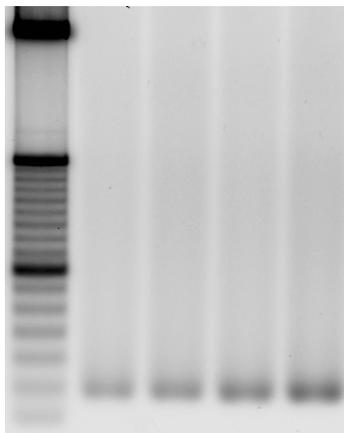
Zhou Y, Dirksen WP, Babu GJ, Periasamy M. Differential vasoconstrictions induced by angiotensin II: role of AT1 and AT2 receptors in isolated C57BL/6J mouse blood vessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 285(6); H2797-803.

Zuscik JM, Piascik MT and Perez DM. Cloning, cell-type specificity, and regulatory function of the mouse α_{1B} - Adrenergic receptor promoter. *Mol. Pharmacol.* 1999; 56; 1288-1297.

12. ANEXO



Movilización de [Ca²⁺]_i en células de músculo liso de aorta de ratón. Mediciones realizadas en espectrofluorómetro con Fura 2AM.



Amplicón AT1 (100pb) obtenido de CMLV de aorta de ratón.

