



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA  
PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES  
ADRENÉRGICOS EN LA RESPUESTA DE  
CONTRACCIÓN INDUCIDA POR SEROTONINA EN  
LA AORTA AISLADA DE COBAYO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**BLANCA DINORA MENDOZA MEJÍA**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. PATRICIA CAMPOS BEDOLLA**

**Ciudad Universitaria, CD. MX. 2017**



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.

---

---

## ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	5
LISTA DE FIGURAS Y CUADROS .....	6
RESUMEN.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
Vías de señalización en la contracción del músculo liso vascular .....	10
Sistema adrenérgico en el músculo liso vascular .....	15
La serotonina en el músculo liso vascular.....	19
Interacción de los sistemas serotoninérgico y adrenérgico.....	23
JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO .....	25
HIPÓTESIS.....	26
OBJETIVOS .....	27
Objetivo General .....	27
Objetivos Específicos.....	27
MATERIAL Y MÉTODO.....	28
Animales de estudio .....	28
Sistema de órganos aislados <i>in vitro</i> .....	28
Mediciones simultáneas Contracción- $Ca^{2+i}$ .....	31
Análisis estadístico.....	32
RESULTADOS .....	33
Estudios en sistema de órganos aislados <i>in vitro</i> .....	33
Mediciones simultáneas de Contracción- $Ca^{2+i}$ .....	42
DISCUSIÓN.....	45
CONCLUSIONES .....	53
BIBLIOGRAFÍA.....	55

## HOJA DE DATOS DEL JURADO

### 1. Datos del alumno

Mendoza  
Mejía  
Blanca Dinora  
26 13 75 78  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
309281740

### 2. Datos del tutor

Dra.  
Patricia  
Campos Bedolla

### 3. Datos del sinodal 1

Dr.  
José Luis  
Arreola  
Ramírez

### 4. Datos del sinodal 2

Dr.  
Josué Orlando  
Ramírez  
Jarquín

### 5. Datos del sinodal 3

Dr.  
Jaime Héctor  
Gómez  
Zamudio

### 6. Datos del sinodal 4

Dra.  
Verónica Estela  
Carbajal  
Salinas

### 7. Datos del trabajo escrito

Evaluación farmacológica de la participación de los receptores adrenérgicos en la respuesta de contracción inducida por serotonina en la aorta aislada de cobayo.  
60 p.  
2017

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco primordialmente a las Instituciones que otorgaron el apoyo para la realización de este proyecto. Al **Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)**, en particular, a la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas por el apoyo constante en mi formación académica y al jefe de esta unidad el Dr. Israel Grijalva Otero por su atención durante el desarrollo de este proyecto. Comparto este agradecimiento con el **Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER)**, esencialmente al Departamento de Investigación en Hiperreactividad Bronquial, donde realicé parte del trabajo experimental. A la Dra. Patricia Segura Medina, quien dirige este departamento, por su atención y sugerencias a este proyecto. Además agradezco al jefe del bioterio el Dr. Alberto Pizaña y al personal por su gran apoyo.

Este trabajo de investigación formó parte del proyecto denominado *“Evaluación farmacológica de los receptores serotoninérgicos involucrados en la actividad de contracción del músculo liso vascular en un modelo experimental de asma alérgica”*, registrado en la Coordinación de Investigación Médica, IMSS como R-2013-3601-7, el cual recibió el apoyo económico por el Fondo de Investigación en Salud, IMSS con registro FIS/IMSS/PROT/G14/1300. Así mismo, este proyecto fue registrado en el Comité de Investigación del INER con el título *“Caracterización farmacológica de los receptores 5-HT<sub>2</sub> (5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>) en la actividad de la aorta de cobayo en un modelo experimental de asma alérgica”* con el número asignado B19-16.

Agradezco a la **Universidad Nacional Autónoma de México** por la riqueza académica, profesional y personal otorgada a mi vida. A la **Facultad de Ciencias** y a los excelentes profesores con quienes tuve la fortuna de aprender y crecer académicamente.

Mi más sincera y enorme gratitud a mi tutora y Directora de tesis la Dra. Patricia Campos Bedolla, por su dirección, motivación y apoyo incondicional en este proyecto. Más aún, por su infinita paciencia, su confianza, las largas charlas y sonrisas, los invaluable consejos y todos los buenos momentos compartidos. Gracias infinitas por sus enseñanzas y su amistad.

Agradezco en especial, a la Dra. Verónica Carbajal Salinas, por su apoyo en la parte experimental, por sus enseñanzas y solidaridad.

También quiero expresar mi reconocimiento y gratitud al Dr. Mario Vargas Becerra por su asesoría, supervisión y las atenciones brindadas en la realización de este proyecto.

Agradezco fundamentalmente al jurado que participó en la revisión de la tesis, conformado por el Dr. José Luis Arreola Ramírez, el Dr. Josué Orlando Ramírez Jarquín, el Dr. Jaime Héctor Gómez Zamudio y la Dra. Verónica Estela Carbajal Salinas, por sus importantes sugerencias y aportaciones a este trabajo.

Muchas gracias a Emmanuel, Rafael, María José y Nahui por lo aprendido juntos, la complicidad de simios y su amistad. Por los agradables momentos compartidos en el laboratorio y fuera de éste.

Y por supuesto, a quienes me han motivado y dirigido con paciencia y sobre todo con el más sincero amor, a mi mamá **Carolina** y mi papá **Rosendo**. No tengo las palabras suficientes para expresar mi profunda gratitud y admiración. A mi mamá por ser el ejemplo más grande de fortaleza, tenacidad y solidaridad. A mi papá por enseñarme a no dejarme vencer, a ser siempre fuerte y sensible a la vez. Gracias a ambos por impulsarme a ser cada día la mejor versión de mí, esto no sería posible sin ustedes.

A mi hermanita **Bárbara**, por la complicidad, el amor y la felicidad. Por transmitirme fortaleza y serenidad en los mejores y peores momentos. Siempre aprendo de ti.

A mi familia por su cariño, apoyo y motivación. En especial a mis tías queridas, Vero y Estela, que se han preocupado siempre por mi bienestar y han sido participes de mis alegrías, tropiezos y logros. A mi tía Vero por ser mi segunda mamá.

¡GRACIAS!

---



---

**ABREVIATURAS**

<b>ABREVIATURA</b>	<b>SIGNIFICADO</b>
$\alpha$ -AR	Receptor Alfa adrenérgico
$\beta$ -AR	Receptor Beta adrenérgico
5-HT	5-hidroxitriptamina
5-HTR	Receptor serotoninérgico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AR	Receptores adrenérgicos
ATP	Adenosín trifosfato
CA	Catecolaminas
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Concentración de calcio intracelular
CaD	Caldesmón
CaM	Calmodulina
DA	Dopamina
DAG	Diacilglicerol
GDP	Guanosín difosfato
GTP	Guanosín trifosfato
GI	Tracto gastrointestinal
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
IP <sub>3</sub>	Inositol trifosfato
KCl	Cloruro de potasio
KT	Ketanserina
ML	Músculo liso
MLV	Músculo liso vascular
MLC	Cadena ligera de miosina
MLCK	Cinasa de la cadena ligera de miosina
MLCP	Fosfatasa de la cadena ligera de miosina
NA	Noradrenalina
NET	Transportador de Noradrenalina
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidil Inositol 4,5-bifosfato
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PLC	Fosfolipasa C

<b>PMCA</b>	ATPasa de $\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática
<b>RKB</b>	Solución Ringer-Krebs Bicarbonato
<b>RS</b>	Retículo sarcoplásmico
<b>SC</b>	Sistema cardiovascular
<b>SERCA</b>	ATPasa de $\text{Ca}^{2+}$ del retículo sarcoplásmico
<b>SERT</b>	Transportador de serotonina
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central

## LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1	Esquema de las capas estructurales de las arterias.	7
2	Vía de señalización de la contracción del músculo liso vascular.	12
3	Síntesis y metabolismo de la 5-HT.	17
4	Esquema del sistema de órganos aislados <i>in vitro</i> .	27
5	Registro representativo de órganos aislados <i>in vitro</i> .	27
6	Esquema del sistema de mediciones simultáneas de Contracción- $[\text{Ca}^{2+}]_i$	28
7	Contracción inducida por la 5-HT en anillos de aorta torácica de cobayo a concentraciones únicas de 5-HT (0.1 $\mu\text{M}$ -100 $\mu\text{M}$ ).	30
8	Efecto de la Ketanserina (0.01 $\mu\text{M}$ ) en la contracción inducida por 5-HT (100 $\mu\text{M}$ ) en anillos de aorta torácica de cobayo.	30
9	Efecto del Prazosin (antagonista $\alpha_1$ -adrenérgico 0.01 $\mu\text{M}$ ), en la contracción inducida por 5-HT (100 $\mu\text{M}$ ) en anillos de aorta torácica de cobayo.	32
10	Efecto de los antagonistas Prazosin (0.01 $\mu\text{M}$ ) y KT (0.01 $\mu\text{M}$ ) en la respuesta de contracción inducida por 5-HT en anillos de aorta torácica de cobayo.	32
11	Efecto del Propranolol (antagonista $\beta$ -adrenérgico, 10 $\mu\text{M}$ ) en la contracción inducida por 5-HT (100 $\mu\text{M}$ ) en anillos de aorta torácica de cobayo.	34



12	Efecto de los antagonistas $\beta$ -adrenérgico, Propranolol (10 $\mu$ M) y 5-HT <sub>2A</sub> , KT (0.01 $\mu$ M) en la respuesta de contracción inducida por 5-HT en anillos de aorta torácica de cobayo.	34
13	Efecto de contracción inducida por los agonistas Fenilefrina (10 $\mu$ M), 5-HT (100 $\mu$ M) e Isoproterenol (10 $\mu$ M) en anillos de aorta torácica de cobayo.	35
14	Efecto de la KT (0.01 $\mu$ M) en la contracción inducida por FE (10 $\mu$ M).	37
15	Efecto de la KT (0.01 $\mu$ M) en la contracción inducida por ISO (100 $\mu$ M).	37
16	Registro representativo de mediciones simultáneas de la contracción y [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> por 5-HT en anillos de aorta torácica de cobayo.	38
17	Registro representativo del efecto del Prazosin (0.01 $\mu$ M) en la respuesta de contracción por 5-HT (320 $\mu$ M) en las mediciones simultáneas de la contracción y [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> en anillos de aorta torácica de cobayo.	39
18	Efecto del Prazosin en la respuesta de contracción y la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> inducida por 5-HT en anillos de aorta torácica de cobayo.	44
19	Esquema de los posibles mecanismos de interacción entre la serotonina y el sistema adrenérgico.	46

## CUADRO

1	Clasificación de receptores adrenérgicos y mecanismos de transducción.	14
2	Clasificación de receptores 5-HT y mecanismos de transducción.	19
3	Agonistas y antagonistas serotoninérgicos y adrenérgicos utilizados en el estudio.	24
4	Respuestas de contracción (%) y área bajo la curva inducida por los antagonistas en la respuesta de 5-HT.	36

---

## RESUMEN

### **Evaluación farmacológica de la participación de los receptores adrenérgicos en la respuesta de contracción inducida por serotonina en la aorta aislada de cobayo.**

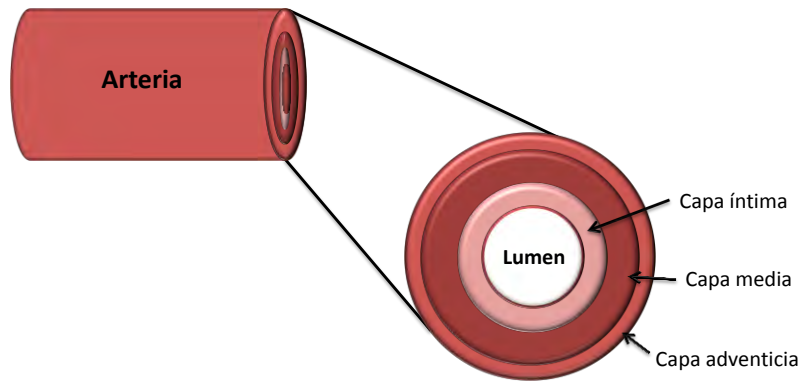
Los receptores serotoninérgicos (5-HTR), en particular 5-HT<sub>2A</sub>R, y los receptores  $\alpha$ - y  $\beta$ -adrenérgicos ( $\alpha$ -AR y  $\beta$ -AR) son los principales receptores que participan en la regulación del tono vascular de la aorta. Por esta razón, estos receptores han sido utilizados como dianas terapéuticas en diversas enfermedades cardiovasculares. En trabajos realizados previamente por nuestro grupo de investigación, se observó que al inhibir la actividad del 5-HT<sub>2A</sub>R con su antagonista específico ketanserina, la respuesta de contracción disminuyó sólo parcialmente, un hecho inesperado, debido a que ha sido ampliamente utilizada la ketanserina como el antagonista específico del 5-HT<sub>2A</sub>R por excelencia y también el 5-HT<sub>2A</sub>R es el receptor primordial en la contracción. Por este motivo, consideramos que otro posible mecanismo de señalización pudiera estar regulando, de manera simultánea, la contracción inducida por 5-HT. Debido a la importancia de los receptores adrenérgicos en la regulación del tono vascular, decidimos explorar la posible participación del sistema adrenérgico en la respuesta de contracción inducida por 5-HT. Asimismo, evaluamos la participación del calcio intracelular [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, el cual es esencial para la contracción del músculo liso. En nuestro trabajo, evaluamos la actividad de los receptores  $\alpha$ -AR y  $\beta$ -AR, a través de sus antagonistas no específicos, en la contracción de la aorta inducida por una dosis única de 5-HT (100  $\mu$ M) en un sistema de órganos aislados *in vitro*. Así también, determinamos la participación de los  $\alpha$ -AR y [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en la respuesta de contracción inducida por 5-HT, mediante un sistema de mediciones simultáneas de contracción-Ca<sup>2+</sup>. Lo más importante de este trabajo fue determinar que los  $\alpha$ -AR y  $\beta$ -AR participan, de manera simultánea, en la contracción inducida por 5-HT. En los experimentos de mediciones simultáneas, observamos un decremento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en la contracción por 5-HT al inhibir la actividad del  $\alpha$ -AR. Con estos resultados podemos concluir que los  $\alpha$ -AR y  $\beta$ -AR participan de manera importante en la contracción de la aorta inducida por 5-HT. Lo anterior nos permite proponer que, la acción de la 5-HT podría estar promoviendo la liberación de catecolaminas desde terminales nerviosas presinápticas, lo que origina una mayor contracción por la acción de las mismas catecolaminas y la 5-HT. Este trabajo de investigación nos conduce a considerar la evaluación del posible mecanismo en la posible interacción de las vías de señalización serotoninérgicas y adrenérgicas en la contracción de la aorta.

## INTRODUCCIÓN

El sistema cardiovascular (SC) tiene como función principal el transporte de los nutrientes y oxígeno, a través de la sangre en el organismo. Este sistema está constituido por el corazón, las arterias, las arteriolas, las venas, las vénulas y los capilares. La sangre es bombeada por el corazón hacia las arterias y arteriolas hasta los capilares donde se realiza el intercambio bidireccional por difusión de oxígeno (O<sub>2</sub>) y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). La sangre oxigenada se dirige hacia órganos y tejidos llevando los nutrientes, mientras que la sangre desoxigenada transporta los productos de desecho metabólico hacia los órganos de excreción y regresa al corazón (1, 2).

Las arterias son vasos sanguíneos de calibre grande, siendo la aorta la principal arteria que da origen a las arterias de menor calibre que irrigan a la mayoría de los órganos. La aorta se origina en el ventrículo izquierdo del corazón, formando el cayado aórtico que desciende por la región torácica y abdominal hasta bifurcarse en las arterias iliacas (1). El tejido de la aorta está constituido por células endoteliales, células musculares lisas y matriz extracelular. Estos tipos celulares se encuentran organizados en tres capas concéntricas, desde el lumen a la parte externa denominadas: capa íntima, capa media y capa adventicia (**Fig. 1**) (3, 4).

La **capa íntima** es la región más delgada compuesta por células endoteliales, que forman la lámina basal y a su vez es soportada por la membrana elástica interna. La **capa media** es la región más gruesa, proporciona soporte estructural, elasticidad y reactividad vascular, está constituida por células del músculo liso vascular (MLV), tejido conectivo y fibras elásticas. La **capa adventicia** se compone de tejido conectivo, colágeno, miofibroblastos, fibroblastos y comprende los *vasa vasorum*, los cuales son vasos sanguíneos pequeños que proporcionan oxígeno y nutrientes a las células de la pared vascular y a nervios autónomos *nervi vasorum* (4-6) (**Fig. 1**).



**Figura 1.** Esquema de las capas estructurales de las arterias. En un corte transversal se observa la disposición concéntrica de las capas desde el lumen hacia la parte externa: íntima, media y adventicia.

Las células del MLV en la capa media de la aorta, están comunicadas por uniones estrechas o uniones comunicantes permitiendo que actúen como un sincitio, por lo que se denomina ML unitario; mientras que en el músculo esquelético las células reciben estímulos desde las terminales nerviosas, lo que permite que actúen de manera independiente (7).

En las células del MLV predominan los filamentos de actina, en una relación de 13:1 con respecto al filamento de la miosina, formando un haz orientado en sentido longitudinal respecto de la célula. Los filamentos de actina terminan en una densidad citoplasmática denominada cuerpo denso (8).

La organización de los elementos contráctiles en las células del MLV permite que las principales funciones del ML de la aorta sean la contracción y la relajación (9-11).

### **Vías de señalización en la contracción del músculo liso vascular**

La contracción del MLV ha sido ampliamente estudiada en los vasos sanguíneos, principalmente en arterias tales como, la arteria mesentérica superior (12), la arteria carótida (13), la arteria caudal y la aorta torácica (14). Fisiológicamente, este proceso es regulado por distintos mecanismos que inducen la activación de las proteínas contráctiles de las células del MLV: actina y miosina (15).

La actina y la miosina interaccionan efectuando el ciclo de los puentes cruzados, el cual es el mecanismo fundamental de la contracción.

En condiciones fisiológicas basales los filamentos de actina se encuentran estables por la acción inhibitoria del caldesmón (CaD), una proteína que bloquea los

sitios de unión de la miosina. Para que se lleve a cabo la contracción, el efecto inhibitorio del CaD es contrarrestado por el complejo Calcio-Calmodulina ( $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ) y diversos mecanismos de regulación, dejando libres los sitios de unión de la miosina (15).

La miosina contiene una enzima ATPasa que hidroliza ATP, esta reacción le confiere energía a la miosina lo que induce el cambio del ángulo de la cabeza de la miosina permitiendo la unión con los filamentos de actina, posteriormente se libera el ADP provocando el deslizamiento de la miosina sobre la actina hasta los cuerpos densos, dando lugar a la contracción. La cabeza de la miosina permanece unida a la actina hasta que se une a ella otra molécula de ATP (16, 17).

El ion  $\text{Ca}^{2+}$  es un segundo mensajero intracelular. La homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  y su señalización son el resultado de interacciones dinámicas entre mecanismos que conllevan a un incremento en la concentración intracelular de calcio [ $\text{Ca}^{2+}$ ]<sub>i</sub> y mecanismos que provocan su disminución, mediados por una diversidad de bombas y transportadores que se localizan en la membrana plasmática y en organelos intracelulares, como el retículo sarcoplásmico y la mitocondria, y por proteínas citosólicas que unen  $\text{Ca}^{2+}$  (17).

La elevación de la [ $\text{Ca}^{2+}$ ]<sub>i</sub> es necesaria para que inicie la contracción del MLV (10, 18-22). De acuerdo a Kim *et al.* (2008) además de la [ $\text{Ca}^{2+}$ ]<sub>i</sub>, los mecanismos que participan en la regulación de la contracción en el ML pueden clasificarse en dos tipos principales:

**1. Mecanismos que activan la acción de la ATPasa de miosina a través de cambios en la fosforilación de la cadena ligera de miosina (MLC):**

- a. Cascada de señalización de RhoA-Rho-cinasa. Al activarse la GTPasa RhoA por GEFs (*Guanine nucleotide exchange factors*) induce la acción de la Rho-cinasa que mediante fosforilación inhibe la MLCP (Fosfatasa de la cadena ligera de miosina), de esta manera la MLC se mantiene fosforilada y contraída (19).
- b. CPI-17 (*C-kinase-activated protein phosphatase inhibitor*, 17kDa). Esta proteína es activada por la proteína cinasa C (PKC) a su vez mediada por la fosfolipasa C (PLC). CPI-17 fosforila la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLC) inhibiéndola, la MLC permanece fosforilada y se mantiene la contracción (19, 21).

2. Mecanismos que regulan la interacción entre miosina y actina a través de proteínas de inhibición de la actina como el CaD. El CaD es una proteína de unión de actina y miosina que inhibe la actividad de la ATPasa de miosina y regula la polimerización de los filamentos de actina bloqueando la vía Arp2/3. El efecto inhibitorio del CaD puede ser revertido por la unión del complejo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  o por fosforilación mediante la vía de señalización PKC/ERK (19).

En condiciones fisiológicas normales la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular  $[\text{Ca}^{2+}]_e$  es aproximadamente de 1 a 10 mM, mientras que la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de las células del ML es de 0.1  $\mu\text{M}$ . La diferencia de concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  se mantiene por la regulación del flujo de iones a través de los canales iónicos. De acuerdo con los mecanismos de activación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  se han clasificado en:

- a. Canales de  $\text{Ca}^{2+}$ -dependientes de voltaje (VOCs, por sus siglas en inglés *voltage-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels*) son activados por cambios en el potencial de la membrana plasmática, han sido clasificados en diferentes subtipos. Los canales de alto umbral requieren grandes despolarizaciones y son los subtipos: L, N, P, Q y R. El único canal de bajo umbral descrito hasta ahora es el tipo T (23).
- b. Canales de  $\text{Ca}^{2+}$  regulados por el receptor (ROCs, *Receptor-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels*) responden a la unión de agonistas y generalmente están acoplados a proteínas G (24, 25).
- c. Canales de  $\text{Ca}^{2+}$  regulados por el almacenamiento o capacitativos (SOCs, *Store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels*) se activan en respuesta a la disminución de reservas de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Estos canales, también llamados canales SOCE (*Store Operated Calcium Entry*) son un complejo de proteínas macromoleculares que participan en la señalización del  $\text{Ca}^{2+}$  asociados a las balsas lipídicas de la membrana plasmática. Estos canales son activados por la depletación del  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  del RS, como una señal para activar el mecanismo de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por SOCE (89). Las proteínas a cargo de este mecanismo son STIM (por sus siglas en inglés, *Stromal Interaction Molecule*), localizada en el RS, la cual oligomeriza áreas de las uniones de la membrana plasmática activando los canales SOCE, formado por Orai, el canal-poro que permite el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol (87).

- d. Canales activados por estiramiento o mecanosensibles (SACs, sensory activated  $Ca^{2+}$  channels) se activan en respuesta a estímulos mecánicos.

La contracción del MLV puede ser iniciada por acoplamiento electromecánico a partir de la despolarización de la membrana o por acoplamiento farmacomecánico inducido mediante la estimulación por agonistas. El acoplamiento electromecánico actúa por cambios en el potencial de membrana que provocan la apertura de los VOCs permitiendo el ingreso de  $Ca^{2+}$  por lo que aumenta la concentración intracelular de este ion y promueve la contracción. El acoplamiento farmacomecánico consiste en la unión de neurotransmisores, hormonas u otros agonistas que estimulan los receptores membranales de la célula del MLV y desencadenan vías de señalización que involucran la acción de proteínas G y producción de segundos mensajeros (10, 15, 24, 26).

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, por sus siglas en inglés *G-protein coupled receptor*) o receptores transmembranales son conocidos como receptores heptahelicales caracterizados por siete hélices anfipáticas localizadas a través de la membrana (7TM) (27).

Las proteínas G tienen un papel esencial en los procesos de señalización y la transducción de señales relacionados con los mecanismos de contracción del MLV. Estos procesos de señalización son iniciados por la interacción de los diferentes agonistas con sus receptores específicos en la superficie celular.

Las proteínas G que son activadas por receptores heptahelicales están constituidas por tres subunidades denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  formando un heterotrímero. La subunidad  $\alpha$  contiene un sitio de unión al guanósín difosfato (GDP). Cuando el GDP se encuentra unido a la subunidad  $\alpha$ , la proteína G se encuentra en su forma inactiva. Al unirse un agonista al receptor induce el intercambio del GDP por guanósín trifosfato (GTP), activándose la subunidad  $\alpha$  de la proteína G que se disocia del complejo de las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$ . La subunidad  $\alpha$  activa la proteína efectora PLC. El complejo  $\beta\gamma$  activan diversas vías de señalización (27-30).

Las proteínas G se han clasificado en cuatro subfamilias basadas en la homología estructural y funcional:  $G_{\alpha(S \text{ y } olf)}$ ,  $G_{i/o}$ ,  $G_{12/13}$ ,  $G_{q/11}$  (30).

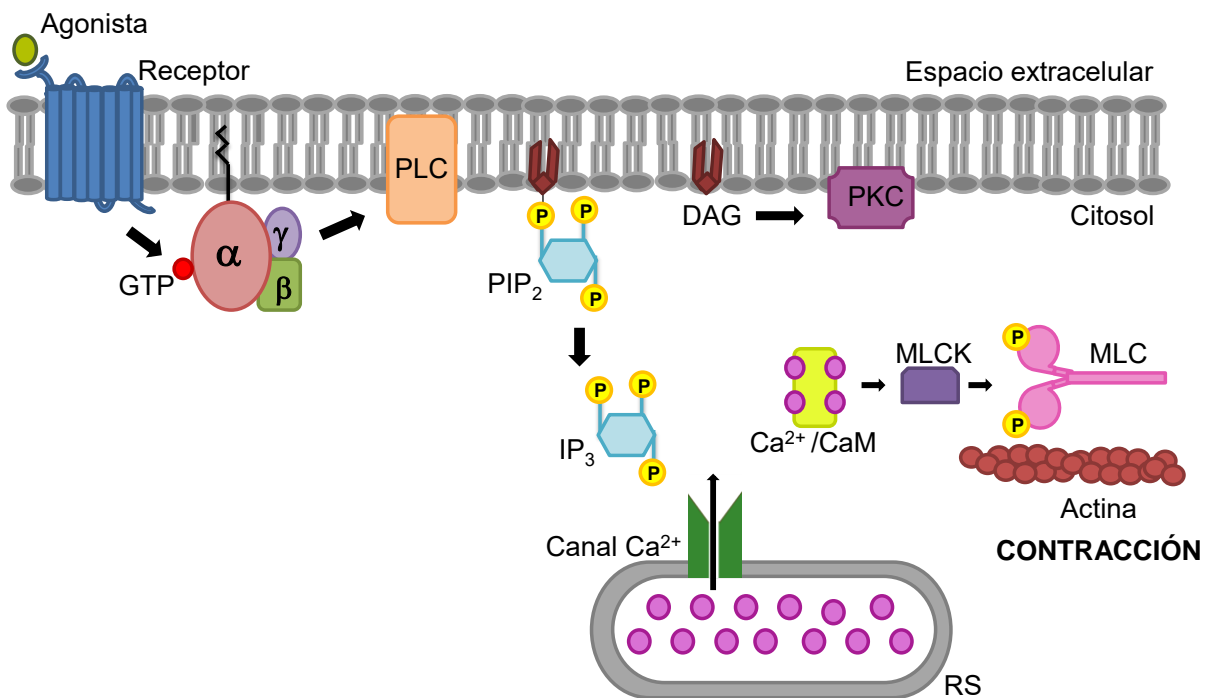
La familia de las proteínas  $G_{\alpha}$  involucra la activación de la adenilato ciclasa (AC). Se reconocen dos principales GPCRs dentro de esta familia:  $G_s$  y  $G_{olf}$ . Las proteínas  $G_s$

estimulan a las proteínas efectoras adenilato ciclasa (AC) y la guanilato ciclasa (GC) que catalizan la conversión de ATP en adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y guanosín 3' 5' monofosfato cíclico (GMPc), respectivamente. El AMPc y GMPc son segundos mensajeros que activan las cinasas PKA (proteína cinasa A) y PKG (proteína cinasa G) las cuales fosforilan a proteínas en sus residuos de serina y treonina induciendo la vasodilatación. Las proteínas **G<sub>olf</sub>** se expresan en neuronas sensoriales olfativas, en los ganglios basales y en el hipocampo, por lo que su principal efecto está asociado a la activación de la AC en el sistema nervioso central (SNC) (30). La familia de las proteínas **G<sub>i</sub>** inhibe la AC lo que induce la vasoconstricción (29, 31).

Las proteínas **G<sub>12/13</sub>** son la familia menos caracterizada. Sin embargo, se ha reconocido su participación en procesos de proliferación y morfología celular, así como en la formación de fibras de estrés y adhesión focal. La mayoría de estos procesos son mediados a través de la interacción con factores intercambiadores de nucleótidos de guanina Rho (RhoGEFs) (30).

Las proteínas **G<sub>q/11</sub>** activan la vía de recambio de fosfoinosítidos/calcio. En esta vía, la activación del receptor estimula la actividad de la PLC que cataliza la formación de segundos mensajeros a partir del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) que se encuentra en la membrana celular, los segundos mensajeros son: el inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y el diacilglicerol (DAG). El DAG permanece anclado a la membrana plasmática. El IP<sub>3</sub> es una molécula soluble la cual difunde por el citoplasma y se une al receptor del IP<sub>3</sub> lo que induce la apertura de los receptores ionotrópicos de Ca<sup>2+</sup> en el retículo sarcoplásmico (RS) y permite la liberación de Ca<sup>2+</sup> hacia el citosol. El Ca<sup>2+</sup> se libera rápidamente siguiendo su gradiente de concentración. Por otra parte el Ca<sup>2+</sup> también se une al DAG en la membrana plasmática para activar a la PKC. La PKC fosforila proteínas en residuos de serina y treonina y produce diversos efectos fisiológicos. Así mismo, el Ca<sup>2+</sup> se une a una proteína intracelular la calmodulina (CaM), formando el complejo Ca<sup>2+</sup>/CaM. Este complejo activa la cinasa de la cadena ligera de miosina (*MLCK*, *myosin light chain kinase*) la cual fosforila a la serina en la posición 19 de la cadena ligera de la miosina (MLC, *myosin light chain*) de 20 kDA (32). Esta fosforilación permite la interacción de los filamentos de actina y miosina, dando lugar a la contracción en el músculo liso (10, 15, 24, 26) (**Fig 2**).





**Figura 2.** Vía de señalización de la contracción del músculo liso vascular. Al unirse el agonista al receptor transmembranal induce el intercambio de GDP por GTP en la subunidad  $\alpha$  de la proteína G. Con este intercambio la subunidad  $\alpha$  se encuentra activa y se disocia del complejo  $\beta\gamma$ . La subunidad  $\alpha$  activa la PLC que hidroliza el PIP<sub>2</sub> anclado a la membrana. Los segundos mensajeros resultantes de esta hidrólisis son el diacilglicerol (DAG) y el inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>). El DAG se mantiene anclado a la membrana mientras que el IP<sub>3</sub> difunde en el citosol hasta llegar a los receptores de IP<sub>3</sub> que activan canales de Ca<sup>2+</sup> del RS. Una vez activados los canales de Ca<sup>2+</sup>, inducen la liberación de Ca<sup>2+</sup> hacia el citosol. En el citosol el Ca<sup>2+</sup> se une a los cuatro sitios activos con la proteína CaM formando el complejo Ca<sup>2+</sup>/CaM. Este complejo activa la MLCK la cual fosforila la MLC para iniciar el ciclo de los puentes cruzados con los filamentos de actina produciendo la contracción.

### Sistema adrenérgico en el músculo liso vascular

El sistema adrenérgico conformado por las catecolaminas (CA) y los receptores adrenérgicos tiene una importante participación en el MLV. Este sistema es determinante en la regulación del tono vascular por medio de mecanismos de contracción y relajación, los cuales permiten mantener un adecuado control del flujo sanguíneo y, por lo tanto, de la presión arterial. Las vías de señalización implicadas en este sistema han sido importantes objetos de estudio durante muchas décadas. En la actualidad el sistema adrenérgico es blanco de varios fármacos que son utilizados clínicamente para modificar la presión sanguínea (33). En condiciones fisiológicas existen tres compuestos de CA estos son: la dopamina (DA), la noradrenalina (NA) y la adrenalina (A). Las CA son derivados del catecol (anillo bencénico con dos grupos hidroxilo adyacentes en la posición 3 y 4) con una cadena lateral que lleva un grupo

amino. La síntesis de las CA se produce en la médula de la glándula adrenal y en las neuronas postganglionares del sistema nervioso simpático. El precursor de las CA es el aminoácido tirosina (34).

Los receptores adrenérgicos o adrenoreceptores (AR) son proteínas transmembranales que se localizan en tejidos neurales y no neurales. Alquist (1948) estableció la clasificación de los receptores en los tipos  $\alpha$  y  $\beta$  en función de las respuestas de excitación e inhibición, respectivamente (35). En la década de los años sesenta, Lands y colaboradores (1966) establecieron la división de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en los subtipos  $\beta_1$  y  $\beta_2$  (36). Posteriormente, Langer (1974) propuso la clasificación de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos en los subtipos  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  de acuerdo con su localización en las neuronas, pre-sináptica o postsináptica (37). Sin embargo, pronto se demostró que los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  están regulando funciones de excitación e inhibición y que los subtipos de ambos se encuentran en posición pre y postsináptica, por lo que dichas clasificaciones resultaban inadecuadas (38). En diversos estudios se ha demostrado, mediante el uso de agonistas y antagonistas adrenérgicos, la localización y funcionalidad de los receptores adrenérgicos (38-40). En particular, en vasos sanguíneos se ha demostrado la localización de estos receptores mediante el uso de diversos fármacos que mimetizan o bloquean su actividad, así como por estudios de unión a radioligandos y técnicas moleculares (41, 42).

En la actualidad se han descrito dos tipos de receptores adrenérgicos:  $\alpha$  y  $\beta$  los cuales comprenden nueve subtipos en total. Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G.

La clasificación más reciente elaborada por la IUPHAR (*International Union of Basic and Clinical Pharmacology*) y los mecanismos de transducción por los que actúan cada uno de los receptores se muestran en el **Cuadro 1**.

**Cuadro 1.** Clasificación de receptores adrenérgicos y mecanismos de transducción.

Receptor	Subtipo	Mecanismo de transducción
$\alpha$	$\alpha_{1A}$	$G_q/G_{11} \uparrow IP_3/DAG$
	$\alpha_{1B}$	
	$\alpha_{1D}$	
	$\alpha_{2A}$	$G_i/G_o \downarrow AMPc$
	$\alpha_{2B}$	
	$\alpha_{2C}$	
$\beta$	$\beta_1$	$G_s \uparrow AMPc$
	$\beta_2$	
	$\beta_3$	

Fuente: International Union of Basic and Clinical Pharmacology (IUPHAR), 2015.

En el SC los receptores adrenérgicos tienen una participación muy importante en la regulación de la contracción del MLV y por ende, el control del flujo sanguíneo el cual determina la presión sanguínea.

Los receptores adrenérgicos se han clasificado en dos subtipos  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ . Regulan la vasoconstricción mediante la activación de la proteína  $G_q/G_{11}$  y  $G_i/G_o$  respectivamente. La familia de los receptores  $\alpha_1$  se ha dividido en tres subtipos:  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  y  $\alpha_{1D}$ . Estos tres subtipos también son conocidos como  $\alpha_{1H}$  debido a su alta afinidad por el antagonista prazosin, con excepción de una variante del receptor  $\alpha_{1A}$  que presenta menor afinidad por lo que se conoce como receptor adrenérgico  $\alpha_{1L}$ . Los AR  $\alpha_1$  son reconocidos por regular la contracción del MLV ( $\alpha_{1A}$  y  $\alpha_{1D}$ ). Mediante técnicas farmacológicas se ha demostrado la funcionalidad de los receptores  $\alpha$  adrenérgicos en la regulación de la vasoconstricción en las arterias: aorta, carótida, mesentérica, iliaca y femoral (42). Así mismo, la expresión de estos receptores se ha evaluado de manera importante mediante técnicas de unión a radioligando y anticuerpos (39, 41). En arterias de rata se ha demostrado la expresión de los tres subtipos de receptores  $\alpha_1$  a nivel de

RNA mensajero (42). La distribución de los diferentes subtipos de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos no es homogénea, en la respuesta de contracción observada en la aorta de torácica de la rata y el ratón está mediada principalmente por los  $\alpha_1$ , mientras en la aorta de conejo es modulada por los receptores  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ , y  $\alpha_{1D}$  (43).

Los receptores  $\beta$ -adrenérgicos han sido identificados en el MLV de diversos vasos sanguíneos. Se encuentran acoplados a la proteína  $G_s$  regulando la vasodilatación inducida por las CA, a través de la liberación del segundo mensajero AMPc. Además, se ha reportado que en algunos vasos sanguíneos los  $\beta$ -AR también participan en la respuesta de vasodilatación mediante la liberación de óxido nítrico (43). Existe una gran homología estructural en la secuencia de aminoácidos de los subtipos  $\beta_1$  y  $\beta_2$ . Aunque ambos son activados por las CA, los  $\beta_2$  presentan mayor afinidad por la NA, mientras los  $\beta_1$  presentan mayor afinidad por la A (40, 44, 45). Los receptores  $\beta_3$ -AR se encuentran principalmente en los adipocitos regulando procesos de termogénesis y en los cardiomiocitos favoreciendo la fosforilación de canales de  $Ca^{2+}$  (45).

La densidad de los  $\beta$ -AR varía dependiendo del vaso sanguíneo, sin embargo, en condiciones fisiológicas normales, se ha demostrado que el receptor  $\beta_2$  predomina en el ML de la aorta de rata (40).

## **La serotonina en el músculo liso vascular**

El sistema adrenérgico es de primordial importancia en la regulación del tono vascular, no obstante, se han evaluado otros sistemas que mediante la integración de múltiples mecanismos modulan el tono vascular. La participación de la serotonina en el SC es ampliamente reconocida (44).

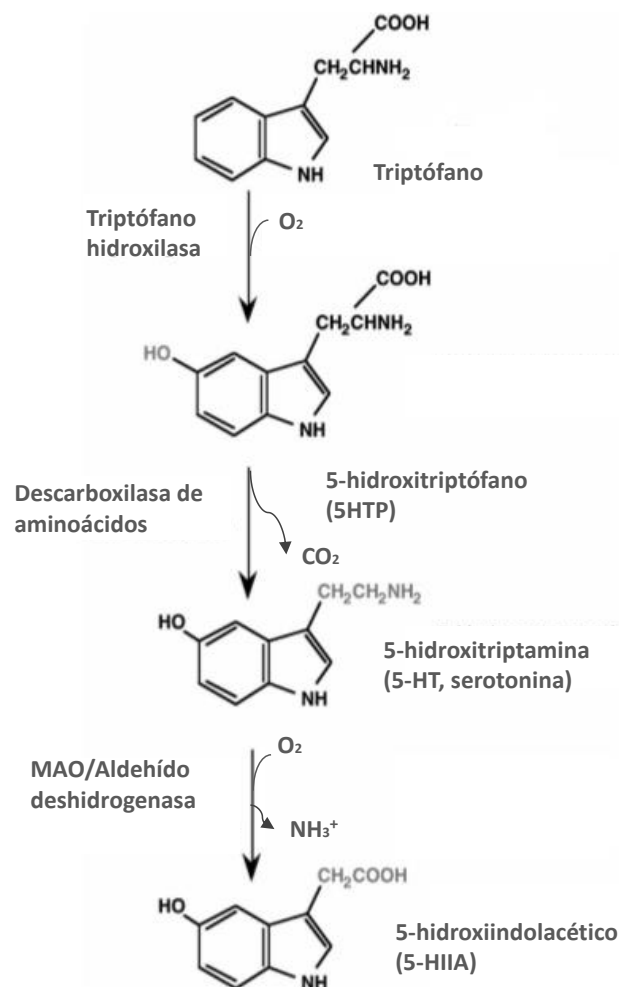
Serotonina es el nombre común del compuesto 5-hidroxitriptamina (5-HT). Los primeros indicios de la existencia de la 5-HT se tuvieron a mediados del siglo XIX. De forma destacada la 5-HT participa en la regulación de la vasoconstricción y vasodilatación y en algunas fisiopatologías como la bradicardia, taquicardia, hipotensión e hipertensión (46).

Las primeras publicaciones describieron que la sangre contenía una sustancia que provoca vasoconstricción y que la administración de suero a diferentes animales provocaba el aumento de la frecuencia cardiaca y respiratoria e incremento en la actividad peristáltica del intestino. Vialli y Erspamer (1933) aislaron una sustancia de las células enterocromafines del intestino denominándola enteramina. A finales de la década de los cuarentas en Estados Unidos, Page en colaboración con Green y Rapport identificaron una sustancia vasoconstrictora a la cual denominaron serotonina. Posteriormente, detallaron diferentes métodos químicos para realizar su extracción, caracterización y síntesis, determinaron su estructura química e identificándola como 5-hidroxitriptamina (5-HT). Pocos años después se reconoció que otra molécula que promovía vasoconstricción llamada enteramina, tenían la misma identidad química que la serotonina. Por lo que conservó el nombre de serotonina (24, 46-48).

La 5-HT es clasificada como una monoamina biogénica, posee un grupo amino ( $\text{NH}_2$ ) y un anillo indol, tiene un peso molecular de 176 Da (24, 48).

La mayor síntesis de la 5-HT tiene lugar en el tracto gastrointestinal dentro de las células enterocromafines, y en SNC en las neuronas serotoninérgicas localizadas en los núcleos del Rafé. La 5-HT, liberada al torrente sanguíneo, es capturada y almacenada en las plaquetas y puede ser liberada durante la agregación plaquetaria. Las neuronas serotoninérgicas pueden recapturar la 5-HT por medio del transportador de serotonina (SERT), almacenarla y metabolizarla (12, 47-50).

La 5-HT es sintetizada a partir del aminoácido esencial L-triptófano que es obtenido de la dieta. La triptófano hidroxilasa (TPH) es la enzima limitante de la síntesis de la 5-HT, y oxida al triptófano en el carbono cinco del anillo indólico, dando lugar al 5-hidroxitriptófano (5-HTP). Existen dos tipos de TPH, la TPH-1 y la TPH-2, las cuales están asociadas a tejidos periféricos y tejidos neuronales, respectivamente. La activación de la TPH requiere de dos cofactores que son el oxígeno molecular y la tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>). El 5-HTP es descarboxilado por la descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos y de esta manera se forma la 5-HT que es almacenada en estructuras vesiculares para protegerse de la acción de la enzima que la degrada. La degradación metabólica de la 5-HT se lleva a cabo por la monoaminoxidasa de tipo A (MAO-A), realizando una desaminación oxidativa y dando como resultado la formación de 5-hidroxiindol-acetaldehído (5-HIAC). El 5-HIAC es metabolizado por la enzima aldehído-deshidrogenasa formando el 5-hidroxiindolacético (5-HIIA) (47, 51, 52).



**Figura 3.** Síntesis y metabolismo de la 5-HT. (Tomado y modificado de Watts, 2008.)

En el SNC, la 5-HT ha sido descrita como uno de los principales neurotransmisores que participa en diversos procesos fisiológicos, patológicos y desórdenes conductuales. En tejidos no neuronales como el tracto gastrointestinal (GI) y el sistema cardiovascular (SC) se han descrito respuestas fisiológicas de la 5-HT con efectos tanto inhibidores como excitadores. En la última década, se ha determinado que las respuestas biológicas y farmacológicas tan complejas de la 5-HT son debido a la gran variedad de receptores que existen (53).

En la actualidad se han descrito siete familias de receptores de la 5-HT (5-HT<sub>1-7</sub>) que comprenden 15 subtipos. Los receptores de la 5-HT son clasificados de acuerdo con criterios operacionales, transduccionales y estructurales. Los criterios operacionales corresponden a los datos farmacológicos, los transduccionales involucran los diferentes sistemas de transducción de señales acoplados al receptor y los estructurales comprenden el conocimiento de la secuencia de los nucleótidos del receptor. Los receptores 5-HT (5-HT-R) pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. Con excepción del receptor 5-HT<sub>3</sub>, que es un receptor ionotrópico (54).

La clasificación más reciente elaborada por la IUPHAR y los mecanismos de transducción por los que actúan cada uno de los receptores se muestran en el **Cuadro 2**.

**Cuadro 2.** Clasificación de receptores 5-HT y mecanismos de transducción.

Receptor	Subtipo	Mecanismo de transducción
5-HT <sub>1</sub>	5-HT <sub>1A</sub> 5-HT <sub>1B</sub> 5-HT <sub>1D</sub> 5-ht1e 5-HT <sub>1F</sub>	G <sub>i</sub> /G <sub>0</sub> ↓AMPc
5-HT <sub>2</sub>	5-HT <sub>2A</sub> 5-HT <sub>2B</sub> 5-HT <sub>2C</sub>	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> ↑IP3/DAG
5-HT <sub>3</sub>	5-HT <sub>3AB</sub> 5-HT <sub>3A</sub>	Canal iónico (Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> )
5-HT <sub>4</sub>		G <sub>s</sub> ↑AMPc
5-HT <sub>5</sub>	5-ht <sub>5a</sub> 5-ht <sub>5b</sub>	G <sub>i</sub> /G <sub>0</sub> ↓AMPc No identificado
5-HT <sub>6</sub>		G <sub>s</sub> ↑AMPc
5-HT <sub>7</sub>		G <sub>s</sub> ↑AMPc

Fuente: *International Union of Basic and Clinical Pharmacology (IUPHAR)*, 2015.

La 5-HT fue descubierta inicialmente como un agente vasoconstrictor en el sistema cardiovascular, por lo que su función en este sistema ha sido ampliamente estudiada. Diversos estudios realizados desde la década de los noventa hasta la actualidad indican que la 5-HT en vasos sanguíneos causa predominantemente constricción a través de los receptores: 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub> y 5-HT<sub>5</sub>, mientras que por el contrario el 5-HT<sub>7</sub> regula respuestas de relajación. El avance en el estudio de los receptores serotoninérgicos ha sido facilitado por el desarrollo de agonistas y antagonistas selectivos, así como por técnicas de farmacología en las que se han empleado. La ketanserina (KT) es un antagonista 5-HT<sub>2A</sub>, el cual se observó que ocasionaba una importante disminución de la presión sanguínea (48). La influencia de



la KT sobre la presión sanguínea generó un gran interés sobre el potencial de la 5-HT en el sistema cardiovascular, en particular sobre la actividad del receptor 5-HT<sub>2A</sub>. Diversos grupos de investigación han evaluado mediante técnicas farmacológicas y moleculares la actividad del receptor 5-HT<sub>2A</sub> en preparaciones de diferentes tipos de músculo liso incluido el vascular (55-57). Se ha determinado que en las arterias el receptor serotoninérgico que predomina en la respuesta de contracción es el 5-HT<sub>2A</sub>, activando la vía de recambio de fosfoinosítidos/calcio. Su sobreexpresión y aumento en su función producen mayores contracciones en patologías como la hipertensión (58).

### **Interacción de los sistemas serotoninérgico y adrenérgico**

Hemos descrito, de manera independiente, la participación de los sistemas serotoninérgicos y adrenérgicos en los mecanismos de contracción y relajación del MLV. No obstante, son escasos los estudios que sugieren la participación conjunta de estos sistemas en la regulación del tono vascular.

Uno de los trabajos pioneros en evaluar la posible relación entre la 5-HT y los AR fue realizado por Kawasaki y col., (1983). Este grupo de investigación mostró que la 5-HT puede ser almacenada dentro de vesículas adrenérgicas de las terminales nerviosas, y que su liberación, por estimulación del nervio periarterial de rata, puede contribuir en el mantenimiento del tono vascular local (59).

En el 2000, Watts y col., demostraron que la contracción a NA en la arteria caudal de rata era potenciada por una concentración umbral de 5-HT (60). Por otra parte, Jantschak y col., (2010) evaluaron la actividad de UK14304, un agonista  $\alpha_2$  adrenérgico, en la arteria caudal de rata y determinaron que la preestimulación con 5-HT aumentaba la contracción de la arteria inducida por UK14304 (14).

En otro trabajo, se determinó la actividad del antagonista no selectivo  $\beta$  adrenérgico, bucindolol. Este compuesto puede bloquear tanto los receptores  $\alpha_1$ -AR, como los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>2B</sub> en aorta torácica de rata (60).

Watts y col., (2012) reconocen la recíproca contribución fisiológica de la 5-HT y la NA en la potenciación de las respuestas contráctiles en las arterias; así como, la actividad indistinta de los transportadores (SERT y NET, respectivamente) en la recaptura presináptica (56).

Por otra parte, en el SNC mediante estudios realizados en membranas corticales de cerebro se determinó la influencia de la 5-HT sobre la cinética de unión del agonista  $\alpha_1$ : prazosin. Se observó que la 5-HT induce cambios en los parámetros de unión y en la interacción del ligando-receptor, sugiriendo la homo y heterodimerización como un proceso involucrado en la interacción de los receptores serotoninérgicos y adrenérgicos (86).

Debido al amplio reconocimiento de la participación de los sistemas serotoninérgico y adrenérgico en la regulación del tono del MLV, y el escaso conocimiento de su posible interacción fisiológica, nos propusimos estudiar esta interacción y generar nuevo conocimiento que nos ayude a comprender de una manera integral los mecanismos de contracción del MLV.

---

## JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) constituyen la principal causa de mortalidad y morbilidad en el mundo, siendo responsables de 17.5 millones de fallecimientos, lo que representa hasta el 31% de la población. Las ECV incluyen una serie de alteraciones que afectan las estructuras cardíacas y vasculares, tales como válvulas cardíacas, músculo cardíaco y enfermedades de las arterias, en particular de la aorta (61).

En la fisiología y patología del SC la participación del sistema adrenérgico es ampliamente reconocida. Existe una amplia evidencia clínica y experimental sobre el papel de receptores  $\alpha$ - y  $\beta$ -adrenérgicos en el SC. Desde 1970, los agonistas y antagonistas de los receptores adrenérgicos han sido utilizados como tratamientos terapéuticos para las ECV.

Si bien los receptores adrenérgicos son muy importantes en la regulación de la contracción de la aorta, diversos estudios han mostrado que la 5-HT también está involucrada en las respuestas fisiológicas que modulan el tono vascular, siendo reconocida su participación en la vasoconstricción a través del receptor 5-HT<sub>2A</sub>. En un estudio previo realizado en aorta aislada de cobayo se observó que al bloquear el receptor 5-HT<sub>2A</sub> con el antagonista ketanserina (KT, 0.01  $\mu$ M) la respuesta de contracción inducida por 5-HT (100  $\mu$ M) se mantiene durante 15 minutos, lo que sugiere la interacción de la serotonina con otros sistemas que promueven la vasoconstricción (62).

La identificación y el estudio de la interacción del sistema adrenérgico y serotoninérgico son de gran relevancia en el entendimiento del control del tono vascular. Además, existe un amplio interés clínico sobre la actividad de los agonistas y antagonistas adrenérgicos debido a sus efectos principales en el SC. No obstante, hasta este momento no se ha descrito de manera amplia la posible interacción entre ambos sistemas de señalización. Por lo anteriormente descrito, se plantea la pregunta de investigación:

**¿Existe una participación de los receptores  $\alpha$ - y  $\beta$ -adrenérgicos en la contracción inducida por serotonina en la aorta torácica de cobayo y cómo se modifica la  $[Ca^{2+}]_i$ ?**

## **HIPÓTESIS**

La actividad de los receptores adrenérgicos aumenta la contracción inducida por serotonina en la aorta aislada de cobayo, modulada por la  $[Ca^{2+}]_i$ .

## OBJETIVOS

### Objetivo General

- Evaluar farmacológicamente la participación de los receptores adrenérgicos involucrados en la respuesta de contracción inducida por 5-HT.
- Evaluar la  $[Ca^{2+}]_i$  en la contracción inducida por 5-HT al bloquear los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos.

### Objetivos Específicos

#### 1. Estudios farmacológicos en órganos aislados *in vitro*:

- Determinar farmacológicamente la participación de los receptores adrenérgicos en la respuesta de contracción, mediante el uso de agonistas y antagonistas de los receptores adrenérgicos de acuerdo al cuadro 3:

**Cuadro 3. Agonistas y antagonistas serotoninérgicos y adrenérgicos utilizados en el estudio**

Receptor	Agonista	Antagonista
$\alpha$	Fenilefrina (FE)	Prazosin (PZ)
$\beta$	Isoproterenol (ISO)	Propranolol (PR)
5-HT	Serotonina (5-HT)	Ketanserina 5-HT <sub>2A</sub>

- Evaluar la respuesta de contracción de la aorta inducida por 5-HT y cómo se modifica con la preincubación de antagonistas de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos y  $\beta$ -adrenérgicos.

#### 2. Estudios de mediciones simultáneas Contracción- $[Ca^{2+}]_i$

- Evaluar la  $[Ca^{2+}]_i$  por la contracción inducida por la 5-HT (320  $\mu$ M).
- Evaluar la  $[Ca^{2+}]_i$  en la contracción inducida por 5-HT (320  $\mu$ M) y cómo se modifica con la preincubación del antagonista de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos.

---

## MATERIAL Y MÉTODO

### Animales de estudio

Se usaron cobayos machos de la cepa Hartley con peso aproximado de 400 g, procedentes del Bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER), criados en condiciones convencionales de bioterio (aire acondicionado filtrado,  $21\pm 1^\circ\text{C}$ , con un 50-70% de humedad, en cama estéril) con acceso a agua y alimento *ad libitum* con un ciclo de luz y oscuridad de 12-12 horas.

Se ha reportado que el uso de los cobayos de la cepa Hartley en estudios de mecanismos celulares y moleculares proporcionan mejores resultados al compararlos con otros modelos de roedores (63). El cuidado y trato de los animales se hizo de acuerdo a las recomendaciones internacionales y a lo establecido en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación y la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. *Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio*. Los cobayos machos de la cepa Hartley estuvieron bajo cuidados del personal capacitado en las instalaciones del bioterio del INER. Se evitó prolongar la permanencia innecesaria de los animales en el bioterio.

### Sistema de órganos aislados *in vitro*

En los estudios *in vitro*, se evaluó la contracción de la aorta inducida por 5-HT y la actividad de los receptores adrenérgicos mediante el uso de agonistas y antagonistas (mencionados previamente en el cuadro 3).

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (PiSA® Agropecuaria) ( $35 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ) vía intraperitoneal. El bloque cardiopulmonar fue removido y posteriormente se disecó la aorta, retirando con cuidado el tejido conectivo. De cada aorta se obtuvieron cuatro anillos (3-4 mm de longitud), cada anillo de la aorta fue colocado en un vaso de órganos aislados que contenía 5 ml de solución Ringer-Krebs-Bicarbonato (RKB). La solución RKB tuvo la siguiente composición (mM): NaCl 120, KCl 4.77,  $\text{KH}_2\text{PO}_2$  1.2,  $\text{MgSO}_4$  1.2,  $\text{NaHCO}_3$  25,  $\text{CaCl}_2$  2.5 y glucosa 11, y se mantuvo a  $37^\circ\text{C}$  con burbujeo constante de una mezcla de 5%  $\text{CO}_2$  y 95%  $\text{O}_2$  con un  $\text{pH}=7.4$ . El anillo fue colocado entre dos ganchos insertados desde el lumen traqueal. Uno de estos ganchos se encontró acoplado a un transductor de tensión (BIOPAC Systems Inc., CA., DA 100C) para registrar la tensión isométrica. Las señales de los transductores fueron

---

digitalizadas con una interfase (BIOPAC Systems Inc., CA., MP150) y los cambios en la tensión fueron monitoreados con un software (BIOPAC Systems, AcqKnowledge 3.9.1) (**Fig. 4**)

Los anillos de la aorta se mantuvieron a una tensión inicial de 1.5 g por media hora, periodo durante el cual fueron lavados con solución RKB a intervalos de 10 minutos. Los tejidos fueron estimulados tres veces con una solución de cloruro de potasio (KCl) 80 mM para confirmar su viabilidad. El último estímulo fue considerado como el 100% de respuesta de contracción y las respuestas fueron expresadas como porcentaje de respuesta máxima de KCl (**Fig. 5**)

Posteriormente, se evaluó la respuesta de contracción inducida por 5-HT mediante curvas con dosis única (100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 0.1  $\mu$ M) (**Fig. 5**). Se evaluó el efecto de la Ketanserina (KT, antagonista 5-HT<sub>2A</sub>) (0.01  $\mu$ M) y de los siguientes fármacos adrenérgicos en la respuesta de contracción inducida por 5-HT: Prazosin (0.01  $\mu$ M, antagonista  $\alpha_1$ ) y Propranolol (10  $\mu$ M, antagonista  $\beta$ ), Fenilefrina (10  $\mu$ M, agonista  $\alpha_1$ ) e Isoproterenol (10  $\mu$ M, agonista  $\beta$ ). Los antagonistas fueron preincubados 20 min antes del estímulo con 5-HT (100  $\mu$ M). El efecto de los antagonistas en la respuesta de 5-HT se comparó con la respuesta de contracción inducida por la dosis única de 5-HT (100  $\mu$ M). Las concentraciones de los antagonistas fueron seleccionadas con base en los trabajos de: Xu, 2016; Pares 2006 y Hauzer, 2014. Debido a que la 5-HT es un compuesto químico fotosensible, todos los experimentos se realizaron en condiciones de oscuridad Todos los fármacos se adquirieron de Sigma Chemical Co.

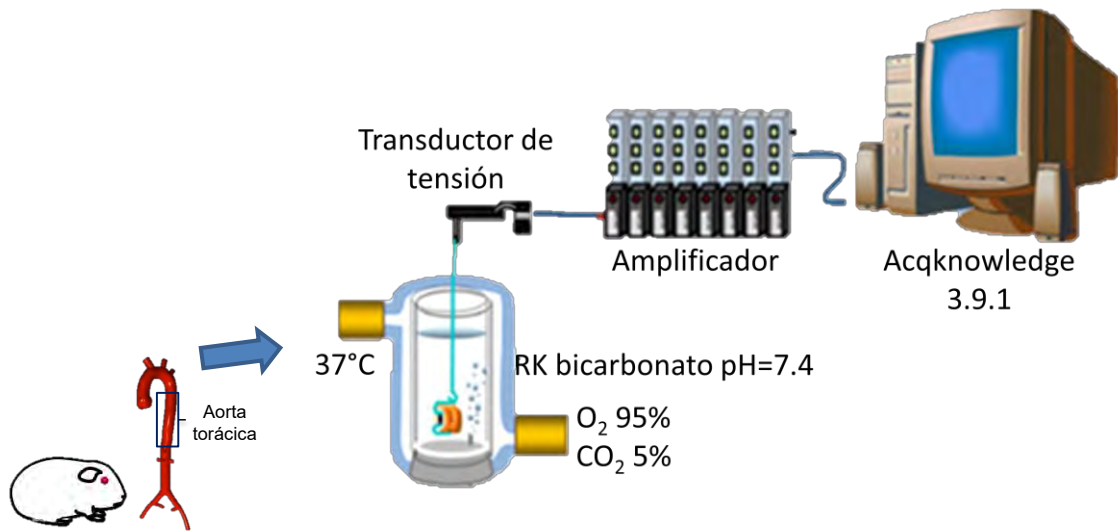


Figura 4. Esquema del sistema de órganos aislados in vitro.

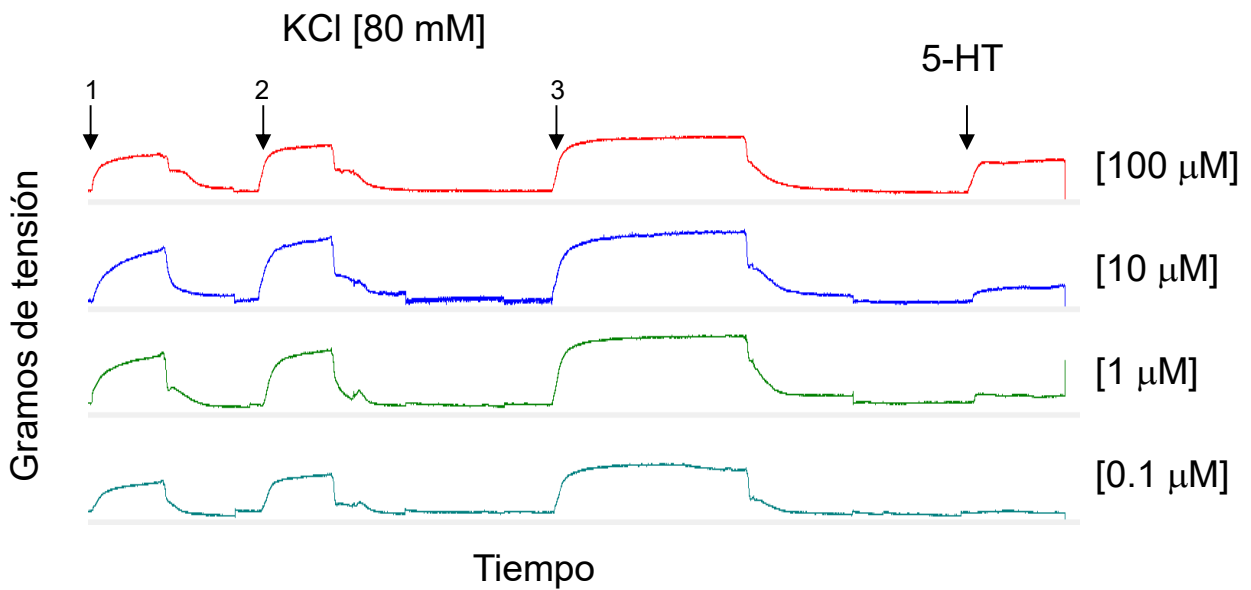
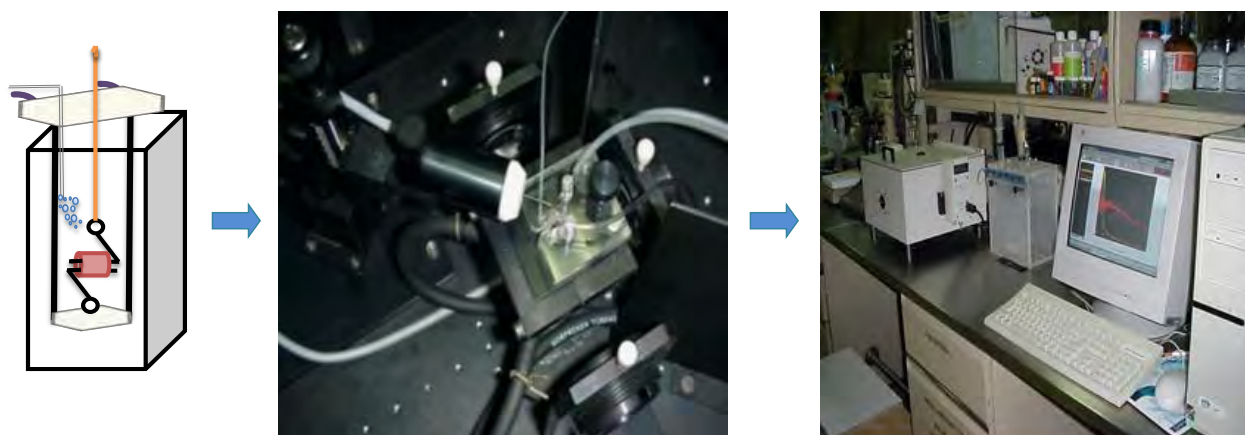


Figura 5. Registro representativo de órganos aislados in vitro. Las flechas señalan los estímulos de KCl [80 mM] y de 5-HT en diferentes concentraciones.



### Mediciones simultáneas Contracción-Ca<sup>2+</sup>i

La [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> se midió simultáneamente con la contracción muscular. Los anillos de aorta torácica (0.3 cm de longitud) se disecaron bajo un microscopio estereoscópico. Un anillo fue colocado verticalmente en una cubeta de polimetacrilato de 4 ml utilizando un adaptador especial de Photon Technology Internacional (PTI, New Jersey, E.U.A.). Esta cubeta fue llenada con una solución RKB y burbujeada con una mezcla de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de O<sub>2</sub> con un pH de 7.4 a 37°C y se colocó en el interior de un fluorómetro de PTI. El anillo de aorta se fijó al adaptador y se unió a un transductor de tensión isométrica (FSG-01, Experimentria, Budapest, Hungría) conectado a un convertidor analógico digital de PTI. Los anillos de aorta se mantuvieron en reposo durante 1h a una tensión de 1.5 g antes de iniciar los experimentos. Con el propósito de normalizar las respuestas del tejido, se estimularon dos veces con una solución de KCl (80 mM) durante 10 min hasta alcanzar la respuesta máxima. Posteriormente los tejidos se incubaron con 2 ml de una solución que contenía 20 μM de Fura 2-AM, 0.1% de Cremophor y 0.03% de ácido plurónico F-127 durante 1 h; después se lavaron con RKB tres veces para remover el Fura- 2AM del espacio extracelular. El Fura 2-AM presente en los anillos de la aorta se excitó alternadamente con luz de 340 y 380 nm de longitud de onda, y la emisión se colectó a 510 nm usando un fluorómetro de PTI. En unos experimentos considerados como controles, se les dio un primer estímulo (E<sub>1</sub>) con 5-HT 320 μM y un segundo estímulo (E<sub>2</sub>) con 5HT 320 μM fue realizado 20 min después. En otros experimentos, los tejidos fueron incubados con 0.01 μM de prazosin (antagonista α-adrenérgico) 20 min antes de E<sub>2</sub>. Los registros obtenidos fueron almacenados en una microcomputadora y analizados usando un programa de análisis y adquisición de datos (Félix v. 1.2.1) de PTI. La [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> está indicada por el cociente de la intensidad de fluorescencia en 340 y 380 nm (cociente 340/380) (**Fig. 6**).



**Figura 5.** Sistema de mediciones simultáneas de Contracción-[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>.

### **Análisis estadístico**

La contracción está representada como el porcentaje de contracción en relación con la respuesta máxima obtenida por 80 mM de KCl que representa el 100% de la contracción. El área bajo la curva se obtuvo con el método de integración trapezoidal, presentada en unidades arbitrarias. Los datos están expresados como la media  $\pm$  error estándar. Para conocer las posibles diferencias en la contracción de los anillos de aorta torácica inducida por cada antagonista adrenérgico y la serotonina, se utilizó la prueba estadística denominada *t de Student*. La significancia estadística se fijó a un nivel de  $p < 0.01$ . En las mediciones simultáneas de contracción-[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> para determinar las posibles diferencias en la contracción inducida por 5-HT y por efecto del antagonista  $\alpha$ -adrenérgico se realizó la prueba *t de Student*. La significancia estadística se fijó a un nivel de  $p < 0.05$ . El procesamiento de datos se realizó con el software INERSTAT-a v2.0 (Mario H. Vargas).

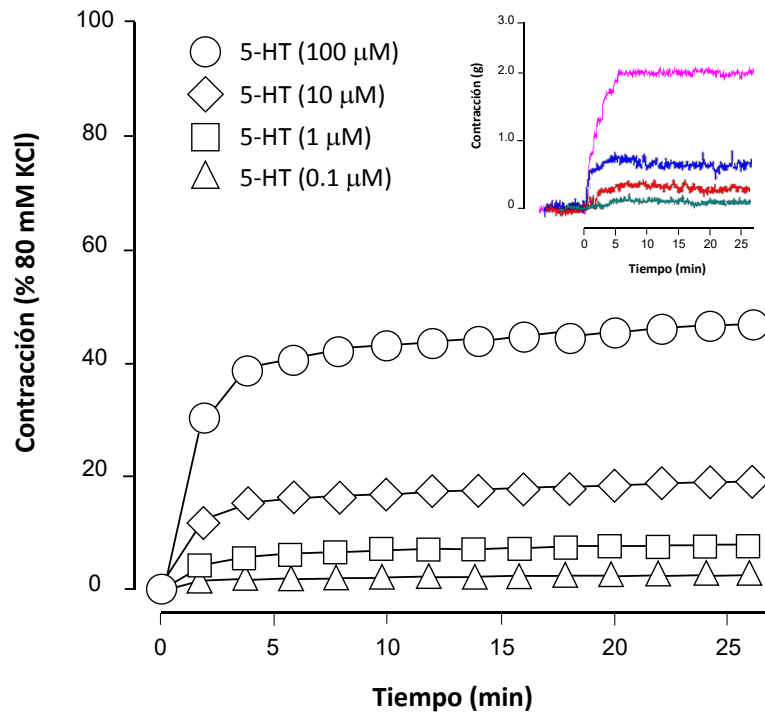
---

## RESULTADOS

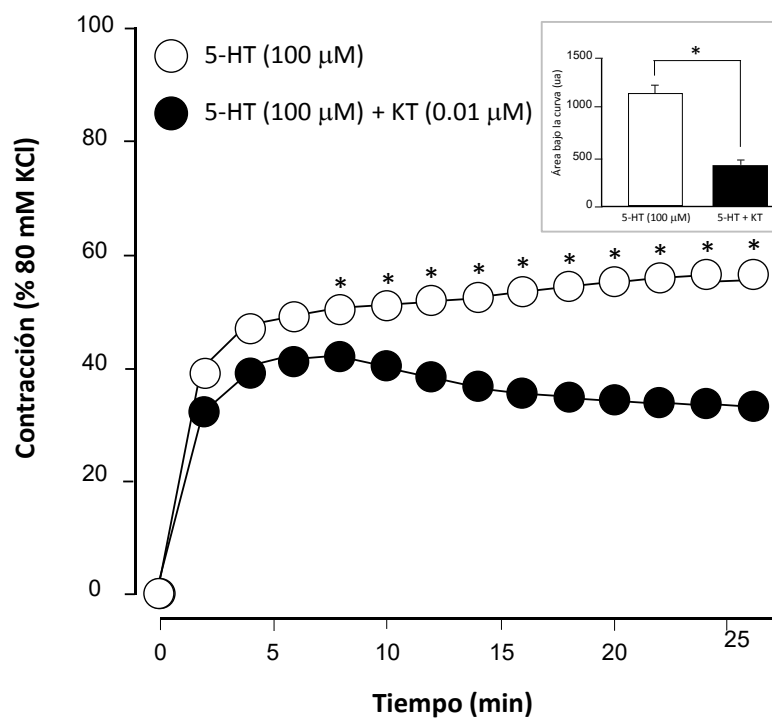
### Estudios en sistema de órganos aislados *in vitro*.

Evaluamos el efecto de la contracción inducida por concentraciones únicas de 5-HT (0.1  $\mu$ M-100  $\mu$ M) en el tejido de aorta de cobayo. La respuesta de contracción por 5-HT es una respuesta sostenida y dependiente de la concentración. La máxima contracción fue de 100  $\mu$ M de 5-HT a los 26 min (**Fig. 7**), con un valor del área bajo la curva de  $1098.613 \pm 81.36$ . Debido a que se obtuvo una máxima respuesta de contracción a la concentración de 100  $\mu$ M de 5-HT, se seleccionó esta concentración para ser utilizada en los experimentos subsecuentes en nuestro trabajo. En estos resultados no realizamos comparaciones estadísticas debido a que únicamente nos interesaba evaluar la máxima respuesta de contracción obtenida por 5-HT (100  $\mu$ M).

Para determinar la participación del receptor 5-HT<sub>2A</sub> en la contracción de la aorta inducida por 5-HT, se evaluó el efecto del antagonista específico de este receptor, la ketanserina (KT, 0.01  $\mu$ M). En la **Figura 8**, se aprecia un decremento en la respuesta de contracción por efecto de la KT, a partir del minuto ocho, obteniendo diferencias significativas ( $p < 0.01$ ). El valor máximo a los 26 min de la respuesta de contracción por 5-HT fue de  $56.68 \pm 1.4\%$ , respecto a la respuesta de KCl. Al evaluar el efecto de la KT obtuvimos una inhibición del 41.77% de la respuesta de 5-HT, que corresponde a una respuesta de contracción de  $33.01 \pm 1.27\%$  ( $p < 0.01$ ). El valor del área bajo la curva inducida por 5-HT (100  $\mu$ M) fue  $1286.34 \pm 43.61$ , mientras que por efecto de la KT fue de  $912.53 \pm 16.05$ , presentándose diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) entre ambas respuestas.



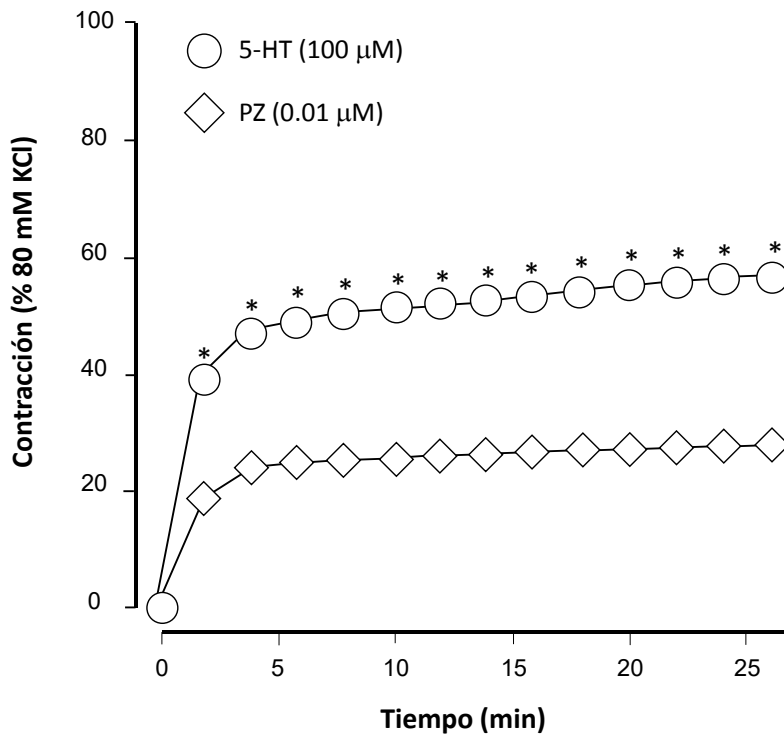
**Figura 7.** Contracción inducida por la 5-HT en anillos de aorta torácica de cobayo a concentraciones únicas de 5-HT (0.1  $\mu$ M-100  $\mu$ M). Se observa la máxima respuesta de contracción a 100  $\mu$ M. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  E.E. ( $n=6$ ). En el inset se muestra un registro representativo de la contracción inducida por concentraciones únicas de 5-HT (0.1  $\mu$ M-100  $\mu$ M).



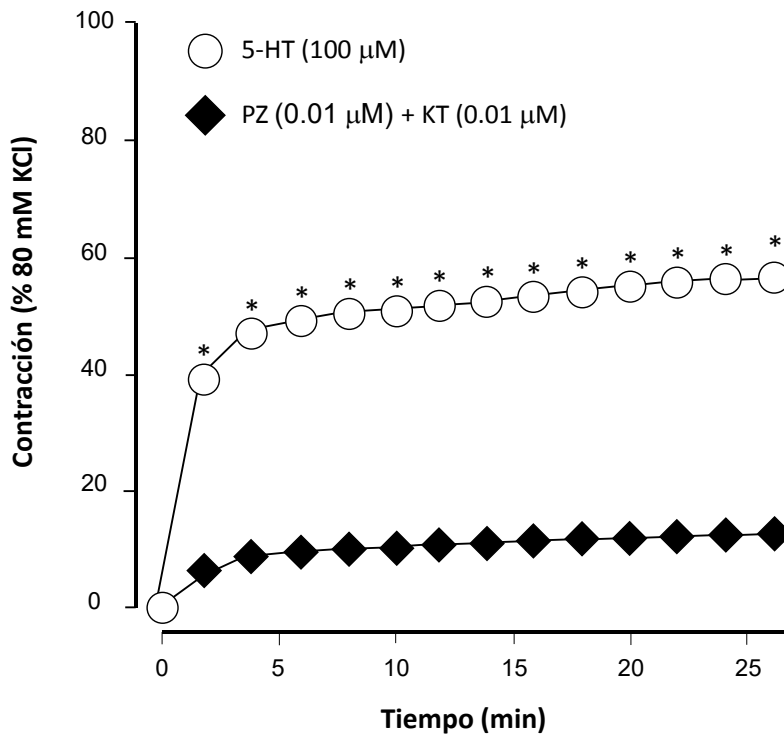
**Figura 8.** Efecto de la ketanserina (0.01  $\mu$ M) en la contracción inducida por 5-HT (100  $\mu$ M) en anillos de aorta torácica de cobayo. En el inset se muestra el área bajo la curva (unidades arbitrarias) de la respuesta de 5-HT (100  $\mu$ M) y el efecto de la KT (0.01  $\mu$ M) en la respuesta de 5-HT. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  E.E. Prueba de t de Student)  $*p<0.01$  ( $n=6$ ).

En otro grupo de experimentos, evaluamos la participación del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico en la contracción inducida por 5HT (100  $\mu$ M). En la **Figura 9**, se observa el efecto del prazosin (antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico, 0.01  $\mu$ M). El prazosin (PZ) produce un decremento en la respuesta de contracción inducida por 5-HT. El valor máximo de la respuesta de contracción de 5-HT fue  $56.68 \pm 1.4\%$  a los 26 min y por efecto de la preincubación del PZ se obtuvo un valor de  $27.97 \pm 0.95\%$  ( $p < 0.01$ ), lo que representa una inhibición de la respuesta en un 50.66%. Comparando los valores del área bajo la curva de la respuesta de 5-HT ( $1286.34 \pm 43.61$ ) y el efecto del PZ ( $647.39 \pm 23.71$ ), observamos diferencias significativas ( $p < 0.01$ ).

También evaluamos el efecto conjunto de los antagonistas a los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgico (PZ, 0.01  $\mu$ M) y el receptor 5-HT<sub>2A</sub> (KT, 0.01  $\mu$ M) en la respuesta de contracción inducida por 5-HT (100  $\mu$ M) (**Fig. 10**). Se observa que la respuesta de 5-HT se ve disminuida en un 79.17% por efecto del PZ y KT, obteniendo diferencias significativas ( $p < 0.01$ ). Considerando los valores del área bajo la curva por el efecto en conjunto del PZ y la KT se obtuvo un decremento de la respuesta ( $647.39 \pm 23.71$ ) comparado con la respuesta de 100  $\mu$ M de 5-HT ( $1286.34 \pm 43.61$ ). Se determinaron diferencias significativas ( $p < 0.01$ ).



**Figura 9.** Efecto del prazosin (antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico  $0.01 \mu\text{M}$ ), en la contracción inducida por 5-HT ( $100 \mu\text{M}$ ) en anillos de aorta torácica de cobayo. El prazosin disminuyó la contracción de 5-HT desde el inicio de la respuesta. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  E.E (t de Student)  $*p < 0.01$  ( $n=6$ ).

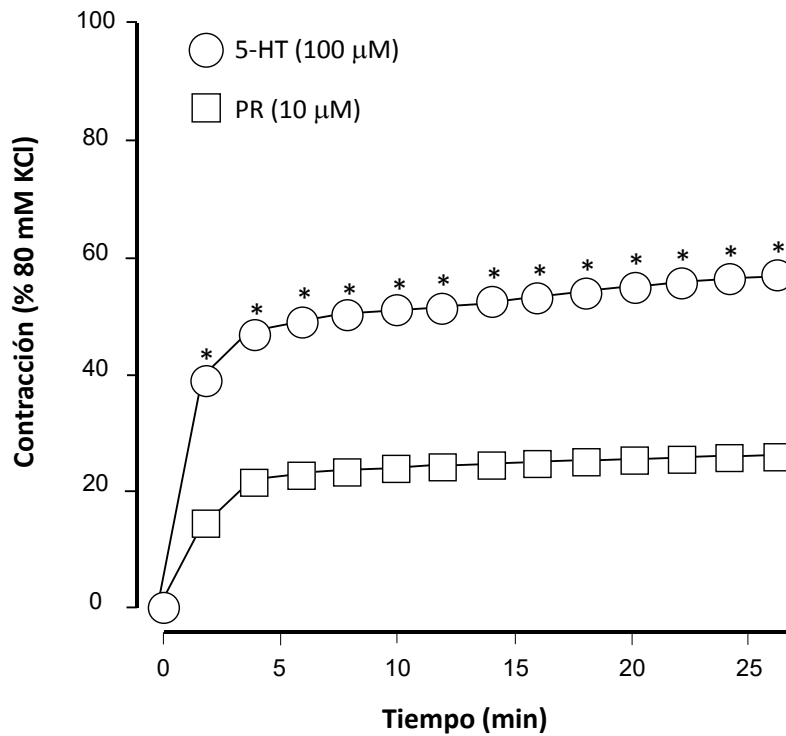


**Figura 10.** Efecto de los antagonistas prazosin ( $0.01 \mu\text{M}$ ) y KT ( $0.01 \mu\text{M}$ ) en la respuesta de contracción inducida por 5-HT en anillos de aorta torácica de cobayo. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  E.E. (t de Student)  $*p < 0.01$  ( $n=6$ ).

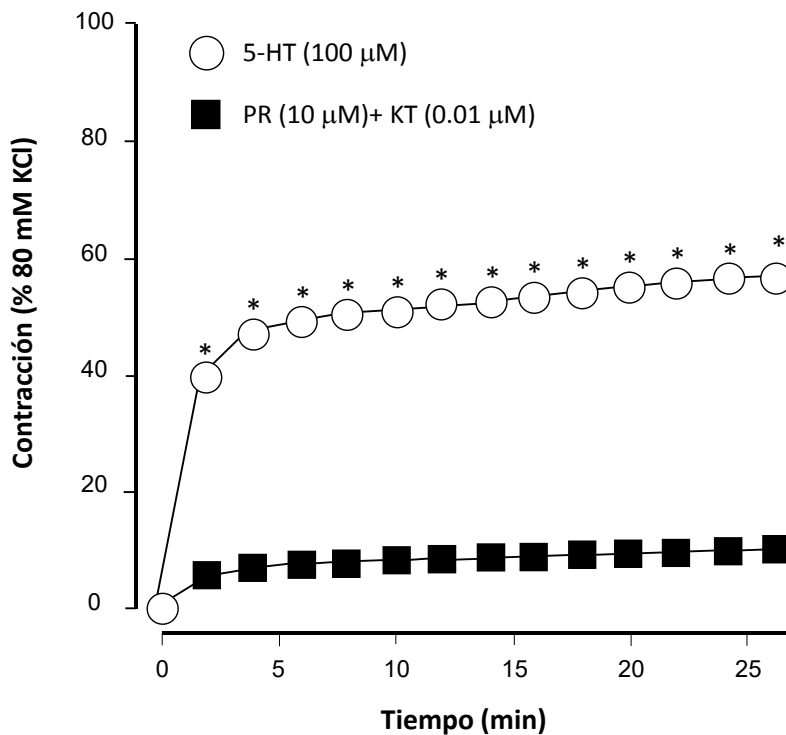
Para evaluar la participación del receptor  $\beta$ -adrenérgico en la aorta de cobayo preincubamos con propranolol (antagonista  $\beta$ -adrenérgico, PR, 10  $\mu$ M), en la respuesta de contracción inducida por 5HT (100  $\mu$ M). En la **Figura 11**, se observa la inhibición de la respuesta de contracción inducida por 5-HT por el efecto del propranolol. El antagonista  $\beta$ -adrenérgico redujo en un 54.49% el valor máximo de la respuesta de contracción de 5-HT, mostrando diferencias altamente significativas ( $p < 0.01$ ). Del mismo modo, al evaluar el área bajo la curva, también se observan diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) por el efecto del PR ( $595.47 \pm 19.04$ ), comparado con el área bajo la curva de la respuesta de 5-HT ( $1286.34 \pm 43.61$ ).

Así también, evaluamos la participación de los receptores  $\beta$ -adrenérgico y 5-HT<sub>2A</sub> en la respuesta de contracción inducida por 5-HT. En la **Figura 12**, observamos un decremento de la respuesta a 5-HT en un 83.03% por el efecto simultáneo del antagonista  $\beta$ -adrenérgico (PR, 10  $\mu$ M) y el antagonista 5-HT<sub>2A</sub> (KT 0.01  $\mu$ M), observando diferencias significativas ( $p < 0.01$ ). El valor del área bajo la curva por el efecto del PR y la KT en la respuesta de contracción de 5-HT fue de  $203.44 \pm 12.81$ , donde también se observaron diferencias significativas ( $p < 0.01$ ), comparado con el valor de 5-HT.

Es importante mencionar que en la preincubación de los antagonistas PZ, PR y K, la tensión de la aorta se mantuvo estable.



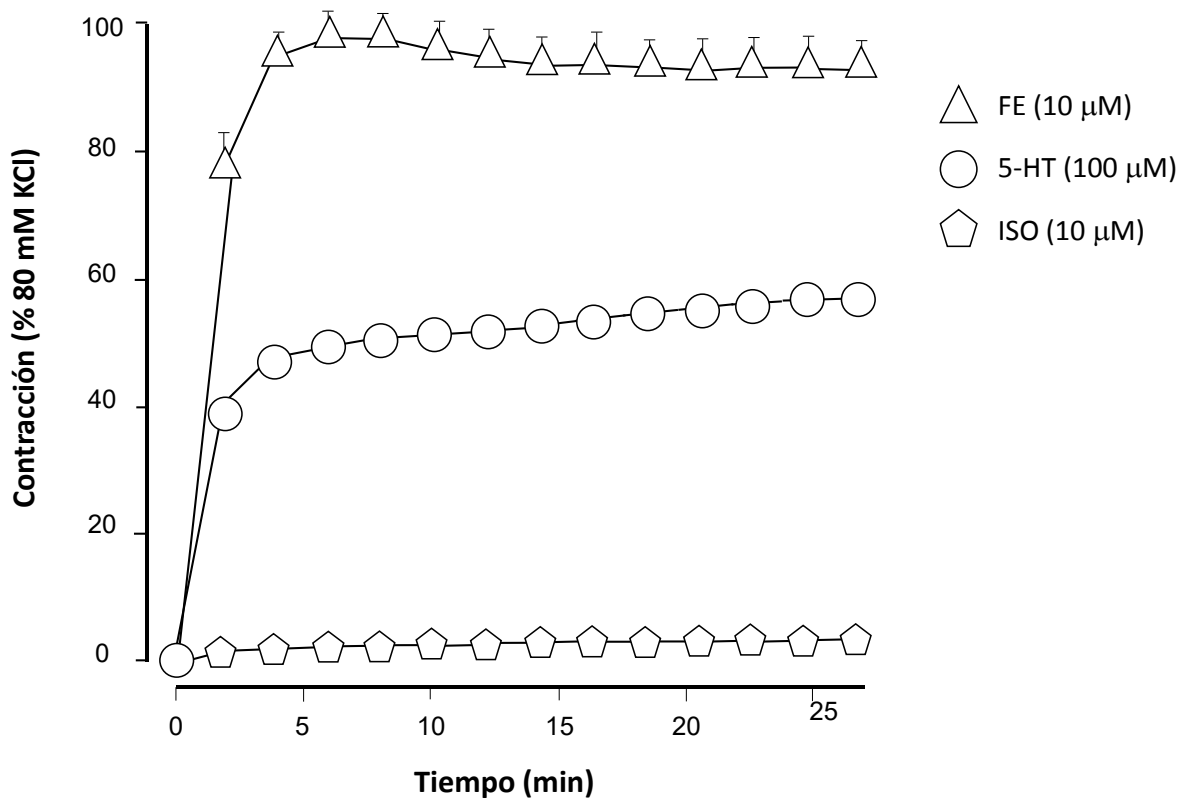
**Figura 11.** Efecto del propranolol (antagonista  $\beta$ -adrenérgico,  $10 \mu\text{M}$ ) en la contracción inducida por 5-HT ( $100 \mu\text{M}$ ) en anillos de aorta torácica de cobayo. El propranolol disminuyó la contracción de 5-HT desde el inicio de la respuesta. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  E.E. (t de Student)  $*p < 0.01$ . (n=6).



**Figura 12.** Efecto de los antagonistas  $\beta$ -adrenérgico, propranolol ( $10 \mu\text{M}$ ) y  $5\text{-HT}_{2A}$ , KT ( $0.01 \mu\text{M}$ ) en la respuesta de contracción inducida por 5-HT en anillos de aorta torácica de cobayo. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  E.E. (t de Student)  $*p < 0.01$ . (n=6).



Al comparar la actividad de contracción por los receptores  $\alpha$ -AR,  $\beta$ -AR y 5-HT, utilizamos los agonistas  $\alpha$ -AR fenilefrina (FE, 10  $\mu$ M),  $\beta$ -adrenérgico isoproterenol (ISO, 10  $\mu$ M) y 5-HT (5-HT, 100  $\mu$ M). En la **Figura 13**, observamos que el agonista  $\alpha$ -adrenérgico (FE) induce una contracción en la aorta de cobayo un valor de  $94.09 \pm 3.19\%$  cercano al valor máximo de la respuesta de KCl (80 mM). Mientras que, la acción del agonista  $\beta$ -adrenérgico (ISO) obtuvo apenas un valor de  $3.39 \pm 0.8\%$ , y mencionamos previamente que la 5-HT induce una respuesta de  $56.68 \pm 1.4\%$ . El valor máximo obtenido como área bajo la curva por efecto del agonista  $\alpha$ -adrenérgico (FE) fue de  $2355.25 \pm 59.98$ , y para el ISO se obtuvo un valor de  $35.63 \pm 1.92$ , siendo para la 5-HT el valor de  $1286.34 \pm 43.61$ .



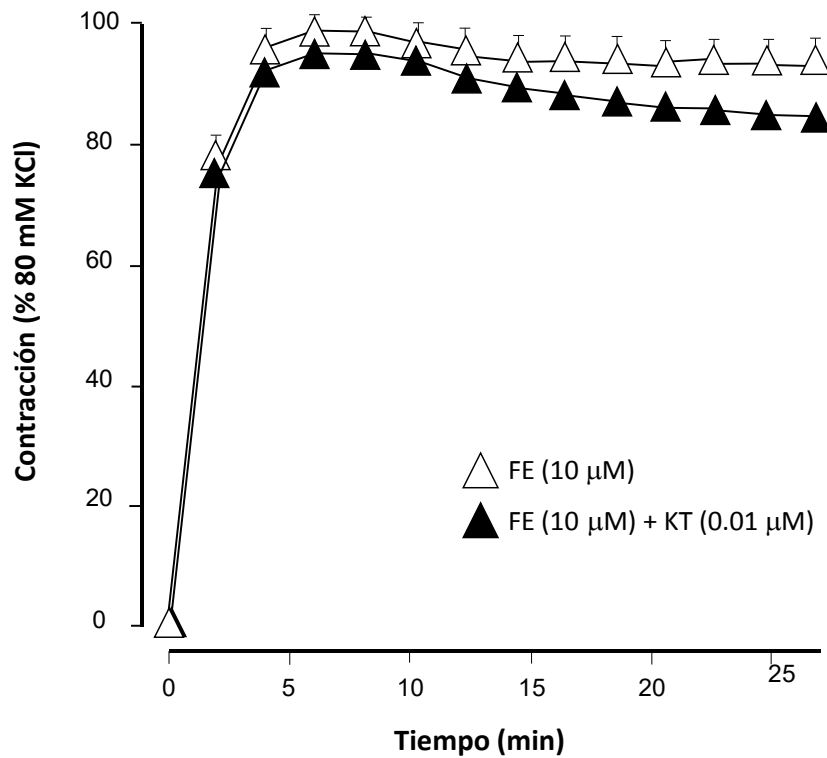
**Figura 13.** Efecto de contracción inducida por los agonistas fenilefrina (10  $\mu$ M), 5-HT (100  $\mu$ M) e isoproterenol (10  $\mu$ M) en anillos de aorta torácica de cobayo. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  E.E. (n=6).

En el **Cuadro 4**, se muestran los valores correspondientes a las respuestas de contracción y el área bajo la curva inducida por el efecto de los antagonistas en la respuesta de contracción inducida por 5-HT.

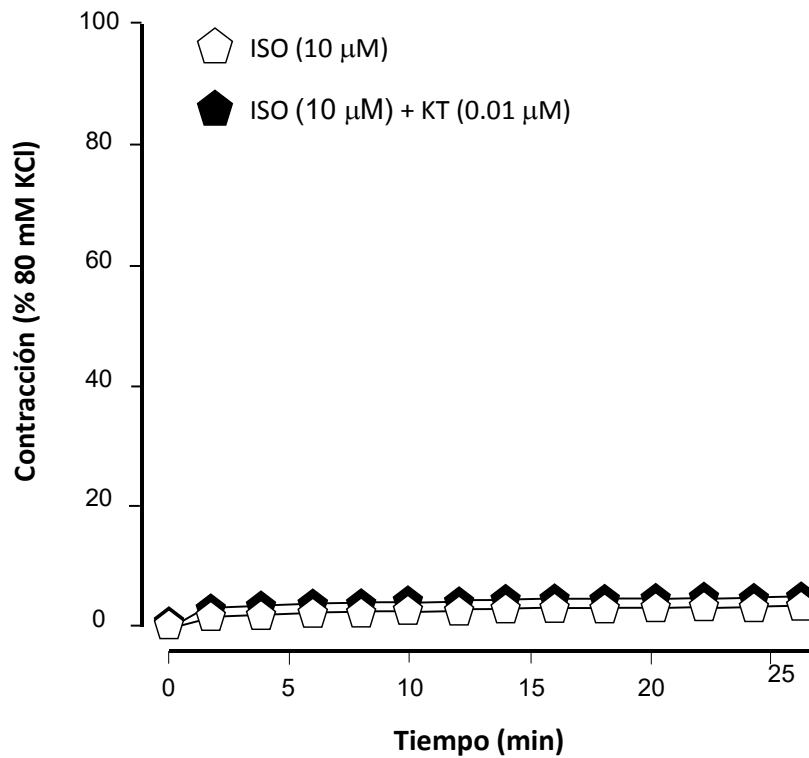
**Cuadro 4.** Respuestas de contracción (%) y área bajo la curva inducida por los antagonistas en la respuesta de 5-HT.

Respuesta	5-HT	5-HT+KT	5-HT+PZ	5-HT+PZ+KT	5-HT+PR	5-HT+PR+KT
<b>% de Contracción</b>	100%	33.01±1.27%	27.97±0.95%	11.81±0.34%	25.80±0.90%	9.62±0.55%
<b>Área bajo la curva</b>	1286.34±43.61	912.53±16.05	647.39±23.71	257.44±4.62	595.47±19.04	203.44±12.81

En otros experimentos, para determinar la posible participación del receptor 5-HT<sub>2A</sub> en la actividad de contracción por la estimulación de los receptores  $\alpha$ - y  $\beta$ -adrenérgicos en la aorta de cobayo, utilizamos el antagonista KT, 0.01  $\mu$ M. En las **Figuras 14 y 15** observamos el efecto de la KT en la respuesta de la FE la cual disminuyó un 9.8%, mientras que por el ISO la respuesta disminuyó un 29.7%. Estas respuestas no presentan diferencias significativas.



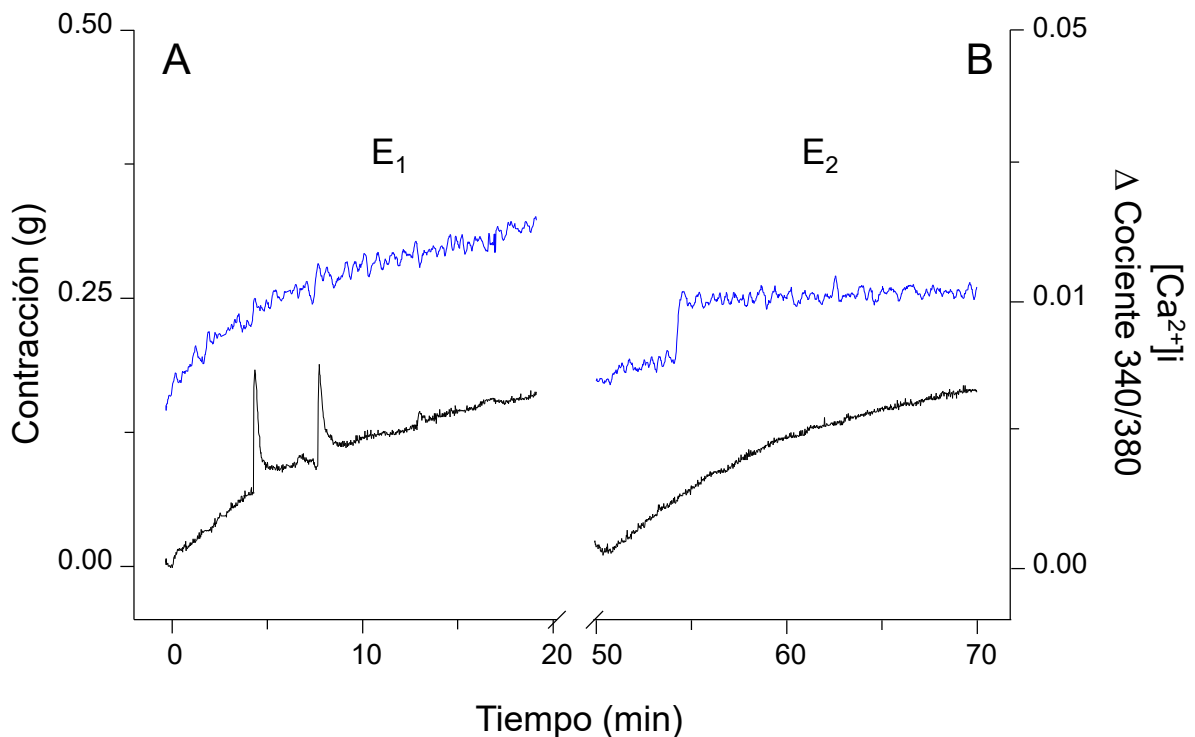
**Figura 14.** Efecto de la KT (0.01 μM) en la contracción inducida por FE (10 μM). Los símbolos representan el promedio ± E.E. (n=6).



**Figura 15.** Efecto de la KT (0.01 μM) en la contracción inducida por ISO (100 μM). Los símbolos representan el promedio ± E.E. (n=6).

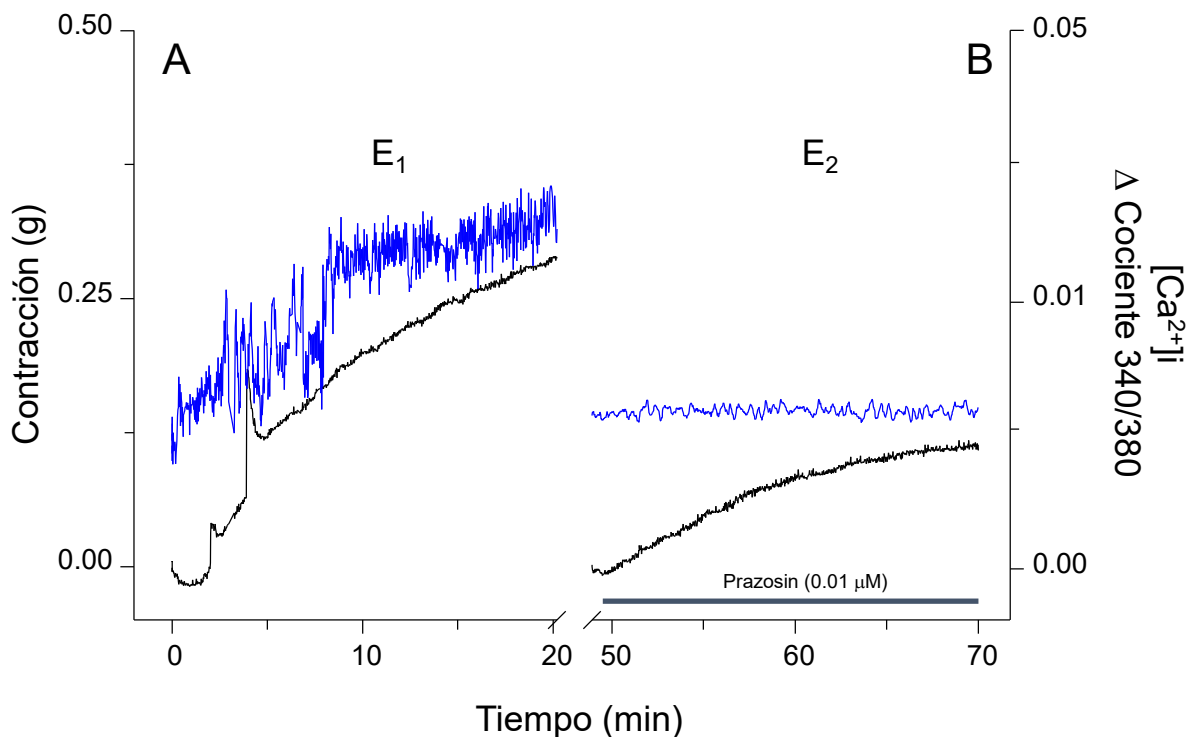
**Mediciones simultáneas de Contracción- $\text{Ca}^{2+}$ i**

Por otra parte, evaluamos la contracción y la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en la respuesta de 5-HT ( $320 \mu\text{M}$ ) en la aorta torácica de cobayo. Como se observa en el registro original (**Fig. 16**) en los estímulos continuos ( $E_1$  y  $E_2$ ) de 5-HT ( $320 \mu\text{M}$ ) las respuestas de contracción se mantiene constante. La  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  disminuye un 20%.



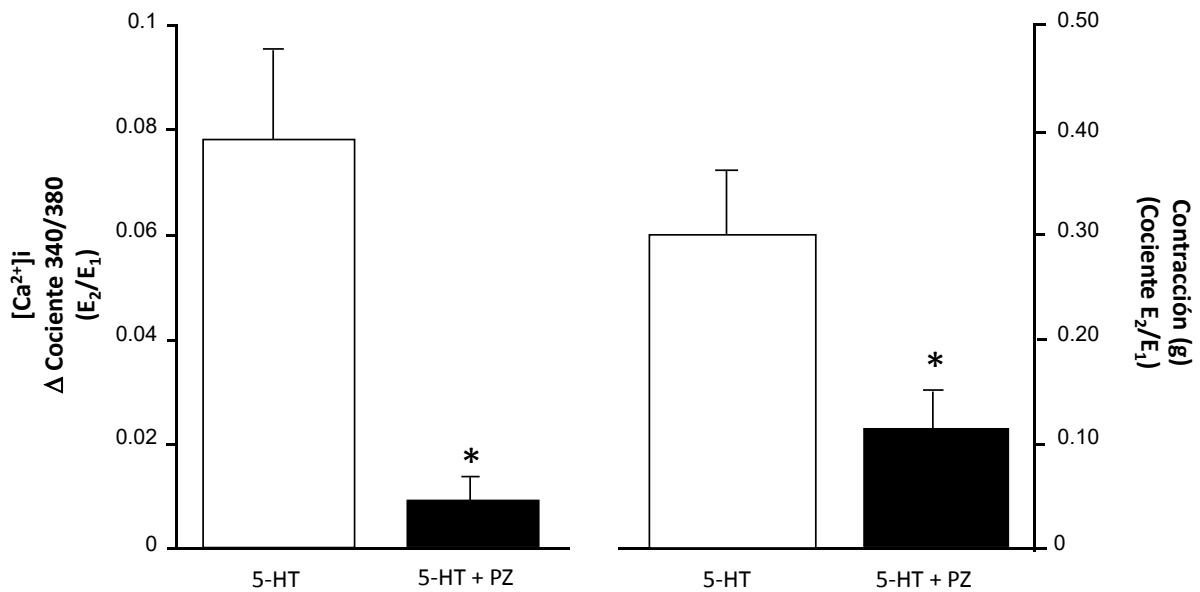
**Figura 16.** Registro representativo de mediciones simultáneas de la contracción y  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  por 5-HT en anillos de aorta torácica de cobayo. **A.** Primer estímulo ( $E_1$ ) por 5-HT ( $320 \mu\text{M}$ ) induce contracción (líneas negras) y liberación de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (líneas azules). **B.** Segundo estímulo ( $E_2$ ) por 5-HT ( $320 \mu\text{M}$ ) induce contracción y liberación de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

Así mismo, evaluamos la  $[Ca^{2+}]_i$  y la actividad del  $\alpha$ -AR en la contracción inducida por 5-HT ( $320 \mu\text{M}$ ) en el tejido de aorta de cobayo. Como se observa en el registro original (**Fig. 17**), la estimulación con 5-HT ( $E_1$ ) produjo una contracción seguida de un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ , indicado por el cociente de la intensidad de fluorescencia en 340 y 380 nm, sin embargo, PZ inhibe la respuesta de contracción de 5-HT ( $E_2$ ) un 68.8% y de la  $[Ca^{2+}]_i$  un 87.47% con respecto a  $E_1$ .



**Figura 17.** Registro representativo del efecto del prazosin ( $0.01 \mu\text{M}$ ) en la respuesta de contracción por 5-HT ( $320 \mu\text{M}$ ) en las mediciones simultáneas de la contracción y  $[Ca^{2+}]_i$  en anillos de aorta torácica de cobayo. **A** representa el primer estímulo ( $E_1$ ) con 5-HT ( $320 \mu\text{M}$ ) y **B** el segundo estímulo ( $E_2$ ) con 5-HT con la preincubación del antagonista  $\alpha$ -adrenérgico, prazosin ( $0.01 \mu\text{M}$ ). Mediciones simultáneas de la contracción en líneas negras y el registro de la  $[Ca^{2+}]_i$  en líneas azules.

En la **Figura 18** nuestros resultados indican que la 5-HT (320  $\mu$ M) produjo una contracción de  $0.34 \pm 0.02$  g de tensión asociada a un valor de la  $[Ca^{2+}]_i$  de  $\Delta 0.07 \pm 0.01$ . Por el efecto del PZ se obtuvo un decremento de la contracción ( $0.12 \pm 0.02$  g de tensión) y de la  $[Ca^{2+}]_i$  ( $\Delta 0.01 \pm 0.004$ ), observándose diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Lo que representa una disminución del 68.88% en la contracción por efecto del PZ en la respuesta de 5-HT y un decremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  en un 87.47%.



**Figura 18.** Efecto del prazosin (0.01  $\mu$ M) en la respuesta de contracción y la  $[Ca^{2+}]_i$  inducida por 5-HT (320  $\mu$ M) en anillos de aorta torácica de cobayo. Los símbolos representan el promedio  $\pm$  E.E. (t de Student) \* $p < 0.05$ . (n=7).

---

## DISCUSIÓN

### Estudios de órganos aislados *in vitro*

Es ampliamente conocido que la 5-HT modula la respuesta de contracción de la aorta y esta respuesta es dependiente de la concentración, como fue confirmado por nuestros resultados (**Fig. 7**). Previamente destacamos que la vasoconstricción es predominantemente mediada por el 5-HT<sub>2A</sub>R y éste el principal receptor involucrado en la contracción de los diferentes tipos de arterias (64, 65), como en las arterias de rata (46, 48, 56).

La ketanserina ha sido una herramienta farmacológica por excelencia en el estudio del 5-HT<sub>2A</sub>-R (66), por lo que fue utilizada en nuestros experimentos para confirmar la actividad del 5-HT<sub>2A</sub>-R. En nuestro sistema de órganos aislados preincubamos con ketanserina y estimulamos posteriormente con una dosis única de 5-HT. La respuesta de contracción que obtuvimos permanece constante durante los primeros ocho minutos, y después de ese tiempo se inhibe parcialmente la contracción (**Fig. 8**). Esto fue un resultado imprevisto en nuestro trabajo, ya que esperábamos que la contracción fuera inhibida en una mayor proporción debido a la importancia que se le ha asignado a los 5-HT<sub>2A</sub>R en la contracción de la aorta (54, 55, 66).

Con el objeto de comprender esta respuesta inesperada exploramos diferentes vías factibles de explicación. Primero, consideramos que la respuesta podría deberse a la posible participación de otro de los receptores serotoninérgicos, los cuales incluyen alrededor de 14 subtipos de receptores de la 5-HT y por consiguiente, diferentes mecanismos de señalización. De manera importante, los 5HT<sub>1B/1D</sub>R también modulan la contracción del MLV mediante la activación de las proteínas G<sub>q/11</sub> y G<sub>i/o</sub>, respectivamente, esta última mediante la disminución del AMPc (56, 57, 67, 68). Los 5-HT<sub>1</sub>-R producen contracción en la arteria basilar, una de las arterias que aporta sangre al cerebro (69). El receptor 5-HT<sub>1B</sub> participa en la contracción de la arteria cerebral y la arteria coronaria humanas y de rata (70), y también en la arteria ilíaca de cobayo (71). Los receptores 5-HT<sub>1B/1D</sub> inducen contracción en la arteria renal y arteria carótida de conejo (67). En un modelo de hipertensión la respuesta de contracción está modulada por los receptores 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>2B</sub> en la arteria aorta (72). Además, es importante considerar la singularidad de los mecanismos de señalización específicos de

cada receptor serotoninérgico. Teniendo en cuenta estos antecedentes consideramos que, además del 5-HT<sub>2A</sub>R, los receptores 5-HT<sub>1B/1D</sub> podrían estar participando en la respuesta de contracción de la aorta de cobayo.

Además del sistema serotoninérgico, consideramos que otros sistemas de señalización fundamentales en la vasoconstricción pudieran contribuir en la respuesta inducida por una concentración única de 5-HT en la aorta, por lo que decidimos explorar el sistema adrenérgico.

El sistema adrenérgico es un sistema de señalización muy importante en la modulación de la contracción-relajación del MLV. Mediante técnicas farmacológicas y moleculares, se ha identificado que tanto los receptores 5-HT<sub>2A</sub> y los  $\alpha$ - y  $\beta$ -adrenérgicos son esenciales en la regulación del tono vascular (40, 41, 56). Sin embargo, existe escasa evidencia sobre la participación simultánea de estos sistemas en el sistema cardiovascular. En este trabajo evidenciamos que los  $\alpha$ -AR participan en la respuesta de contracción de la aorta de cobayo inducida por una dosis única de 5-HT, lo cual no había sido descrito anteriormente.

Es importante destacar a los  $\alpha$ - y  $\beta$ -AR y la familia de receptores 5-HT como principales receptores asociados en la contracción-relajación de la aorta, y comparten las vías de señalización de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) (30). Los  $\alpha$ -AR y la familia de receptores 5-HT<sub>2</sub> están asociados a la proteína G<sub>q/11</sub>, que actúan movilizando Ca<sup>2+</sup> intracelular. Mientras que los  $\alpha_2$ -AR y los receptores 5-HT<sub>1</sub> y 5-HT<sub>5</sub> están acoplados a proteína G<sub>i/o</sub>, que inhiben la actividad de la adenilato ciclasa (AC) y lo que induce una disminución del AMPc intracelular. En el caso de los receptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$  y los receptores 5-HT<sub>4</sub>, y 5-HT<sub>7</sub> están asociados a la proteína G<sub>s</sub>, la cual promueve la estimulación de la AC y por lo tanto, la formación de AMPc, lo cual promueve la relajación del MLV (54).

Un aspecto importante en la interacción entre las diferentes aminas biogénicas son las afinidades de unión entre agonistas y antagonistas serotoninérgicos y los  $\alpha$ -AR. Yoshio y col, (2001) observaron que diferentes agonistas y antagonista de 5-HT muestran una alta afinidad a los tres subtipos de receptores  $\alpha_1$  en la aorta torácica arteria y caudal de rata y arteria carótida de perro (73).



Es factible que la estimulación de la 5-HT tenga una actividad dual. Algunos autores definen que la 5-HT puede estar relacionada con un aumento en la NA como resultado de la activación del receptor 5-HT<sub>3</sub>. Otros, han descrito que la 5-HT puede inhibir la liberación de NA en vasos sanguíneos, mediante la interacción con receptores 5-HT presinápticos con actividad inhibitoria, como los receptores 5-HT<sub>1B/1D</sub> (46, 74). Ramage y Villalón (2008), en una relevante revisión, proponen que la bradicardia puede estar mediada por la 5-HT, inhibiendo la liberación de NA de las terminales nerviosas simpáticas que inervan el corazón, mediante la activación de los receptores presinápticos 5-HT<sub>1B/1D</sub> y 5-HT<sub>5A/5B</sub> (46). La 5-HT puede inhibir la liberación de NA en la unión neuroefectora simpática en los vasos sanguíneos a través de interacciones con receptores 5-HT presinápticos inhibidores (12). También ha sido propuesto que la 5-HT modifica el flujo de salida simpático que se refleja en los cambios en la actividad de los nervios simpáticos preganglionares (12).

En la década de los noventa surgió un gran interés por elucidar los mecanismos de señalización implicados en la vasoconstricción por serotonina y los diversos receptores serotoninérgicos. Los resultados de esas líneas de investigación mostraron que la 5-HT actúa de manera simultánea con una gran variedad de sustancias vasoactivas provocando la amplificación y potenciación de la respuesta contráctil. En una revisión realizada por Yildiz y col., (1998), reúnen los trabajos más sobresalientes que describen el efecto directo e indirecto de la 5-HT en otros sistemas de señalización que producen vasoconstricción. Estos autores precisan un sinergismo vasoconstrictor por la 5-HT, en particular 5-HT<sub>1</sub> y 5-HT<sub>2A</sub>, en conjunto con otros vasoconstrictores endógenos, como la angiotensina II, la histamina y la prostaglandina F<sub>2</sub> (75, 76). En esta revisión, se menciona que el sinergismo de la 5-HT con otros sistemas, como el adrenérgico, podría estar regulado mediante la interacción de los mecanismos de transducción regulados por la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> lo cual implica la activación de los 5-HT<sub>1</sub>-R y  $\alpha$ -AR (75).

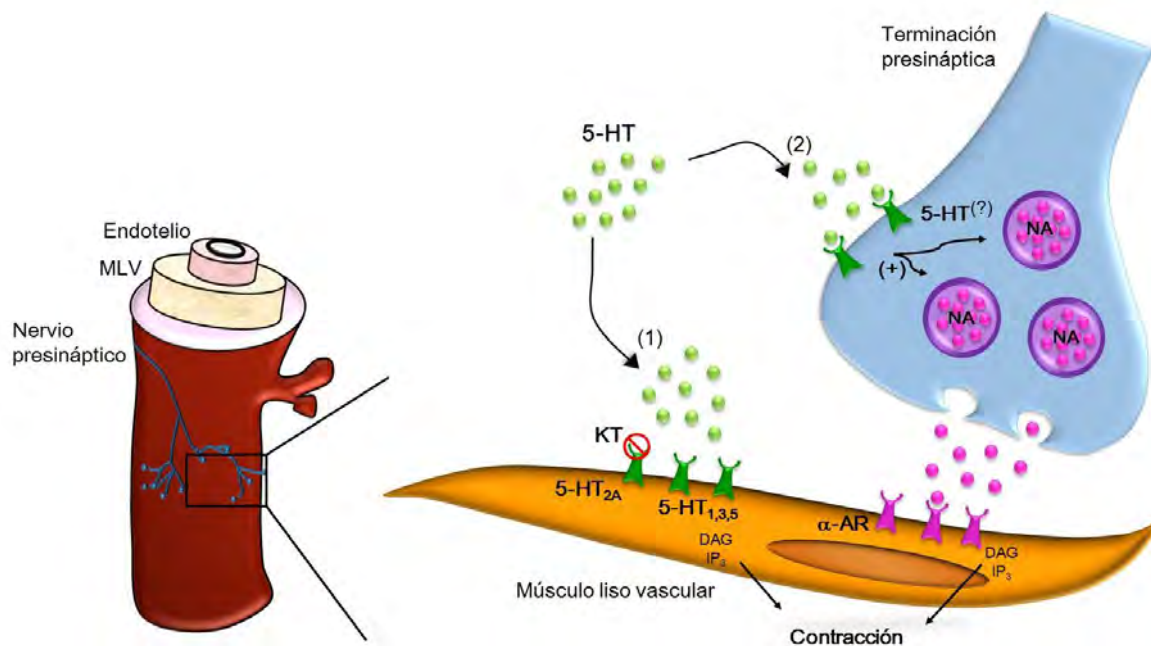
El concepto de sinergismo sigue vigente en algunos grupos de investigación, proponiendo mecanismos específicos que involucran los diversos subtipos de receptores serotoninérgicos y otras aminas biogénicas, y sus respectivos transportadores (46, 56, 77, 78).

La contribución de los transportadores de las aminas biogénicas, serotonina, noradrenalina y dopamina (SERT, NET y DAT, respectivamente), como elementos primordiales en el sistema de señalización, se ha señalado que tienen una “naturaleza promiscua”; es decir, que estos transportadores pueden interactuar con diferentes tipos de aminas, además de su neurotransmisor original (79). El mecanismo de señalización de las aminas biogénicas es interrumpido por la recaptura del neurotransmisor, realizado por las proteínas transportadoras, mencionadas previamente.

En el 2004, se reconoció un transportador presente en el cerebro, denominado transportador de monoaminas de la membrana plasmática (PMAT), el cual transporta indiscriminadamente una gran variedad de aminas biogénicas y cationes xenobióticos. Entre las monoaminas que son utilizadas como sustrato son serotonina, dopamina, histamina, norepinefrina, epinefrina y tiramina (68). Aunque está ampliamente reconocida la presencia de este transportador en cerebro, también ha sido reportado el PMAT en el útero de mujer en la etapa proliferativa, lo que permite regular las diferentes etapas del proceso reproductivo (80). La presencia del transportador PMAT en el sistema cardiovascular está por explorarse, aunque ya se ha descrito en las células del músculo liso vascular del cerebro humano en ausencia de SERT (81).

Yokoyama y col., (2015) observaron terminales nerviosas y vesículas adyacentes a lámina basal de células de músculo liso en el cuerpo carotideo de ratas mediante microscopía electrónica (CITA). Por lo que, pudieron determinar la presencia de la enzima dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (convertidora de DA en NA) en estas terminales nerviosas mediante ensayos de inmunoreactividad, lo que confirma la presencia de la inervación simpática de las arteriolas del cuerpo carotideo.

Por lo anterior, es posible que exista una posible interacción entre los diferentes mecanismos de señalización del sistema serotoninérgico y adrenérgico. Por esta razón, nosotros hemos propuesto un posible mecanismo en regulación de la 5-HT y el sistema adrenérgico en el MLV. En otros sistemas, se ha determinado que la 5-HT activa los receptores serotoninérgicos presinápticos (5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5</sub> y 5-HT<sub>7</sub>) que induce la liberación de catecolaminas (principalmente NA) localizadas en las vesículas presinápticas. Al ser liberadas, la NA se unirá a los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos en el MLV promoviendo y sinergetizando la vasoconstricción de la aorta (**Fig. 19**).



**Figura 18.** Esquema de los posibles mecanismos de interacción entre la serotonina y el sistema adrenérgico. (1) La 5-HT activa los receptores serotoninérgicos en el MLV induciendo la contracción. (2) La 5-HT activa los receptores serotoninérgicos presinápticos. Esta unión induce la liberación de catecolaminas (principalmente NA) localizadas en las vesículas presinápticas. Al ser liberadas, las CA se unirán a los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos en el MLV promoviendo la vasoconstricción.

En otro grupo de experimentos evaluamos el efecto del propranolol, antagonista no selectivo  $\beta$ -adrenérgico y encontramos que produjo un decremento en la contracción inducida en la respuesta única a 5-HT. Esto es un resultado inesperado, ya que esperamos que la respuesta de 5-HT no disminuyera. El propranolol, un antagonista no selectivo de los receptores  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - y  $\beta_3$ -AR, ha sido utilizado como agente terapéutico en diversas patologías tales como la hipertensión, las arritmias, el glaucoma y la migraña. De manera importante, han sido observadas respuestas de vasoconstricción y vasodilatación, sin embargo los mecanismos que subyacen a estos efectos duales han sido escasamente explorados. Kurosaki y col., (2000) proponen el incremento del óxido nítrico (ON) como un mecanismo posible. Priviero y col., (2006) confirman que en la arteria mesentérica de rata, el propranolol provoca la liberación de ON y el bloqueo de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , estos efectos de vasodilatación son independientes del bloqueo de los  $\beta$ -AR. Cekic y col., (2013) observan que en la arteria mesentérica de rata, el propranolol induce un efecto vasodilatador debido a que bloquea los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L (82-84).

Además, en otros trabajos se ha descrito que los antagonistas  $\beta$ -AR inhiben la vasoconstricción a través de diferentes mecanismos, como la producción de óxido nítrico por la acción del 5-HT<sub>1</sub>-R en células endoteliales, la activación parcial del  $\beta_2$ -AR, el antagonismo con  $\alpha_1$ -AR, y la apertura de canales de K<sup>+</sup> (82, 85). Lo anterior, nos permite sugerir que el decremento de la contracción observado en nuestros experimentos con propranolol, posiblemente está modulado por otros mecanismos independientes a los  $\beta$ -AR; sin embargo, en este trabajo no se evaluaron estos mecanismos. El uso del propranolol como antagonista  $\beta$ -AR no fue adecuado en este estudio.

Otros resultados obtenidos en este trabajo confirman que no se modifica la respuesta de los diferentes agonistas  $\alpha$ - y  $\beta$ -AR por la participación de la ketanserina, un antagonista específico 5-HT<sub>2A</sub>. No obstante, que los  $\alpha$ -AR modulan la respuesta la 5-HT.

---

## Mediciones simultáneas de Contracción- $\text{Ca}^{2+}$

En los experimentos de mediciones simultáneas de contracción- $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , sólo evaluamos el efecto del prazosin, un antagonista no selectivo  $\alpha$ -AR. Nuestros resultados comprobaron la importancia del  $\text{Ca}^{2+}$  en la respuesta de contracción serotoninérgica y la participación de los receptores  $\alpha$ -AR. Es extensamente reconocido que el incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  promueve la contracción del MLV. De manera general, el incremento citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  favorece la unión con la calmodulina y se forma el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulina. Este complejo favorece la activación de la cinasa cadena ligera de la miosina (MLCK), la cual fosforila la cadena ligera de la miosina (MLC), lo que facilita la interacción de la actina-miosina y lleva a cabo la contracción (15).

En este sentido, para alcanzar una apropiada respuesta fisiológica, en las células del MLV se integran múltiples vías de señalización que modulan la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  directa o indirectamente. Las fuentes de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  disponibles para la señalización celular en el MLV incluyen el influjo de  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  a través de canales iónicos localizados en la membrana plasmática (Tipo L) y la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde reservorios intracelulares (15, 17, 23).

En el presente trabajo se evaluó de manera simultánea la contracción inducida por 5-HT y el  $\text{Ca}^{2+}_i$ . Evaluamos la participación de los  $\alpha$ -AR a través del prazosin. Como ha sido ampliamente reconocido, nuestros resultados indican que el  $\text{Ca}^{2+}_i$  está modulando la respuesta de contracción por 5-HT.

Los receptores  $\alpha$ -AR y los 5-HT<sub>2</sub>-R involucrados en la contracción del MLV están acoplados a la proteína  $G_{q/11}$ , que induce la activación de la PLC con la subsecuente formación del  $\text{IP}_3$  y la liberación del  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  desde el retículo sarcoplásmico. El  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  no sólo está regulado por los reservorios (RS y mitocondria) sino también, por otros mecanismos entre los que destaca la regulación positiva de este ion al inducir la apertura de canales tipo L que inducirán despolarización de la membrana y como evento final la contracción (23).

En un estudio destacado, Yokoyama y col., (2015) evaluaron el aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  por estímulos de 5-HT y NA en las células del ML de la arteriolas del cuerpo carotídeo. Estos autores observaron que solo cuando existe una preestimulación con NA aumenta la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  por estimulación de la 5-HT, lo que sugiere un posible sinergismo

entre la 5-HT y la NA. Así mismo, determinaron que la  $[Ca^{2+}]_i$  disminuye al inhibir la actividad del receptor 5-HT<sub>2A</sub> con ketanserina (86).

Contrario a estos resultados, nosotros observamos un incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  por el estímulo de 5-HT, no siendo necesaria la preestimulación con NA. Estas diferencias en los resultados podrían ser debido al uso de las diferentes concentraciones de 5-HT y al diferente tipo de tejido utilizado en ambos estudios (86).

Nuestros resultados confirman, lo que es ampliamente sabido que el  $Ca^{2+}$  es un modulador primordial en la contracción del MLV y además, la dinámica de este ion está regulada por la integración de las vías de señalización inducidas por los sistemas serotoninérgico y adrenérgico.

Sin embargo, no había sido descrita la acción simultánea de estos sistemas, por lo que implica una novedad en la investigación farmacológica del MLV. Así, la importancia primordial de este trabajo de investigación es la contribución al conocimiento en la contracción del MLV por la acción sinérgica del sistema serotoninérgico y el sistema adrenérgico, y la participación del  $Ca^{2+}_i$

## CONCLUSIONES

1. Existe un efecto sinérgico en la actividad de la contracción de 5-HT (100  $\mu$ M) y los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos en la aorta torácica de cobayo.
2. La estimulación de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos inducen una máxima contracción en la aorta torácica de cobayo.
3. La  $[Ca^{2+}]_i$  disminuye al bloquear los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos en la contracción inducida por 5-HT en la aorta torácica de cobayo.

## PERSPECTIVAS

- Caracterizar los receptores  $\alpha$ -AR y  $\beta$ -AR en la aorta torácica de cobayo.
- Evaluar la participación de los receptores 5-HT (no evaluados en este trabajo) involucrados en la respuesta de contracción de la aorta torácica de cobayo.
- Determinar la colocalización de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$ -adrenérgicos y 5-HT<sub>2A</sub> mediante técnicas de inmunohistoquímica en el MLV de aorta torácica.
- Evaluar la liberación de catecolaminas mediante mediciones con estimulación eléctrica en la aorta torácica de cobayo.
- Evaluar la participación del endotelio en la contracción inducida por 5-HT en la aorta torácica de cobayo.
- Evaluar la participación de los receptores adrenérgicos en la respuesta de contracción inducida por 5-HT en la aorta torácica de cobayo con un modelo de asma alérgica.



---

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Gal Iglesias B, López Gallardo, M, Martín Velazco, A, y Prieto Montalvo, J. Bases de la Fisiología: Tébar; 2007.
2. P.R. Anatomía, fisiología e higiene.: Progreso; 1971.
3. M. R. Histología. 5 ed2007.
4. Wagenseil JE, Mecham RP. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiol Rev.* 2009; 89(3):957-89.
5. V. K. Pathologic Basis of disease. 7 ed2005.
6. N. VD. Efecto de los inhibidores de fosfodiesterasas sobre la entrada de Calcio extracelular en el músculo liso de aorta de rata: Universidad Nacional Autónoma de México; 2014.
7. Komuro I, Kurihara H, Sugiyama T, et al. Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 1988; 238(2):249-52.
8. U. W. Histología de Sobotta. 2 ed2006.
9. Rensen SS, Doevendans PA, van Eys GJ. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J.* 2007; 15(3):100-8.
10. Hilgers RH, Webb RC. Molecular aspects of arterial smooth muscle contraction: focus on Rho. *Exp Biol Med (Maywood).* 2005; 230(11):829-35.
11. Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev.* 1995; 75(3):487-517.
12. Darios ES, Barman SM, Orer HS, et al. 5-Hydroxytryptamine does not reduce sympathetic nerve activity or neuroeffector function in the splanchnic circulation. *Eur J Pharmacol.* 2015; 754:140-7.
13. Centurion D, Sanchez-Lopez A, Ortiz MI, et al. Mediation of 5-HT-induced internal carotid vasodilatation in GR127935- and ritanserin-pretreated dogs by 5-HT<sub>7</sub> receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2000; 362(2):169-76.
14. Jantschak F, Popp AM, Hofmann RA, et al. Postjunctional alpha<sub>2C</sub>-adrenoceptors mediate vasoconstriction in rat tail artery: influence of precontraction and temperature on vasoreactivity. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2010; 382(5-6):487-97.
15. Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ.* 2003; 27(1-4):201-6.
16. B. A. Molecular Biology of the cell. 5 ed2008.
17. Regnier M, Lee DM, Homsher E. ATP analogs and muscle contraction: mechanics and kinetics of nucleoside triphosphate binding and hydrolysis. *Biophys J.* 1998; 74(6):3044-58.
18. Kim H, Appel S, Vetterkind S, et al. Smooth muscle signaling pathways in health and disease. *Journal Cell Molecular Medicine.* 2008; 12:2165-80.
19. Jalil J, Lavandero S, Chiong M, et al. [Rho/Rho kinase signal transduction pathway in cardiovascular disease and cardiovascular remodeling]. *Rev Esp Cardiol.* 2005; 58(8):951-61.
20. Laporte R, Hui A, Laher I. Pharmacological modulation of sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle. *Pharmacol Rev.* 2004; 56(4):439-513.
21. Somlyo AP, Somlyo AV. Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev.* 2003; 83(4):1325-58.

22. Hill-Eubanks DC, Werner ME, Heppner TJ, et al. Calcium signaling in smooth muscle. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011; 3(9):a004549.
23. Amberg GC, Navedo MF. Calcium dynamics in vascular smooth muscle. *Microcirculation.* 2013; 20(4):281-9.
24. Campos P. Caracterización farmacológica de los receptores serotoninérgicos involucrados en la contracción y relajación del músculo liso de las vías aéreas de cobayo. : Universidad Nacional Autónoma de México; 2011.
25. Engel J, Michna M, Platzer J, et al. Calcium channels in mouse hair cells: function, properties and pharmacology. *Adv Otorhinolaryngol.* 2002; 59:35-41.
26. Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature.* 1994; 372(6503):231-6.
27. Landry Y, Niederhoffer N, Sick E, et al. Heptahelical and other G-protein-coupled receptors (GPCRs) signaling. *Curr Med Chem.* 2006; 13(1):51-63.
28. Berridge MJ. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. *J Physiol.* 2008; 586(21):5047-61.
29. Berridge MJ. Calcium signalling remodelling and disease. *Biochem Soc Trans.* 2012; 40(2):297-309.
30. Offermanns S. G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Prog Biophys Mol Biol.* 2003; 83(2):101-30.
31. García D. Impacto del estrés por restricción del movimiento en el contenido de catecolaminas de la glándula suprarrenal del ratón.: Universidad Nacional Autónoma de México; 2015.
32. Somlyo AP, Somlyo AV. Smooth muscle: excitation-contraction coupling, contractile regulation, and the cross-bridge cycle. *Alcohol Clin Exp Res.* 1994; 18(1):138-43.
33. Marin EP, Jozsef L, Di Lorenzo A, et al. The Protein Acyl Transferase ZDHHC21 Modulates alpha1 Adrenergic Receptor Function and Regulates Hemodynamics. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016; 36(2):370-9.
34. Bricker J, Fortuna A, Alves G, et al. Liquid chromatographic methods for the quantification of catecholamines and their metabolites in several biological samples-A review. *Analytica Chimica Acta.* 2013; 768:12-34.
35. Ahlquist RP. A study of the adrenergic receptors. *Am J Physiol.* 1948; 153(3):586-600.
36. Lands A, Groblewski, GE, Brown, TG Jr. Comparison of the action of isoproterenol and several related compounds on blood pressure, heart and bronchioles. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1966; 161(1):68-75.
37. Langer S. Presynaptic regulation of catecholamine release. *Biochem Pharmacol* 1974; 23:1793-800.
38. Civantos B, Aleixandre A. Effect of dietary calcium supplements and amlodipine on growth, arterial blood pressure, and cardiac hypertrophy of spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens.* 2003; 25(8):495-508.
39. Gnus J, Czerski A, Ferenc S, et al. In vitro study on the effects of some selected agonists and antagonists of alpha(1)-adrenergic receptors on the contractility of the aneurysmally-changed aortic smooth muscle in humans. *J Physiol Pharmacol.* 2012; 63(1):29-34.
40. Werstiuk ES, Lee RM. Vascular beta-adrenoceptor function in hypertension and in ageing. *Can J Physiol Pharmacol.* 2000; 78(6):433-52.
41. McGrath J. Localization of adrenoceptors: JR Vane Medal Lecture. *British J of Phar.* 2015; 172:1179-94.

42. Pares-Hipolito J, Gomez-Zamudio JH, Gallardo-Ortiz IA, et al. Selective agonists reveal alpha(1A)- and alpha(1B)-adrenoceptor subtypes in caudal artery of the young rat. *Auton Autacoid Pharmacol.* 2006; 26(4):371-8.
43. Oriowo MA, Bevan JA. Chloroethylclonidine unmasks a non-alpha-adrenoceptor noradrenaline binding site in the rat aorta. *Eur J Pharmacol.* 1990; 178(2):243-6.
44. Perez-Aso M, Flacco N, Carpena N, et al. beta-Adrenoceptors differentially regulate vascular tone and angiogenesis of rat aorta via ERK1/2 and p38. *Vascul Pharmacol.* 2014; 61(2-3):80-9.
45. Sanz-Rosa D. Los receptores beta-adrenérgicos en la enfermedad cardiovascular. *Hipertensión y riesgo cardiovascular.* 2011; 28(2):55-62.
46. Ramage AG, Villalon CM. 5-hydroxytryptamine and cardiovascular regulation. *Trends Pharmacol Sci.* 2008; 29(9):472-81.
47. Córdoba R. Identificación de los receptores serotoninérgicos involucrados en la hiperreactividad de las vías aéreas inducida por reto antigénico en cobayos sensibilizados. : Universidad Nacional Autónoma de México; 2008.
48. Villalon CM, Centurion D. Cardiovascular responses produced by 5-hydroxytryptamine: a pharmacological update on the receptors/mechanisms involved and therapeutic implications. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2007; 376(1-2):45-63.
49. Davis RP, Szasz T, Garver H, et al. One-month serotonin infusion results in a prolonged fall in blood pressure in the deoxycorticosterone acetate (DOCA) salt hypertensive rat. *ACS Chem Neurosci.* 2013; 4(1):141-8.
50. Watts SW, Darios ES, Seitz BM, et al. 5-HT is a potent relaxant in rat superior mesenteric veins. *Pharmacol Res Perspect.* 2015; 3(1):e00103.
51. Rang H. *Farmacología.* 5 ed 2004.
52. Sigma-Aldrich.
53. Diaz J, Ni W, Thompson J, et al. 5-Hydroxytryptamine lowers blood pressure in normotensive and hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008; 325(3):1031-8.
54. *Pharmacology IUoBaC.* 2015.
55. Watts SW. 5-HT is a potent relaxant in rat superior mesenteric veins. *Pharmacology Research and Perspectives.* 2014; 3(1):1-13.
56. Watts SW, Morrison SF, Davis RP, et al. Serotonin and blood pressure regulation. *Pharmacol Rev.* 2012; 64(2):359-88.
57. Ullmer C, Schmuck K, Kalkman HO, et al. Expression of serotonin receptor mRNAs in blood vessels. *FEBS Lett.* 1995; 370(3):215-21.
58. Nelson PM, Harrod JS, Lamping KG. 5HT(2A) and 5HT(2B) receptors contribute to serotonin-induced vascular dysfunction in diabetes. *Exp Diabetes Res.* 2012; 2012:398406.
59. Kawasaki H, Takasaki K. Vasoconstrictor response induced by 5-hydroxytryptamine released from vascular adrenergic nerves by periarterial nerve stimulation. *J Pharmacol Exp Ther.* 1984; 229(3):816-22.
60. Watts SW, Fink GD, Silver PJ, et al. Interaction of the beta adrenergic receptor antagonist bucindolol with serotonergic receptors. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000; 35(1):29-36.
61. Napoli C. Novel epigenetic-based therapies useful in cardiovascular medicine. *World Journal of Cardiology.* 2016; 8(2):211-9.

62. De la Cruz R. Evaluación farmacológica de los receptores serotoninérgicos en la aorta aislada de cobayo.: Tecnológico de Acapulco; 2014.
63. Padilla D. The guinea pigs as a model of infectious diseases. . *Comparative Medicine*. 2008; 58(4):324-54.
64. Morecroft I, Heeley RP, Prentice HM, et al. 5-hydroxytryptamine receptors mediating contraction in human small muscular pulmonary arteries: importance of the 5-HT<sub>1B</sub> receptor. *Br J Pharmacol*. 1999; 128(3):730-4.
65. Watts SW, Gilbert L, Webb RC. 5-Hydroxytryptamine<sub>2B</sub> receptor mediates contraction in the mesenteric artery of mineralocorticoid hypertensive rats. *Hypertension*. 1995; 26(6 Pt 2):1056-9.
66. Alvarez-Guerra M, Hameg A, Bayle F, et al. 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist properties of cyamemazine in rat and guinea pig smooth muscle. *Eur J Pharmacol*. 2002; 454(2-3):235-9.
67. Akin D, Gurdal H. Involvement of 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>1D</sub> receptors in sumatriptan mediated vasocontractile response in rabbit common carotid artery. *Br J Pharmacol*. 2002; 136(2):177-82.
68. Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, et al. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev*. 1994; 46(2):157-203.
69. Parsons AA, Whalley ET. Evidence for the presence of 5-HT<sub>1</sub>-like receptors in rabbit isolated basilar arteries. *Eur J Pharmacol*. 1989; 174(2-3):189-96.
70. McLennan PL, Taylor DA. Antagonism by ketanserin of 5-HT-induced vasoconstriction unmasks a 5-HT-induced vasodilation. *Eur J Pharmacol*. 1984; 104(3-4):313-8.
71. Jahnichen S, Radtke OA, Pertz HH. Involvement of 5-HT<sub>1B</sub> receptors in triptan-induced contractile responses in guinea-pig isolated iliac artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2004; 370(1):54-63.
72. Banes AK, Watts SW. Arterial expression of 5-HT<sub>2B</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptors during development of DOCA-salt hypertension. *BMC Pharmacol*. 2003; 3:12.
73. Yoshioka A, Horiuchi H, Shirakawa R, et al. Molecular dissection of alpha- and dense-core granule secretion of platelets. *Ann N Y Acad Sci*. 2001; 947:403-6.
74. Molderings GJ, Bruss M, Gothert M. Functional and molecular identification of 5-hydroxytryptamine receptors in rabbit pulmonary artery: involvement in complex regulation of noradrenaline release. *Pharmacol Rep*. 2006; 58(2):188-99.
75. Yildiz O, Smith JR, Purdy RE. Serotonin and vasoconstrictor synergism. *Life Sci*. 1998; 62(19):1723-32.
76. Yildiz O, Ehlert F, Purdy RE. Characterization of the "silent" 5-HT<sub>1B</sub> receptors of rabbit iliac artery. *Ann N Y Acad Sci*. 1998; 861:259.
77. Calama E, Ortiz de Urbina AV, Moran A, et al. Effect of 5-hydroxytryptamine on neurogenic vasoconstriction in the isolated, autoperfused hindquarters of the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005; 32(10):894-900.
78. Calama E, Garcia M, Jarque MJ, et al. 5-Hydroxytryptamine-induced vasodilator responses in the hindquarters of the anaesthetized rat, involve beta<sub>2</sub>-adrenoceptors. *J Pharm Pharmacol*. 2003; 55(10):1371-8.
79. Daws LC. Unfaithful neurotransmitter transporters: focus on serotonin uptake and implications for antidepressant efficacy. *Pharmacol Ther*. 2009; 121(1):89-99.

80. Bottalico B, Noskova V, Pilka R, et al. The organic cation transporters (OCT1, OCT2, EMT) and the plasma membrane monoamine transporter (PMAT) show differential distribution and cyclic expression pattern in human endometrium and early pregnancy decidua. *Mol Reprod Dev.* 2007; 74(10):1303-11.
81. Li RW, Yang C, Kwan YW, et al. Involvement of organic cation transporter-3 and plasma membrane monoamine transporter in serotonin uptake in human brain vascular smooth muscle cells. *Front Pharmacol.* 2013; 4:14.
82. Cekic EG, Soydan G, Guler S, et al. Propranolol-induced relaxation in the rat basilar artery. *Vascul Pharmacol.* 2013; 58(4):307-12.
83. Kurosaki K, Ikeda U, Maeda Y, et al. Carvedilol stimulates nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2000; 32(2):333-9.
84. Priviero FB, Teixeira CE, Toque HA, et al. Vasorelaxing effects of propranolol in rat aorta and mesenteric artery: a role for nitric oxide and calcium entry blockade. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006; 33(5-6):448-55.
85. Brunton L, Lazo J, Parker K. Goodman & Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics 2006.
86. Yokoyama T, Nakamuta N, Kusakabe T. Sympathetic regulation of vascular tone via noradrenaline and serotonin in the rat carotid body as revealed by intracellular calcium imaging. *Brain Res.* 2015; 126-135.
87. Pacheco J, Ramírez-Jarquín J.O., Vaca L. Calcium Entry Pathways in Non-excitable Cells, Chapter 15: Microdomains associated to lipid rafts. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 2016. 898 DOI 10.1007/978-3-319-26974-0\_15