



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

***Implicaciones morfológicas del músculo  
cardíaco en ratones deficientes (KO) del receptor  
 $\alpha_{1D}$ -adrenérgico***

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I Ó L O G O**

P R E S E N T A :

**Pérez Medina César Eder**

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ITZELL A. GALLARDO ORTÍZ

Los Reyes Iztacala, Estado de México 2020





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## DEDICATORIAS



*En memoria de todos aquellos ratones que dieron su vida involuntariamente por unos pequeños avances en el conocimiento científico. Gracias por su sacrificio.*

*Agradecimiento eterno a mis papás por aportar los cimientos genéticos para mi creación.*

*A mi papá, un sabio e incansable guerrero que siempre ayuda a sus seres queridos.*

*A mi mamá, quien amó y protegió a su familia hasta su último aliento.*

*A mis hermanos: Carlos, Priscila y Marilú, con quienes tuve la fortuna de crecer.*

*Una tesis no basta para honrarlos, por lo que espero hacerlo con mi propia vida.*

*A Mari, que ha mejorado sus niveles de paciencia conmigo y quien ilumina su entorno con la luz de sus ojos. Eres mi humano favorito. Gracias por tu ilimitada ayuda.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias a la Dra. Itzell A. Gallardo Ortíz por invitarme a colaborar con ella en el laboratorio, por su apoyo que sobrepasa por mucho sus funciones académicas. Por sus consejos y por permitirme servir como sujeto de pruebas para un sin fin de terapias alternativas.

Gracias al Gran Dr. Rafael Villalobos Molina, cuya vida y trayectoria laboral son un modelo a seguir. Le agradezco inmensamente que me haya permitido ser su ayudante.

Gracias a mis sinodales: A la Dra. Ana Victoria Vega Salcedo por adoptarme durante todo un año y compartirme un poco de su gran sabiduría; a la Maestra Carmen Álvarez Rodríguez por instruirme en la ciencia de la biología del desarrollo e histología y al Dr. Santiago Sigríst, quien me ha guiado desde mi primer día en el laboratorio y me ha infundido confianza para la elaboración de los experimentos.

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, Carrera de Biología por mi extensa formación profesional.

A los financiamientos otorgados por DGAPA, UNAM PAPIIT: IN219915, IN226819 (IAG-O) & IN223519 (RV-M); así como a la Fundación Miguel Alemán (IAG-O).

# ÍNDICE

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
Glosario de Términos.....	04
Resumen.....	05
Abstract.....	06
Introducción.....	07
1. Hipertensión Arterial y sus consecuencias.....	07
1.1. Regulación de la presión arterial.....	08
1.1.1. Mecanismos de elevación de la presión arterial.....	08
1.1.2. Mecanismos que disminuyen la presión arterial.....	09
2. Sistema Cardiovascular (SCV).....	10
2.1. El Corazón y su anatomía.....	11
2.1.1. El Sistema Contráctil.....	14
2.1.2. Hipertrofia Cardíaca.....	16
2.2. Regulación del SCV.....	17
3. Receptores Adrenérgicos.....	18
Justificación.....	24
Hipótesis.....	25
Objetivos.....	25
Materiales y Métodos.....	25
Resultados.....	32
Discusión.....	35
Conclusiones.....	36
Referencias.....	37

## GLOSARIO DE TÉRMINOS

- DAG** - Diacilglicerol
- DOCA** - Acetato de Desoxicorticosterona
- GPCR** - Receptor Acoplado a Proteína G
- HTA** - Hipertensión arterial
- IC** - Insuficiencia Cardíaca
- IP<sub>3</sub>** - Inositol trifosfato
- KO** - Knockout
- mmHg** - Milímetros de mercurio
- pH** - Potencial de hidrógeno
- PLC** - Fosfolipasa C
- RA** - Receptor adrenérgico
- SCV** - Sistema Cardiovascular
- SHR** - Ratas Espontáneamente Hipertensas
- SNA** - Sistema Nervioso Autónomo
- SNC** - Sistema Nervioso Central
- SNS** - Sistema Nervioso Simpático
- SRAA** - Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
- VA** - Válvulas Atrioventriculares
- VD** - Ventrículo Derecho
- VI** - Ventrículo Izquierdo
- WT** - Wild Type (Silvestre)

## RESUMEN

La hipertensión arterial (HTA) se caracteriza por ser un trastorno en el que los vasos sanguíneos tienen una tensión persistentemente alta. Se considera como una entidad clínica caracterizada por la elevación crónica de la presión arterial, usualmente por encima de 120/80 mmHg. Es un estado patológico que aumenta el riesgo de aparición de afecciones cardiovasculares y cerebrovasculares que tiene consecuencias mortales sobre el conjunto de órganos irrigados por el árbol vascular.

Una consecuencia de la HTA en el corazón es la hipertrofia ventricular, causada por un aumento de la cantidad y el tamaño de las células musculares cardíacas. La hipertrofia se caracteriza por el aumento de la fibrosis intersticial, y a la larga, puede hacer ceder al músculo cardíaco, disminuyendo la función contráctil del ventrículo izquierdo.

Los receptores adrenérgicos (RA) son mediadores de gran importancia en la homeostasis del sistema cardiovascular (SCV), en particular, los receptores  $\alpha_{1D}$  se encuentran en las células que conforman las arterias.

El objetivo de este trabajo fue determinar si la ausencia del receptor RA- $\alpha_{1D}$  tiene repercusiones morfológicas a nivel cardíaco, utilizando el modelo de ratones "knockout" (KO), desarrollado en 2002 por Tsujimoto, los cuales no expresan el gen que codifica para el RA- $\alpha_{1D}$ .

## **ABSTRACT**

Arterial Hypertension (HTA) is characterized for being a disease in which the blood vessels have continuous high blood pressure. It's considered as an entity clinically characterized by the chronic high arterial pressure, usually above 120/80 mmHg. It's a pathological state which increases the risk of generating cardiovascular and neurovascular affections that have deadly consequences in the group of organs irrigated by the vascular tree.

A consequence of the HTA in the heart is the ventricular hypertrophy, caused by the increase in the amount and size of the heart muscle cells. The hypertrophy is characterized for the growth of the interstitial fibrosis, and in long term, it can damage the cardiac muscle, diminishing the contractile function of the left ventricle.

The adrenergic receptors (RA) are highly important mediators in the homeostasis of the cardiovascular system (SCV), in particular, the  $\alpha_{1D}$  receptors are found in the cells of the arteries.

The objective of this work was to determine if the absence of the RA- $\alpha_{1D}$  has morphological consequences at heart level, using a "knockout" (KO) mice model, developed in 2002 by Tsujimoto, which doesn't have the gene that codifies for the RA- $\alpha_{1D}$ .



## INTRODUCCIÓN

### 1. La hipertensión arterial y sus consecuencias.

La hipertensión arterial (HTA) se caracteriza por ser un trastorno en el que los vasos sanguíneos tienen una tensión persistentemente alta, lo que puede ocasionarles daños (OMS, 2019). Es considerada como una enfermedad cardiovascular crónica, producida por diversos factores: genéticos, ingesta excesiva de sodio, edad, tabaquismo, sedentarismo, obesidad, dislipidemias, diabetes, entre otros (Campos-Nonato *et al.*, 2016). En México 1 de cada 4 adultos padece HTA, la Secretaría de Salud la clasificó como la décima enfermedad más recurrente entre la población mexicana (SSA, 2018). Es además, es uno de los factores que contribuyen en mayor medida a la morbilidad y a la mortalidad cardiovascular (Fuster, *et al.*, 2002).

La HTA era considerada como un padecimiento asociado a la edad, sin embargo, estudios poblacionales han mostrado que esta enfermedad se puede presentar desde edades tempranas, por ejemplo en 2012, la ENSANUT reportó una prevalencia del 1.8% en jóvenes de entre 10-19 años (Katzung B.G, *et al.*, 2010; Oropeza-Abúndez, *et al.*, 2012). Aunque la susceptibilidad genética desempeña un papel importante en la HTA, este podría ser tan **solo permisivo** y necesitaría también uno o más cofactores ambientales, tales como la ingesta de sal, el consumo de alcohol o la ganancia de peso, para inducir el desarrollo de HTA. De todos los factores determinantes de la HTA, la ganancia de peso y la adiposidad, sobre todo la de distribución abdominal, parecen ser los más importantes (Fuster, *et al.*, 2002).

Las personas hipertensas enfrentan graves riesgos cardiovasculares y se necesita intervención a través de modificaciones del estilo de vida, o mediante tratamiento farmacológico para retrasar o evitar las complicaciones posteriores. Los riesgos son proporcionales al valor de la presión arterial a cualquier edad y en ambos sexos (Fuster, *et al.*, 2002). Estudios previos indican que los riesgos de daño renal, cardíaco y cerebral tienen relación directa con el grado de elevación en la presión arterial. A partir de 115/75 mmHg, el riesgo de enfermedad cardiovascular se duplica con cada incremento de 20/10 mmHg. **El daño de órgano terminal** ante el aumento de la presión arterial, es mayor en personas fumadoras o con síndrome

metabólico, (obesidad, dislipidemia, y diabetes). La HTA suele ser asintomática y causa daños en la vasculatura hasta producir alteraciones en órganos, que es entonces cuando suele ser diagnosticada (Katzung, *et al.*, 2010).

La HTA sostenida daña a los vasos sanguíneos, incluyendo a los que se encuentran en los riñones, lo que conduce a mayor incidencia de padecimientos como insuficiencia renal, coronariopatía y apoplejía (Katzung, *et al.*, 2010). La HTA aumenta el riesgo de padecer afecciones cardiovasculares y cerebrovasculares, además tiene consecuencias mortales sobre el conjunto de órganos irrigados por el árbol vascular (Brack, 2009). La insuficiencia cardíaca (IC) es el estadio final de la enfermedad, una vez que el miocardio ha agotado todas sus reservas y sus mecanismos de compensación. La mayor parte de los casos de IC se deben a la HTA, que es la responsable de más del 50% de los casos y su prevalencia se halla en ascenso entre los nuevos casos de IC (Fuster, *et al.*, 2002).

## **1.1 Regulación de la presión arterial**

La presión arterial es mantenida por el gasto cardíaco y la resistencia vascular periférica ejercida sobre arteriolas, vénulas poscapilares y el corazón. Otro sitio de control es el riñón, el cual contribuye al mantenimiento de la presión arterial mediante la regulación del volumen de líquidos. Los barorreflejos, mediados por nervios autónomos, que actúan en combinación con mecanismos como el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) para mantener la presión arterial normal. Finalmente, la secreción de sustancias vasoactivas por el endotelio vascular participan en la regulación y la resistencia vascular. Por ejemplo, la endotelina produce vasoconstricción y el óxido nítrico causa vasodilatación (Katzung, *et al.*, 2010).

### **1.1.1 Mecanismos de elevación de la presión arterial**

La perfusión de sangre a todos los tejidos requiere de presión elevada en el sistema de distribución. El mantenimiento de la presión elevada está garantizado por un conjunto de mecanismos vasoconstrictores. El efecto vasoconstrictor más

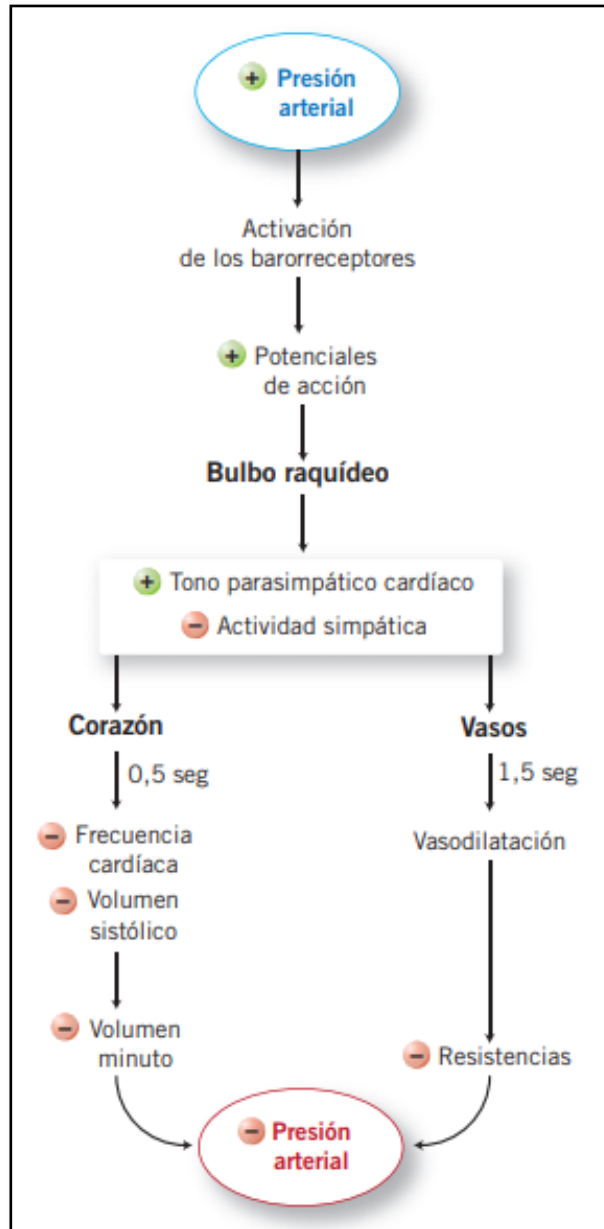
generalizado e importante se produce a través de la activación del Sistema Nervioso Simpático (SNS).

Las abundantes varicosidades simpáticas, cerca de los vasos sanguíneos, liberan noradrenalina, la cual produce vasoconstricción al unirse a los receptores adrenérgicos (RA)  $\alpha_1$  de las células de músculo liso vascular. La acción vasoconstrictora del SNS, no se debe únicamente a la noradrenalina liberada, sino también a los cotransmisores: ATP y neuropéptido "Y". La reducción del tono simpático produce vasodilatación. La actividad del SNS se puede regular de forma generalizada, pero también de manera específica en los distintos territorios. Por ejemplo, si la presión arterial aumenta, se estimulan los barorreceptores del sistema arterial, con lo que se reduce la actividad simpática completa, produciéndose una vasodilatación generalizada que reduce la presión arterial. (Mezquita, *et al.*, 2011).

### **1.1.2 Mecanismos que disminuyen la presión arterial**

En contraste, en condiciones fisiológicas existen un discreto número de mecanismos para reducir la presión arterial, tal como se ilustra en la **Esquema 1**. Uno de ellos es el péptido natriurético auricular (PNA), quien consigue producir una disminución discreta de la presión arterial. El PNA es secretado por la aurícula cuando aumenta el retorno venoso y se distiende la cavidad auricular, ocasionando vasodilatación moderada.

La disminución de la volemia es mayor que la atribuible al aumento de la diuresis y es debida, en parte, a un incremento de la filtración capilar por aumento de la presión capilar y de la permeabilidad venular. La consecuencia de estas acciones es una disminución de la presión arterial (Mezquita, *et al.*, 2011).



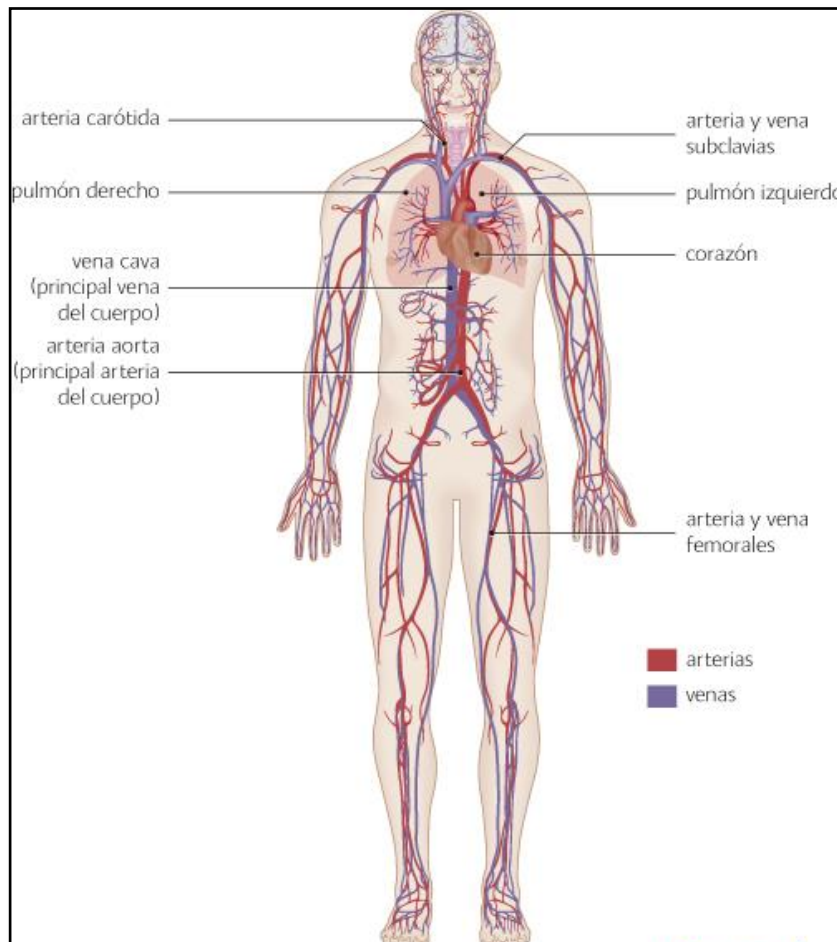
**Esquema 1.** Respuestas evocadas por el aumento de presión arterial para disminuir sus valores.

(Descargado de: <http://biblio.upmx.mx/textos/144068.pdf>)

## 2. El Sistema Cardiovascular (SCV)

El sistema cardiovascular (SCV) está formado por un conjunto de órganos que intervienen en el transporte de sangre y linfa, desde los tejidos del organismo y hacia ellos (Ross & Pawlina, 2012) (**Esquema 2**). La misión de este sistema consiste en transportar oxígeno, elementos nutritivos y otras moléculas esenciales a los tejidos y retirar de ellos los productos de desecho (anhídrido carbónico y productos metabólicos terminales) para llevarlos a los órganos responsables de su

eliminación (pulmones, riñones e hígado) (Fuster, *et al.*, 2002). El SCV se compone por el corazón y los vasos sanguíneos, que conforman la ruta por la cual la sangre circula desde una parte del organismo hacia otra. El corazón bombea la sangre a través del sistema arterial con una presión considerable; la sangre retorna al corazón a baja presión, con la ayuda de la presión negativa que hay en la cavidad torácica durante la inspiración y la compresión de las venas por los músculos esqueléticos (Ross & Pawlina, 2012).



**Esquema 2.** Esquema del sistema cardiovascular, el corazón y pulmones se encuentran conectados a la red de vasos sanguíneos. En rojo se observan las arterias y en azul a las venas.

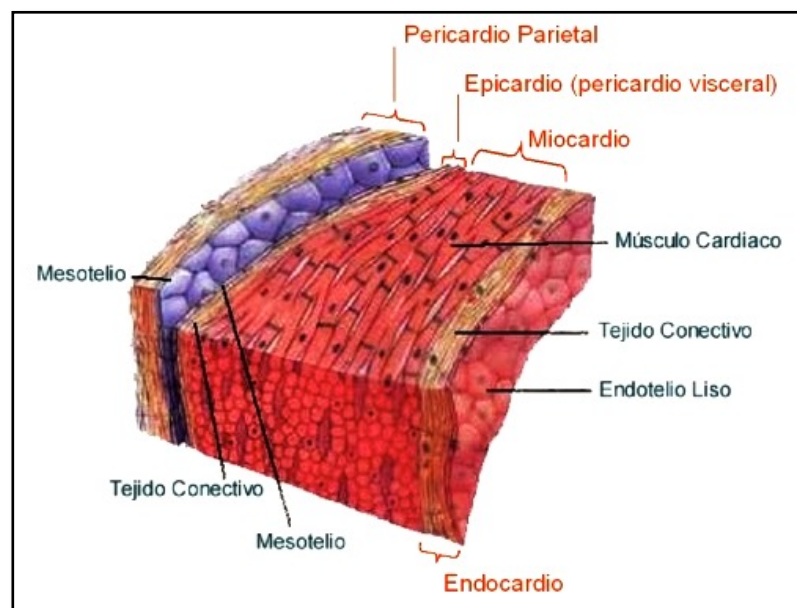
(Descargado de: <https://contenidos.bupasalud.com/salud-bienestar/vida-bupa/sistema-cardiovascular>)

## 2.1 El corazón y su anatomía

El corazón es un órgano de naturaleza muscular, común a todos los vertebrados y a muchos invertebrados, actúa como impulsor de la sangre y en el ser humano está situado en la cavidad torácica (RAE, 2019). Tiene 4 cavidades (los atrios derecho e

izquierdo y los ventrículos derecho e izquierdo), un tabique interatrial y un tabique interventricular separan los lados derecho e izquierdo del corazón. La organización estructural de la pared del corazón es continua en los atrios y los ventrículos. La pared cardiaca está compuesta de 3 capas (**Esquema 3**):

- **Epicardio**.- es la capa externa del corazón. Aquí se encuentran los vasos sanguíneos y nervios que irrigan e inervan el corazón, rodeados por tejido adiposo que ejerce una acción amortiguadora.
- **Miocardio**.- formado por músculo cardíaco. En los ventrículos es más grueso que en los atrios a causa de la presión mayor, necesaria para bombear la sangre a través de las circulaciones pulmonar y sistémica
- **Endocardio**.- conformado por 3 capas: una interna de endotelio y tejido conjuntivo, otra intermedia de tejido conjuntivo y células musculares lisas y finalmente una externa de tejido conjuntivo del miocardio. El sistema conductor de impulsos del corazón está ubicado en la capa subendocárdica.



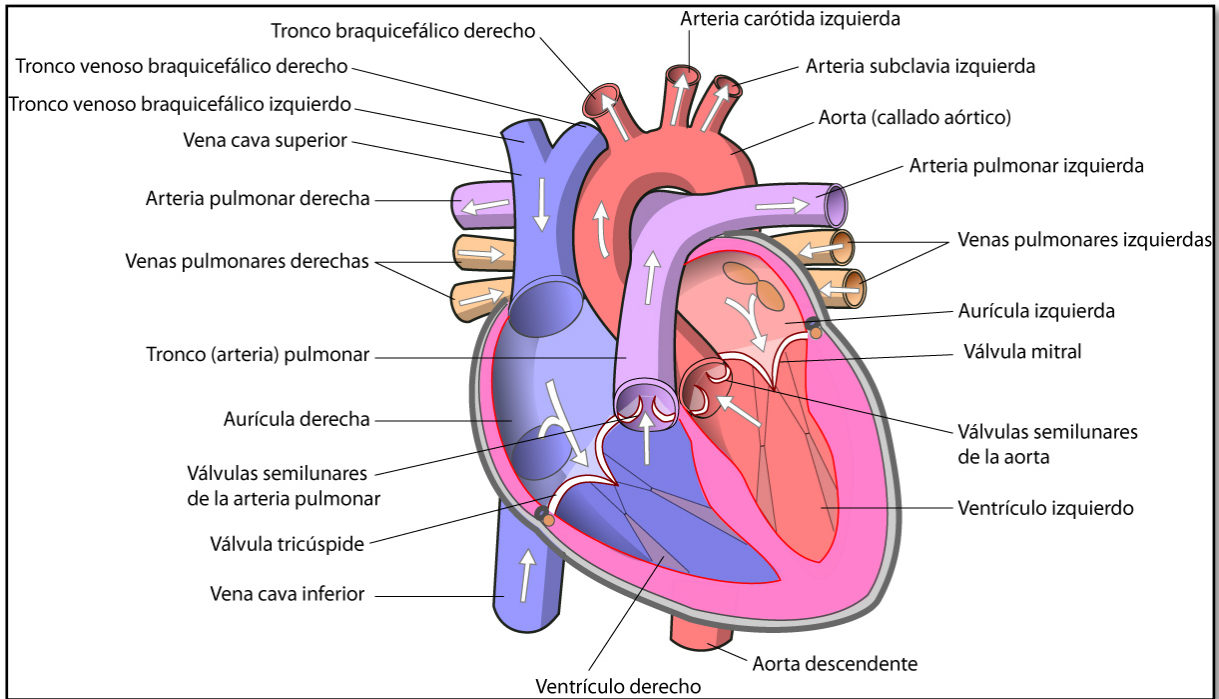
**Esquema 3.** Esquema de un fragmento de la pared cardiaca, en el cual se señalan sus principales capas estructurales. (Descargado de: <http://histologiavudea.blogspot.com/>)

El miocardio es un tejido altamente organizado, compuesto por diferentes tipos celulares que incluyen células de músculo liso, fibroblastos y miocitos cardíacos (Gómez & Piskorz, 2013). El tabique interventricular, es la pared que separa el

ventrículo derecho del ventrículo izquierdo, mientras que el tabique interatrial separa a los atrios, siendo mucho más delgado que el anterior. Con excepción de ciertas regiones focales que son de tejido fibroso, este tabique posee una capa central de músculo cardíaco y un revestimiento de endocardio localizado en la superficie, que está en contacto con cada cavidad atrial (Ross & Pawlina, 2012).

Las válvulas cardíacas (**Esquema 4**) están fijadas al complejo esquelético de tejido conjuntivo denso no modelado, que forma los anillos fibrosos y rodea los orificios atrioventriculares, aórtico y pulmonar (Ross & Pawlina, 2012). Las cuatro válvulas cardíacas están ancladas a sus anillos fibrosos, que a su vez se encuentran localizados en la base del corazón, estos se reúnen para formar el esqueleto fibroso del corazón. La válvula aórtica, de localización central, constituye la piedra angular del esqueleto cardíaco, y sus extensiones fibrosas desembocan en cada una de las tres válvulas restantes. El esqueleto cardíaco no sólo contiene las cuatro válvulas, sino también la porción membranosa del tabique y los trígonos fibrosos intervalvulares, derecho e izquierdo. El esqueleto fibroso cardíaco sirve para aislar eléctricamente las aurículas de los ventrículos (Fuster, *et al.*, 2002). Cada válvula se compone de 3 capas:

- **Fibrosa.-** forma el centro de cada valva y contiene extensiones fibrosas de tejido conjuntivo de los anillos fibrosos del esqueleto cardíaco.
- **Esponjosa.-** fibras de colágeno y elásticas de disposición laxa separadas por una gran cantidad de proteoglicanos. Actúa como amortiguador y confiere flexibilidad y plasticidad a las valvas.
- **Ventricular.-** tejido conjuntivo denso con muchas capas de fibras elásticas. En las válvulas atrioventriculares (VA) continúa en las cuerdas tendinosas, las cuales se extienden desde las VA hacia proyecciones musculares de la pared de los ventrículos llamadas *músculos papilares* (Ross & Pawlina, 2012).



**Esquema 4.** Esquema de la circulación sanguínea a través del corazón, las válvulas cardíacas son las encargadas de controlar el flujo unidireccional de la sangre. (Descargado de: <https://www.educandose.com/el-corazon-humano-anatomia-funcion/>)

### 2.1.1 El Sistema Contráctil

La contracción de los cardiomiocitos ocurre a nivel de las miofibrillas, que son estructuras proteicas celulares adaptadas específicamente a la función contráctil. Las miofibrillas están constituidas por la repetición de sarcómeros en serie (Gómez & Piskorz, 2013).

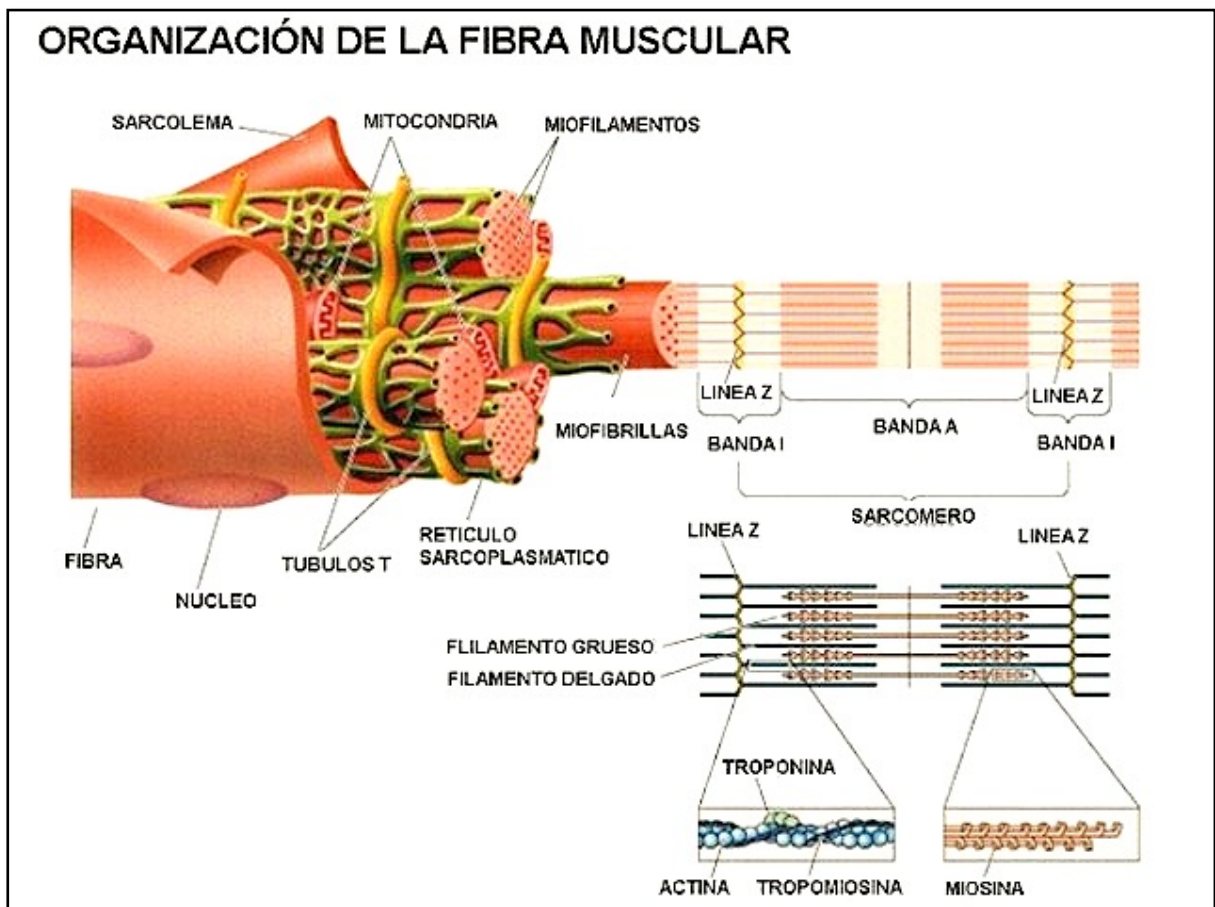
El sarcómero o sarcómera, es la pieza básica del sistema contráctil muscular, una organización repetida de proteínas responsables de la actividad mecánica. Los miocitos adultos pueden aumentar el número y cambiar la disposición de los sarcómeros en respuesta a cambios fisiológicos o patológicos. Un incremento de los sarcómeros elevará la capacidad de producir fuerza, mientras que un aumento en serie incrementará su capacidad de acortamiento.

Cada sarcómero está formado por dos haces de filamentos de orientación longitudinal (**Esquema 5**). Los filamentos gruesos, con longitud aproximada de 1.6 micrómetros, están formados por moléculas de miosina en el centro del sarcómero. En cada extremo de esta estructura, un conjunto de filamentos finos, con longitud de



1 micrómetro y formados por actina, tropomiosina y troponina, se entretrejen con los filamentos gruesos. Los extremos opuestos de los filamentos finos se extienden hasta el final del sarcómero, donde se fijan a una estructura transversal, la línea Z. La distancia entre dos líneas Z consecutivas es la longitud total del sarcómero.

La cadena pesada de la miosina forma enlaces cruzados, la estructura molecular que actúa sobre la actina y que es la responsable de la conversión de la energía química (enlaces de fosfato de alta energía) en energía mecánica (fuerza y movimiento).



**Esquema 5.** Organización estructural de la fibra muscular, el sarcómero es la unidad funcional encargada de la contracción muscular. (Descargado de: <http://histologianimalmencleo.blogspot.com/2015/06/sarcomero.html>)

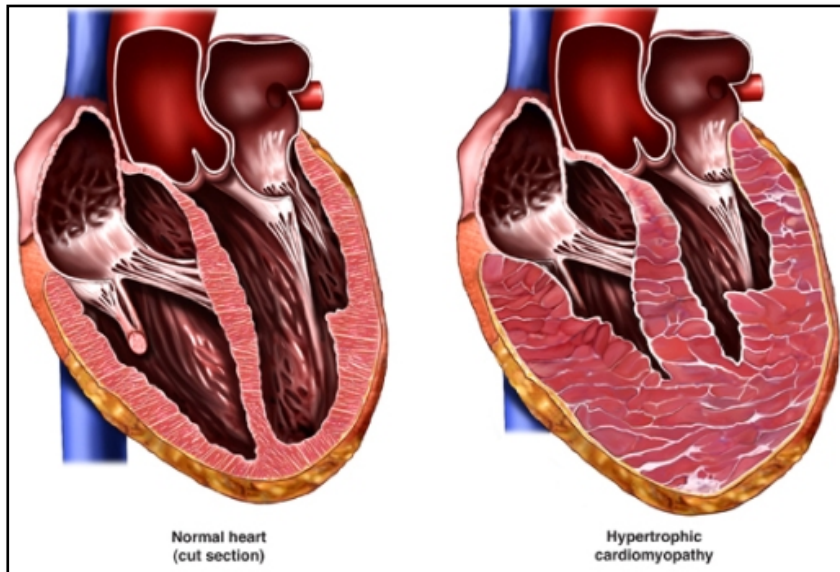
### 2.1.2 Hipertrofia Cardíaca

En respuesta a condiciones de sobrecarga hemodinámica, de presión o de volumen, el corazón responde incrementando su masa, principalmente a expensas del aumento del tamaño de los cardiomiocitos (Ross & Pawlina, 2012), este crecimiento de las células cardíacas es conocido como hipertrofia cardíaca (**Esquema 6**), que se caracteriza por ser un proceso complejo de remodelamiento en el corazón, resultado de estímulos fisiológicos o patológicos. Hay dos tipos de hipertrofia: “fisiológica o adaptativa” y “patológica o maladaptativa” (Cotecchia, *et al.*, 2015).

La hipertrofia fisiológica es resultado del crecimiento normal del corazón desde el nacimiento hasta la adultez, el crecimiento del corazón materno durante el embarazo, y en los atletas como resultado del ejercicio. Se caracteriza por un aumento de tamaño tanto del corazón como de los cardiomiocitos, con una mejora general de la función cardíaca, sin fibrosis (Gómez & Piskorz, 2013).

En contraste, la hipertrofia patológica se caracteriza por sus propiedades metabólicas, estructurales y funcionales anormales, incluyendo fibrosis, muerte celular y disminución de la función (Gómez & Piskorz, 2013). Puede resultar de estrés neurohumoral, como la liberación excesiva de hormonas y citocinas, o diversas formas de estrés hemodinámico, incluyendo infarto miocárdico, hipertensión, isquemia asociada con enfermedad coronaria, disfunciones valvulares o mutaciones heredadas de genes que codifican proteínas contráctiles.

Una consecuencia de la HTA en el músculo cardíaco es la hipertrofia ventricular, causada por aumento de la cantidad y el tamaño de las células musculares cardíacas. En la hipertrofia ventricular la pared cardíaca se torna menos elástica, por lo que el corazón tiene que trabajar más para bombear la sangre, sin embargo, se ha demostrado que la reducción prolongada de la tensión arterial en personas con hipertrofia ventricular por hipertensión puede reducir el grado de hipertrofia (Ross & Pawlina, 2012).



**Esquema 6.** Del lado izquierdo se muestra un corte transversal de corazón sano, mientras que del lado izquierdo se observa el de un corazón hipertrófico. (Descargado de: <https://www.cancercarewny.com/content.aspx?chunkid=258326>)

La hipertrofia ventricular izquierda da lugar a diversas alteraciones funcionales: menor capacidad de vasodilatación coronaria, patrón anormal de llenado diastólico del ventrículo izquierdo y depresión de la mecánica de la pared ventricular izquierda. En el ámbito patológico, la hipertrofia relacionada con la HTA se caracteriza por hipertrofia miocitaria, acompañada de un aumento de la fibrosis intersticial y desestructuración fisiológica de la geometría contráctil miocárdica. A la larga, el mantenimiento de la poscarga aumentada, puede hacer ceder al músculo cardíaco, generando hipertrofia excéntrica que, además de las alteraciones diastólicas, puede asociarse con disminución de la función contráctil del ventrículo izquierdo (Chorro, García & López, 2007).

## 2.2 Regulación del SCV

La actividad del SCV está vigilada por el Sistema Nervioso Central (SNC). En las paredes de los grandes vasos sanguíneos cercanos al corazón y dentro del corazón mismo, hay receptores nerviosos sensitivos especializados que proveen información sobre la tensión arterial, tales como:

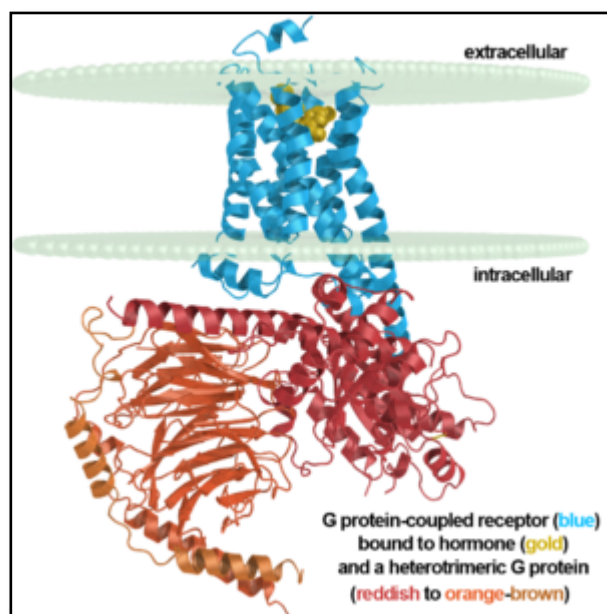
- **Barorreceptores:** receptores de presión alta, ubicados en el seno carotídeo y en el arco aórtico.

- **Receptores de volumen:** receptores de presión baja, situados dentro de las paredes de los atrios y los ventrículos.
- **Quimiorreceptores:** detectan alteraciones en la tensión de oxígeno y dióxido de carbono y en el pH (Ross & Pawlina, 2012).

La regulación homeostática del SCV es controlada por el sistema nervioso autónomo (SNA), es decir, por el sistema nervioso simpático a través de los RA y el sistema nervioso parasimpático a través de los receptores muscarínicos de la acetilcolina. El corazón late en forma independiente de estímulos nerviosos, los nervios autónomos no inician la contracción del músculo cardíaco, sino que regulan la frecuencia cardíaca (efecto cronotrópico). Los cambios en la fuerza y la frecuencia de las contracciones del músculo cardíaco son regulados por hormonas catecolaminas, secretadas desde la médula suprarrenal. Estas hormonas son la adrenalina y la noradrenalina que llegan a las células musculares cardíacas a través de la circulación coronaria (Ross & Pawlina, 2012). Los receptores adrenérgicos (RA) regulan las respuestas fisiológicas mediadas por las catecolaminas en el SCV, además, han sido identificados en patologías como la hipertrofia y la remodelación vascular (Villalobos-Molina & Ibarra, 1999).

### 3. Receptores Adrenérgicos

Los RA pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G, y se han identificado al menos 9 subtipos:  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ , y  $\alpha_{1D}$ ;  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ , y  $\alpha_{2C}$ ; y  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ , y  $\beta_3$ -RA (Guimaraes & Moura, 2001) y todos ellos tienen un papel fundamental en el sistema cardiovascular. Por ejemplo, la activación de los receptores  $\beta$  adrenérgicos en el corazón (**Esquema 7**), por la adrenalina y, con menos eficacia, por la noradrenalina produce aumento en la fuerza de contracción (efecto inotrópico positivo) y en la frecuencia cardíaca (efecto cronotrópico positivo). Las sustancias que ejercen efectos inotrópicos y cronotrópicos negativos sobre el músculo cardíaco comprenden a los antagonistas de los canales de  $Ca^{2+}$ . Estas sustancias disminuyen la frecuencia cardíaca y la fuerza de contracción del músculo cardíaco (Ross & Pawlina, 2012).

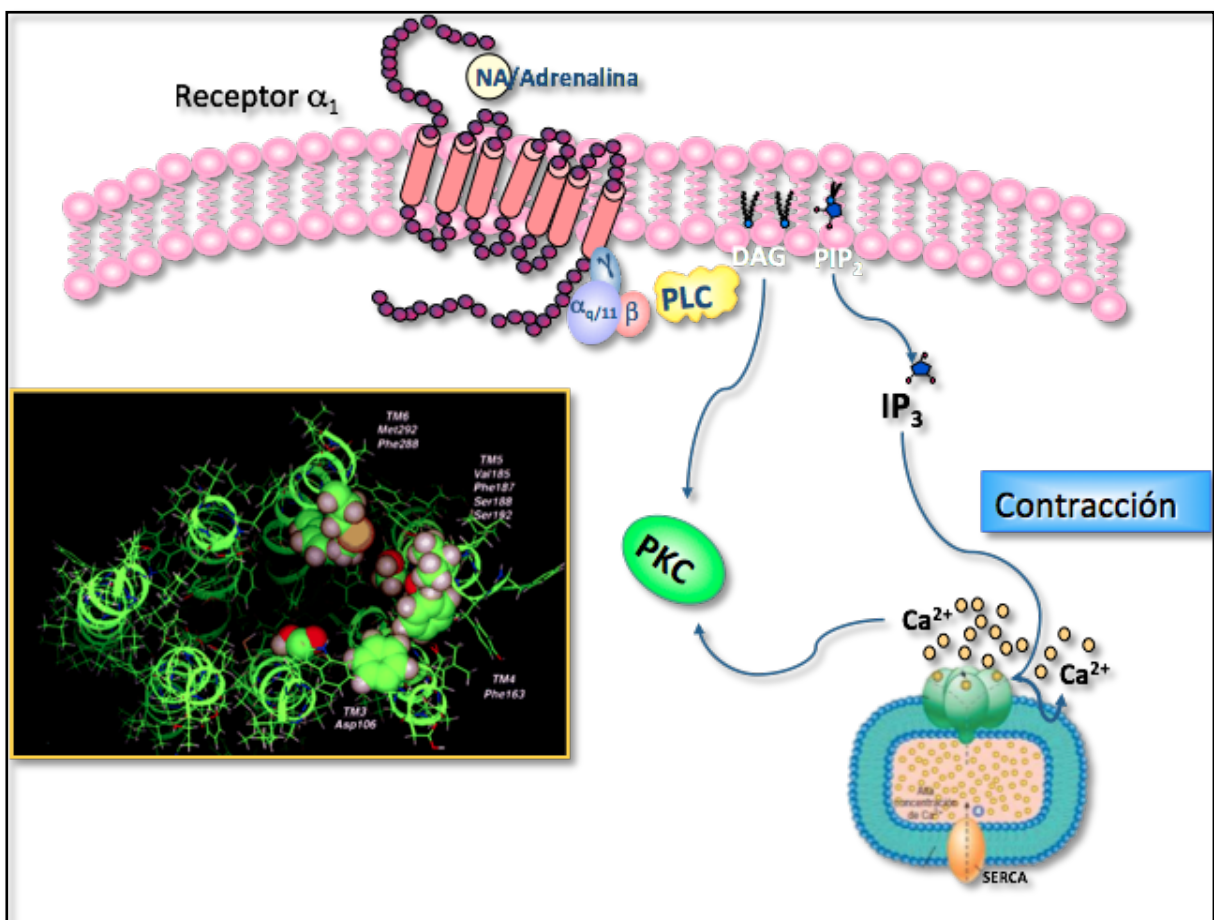


**Esquema 7.** Estructura tridimensional del receptor  $\beta$ -adrenérgico, en azul, con su ligando (dorado) asociado a él y las 3 subunidades que componen a la proteína G, en la porción intracelular (rojo, naranja y café claro). Descargado de: [https://proteopedia.org/wiki/index.php/Beta-2\\_Adrenergic\\_Receptor](https://proteopedia.org/wiki/index.php/Beta-2_Adrenergic_Receptor)

Por otro lado, los RA- $\alpha_1$  han sido identificados por clonación (Docherty, 2010) y análisis farmacológico (Jensen *et al.*, 2014; Cotecchia *et al.*, 2015), aunque la contribución de cada subtipo RA- $\alpha_1$  en las respuestas inducidas por la adrenalina o noradrenalina no están completamente caracterizadas; sin embargo, estos receptores parecen tener un importante papel en funciones cardiovasculares (Cotecchia *et al.*, 2015). En el SCV, los RA- $\alpha_1$  regulan procesos como contracción del músculo cardíaco y músculo liso vascular, proliferación celular y migración, pero también han sido implicados en procesos patológicos como hipertrofia en corazón y músculo liso vascular o arritmias inducidas por isquemia cardíaca (García-Sáinz *et al.*, 1999; Erami *et al.*, 2002; Faber *et al.*, 2007; Jensen *et al.*, 2014; Cotecchia *et al.*, 2015; Gallardo-Ortíz *et al.*, 2015). No ha sido completada la caracterización funcional de los RA- $\alpha_1$ , debido a que los fármacos disponibles son solo moderadamente selectivos y pueden interactuar con otros receptores adrenérgicos y no adrenérgicos, además porque hay tejidos pueden expresar hasta los tres subtipos RA- $\alpha_1$ . Por ello, las implicaciones funcionales de los RA- $\alpha_1$  así como su relevancia fisiológica siguen siendo en gran medida desconocidas.

Estos receptores pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y por tanto presentan 7 dominios transmembranales, que se encuentran

conectados a través de asas intra y extracelulares. Su sistema de señalización está asociado con un aumento de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracelular, ya que al unirse la noradrenalina o adrenalina al receptor, estos sufren un cambio conformacional, produciendo la activación de proteínas Gq/11 que a su vez activan a la fosfolipasa C (PLC- $\beta$ ). Esta enzima hidroliza fosfatidilinositol 4,5 bifosfato para generar 2 segundos mensajeros: el inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG). El IP<sub>3</sub> se une a receptores localizados en la membrana del retículo endoplasmático liberando  $\text{Ca}^{2+}$ . El  $\text{Ca}^{2+}$  liberado actúa sinérgicamente con DAG para activar a la PKC, que a su vez favorece la fosforilación de proteínas específicas (Minneman 1988; Hieble *et al.*, 1995). Además, la activación de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos favorece la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  del medio extracelular a través de canales dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ . El aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular produce contracción del músculo liso vascular, acción que se traducirá en aumento de tensión arterial por vasoconstricción (**Esquema 8**).



**Esquema 8.** Mecanismo de señalización intracelular de los RA- $\alpha_1$  por estimulación de las catecolaminas Adrenalina o Noradrenalina en lechos vasculares.

En cuanto a los RA- $\alpha_{1D}$ , diversos estudios muestran estos receptores están involucrados en la regulación del tono vascular periférico, así como en el origen / mantenimiento de la hipertensión, y se ha asociado con la hipertrofia del músculo liso vascular (Xin et al. 1997; Villalobos-Molina *et al.*, 1999; Tanoue *et al.*, 2002; García-Sáinz & Villalobos-Molina, 2004; Gallardo-Ortíz *et al.*, 2015). Por ejemplo Villalobos e Ibarra, reportaron en 1999, que los RA- $\alpha_{1D}$  son responsables de la génesis y el mantenimiento de la presión arterial alta en ratas espontáneamente hipertensas (SHR), así como en otros modelos de hipertensión, tal como en ratas Dahl (Caveney *et al.*, 1997) y DOCA-sal (Suzuki *et al.*, 1993).

En el corazón, se encuentran expresados los 3 subtipos de RA, sin embargo el subtipo  $\beta_1$  se expresa de forma predominante, manteniendo la función de éste órgano, sin embargo, en el corazón también se expresan receptores  $\alpha_1$ , los cuales sólo parecen tener un papel importante durante estados patológicos como durante la HTA. La abundancia y distribución de los RA- $\alpha_1$  cardíacos de humano y ratón parece ser muy similar, los  $\alpha_{1A}$  y  $\alpha_{1B}$  están expresados predominantemente en miocitos cardíacos, mientras que el  $\alpha_{1D}$  se encuentra en células de músculo liso coronario. No obstante, se ha descrito que la abundancia y función de los RA- $\alpha_1$  es mantenida o aumentada durante el establecimiento de la insuficiencia cardíaca (IC), en contraste con los RA- $\beta$ , que están regulados a la baja y/o se encuentran disfuncionales (Jensen, *et al.*, 2014).

Estudios *in vitro* y en animales han sugerido que los RA- $\alpha_1$  favorecen efectos cardioprotectores a través de procesos adaptativos, tales como la inhibición de la muerte de los cardiomiocitos, síntesis proteica mejorada, aumento en el metabolismo de la glucosa e inotropismo positivo. Ensayos clínicos humanos sugieren que el uso de antagonistas de los RA- $\alpha_1$ , está asociado con un aumento en la incidencia de la IC. Por otro lado, la infusión crónica de un agonista de los RA- $\alpha_1$  causa hipertrofia cardíaca fisiológica sin fibrosis (no patológica), mientras que la estimulación de los RA- $\beta_2$  conduce proliferación de fibroblastos cardíacos (hipertrofia patológica) tanto en roedor como en humano. Así, muchos de los efectos deletéreos de la activación de los receptores acoplados a Gq pueden ser atribuidos a efectos en fibroblastos cardíacos y no en cardiomiocitos (Jensen, *et al.*, 2014).

Los RA- $\alpha_{1D}$  se localizan principalmente en los lechos vasculares, donde median la contracción inducida por agentes adrenérgicos (Villalobos-Molina & Ibarra, 1996; Villalobos-Molina *et al.*, 1997; Arévalo-León *et al.*, 2003), y su expresión funcional *in vivo* tiene gran importante función en el control de la presión arterial (Zhou & Vargas, 1996; Ibarra *et al.*, 1997; Villalobos-Molina *et al.*, 1999). Además evidencias muestran que los RA- $\alpha_{1D}$  se relacionan con la génesis y/o el mantenimiento de la HTA, pues están presentes antes del establecimiento de la HTA, por esta razón se les ha relacionado con la patología y el aumento en el tono simpático en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) (Villalobos-Molina & Ibarra, 1996; Villalobos-Molina *et al.*, 1999; Guimaraes & Moura, 2001; Garcia-Sainz & Villalobos-Molina, 2004). Otros datos también muestran que la estimulación de los RA- $\alpha_1$  por catecolaminas, están involucrados en la hipertrofia y proliferación de células de músculo liso vascular y se les atribuye a los RA- $\alpha_{1D}$  una acción importante en la hipertrofia vascular (Chen *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 1996; Xin *et al.*, 1997).

Derivado de la importancia que tienen los RA- $\alpha_{1D}$  en el sistema cardiovascular, en el 2002 Tsujimoto y colaboradores, desarrollaron un modelo transgénico de ratones, los cuales tienen disrupción del gen que codifica para el RA- $\alpha_{1D}$  (knockout). Este tipo de modelos se logra mediante la localización del gen de interés, posteriormente se diseñan plásmidos para incluir vectores de acompañamiento al gen. Las células madre son transfectadas y se lleva a cabo una recombinación homóloga en la que los plásmidos flanquean la secuencia silvestre original (WT), permitiendo la inserción de un marcador seleccionable, que en este caso es un cassette con el gen de resistencia a la neomicina en el primer exón del genoma del ratón. Esto ocasiona que la proteína expresada sea disfuncional. Después de este proceso, se dice que el gen mutado, es decir, ha sido noqueado (**Esquema 9**) (Wolf & Woodside, 2004).

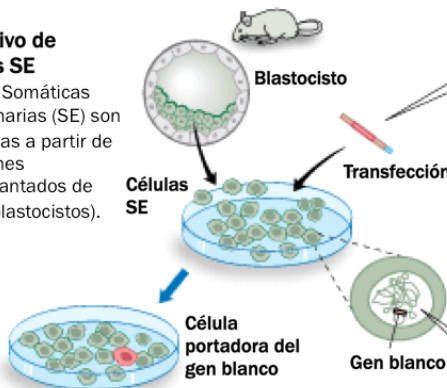


## Estrategia general para la localización de genes en ratón

### Paso 1. Localización del gen en células SE

#### 1. Cultivo de células SE

Células Somáticas Embrionarias (SE) son cultivadas a partir de embriones preimplantados de ratón (blastocistos).

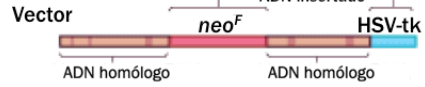


#### 4. Proliferación de células SE

Selección por presencia de *neo<sup>F</sup>* y ausencia de HSV-tk en las células blanco.

Selección positiva-negativa

Población pura de células SE portadoras del gen blanco.

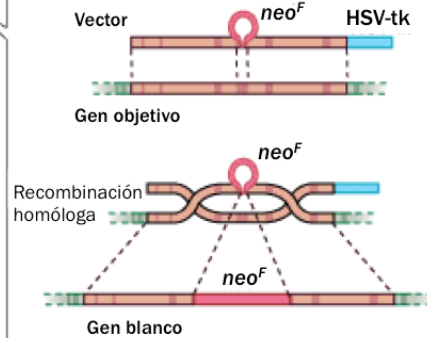


#### 2. Construcción del vector blanco

El vector contiene piezas de ADN que son homólogas al gen blanco, así como ADN insertado que cambia al gen blanco y permite la selección positiva-negativa.

#### 3. Transfección de células SE

La maquinaria celular para la recombinación homóloga permite que el vector localice y se recombine con el gen blanco.



### Paso 2. Desde células SE hasta ratones con el gen de interés

#### 5. Inyección de células SE dentro de blastocistos

Las células SE blanco se inyectan dentro de los blastocistos...

... donde se mezclan y forman un mosaico con las células de la masa celular interna en la cual se desarrolla el embrión.

Los blastocistos inyectados son implantados en una madre subrogada en donde se desarrollan embriones mosaicos.



#### 6. Nacimiento y crianza de ratones mosaico

Los ratones mosaico se cruzan con ratones normales para ambos producir descendientes normales con genes blanco.

Ratones mosaico recién nacidos

Ratón mosaico ♂

Ratón normal ♀



Ratones con el gen blanco inactivo denominados "knockout" (KO)

Ratones normales

© The Nobel Committee for Physiology or Medicine Illustration: Annika Röhl

**Esquema 9.** Proceso mediante el cual se bloquea la expresión de un gen, para la creación de una cepa KO de ratones.

Los estudios realizados por los grupos de Tsujimoto y Villalobos-Molina, entre otros, han demostrado la importancia del RA- $\alpha_{1D}$  a nivel vascular, ya que los ratones KO-

$\alpha_{1D}$  muestran valores de presión arterial basal significativamente más bajos en relación con los ratones silvestres (WT) (Tanoue *et al.*, 2002), así como una menor respuesta contráctil de la arteria aorta (Lázaro-Suárez *et al.*, 2005) y la respuesta presora del lecho arterial mesentérico perfundido (Martínez-Salas *et al.*, 2011) inducida por agonistas  $\alpha_1$ -adrenérgicos. Estos datos llevaron al grupo de Villalobos & Gallardo a proponer que, una posible causa en la reducción de las respuestas vasculares pudiera deberse a cambios morfológicos en la estructura cardiovascular en los ratones KO- $\alpha_{1D}$ . Así, previos datos en nuestro laboratorio demuestran que los vasos arteriales, aorta, carótida, mesentérica, caudal y coronaria, tienen significativamente menor grosor de masa muscular en comparación con las mismas arterias aisladas de ratones WT (datos no publicados). Con estos hallazgos, decidimos evaluar si los ratones KO- $\alpha_{1D}$ , también presentan modificaciones morfológicas en el corazón.

## **JUSTIFICACIÓN**

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la primera causa de muerte a nivel mundial (OMS, 2017), correspondiendo a más del 30% de las muertes en el mundo, donde la mayoría ocurren en países en desarrollo; por ejemplo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó que en 2015 murieron por ECV 17.7 millones de personas (31%), de estas muertes, 7.4 millones se debieron a enfermedad coronaria y se calcula que para el año 2030, 23.6 millones de personas mueran por esta causa (OMS, 2017). En México, las ECV también representan la primera causa de muerte. El Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) reportó 116,002 defunciones en 2015 (Arriaga *et al.*, 2017). La hipertensión es el principal factor de riesgo de ECV, además el control subóptimo de la hipertensión está asociado a daño en órganos, que conducen a hipertrofia cardiovascular, asociada a insuficiencia cardíaca, cardiopatía isquémica, accidente cerebrovascular, disfunción renal, retinopatía y demencia vascular. Por ello, existe una imperante necesidad de entender los mecanismos que subyacen en el desarrollo de las ECV con la finalidad de generar estrategias efectivas para el control adecuado de la hipertensión y/o reversión de la hipertrofia cardíaca.

Tomando en cuenta los estudios previos del laboratorio, sobre la observación que la disminución en el grosor de los lechos arteriales aislados de ratones KO- $\alpha_{1D}$ , resulta

importante identificar si la ausencia de este receptor, también produce cambios morfológicos en la musculatura del corazón de estos mismos animales.

## **HIPÓTESIS**

La expresión disfuncional del RA- $\alpha_{1D}$  modifica la morfología o la estructura del corazón en ratones KO- $\alpha_{1D}$  en comparación con su control silvestre WT.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Estudiar el efecto morfológico de la ausencia del receptor  $\alpha_{1D}$  adrenérgico en la morfología del corazón en ratones KO- $\alpha_{1D}$ .

### **Objetivos Particulares**

- ❖ Identificar el genotipo de los ratones WT y KO- $\alpha_{1D}$  mediante PCR.
- ❖ Determinar por análisis histológico, si la ausencia del RA- $\alpha_{1D}$  modifica la morfología del corazón.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Animales:**

Se utilizaron 6 ratones silvestres de la cepa C57Black/6J (WT) como control, y 6 ratones que carecen del gen que codifica para el RA- $\alpha_{1D}$  (KO- $\alpha_{1D}$ ) como grupo experimental. Los ratones se mantuvieron en ambiente libre de patógenos con temperatura y humedad controladas ( $22 \pm 2$  °C y 40-60% de humedad). Los ciclos de luz/oscuridad son de 12/12 y tienen libre acceso al agua y alimento. El almacenamiento, cuidado y procedimientos experimentales de los animales se realizaron evitando el sufrimiento innecesario, siguiendo las directrices aprobadas por el Comité Institucional de Bioética de nuestra institución para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999, SAGARPA, México).

### **Toma de presión arterial:**

La presión arterial de los ratones fue tomada en el BIOTERIO de la FES Iztacala. Los animales se sometieron a 1 semana de adiestramiento, con la finalidad de que los datos obtenidos fueran lo más cercano a su estado normal. Se utilizó un lector de presión “LF507 automatic blood pressure computer” y un calefactor “LE565015” (Letica, Panlab, España). Los ratones se introdujeron en restrictores de movimiento, posteriormente se colocaron dentro del calefactor el cual es mantenido a una temperatura de 35°C x 15 min, con la finalidad de dilatar las arterias caudales para una mejor detección de los pulsos cardíacos. Posteriormente, se colocó una bomba insufladora, la cual al inflarse ejerce presión en la cola y ocluye la circulación. La señal es detectada por un transductor de presión que a su vez se conecta con la computadora de presión sanguínea para el cálculo de la presión arterial. Se midió la presión arterial de cada ratón 5 veces y se obtuvo el promedio total de cada cepa de ratón.

### **Extracción de ADNg:**

Para la determinación del genotipo de los ratones, se utilizó la técnica de extracción de ADN genómico (ADNg), a partir del centímetro terminal de la cola de ratones. Cada uno de los fragmentos se sometió a un proceso de digestión con 1 ml de una solución SNET (Dodecilsulfato de Sodio, NaCl, EDTA, Tris-HCl pH 8), a la que se le adicionaron 20 µl de proteasa-K. Las muestras se incubaron aproximadamente 12 hrs a 57°C en agitación. Se tomaron 500 µl de cada muestra digerida y se adicionó un volumen igual 500 µl de una mezcla de Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló durante 30 seg en un Vortex y posteriormente fueron centrifugadas a 13,000 rpm a 4°C por 15 min en una centrífuga Sorvall-Pico.

Se tomaron 300 µl de la fase acuosa y se adicionaron un volumen igual 500 µl de isopropanol (Sigma-Aldrich, I9515) frío para precipitar el ADN. Se mezcló por inversión y se incubó durante 4 horas en un ultracongelador a -76°C. Posteriormente se centrifugó nuevamente a 13,000 rpm por 15 min. Se decantó cuidadosamente el sobrenadante y se adicionó 1 ml de etanol al 70% para llevar a cabo una última centrifugación a 13,000 rpm por 15 min. Se decantó la mayor parte del etanol y se dejó abierto el tubo (dentro de una campana de extracción), para permitir la

evaporación del excedente de alcohol. Finalmente, se resuspendieron las muestras en 25 µl de agua inyectable.

Se midió la concentración del ADNg con ayuda de un espectrofotómetro Amersham-Biosciences-Ultrospec 3300 pro, utilizando diluciones de 3 µl de muestra en 300 µl de agua (dilución 1:100) y 1 µl de muestra en 300 µl de agua (dilución 1:300).

### **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):**

Una vez obtenida la concentración de ADNg, se tomó 1 µg de la muestra para ser amplificado mediante PCR. Se utilizó un juego de primers específicos para el RA- $\alpha_{1D}$  y para el cassette de resistencia a la Neomicina (Neo492).

Cada reacción contenía 1 µg de gDNA, “primers upstream” y “downstream” (al 0.2 µM los de RA- $\alpha_{1D}$  y 2.5 µM para los Neo 492), agua inyectable, buffer 1X para PCR, dNTP's al 0.4 mM, MgCl<sub>2</sub> al 1 mM y Taq polimerasa.

El ciclo térmico se realizó con una temperatura de apertura de 94°C por 30 seg, hibridación a 60°C por 30 seg y extensión a 72°C por 1 min, durante 34 ciclos.

La secuencia genética de los primers para el RA- $\alpha_{1D}$  es la siguiente: ( $\alpha_{1D}$ -upstream) CGCTGTGGTGGGAACCGGCAGCGG y ( $\alpha_{1D}$ -downstream) ACACAGCTGCACTCAGTAGCAGGTCA, el tamaño esperado del producto de amplificación (amplicón) es de 282 pb. Para el cassette de resistencia a Neomicina, la secuencia genética de los primers es la siguiente: (Neo492 upstream) AGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTG y (Neo492 downstream) AAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGGCG, el tamaño esperado del amplicón es de 492 pb.

### **Electroforesis en gel de Agarosa**

Se utilizó un gel de agarosa al 1.5% disuelto en buffer TAE 1X (Tris base, ácido acético y EDTA) y adicionado con 3.25 µl de Bromuro de Etidio (0.5µg/ml) En el gel se cargaron 5 µl de DNA con 1 µl de buffer de carga Blue-Juice (Invitrogen) para DNA y 4 µl de H<sub>2</sub>O inyectable en cada pozo. Dicho gel se reveló en un Sistema de documentación en gel, Gel Doc™ EZ, (Marca Biorad), para obtener fotografías de las bandas y determinar el genotipo de los ratones KO.

## Técnica Histológica

Los ratones fueron sacrificados mediante una dosis letal de pentobarbital sódico con la finalidad de evitar el sufrimiento innecesario de los animales.

Se realizó una disección para extraer el corazón, el cual se limpió de residuos de sangre externa y se pesó en una balanza analítica.

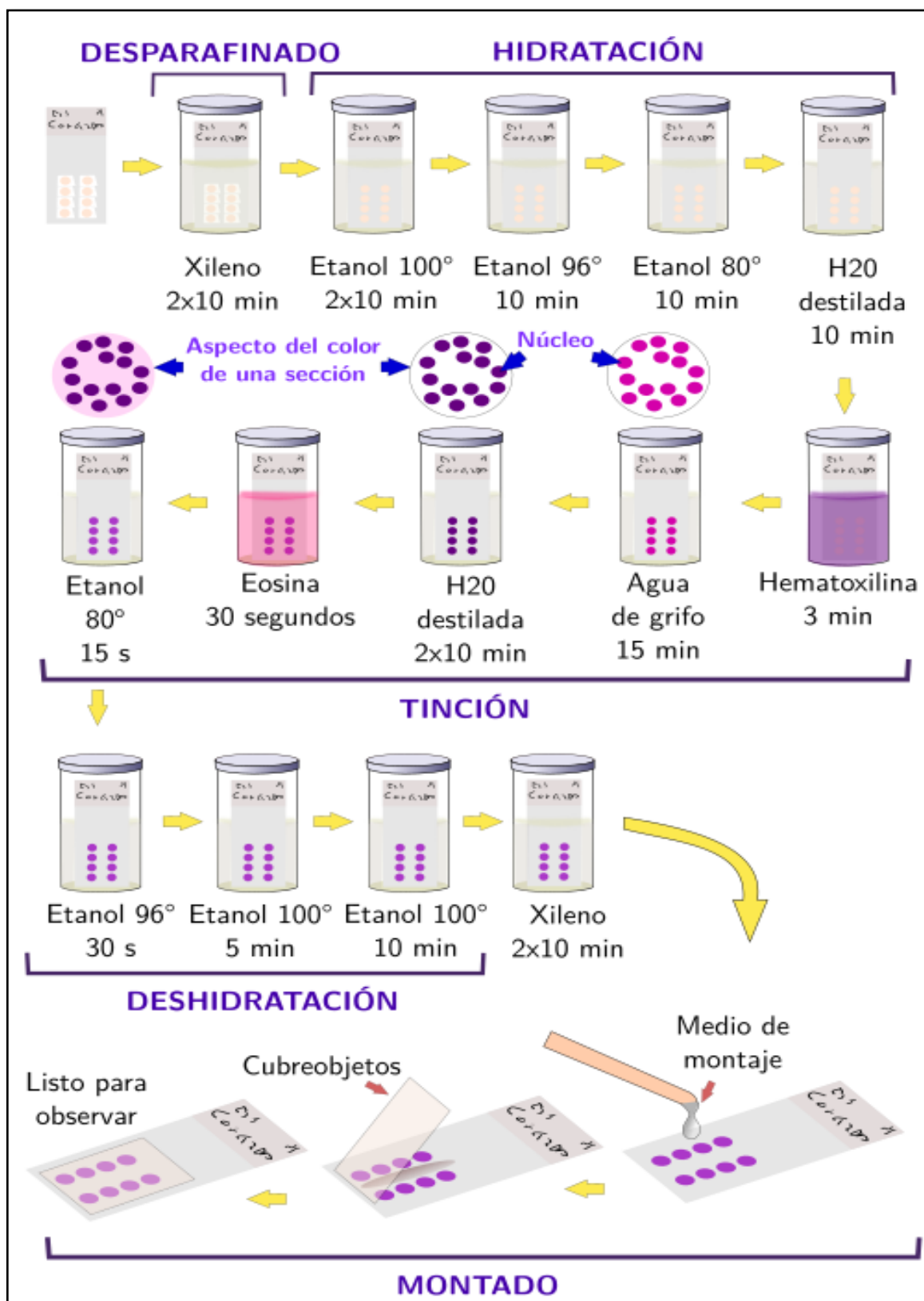
Los corazones limpios se almacenaron durante 24 hrs en paraformaldehído (PFA) al 4%. Transcurridas 24 hrs, los corazones se sometieron a diferentes tiempos y solventes para ser incluidos en parafina y finalmente ser colocados en moldes para formar cubos de parafina de 5x5cm. El procedimiento se indica en la **Tabla 1**.

<b>FIJACIÓN</b>	
PFA 4%	24hrs
<b>LAVADO</b>	
H <sub>2</sub> O (flujo continuo)	30min
<b>DESHIDRATACIÓN</b>	
Alcohol 70%	1.5hrs
Alcohol 80%	1.5hrs
Alcohol 90%	1.5hrs
Alcohol 96%	24hrs
Alcohol I al 100%	1hr
Alcohol II al 100%	1hr
<b>ACLARAMIENTO</b>	
Xilol I	1min
Xilol II	1min
<b>INCLUSIÓN</b>	
Parafina I	1.5hrs
Parafina II	1.5hrs
Parafina III	24hrs

**Tabla 1.** Procesamiento de los corazones aislados de ratones KO- $\alpha_{1D}$  y WT para su inclusión en parafina.

Una vez obtenidos los corazones dentro de cubos de parafina, se hicieron cortes con un microtomo (Leica, RM2125RT) de alto perfil. Los cortes se realizaron a 7  $\mu\text{m}$  de grosor, se extendieron en un baño de flotación con agua destilada y gelatina a 40°C y se montaron sobre portaobjetos silanizados. Una vez obtenidas las laminillas con los cortes de corazón, se introdujeron en un horno a 50°C durante 24 hrs, con el propósito de evaporar la parafina de las muestras.

Después de 24 hrs en el horno, a los cortes de corazón se les aplicó formaldehído al 10%, con la finalidad de fijar las muestras a las laminillas. Finalmente, se sometieron al método de tinción de Hematoxilina-Eosina, el cual permite visualizar los núcleos y el citoplasma de las células. La tinción se realizó con los tiempos y soluciones indicados en la **Tabla 2** e ilustrados en el **Esquema 10**.



**Esquema 10.** Procedimiento para la tinción de hemaoxilina y eosina. Descargado de: <https://i.pinimg.com/originals/7c/70/13/7c70133a4b85adbe05579ef93eceed89.png>



<b>Soluciones</b>	<b>Tiempo</b>
Xilol I	1.5min
Xilol II	1.5min
Xilol + Etanol	1.5min
Etanol 100%	3min
Etanol 96%	3min
Etanol 90%	3min
Etanol 80%	3min
Etanol 70%	3min
Etanol 50%	3min
Agua destilada	5min
Hematoxilina	1.5min
Agua destilada	1min
Eosina	3min
Etanol 50%	3min
Etanol 70%	3min
Etanol 80%	3min
Etanol 90%	3min
Etanol 96%	3min
Etanol 100%	3min
Xilol + Etanol	1.5min
Xilol II	1.5min
Xilol I	1.5min

**Tabla 2.** Tiempos y soluciones para la tinción con Hematoxilina y Eosina de corazones aislados de ratones KO- $\alpha_{1D}$  y WT.

### **Análisis Histológico**

Finalmente, se realizó el análisis histológico en los cortes de corazones aislados de ratones KO- $\alpha_{1D}$  y WT, donde medimos el grosor de los ventrículos derecho e izquierdo, así como el septum. Las mediciones se realizaron en un microscopio La Carl Zeiss (Carl-Zeiss MicroImaging GmbH, Gottingen, Germany).

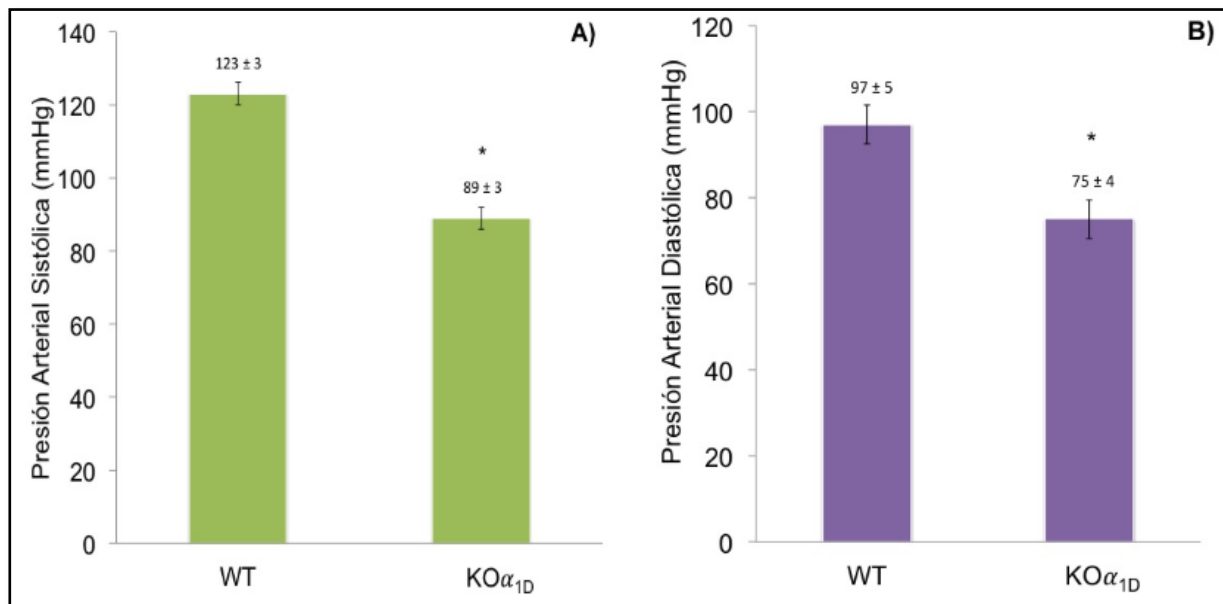
## Análisis estadístico

Los datos representan la media  $\pm$  error estándar (e.e.) de al menos 3 ratones de cada cepa ( $KO\alpha_{1D}$  y WT). Para determinar diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en las mediciones de las 3 áreas evaluadas de los corazones, se realizó un análisis estadístico utilizando la prueba de *t*-Student

## RESULTADOS

### Medición de la Presión Arterial en ratones WT y $KO\alpha_{1D}$ por pletismografía

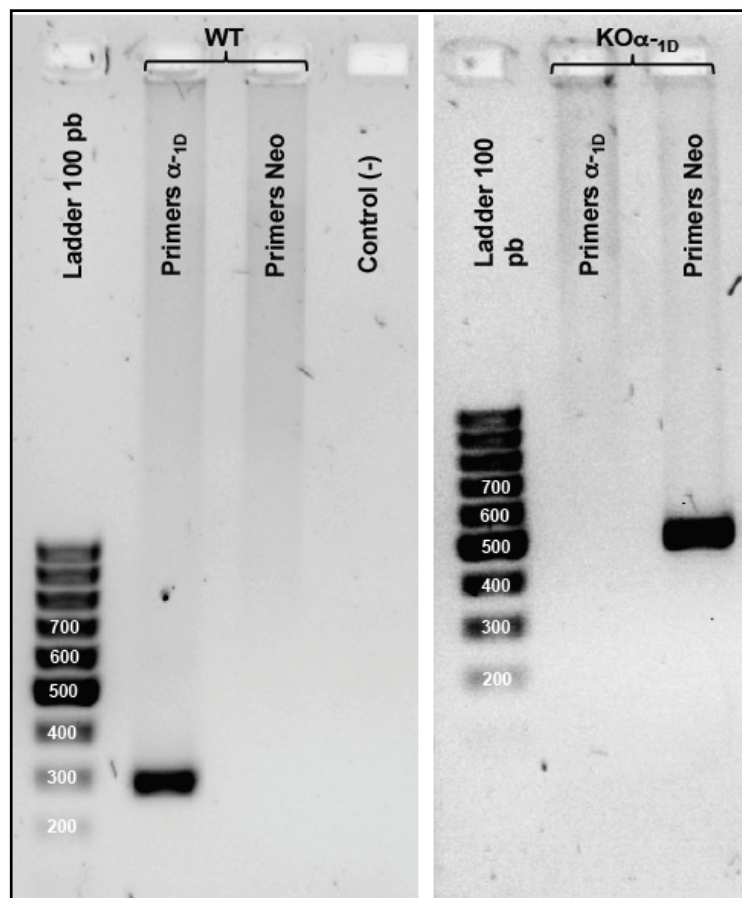
La pletismografía, es un método indirecto no invasivo, que registra el pulso sistólico de la presión arterial caudal de los ratones, en este caso, se utilizó para determinar la presión arterial basal de ratones WT y  $KO\alpha_{1D}$  con la finalidad de determinar si entre las dos cepas evaluadas existe diferencia. Encontramos que los valores basales de presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD), son significativamente menores en ratones  $KO\alpha_{1D}$  comparado con los ratones control/silvestre WT (**PAS**:  $89 \pm 3$  mm Hg VS  $123 \pm 3$  mm Hg y **PAD**:  $75 \pm 4$  VS  $97 \pm 5$  mm Hg en ratones  $KO\alpha_{1D}$  y WT respectivamente), **Figura 1**.



**Figura 1.** Valores de presión arterial sistólica (A) y diastólica (B) de ratones WT y  $KO\alpha_{1D}$  determinados por pletismografía. Los valores representan el valor promedio de 6-8 ratones  $\pm$  error estándar. (*t*-Student, \* $P < 0.05$  vs WT).

## Confirmación del genotipo

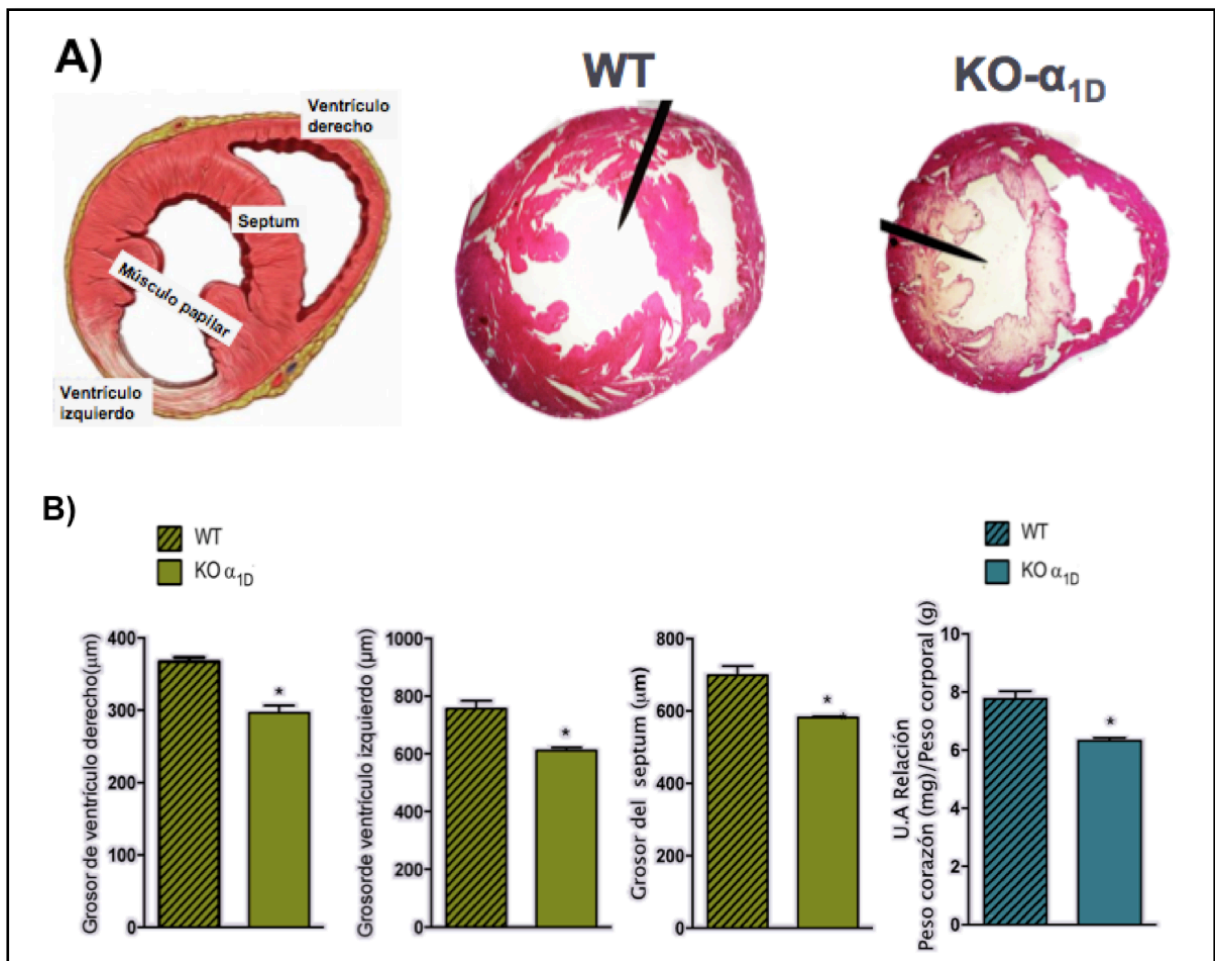
Con la finalidad de confirmar que las cepas de los ratones  $KO\alpha_{1D}$  y WT ratones conservaban sus genotipos homocigotos  $\alpha_{1D}^{+/+}$  (KO) y  $\alpha_{1D}^{-/-}$  (WT), se procedió realizar la genotipificación tomando las secuencia y condiciones de amplificación facilitadas por el grupo de Tsujimoto (Tanoue., et al., 2005) y las modificaciones realizada por (Lázaro-Suárez et al., 2011). Para ello utilizamos ADNg aislado de las colas de los ratones  $KO\alpha_{1D}$  y WT, los cuales sometimos a PCR, utilizando las condiciones de amplificación antes mencionadas, que nos permitió obtener una única banda en 282 pb correspondiente el RA- $\alpha_{1D}$  y una banda en 492 pb correspondiente al gen de Neomicina. El patrón de expresión se muestra en la **Figura 2**, donde observamos para los ratones silvestres (WT), solo la banda de 282 pb correspondiente al RA- $\alpha_{1D}$  con ausencia de la banda de 492 pb; mientras que el patrón de bandas para los ratones  $KO\alpha_{1D}$ , fue solo la banda de 492 pb correspondiente al cassette de Neomicina con ausencia de la banda del RA- $\alpha_{1D}$ .



**Figura 2.** Patrón de expresión por electroforesis en geles de agarosa al 2%. Genotipo de los ratones silvestre (WT) con una única banda en 282 pb y para ratones  $KO\alpha_{1D}$  con una banda única en 492pb.

## Análisis Histológico

Previos datos del laboratorio, mostraron que los todos los lechos arteriales derivados de ratones KO- $\alpha_{1D}$  tenían una marcada disminución en el grosor de la masa muscular lisa comparado con su control WT, por lo que la pregunta a evaluar fue si este mismo fenómeno se observaba en la musculatura cardiaca. El análisis histológico y estadístico demostró que en los corazones aislados de ratones KO- $\alpha_{1D}$  también tienen menor grosor en la musculatura de los ventrículos derecho, izquierdo y septum en comparación con los corazones aislados de ratones WT. Además, el índice alométrico (relación peso del corazón/peso corporal) confirma esta misma observación, es decir que la musculatura cardiaca de ratones carentes del RA- $\alpha_{1D}$  se encuentran disminuidos (**Figura 3**).



**Figura 3.** Análisis histológico. **A)** Diagrama y fotografías representativas de cortes de corazón de ratones WT y KO $\alpha_{1D}$ . **B)** Mediciones del grosor de los ventrículos izquierdo, derecho y septum, así como la relación alométrica (peso corazón/peso corporal) de de ratones WT y KO $\alpha_{1D}$ . Los datos representan el valor promedio  $\pm$  error estándar de 3-4 ratones de cada cepa. \*P < 0.05, t-Student.

## DISCUSIÓN

El presente estudio evidencia el importante papel del RA- $\alpha_{1D}$ , en la morfología cardiovascular, de manera específica en este trabajo se demuestra su participación en la morfología del corazón.

Previos datos en el laboratorio, demuestran que la ausencia del RA- $\alpha_{1D}$  en ratones, produce una significativa disminución en el grosor de la musculatura vascular de los lechos arteriales: aorta, carótida, mesentérica, caudal y arteria coronaria aislados de ratones KO $\alpha_{1D}$ , en comparación con su control WT (datos no publicados), lo que sugiere que este subtipo de receptor adrenérgico participa no solo en la contracción de los vasos sanguíneos, sino que también en la morfología de los vasos sanguíneos.

Por otro lado, el análisis histológico en corazones aislado de ratones KO- $\alpha_{1D}$ , sorprendentemente, también muestran una marcada disminución en el grosor de los ventrículos y septum, en comparación con el grupo WT, lo que hace evidente la importancia de este receptor en la morfología del corazón, aun cuando el RA $\alpha_{1D}$ , de manera normal no parece jugar un papel importante en la fisiología de éste órgano.

Datos en la literatura reportan que las acciones de las catecolaminas sobre receptores  $\alpha_1$ , están relacionadas a condiciones fisiológicas o patológicas (Chalothorn et al. 2003; Zhang et al. 2004; Faber et al. 2007; Jensen et al. 2014; O'Connell et al. 2014). En cuanto al corazón, vale la pena mencionar que los 3 subtipos de RA $\alpha_1$  están expresados (Cotecchia et al. 2015; Jensen et al., 2014), pero su papel fisiológico aún es desconocido. Otros autores sugieren que la estimulación de los RA $\alpha_{1D}$ , se relaciona con hipertrofia fisiológica y patológica en miocitos, por lo que se ha involucrado a este subtipo de RA $\alpha_1$  en la insuficiencia cardíaca (Zhang et al., 2004; Jensen et al., 2014; Cotecchia et al., 2015). Sin embargo, poco se sabe acerca de la ausencia de estos receptores, y aquí mostramos que la ausencia del RA $\alpha_{1D}$ , parece estar involucrada en la disminución de la masa muscular del corazón.

Nuestros valores de presión arterial en ratones WT y KO- $\alpha_{1D}$ , presentan un patrón similar al reportado por el grupo del Tsujimoto (Tanoue et al., 2002), sin embargo, nuestros datos hacen sugerir que la disminución en la presión arterial presente en

ratones KO- $\alpha_{1D}$ , puede estar relacionada a la disminución de la masa muscular vascular de las arterias, así como a la disminución en la musculatura cardíaca. Vale la pena comentar que cuando se generaron estos ratones KO- $\alpha_{1D}$ , por el grupo de Tsujimoto (Tanoue et al., 2002), reportaron que el corazón de estos animales no se observan cambios morfológicos, sin embargo, en nuestro caso, encontramos que si sólo graficamos el peso de los corazones de los ratones KO- $\alpha_{1D}$  y WT, tampoco encontramos diferencias entre los dos grupos, pero al realizar el análisis de la relación alométrica (peso del corazón/ peso corporal) encontramos que hay una disminución importante en el corazón aislado de ratones KO- $\alpha_{1D}$  en comparación con el grupo WT, además nosotros observamos en el análisis histológico, una clara disminución en la masa cardíaca en cada todos corazones de los ratones KO, en comparación con los ratones silvestres. Por otro lado, y no menos importante, nuestro grupo ha descrito que el RA- $\alpha_{1D}$ , está involucrado en la génesis y el mantenimiento de hipertensión, ya que el bloqueo de este receptor con el antagonista del RA- $\alpha_{1D}$ , BMY-7378, se previene y/o revierte tanto la hipertensión arterial como la hipertrofia vascular (Villalobos e Ibarra en 1999; Gallardo-Ortíz *et al.* 2015) es decir, hay varias evidencias que demuestran que el RA- $\alpha_{1D}$ , tiene una función importante en el proceso de remodelamiento vascular y en el control de la presión arterial.

En este mismo sentido, Cotecchia en 2015, reportó que, durante la IC, los RA- $\alpha_{1D}$  tienen un papel compensatorio y protector en el corazón. Además, de que la estimulación de los RA- $\alpha_1$  induce hipertrofia cardíaca, demostrando con ello un efecto directo de las catecolaminas en el crecimiento del corazón (Cotecchia *et al.* 2015).

## **CONCLUSIÓN**

Nuestros datos sugieren fuertemente que, la ausencia del RA- $\alpha_{1D}$  tiene consecuencias importantes no solo en la regulación y el mantenimiento de la presión arterial, sino también en la morfología del corazón, ya que la produce una marcada disminución en la masa de es éste órgano.

## REFERENCIAS.

Oropeza-Abúndez C., Reveles F., García-Letechipia J. J., Voghel-Gutiérrez S., Gómez-Ocampo Y., Castro-Mondragón A. & Tovar-Hernández R.

Arévalo-Leon LE, Gallardo-Ortiz IA, Urquiza-Marin H & Villalobos-Molina R. 2003. Evidence for the role of alpha1D- and alpha1A-adrenoceptors in contraction of the rat mesenteric artery. *Vascul Pharmacol.* 40, 91-96.

Arriaga-Dávila J., Pérez-Rodríguez G. & Borrayo-Sánchez G. 2017. Quality dimensions focused on the healthcare protocol Infarction Code (Código Infarto). *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 55:382–387.

Brack M. 2009. La hipertensión arterial: cómo prevenirla y curarla. Editorial Hispano-Europea. España.

Caveney SW, Taylor DA, Fleming WW. 1997. Examination by radioligand binding of the alpha1 adrenoceptors in the mesenteric arterial vasculature during the development of salt-sensitive hypertension. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 356:374

Chen L, Xin X, Eckhart AD, Yang N & Faber JE. 1995. Regulation of vascular smooth muscle growth by alpha 1-adrenoreceptor subtypes in vitro and in situ. *J Biol Chem* 270, 30980-30988.

Chorro F. J., García C. R. & López M. V. 2007. *Cardiología clínica.* Universidad de Valencia. España.

Cotecchia S. Del Vescovo C. D., Colella M., Caso S. & Diviani D. 2015. The alpha1-adrenergic receptors in cardiac hypertrophy: signaling mechanisms and functional implications. *Cell Signal.* Oct;27(10):1984-93.

Docherty J. R. 2010. Subtypes of functional  $\alpha_1$ -adrenoceptor. *Cell Mol Life Sci.* 67:405-417.

Campos-Nonato I., Hernández-Barrera L., Pedroza-Tobías A., Medina C. & Barquera S. 2016. Hipertensión arterial en adultos mexicanos: prevalencia, diagnóstico y tipo de tratamiento. ENSANUT. Salud Publica Mex 60:233-243.

Ennis I. & Yeves A. M. 2013. Fisiopatología de la hipertrofia cardíaca: Hipertrofia cardíaca fisiológica y patológica. Hipertensión Epidemiología, fisiología, fisiopatología, diagnóstico y terapéutica.

Erami C., Zhang H., Ho J. G., French D. M. & Faber J. E. 2002.  $\alpha_1$ -Adrenoceptor stimulation directly induces growth of vascular wall in vivo. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 283:H1577-H1587.

Faber J. E., Szymeczek C. L., Cotecchia S., Thomas S. A., Tanoue A. & Tsujimoto G. 2007. Alpha1-adrenoceptor-dependent vascular hypertrophy and remodeling in murine hypoxic pulmonary hypertension. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 292:H2316-H2323.

Fuster V., Wayne R. & O'Rourke R. 2002. Hurst: El Corazón. 10<sup>o</sup>ed. Vol 1. McGraw Hill Interamericana. España.

Gallardo-Ortíz I. A., Rodríguez-Hernández S. N., López-Guerrero J. J., Del Valle-Mondragón L., López-Sánchez P., Touyz R. M. & Villalobos-Molina R. 2015. Role of  $\alpha_1$ -adrenoceptors in vascular wall hypertrophy during angiotensin II-induced hypertension. Auton Autacoid Pharmacol. 35:17-31.

García-Saíenz J. A. & Villalobos-Molina R. 2004. The elusive  $\alpha_{1D}$  -adrenoceptor molecular and cellular characteristics and integrative roles. Eur J Pharmacol. 500: 319-356.

Gómez-Llambí H. & Piskorz D. 2013. Hipertensión Arterial, epidemiología, fisiología, fisiopatología, diagnóstico y terapéutica. Sociedad Argentina de Hipertensión Arterial. Ciudad Autónoma de Buenos Aires.



González F. J. y Fernández S. P. 1998. The aryl hydrocarbon receptor: studies using the AHR-null mice. *Drug Metab Dispos.* 26(12):1194-8.

Guimaraes S. & Moura D. 2001. Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol Rev.* 53:319-356

Hieble J. P., Bylund D. B., Clarke D. E., Eikenburg D. C., Langer S. Z., Lefkowitz R. J., Minneman K. P. & Ruffolo R. R. 1995. International Union of Pharmacology. X. Recommendation for nomenclature of alpha 1-adrenoceptors: consensus update. *Pharmacol Rev.* 47(2):267-70. Review.

Ibarra M., Terrón J. A., López-Guerrero J. J. & Villalobos-Molina R. 1997. Evidence for an age-dependent functional expression of alpha 1D-adrenoceptors in the rat vasculature. *Eur J Pharmacol.* 19;322(2-3):221-4.

Jensen B. C., O'Connell T. D. & Simpson P. C. 2014. Alpha-1-Adrenergic Receptors in Heart Failure: The Adaptive Arm of the Cardiac Response to Chronic Catecholamine Stimulation. *J Cardiovasc Pharmacol.* 63(4): 291–301.

Katzung B. G., Masters S. B. & Trevor A. J. 2010. *Farmacología básica y clínica.* 11<sup>a</sup> ed. Mc Graw Hill. México.

Lázaro-Suárez M. L., Gómez-Zamudio J. H., Gallardo-Ortíz I. A., Tanoue A., Tsujimoto G., Farias-Rodríguez V. M. & Villalobos-Molina R. 2005. Chloroethylclonidine reveals that alpha (1 A)-adrenoceptors mediate contraction in aorta of alpha (1 D)-adrenoceptor knockout mice. *Auton Autacoid Pharmacol.* 25(4):179-83.

Lázaro-Suárez M. L., Gómez-Zamudio J. H., Delgado-Buenrostro N. L., Tanoue A., Tsujimoto G. & Villalobos-Molina R. 2011. Angiotensin II modifies the expression of  $\alpha(1)$ -adrenoceptors in aorta smooth muscle cells of  $\alpha(1D)$ -adrenoceptor knockout mice. *Auton Autacoid Pharmacol.* 31(3-4):57-63.

Martínez-Salas S. G., Campos-Peralta J. M., Pardo J. P., Hernández-Muñoz R., Ibarra M., Tanoue A., Tsujimoto G. & Villalobos-Molina R. 2011.  $\alpha(1D)$ -Adrenoceptor regulates the vasopressor action of  $\alpha(1A)$ -adrenoceptor in mesenteric vascular bed of  $\alpha(1D)$ -adrenoceptor knockout mice. *Auton Autacoid Pharmacol.* 31(3-4):64-71

Mezquita P. C., Mezquita P. J., Mezquita M. B., & Mezquita M. P. 2011. *Fisiología Médica: del razonamiento fisiológico al razonamiento clínico.* Editorial Médica Panamericana. España.

Minneman K. P. 1988. Alpha 1-adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates, and sources of cell  $Ca^{2+}$ . *Pharmacol Rev.* 40(2):87-119.

Organización Mundial de la Salud. 2017. *Enfermedades Cardiovasculares.* Recuperado de: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))

Organización Mundial de la Salud. 2019. *Hipertensión.* Recuperado de: <https://www.who.int/topics/hypertension/es/>

Ross M. H. & Pawlina W. 2012. *Histología: Texto y atlas color con Biología celular y molecular.* Editorial Médica Panamericana. Argentina.

Secretaría de Salud. 2018. *Veinte principales causas de enfermedad Nacional, por grupos de edad. Estados Unidos Mexicanos. Población General.* Recuperado de: [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2018/morbilidad/grupo/veinte\\_principales\\_causas\\_enfermedad\\_nacional\\_grupo\\_edad.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2018/morbilidad/grupo/veinte_principales_causas_enfermedad_nacional_grupo_edad.pdf)

Suzuki S., Takata Y., Kubota S., Ozaki S. & Kato H. 1993. Characterization of the alpha-1 adrenoceptors in the mesenteric vasculature from deoxycorticosterone-salt hypertensive rats: studies on vasoconstriction, radioligand binding and postreceptor events. *J Pharmacol Exp Ther.* 268:576.

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

Tsujimoto G., Nasa Y., Koshimizu T., Shinoura H., Oshikawa S., Kawai T., Sunada S., Takeo S. & Tanoue A. 2002. The  $\alpha_{1D}$ -adrenergic receptor directly regulates arterial blood pressure via vasoconstriction. *J Clin Invest.* 109, 765–775.

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

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

Villalobos-Molina R. & Ibarra M. 1999. Vascular alpha 1D-adrenoceptors: are they related to hypertension? *Arch Med Res.* 30, 347-52.

Wolf E. & Woodside K. 2004. Transgenic and Gene Knock-Out Techniques and Burn Research. *J Surg Res.* 123, 328-39.

Xin X, Yang N, Eckhart AD & Faber JE. 1997. Alpha1D-adrenergic receptors and mitogen-activated protein kinase mediate increased protein synthesis by arterial smooth muscle. *Mol Pharmacol.* 51, 764-775

Yu SM, Tsai SY, Guh JH, Ko FN, Teng CM & Ou JT. 1996. Mechanism of catecholamine-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circulation.* 94, 547-554.

Zhou L. & Vargas H. M. 1996. Vascular alpha 1D-adrenoceptors have a role in the pressor response to phenylephrine in the pithed rat. *Eur J Pharmacol.* 305, 173-176.