

T
464

 XUCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

82401



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Xochimilco

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS
MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:
INVESTIGACIÓN FITOFARMACOLÓGICA

DESENSIBILIZACIÓN DE RECEPTORES α_1 ADRENÉRGICOS
EN MUSCULO LISO VASCULAR

IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS
P R E S E N T A
QFB JESÚS DAVID GÓMEZ RODRÍGUEZ
MATRÍCULA: 203181603

COMITÉ TUTORIAL
TUTOR: DR. RAFAEL VILLALOBOS MOLINA
ASESORA: DRA. MARISA CABEZA SALINAS
ASESOR: HECTOR PONE MONTER

MÉXICO D.F.

ABRIL 2005

FIRMAS DE CONFORMIDAD DEL COMITÉ TUTORIAL



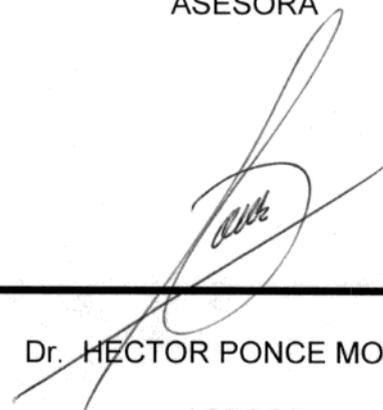
Dr. RAFAEL VILLALOBOS MOLINA

TUTOR



Dra. MARISA CABEZA SALINAS

ASESORA



Dr. HECTOR PONCE MONTER

ASESOR

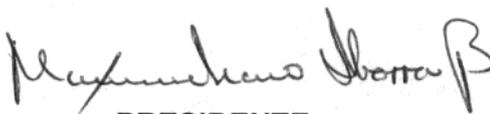


ALUMNO: QFB JESÚS DAVID GÓMEZ RODRÍGUEZ

MATRÍCULA. 20181603

**TITULO DEL PROYECTO
DESENSIBILIZACIÓN DE RECEPTORES α_1 ADRENÉRGICOS
EN MUSCULO LISO VASCULAR**

JURADO DE EXAMEN DE GRADO



**PRESIDENTE
DR. MAXIMILIANO IBARRA BARAJAS**



**VOCAL
DRA. GILDA FLORES ROSALES**



**SECRETARIA
DRA. MARISA CABEZA SALINAS**

AGRADECIMIENTOS

A DIOS, por todo lo maravilloso que me ha dado.

A MIS PADRES, Tadeo y Adelina, por darme la vida y por todas las cosas que me han enseñado, y espero que dios me los conserve por muchísimo tiempo.

A MIS HERMANOS, Luis y Bane, por haber formado una maravillosa familia, y enseñarme a madurar en los momentos difíciles.

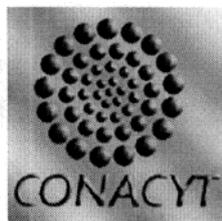
A MI HERMANA, Sara (Q.E.P.D.) por que me hubiera gustado compartir mis logros con ella.

A MI GENERACIÓN, Luigi, Mary, Zaida, Ana, David, Paty, Rodrigo, Cata y Daniel, por su valioso apoyo y me impulsaron en todo momento.

A MIS COMPADRES, Toño, Alejandro y Angeles. por su apoyo y enseñarme a ver la vida de diferente forma.

A MIS AMIGOS, Mario, Odi, Emmanuel, Cesar, Chabelita, Raziell, Ricardo, Gladis, Erick y Claudia (UAM) Juan Pablo, Juan Javier, Jaime, Martha, Itzell, Froy, Lucia, Rogelio, Ricardo, Lupita, Marcia, Daniel y Maru (CINVESTAV) Paco, Jorge, Rolffy, Zulema, Ayulia, Giovanni, Oscar, Lizeth, Dana, Coral, Rola y Veloz (UAEM). Por su inmensa calidad humana, su paciencia, su amistad, su apoyo y por los inmemorables momentos compartidos.

A LOS INVESTIGADORES, Dr. Samuel Estrada, Dr. Adolfo García Sainz, Dr. Max. Ibarra, Dr. Pedro López, Dr. Alfredo Meneses, Dr. Ricardo Mejia, Dr. Carlos T. Quirino, Dr. Jaime Kravzov, Dra. Paty Casas, Dra. Laura Castrillon y en especial al **Dr. Rafael Villalobos Molina**, a la **Dra. Marisa Cabeza Salinas** y al **Dr. Héctor Ponce Monter** por su valioso apoyo, colaboración, sugerencias, desarrollo y evaluación de este trabajo.



Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante seis meses con el proyecto 36230-N.

RESUMEN

La desensibilización es un proceso que se caracteriza por pérdida de la respuesta celular, se trata generalmente de una respuesta de protección celular ante una estimulación continua del agonista sobre el receptor. Este proceso es un componente importante en la capacidad de regular la activación celular y tiene evidentes consecuencias de carácter fisiológico y patológico. La función de los adrenoreceptores α_1 y de muchos otros tipos parecen estar regulados por la fosforilación, en otras palabras el estado de fosforilación del receptor parece modular su sensibilidad y por consiguiente la respuesta celular (García-Sáinz y col., 2001).

El proceso de desensibilización de los adrenoreceptores α_1 es de particular interés, debido a su importancia en el control de varios procesos fisiológicos como la presión arterial y la regulación del tono de los vasos sanguíneos y a que no se cuenta con suficiente información que permita establecer como es la regulación de estos receptores.

El objetivo de este estudio fue el de identificar los diferentes subtipos de adrenoreceptores α_1 que participan en la desensibilización del músculo liso vascular en condiciones de cultivo.

Para alcanzar el objetivo se realizaron experimentos "in vitro" con anillos de aorta de rata sin endotelio, que fueron incubadas a 2 y 24 horas con presencia y ausencia de Noradrenalina para observar el fenómeno de desensibilización.

Una vez desensibilizado el tejido se realizó la identificación de qué subtipo de adrenoreceptor α_1 está modulando la respuesta contráctil y para esto se agregaron antagonistas selectivos de los receptores α_{1A} y α_{1D} .

También se realizó la cuantificación de proteína para cada subtipo de receptor α_1 adrenérgico por el método de Western Blot

Los datos muestran que el receptor α_{1D} participa principalmente en la respuesta contráctil en aorta de rata a las 2 horas de incubación, a las 24 horas de incubación no se observa un desplazamiento de las curvas cuando se le agregaron los antagonistas selectivos para los receptores α_{1A} y α_{1D} por lo que el receptor que participa y que está modulando la respuesta contráctil en la aorta de rata es el subtipo α_{1B} . Esto es con base que la proteína medida por la técnica de Western Blot correspondiente al subtipo α_{1B} aumenta significativamente y que corresponde al subtipo α_{1D} disminuye gradualmente a las 24 horas de incubación.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
MARCO TEÓRICO	5
EI SISTEMA NERVIOSO.....	5
NEUROTRANSMISORES DEL SNA.....	6
TIPOS DE RECEPTORES.....	8
1. Receptores Intracelulares.....	8
2. Receptores relacionados con el transporte iónico.....	9
2.1. Canales iónicos dependiente de voltaje.....	9
2.2. Canales iónicos asociados a un receptor.	9
2.3. Sistemas enzimáticos de transporte activo de iones.....	10
RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G.....	10
3.1. Receptor.....	11
3.2. Proteína G.....	12
3.3. Sistemas efectores.....	13
3.3.1. Adenililciclase.....	13
3.3.2. Fosfoinosítidos y movilización de Ca^{2+}	14
3.3.3. Fosfolipasa A_2	14

3.3.4. Activación de canales iónicos.....	15
3.4. Receptores de membrana con actividad enzimática.....	15
SUBTIPOS DE RECEPTORES.....	15
RECEPTORES ADRENÉRGICOS.....	16
ADRENOCEPTORES α_1	17
MEC. DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DE LOS ADRENOCEPTORES α_1	20
REGULACIÓN DEL RECEPTOR.....	22
DESENSIBILIZACIÓN.....	23
OBJETIVO GENERAL.....	28
OBJETIVOS PARTICULARES.....	28
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	29
HIPÓTESIS.....	30
MATERIAL Y MÉTODOS.....	31
RESULTADOS.....	38
DISCUSIÓN.....	49
CONCLUSIÓN.....	54
BIBLIOGRAFÍA.....	55

INTRODUCCIÓN

Las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) juegan un papel clave en la regulación de muchos procesos fisiológicos del organismo como la tensión arterial, funcionamiento cardíaco, función renal, metabolismo de carbohidratos y lípidos (**García-Sáinz y col., 2000**).

Las proteínas de membrana plasmática que median los efectos de las catecolaminas se denominan receptores adrenérgicos y se clasifican en tres familias (α_1 , α_2 y β). Cada familia se subdivide en al menos tres subtipos distintos.

Con técnicas de clonación y estudios farmacológicos se han podido identificar 3 subtipos de adrenoceptores α_1 (α_{1A} , α_{1B} y α_{1D}); todos ellos se expresan en el músculo liso vascular y juegan un papel vital en la regulación de la presión sanguínea, sin embargo la función de cada subtipo no ha sido bien definida (**Koshimizu y col. 2003**). Estudios previos han demostrado que en arterias como la aorta y la carótida en ratas normotensas, el subtipo adrenoceptor α_{1D} modula la respuesta contráctil, mientras que en la arteria caudal el subtipo adrenoceptor es el α_{1A} (**Villalobos-Molina e Ibarra, 1996**).

Los receptores acoplados a proteínas G comprenden cerca del 1% del genoma humano y juegan diversos papeles en la regulación de varios procesos fisiológicos. Uno de los miembros de receptores acoplados a proteína G es la familia de los receptores adrenérgicos α_1 , estos receptores están compuestos por una sola cadena polipeptídica,

cuya característica principal son siete dominios transmembranales, conectados por tres asas intracelulares y tres asas extracelulares (McDonald y col., 2001). La función de estos receptores y de muchos otros tipos parece estar regulada por la fosforilación, en otras palabras el estado de fosforilación del receptor parece modular su sensibilidad y, por consiguiente, la respuesta celular. La fosforilación es considerada como el paso inicial en el proceso de desensibilización (García-Sáinz y col., 2001).

La desensibilización es un proceso que se caracteriza por pérdida de la respuesta celular, se trata generalmente de una respuesta homeostática de protección celular a una estimulación continua del agonista sobre el receptor. Hay 2 tipos de desensibilización, los cuales son:

- 1) Homóloga, es cuando el receptor se fosforila por su misma vía de transducción y parece ser mediada principalmente por cinasas que fosforilan receptores acoplados a proteínas G (GRKs).
- 2) Heteróloga, es cuando el receptor se fosforila por otra vía u otro receptor diferente que el de su vía de transducción y también involucra cinasas, activadas por segundos mensajeros como la proteína cinasa A (o dependiente de AMP cíclico, PKA) y la PKC, a este proceso también se le llama "crosstalk" (García-Sáinz y col., 2004).

El propósito de este estudio es el identificar los diferentes subtipos de adrenoceptores α_1 que participan en la desensibilización del músculo liso vascular en condiciones de cultivo.

ANTECEDENTES

En 1906 Langley estaba estudiando los efectos de dos sustancias, la nicotina y el curare, en una preparación experimental con células de músculo y nervio. Este investigador observó que dichas sustancias competían entre sí, lo que lo llevó a concluir que hay “el mutuo antagonismo entre el curare y la nicotina sobre el músculo”. Hacia 1913, Paul Ehrlich formuló un postulado donde dice que las sustancias no actúan a menos que se fijen, dejando la idea de “receptor”. La idea de receptor permaneció como tal, es decir, como un concepto abstracto sin pruebas experimentales directas, por muchos años **(García-Sáinz, 1996a)**.

Varios años después Ahlquist (1948) llegó a una conclusión que de hecho, constituye la piedra angular de lo que hoy sabemos sobre acciones adrenérgicas. Este investigador usó una serie de agonistas adrenérgicos y observó que la potencia relativa de estos compuestos para producir contracción o relajación era claramente diferente. Estas observaciones y, por supuesto, su capacidad lo llevaron a deducir que la contracción ocurría por la activación de un tipo de receptor, al cual llamó α mientras que la relajación se daba por la activación de otro tipo de receptor, al que denominó β **(Ahlquist, 1948)**.

Después de esta clasificación, dividieron a los receptores β en β_1 y β_2 **(Lands y col. 1967)** y, posteriormente, a los receptores α los dividieron en α_1 y α_2 . **(Langer y col. 1974)**.

La ciencia, como toda actividad humana, esta sujeta a cambios, de pronto algo surge como importante quizá toda una década, o quizá un poco más (1965-1975 aproximadamente); así, el Dr. Sutherland identificó un compuesto, el AMP cíclico, incluso se identificó la enzima que lo sintetiza, la adenilil ciclasa, el esfuerzo de este investigador fue reconocido con el premio Nobel en Fisiología y Medicina.

En 1975, Bob Michell, un investigador inglés, hizo una revisión de los hallazgos de Mabel y Lowell Hokin en los años 50s, y durante su revisión encontró una asociación estrecha entre el recambio (síntesis y degradación) de fosfatidilinositol (PI) y las variaciones en la concentración de calcio libre en el citoplasma de la célula (el calcio libre citosólico ya era considerado como un segundo mensajero); entonces propuso que el mecanismo de transducción para un gran número de mensajeros involucra, como paso inicial, un aumento en el recambio de fosfatidilinositol (efecto PI), el cual a su vez, conduce a cambios en la concentración intracelular de calcio libre. Un trabajo pionero de Martín Rodbell fue continuado por estudios detallados que han conducido a la purificación, reconstitución funcional, clonación y determinación de la estructura de las diversas proteínas G, varios grupos participaron en este trabajo con un claro liderazgo de Alfred Gilman. Rodbell y Gilman compartieron el premio Nobel en Fisiología y Medicina en 1994. Estos conceptos sientan las bases de mucho de lo que se sabe hoy día sobre la acción hormonal. En la actualidad ya se conoce la naturaleza química de muchos receptores, se han purificado varios de ellos y un buen número ya han sido sintetizados en laboratorios por métodos semiartificiales, lo cual ha obligado a aquellas células que normalmente no sintetizan algún receptor a hacerlo. Lo mejor está por venir (**García-Sáinz, 1996a**).

MARCO TEÓRICO

EL SISTEMA NERVIOSO

El sistema nervioso se puede dividir en dos grandes grupos:

1. Sistema Nervioso Central: incluye las estructuras nerviosas del cerebro y médula espinal situadas dentro del cráneo y conducto raquídeo, respectivamente y
2. Sistema Nervioso Periférico que a su vez puede dividirse en:
 - a) Sistema Nervioso Somático, voluntario, que inerva exclusivamente al músculo esquelético y cuyos axones emergen del S.N.C. y siguen sin interrupción hasta hacer sinapsis en las uniones neuromusculares y
 - b) Sistema Nervioso Autónomo (SNA), que se activa principalmente por centros situados en médula espinal, tallo cerebral e hipotálamo; es parte del sistema nervioso y controla una gran diversidad de funciones. Tiene control sobre la tensión arterial, la motilidad, y las secreciones gastrointestinales, el vaciamiento de la vejiga urinaria, la sudoración, la temperatura corporal, la regulación del músculo cardíaco, del músculo liso y muchas otras funciones viscerales del organismo. El SNA se divide en: sistema nervioso simpático y sistema nervioso parasimpático (ver Fig. 1) con bases anatómicas y funcionales diferentes. Ambos sistemas consisten en fibras preganglionares, las cuales hacen conexiones sinápticas con fibras postganglionares, las que inervan a los órganos efectores. Estas sinapsis ocurren usualmente en lugares denominados ganglios. La mayor parte de los órganos son inervados por fibras provenientes de ambas divisiones del SNA y la respuesta es usualmente opuesta (**Castro Ramírez V. y col. 2003**).

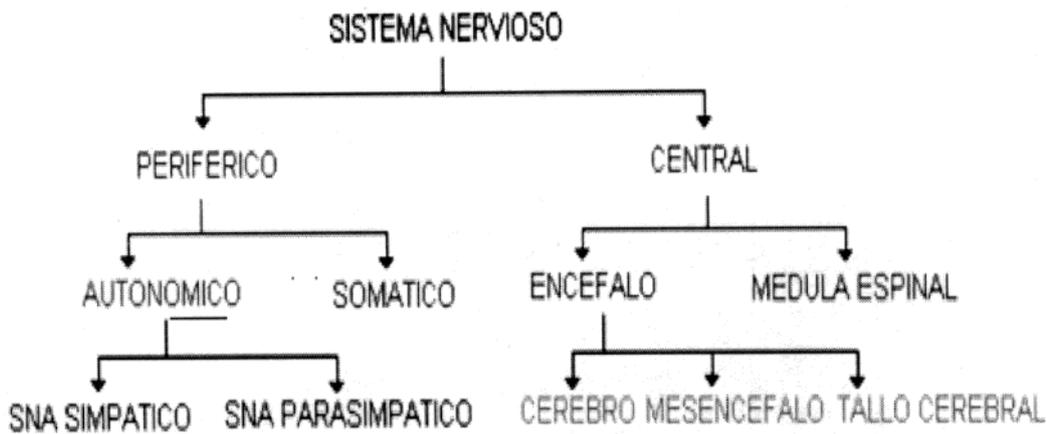


Figura 1. CLASIFICACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO.

NEUROTRANSMISORES DEL SNA

Los nervios en cuyas terminaciones se libera acetilcolina se denominan colinérgicos. La noradrenalina es el neurotransmisor de las neuronas simpáticas posganglionares. Los nervios en los cuales se libera noradrenalina se llaman adrenérgicos. Tanto la acetilcolina como la noradrenalina actúan sobre los diferentes órganos para producir los efectos parasimpáticos o simpáticos correspondientes.

Las tres catecolaminas naturales, noradrenalina o norepinefrina, adrenalina o epinefrina y dopamina, se sintetizan a partir del aminoácido tirosina que se encuentra en la dieta y es captado de la circulación por un proceso de transporte activo hacia el interior axonal. Este aminoácido primero se hidroxila y forma dopa, luego se descarboxila para dar dopamina y finalmente se hidroxila en posición beta de la cadena lateral para formar noradrenalina, la cual se metila por acción de la N-metil-transferasa formando adrenalina (ver Fig. 2).

Las principales transformaciones metabólicas de las catecolaminas son llevadas a cabo por dos enzimas: catecol-O-metil-transferasa, que es importante en el metabolismo de las catecolaminas circulantes y la mono-amino-oxidasa que, aunque tiene un papel limitado en el metabolismo de catecolaminas circulantes, es importante para regular los depósitos de catecolaminas situados en las terminaciones periféricas de los nervios simpáticos.

Tanto en la médula suprarrenal como en terminaciones nerviosas simpáticas, las catecolaminas se acumulan en granulaciones subcelulares y se liberan por exocitosis. Las catecolaminas influyen sobre las células efectoras interaccionando con unos receptores específicos de la superficie celular.

La noradrenalina y la adrenalina tienen efectos diferentes al excitar a los receptores α y β . La noradrenalina excita principalmente a los receptores α y en pequeña medida a los β . La adrenalina actúa sobre ambos tipos de receptores por igual (Hoffman, B.B., Lefkowitz, R.J., 1996).

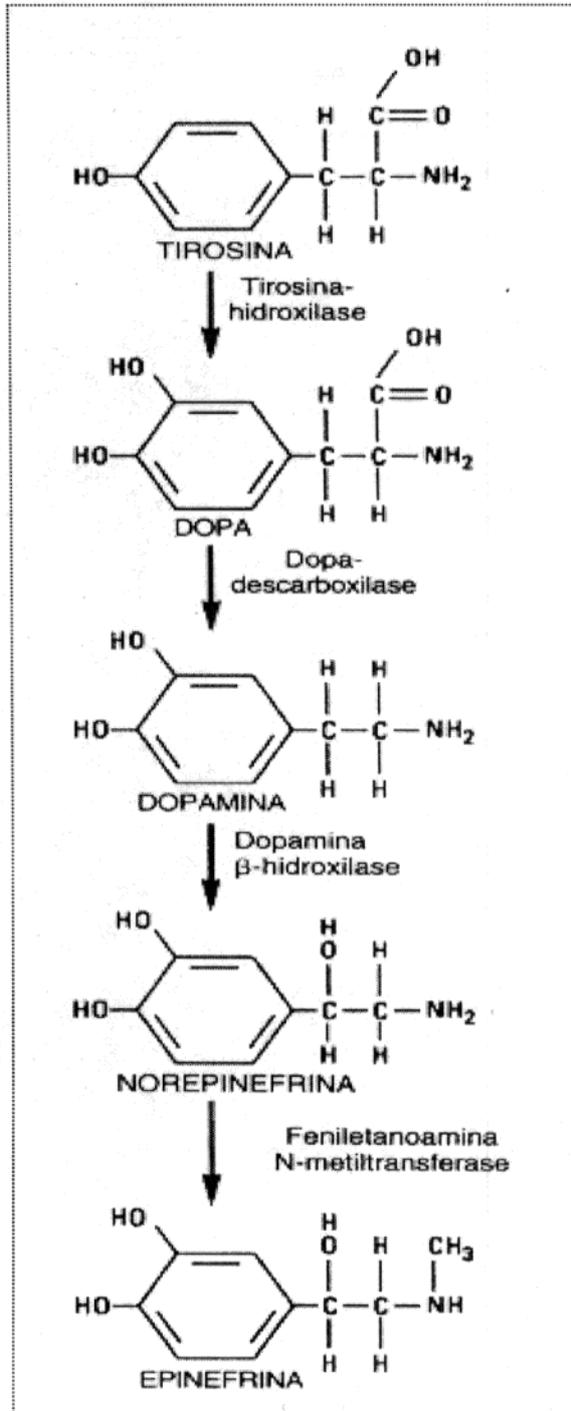


Figura 2. METABOLISMO DE LAS CATECOLAMINAS

El receptor, al ser estimulado por catecolaminas, pone en marcha una serie de cambios en la membrana que van seguidos de una cascada de fenómenos intracelulares que culminan en una respuesta fisiológica (ver Fig. 3).

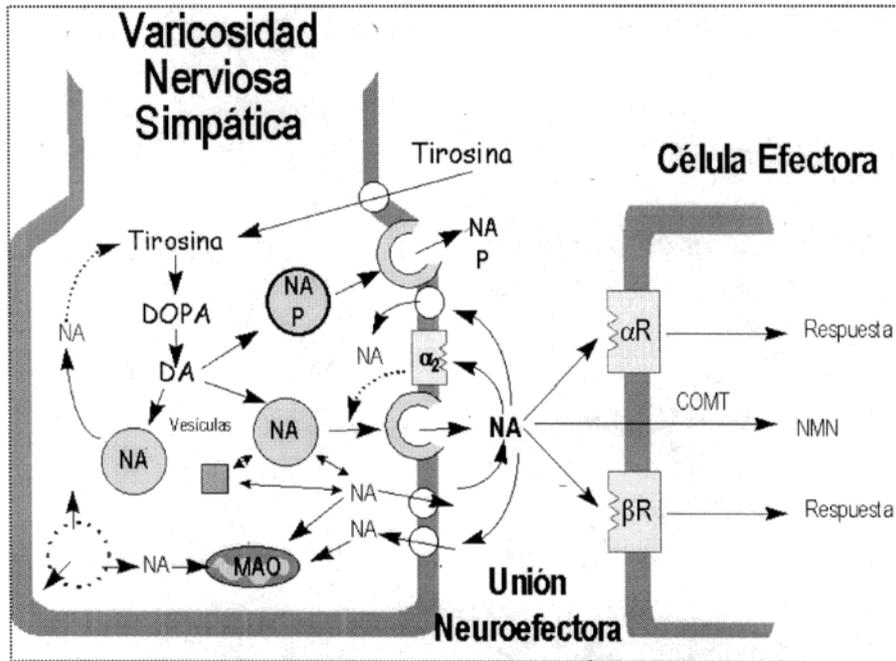


Figura 3. ESQUEMA DE TRANSMISIÓN ADRENERGICA.

TIPOS DE RECEPTORES

1. Receptores Intracelulares

Estos receptores son proteínas intracelulares situadas en el citoplasma o el núcleo celular. Poseen afinidad y selectividad por su ligando característico y su interacción modifica a la molécula receptora, de forma que hace posible la asociación con cromosomas en determinadas secuencias del ADN. La fijación del ligando al receptor favorece la afinidad del complejo por estas secuencias, alterando los procesos de transcripción de ciertos genes y modificando la síntesis de proteínas derivadas de dichos genes. Esta acción es reversible, de modo que se pueden disociar el receptor y su

ligando; el receptor se recupera y el ligando se elimina por metabolismo u otro mecanismo. Fármacos que actúan en este tipo de receptores son: fármacos esteroidales, tales como glucocorticoides, mineralcorticoides, vitamina D, hormonas tiroideas T3 y T4 y sustancias inductoras del metabolismo de otros fármacos (Bustamante D., y col. 2003).

2. Receptores relacionados con el transporte iónico

El paso de iones a través de la membrana celular es un proceso esencial para la vida celular. Su modificación por fármacos produce cambios importantes en la función celular. Los canales iónicos transportan iones a favor de un gradiente electroquímico, en tanto que los sistemas enzimáticos de transporte lo hacen contra gradiente.

2.1. Canales iónicos dependiente de voltaje. Son una familia de canales iónicos que conducen Na^+ , K^+ y Ca^{2+} en respuesta a un cambio de potencial de membrana. Son muy selectivos para cada tipo de ion. La cinética de estos canales es muy rápida. Esta cinética también puede ser regulada por la activación de ciertos receptores asociados a proteína G, que tienen por efector propio al canal iónico. Esta regulación está dirigida a cambiar el tiempo de acción del canal iónico. Por este mecanismo, dependiente de proteína G, pueden ser activados algunos canales de K^+ y Ca^{2+} sensibles a dihidropiridinas.

2.2. Canales iónicos asociados a un receptor. Son canales cuya apertura se asocia específica y directamente a la interacción de un ligando con un receptor situado en la membrana de la célula y hay dos tipos:

a) Canales iónicos en los que el receptor y el canal residen en la misma macromolécula, es decir, el receptor forma parte de la estructura del canal. Ejemplos de

ellos son el canal de Ca^{2+} dependiente de receptor, el canal de Na^+ asociado al receptor colinérgico nicotínico (antagonizado por *d*-tubocurarina o activado por agonistas como acetilcolina), el canal de Cl^- asociado al receptor GABA (benzodiazepinas actúan como agonistas; antagonizado por bicuculina).

b) Canales iónicos en los que el canal y el receptor forman parte de proteínas diferentes, pero acopladas por una diversidad de elementos transductores como proteínas G y segundos mensajeros, formados por la activación del receptor. Ejemplos son el canal de K^+ asociado a receptores colinérgicos, muscarínicos (fármacos parasimpaticomiméticos), el canal de Ca^{2+} tipo L asociado a receptores β -adrenérgicos (fármacos simpaticomiméticos).

2.3. Sistemas enzimáticos de transporte activo de iones. El transporte activo requiere energía libre, que generalmente proviene de la hidrólisis de ATP. Las bombas de protones son las que intervienen en los procesos de transporte activo. Existen tres familias: la **P**, la **V** y la **F**; de las ATPasas tipo P destacan: ATPasa- Na^+/K^+ , ATPasa K^+/H^+ y la ATPasa de Ca^{2+} . Fármacos como los glucósidos digitálicos se fijan específicamente en la cara externa de una de las subunidades de la bomba, provocando la inhibición de la desfosforilación de la ATPasa. Las ATPasas tipo V están asociadas a transportadores específicos que permiten la recaptación de catecolaminas, acetilcolina, serotonina, glutamato, etc. Las ATPasas tipo F tienen por función sintetizar ATP a expensas de la fuerza generada por la cadena de transporte de electrones (Bustamante S. E. 1997).

RECEPTORES ACOPLADOS CON PROTEÍNAS G

A estos receptores acoplados a proteínas G se los llama así por la forma en que funcionan: interactúan con componentes intermediarios del proceso, las proteínas G; y

por su estructura, también se les llama receptores de los siete dominios transmembranales (7TM) y constituye la familia más grande conocida de receptores en la membrana celular (ver Fig. 4). El genoma humano codifica aproximadamente 1,000 7TM que funcionan, sobre todo en la transmisión de señales (luz, odorantes, neurotransmisores y las hormonas, etc.) (**Penela P. y col. 2003**).

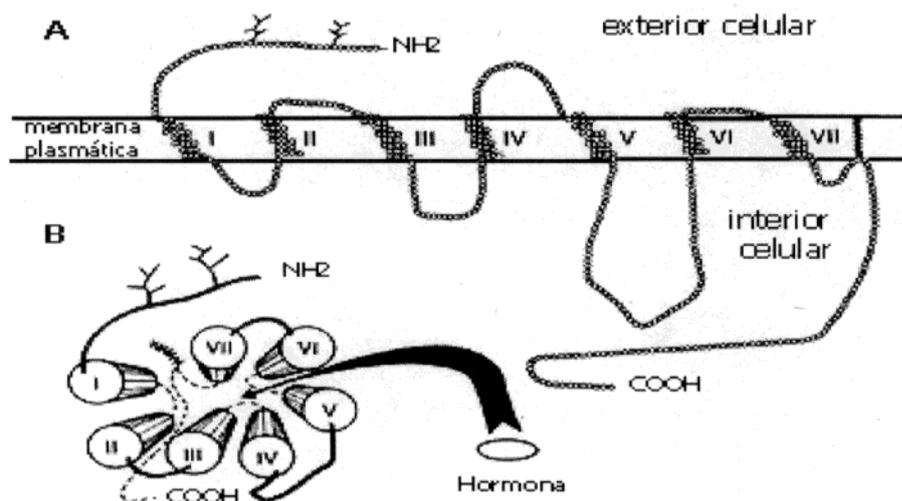


Figura 4. ESTRUCTURA DE UN RECEPTOR DE SIETE DOMINIOS TRANSMEMBRANALES. (A) REPRESENTACIÓN DE ESTOS RECEPTORES, EN PLANO, SAÑALANDO SU TOPOLOGÍA. (B) RECEPTOR VISTO DESDE LA CARA EXTRACELULAR Y SEÑALANDO LA ZONA DE INTERACCIÓN CON LA HORMONA.

3.1. Receptor. El alto grado de homología molecular, por distinto que sea su ligando endógeno, permite hablar de una familia de receptores. La estructura molecular muestra un patrón común, con una secuencia de aminoácidos con 7 dominios transmembranales. El sitio de fijación al ligando suele estar entre los dominios 2 y 3. La región intracelular de la secuencia tiene sitios de fosforilación por proteínas cinasas y entre los dominios 5 y 6 suele estar el sitio de fijación a la proteína G. Dado que un mismo receptor puede interactuar con más de una proteína G, poseerá varias regiones en el enrollado intracelular en coordinación con las respectivas proteínas G (**Bustamante D. y col. 2003**).

3.2. Proteína G

Existen múltiples formas de las proteínas G en el sistema nervioso, cada proteína G es un heterotrímero compuesto de subunidades α , β y γ simples. La actividad funcional de las proteínas G implica su disociación y reasociación, en respuesta a señales extracelulares. Las proteínas G unen directamente algunos receptores neurotransmisores con canales iónicos y regulan niveles intracelulares de segundos mensajeros. Con la excepción de la transmisión sináptica mediada vía receptores que forma canales iónicos, la familia de proteínas G parece estar implicada en todas las señales de transmembrana en el sistema nervioso. Las proteínas G, identificadas y caracterizadas por Rodbell, Gilman y otros, son llamadas así a causa de la capacidad para unir los nucleótidos de guanina, guanosina trifosfato (GTP) y guanosina difosfato (GDP), también poseen una actividad GTPasa intrínseca. Fueron identificadas tres formas de proteína G en estudios tempranos: G_t , denominada *transducina*, fue identificada como la proteína G que se une a la rodopsina para la regulación del funcionamiento de células fotorreceptoras, y G_s y G_i fueron identificados como las proteínas G que se unen a los receptores de membrana para la estimulación e inhibición, respectivamente, de la adenilil ciclasa, la enzima que cataliza la síntesis de AMPc. Además de G_t , G_s y G_i , los otros tipos principales de proteína G en el cerebro son designados G_o , G_{olf} , G_{gust} , G_z , G_q y G_{11-16} (Rennolds S. O. y col. 2000).

Los diferentes tipos de proteínas G contienen distintas subunidades α , que son responsables de su actividad funcional específica. La actividad funcional de las proteínas G implica su disociación y reasociación en respuesta a señales extracelulares.

En estado de reposo, las proteínas G funcionan como heterotrímeros que están unidos a GDP y no están asociados con receptores extracelulares o con proteínas efectoras intracelulares. Cuando un ligando se une a (y activa) un receptor, da lugar a un cambio conformacional en el receptor, lo que provoca que se asocie la proteína G al receptor, esto altera la conformación de la subunidad α y conduce (1) al desplazamiento del GDP por el GTP, unido a la subunidad α , (2) a la separación de las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G, y (3) a la liberación de la unión receptor-proteína G. Este proceso genera una subunidad α unida a GTP, que es biológicamente activa y que puede regular la actividad funcional de las proteínas efectoras dentro de la célula. El sistema vuelve a su estado de reposo cuando el ligando es liberado desde el receptor y la actividad de la GTPasa, que hidroliza al GTP en GDP. La acción posterior conduce a la reasociación de las subunidades α libres con las $\beta\gamma$ para restaurar el heterotrímero original, que es la proteína G (Stephan K. B. y col. 1997).

3.3 Sistemas efectores

3.3.1. Adenililciclase. Varios ligandos endógenos (y también fármacos) ejercen su acción celular mediante la activación o inhibición de la enzima adenililciclase, cuya función es la de generar AMP cíclico (AMPc) a partir de ATP. El AMPc activa de manera específica la proteína cinasa A (PKA), la cual provoca la fosforilación de varias proteínas. La fosforilación de estas proteínas modifica su función, lo que constituye la respuesta celular a la acción del ligando. Los ligandos que tienen acción *inhibitoria* sobre la formación de AMPc actúan por medio de una proteína G_i ; la acción celular resultante será contraria a la producida por un ligando *estimulante* de la formación de AMPc, vía

proteína Gs. El AMPc formado es hidrolizado por una *fosfodiesterasa* que lo inactiva. Como consecuencia de la fosforilación de proteínas por AMPc-PKA (también por GMPc), hay fenómenos de despolarización o hiperpolarización de membranas, alteraciones del metabolismo, alteración en la síntesis de neurotransmisores, modificación de los movimientos del Ca^{2+} intracelular, exocitosis, contracción o relajación muscular y modificación de la expresión de algunos genes.

3.3.2. Fosfoinosítidos y movilización de Ca^{2+} . Otra vía transductora de señales es la hidrólisis de fosfoinosítidos, fosfolípidos de inositol membranales que generan productos de diversa actividad biológica y facilitan la movilización de Ca^{2+} . El efector catalítico es una fosfoinositidasa, la fosfolipasa C (PLC), capaz de hidrolizar el fosfadilinositol-4,5-bisfosfato. La hidrólisis produce diacilglicerol (DAG) que permanece en la membrana e inositol-1,4,5-trisfosfato (IP_3) que se libera al citoplasma. La función del IP_3 es movilizar el Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares al citoplasma; esta liberación endocelular de Ca^{2+} promueve, a su vez, la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular al interior de la célula a través de canales de Ca^{2+} . El producto resultante de la acción de la PLC y DAG, es activar la proteína cinasa C (PKC), en presencia de Ca^{2+} y fosfatidilserina. La PKC fosforila proteínas que modifican diversos procesos celulares como secreción, activación de plaquetas, regulación de expresión de genes, potenciación sináptica de largo plazo, metabolismo, etc. El Ca^{2+} intracelular actúa activando varias enzimas después de unirse a proteínas fijadoras de Ca^{2+} (calmodulina, troponina C, calsequestrina, etc).

3.3.3. Fosfolipasa A₂. La enzima fosfolipasa A₂ libera ácido araquidónico (Ac.A) a partir de fosfolípidos de membrana, como la fosfatidilcolina y el ácido fosfatídico. El Ac.A

activa la PKC y la PLC, aumenta la concentración de Ca^{2+} y modula la actividad de algunos canales de K^+ . Además, el AA es el precursor de prostaglandinas y de interleucinas.

3.3.4. Activación de canales iónicos. Las proteínas G pueden activar canales iónicos por mecanismos directos e indirectos. En la *activación directa* la proteína G activada actúa sobre la molécula del canal sin compuestos intermedios. La *activación indirecta* implica que la proteína G activada provoca la liberación de segundos mensajeros y sus respectivos sistemas efectoros, los que actúan sobre el canal, modulando su apertura o cierre. Ejemplos de ellos son algunos canales de Ca^{2+} y K^+ cardíacos.

3. Receptores de membrana con actividad enzimática

Ciertos receptores de membrana poseen actividad enzimática. La porción extracelular tiene el dominio de fijación del ligando que, al unirse al receptor, provoca la modificación necesaria para que la porción intracelular del receptor, dotada de actividad enzimática, catalice sustratos específicos. Ejemplos de estos receptores son el de insulina y factor del crecimiento (tirosinacinasas o cinasas autofosforilantes de la propia proteína a nivel de residuos de tirosina) y el del péptido natriurético auricular (con actividad de guanililciclase).

SUBTIPOS DE RECEPTORES

Cambios en la secuencia primaria de aminoácidos del receptor determinan nuevas moléculas, que si bien no se diferencian significativamente desde un punto de vista estructural, si lo hacen funcionalmente. Cuando los cambios afectan al dominio de

unión al ligando, se ven afectadas la afinidad y la especificidad, determinando una alteración de la actividad intrínseca de los agonistas y los antagonistas.

El criterio de diferenciación puede ser farmacológico o con base en estudios de biología molecular. Un ejemplo claro es el caso de los receptores muscarínicos M, entre los cuales existen los M1, M2 y M3 basados en criterios farmacológicos; los subtipos m1 a m5 han sido reportados con base en biología molecular. Más aún, la distribución anatómica de los distintos subtipos receptores suele ser heterogénea, controlando las respuestas celulares de los órganos en los cuales se les encuentra. La implicación terapéutica de los subtipos receptores farmacológicos es clara, en el sentido que permite la utilización de agonistas con mayor especificidad y afinidad por un determinado subtipo de receptor y evitar, así, los efectos indeseados de agonistas menos específicos que actúan sin discriminar los subtipos de receptores (**Bustamante D. y col. 2003**).

RECEPTORES ADRENÉRGICOS

Hace algunos años se aislaron los genes para todos los adrenoceptores, se ha determinado su secuencia de aminoácidos completa y en la actualidad se reconoce también heterogeneidad entre los adrenoceptores α -. La distinción inicial se basó en consideraciones funcionales y anatómicas cuando se percibió que la noradrenalina y otros agonistas α - podían inhibir en gran medida la descarga de noradrenalina desde las neuronas (**Starke, 1987**). De hecho, cuando se estimulan los nervios simpáticos en presencia de ciertos antagonistas α -, se incrementa en grado notable la cantidad de noradrenalina liberada por cada impulso nervioso. Esta retroalimentación negativa de la noradrenalina sobre su descarga desde las terminaciones nerviosas, se encuentra mediada por receptores α que desde el punto de vista farmacológico son distintos de los

receptores α posinápticos clásicos. De conformidad con lo anterior, estos receptores α presinápticos se designaron α_2 , en tanto que los receptores α "excitadores" posinápticos se designaron α_1 (**Langer y Lehmann, 1988**).

Son tres los adrenoreceptores α_1 - definidos desde el punto de vista farmacológico y clonados (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}) y en estudios recientes se han demostrados diferencias en la distribución tisular entre los subtipos. De todas maneras no se han aclarado, en su mayor parte, las peculiares propiedades funcionales de los diferentes subtipos de receptores α_1 - adrenérgicos. Son tres los receptores α_2 -adrenérgicos clonados (α_{2A} , α_{2B} , α_{2C}). (**Guimaraes y Moura , 2001**)

ADRENORECEPTORES α_1

Los subtipos α_1 -adrenérgicos se encuentran distribuidos ampliamente en todo el sistema arterial y venoso, indicando que estos receptores tienen un papel relevante en la regulación del flujo sanguíneo y en el mantenimiento de la resistencia vascular periférica (**Vargas y Gorman, 1995**). En la rata, la distribución tisular de los subtipos α_1 - ha sido extensamente investigada a través del análisis en los patrones de expresión del ARN_m (**Faure y col., 1994**).

No obstante que la mayoría de los tejidos expresan los tres subtipos a nivel de ARN_m, parece haber un patrón en la distribución tisular que es característica de cada subtipo en esta especie (rata Wistar). En este sentido se ha reportado que, con excepción de la corteza cerebral, casi todos los tejidos estudiados expresan un subtipo α_1 como el dominante (**Scofield y col., 1995**). Por ejemplo, niveles altos de expresión

para el subtipo α_{1A} se han encontrado en tejidos como: el pulmón, el esófago, el estómago, el intestino delgado, el colon, el páncreas, el riñón, la vejiga y la próstata, mientras que para el α_{1B} en la uretra, el tejido adiposo blanco, el hígado y el corazón **(Torres-Márquez y col., 1992)**. En el caso de la tráquea, el bazo, la corteza cerebral, las glándulas adrenales y la aorta, parece expresarse, predominantemente, el ARN_m para el subtipo α_{1D} **(Scofield y col., 1995; Xu y Han, 1996)**. Aunque no siempre es posible encontrar una relación entre los niveles de ARN_m y la expresión funcional de un receptor **(Piascik y col., 1995)**, algunos grupos de investigación han sugerido que el α_{1A} es el subtipo predominante responsable de la respuesta adrenérgica en el conducto deferente, la próstata, la glándula submaxilar y el riñón **(Hiraoka y col., 1999)**, en tanto que, en el bazo, el tejido adiposo blanco y el hígado el receptor involucrado en la respuesta es el α_{1B} **(Torres-Márquez y col., 1991)**. En el corazón la respuesta inotrópica positiva a la estimulación α_1 -adrenérgica es mediada, fundamentalmente, por los subtipos α_{1A} y α_{1B} **(Hattori y Kanno, 1998)**. Es importante señalar que hay diferencias en la distribución tisular de los subtipos α_1 - por especie. El ejemplo más notable de esta diversidad es el hígado; en el humano, el perro, el gato y el conejo el subtipo predominante es el α_{1A} **(García-Sáinz y col., 1992)**; mientras que en el ratón, el hámster y la rata, el principal es el α_{1B} **(García-Sáinz y col., 1994)** y en el mono *rhesus* ay una mezcla de α_{1A} y α_{1B} **(García-Sáinz y col., 1996b)**.

En la rata los estudios funcionales, utilizando arterias de conductancia, han demostrado que el subtipo α_{1D} tiene una participación importante en la regulación del tono vascular. En este sentido se ha reportado que la activación de este subtipo por agentes α_1 -adrenérgicos produce contracción en un grupo numeroso de arterias, entre

las que se incluyen: la aorta (**Goetz y col., 1995; Villalobos Molina e Ibarra, 1996**), la carótida (**Villalobos Molina e Ibarra, 1996**), la iliaca (**Piasek y col., 1995, 1997**), la mesentérica superior (**Villalobos-Molina e Ibarra, 1996**), la femoral (**Piasek y col., 1997**) y la pulmonar (**Hussain y Marshall, 1997**). La detección del ARN_m y de la proteína para el subtipo α_{1D} en la capa media superior de esas arterias (**Piasek y col., 1994**), apoyan la sugerencia de que este receptor desempeña un papel en la regulación vascular.

El ARN_m para el subtipo α_{1A} es expresado en niveles muy elevados en las arterias periféricas de la rata, aproximadamente el 90% del ARN_m total que codifica para los adrenoreceptores α_1 - pertenece a este subtipo (**Guarino y col., 1996**). Sin embargo, solamente en la arteria caudal se ha encontrado el subtipo α_{1A} como el receptor predominante en la contracción (**Lachnit y col., 1997; Villalobos Molina e Ibarra, 1996**). La función del subtipo α_{1B} en la contracción del músculo liso vascular no se ha podido determinar debido a la carencia de herramientas farmacológicas selectivas para este subtipo. A pesar de que el ARN_m y la proteína para el subtipo α_{1B} se han detectado en todo el sistema vascular periférico, este receptor no parece estar ligado a la activación de la contracción en la mayoría de las arterias de la rata, sugiriendo que ese receptor tiene una función limitada en el sistema arterial (**Hrometz y col., 1999**). La presencia del subtipo α_{1B} en tejido venoso sugiere que éste podría tener un papel fisiológico en la constricción venosa, en la regulación de la capacitancia venosa y por lo tanto en el gasto cardíaco. El subtipo α_{1D} ha sido detectado en vasos sanguíneos mediante estudios funcionales o de unión de radioligandos, pero no se ha encontrado en otros tejidos de la rata, incluyendo aquellos órganos que participan en la regulación de la

presión arterial, como son el riñón y el corazón. Esto significa que el subtipo α_{1D} participa en la regulación de la función cardiovascular fundamentalmente a través de su influencia a nivel vascular. El hallazgo de que los subtipos α_{1A} y α_{1D} participan en la regulación del tono vascular en las arterias de resistencia, hizo evidente la importancia del papel fisiológico que juegan esos adrenoreceptores en la regulación de la función del sistema cardiovascular.

Por otro lado, no se cuenta con suficiente información que permita establecer si un solo subtipo es expresado, funcionalmente, en diferentes tipos celulares en un tejido o si los tres subtipos son coexpresados por la misma célula. En cultivos primarios de miocitos cardíacos de rata neonata se detectaron los tres subtipos, donde su expresión fue regulada de manera diferente por la exposición crónica del agonista o por otros estímulos hipertróficos (**Rokosh y col., 1996**). Esto apoya el concepto de coexpresión de los subtipos por las células y sugiere que el nivel de expresión está sujeto a mecanismos de regulación independientes. Debido a que los tres subtipos parecen coexistir en diferentes proporciones en los tejidos, es razonable sugerir que la respuesta a la estimulación α_1 -adrenérgica, se debe a la activación de varios subtipos.

MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DE LOS ADRENOCEPTORES α_1

La estimulación de éstos receptores da por resultado regulación de por lo menos, cuatro sistemas efectores (**Lomasney y col., 1991; Bylund, 1992**). El modo primario de transducción de señales consiste en la movilización de Ca^{2+} intracelular desde los sitios endoplásmicos de almacenamiento. Este incremento del Ca^{2+} intracelular se considera, en la actualidad, resultado de activación de isoformas de fosfolipasa C a través de la

familia $G_{q/11}$ de proteínas G. La hidrólisis de polifosfoinosítidos fijos a la membrana, por vía de la fosfolipasa C, da por resultado la generación de segundos mensajeros: diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trisfosfato (IP_3).

El IP_3 estimula la descarga del Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares (retículo endoplásmico), por medio de un proceso específico mediado por receptores, en tanto que el DAG es un activador potente de la PKC. Un componente de primera importancia de las reacciones que ocurren después de la activación del receptor consiste en la regulación de diversas proteínas cinasas. Además de la PKC, activada por el Ca^{2+} y el DAG, estas incluyen un grupo de proteínas cinasas sensibles al Ca^{2+} y calmodulina **(Tanaka y Nishizuka, 1994)**. La estimulación α_1 -adrenérgica de la fosfolipasa A_2 (PLA_2) genera araquidonato libre, que es sustrato de la cicloxigenasa y de la lipooxigenasa hasta producir prostaglandinas y leucotrienos con bioactividad, respectivamente. La estimulación de la actividad de PLA_2 por diversos agonistas (entre ellos adrenalina, que actúa a nivel de los adrenoreceptores α_1 -) ocurre en muchos tejidos y en muchas líneas celulares, lo que sugiere que este efector tiene importancia fisiológica.

La fosfolipasa D (PLD) hidroliza la fosfatidilcolina para producir ácido fosfatídico (PA). Aunque por sí solo el PA puede actuar como segundo mensajero al liberar Ca^{2+} desde las reservas intracelulares, se metaboliza también hasta el segundo mensajero DAG. En estudios recientes se ha demostrado que la PLD es un efector del factor ribosilante de ADP (ARF), lo cual indica que la PLD puede desempeñar una función de tránsito por la membrana. Por último, algunas pruebas realizadas en músculo liso vascular señalan que los adrenoreceptores α_1 - regulan el canal del Ca^{2+} vía una

proteína G (**Zhong y Minneman, 1999**). En casi todos los tipos de músculo liso, las concentraciones incrementadas del Ca^{2+} celular generan finalmente contracción, como resultado de activación de proteínas cinasas sensibles al Ca^{2+} , como la cinasa de la cadena ligera de la miosina, dependiente de la calmodulina; la fosforilación de la cadena ligera de la miosina conlleva el desarrollo de tensión (Stull y col., 1990).

Las proteínas G heterotriméricas están integradas por las subunidades α , β y γ . La subunidad α tiene actividad GTPasa y es única para cada proteína G, mientras que las subunidades β y γ son compartidas por varias proteínas G (**Natel y Bouvier, 1993; Schnabel y Böhm, 1996**). La familia de proteínas $G_{q/11}$ tiene cuatro isoformas α : α_q y α_{11} las cuales son coexpresadas en la mayoría de las células y las α_{14} y α_{16} muestran una distribución restringida. El acoplamiento individual de subtipos de receptores α_1 a diferentes subunidades α de la familia $G_{q/11}$ ha sido examinado por sobreexpresión transitoria de un par de receptores y subunidades α de proteína G en células de riñón de mono. Estos estudios mostraron que los 3 subtipos de adrenoreceptores α_1 pueden acoplarse a la PLC a través de las subunidades α_q y α_{11} , los subtipos α_{1A} y α_{1B} están acoplados a la subunidad α_{14} y solo el receptor α_{1B} esta acoplado a la subunidad α_{16} (**Wu y col., 1992**).

REGULACIÓN DEL RECEPTOR

Los receptores, como moléculas específicas de las células poseen un ciclo biológico determinado, de forma que su velocidad de recambio esta definido por el equilibrio entre los procesos de síntesis, movimiento y desintegración, dentro de los sistemas específicos de regulación. No obstante este reciclaje natural de la célula, hay

determinadas situaciones en las cuales los receptores son regulados en función de la homeostasis celular. Fundamentalmente son fenómenos de *desensibilización* y de hipersensibilización. Los mecanismos moleculares que subyacen a los procesos de regulación de receptores no están totalmente comprendidos.

DESENSIBILIZACIÓN

La desensibilización es un proceso que se caracteriza por la pérdida de respuesta celular ante a una estimulación excesiva, crónica o aguda del agonista sobre el receptor, es un componente importante de la capacidad homeostática en los procesos de activación celular y tiene evidentes consecuencias de carácter fisiológico y patológico **(García-Sáinz y col., 2000)**.

Esta desensibilización, es la consecuencia de una combinación de diversos mecanismos. Estos mecanismos incluyen desacoplar el receptor de las proteínas G en respuesta a la fosforilación del receptor **(Trudy A. K. y Lefkowitz R. 2003)**. La función de los adrenoreceptores α_1 y de muchos otros tipos parecen estar regulados por la fosforilación, en otras palabras el estado de fosforilación parece modular su sensibilidad y por consiguiente la respuesta celular. La fosforilación es considerada como el paso inicial del proceso de desensibilización. Uno de los primeros pasos en este proceso implica "desacoplar funcionalmente" las proteínas G de los receptores. Este proceso es bastante rápido (segundos a minutos) y es dependiente de la fosforilación del receptor, mediada por cinasas de segundos mensajeros intracelulares (PKA y PKC) y por las cinasas acopladas a receptores de proteínas G (GRKs) **(García-Sáinz y col., 2004)**.

Hay dos tipos de desensibilización:

Desensibilización Heteróloga. Es cuando el receptor adrenérgico se fosforila (residuos de serina³⁹⁴ y serina⁴⁰⁰) por otra vía o por otro receptor diferente que el de su vía de transducción y también involucra cinasas activadas por segundos mensajeros (PKA y PKC), a este proceso se le llama "crosstalk" (ver Fig. 5).

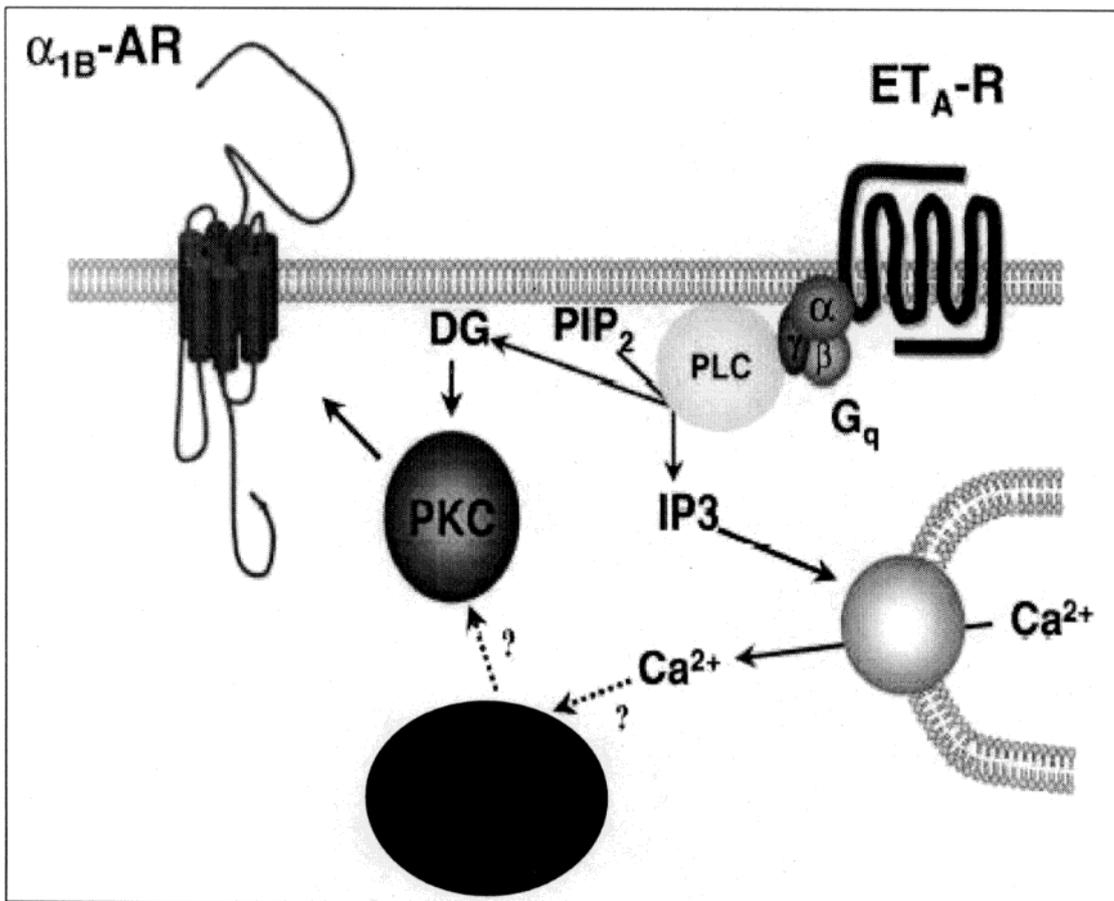


Figura 5. FOSFORILACIÓN DEL ADRENOCEPTOR α_{1B} POR FOSFOLIPASA C PRODUCIDO POR LA ENDOTELINA.

ET, endotelina
 ET_A -R receptor de endotelina;
PIP₂, fosfatidil inositol 4,5-bifosfato;
DG, diacilglicerol;
IP₃, inositol 1,4,5-trifosfato;
PKC, proteína cinasa C.

Desensibilización Homóloga. Es cuando el receptor adrenérgico se fosforila (residuos de serina⁴⁰⁴, serina⁴⁰⁸ y serina⁴¹⁰) por su misma vía de transducción y es mediada por (GRKs) (ver Fig. 6).

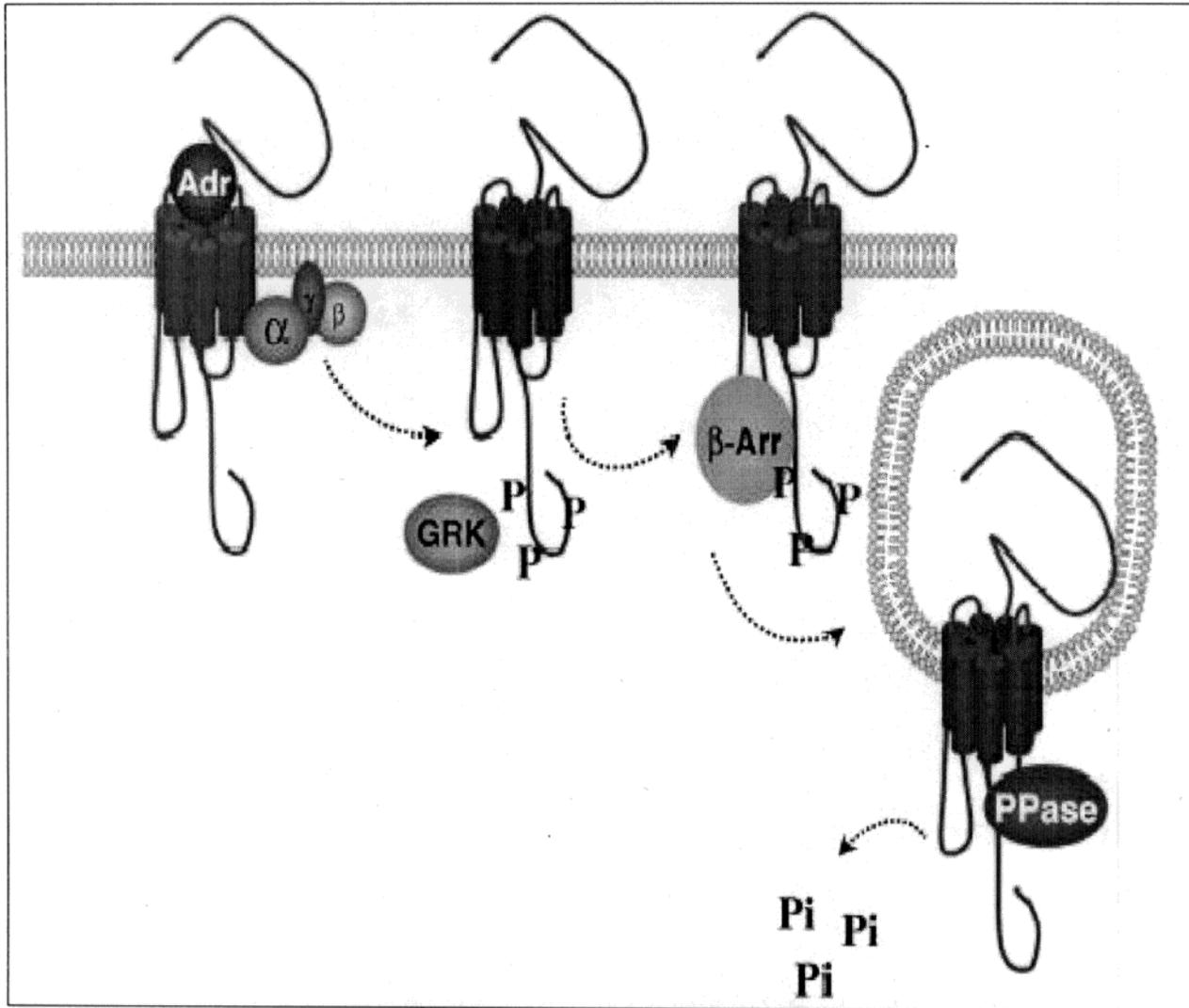


Figura 6. FOSFORILACIÓN DEL ADRENOCEPTOR α_{1B} POR GRK 2.

GRK, G cinasas para receptores de proteína G;
 β -Arr, beta-arrestina;
 PPase, proteína fosfatasa;
 Adr; adrenalina.

- Cinasas acopladas a receptores de proteínas G (GRKs)

La desensibilización funcional del receptor ha sido determinada por la fosforilación en residuos de serina y treonina. Aunque existen 4 subtipos de GRKs, la tipo 2 es la que

adiciona grupos fosfato al receptor, es una familia de enzimas que modifican la estructura de los receptores introduciendo un grupo fosfato cuando los receptores son estimulados de forma excesiva. La fosforilación del receptor por la GRK no es suficiente para la desensibilización, sirve para crear sitios de alta afinidad y para promover el acoplamiento de las proteínas arrestinas. La función de las arrestinas en la desensibilización se ha estudiado extensivamente ya que éstas facilitan la endocitosis o también llamado secuestro del receptor **(Cheryl M. C. y Donald H. W. 1995)**.

Las GRKs y las arrestinas parecen ser moléculas reguladoras dominantes para la internalización del receptor, se ha demostrado que estas proteínas interactúan con otras proteínas como la AP₂ y la clatrina y como consecuencia, se forma una vesícula que es una ruta de endocitosis ya caracterizada **(Spiegel A. 2003)**.

La clatrina es una proteína trimérica muy estable y junto con la proteína AP-2, la dinamina y otras proteínas forman los "coated pits", vesículas que son internalizadas en la célula

En los últimos años se ha investigado el papel de la internalización del receptor, hay evidencias que existen 2 posibles vías, una posible vía es la llamada "down regulation" una *disminución en el número total* de receptores funcionales en la membrana celular y es causada por la exposición prolongada del agonista (horas o días) **(Marsh M. y McMahon H.T. 1999)**.

La disminución del número de receptores en la membrana puede ser consecuencia de los siguientes procesos: internalización del receptor, inactivación del receptor, proteólisis del receptor por enzimas intracelulares en los lisosomas; y después

de la degradación la célula tendría que hacer síntesis *de novo* para formar otra proteína y así regular el número de receptores en la célula (Yu y col. 1993). La otra vía después de la internalización del receptor es la de que el receptor se defosforile y este reciclamiento del receptor lo regrese a la membrana de la célula (ver Fig. 7) (Audrey C. y col. 2002).

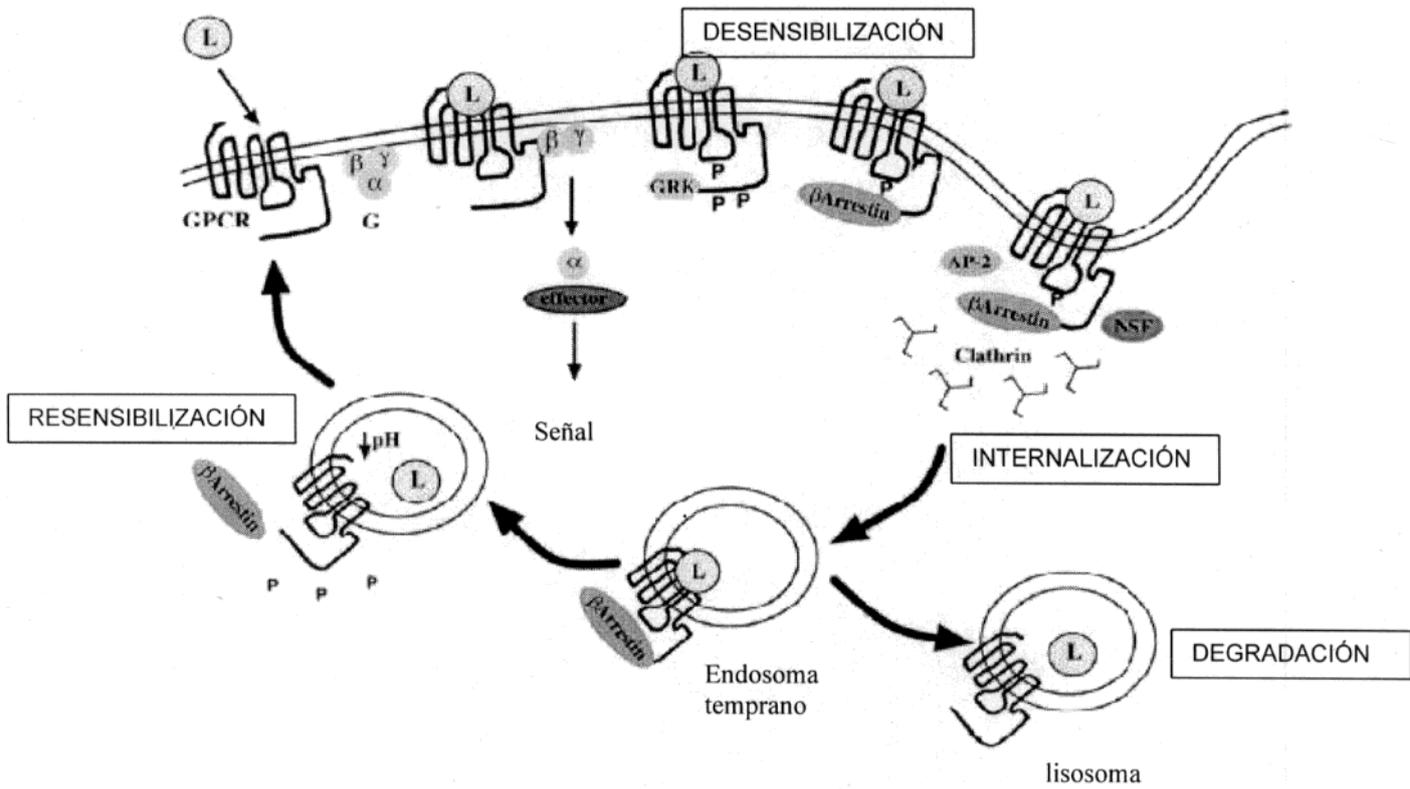


Figura 7. MECANISMO DE DESENSIBILIZACIÓN EL CUAL ES INICIADA POR LA FOSFORILACIÓN DEL RECEPTOR, SEGUIDO DE LA INTERNALIZACIÓN DONDE PUEDEN OCURRIR 2 VÍAS UNA ES LA DEGRADACIÓN DEL RECEPTOR Y LA OTRA ES EL RECICLAMIENTO DONDE EL RECEPTOR REGRESA A LA MEMBRANA.

OBJETIVO GENERAL

- ✎ Identificar el proceso de desensibilización de los adrenoreceptores α_1 en músculo liso vascular de aorta de rata en condiciones de cultivo.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ✎ Investigar el proceso de desensibilización incubando la arteria aorta con diferentes concentraciones de Norepinefrina (NE) a tiempos de 2 y 24 horas.
- ✎ Identificar cuál de los subtipos de adrenoreceptores α_1 participa en la contracción a las 2 y 24 horas de incubación.
- ✎ Cuantificar la proteína para los adrenoreceptores α_1 por "Western Blot" a tiempo 0 y 24 horas de incubación.
- ✎ Investigar la respuesta contráctil de aorta cuando se adiciona una solución 80 mM de KCl en las diferentes condiciones de cultivo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La desensibilización es un proceso que se caracteriza por pérdida de la respuesta celular, se trata generalmente de una respuesta de protección celular ante una estimulación continua del agonista sobre el receptor. Este proceso es un componente importante en la capacidad de regular la activación celular y tiene evidentes consecuencias de carácter fisiológico y patológico. La función de los adrenoreceptores α_1 y de muchos otros tipos parecen estar regulados por la fosforilación, en otras palabras el estado de fosforilación del receptor parece modular su sensibilidad y por consiguiente la respuesta celular.

Son tres los adrenoreceptores α_1 definidos desde el punto de vista farmacológico y molecular (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}) y en estudios recientes se han demostrado diferencias en la distribución tisular entre estos subtipos.

El proceso de desensibilización de receptores α_1 -adrenérgicos es de particular interés, debido a su importancia en el control de varios procesos fisiológicos como la presión arterial y la regulación del tono de los vasos sanguíneos.

HIPÓTESIS

La exposición continua de la aorta a noradrenalina, debe provocar desensibilización de los receptores α_1 adrenérgicos, por lo tanto la respuesta contráctil mediada por el receptor α_{1D} adrenérgico se ve modificada.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. EXTRACCIÓN DE ANILLOS DE AORTA

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar, macho, normotensas de tres meses de edad (BIOTERIO, CINVESTAV SUR), las ratas se sacrificaron en atmósfera de éter y se disecó la arteria aorta torácica la cual se colocó en cajas de petri con solución Krebs para remover los tejidos conectivo y adiposo. Posteriormente las arterias se cortaron en segmentos de 3-4 mm y se les removió el endotelio por frotación con un estilete esmerilado (ver figuras 8,9 y 10).

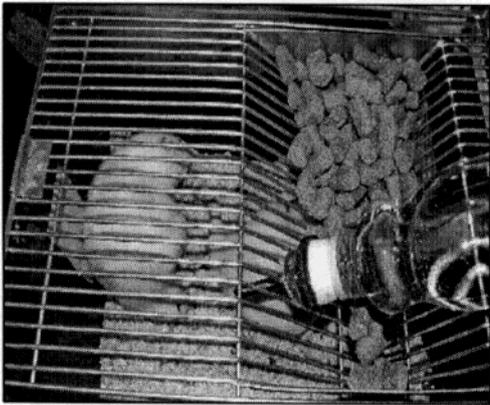


Figura 8. RATA WISTAR 250g.

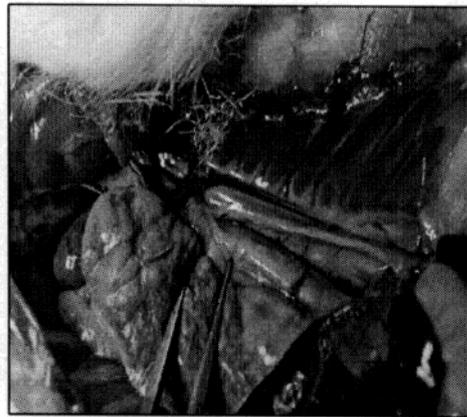


Figura 9. AORTA TORÁCICA .

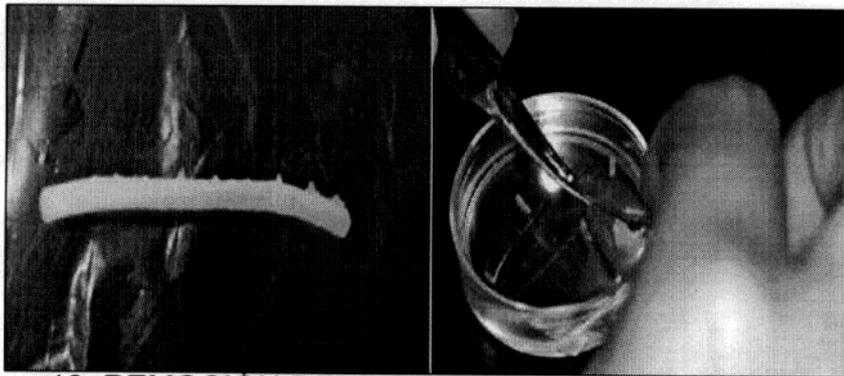


Figura 10. REMOCIÓN DEL TEJIDO CONECTIVO Y ENDOTELIO.

2. INCUBACIÓN CON MEDIO D-MEM

Utilizando campana de flujo laminar para evitar la contaminación, los anillos se colocaron en una caja multipozos con 2.7ml de medio D-MEM y se les agregaron diferentes concentraciones de norepinefrina (NE), $1 \times 10^{-8.5}$ a $1 \times 10^{-6.5}$ M; cabe señalar que se tomó como control a los anillos a los cuales no se les adicionó NE. El tejido fue incubado a diferentes tiempos (2 y 24 horas) a 37° C y 5% de CO_2 . (ver fig 11)

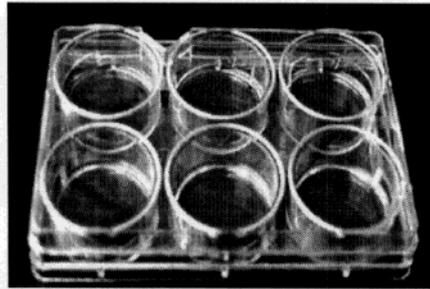


Figura 11. CAJA MULTIPOZOS UTILIZADA PARA LA INCUBACIÓN.

3. DETERMINACIÓN DE LOS CAMBIOS EN LA TENSIÓN ISOMÉTRICA

Una vez transcurrido el tiempo establecido de la incubación, los anillos arteriales se montaron en dos ganchos de nikrom y se colocaron en cámaras para órgano aislado con una solución Krebs cuya composición (mM) es la siguiente: NaCl, 118; KCl, 4.7; 2.5; MgSO_4 , 1.2; KH_2PO_4 , 1.2; NaHCO_3 , 25; EDTA, 0.026 y glucosa, 11.1. La solución Krebs se burbujeó constantemente con una mezcla gaseosa que contiene 5% CO_2 : 95% O_2 , la solución se mantuvo a una temperatura de 37° C y a un pH de 7.4.

Uno de los ganchos se fijó a la parte inferior de la cámara y el otro se ató a un transductor de tensión isométrica modelo Grass TSD105 (Astro-Med, RI, USA), acoplado a un sistema de adquisición de datos modelo MP100 (Biopac Systems Inc., CA, USA) y a una computadora para registrar los cambios de tensión provenientes de la arteria.

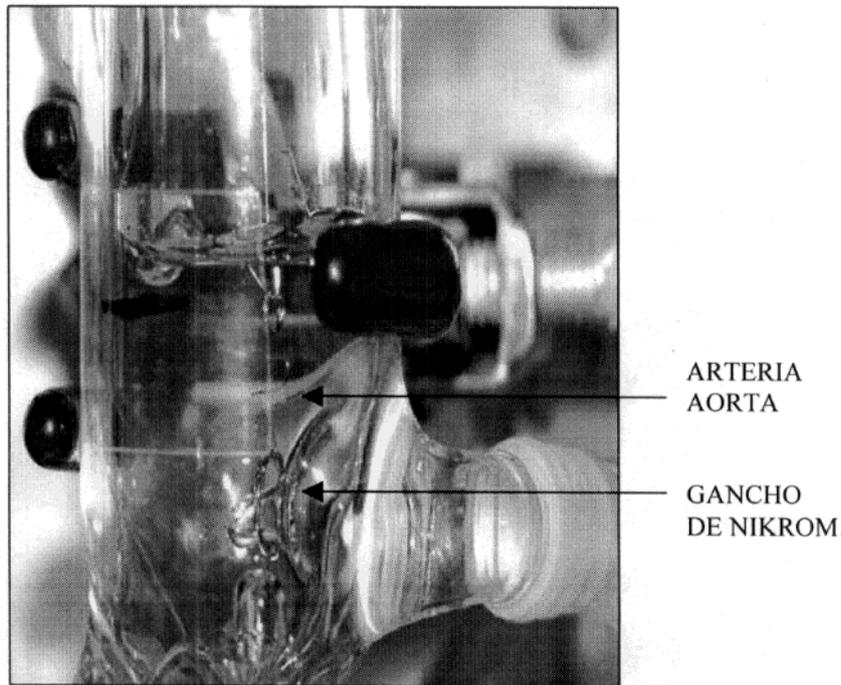


Fig. 12 CAMARA PARA ÓRGANO AISLADO

4. SENSIBILIZACIÓN DEL RECEPTOR

Los anillos de la arteria aorta se sometieron a una tensión inicial óptima de 3g y después de un período de reposo de 30 min., los anillos se estimularon con una concentración de 1×10^{-7} M de NE y al llegar al efecto máximo las arterias se lavaron. Este procedimiento se repitió 3 veces, cada 30min.

5. INTEGRIDAD DEL ENDOTELIO

La integridad funcional del endotelio en las preparaciones se determinó farmacológicamente por la respuesta relajante a carbacol. Después de un período de reposo las preparaciones se contrajeron con NE (1×10^{-7} M) y una vez que alcanzaron la meseta se les agregó carbacol a una concentración 1×10^{-6} M. Los anillos que no presentaron relajación o pérdida en la respuesta fueron considerados sin endotelio.

6. RESPUESTA CONTRÁCTIL DE AORTA DE RATA A KCl 80 mM

Después de un período de reposo de 30 min, se sustituye el Krebs normal de la cámara y se agrega el Krebs con KCl 80 mM, para ver la maquinaria contráctil del tejido por despolarización de la membrana celular.

7. EFECTO CONTRÁCTIL DEL AGONISTA (NE) α_1 -ADRENÉRGICO (CURVA1)

Las arterias se mantuvieron por 30 min en una solución Krebs con rauwolscina (100 nM) y propranolol (100 nM) con el propósito de bloquear los receptores α_2 y β , respectivamente. Se realizaron curvas crecientes de concentración-respuesta a NE (1 nM a 100 μ M), hasta que se observó el efecto máximo, después se lavó el tejido con solución Krebs.

8. EFECTO DEL BMY 7378 SOBRE LOS ADRENORECEPTORES α_{1D}

Después de la primera curva concentración-respuesta a la noradrenalina las arterias se mantuvieron por 30 min en una solución con BMY 7378 (1×10^{-8} M), rauwolscina y propranolol, una vez transcurrido el tiempo se realizó una curva concentración-respuesta a NE (1 nM a 100 μ M). Después se dejó reposar la arteria en solución Krebs durante 1 hora y se realizó el mismo procedimiento, pero ahora con BMY 7378 ($1 \times 10^{-8.5}$ M) y después con BMY 7378 (1×10^{-8} M).

9. EFECTO DEL 5-METILURAPIDIL SOBRE LOS ADRENOCEPTORES α_{1A}

Se realizó el mismo procedimiento que con el BMY 7378, pero ahora con 5-metilurapidil adicionándole las siguientes concentraciones: 1×10^{-8} , $1 \times 10^{-7.5}$ y 1×10^{-7} M.

PROTECCIÓN DEL ADRENORECEPTOR α_{1D} - CON BMY 7378 (1×10^{-7} M)

Se incubaron las arterias con 2.7 ml de medio D-MEM y BMY 7378 (1×10^{-7} M) durante 24 horas y después se realizó una curva concentración- respuesta a NE (1 nM a 100 μ M).

10. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA POR WESTERN BLOT

- Extracción de la muestra

Se sacrificaron 8 ratas en una atmósfera de éter y se les disecó la aorta, posteriormente se limpió del tejido adiposo y conectivo circundante. Se colocó el tejido en 0.5ml de Tris-HCl (pH 7.4; 0.1M) más una mezcla de inhibidores de proteasas (PMSF, TLC e IAA) y se homogenizó con un Politron (Tissue Tearor, Biospec Products, Inc.). Obtenidos, los homogenizados se centrifugaron a 10,000 rpm/5 minutos/4° C y se separó el sobrenadante en alícuotas de 200 microlitros. Se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford. A cada pozo se le agregaron una alícuota, el 10% de su volumen de buffer de SDS, que a su vez tiene el 10% de β -mercaptoetanol, se hirvieron las muestras en baño maría por 10 minutos. Las muestras se mantuvieron en congelación a -70° C.

- Electroforesis en geles de poliacrilamida:

Se prepararon geles de poliacrilamida al 10%. Una vez polimerizado el gel se depositó en cada pozo 20 microgramos/ μ l y en un pozo predeterminado se depositó un marcador de peso molecular (Rainbow, Amersham), más tarde se agregó en la cámara un buffer de corrida (Tris-Acetato 400 mM, EDTA 20 mM), y se inició la electroforesis a 88 voltios durante 3 horas.

- Transferencia de proteínas

Las proteínas separadas se transfirieron desde los geles hacia membranas de fluoruro de polivinildieno (PVDF, Transfer Membrane; Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech) por medio de un sistema de transferencia (Trans-Blot SD Semi-dry Transfer Cell, Bio-Rad) a 15 voltios durante 45 minutos.

- Inmunodetección

Se realizó un bloqueo de unión inespecífica con leche Svelty, baja en grasas, al 5% en buffer TBS-Tween, durante 3 horas con agitación constante. Las membranas se incubaron con anticuerpos primarios (anticuerpos de cabra; 1:200 en leche-TBS-Tween al 5%) específicos contra cada uno de los adrenoreceptores α_1 - y β -actina (Santa Cruz, Biotechnology) por toda la noche a 20° C, con agitación constante. Posteriormente se realizaron tres lavados a intervalos de 10 minutos con TBS-Tween abundante. Se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (obtenida

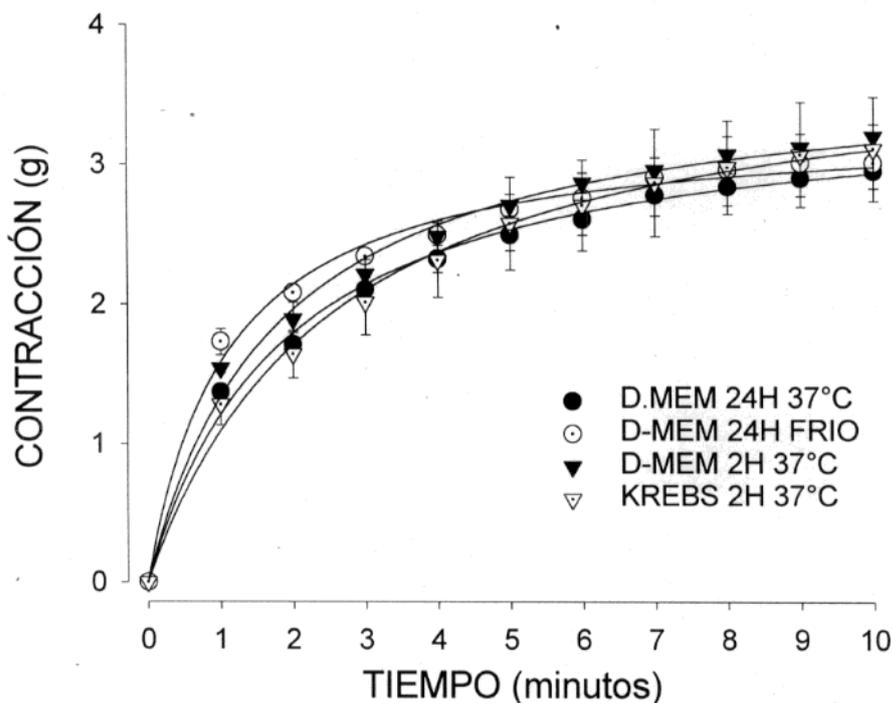
de burro inmunizada con anticuerpo anti-cabra; 1:1000 en leche-TBS-Tween al 5%) contra el anticuerpo primario. Finalmente las membranas se expusieron y se revelaron en placas fotográficas (Hyperfilm-ECL, Amersham) utilizando como agente quimioluminiscente, luminol (Western Blotting Luminol Reagent, Santa Cruz Biotechnology). La fluorescencia se detectó como una banda oscura en la placa fotográfica, correspondiendo al peso molecular de la proteína de interés recomendado por el fabricante de los anticuerpos primarios. Las placas fotográficas se digitalizaron y analizaron por densitometría mediante un programa computarizado (Quantity One, Bio-Rad).

Los datos se graficaron como la relación entre la densidad de la banda de la proteína problema, entre la densidad de la banda de la proteína de referencia (beta-actina) expresada en unidades arbitrarias.

RESULTADOS

1) RESPUESTA CONTRÁCTIL DE AORTA ADICIONANDO KCl 80 mM

Para investigar si las condiciones de incubación modifican la respuesta contráctil en aorta de rata Wistar se agregó una solución de KCl 80 mM



Gráfica 1. Curso temporal de la contracción a KCl 80 mM en arteria aorta de rata incubada a diferentes tiempos y condiciones.

En las diferentes condiciones de incubación de la arteria aorta en rata Wistar, (ver grafica 1). El KCl 80 mM provocó una respuesta contráctil cuya contracción máxima se alcanzó después de los 5 minutos y no fue modificada por las condiciones ya descritas.

La NE provoca contracción dependiente de la concentración en arteria aorta (ver grafica 2). Sin embargo, en los anillos incubados a las 2 horas con NE se observó desensibilización del adrenoreceptor α_1 porque disminuyó la contracción máxima de los incubados con NE con respecto a el control aunque los valores de afinidad por el agonista (pD_2) son similares (ver tabla 1).

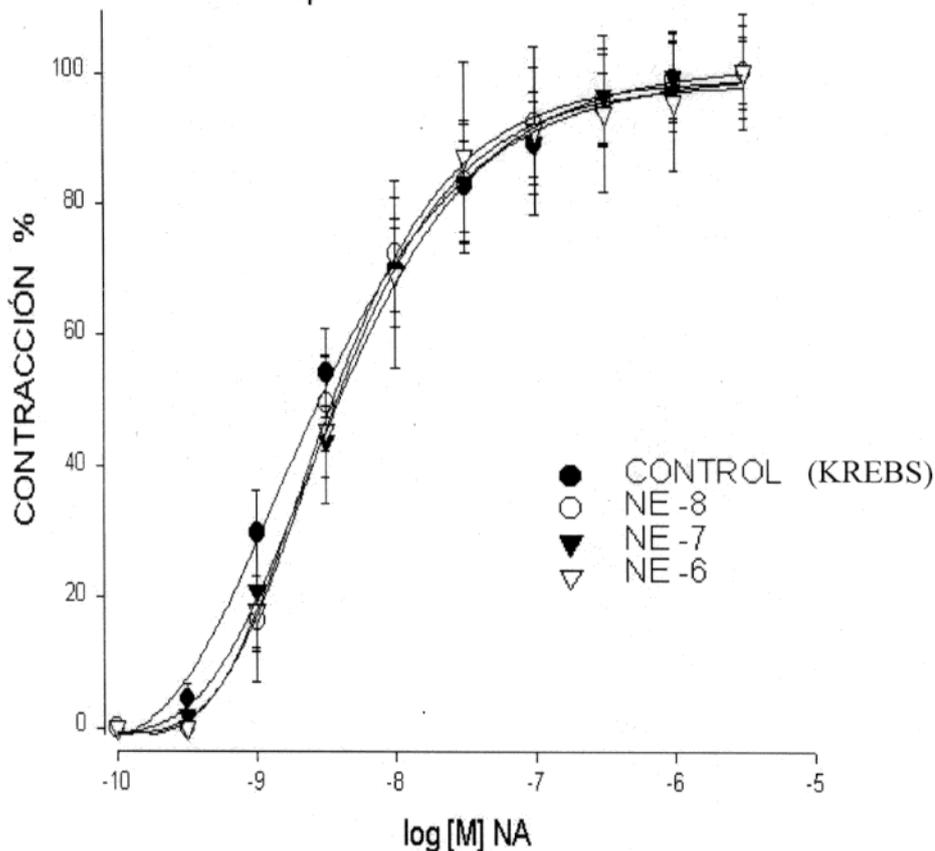
Tabla 1. Valores de pD_2 para Noradrenalina en aorta de rata Wistar normotensa en condiciones de cultivo a diferentes tiempos. E.E. = Error Estandar

Tiempo	2 horas		24 horas	
	Media	E.E.	Media	E.E.
Control	8.73	0.11	6.74	0.13
NA -8.5	8.63	0.5	6.36	0.09
NA -8	8.78	0.33	6.53	0.06
NA -7.5	8.80	0.47	6.67	0.1
NA -7	8.68	0.29	6.65	0.1
NA -6.5	8.14	0.61	6.91	0.12
Media	8.62	0.38	6.64	0.11

A las 24 horas de incubación se observó un desplazamiento a la derecha, con cambios importantes en la respuesta máxima de la curva concentración-respuesta a NE (ver grafica 2). Los valores de pD_2 a las 24 horas de incubación es, aproximadamente, de 6.64 (ver tabla 1).

3) EFECTO CONTRÁCTIL DEL AGONISTA α_1 ADRENÉRGICO EN AORTA DE RATA INCUBADA CON KREBS 24 HORAS

Se incubó la arteria aorta 24 horas con Krebs a 4°C, conteniendo NE (1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} M) y un control únicamente con Krebs. Después de la incubación se realizó una curva concentración-respuesta a NE.



Gráfica 3. Respuesta contráctil de aorta de rata incubada en Krebs 24 horas a 4°C y a diferentes concentraciones de NE.

La NE provocó contracción, dependiente de la concentración, en aorta de la rata (ver Grafica 3); cabe señalar que a las 24 horas incubadas con Krebs no ocurre un desplazamiento a la derecha, como cuando son incubadas con el medio D-MEM. El valor del pD_2 fue de 8.4 indicando que esa es la afinidad de la NE por el receptor α_{1D} adrenérgico (Villalobos-Molina y col. 1996; Vagna P. R. Y col. 2001; Fagura y col. 1997).

4) CONTRACCIÓN DE LA AORTA EN PRESENCIA DE ANTAGONISTAS α_1 ADRENÉRGICOS

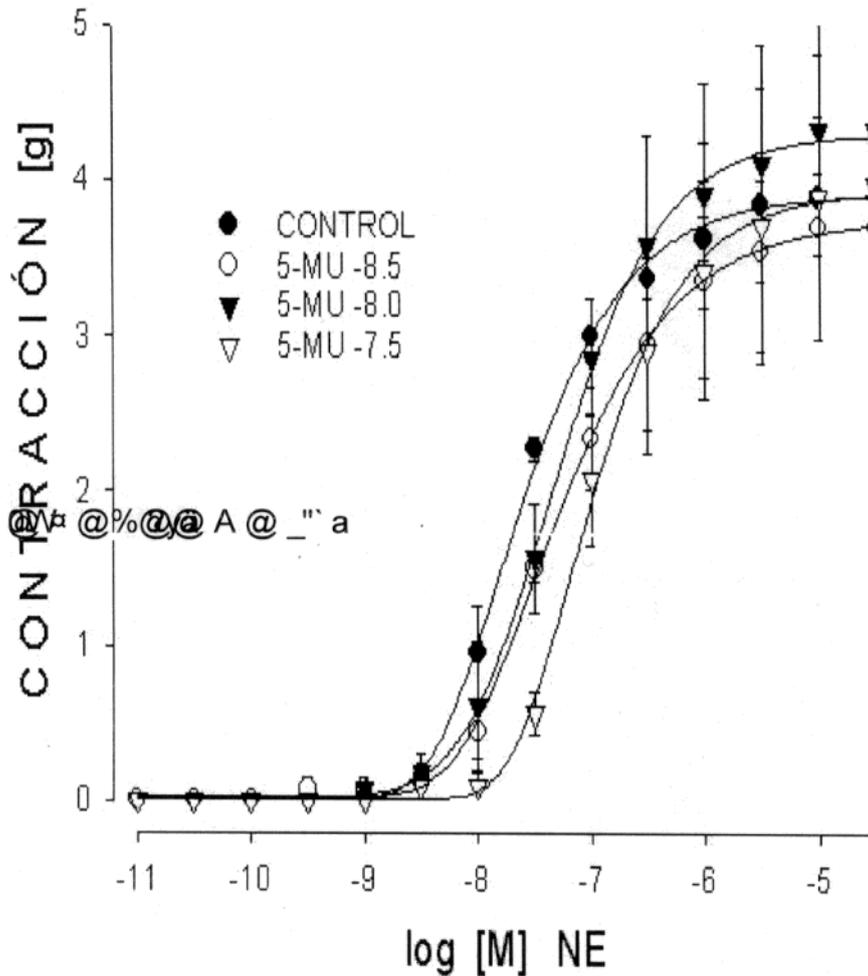
Se agregaron antagonistas para caracterizar los subtipos de receptores α_1 adrenérgicos que participan en el fenómeno de desensibilización.

➤ 2 HORAS DE INCUBACIÓN

Después de las 2 horas de incubación con NE, se le agregó a la aorta un antagonista selectivo para el receptor α_{1D} adrenérgico (BMY 7378) a concentraciones de $1 \times 10^{-8.5}$, 1×10^{-8} y $1 \times 10^{-7.5}$ M. También se le agregó, a otra arteria, un antagonista para el subtipo α_{1A} (5-metilurapidil, 5Mu) en concentraciones de 1×10^{-8} , $1 \times 10^{-7.5}$ y 1×10^{-7} M

❖ RESPUESTA CONTRÁCTIL DE AORTA ADICIONANDO EL ANTAGONISTA 5-Mu DESPUÉS DE LAS 2 HORAS DE INCUBACIÓN CON D-MEM

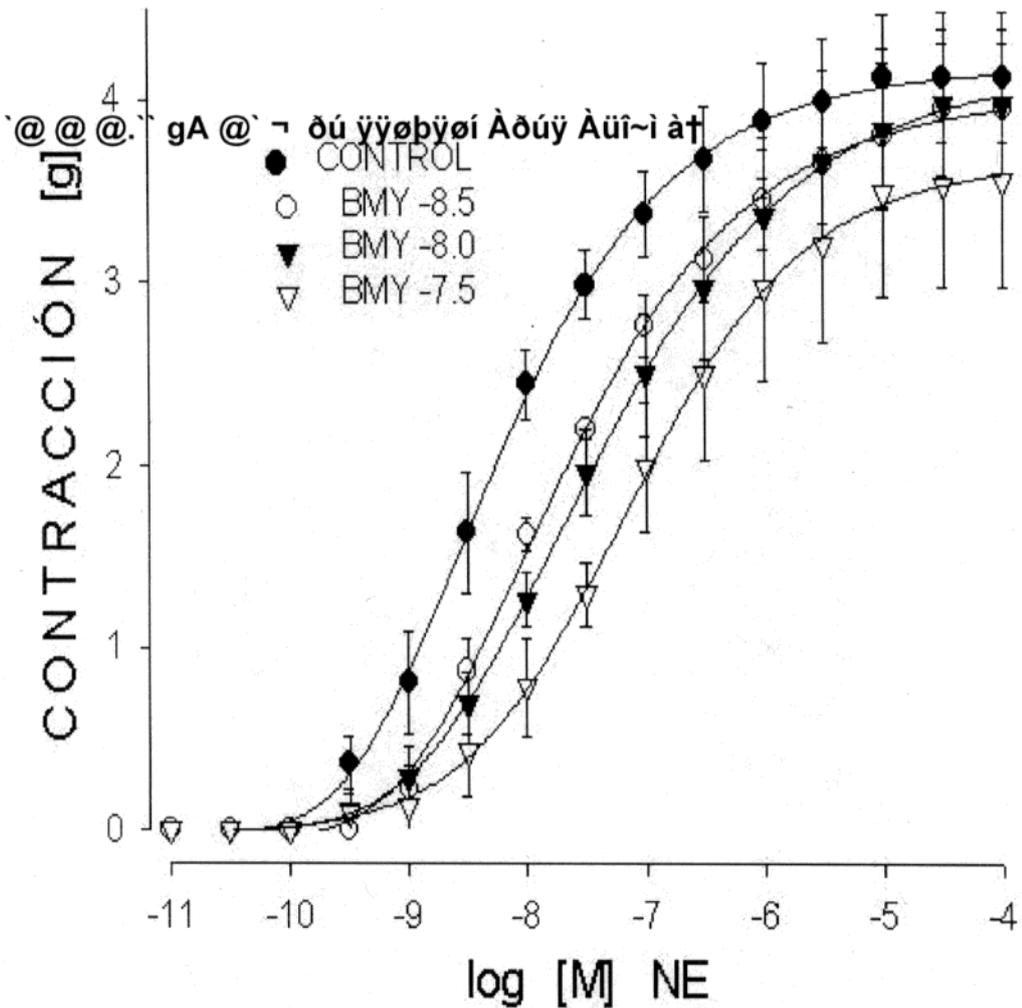
El antagonista 5-Mu no desplazó la curva a la derecha de la curva concentración-respuesta a NE en 2 horas de incubación (ver Grafica 4); el valor de afinidad del antagonista (pkB) fue de 7.46, indicando que el receptor adrenérgico α_{1A} no esta ejerciendo la respuesta contráctil en la arteria, a las 2 horas de incubación, ya que el valor de afinidad del 5-Mu por el adrenoceptor α_{1A} que se ha reportado es 8.9 (Rafael Villalobos-Molina y col. 1996; M.S. Fagura, y col 1997).



Gráfica 4. Curva concentración-respuesta de 5-MU a diferentes concentraciones y con 2 horas de incubación con D-MEM.

❖ RESPUESTA CONTRÁCTIL DE AORTA AGREGANDO EL ANTAGONISTA BMY 7378 DESPUES DE 2 HORAS DE INCUBACIÓN CON D-MEM

El antagonista BMY 7378 desplazó a la derecha la curva concentración-respuesta a NE en 2 horas de incubación (ver Grafica 5). El valor de pA_2 fue de 8.9 y mostró que el BMY7378 es un antagonista con alta afinidad en la arteria aorta.



Gráfica 5. Curva concentración-respuesta de BMY 7378 a diferentes Concentraciones y con 2 horas de incubación con D-MEM.

Los valor de pD_2 a NE que fue de 8.7 y el valor de pA_2 que fue de 8.9 indican que el receptor α_{1D} adrenérgico de aorta de rata Wistar participa en la contracción a las 2 horas de incubación con NE ya que el valor de afinidad del BMY 7378 por el adrenoreceptor α_{1D} que se ha reportado es 8.9 (Rafael Villalobos-Molina y col. 1996; M.S. Fagura, y col 1997).

➤ 24 HORAS DE INCUBACIÓN

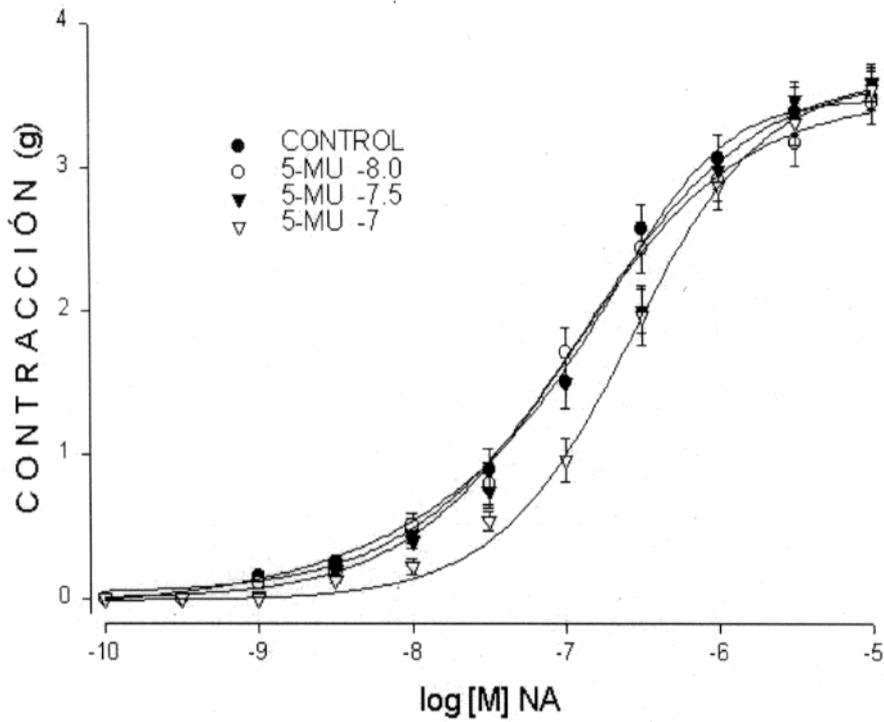
Con base en los resultados anteriores el receptor α_{1D} -adrenérgico esta ejerciendo la respuesta contráctil a las 2 horas de incubación, pero a las 24 horas se desplazó la curva a la derecha ≈ 100 veces, por lo tanto se agregaron antagonistas para los receptores α_{1D} y α_{1A} adrenérgicos, con el propósito de conocer la participación de estos receptores cuando ocurre el proceso de desensibilización.

❖ RESPUESTA CONTRÁCTIL DE AORTA ADICIONANDO EL ANTAGONISTA 5-Mu DESPUES DE LAS 24 HORAS DE INCUBACIÓN CON D-MEM

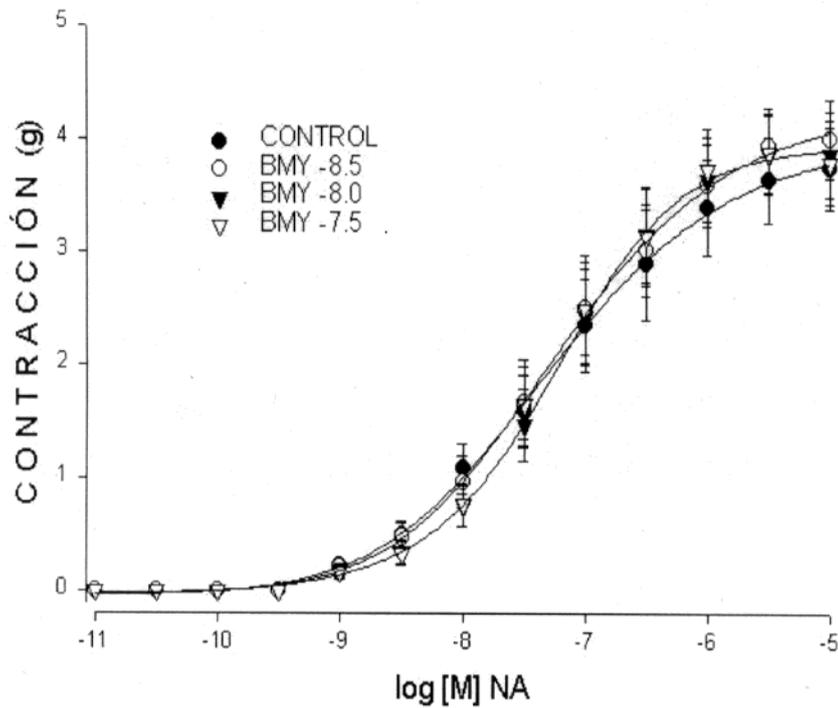
El antagonista 5-Mu no desplazó la curva a la derecha de la curva concentración-respuesta a NE en 24 horas de incubación (ver Grafica 6); mientras que el valor de afinidad del antagonista fue de 7.90, indicando que el receptor adrenérgico α_{1A} no está ejerciendo la respuesta contráctil a las 24 horas de incubación, ya que el valor de afinidad del 5-Mu por el adrenoreceptor α_{1A} que se ha reportado es 8.9 (**Gross y col.1988; Minneman y col., 1988; Michel y col 1989; Fagura y col. 1997**).

❖ RESPUESTA CONTRÁCTIL DE AORTA AGREGANDO EL ANTAGONISTA BMY 7378 DESPUES DE LAS 24 HORAS DE INCUBACIÓN CON D-MEM

El antagonista BMY 7378 tampoco desplazó a la derecha la curva concentración-respuesta a NE en 24 horas de incubación con D-MEM (ver Grafica 7). El valor de pA_2 fue de 6.11, esto quiere decir que tiene baja afinidad por el receptor α_{1D} -adrenérgico y el reportado es de 8.9 (**Villalobos-Molina y col. 1996; Fagura, y col 1998**). Lo que indica que éste no participa en la respuesta contráctil a las 24 horas de incubación con D-MEM.



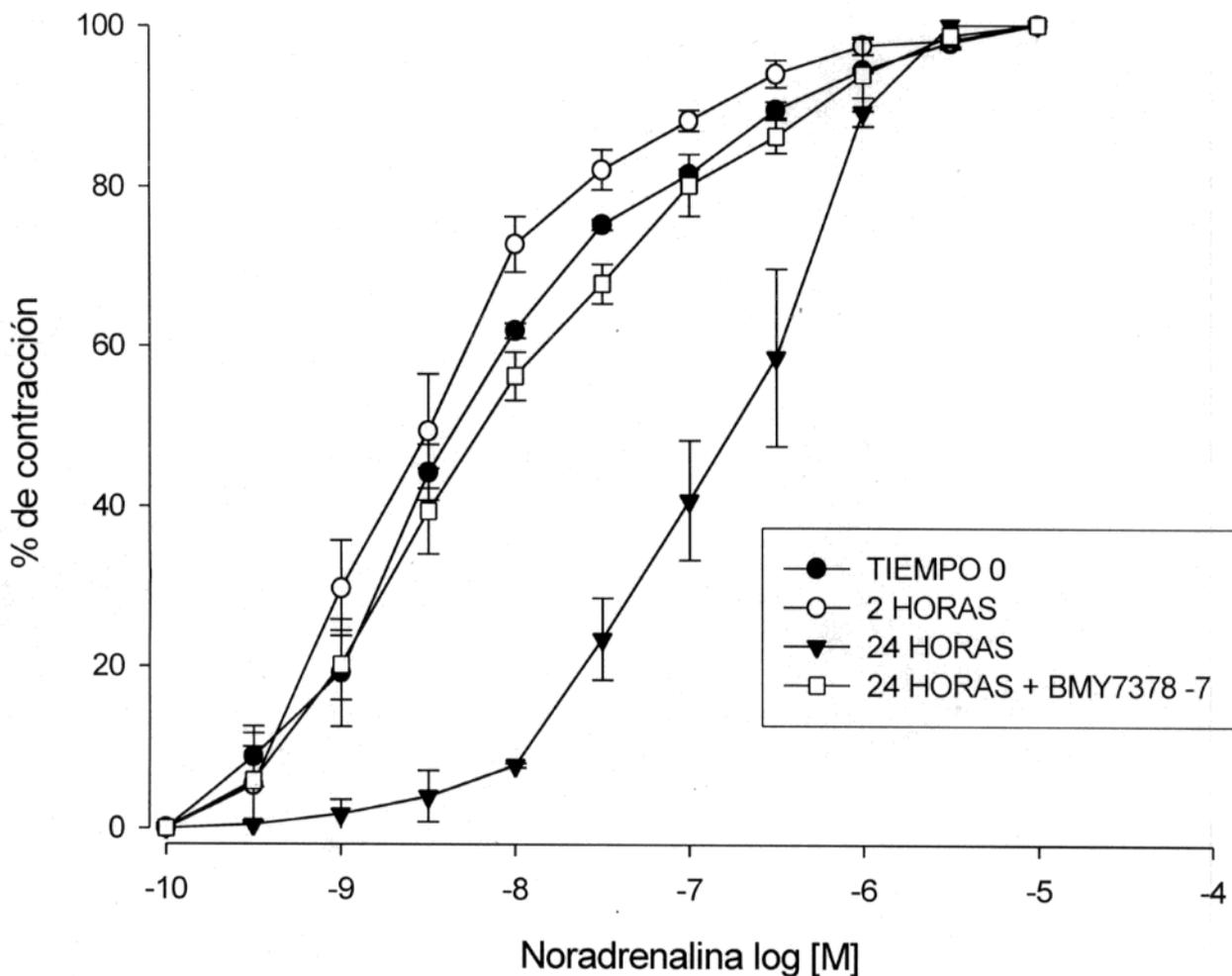
Gráfica 6. Curva concentración-respuesta de 5-MU a diferentes concentraciones y con 2 horas de incubación con D-MEM.



Gráfica 7. Curva concentración-respuesta de BMY 7378 a diferentes Concentraciones y con 24 horas de incubación con D-MEM .

5) PROTECCIÓN DEL RECEPTOR α_{1D} ADRENÉRGICO INCUBANDO LA AORTA CON D-MEM Y EL ANTAGONISTA BMY 7378 (1×10^{-7} M) POR 24 HORAS

Como el receptor α_{1D} -adrenérgico, a las 2 horas de incubación, esta participando en la respuesta contráctil y a las 24 horas no lo hace, se propuso incubar la aorta 24 horas con D-MEM y se le adicionó BMY 7378 a la concentración de 1×10^{-7} M con el propósito de ocupar y proteger al receptor de la desensibilización, como se había observado.

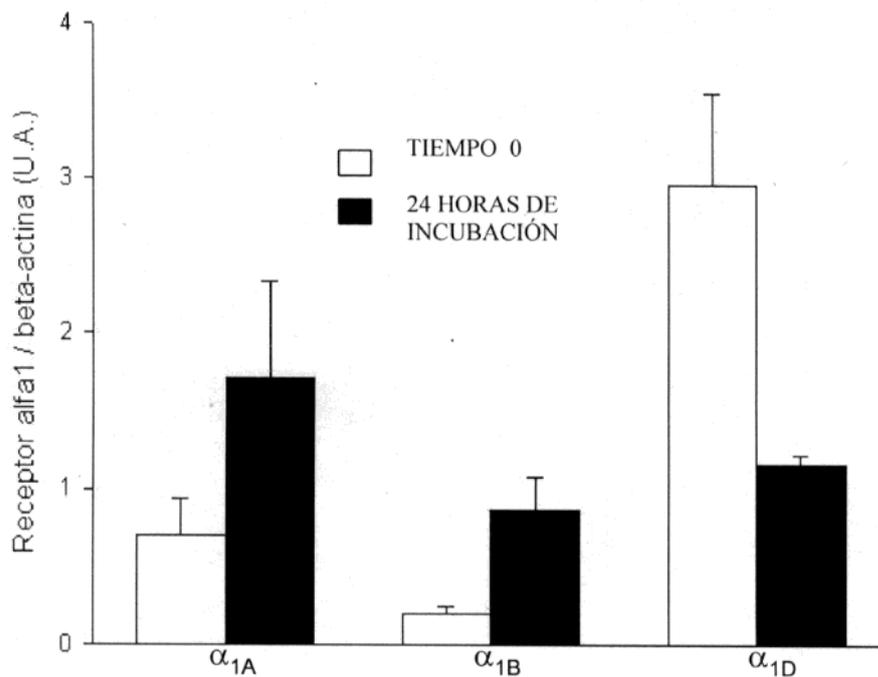


Gráfica 8. Protección del receptor α_{1D} -adrenérgico incubando la aorta con D-MEM y el antagonista BMY 7378 (1×10^{-7} m) por 24 horas.

El BMY 7378 protegió al receptor α_{1D} -adrenérgico cuando la arteria fue incubada las 24 horas y se observa un comportamiento como el de las 2 horas de incubación y el de tiempo cero, es importante señalar que el tiempo cero fue cuando se extrajo la aorta y enseguida se montó en el equipo para órgano aislado (ver Gráfica 8). El valor de pA_2 fue de 8.7 indicando que el receptor α_{1D} -adrenérgico no se desensibilizó y esta participando en la contracción. También se observó el desplazamiento a la derecha de la curva a NE cuando es incubada con D-MEM.

6) CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE WESTERN BLOT

Los resultados obtenidos por el método de Western Blot indican que la cantidad de proteína para el receptor α_{1D} -adrenérgico disminuyó, a las 24 horas de incubación, significativamente y para el caso de los otros 2 receptores su proteína aumentó, pero el subtipo α_{1B} -adrenérgico fue estadísticamente significativo mientras que el subtipo α_{1A} adrenérgico aumentó su proteína, pero no es significativa (ver grafica 9).



Gráfica 9. Cuantificación de proteína para los receptores α_1 adrenérgicos por el Método de Western Blot a tiempo 0 y 24 horas de incubacion con D-MEM.

DISCUSIÓN

Los adrenoreceptores α_1 constituyen una familia heterogénea de receptores acoplados a proteínas G. La activación simpática tónica de estos receptores produce un aumento de la resistencia vascular periférica y de la presión arterial (Ibarra B. Tesis Doctoral 2000).

Estudios funcionales de unión con radioligando y de biología molecular han demostrado la existencia de múltiples subtipos de adrenoreceptores α_1 en músculo liso vascular de aorta de rata.

En los últimos años se ha investigado y se ha tratado de comprender en términos moleculares y farmacológicos como los receptores α_1 adrenérgicos se desensibilizan funcionalmente. Esta labor no ha sido fácil ya que se ha estado estudiando cual es la participación cuando son sobreexpresados algún subtipo específico de los receptores α_1 adrenérgicos en las células, por ejemplo Myrton y col. 2003, han investigado la localización, regulación, función y estabilidad del receptor α_{1B} adrenérgico utilizando células DD₁ MF-2 de hámster, otro trabajo interesante es el de García Sainz y col. 2004 donde investigaron la fosforilación y desensibilización en una línea celular de fibroblastos rat 1 que son transfectados con un plasmido conteniendo un cDNA del adrenoreceptor α_{1D} de humano.

En la rata de la cepa Wistar estudios funcionales, utilizando arterias como la carótida y la aorta torácica han demostrado que el subtipo de receptor α_{1D} adrenérgico tiene una participación importante en la respuesta contráctil (**Villalobos Molina e Ibarra Barajas, 1996**). En esta investigación se comprobó que el receptor α_{1D} adrenérgico participa en la contracción (pD_2 8.7) (**Villalobos-Molina y col. 1996; Fagura M.S., y col 1998**). Los resultados de los estudios funcionales *in vitro* demuestran que en el control cuando fue incubado a las 2 horas, el valor de afinidad a noradrenalina fue (pD_2 8.73 ± 0.11) y cuando el tejido fue incubado a diferentes concentraciones de noradrenalina se observó desensibilización por que disminuyó el efecto máximo con respecto al control (ver grafica 2) pero el valor de pD_2 promedio de las incubadas con noradrenalina fue de 8.62 ± 0.38 . Ambos valores de afinidad no son diferentes y son similares a la afinidad de la noradrenalina por el subtipo de receptor α_{1D} adrenérgico.

Con el propósito de identificar el subtipo de receptor que media la respuesta contráctil en los diferentes tiempos de incubación (2 y 24 horas) se utilizaron antagonistas selectivos para los subtipos α_{1A} y α_{1D} adrenérgicos (5-Mu y BMY 7378 respectivamente). A las 2 horas de incubación y adicionando 5 Mu el valor de afinidad fue de 7.4 indicando que el receptor adrenérgico α_{1A} no media la respuesta contráctil, pero con la presencia de BMY 7378 desplaza la curva hacia la derecha, con un valor de afinidad de 8.9 corroborando la participación del adrenoreceptor α_{1D} en la respuesta contráctil en la aorta de rata en un período de incubación de 2 horas.

Cuando se incubó la arteria 24 horas con y sin noradrenalina se observó un resultado bastante interesante porque ocurre desensibilización donde probablemente exista "downregulation" de los adrenoreceptores α_1 . En estas condiciones se observa un desplazamiento a la derecha de la curva con 2 ordenes de magnitud, en otras palabras se requiere 100 veces más la concentración de noradrenalina para provocar el mismo efecto que a las 2 horas de incubación (ver grafica 2). Esta deducción es a partir del análisis de los valores de pD_2 ya que el valor para noradrenalina a las 24 horas de incubación fue de 6.6 ± 0.11 mientras que a las 2 horas fue de 8.73 ± 0.11 . Con estos valores se infiere que el subtipo de adrenoreceptor α_{1D} que participaba en la contracción a las 2 horas ya no esté mediando la respuesta contráctil a las 24 horas de incubación.

Un resultado inesperado pero interesante fue que el control se comportó de manera similar a los incubados con noradrenalina a las 24 horas, con respecto a este fenómeno se propone la posibilidad de que exista noradrenalina residual en las terminales nerviosas de la aorta de rata y que esta noradrenalina este interactuando constantemente con los receptores α_{1D} adrenérgicos y con ello desencadene el proceso de desensibilización, es decir la presencia del agonista por 24 horas podría desensibilizar al tejido. También se evaluó farmacológicamente la respuesta contráctil a KCl 80 mM en aorta de rata en diferentes condiciones y tiempos de cultivo (ver gráfica 1) y se observa que no existe diferencia entre la respuesta contráctil por efecto de la despolarización de la membrana en las diferentes condiciones de cultivo esto nos quiere decir que la maquinaria contráctil no fue modificada por la incubación.

A las 24 horas de incubación no se observó un desplazamiento hacia la derecha de las curvas en presencia de los antagonistas 5-Mu y BMY 7378, para el caso de I BMY

7378 el resultado era de esperarse no así con el 5-Mu cuyo valor de afinidad en estas condiciones fue $pK_b 7.90 \pm 0.15$ con lo cual se descartó la posibilidad de la participación del subtipo α_{1A} en las respuesta contráctil por que la afinidad del 5-Mu por el subtipo α_{1A} es de 8.9 (Gross y col.1988; Minneman y col., 1988; Michel y col 1989; Fagura M.S., y col 1998).

Otro resultado que vale la pena mencionar fue que el adrenoceptor α_{1D} se protegió de la desensibilización cuando el tejido fue incubado con BMY 7378 (1×10^{-7} M), esto quiere decir que se bloqueó la disponibilidad del receptor con la noradrenalina residual de las terminales nerviosas, o sea que el BMY 7378 evita que la noradrenalina este sobreestimulando continuamente el receptor adrenérgico α_{1D} y por lo tanto no desencadene los pasos de la desensibilización que serían la fosforilación, internalización y degradación o reciclamiento del receptor.

Otro aspecto importante a destacar sobre los resultados obtenidos fue que no se pudo caracterizar el subtipo de adrenoceptor α_1 que participa en respuesta funcional en la aorta de rata cuando fue incubada a las 24 horas, porque los resultados obtenidos de los antagonistas 5-Mu y BMY 7378 no desplazaron las curvas a la derecha, lo que sugiere la participación del receptor adrenérgico α_{1B} en la modulación de la respuesta contráctil a las 24 horas apoyándose en las siguientes bases, los resultados de CEC en este trabajo cuando se incubó con 1×10^{-6} M por 24 horas fue que se abolió la respuesta contráctil como ya sabemos el efecto de CEC sobre la función de los receptores α_1 adrenérgicos ha sido principalmente interpretado por la capacidad de alquilar e inactivar los subtipos de adrenoceptores α_{1B} y α_{1D} .

También se obtuvieron datos en los que la cuantificación de proteína para los subtipos α_{1A} y α_{1B} aumentó a las 24 horas de incubación.

Otro dato por el que reafirmamos la desensibilización del adrenoreceptor α_{1D} fue por la cuantificación de proteína para este receptor y a que disminuyó más de la mitad a las 24 horas de incubación con respecto al tiempo cero y esta diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0.005$).

Un experimento que se propone realizar es el incubar la arteria nada más con la parte de muscular y se incubaría a las 24 horas de tal manera que en la parte de la adventicia estamos removiendo las terminales nerviosas de las cuales se esta liberando noradrenalina y así no tendríamos la desensibilización del control.

Otro experimento seria el de adicionar el antagonista selectivo para el receptor adrenergico α_{1B} y se esperaría que existiera desplazamiento de la curva al adicionarle el antagonista. Con esto se podría corroborar las sugerencia que se plantea de que este receptor α_{1B} esta involucrado en la contracción a las 24 horas de incubación.

Los resultados de esta investigación muestran que el modelo experimental *in vitro*, puede ser de gran utilidad para estudiar la desensibilización ya que ya que no se cuenta con suficiente información en este tipo de modelos.

CONCLUSIÓN

- Se encontró que cuando la arteria es incubada a las 2 horas con noradrenalina, el receptor que participa en la modulación de la respuesta funcional es el α_{1D} .
- Cuando se incubó la arteria por un tiempo de 24 horas con noradrenalina se observa desplazamiento a la curva de noradrenalina con dos ordenes de magnitud con respecto a las 2 horas de incubación.
- Los datos sugieren que a las 24 horas de incubación el receptor que participa en la modulación de la respuesta contráctil en la aorta es el subtipo α_{1B} . Ya que la cuantificación de proteína para este subtipo aumenta significativamente a las 24 horas de incubación.
- Las diferentes condiciones de incubación no modifican la respuesta contráctil al agregar 80 mM de KCl en la aorta de rata indicando que la maquinaria contráctil no esta modificada.
- Se identificó el proceso de desensibilización de los adrenoreceptores α_1 en músculo liso vascular cuando la arteria aorta fue cultivada a las 2 y 24 horas.

BIBLIOGRAFÍA

Ahlquist R.P. (1948). A study of the adrenotropic receptors. American Journal Physiologic **153**: 586-600.

Audrey C., Stéphane A. L., Marc G. C. y Lefkowitz R. (2002). Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and β -arrestin proteins. Progress in Neurobiology **66**: 61–79.

Bustamante S. E. (1997). "Neurotransmisores y Neuromoduladores que participan en la transmisión del Dolor y la Analgesia: Canales Iónicos en El Dolor. Aspectos Básicos y Clínicos". Segunda edición, Ed. Mediterráneo, Santiago de Chile. pp 78-88.

Bustamante S. E., Miguel A. y Morales S. (2003). "Receptores Farmacológicos" Ed. Mediterraneo, Santiago de Chile. pp 1-16.

Bylund, D.B. (1992). Subtypes of α_1 - and α_2 - adrenergic receptors. FASEB J. **6**: 832-839.

Castro Ramírez V., Jayme Ascensio V., Córdova Izquierdo A., Ruiz Lang G., Castillo González Ana y Rosas Sánchez L. (2003). "El sistema nervioso autónomo". Ed. Univesidad Autónoma Metropolitana, México D.F. pp 1-99.

Cheryl M. C. y Donald H. W. (1995). The arrestin superfamily: cone arrestins are a fourth family. FEBS Letters **362**: 247-255.

Fagura, M.S., Lydford S.J. y Dougall I.G. (1997). Pharmacological classification of α_1 -adrenoceptors mediating contractions of rabbit isolated ear artery: comparison with rat isolated thoracic aorta. British Journal of Pharmacology **120**: 247 –258.

Faure C., Pimoule C, Arbilla S, Langer S. Z. y Graham D. (1994). Expression of α_1 adrenoceptor subtypes in rat tissues. Implications for α_1 adrenoceptor classification. *European Journal Pharmacology* **268**: 141-149.

García-Sáinz J.A., Romero-Avila, M.T., Alcántara-Hernández, T., Macias-Silva, M., Oiihares-Reyes, A. y González-Espinoza, C. (1992). Species heterogeneity of hepatic α_1 -adrenoceptors: α_{1A} -, α_{1B} - or α_{1D} - subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**: 760-767.

García-Sáinz J.A., Casas-González, P., Romero-Avila, M.T. y González-Espinoza, C. (1994). Characterization of the hepatic α_{1B} -adrenoceptors of rats, mice and hamsters. *Life Science* **54**: 1995-2003.

García-Sáinz J.A. (1996a). "Hormonas: mensajeros químicos y comunicación celular" segunda edición, Ed. Fondo de Cultura Económica, México D.F. pp 1-51.

García-Sáinz J. A., Romero-Avila, M.T. y González-Espinoza, C. (1996b). Coexpression of α_{1A} - and α_{1B} - adrenoceptors in the liver of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *European Journal Pharmacology* **311**: 277-283.

García-Sáinz J.A., Vázquez Prado J. y Medina Luz del Carmen. (2000). α_1 adrenoceptors: function and phosphorylation. *European Journal Pharmacology.* **398**: 1-12.

García-Sáinz J.A., Vázquez Cuevas F. y Romero Ávila M. T. (2001). Phosphorylation and desensitization of α_1 adrenergic receptors. *Biochemical Journal* **353**: 603-610.

García-Sáinz J.A., Rodríguez Pérez E. y Romero Ávila M. T. (2004). Human α_{1D} adrenoceptor phosphorylation and desensitisation. *Biochemical Pharmacology* **67**: 1853-1858.

García-Sáinz J.A., Romero-Avila, M.T., Alcántara-Hernández, T., Macias-Silva, M., Ojivares-Reyes, A. y González-Espinoza, C. (1992). Species heterogeneity of hepatic α_1 -adrenoceptors: α_1A -, α_1B - or α_1C -subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**: 760-767.

Goetz A.S., King, H.K., Ward, S.D., True, T.A., Rimele, T.J. y Saussy, D.L.Jr. (1995). BMY 7378 is a selective antagonist of the subtype of α_{1D} -adrenoceptors. *European Journal. Pharmacology* **272**: R5-R6.

Gross G., Hanft, G., Rugevies, C. (1988). 5-Methyl-uripidil discriminates between subtypes of the α_1 -adrenoceptor. *European Journal Pharmacology* **151**: 333-335.

Guarino R.D., Pérez, D.M. y Piascik, M.T. (1996). The α_1 -adrenergic receptors. *Cellular Signalling* **8**: 322-323.

Hattori, Y. y Kanno, M. (1998). Role of α_1 -adrenoceptor subtypes in production of the positive inotropic effects in mammalian myocardium: implications for the α_1 -adrenoceptor subtype distribution. *Life Science* **62**: 1449-1453.

Hiraoka Y., Ohmura, T., Oshita, M., Watanabe, Y., Morikawa, K., Nagata, O., Kato, H., Taniguchi, T. y Muramatsu, I. (1999). Binding and functional characterization of α_1 -adrenoceptor subtypes in the rat prostate. *European Journal Pharmacology* **366**: 119-126.

Hoffman, B.B., Lefkowitz, R.J. (1996). Catecholamines, sympathomimetic drugs, and adrenergic receptor antagonists (eds) Hardman, J.G., Limbird, L.E., Molinoff, P.B., Ruddon, R.W., Gilman, A.G., in Goodman & Gilman's *The pharmacological basis of therapeutics* pp. 199-248.

Hrometz S.L., Edelman, S.E., McCune, D.F., Olges, J.R., Hadley, R.W., Perez, D.M. y Piascik, M.T. (1999). Expresión of múltiple α_1 -adrenoceptors on vascular smooth muscle contraction: correlation with the regulation of contraction. *J. Pharmacol. Expt. Ther.* **290**: 452-464.

Hussain M. y Marshall, I. (1997). Characterization of α_1 -adrenoceptor subtypes mediating contractions to phenylephrine in rat thoracic aorta, mesenteric artery and pulmonary artery. *Br. J. Pharmacol.* **122**: 849-858.

Ibarra Barajas Maximiliano (2000). Caracterización de los receptores α_1 -adrenérgicos en arterias de ratas normotensas y espontáneamente hipertensas. Tesis Doctoral, CINVESTAV, Instituto Politécnico Nacional.

Koshimizu Taka-aki, Akito Tanoue, Hirasawa Akira, y Junji Yamauchi. (2003). Recent advances in α_1 adrenoceptor pharmacology. *Pharmacology and Therapeutics* **98** (2): 235-244.

Lachnit W.G., Tran, A.M., Clarke, D.E. y Ford, A.P. (1997). Pharmacological characterization of an α_{1A} -adrenoceptor mediating contractile responses to noradrenaline in isolated caudal artery of rat. *Br. J. Pharmacol.* **120**:819-826.

Lands A. M., Arnold A., McAuliff J.P., Luduena F.P. y Brown T.G. (1967). Differentiation of receptor systems activated by sympathicomimetics amines. *Nature* **214**: 597-598.

Langer S. Z., y Lehmann J. (1988). Presynaptic receptors on catecholamine neurons, In. Catecholamine I, (Trendelenberg U., Weiner N., eds), *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol **90**, Springer-Verlang, Berlin, 419-507.

Langer S. Z. (1974). presynaptic regulation of catecholamine release. *Br. Journal Pharmacology* **60**:481-497

Lomasney J.W., Cotecchia, S., Lorenz, W., Leung, W.Y., Schwinn, D.A., Yang-Feng, T.L., Brownstein, M., Lefkowitz, R.J. y Caron, M.G. (1991). Molecular cloning and expression of that cDNA for the α_1A -adrenergic receptor. The gene for which is located on human chromosome 5. *Journal. Biological Chemical* **266**, 6365-6369.

Marsh M. y McMahon H.T. (1999). The Structural Era of Endocytosis. *Science* **285**: 215-220.

McDonald P.H. y Lefkowitz R. J. (2001). β arrestins: new roles in regulation heptahelical receptors functions. *Cellular Signalling* **13**: 683-689.

Michel M. C., Insel P.A., Brode O.E. (1989). Renal α -adrenergic receptor alterations: a cause of essential hypertension?. *FASEB Journal* **3**, 139-144.

Minneman K.P., Han C. y Abel, P.W. (1988). Comparison of α_1 -adrenergic receptor subtypes distinguished by chloroethylclonidine and WB 4101. *Molecular. Pharmacology* **33**: 509-514.

Myron L. T., Steven C. P. y Nancy A. S. (2003). Regulation of alpha- $_{1B}$ adrenergic receptor localization, trafficking, function, and stability. *Life Sciences* **74**: 379–389.

Natel F. y Bouvier, M. (1993). Receptor regulation. *Neurotransmitter receptors*. Editorial Elsevier Science Publisher 99-109.

Penela P., Catalina Ribas C., y Mayor F. (2003). Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases. *Cellular Signalling* **15**: 973–981.

Piasecik M.T., Smith, M.S., Soltis, E.E. y Perez, D.M. (1994). Identification of the mRNA for the novel α_{1D} -adrenoceptor and two other α_1 -adrenoceptors in vascular smooth muscle. *Molecular Pharmacology* **46**:30-40.

Piasek, M.T., Guarino, R.D., Smith, M.S., Soltis, E.E., Saussy, D.L. y Perez, D.M. (1995). The specific distribution of the novel α_{1D} -adrenoceptor to the contraction of vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **275**:1583-1589.

Piasek M.T., Hrometz, S.L., Edelmann, S.E., Guarino, R.D., Hadley, R.W. y Brown, R.D. (1997). Immunocytochemical localization of the α_{1B} -adrenergic receptor and the distribution of this and the other subtypes to vascular smooth muscle contraction: analysis with selective ligands and antisense oligonucleotides. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **283**: 854-868.

Rennolds S. O., Steven R. P. y Paul A. I. (2000). Stoichiometry and Compartmentation in G Protein-Coupled Receptor Signaling: Implications for Therapeutic Interventions Involving Gs. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **294 (2)**: 407-412.

Rokosh D.G., Stewart, A.F., Chang, K.C., Bailey, B.A., Karliner, J.S., Camacho, S.A., Long, C.S. y Simpson, P.C. (1996). α_1 -Adrenergic receptor subtype mRNAs are differentially regulated by α_1 -adrenergic and other hypertrophic stimuli in cardiac myocytes in culture an in vivo. Repression of α_{1B} - and α_{1D} - but induction of α_{1D} . *Journal Biological Chemical* **271**:5839-5843.

Scofield M. A., Liu, F., Abel, P.W. y Jeffries, W.B. (1995). Quantification of steady state expression of mRNA for α_1 -adrenergic receptor subtypes using reverse transcription and a competitive polymerase chain reaction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **275**: 103510-103542.

Schnabel P. y Böhm, M. (1996). Heterotrimeric G proteins in Herat disease. *Cellular Signalling* **8** :413-423.

Spiegel A. (2003). β -Arrestin. Not Just for G Protein–Coupled Receptors. *Science* **301**: 1338-1339.

Guimaraes S y Daniel Moura (2001). Vascular Adrenoceptors: An Update. *Pharmacological Reviews* **53** : 319–356.

Starke, (1987). Presynaptic-autoreceptors. *Rev. Physiologic Biochemical Pharmacology* **107**: 73-146.

Stephan K. B., Eileen F. G. y Nigel W. B. (1997). Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. *Biochemical Journal* **322**: 1-18.

Tanaka C., y Nishizuka, Y. (1994). The protein kinase C family for neuronal signaling. *Annual Rev. Neurosciences* **17** : 551-567.

Torres-Márquez M.E., Villalobos-Molina, R. y García-Sáinz J.A. (1991). α_1 -Adrenoceptor subtypes in aorta (α_{1A}) and liver (α_{1B}). *European Journal Pharmacology* **206(3)** : 199-202.

Torres-Márquez., Romero-Avila, M.T., González-Espinosa, C. y García-Sáinz, J.A. (1992). Characterization of rat white fat cell α_{1B} -adrenoceptors. *Molecular Pharmacology* **42(3)** : 403-406.

Trudy A. K. y Lefkowitz R. (2003). Regulation of G Protein-Coupled Receptor Kinases and Arrestins During Receptor Desensitization. *Molecular Pharmacology* **63** : 9–18.

Vagna P. R., Fiona J., Colin B., Andrew R., John C., Mcgrath A. Y Chris H. (2001). Functional Characterization of α_1 -Adrenoceptor Subtypes in Human Subcutaneous Resistance Arteries. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **299** : 729–734.

Vargas H. M. y Gorman A. J. (1995). Vascular α_1 adrenergic receptor subtypes in the regulation of arterial pressure. *Life Science* **57** : 2291-2295.

Villalobos-Molina R. e Ibarra Barajas M. (1996). α_1 adrenoceptors mediating contraction in arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats are of the α_{1D} or α_{1A} subtypes. *European Journal of Pharmacology* **298** : 257-263.

Wu D., Katz, A., Lee, C.H. y Simmon, M.I. (1992). Activation of phospholipase C by α_1 -adrenergic receptors is mediated by the α subunits of Gq family. *Journal of Biological Chemistry* **297** : 25798-25802.

Xu, K. y Han, C. (1996). Quantification of mRNAs for three α_1 -adrenoceptor subtypes in rat aorta by solution hybridisation. *Life Science* **59** : 343-347.

Zhong H. y Minneman, K.P. (1999). α_1 -Adrenoceptor subtypes. *European Journal of Pharmacology* **375** : 271-276.