



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

Análisis de la abundancia relativa de los transcritos de los
receptores α_1 -adrenérgicos por PCR en tiempo real, en
ratas espontáneamente hipertensas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A

Jade Rodríguez Cabrales





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis fue realizada en la Unidad de Biomedicina (UBIMED) en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Francisco Gabriel Vázquez Cuevas. El proyecto fue apoyado por donativos del CONACYT, proyecto 47481, PAPIIT, DGAPA, UNAM IN203205 y fundación Miguel Alemán, A. C.

This is for you Mom

And for my love, Alejandro

How happy is the blameless vestal's lot!
The world forgetting, by the world forgot.
Eternal sunshine of the spotless mind!
Each pray'r accepted, and each wish resign'd;

Alexander Pope

Agradecimientos

Al Dr. Rafael Villalobos Molina por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo.

Al Dr. Francisco Vázquez Cuevas por el apoyo y dirección en la realización de este trabajo. Muchas gracias Sensei por toda tu paciencia y buena vibra, you're the best.

A los sinodales que corrigieron y enriquecieron esta tesis: Dr. Rafael Villalobos Molina, Biol. Héctor Barrera Escorcía, M. en C. María Eugenia Heres Pulido y M. en C. Irma Elena Dueñas García.

En especial quiero agradecer a las Power Puff girls, incluyendo a la M. en C. Laura Castañeda Partida, por que son unas excelentes maestras y extraordinarias personas.

A mis compañeros del lab.: Vicky (colega), Jessy, Martha (big sister), Jaime, Citla y Aurora, gracias por todos esos momentos de cábula y buenos consejos.

A mis compañeros de la carrera: Maggie, Samia, Paco, Memo, Areli, Raúl y César, gracias por la gran y divertida compañía a lo largo de la licenciatura tanto en el aula como en las prácticas de campo.

A la Familia Villalobos, por abrirme las puertas de su casa y por haberme tratado como un miembro más de la familia.

A mi Familia, por su apoyo en todos los momentos y decisiones importantes a lo largo de mi vida. Abuelos, tíos y primos.

A mis amigas: Nadxielly gracias por tu apoyo y amistad. Y a mi sister Lizeth, gracias por tu cariño incondicional durante esta larga y hermosa amistad. Te quiero mucho my friend.

Índice

Índice.....	1
Resumen.....	1
<i>Abstract</i>	2
Introducción.....	3
Hipertensión.....	3
Regulación de la presión arterial.....	5
Catecolaminas.....	8
Clasificación de los receptores adrenérgicos.....	12
Receptores α_1 -adrenérgicos.....	13
Importancia de los receptores α_1 -adrenérgicos en la regulación de la presión arterial.....	17
Antecedentes.....	19
Hipótesis.....	21
Objetivos.....	22
Diseño experimental.....	23
Materiales y métodos.....	25
Resultados.....	34
Discusión.....	60
Conclusión.....	64
Referencias.....	65

Resumen

La hipertensión arterial está mediada por diversos factores, entre ellos la estimulación de los receptores adrenérgicos, que intervienen en la contracción de la aorta torácica. En estudios anteriores, se demostró que el receptor α_{1D} -adrenérgico (α_{1D} -AR) tiene un papel en la génesis y el mantenimiento del proceso hipertensivo dependiente de la edad. El presente trabajo se enfoca en comparar la abundancia relativa del mRNA de los receptores α_1 -AR durante el desarrollo, para establecer una relación con la contractilidad de la aorta descrita en la literatura, utilizando como modelo ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y ratas normotensas (WKY). Se propone que los niveles de expresión de los receptores α_1 -AR están relacionados con la edad. El RNA total fue extraído de la aorta torácica para después sintetizar el cDNA con transcriptasa reversa. Se realizó PCR semicuantitativo, donde fue necesario diseñar los cebadores para cada receptor, así como para los RNAs de referencia. Posteriormente se realizó PCR cuantitativo utilizando el sistema TaqMan[®] (Applied Biosystems) para α_{1a} -AR y α_{1b} -AR; la cuantificación del α_{1d} -AR se realizó utilizando el método de SYBR[®] Green. Como RNAs de referencia se utilizaron el ribosomal 18S y el transcrito de la enzima GAPDH, los cuales fueron cuantificados con SYBR[®] Green. Por último se comparó la proporción del mRNA de cada receptor para todas las edades de cada cepa. Los resultados obtenidos muestran que los transcritos de α_{1a} -AR y α_{1b} -AR, son mayores en la cepa hipertensa que en la normotensa, a la edad de 48 semanas. Mientras que para el transcrito del α_{1d} -AR en las ratas SHR existe un aumento desde las 5 semanas, el cual se mantiene en todo el rango de las edades utilizadas. Al correlacionar estos datos con otros trabajos, se propone que el α_{1d} -AR participa en el surgimiento y el mantenimiento de la hipertensión y la hiperreactividad vascular a agentes adrenérgicos. Los otros dos subtipos sólo se modifican en la senescencia pero su papel fisiológico no ha sido estudiado.

Palabras clave: hipertensión, adrenoreceptores, PCR semicuantitativo, PCR cuantitativo

Abstract

Arterial hypertension is mediated by diverse factors among them is the stimulation of adrenoceptors, these receptors take part in contraction of the toracic aorta. In previous studies, had been demonstrate that the α_{1D} -adrenoceptor (α_{1D} -AR) has a role in the genesis and the maintenance of hypertensive process age dependent. The present work focuses in comparing the relative abundance of mRNA of α_1 -ARs during development, to establish a relation with the contractility of aorta as described in literature, using the spontaneously hypertensive rats (SHR) and normotensive rats (WKY). We consider that the levels of expression of the α_1 -AR are related to age. Total RNA was extracted from toracic aorta, later on cDNA was synthesized with reverse transcriptase. Semiquantitative PCR was made, where it was necessary to design the primers for each receptor, as well as for the RNAs of reference. Then quantitative PCR was made using the TaqMan[®] system (Applied Biosystems) for α_{1a} -AR and α_{1b} -AR; the quantification of α_{1d} -AR was made using the method with SYBR[®] Green. As RNAs of reference the ribosomal 18S and the transcript of enzyme GAPDH were used, which were quantified with SYBR[®] Green. Finally the proportion of the mRNA of each receptor for all the ages of each rat strain was compared. The obtained results shows that transcripts of α_{1a} -AR and α_{1b} -AR, are greater in the SHR that in WKY at the age of 48 weeks. Whereas for the transcript of α_{1d} -AR in the SHR rats, exists an increase from the age of 5 weeks, which stays in all the range of the used ages. When correlating these data with other works, can be proposed that α_{1d} -AR participates in the sprouting and the maintenance of hypertension and the vascular hyperreactivity to adrenergic agents. The other two subtypes they just are modified in the senescence, but their physiological role have not been studied.

Introducción

Hipertensión

La hipertensión arterial es un padecimiento crónico, el cual consiste en presentar aumento sostenido de la presión arterial, ya sea sistólica, diastólica o en ambas; esto se asocia con cambios estructurales de las paredes de los vasos sanguíneos e hipersensibilidad a estímulos vasoconstrictores. (Guadalajara, 2006; García-Sáinz *et al.*, 1999). Es una enfermedad frecuente que por lo general no causa síntomas tempranos, pero implica un elevado riesgo, pues las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en México (IMSS, 2003).

En la Encuesta Nacional de Salud (ENSA) realizada en el 2006 en México, aplicada a 38 mil 377 personas, cuyas edades oscilaron de 20 a 69 años, los resultados concluyeron que 15.2 millones de mexicanos padecen hipertensión arterial sistémica (HTAS) y que 61 por ciento de ellos desconoce que tiene la enfermedad. Estas cifras significan que cinco de cada 10 mexicanos, mayores de 50 años sufre este padecimiento, por lo que se encuentran en riesgo de muerte anualmente por causas directamente relacionadas con la hipertensión (Plan Nacional de Salud 2001-2006), por lo cual es tan importante su estudio.

La elevación de la presión arterial afecta al funcionamiento y la estructura de los vasos sanguíneos, principalmente a las pequeñas arterias musculares, las arteriolas, al corazón y el encéfalo, además de incrementar la incidencia de insuficiencia renal, trastornos coronarios, insuficiencia cardíaca y apoplejía. Esta elevación suele provocarse por una combinación de varias anormalidades (multifactorial): factores hereditarios, estrés y factores ambientales así como alimenticios (aumento en el consumo de sal y disminución del potasio o calcio) que contribuyen al desarrollo de la hipertensión (Benowitz, 2001).

La presión arterial se encuentra regulada por varios sistemas interrelacionados. Los componentes del sistema pueden ser agrupados en tres categorías: la primera comprende *mecanismos de acción rápida*, los cuales tienen la capacidad de cambiar la presión arterial en segundos y actúan principalmente a través de componentes del sistema nervioso.

La segunda posee un curso de *acción intermedio* y requiere de minutos u horas para efectuar un cambio en la presión arterial. Dentro de este grupo se encuentran tres mecanismos: a) el sistema renina-angiotensina que actúa principalmente sobre el tono de los vasos arteriales de resistencia. b) El mecanismo de desplazamiento de líquido de los capilares, el cual consiste en absorber o perder líquido por ósmosis desde el tejido hacia la circulación para aumentar o reducir el volumen sanguíneo y la presión. c) El mecanismo de relajación de estrés; cuando la presión es elevada en los vasos sanguíneos, estos se distienden durante minutos y horas, como resultado la presión cae al nivel normal.

Por último se encuentra el grupo de *control de largo alcance*, cuyo efecto dura horas o días para desarrollarse por completo. Este mecanismo estabiliza la presión a largo plazo por el sistema renal y el de los líquidos corporales; tiene a su vez múltiples interacciones con el sistema nervioso y varios otros factores, como la aldosterona, los cuales confieren capacidades de control especiales para afinidades especiales (Guyton y Hall, 1998).

Regulación de la presión arterial

La magnitud de la presión arterial (PA) depende de dos variables hemodinámicas fundamentales: el gasto cardíaco y las resistencias periféricas totales (Figura 1). La presión arterial se mantiene mediante una regulación de estas dos variables ejercida en cuatro sitios anatómicos: arteriolas, vénulas poscapilares y corazón; el cuarto sitio del control anatómico son los riñones, los cuales contribuyen con el mantenimiento de esta presión al regular el volumen de líquido intravascular (Benowitz, 2001).

El gasto cardíaco es la cantidad de sangre que el corazón bombea por el aparato circulatorio durante un minuto y éste depende del volumen sanguíneo, que está muy supeditado al sodio corporal. Por eso, la homeostasis del sodio es esencial para la regulación de la tensión arterial (Schoen y Cotran, 2003). Las resistencias periféricas totales dependen principalmente de las arteriolas, estando determinadas por el tamaño de su luz que, a su vez, varía con el espesor de la pared arteriolar y con los estímulos nerviosos y hormonales capaces de contraer o dilatar estos vasos. El tono vascular normal depende de la competición establecida entre las influencias vasoconstrictoras (angiotensina II, catecolaminas, tromboxano, leucotrienos y endotelina) (Figura 1) y las influencias vasodilatadoras (prostaglandinas, cininas y óxido nítrico y). Algunos productos metabólicos (como el ácido láctico, H^+ y adenosina) y la hipoxia también pueden actuar como vasodilatadores locales. Los vasos de resistencia gozan asimismo de una función de autorregulación, un proceso merced al cual el aumento de la sangre que pasa por esos vasos provoca vasoconstricción, siendo un mecanismo de adaptación que protege contra el exceso de perfusión tisular (Schoen y Cotran, 2003).

Los riñones desempeñan un papel importante en la regulación de la presión arterial, como ya se mencionó. Existen pruebas de que la insuficiencia renal es

esencial para el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión. El riñón influye en las resistencias periféricas y en la homeostasis del sodio, y el sistema renina-angiotensina parece ser esencial en esas influencias. La renina elaborada por las células yuxtglomerulares renales transforma el angiotensinógeno del plasma en angiotensina I, y ésta se convierte en angiotensina II por acción de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA). La angiotensina II modifica la tensión arterial aumentando las resistencias periféricas y el volumen sanguíneo. Lo primero se consigue en gran parte por su capacidad para producir vasoconstricción al actuar directamente sobre la musculatura lisa de los vasos, y lo segundo se logra estimulando la secreción de aldosterona, que aumenta la reabsorción de sodio (Benowitz, 2001).



Fig. 1 Variables hemodinámicas fundamentales que regulan la magnitud de la presión arterial. El gasto cardíaco obedece al volumen de sangre el cual se encuentra sujeto al sodio, mineralocorticoides y atriopeptina. A su vez existen factores como la frecuencia cardíaca y la contractilidad, los cuales regulan el gasto cardíaco.

Por otro lado, las resistencias periféricas dependen de factores humorales como constrictores y dilatadores. Existe la autorregulación iónica la cual se encuentra dentro de los factores locales. Por último se encuentran los factores nerviosos, como los constrictores donde entran los receptores α₁-adrenérgicos y los dilatadores donde están los receptores β-adrenérgicos.

El riñón produce varias sustancias vasodilatadoras o antihipertensivas que, contrarrestan los efectos vasopresores de la angiotensina. Tales son las prostaglandinas, un sistema de calicreína-cinina urinario, el factor activador de las plaquetas (ERDF) y el óxido nítrico (NO) (Schoen y Cotran, 2003).

En el presente trabajo se estudió uno de los factores que intervienen en la regulación de la presión arterial: los receptores α_1 -adrenérgicos (α_1 -ARs) (Figura 1). Esto es porque el sistema cardiovascular dichos receptores regulan, por ejemplo, la contracción del ritmo y la fuerza cardíaca, la resistencia arterial periférica y varios aspectos de la función renal (Lefkowitz, 2003). También se ha descrito que las diferencias en la expresión de estos receptores y sus funciones regulatorias dependientes de la edad, pueden ser importantes para el mantenimiento de la presión arterial durante el desarrollo (Gurdal *et al.*, 1995). Por otro lado, se ha sugerido que los cambios estructurales de los vasos sanguíneos pueden ser un proceso adaptativo, en donde la pared vascular aumenta su grosor en respuesta a la presión arterial, fenómeno asociado con la estimulación α_1 -AR en células de músculo liso vascular (Xin *et al.*, 1997).

Catecolaminas

Las catecolaminas son moléculas que tienen en su estructura un grupo catecol y un grupo amino (NH_2) (Figura 2). Estos neurotransmisores juegan un importante papel en el sistema nervioso, en la presión arterial, el metabolismo y en particular integran las reacciones a diversos tipos de estrés o tensión. Son producidas principalmente por las glándulas suprarrenales y otros tejidos. Las más importantes en el sistema nervioso son la norepinefrina (noradrenalina), la epinefrina (adrenalina) y la dopamina (Hoffman, 2001).

Síntesis

Las catecolaminas son derivadas de la tirosina y se encuentran almacenadas en gránulos hasta que se produce la exocitosis bajo el control del sistema nervioso simpático. Se originan a partir de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina (Figura 2). La fenilalanina al ser oxidada se transforma en tirosina y una posterior oxidación origina dihidroxifenilalanina (DOPA) y a continuación se efectúa la descarboxilación de la DOPA con producción de la dopamina. Posteriormente, cerca del 50% de la dopamina formada en el citoplasma se transporta de manera activa hasta las vesículas de almacenamiento que contienen dopamina β -hidroxilasa (DBH), donde se convierte en norepinefrina (Hoffman y Taylor, 2001; Gómez-Jarabo, 1997).

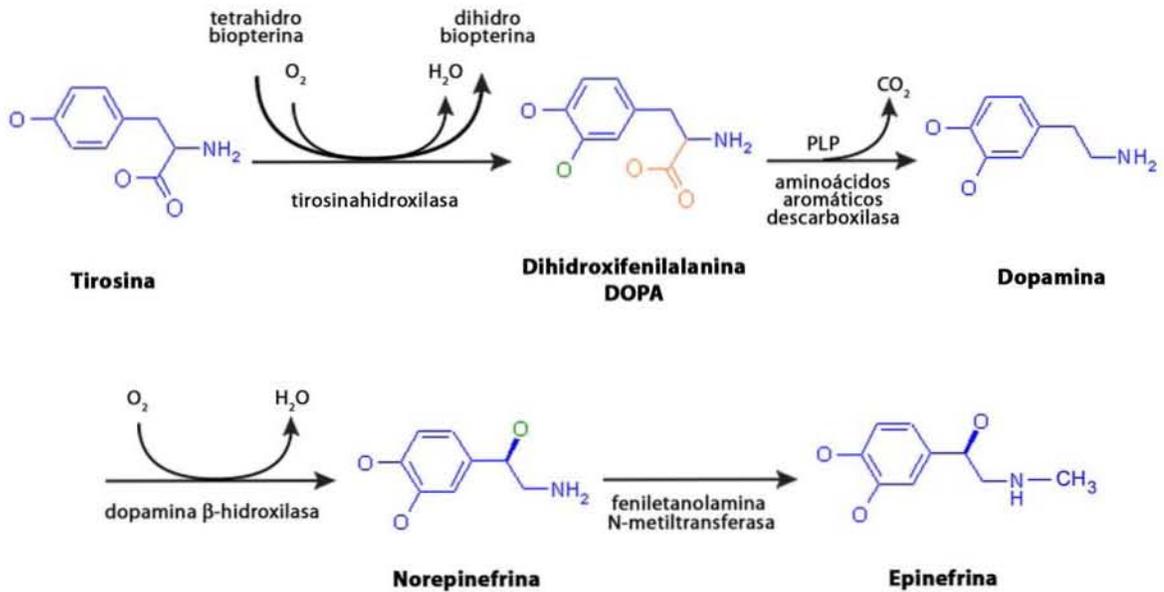


Fig. 2 Síntesis de dopamina, norepinefrina y epinefrina. La tirosina sufre una descarboxilación catalizada por la enzima tirosinohidroxilasa. Esta enzima utiliza O_2 y tetrahidrobiopterina, que da como resultado DOPA, H_2O y dihidrobiopterina. La DOPA al ser descaboxilada se convierte en dopamina con la presencia de la enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos. Posteriormente a la dopamina le ocurre una hidroxilación obteniéndose la norepinefrina y H_2O , esta reacción es catalizada por la dopamina β -hidroxilasa. Por último la enzima feniletanolamina N-metiltransferasa produce una metilación originando la epinefrina.

Efectos de las catecolaminas sobre el sistema cardiovascular

El efecto claro de un fármaco dado en el organismo intacto depende de su afinidad relativa por los receptores (α o β), su actividad intrínseca y los reflejos compensatorios provocados por su acción directa (Hoffman, 2001).

Las catecolaminas (norepinefrina y epinefrina) afectan rápidamente las funciones fisiológicas y el metabolismo de la mayoría de los órganos al estimular o inhibir la síntesis de AMP cíclico, así como activar el recambio de fosfoinosítidos- Ca^{2+} . Los efectos de estas dos catecolaminas son muy semejantes en algunos sitios, pero difieren en grado muy importante en otros, a continuación se describirán sus efectos en diferentes sistemas de órganos (Gómez-Jarabo, 1997; Ganong, 1990).

Vasos sanguíneos

Las catecolaminas son importantes para controlar la resistencia vascular periférica y la capacitancia venosa. Los receptores α aumentan la resistencia arterial, mientras que los receptores β_2 promueven la relajación del músculo liso. Los vasos de la piel tienen predominantemente receptores α y se contraen en presencia de epinefrina y norepinefrina, al igual que los vasos espláncnicos. Los vasos en el músculo esquelético pueden contraerse o dilatarse, dependiendo de que se activen los receptores α y β . Así, los efectos globales de un fármaco simpatomimético en los vasos sanguíneos dependen de las actividades relativas en los receptores α y β de los vasos afectados en sitios anatómicos (Hoffman, 2001).

Corazón

La estimulación fisiológica del corazón por catecolaminas incrementa el flujo sanguíneo. Por ejemplo la epinefrina provoca tres respuestas distintas en el corazón: la aceleración cardíaca a través del nodo sinoauricular (efecto cronotrópico); el aumento en la fuerza de contracción (efecto inotrópico) y las alteraciones en la función rítmica del ventrículo (extrasístoles ventriculares, taquicardia y fibrilación potencial),

estos efectos se determinan en gran parte por los receptores β_1 , aunque también participan los receptores β_2 y en menor grado los receptores α (Hoffman, 2001).

Presión arterial

El aumento de la presión arterial sistólica que se produce después de la liberación de epinefrina se debe a sus acciones inotrópicas y cronotrópicas positivas sobre el corazón. De este modo la epinefrina incrementa la frecuencia cardiaca, aumenta la presión sistólica y la presión media usualmente disminuye la presión diastólica. El gasto cardíaco aumenta y la resistencia periférica total disminuye. En contraste, con la norepinefrina las presiones sistólica, diastólica y media se elevan, aumenta la resistencia periférica y la frecuencia y el gasto cardiaco disminuyen. Esto se interpreta como que la norepinefrina es un vasoconstrictor más potente que la epinefrina (Hoffman, 2001).

Con estos datos se puede establecer que la norepinefrina y la epinefrina son mensajeros químicos esenciales, ya que regulan muchos procesos fisiológicos. Y conocer que se encuentran mediados por los receptores α y β adrenérgicos, es de gran importancia para entender sus mecanismos de acción y efectos sobre el organismo. Existen muchos más sistemas en los que producen efectos las catecolaminas como en los ojos y los aparatos respiratorio, digestivo, genitourinario, exócrino, etc. Pero en este trabajo sólo se mencionan los sistemas de interés (vasos sanguíneos, corazón y presión arterial).

Clasificación de los receptores adrenérgicos

Para comprender los mecanismos moleculares por los cuales actúan las catecolaminas es necesario conocer la clasificación y las propiedades de los diferentes tipos de receptores adrenérgicos; ya que éstas actúan mediante dos receptores principales, los α y β (Hoffman y Taylor, 2001).

Dentro de este grupo se encuentran tres grandes familias de receptores adrenérgicos: α_1 , α_2 , y β . Cada familia se subdivide en al menos tres subtipos distintos (Tabla 1); la diferencia entre ellos radica en las secuencias de aminoácidos, sus mecanismos de señalización y sus diferentes afinidades por agonistas y antagonistas (Bylund *et al.*, 1994; Cotecchia *et al.*, 1988; Lomasney *et al.*, 1991). En el presente estudio se hará referencia solamente a los receptores α_1 -adrenérgicos.

FAMILIA	α_1	α_2	β
SUBTIPOS	α_{1A}	α_{2A}	β_1
	α_{1B}	α_{2B}	β_2
	α_{1D}	α_{2C}	β_3

Tabla 1. Las tres familias de adrenoreceptores cada una con sus subtipos.

Receptores α_1 -adrenérgicos

Como todos los adrenoreceptores, éstos son proteínas de membrana que pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (por sus siglas en inglés, GPCR). Los GPCRs se forman por una sola cadena polipeptídica. El análisis del perfil de hidropatía de esta cadena ha revelado la presencia de siete regiones hidrofóbicas, que estructuralmente se han considerado dominios transmembranales. La estructura general incluye un dominio N-terminal localizado extracelularmente, que contiene sitios para N-glicosilación; un extremo C-terminal intracelular el cual contiene sitios para fosforilación por varias cinasas; tres asas intracelulares y tres asas extracelulares (Figura 3) (Hieble *et al.*, 1995).

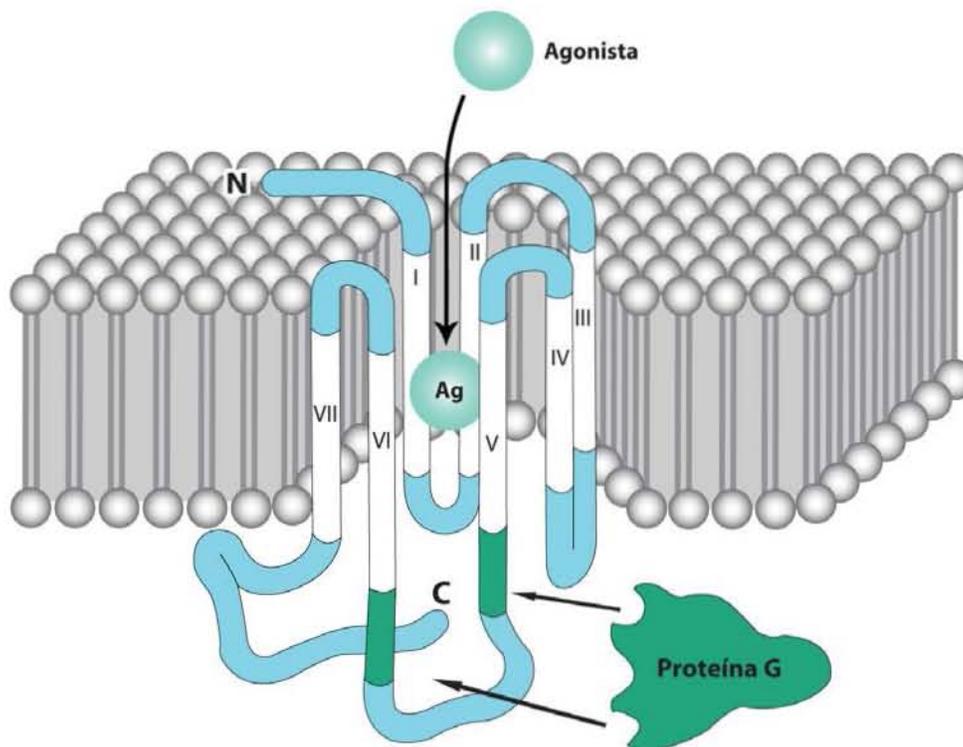


Fig. 3 Estructura transmembranal de los receptores α_1 -adrenérgicos. El extremo amino terminal (**N**) del receptor es extracelular y su extremo carboxilo (**C**) intracelular. Los extremos son conectados por una cadena polipeptídica que atraviesa el plano de la membrana siete veces. Los segmentos hidrofóbicos transmembranales se designan con números romanos (**I-VIII**). Las proteínas G (**G**) interactúan con las regiones citoplasmáticas del receptor, especialmente con las porciones de la tercera asa citoplasmática entre las regiones transmembranales **V** y **VI** (Tomado de Bourne y Zastrow, 2001).

Subtipos

El concepto de subtipos dentro del grupo α_1 surgió de experimentos farmacológicos que indicaban formas complejas de las curvas dosis-respuesta para

algunos agonistas en la contracción del músculo liso en algunos tejidos, así como diferencias de afinidades por antagonistas en ciertas respuestas contráctiles. Con base en estos datos farmacológicos se demostró la existencia de dos subtipos α_1 que se lograron diferenciar con múltiples ligandos. Mediante técnicas de clonación se identificó un tercer subtipo del receptor α_1 . La subdivisión de los α_1 -AR es la siguiente: α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} (Hoffman, 2001; Hieble *et al.*, 1995).

Vía de transducción

La ruta clásica por la que se transduce la señal de activación del receptor por ocupación de su ligando es a través de proteínas G heterotriméricas, las cuales regulan la actividad de diversos efectores y por ende la concentración de segundos mensajeros. Las proteínas G heterotriméricas constan de tres subunidades, con diferentes uniones y efectos característicos, la subunidad alfa (α) de 45-47 kD, la subunidad beta (β) de 35 kD y una subunidad gamma (γ) de 7-9 kD (Figura 4). En su forma inactiva las tres subunidades se encuentran unidas.

La subunidad α tiene unido GDP, cuando el receptor activa la proteína G, ésta cambia el GDP por el GTP y luego se separa de las subunidades $\beta\gamma$ (Hamm y Gilchrist, 1996). Existen varias isoformas de $G\alpha$, las $G\alpha_s$ estimulan a la enzima adenilato ciclasa y regulan la actividad de canales de calcio; por el contrario las $G\alpha_i$ inhiben a la adenilato ciclasa, regulan los canales de calcio y potasio y activan a la fosfodiesterasa de CMPC; la $G\alpha_q$ activa a la fosfolipasa C (Neer, 1995).

La vía de transducción de señales de los receptores α_1 -adrenérgicos consiste en la movilización del Ca^{2+} intracelular desde los sitios endoplásmicos de almacenamiento. Este incremento se considera resultado de la activación de isoformas de fosfolipasa $C\beta$ a través de la familia G_q de proteínas G. La hidrólisis de los polifosfoinosítidos fijos a la membrana, por la fosfolipasa C, da por resultado la generación de dos segundos mensajeros: diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trifosfato

(IP₃). El IP₃ estimula la liberación del Ca²⁺ desde las reservas intracelulares, por medio de un proceso específico mediado por receptores, en tanto el DAG es un activador potente de la proteína cinasa C (PKC) (Figura 4) (Hoffman y Taylor, 2001; Hieble *et al.*, 1995).

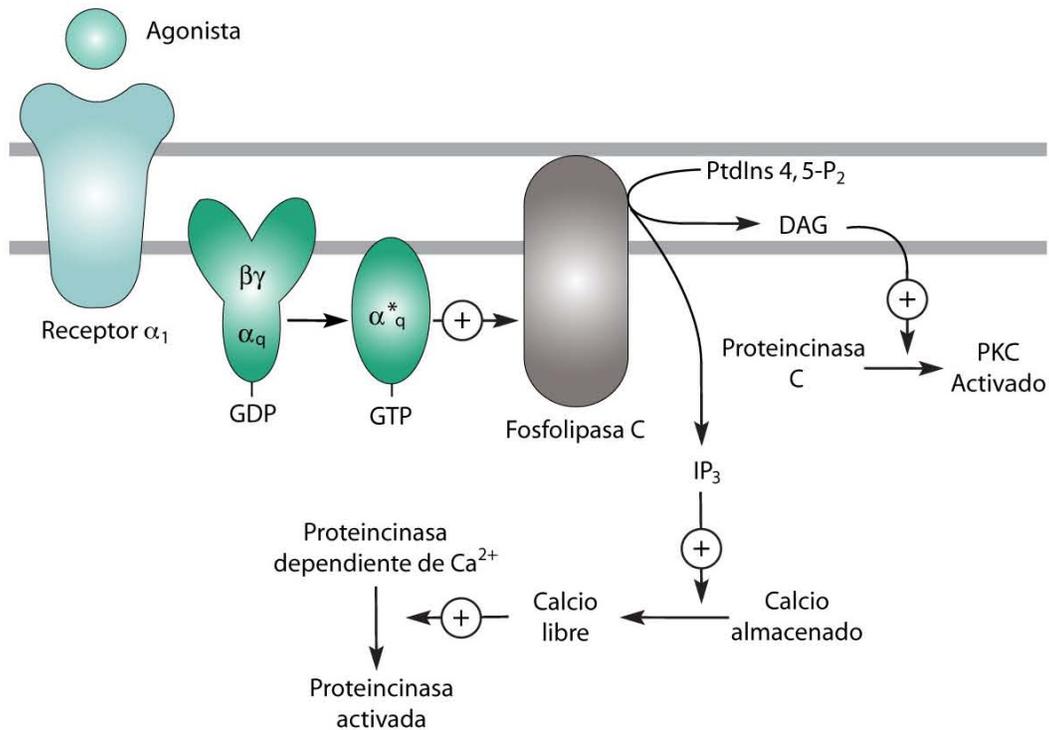


Fig. 4 Vía de transducción de señales α₁. La estimulación de los receptores α₁ por catecolaminas conduce a la activación de una proteína acopladora G_q. La subunidad α de esta proteína G activa el efector fosfolipasa C, que conduce la liberación del IP₃ (inositol-1, 4, 5-trifosfato) y DAG (diacilglicerol) a partir de 4, 5-difosfato de fosfatidilinositol (PtdIns 4, 5-P₂). El IP₃ estimula la liberación de las reservas secuestradas de calcio (Ca), almacenado en el retículo endoplásmico, conduciendo a un aumento en la concentración del Ca²⁺ citoplásmico. El Ca²⁺ puede entonces activar las proteincinasas dependientes de Ca²⁺, las cuales a su vez fosforilan sus sustratos. El DAG activa la proteína cinasa C (Tomado de Hoffman, 2001).

Papel Fisiológico

Los receptores α₁-AR se encuentran en casi todos los tejidos periféricos y en muchas poblaciones de neuronas en el sistema nervioso; juegan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis. Estos receptores participan en numerosas funciones fisiológicas como la neurotransmisión simpatomimética, el efecto inotrópico, miocárdico y cronotrópico, la modulación del metabolismo hepático, la contracción

uterina, la regulación del metabolismo de agua y electrolitos, la modulación del tono vascular y la contracción del músculo liso en el sistema genitourinario (García-Sáinz *et al.*, 1999). También participan en la contracción del músculo liso, crecimiento hipertrófico, median la vasoconstricción en la circulación de la sangre periférica y en la contracción cardíaca en el sistema cardiovascular (Martí *et al.* 2005; Piascik y Perez, 2001).

Se ha descrito que después de una continua exposición a agonistas α_1 -adrenérgicos, las células del miocardio muestran una respuesta hipertrófica incluyendo un incremento en el volumen y acumulación de proteínas (Simpson, 1983). Por otro lado, Milano (1994) demostró que la expresión en el miocardio del receptor α_{1B} -AR en ratones transgénicos induce hipertrofia cardíaca.

En estudios funcionales, utilizando los modelos de ratas normotensas (WKY) y espontáneamente hipertensas (SHR), se comprobó que los receptores adrenérgicos α_{1A} median la contracción de varios vasos sanguíneos aislados que incluyen arterias caudal, renal y mesentérica (Villalobos-Molina y Ibarra, 1996).

Los receptores α_1 -AR también se expresan en la glándula prostática y se ha discutido que algunos de los casos de retención de orina son causados por estos receptores, por lo que se utilizan antagonistas para atacar la hipertrofia prostática (Hieble y Ruffolo, 1996).

Importancia de los receptores α_1 -adrenérgicos en la regulación de la presión arterial

Como ya se ha mencionado, los receptores α_1 -adrenérgicos regulan varios procesos fisiológicos en mamíferos y conocer a detalle su participación en algún proceso tiene implicaciones terapéuticas (Lefkowitz, 2004; García-Sáinz *et al.*, 1999). Los receptores

α_1 -AR son de particular importancia por su significativo papel en el control de la presión sanguínea.

La hipersensibilidad del músculo liso vascular a la estimulación α_1 -AR ha sido sugerida como un elemento involucrado en el incremento y mantenimiento de la presión sanguínea en ratas SHR y en otros modelos de hipertensión (Ibarra *et al.*, 1998) En el modelo de rata desmedulada y descerebrada se observó la contribución de los diferentes subtipos α_1 -AR en la respuesta presora de la vasculatura, inducida por fenilefrina y se demostró que la respuesta contráctil vascular parece incrementar con la edad (Ibarra, *et al.*, 1997) . Estas diferencias en la respuesta vasoconstrictora mediada por α_1 -AR en vasos aisladas dependiente de la edad, puede resultar por cambios en la expresión de los subtipos de estos receptores (Gurdal *et al.*, 1995).

Está claro que los α_1 -ARs se localizan en numerosos tejidos vasculares realizando diferentes funciones, pero el tejido de interés en este trabajo es la aorta, ya que se considera un modelo funcional para caracterizar las propiedades farmacológicas y de transducción de señales de estos receptores (Goetz *et al.*, 1995). Las arterias de ratas expresan a los α_1 -ARs, sugiriendo que su papel predominante es la contracción vascular (Deng *et al.*, 1996; Piascik *et al.*, 1995). Sin embargo, es importante mencionar que la proporción de cada receptor en la aorta no es la misma, por ejemplo el análisis de la correlación entre los niveles de mRNA de los subtipos α_1 -adrenérgicos en otras arterias de rata, ha permitido establecer que los tres subtipos se expresan en los vasos pero con diferencias en el nivel de expresión. Así, el receptor α_{1d} -AR predomina en la aorta y en arteria mesentérica mientras que el α_{1a} -AR fue prominente en la arteria caudal y en pequeñas arterias mesentéricas (SMAs) y finalmente el α_{1b} -AR se presenta en minoría en todos los tejidos (Martí *et al.*, 2005). Por otro lado, Kenny y colaboradores caracterizaron farmacológicamente al receptor α_{1D} -AR como mediador de la respuesta contráctil a norepinefrina, en aorta de rata, mediada predominantemente por este receptor (Kenny *et al.*, 1995).

Planteamiento del problema

Tomando en cuenta estos antecedentes, el interés de este estudio es describir en un periodo amplio de la vida del animal los cambios en la abundancia de cada receptor α_1 -adrenérgico, con el fin de correlacionarlos con los datos funcionales ya existentes. Así mismo, será importante conocer cual de los tres subtipos es predominante en la arteria aorta, complementando datos funcionales, los cuales establecen que el receptor α_{1D} -adrenérgico se encuentra en mayor cantidad y regula la contracción de esta arteria.

Antecedentes

Se ha documentado que la aorta de rata expresa los tres subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos a nivel de RNA (Xu *et al.*, 1998; Piascik *et al.*, 1997; Xu y Han, 1996; Piascik *et al.*, 1995; Scofield *et al.*, 1995; Piascik *et al.*, 1994;), pero funcionalmente el receptor más importante en la aorta de ratas adultas es α_{1D} (Hieble *et al.*, 1995). Estudios de nuestro laboratorio en arterias aisladas sugieren que el receptor α_{1D} es el predominante en la contracción (Ibarra *et al.*, 1998; Villalobos-Molina y Ibarra, 1996).

Por otra parte, se ha descrito que la presión sanguínea aumenta con la edad del animal, este hecho ha sido explorado en nuestro laboratorio utilizando el modelo de la rata desmedulada y descerebrada en animales normotensos (WKY) e hipertensos (SHR) (Villalobos-Molina, *et al.*, 1999). Estos estudios revelaron que la administración intravenosa de fenilefrina evoca un incremento dosis-dependiente en la presión sanguínea diastólica, en todos los casos (Figura 5). La fenilefrina evoca un efecto presor máximo superior en ratas SHR jóvenes y adultas comparado con las WKY. Al bloquear selectivamente a los receptores α_{1D} con BMY 7378, puede observarse que la ED_{50} se desplaza significativamente a la derecha, lo cual sugiere que el receptor α_{1D} -AR regula la respuesta presora a la fenilefrina en ambas cepas de ratas. En contraste estos mismos tratamientos en ratas jóvenes, de 1 mes de edad, sólo afecta a la cepa hipertensa (SHR) y estos resultados sugieren que los α_{1D} -AR están regulando la contracción vascular de ratas jóvenes hipertensas, pero no lo hacen en las normotensas.

Estos resultados muestran la presencia del receptor α_{1D} -adrenérgico en la vasculatura de ratas jóvenes, prehipertensas SHR y su aparición relacionada con la edad en ratas adultas WKY. El efecto máximo presor de la fenilefrina fue más alto en ratas SHR que en las WKY, sugiriendo que el receptor α_{1D} -adrenérgico puede estar involucrado en la hiperreactividad vascular. Los datos anteriores sugirieron que el

receptor α_{1D} -adrenérgico tiene un papel en la patogénesis y/o el mantenimiento del proceso hipertensivo dependiente de la edad en ratas SHR (Villalobos-Molina, *et al.*, 1999).

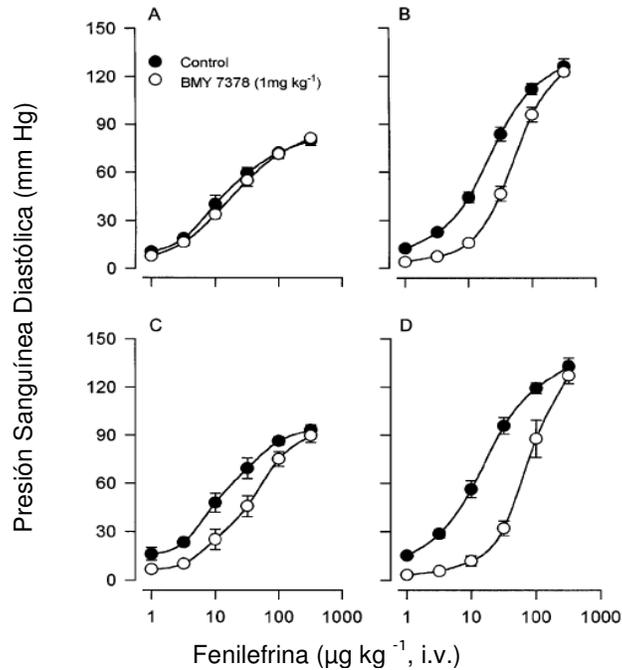


Fig. 5 Acción antagonista del BMY 7378 en respuesta presora a fenilefrina en ratas WKY y SHR de diferentes edades. En el modelo de ratas descerebradas y desmeduladas de 1 y 6 meses, fueron sometidas a un incremento en la dosis de fenilefrina. (A) WKY, 1 mes; (B) WKY, 6 meses; (C) SHR, 1 mes; (D) SHR, 6 meses (Tomado de Villalobos-Molina, *et al.* 1999)

Es importante destacar que en este modelo experimental se tiene un registro del efecto generalizado de las drogas utilizadas, es decir en el sistema vascular como un todo. Nuestro interés es analizar lo que sucede en la arteria aorta, aunque ya existen datos funcionales en animales adultos (Kenny *et al.*, 1995).

Hipótesis

Existen evidencias experimentales de que la respuesta presora mediada por agentes adrenérgicos en el sistema vascular completo de la rata varía en relación a la edad del animal, los datos farmacológicos sugieren una participación diferencial para cada subtipo de receptor α_1 -adrenérgico, siendo el α_{1D} el subtipo relacionado con la hiperreactividad presente en ratas hipertensas. Por tanto se propone que al analizar la abundancia de los transcritos de estos receptores en la arteria aorta, se evidenciará que existen cambios a lo largo de la vida del animal y se distinguirán diferencias entre las cepas WKY y SHR. Así mismo, se espera que el transcrito del receptor α_{1D} sea el más abundante de los tres estudiados.

Objetivo General

- Analizar los niveles de expresión de los transcritos de receptores α_1 -adrenérgicos, en un rango amplio de edad en la vida de la rata y establecer si existen diferencias entre animales normotensos y espontáneamente hipertensos.

Objetivos Particulares

- Comparar la abundancia relativa del mRNA de los receptores α_1 -AR entre SHR y WKY a diferentes edades.
- Comparar en cada edad y cepa la proporción de cada receptor α_1 -AR.
- Implementar PCR en tiempo real y semicuantitativo para el estudio de la abundancia de los transcritos de los receptores α_1 -AR.

Diseño experimental

Este trabajo se enfocó en el estudio de la abundancia relativa de los transcritos de los receptores α_1 -adrenérgicos en la arteria aorta durante el desarrollo en SHR. La comparación de estas abundancias con animales normotensos de la cepa Wistar Kyoto (WKY), nos permitirá proponer un papel para estos receptores en el desarrollo de la hipertensión. La estrategia fue la siguiente:

- Se usaron ratas WKY y SHR desde 5 a 64 semanas, para conocer los cambios a lo largo de la vida.

Cepas	Edades
	5 semanas
WKY	10 semanas
y	24 semanas
SHR	32 semanas
	48 semanas
	64 semanas

Tabla 2. Cepas y edades de ratas utilizadas

A continuación se muestra un diagrama de los pasos realizados en este trabajo para analizar la abundancia relativa de los transcritos de los receptores α_1 -adrenérgicos:

Se extrajeron las aortas de las ratas y se procesaron para obtener RNA total



Ya obtenido el RNA se sintetizó el cDNA



Se diseñaron los cebadores para amplificar el cDNA correspondiente de cada receptor usando la secuencia de *Rattus norvegicus*



Se realizaron reacciones de PCR semicuantitativo y cuantitativo con el cDNA que se sintetizó



Los resultados obtenidos se normalizaron contra el cDNA de GAPDH y rRNA 18S



Se compararon las abundancias del cDNA de los receptores por edad y por cepa

Materiales y Métodos

Animales

Se utilizaron trece ratas (*Rattus norvegicus*) SHR de diferentes edades y doce ratas como controles normotensos de la cepa parental Wistar Kyoto (Tabla 2).

Extracción de aorta torácica

Se extrajo la arteria aorta torácica, por medio de una disección. Se realizó un corte en la piel hasta la cavidad abdominal, el cual se prolongó hasta la cavidad torácica, se identificó la arteria aorta, se extrajo y se colocó posteriormente en cajas Petri con PBS (solución amortiguadora de fosfatos, pH 7.4), donde se les retiro la grasa y el tejido conectivo.

Purificación de RNA

El RNA total de las aortas se purificó por medio de una modificación del método de Chomczynski y Sacchi, 1987, utilizando el reactivo comercial Trizol™ (Invitrogen). 1) Las aortas se homogenizaron con un instrumento tipo Dounce, Homogenizador Pro 200 (Pro Scientific Inc.), en hielo a 4 °C. 2) Posteriormente, se indujo la formación de dos fases por emulsificación con cloroformo. 3) Se recuperó la fase acuosa y se obtuvo el RNA por precipitación con isopropanol en presencia de glicógeno como acarreador. 4) El RNA precipitado se resuspendió en agua Mili Pore, tratada con dietilpirocarbonato (ultra pura, libre de RNAsas). Las concentraciones del RNA se determinaron por espectrofotometría.

Análisis de la integridad del RNA por electroforesis en gel

Se realizó un análisis del RNA en geles de agarosa con formaldehído (agarosa 1.4%, MOPS 0.02 M, formaldehído 3.075 M).

Las muestras fueron tratadas previamente con buffer de muestra, (glycerol 50%, azul de bromofenol 0.25%, xilen cianol FF 0.25% en buffer TAE 1x) y SYBR® Green 0.05%. Posteriormente se calentaron a 65 °C por 5 min., al término se pasaron a hielo por 5 min. para después cargar el gel. Se utilizó buffer de corrida, MOPS (0.02 m MOPS [3-(n-morfolino)-ácido propanosulfónico], 8 Mm acetato de sodio, 1 mM EDTA). Las imágenes se obtuvieron en el analizador de imágenes (FLA-5000).

Transcripción reversa

La primera cadena del cDNA se sintetizó usando transcriptasa reversa (Invitrogen) a partir de 2µg de RNA, previamente tratado con 1.5 U de DNAsa I, para eliminar el DNA genómico contaminante. Como cebadores se utilizaron oligo (dt) 1µg y hexanucleótidos 1.5µg en un volumen total de 20µl. La reacción se llevó a cabo usando 2mM de dNTPs y transcriptasa reversa SuperScript™ II (Invitrogen). El cDNA sintetizado se utilizó como templado en reacciones de PCR.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) semicuantitativo

Diseño de los cebadores

Los cebadores utilizados para cada receptor fueron diseñados contra las secuencias del cDNA de cada uno de ellos (Invitrogen). Las secuencias se encuentran en la base de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

La información de los cebadores, el tamaño del amplicón y el número de acceso del cDNA completo en el NCBI se enlistan en la Tabla 3.

Cebador	Secuencia (5' → 3')	Posición	Tamaño del amplicón	Número de acceso
α_{1a} Sentido	CATGGTGCATATCCCCGGTGG	1155 a la 1174	146 pb	NM_017191
α_{1a} Antisentido	GGACCAATCTGCCTGTACCACA	1278 a la 1299		
α_{1b} Sentido	TCATGAGGACACCCTCAGCAGTAC	1171 a la 1193	129 pb	NM_016991
α_{1b} Antisentido	ACCTTGGGCATTGTAGTCGGAATGT	1273 a la 1297		
α_{1d} Sentido	TGTA CTGCCGCGTGTACGTGGTCCG	1279 a la 1303	117 pb	NM_024483
α_{1d} Antisentido	TGCGCCGCGACAGTGGATCC	1375 a la 1395		

Tabla 3. Secuencia de los cebadores para PCR, posición, tamaño del producto de PCR y número de acceso.

Para el análisis de la expresión génica a nivel de mRNA y análisis comparativos de niveles de expresión de genes de interés, se requiere normalizar los datos de PCR contra un control endógeno (gen constitutivo). Esta normalización es para corregir las variaciones entre las muestras durante la cuantificación de la expresión del RNA, porque este error puede ser introducido en diversos pasos a través del protocolo experimental (Dheda *et al.*, 2004).

Como control endógeno se utilizó el transcrito de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), el cual se amplificó con los siguientes cebadores: cebador sentido (5' TCCCTCAAGATTGTCAGCAA 3') y antisentido (5' AGATCCACAACGGATAC ATT 3') (Fort *et al.*, 1985) y el RNA ribosomal 18S (18S), cebador sentido (5' GGGAGCCTGAGA AACGGC 3') y el cebador antisentido (5' GGGTCGGGAGTGGGTAATTT 3').

Las abundancias se consideran relativas porque se expresan en función de una referencia interna o transcrito constitutivo. Los niveles de expresión de los genes de referencia muestran una alta uniformidad en los organismos vivos, entre las células de diferentes tejidos, durante varias fases del desarrollo y bajo diferentes condiciones ambientales y experimentales. Se eligió GAPDH que ha sido usado extensivamente,

ya que es una importante enzima de la ruta de la glicólisis y glucogénesis y 18S por ser constituyente de las subunidades 40S de los ribosomas eucariotas y se encuentra involucrado en la iniciación de la síntesis polipeptídica de eucariotas (Jain *et al.*, 2006; Kok *et al.*, 2005; Bas *et al.*, 2004).

PCR semicuantitativo

Ya diseñados los cebadores para cada receptor se realizaron las reacciones de PCR, en el termociclador Palm Cycler (Corbett Research) (Tabla 4). Cada muestra de ratas SHR y WKY se realizó por duplicado.

Receptor	Desnaturalización		Alineamiento		Extensión		Número de ciclos
	(°C)	(min)	(°C)	(min)	(°C)	(seg)	
α_{1a}	95	1	61	1	72	30	33
α_{1b}	95	1	60	1	72	30	31
α_{1d}	95	1	61	1	72	30	33
GAPDH	95	1	58	1	72	30	24
18S	95	1	62	1	72	30	14

Tabla 4. Condiciones de amplificación para reacciones de PCR semicuantitativo.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real es un método que permite monitorear el progreso de la reacción de PCR en cada ciclo de amplificación. El PCR en tiempo real determina el parámetro Ct (*threshold cycle*), definido como el número de ciclos en el cual la fluorescencia generada durante el proceso de amplificación sobrepasa un determinado nivel por encima de la línea base. Este parámetro es proporcional a la cantidad de copias iniciales de la secuencia en estudio, de tal forma que, a mayor cantidad de DNA o mRNA inicial, se detectará antes una señal de fluorescencia significativa, y por tanto, presentará un valor Ct mas pequeño. De esta forma, la cantidad exacta de un determinado DNA o mRNA en la muestra problema puede ser determinado interpolando el valor Ct en la curva patrón correspondiente. También se puede determinar el Ct comparativo entre el valor Ct de la muestra problema y una muestra control, ambos normalizados contra un control interno (Giulietti *et al.*, 2001).

Utilizar PCR en tiempo real tiene grandes ventajas comparado con el PCR semicuantitativo convencional. Primero el progreso de la reacción de PCR puede ser monitoreado después de cada ciclo, de ese modo provee una mejor cuantificación; segundo se necesita muy poco DNA; tercero es un ensayo no radioactivo y finalmente puede ser realizado en aproximadamente dos horas (Ponchel *et al.*, 2003). En este trabajo se utilizaron 2 métodos: 1) Las Sondas TaqMan® y 2) SYBR® Green, que serán descritos a continuación.

Sondas TaqMan®

La sonda TaqMan® consiste en un oligonucleótido específico localizado entre los dos cebadores utilizados en la reacción de PCR, a esta sonda se encuentran unidas dos

moléculas: uno en el extremo 5' reportero y otro al extremo 3' silenciador (*quencher*) (Figura 6.1). Cuando están unidos estos dos componentes el reportero no emite señal. A medida que la Taq polimerasa efectúa la extensión en dirección 5'-3' (Figura 6.2), la actividad 5' exonucleasa de la enzima, la AmpliTaq Gold DNA polimerasa (Applied Biosystems) libera el fluoróforo reportero permitiendo la emisión de una señal fluorescente (Figuras 6.3 y 6.4). Esta señal es directamente proporcional a la cantidad de producto de PCR sintetizado. Además, ya que la sonda TaqMan[®] es específica para cada producto de PCR, es posible la cuantificación de varios genes simultáneamente en el mismo tubo (*multiplex*) y por tanto, la coamplificación de controles internos, disminuyendo el costo por análisis y la variabilidad inter e intraensayo (Lovatt, 2002; Holland *et al.*, 1991).

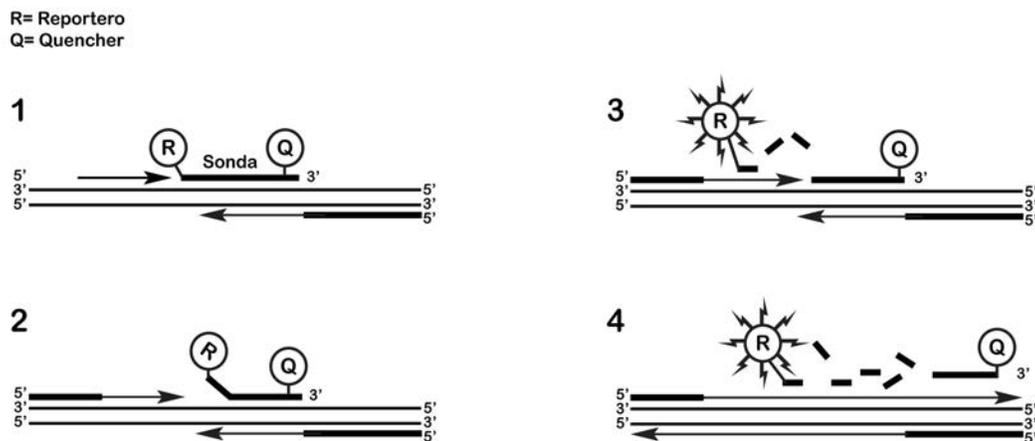


Fig. 6 Corte del fluoróforo en la prueba TaqMan[®], durante la amplificación. (1) Polimerización. Cebadores específicos, un oligonucleótido que sirve como sonda la cual se pega y se alinea específicamente al templado entre los cebadores, la sonda está marcada con un fluoróforo reportero (R) y un *quencher* (Q). Al estar unidos la emisión del reportero es silenciada por el *quencher*. (2) Extensión. La actividad 5' exonucleasa de la enzima realiza la extensión. (3) Separación. Al llegar a la sonda la enzima libera al reportero de la sonda. (4) Polimerización terminada. La enzima termina la extensión, ya liberado el reportero se incorpora una señal fluorescente al PCR.

Condiciones de amplificación

Cada una de las muestras y controles se amplificaron por triplicado. Todas las reacciones se realizaron en el Rotor-Gene 6 (Corbett Research) utilizando 1µl de cDNA. Los componentes de la reacción fueron 10µl del TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) (contiene Taq DNA polimerasa, buffer de reacción, MgCl₂, dNTP mix), 1µl de 20X *assays on demand mix* y agua tratada con dietilpirocarbonato para un volumen final de 20µl.

Los transcritos de α_{1a} y α_{1b} se cuantificaron usando el sistema TaqMan[®], los números de *assay on demand* son los siguientes: para el receptor α_{1a} es Rn00567876_m1 y para el receptor α_{1b} es Rn01471343_m1.

Todas las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron con un total de 40 ciclos. Las condiciones específicas de los ciclos para cada subtipo se resumen en la Tabla 5.

Receptor	Incubación 1 (°C) (min)		Incubación 2 (°C) (min)		Ciclo de PCR (°C) (seg)	
α_{1a}	50	2	95	10	95 60	15 60
α_{1b}	50	2	95	10	95 60	15 60

Tabla 5. Condiciones de amplificación para los subtipos α_{1a} -AR y α_{1b} -AR, de la reacción de PCR en tiempo real.

SYBR[®] Green

Este método consiste en detectar productos de PCR, a través de la unión de pequeñas moléculas fluorescentes al DNA de doble cadena, por lo tanto la fluorescencia observada es directamente proporcional a la cantidad de producto. Con este método

se cuantificó el subtipo α_{1d} -AR. Como genes de referencia se utilizaron el ribosomal 18S y el transcrito de la enzima GAPDH, los cuales también fueron cuantificados con el mismo método. Las secuencias de los cebadores utilizados se especificaron previamente en la página 28.

Condiciones de amplificación

Todas las reacciones de PCR se realizaron con un total de 40 ciclos, en el Rotor-Gene 6 (Corbett Research) utilizando 1 μ l de cDNA. Los componentes de la reacción para el receptor fueron 10 μ l del Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR Super Mix UDG (Invitrogen) (contiene Taq DNA polimerasa, buffer de reacción, MgCl₂, dNTP mix), 1 μ l de cebadores y agua tratada con dietilpircarbonato para un volumen final de 20 μ l.

Las condiciones específicas de los ciclos para cada subtipo y los genes de referencia se resumen en la Tabla 6.

Receptor	Incubación (°C) (min)		Incubación 2 (°C) (min)		Ciclo de PCR (°C) (seg)		Melt (°C)
α_{1d}	50	3	95	10	95 10 60 30 72 25	72-95	
GAPDH	50	3	95	10	95 30 58 30 72 30	72-95	
18S	50	3	95	10	94 20 60 25 72 20	72-95	

Tabla 6. Condiciones de amplificación para el receptor α_{1d} , GAPDH y 18S, para reacciones de PCR en tiempo real.

La diferencia más importante entre las sondas TaqMan[®] y el SYBR[®] Green es que el SYBR[®] Green detecta el DNA de doble cadena, incluyendo productos inespecíficos en

la reacción o dímeros que se producen por los cebadores. Por lo que es elemental que se efectúe una reacción optimizada para obtener resultados exactos.

Cada pieza de DNA de doble cadena tiene un punto de fusión (Melt, T_m) específico. La temperatura depende del tamaño del DNA, el orden de la secuencia y el contenido total de G-C. Por lo tanto cada producto de PCR puede ser distinguido por su curva de Melt, un sólo pico en las muestras sugiere un sólo tamaño de producto. La curva de Melt se obtiene al final del PCR, por medio de una corrida específica donde la temperatura se va incrementando gradualmente, al final de cada etapa se va monitoreando la fluorescencia del SYBR[®] Green que está unido a las cadenas dobles de DNA (Ponchel *et al.*, 2003; Ririe *et al.*, 1997).

Análisis de la abundancia de los receptores α_1 -AR con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$

La cuantificación de los cambios relativos en la expresión de un gen usando PCR en tiempo real requiere un método específico de análisis de datos. El método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ fue utilizado para calcular dichos cambios, utilizando el *software* del programa Rotor-Gene (Corbett Research). En este análisis se puede comparar de manera relativa la abundancia de un mensajero normalizado con un transcrito de referencia, en dos o más condiciones de estudio. Los datos graficados son la media \pm error estándar de la media. La diferencia entre grupos se analizó con la prueba *t* de *student* (Livak y Schmittgen, 2001).

Resultados

Animales

Se utilizaron ratas SHR y WKY, de un rango de edades de entre 5 a 64 semanas. Las muestras fueron ordenadas y etiquetadas de la siguiente manera:

Número	Edad (semanas)	Cepa
1	5	SHR
2	5	SHR
3	10	SHR
4	24	SHR
5	24	SHR
6	24	SHR
7	32	SHR
8	32	SHR
9	48	SHR
10	48	SHR
11	48	SHR
12	64	SHR
13	64	SHR
14	5	WKY
15	5	WKY
16	10	WKY
17	10	WKY
18	24	WKY
19	24	WKY
20	32	WKY
21	32	WKY
22	48	WKY
23	48	WKY
24	64	WKY
25	64	WKY

Tabla 7. Muestra el número de etiqueta, edad y cepa de las ratas utilizadas.

Análisis de la integridad del RNA por electroforesis en gel

Para realizar la síntesis de la primer cadena del cDNA y la determinación de la abundancia de los transcritos, fue necesario analizar la integridad del RNA total obtenido de las aortas en estudio. Para este fin los RNAs totales fueron analizados en geles de agarosa-formaldehído como se describe en métodos. Cuando el RNA se encuentra íntegro pueden observarse 3 bandas principales (Figura 7) el RNA ribosomal (rRNA) 28S, 18S y 5S. En esta figura representativa se destacan las bandas mencionadas, la totalidad de las muestras fueron analizadas por este método. Las muestras que no mostraron el patrón característico se descartaron.

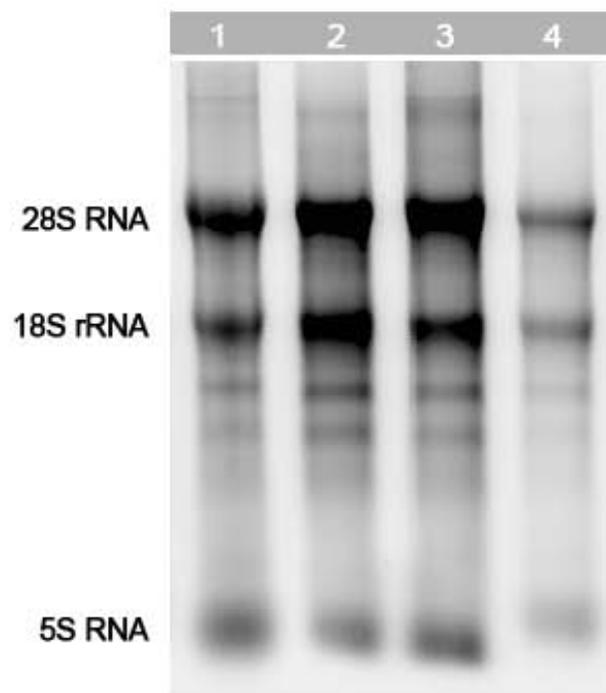


Fig. 7 Gel de agarosa con formaldehído, mostrando la calidad del RNA obtenido de tejido de aorta.

PCR semicuantitativo

El primer paso para la realización del PCR semicuantitativo consistió en estandarizar las condiciones de amplificación. Se normalizaron dos condiciones: 1) Optimización de la temperatura de *annealing* y 2) Ciclos necesarios para la cuantificación.

Estas pruebas se realizaron para cada juego de cebadores. Los cebadores para los receptores α_1 -adrenérgicos fueron diseñados específicamente para este trabajo. En el caso de los diseños que amplifican al transcrito constitutivo GAPDH y al RNA ribosomal 18S se confirmaron las condiciones descritas en la literatura (Fort *et al.*, 1985).

GAPDH

Para el transcrito de la enzima GAPDH, se realizó una curva de temperaturas desde 57.5 °C hasta 62.5 °C, utilizando cDNA de aorta. Con esta prueba se pudo establecer que la temperatura idónea para la amplificación es entre 57 y 58 °C, por lo que se decidió utilizar 58 grados centígrados.

En otra serie de reacciones se determinó que se usarían 24 ciclos de amplificación. En estas condiciones las reacciones pasan la etapa exponencial, pero no llegan a la saturación (datos no mostrados).

A continuación se realizó la determinación de las muestras experimentales. Para ello muy importante que las amplificaciones fueran limpias (sin bandas espurias) y sin ambigüedades (del tamaño esperado), pues el valor obtenido se utilizaría para normalizar la abundancia de los receptores en estudio. Como se observa en los geles representativos, los duplicados mostraron alta reproductibilidad y no se observaron productos inespecíficos como segundas bandas (Figura 8).

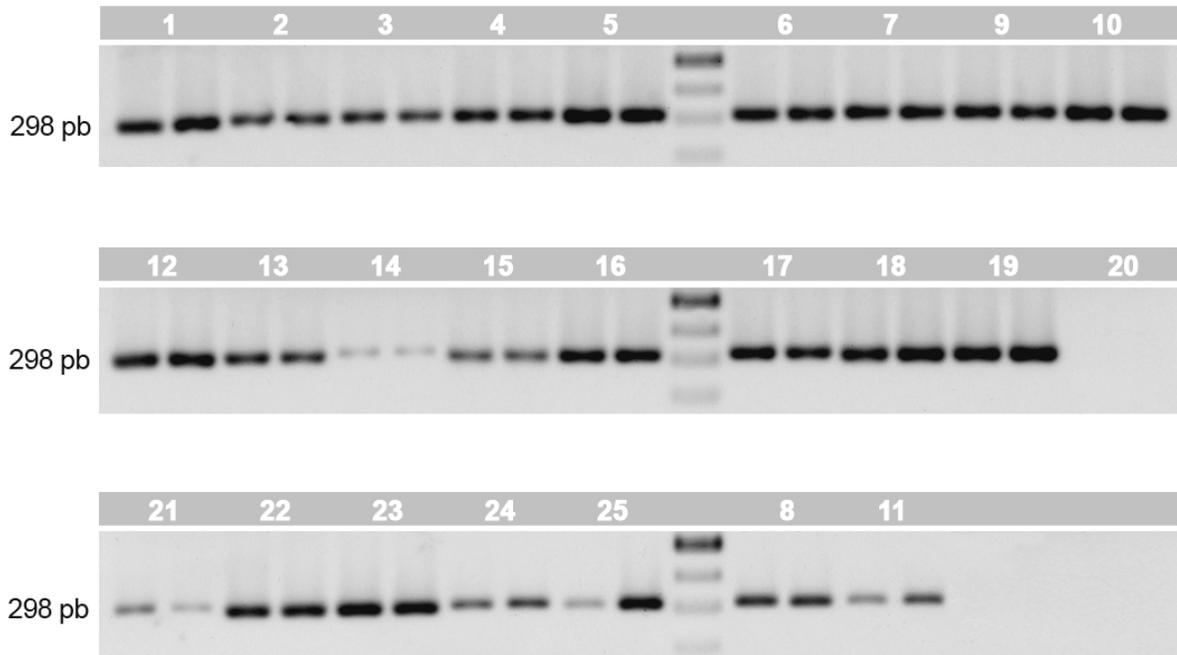


Fig. 8 Experimento representativo de la amplificación de GAPDH.

En esta figura se muestra la reacción representativa de amplificación para GAPDH, posteriormente se cuantificó por densitometría obteniendo unidades arbitrarias de densidad óptica (DO) con el *software* Multi-Gauge v 3.0 (Fujifilm), estos datos se utilizaron para normalizar los tres subtipos de α_1 -AR. Los números de la Figura corresponden a la cepa y edad de las muestras utilizadas (Tabla 7).

RNA Ribosomal 18s

Como segunda referencia se analizó el rRNA 18S. La importancia de tener un segundo control de normalización es que éste no se regula transcripcionalmente con la misma velocidad que la del mensajero de la GAPDH. Esta aseveración tiene su fundamento en que el rRNA 18S es un componente estructural del ribosoma, siendo constante el número de éstos en células del mismo tipo. El ensayo realizado para el ribosomal 18S fue una curva de temperatura donde estableció que la temperatura

adecuada es de 62 °C y que la reacción no ha llegado a saturación en 14 ciclos (datos no mostrados). A continuación se muestra un gel representativo, observándose su reproducibilidad y que hay un producto único (Figura 9). Al igual que para GAPDH, el 18S se cuantificó por densitometría obteniendo unidades arbitrarias de densidad óptica (DO), con estos datos se normalizaron los tres subtipos α_1 -AR.

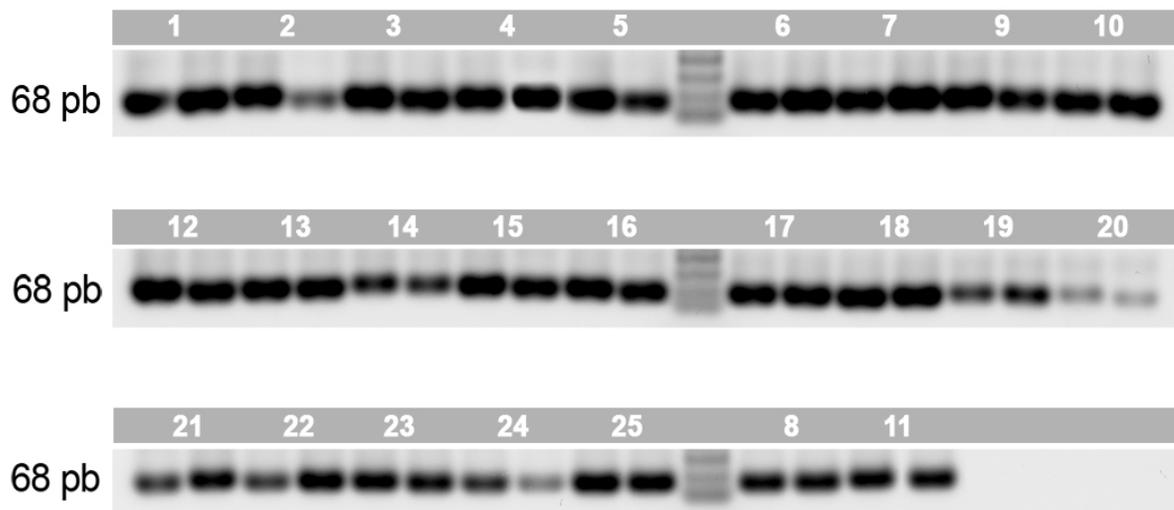


Fig. 9 Experimento representativo de la amplificación del 18S.

Receptor α_{1a} -AR

Al llevar a cabo las amplificaciones por PCR con los cebadores correspondientes se observó claramente un amplicón del tamaño esperado (146 pb) y no había presencia de productos inespecíficos. Para determinar la temperatura óptima de amplificación se realizó un PCR con gradiente para la temperatura de *annealing* de 59° C, 60° C y 61° C. La temperatura apropiada de amplificación fue 61° C (Figura 10), posteriormente se efectuó la reacción utilizando las muestras problema (Figura 11). Las bandas se

cuantificaron por densitometría y las abundancias se normalizaron contra GAPDH y rRNA 18S.

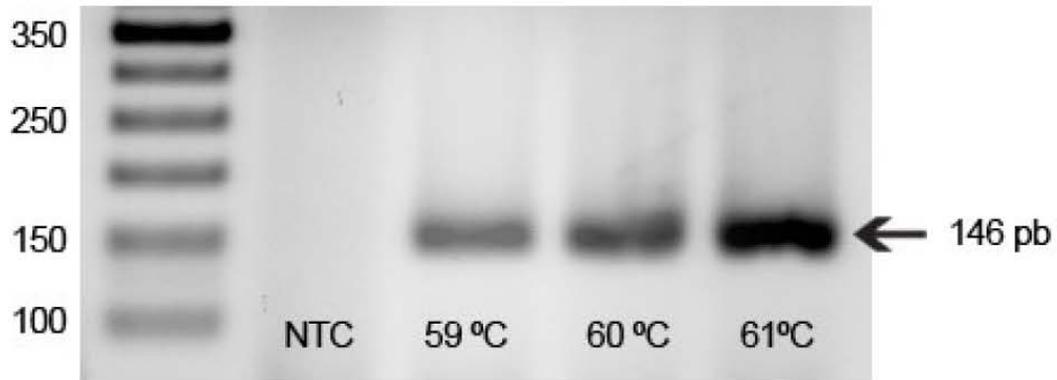


Fig. 10 Gradiente de temperatura para la amplificación del receptor α_{1a} . El primer carril corresponde a la escalera de 100 pares de bases (Invitrogen), el segundo es el control, *not template control* (NTC) y los siguientes tres carriles son las muestras a diferentes temperaturas.

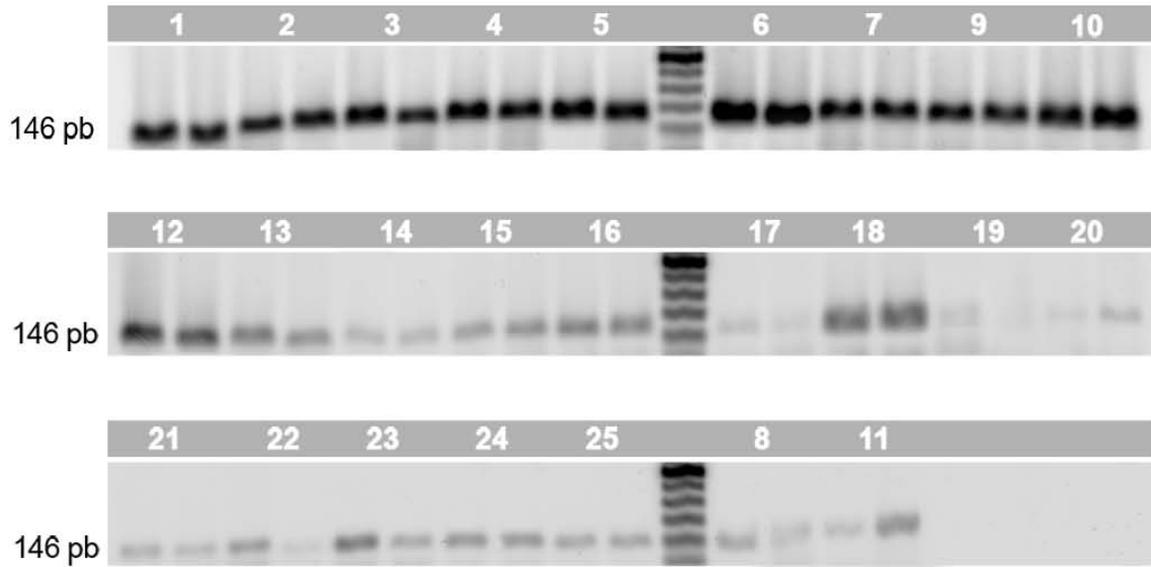


Fig. 11 Experimento representativo de la amplificación del α_{1a} -AR. Donde los números del 1 al 25, son las muestras utilizadas (Tabla 7).

Receptor α_{1b} -AR

Utilizando los cebadores diseñados para amplificar este transcrito, se observó una banda única del tamaño esperado (129 pb), ninguna banda inespecífica y la temperatura óptima de amplificación fue de 61 °C.

Asimismo se realizó una curva de ciclos (Figura 12). El número adecuado de ciclos para que amplificara fue 31. Estas condiciones se utilizaron para el experimento con todas las muestras problema (Figura 13).

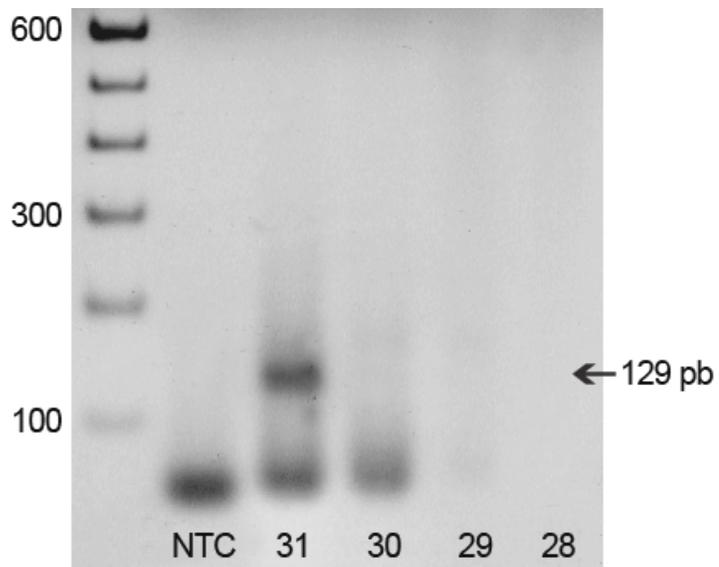


Fig. 12 Curva de ciclos para el receptor α_{1b} -AR.

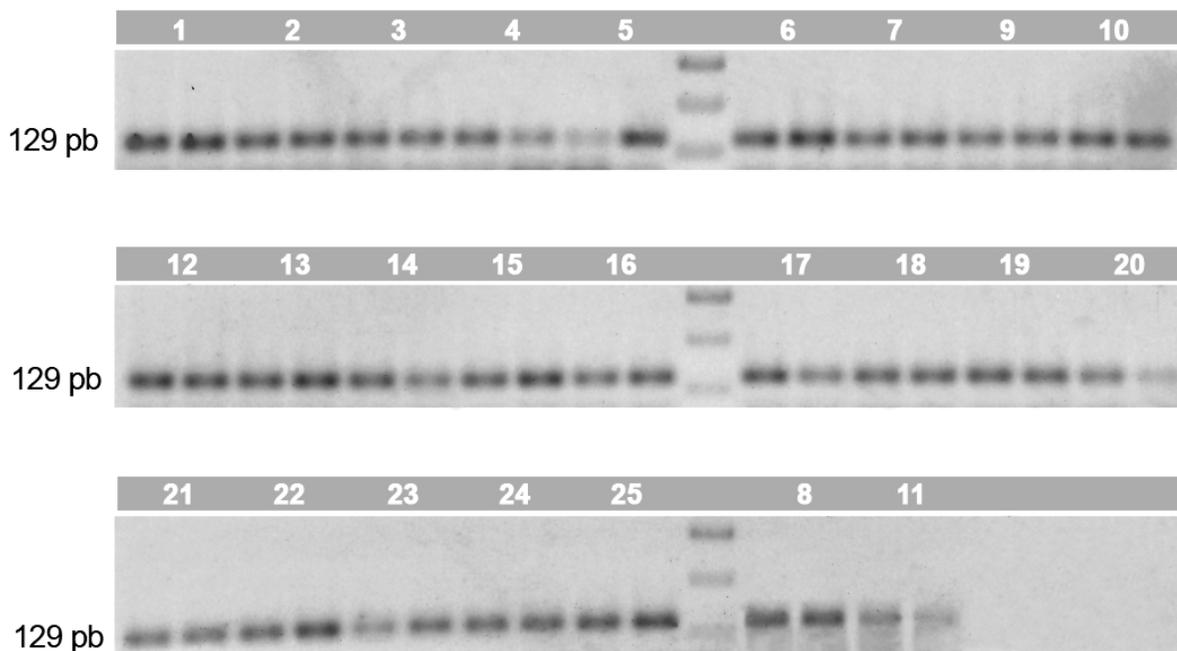


Fig. 13 Experimento representativo de la amplificación del α_{1b} -AR. Donde los números del 1 al 25, son las muestras utilizadas (Tabla 7).

Receptor α_{1d} -AR

En las reacciones de amplificación del transcrito del α_{1d} -AR se observó un producto del tamaño esperado (146 pb) (Figura 14), además en la parte baja se observa una mancha que, de acuerdo a su tamaño (50 pb) puede corresponder a un agregado de cebadores, pues es claramente visible en la muestra donde en lugar de templado se utilizó agua (NTC) (Figura 14), además este agregado disminuye su intensidad de manera inversamente proporcional a la banda de 146 pb.

De este modo se consideró que no influye en la determinación en muestras problema. Así mismo se estableció que la temperatura de alineamiento es de 61 °C (Figura 14).

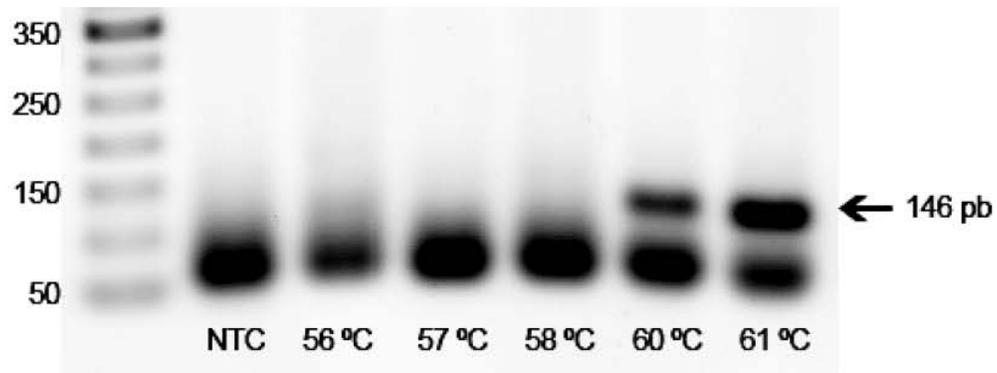


Fig. 14 Gradiente de temperatura para el receptor α_{1d} -AR.

Posteriormente se realizó la reacción utilizando todas las muestras de las cepas SHR y WKY de diferentes edades como se hizo para los otros receptores (Figura 15).

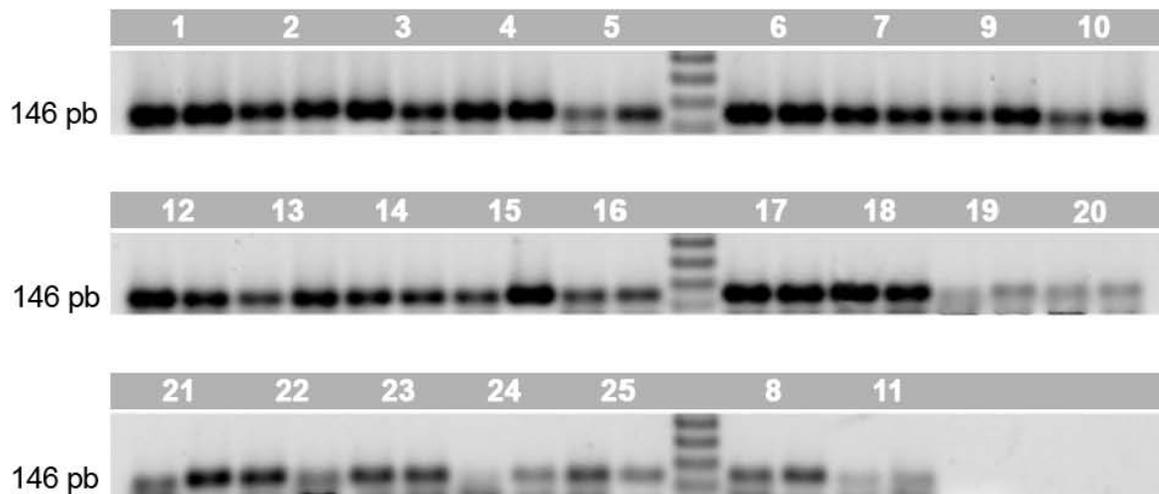


Fig. 15 Experimento representativo de la amplificación del α_{1d} -AR. Donde los números del 1 al 25, son las muestras utilizadas (Tabla 7).

Expresión relativa de los receptores α_1 -AR normalizadas contra GAPDH y 18S

Como ya se ha indicado la abundancia de los transcritos de los receptores se normalizó contra los RNAs de referencia. Se obtuvieron las unidades arbitrarias de densidad óptica para GAPDH y 18S así como para los tres subtipos de receptores. Con los datos, se obtuvo el cociente del valor del receptor entre el valor del gen constitutivo, para después graficar los datos obtenidos. Como referencia se tomó la edad más pequeña (5 semanas), para establecer la diferencia proporcional entre cada edad. A continuación se muestran las gráficas obtenidas.

Receptor α_1 -AR

Los valores para la cepa WKY no muestran cambio significativo en el rango de edades analizado, al normalizar los datos contra cualquiera de los constitutivos. Para la cepa SHR hay una mayor abundancia a los 24 semanas, que es estadísticamente significativa si se le compara con 32 y 48 semanas, y normalizado, con GAPDH. Mientras que en el normalizado contra 18S existe diferencia significativa a las 24 semanas si se compara con 32, 48 y 64 semanas. En contraste, para la cepa SHR los niveles de expresión son mucho mayores que la cepa WKY.

La diferencia más importante y clara es la que se da entre cepas, pues este receptor es más abundante en ratas SHR a las 5, 10, 24 y 48 semanas, dicha diferencia puede tener relevancia fisiológica y requiere caracterizarse a detalle.

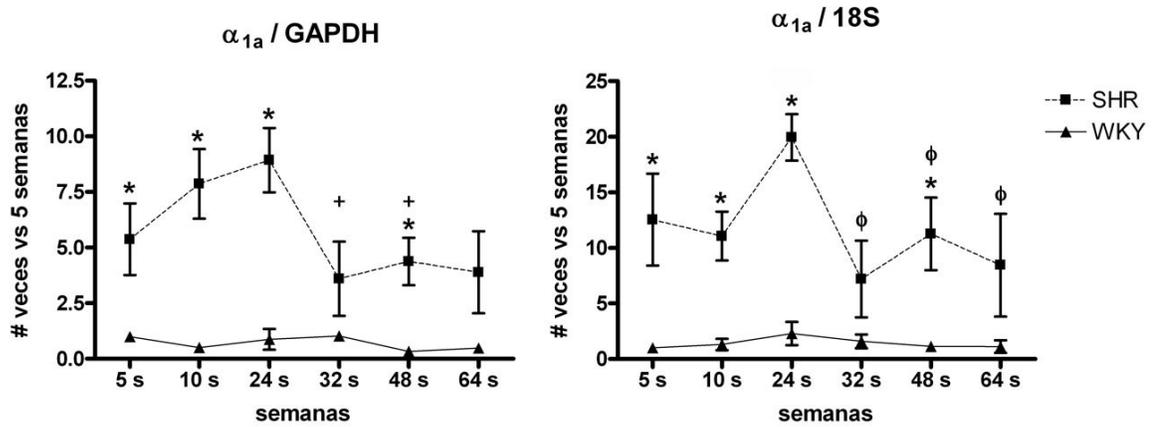


Fig. 16 Abundancia del receptor α_{1a} -AR normalizadas contra GAPDH y RNA 18S. * $p < 0.05\%$ vs. WKY.

+ $p < 0.05\%$ vs. 24 semanas de la cepa SHR. $\phi p < 0.05\%$ vs. 24 semanas de la cepa SHR.

Receptor α_{1b} -AR

En el caso del receptor α_{1b} , no se observaron cambios significativos entre las cepas ni a lo largo del rango de edad analizado (Figura17), sin embargo en la cepa WKY hay un cambio súbito a las 32 semanas. No se pudo determinar si se trató de un cambio real, pero en lo general no hubo variaciones entre cepas o edades examinadas.

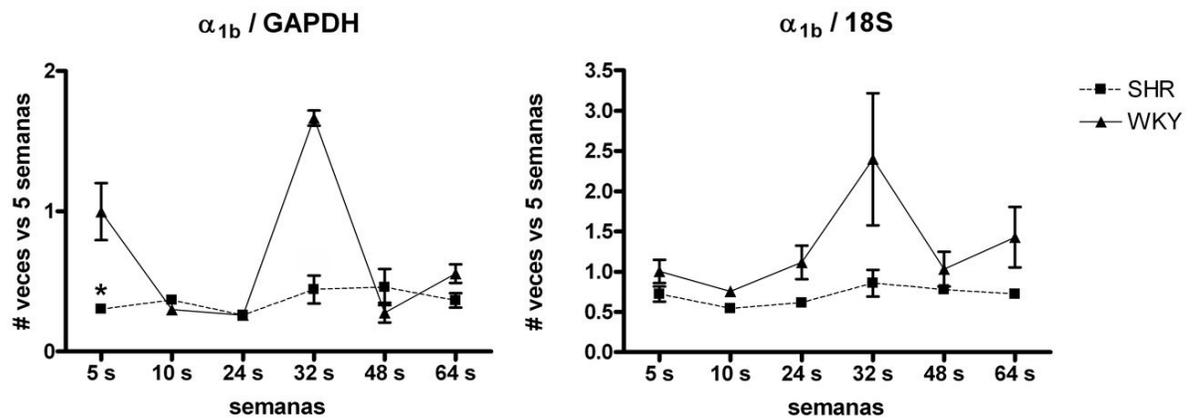


Fig. 17 Abundancias del receptor α_{1b} -AR normalizadas contra GAPDH y RNA 18S.

Receptor α_{1d} -AR

Se muestra la gráfica de la expresión relativa de este receptor normalizada contra GAPDH y RNA 18S (Figura 18). La cepa WKY muestra mayor abundancia a las 5 semanas al compararla con 24,48 y 64 semanas, por su parte la cepa SHR muestra una diferencia entre la edad de 10 semanas contra la de 48 s.

Al comparar entre cepas se observó que a las 64 semanas la cepa hipertensa muestra una mayor cantidad de transcrito.

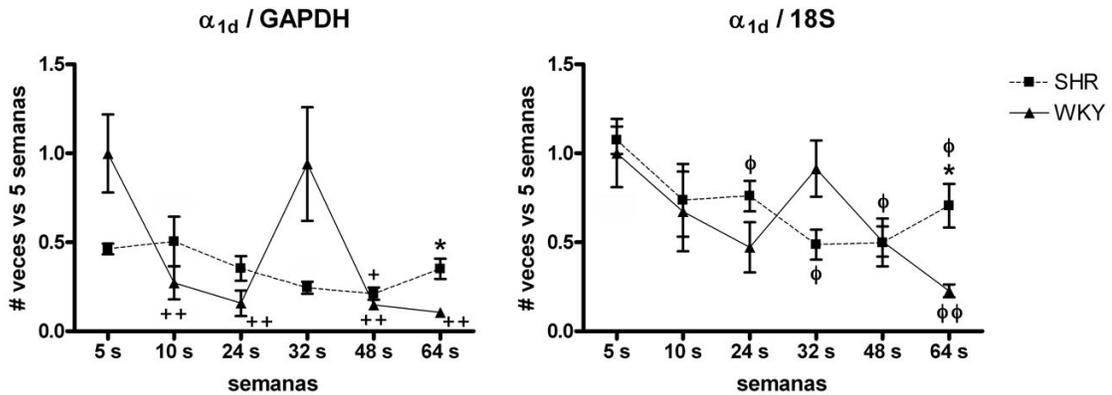


Fig. 18 Abundancias del receptor α_{1d} -AR normalizadas contra GAPDH y RNA 18S. *p < 0.05% vs. WKY.

+p < 0.05% vs. 10 semanas de la cepa SHR. ++p < 0.05% vs. 5 semanas de la cepa WKY. ϕ p < 0.05% vs. 5 semanas de la cepa SHR. $\phi\phi$ p < 0.05% vs. 5 y 32 semanas de la cepa WKY.

PCR en tiempo real

Para el PCR en tiempo real el rango de edades utilizadas fueron de 5 a 48 semanas a diferencia del PCR semicuantitativo que se utilizaron de 5 a 64 semanas, esto porque el material biológico no era suficiente para realizar todas las pruebas con este método.

Se realizaron pruebas para estandarizar las reacciones de PCR en tiempo real, utilizando como templado cDNA de cerebro, por ser un tejido con alto contenido de estos mensajeros, cDNA de aorta, que es el tejido problema y agua que se utilizó como control sin templado (NTC). Ya estandarizadas las condiciones se prosiguió con las reacciones en todas las muestras. En primer término se muestran las reacciones que se realizaron con la técnica de SYBR[®] Green.

Determinaciones realizadas con la técnica de SYBR[®] Green

GAPDH

Las amplificaciones representativas utilizando el cDNA de cerebro y de aorta, pueden observarse en la figura 19 A, y se logra distinguir que el control sin templado no amplifica. En la determinación realizada con las muestras problema (Figura 19 B), se observan todas las muestras amplificadas y el control (NTC) no, ya que este no contenía templado.

Al término de la reacción de PCR en tiempo real, utilizando el método de SYBR[®] Green, se realizó el análisis de Melt (Figura 19 C), la temperatura fue de 92.5 °C. En este análisis se determina aquella temperatura en la cual se forma la mayor cantidad de DNA de cadena doble, dado que este parámetro depende de manera específica de la secuencia de bases de un fragmento de DNA, permite establecer que hay un sólo producto de PCR. También puede observarse que el nivel de fluorescencia basal es constante y no presentó picos que produjeran ambigüedades en el análisis. Por otra parte, los testigos sin templado (NTC) no presentan

amplificación lo que permite sugerir que no hay resultados artefactuales en nuestras mezclas de reacción.

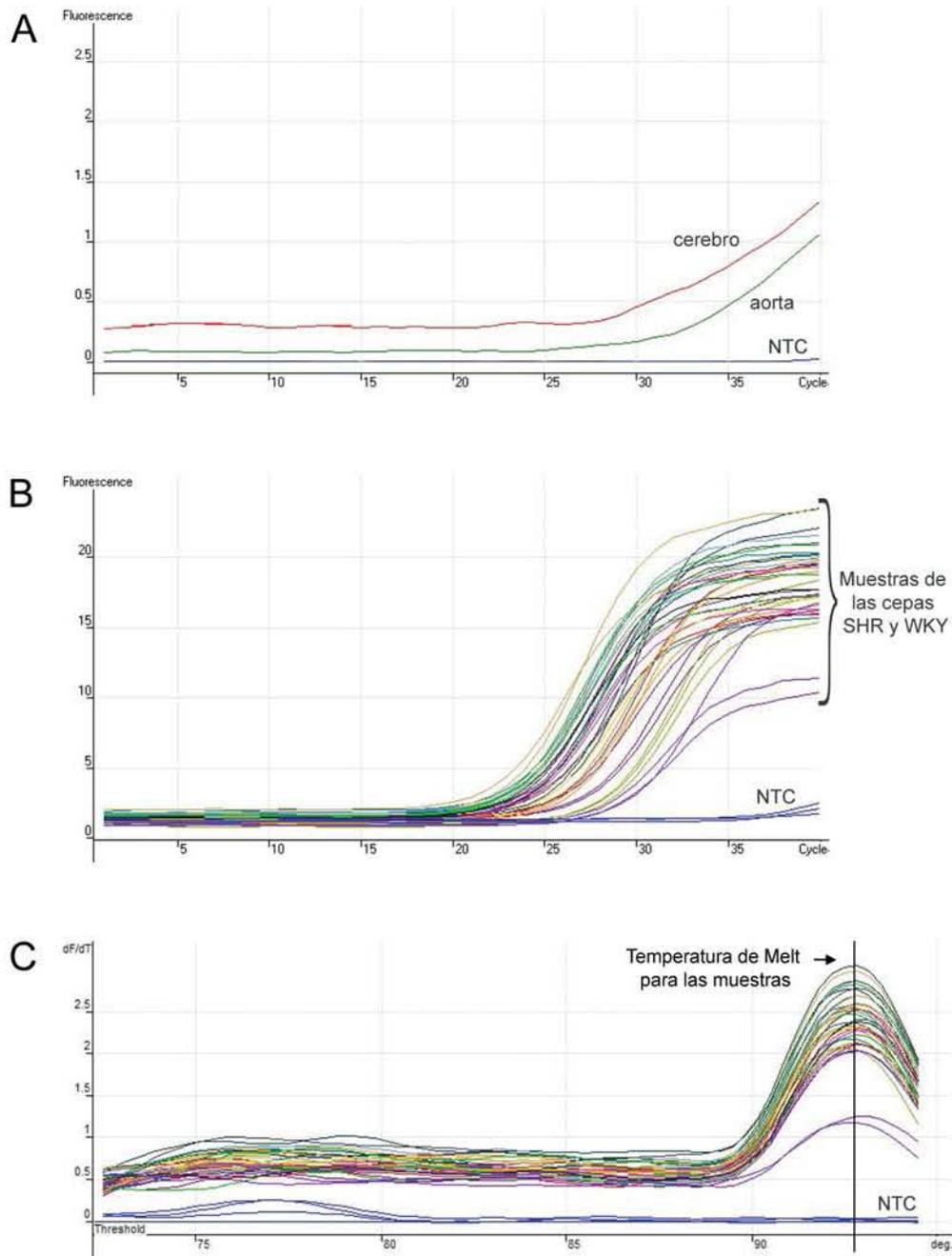


Fig. 19 **(A)** Amplificación de un fragmento de la GAPDH utilizando templados de cerebro, aorta y agua (NTC). **(B)** Reacción representativa de GAPDH utilizando las muestras problema. **(C)** Análisis de Melt para el amplicón de la enzima GAPDH. Fluorescencia expresada en unidades arbitrarias. dF/dT : la diferencial de la fluorescencia en función del tiempo.

Ribosomal 18S

Para el rRNA 18S y el adrenoreceptor α_{1d} se realizaron procedimientos análogos. En el caso del rRNA18S (Figura 20) se observa la amplificación y el análisis de Melt (Figura 20 A y 20 B, respectivamente) en este caso se determinó que este amplicón tiene una temperatura de Melt de 87.5 °C y hay sólo un producto en la reacción. En la determinación todas las muestras problema amplifican y el control sin templado no lo hace (Fig 20 C).

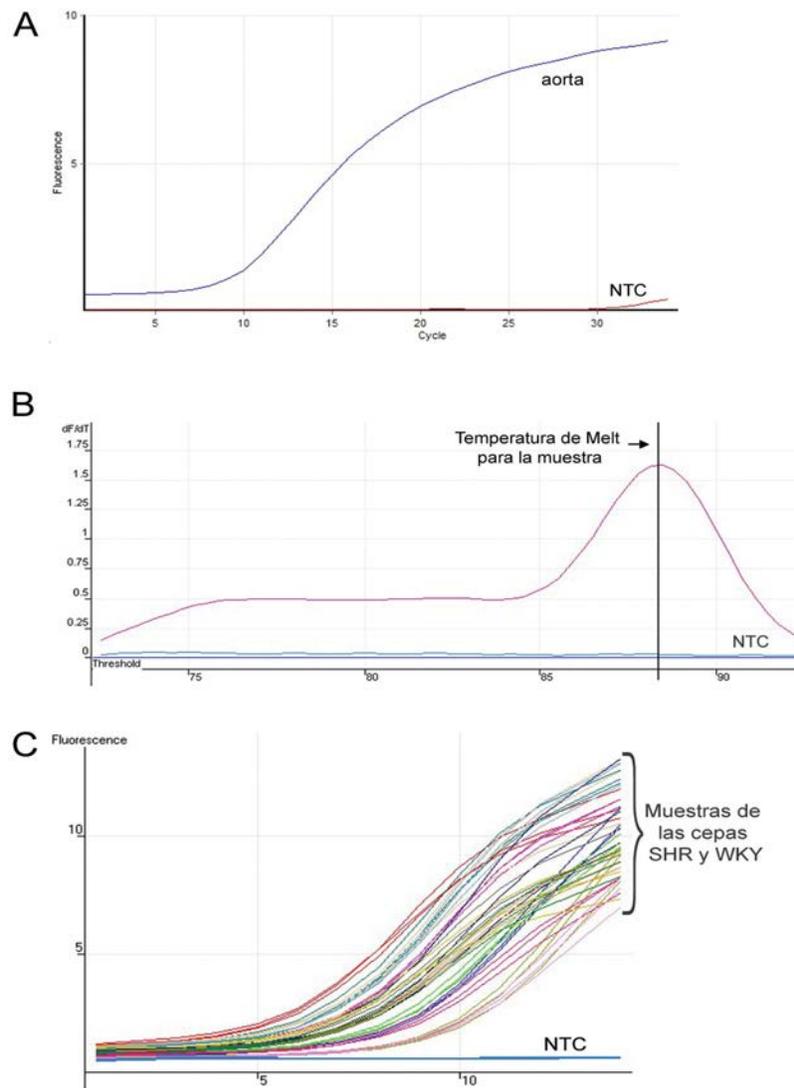


Fig. 20 (A) Prueba utilizando templado de aorta y como control agua (NTC). (B) Análisis de Melt para el rRNA 18S. (C) Amplificación del rRNA 18S utilizando las muestras problema.

Receptor α_{1d}

Al analizar el producto de reacción por electroforesis, para el receptor α_{1d} -adrenérgico mostraba una banda inespecífica de 50 pb que presumiblemente se formaba por dimerización de los cebadores, para superar esta imprecisión se estandarizó la concentración óptima de los cebadores desde 500 nM hasta 25 nM. Se eligió la concentración más adecuada que fue de 50nM (Figura 21 A); la concentración elegida es la concentración mínima con la cual la amplificación se lleva a cabo de manera óptima, ya que utilizando concentraciones bajas de cebadores se disminuyen sus interacciones.

En el análisis de Melt se observó que las muestras tienen una Tm de 83 °C (Figura 21 B) y no hay productos inespecíficos. Con estas condiciones se llevó a cabo el análisis de las muestras problema (Figura 21 C).

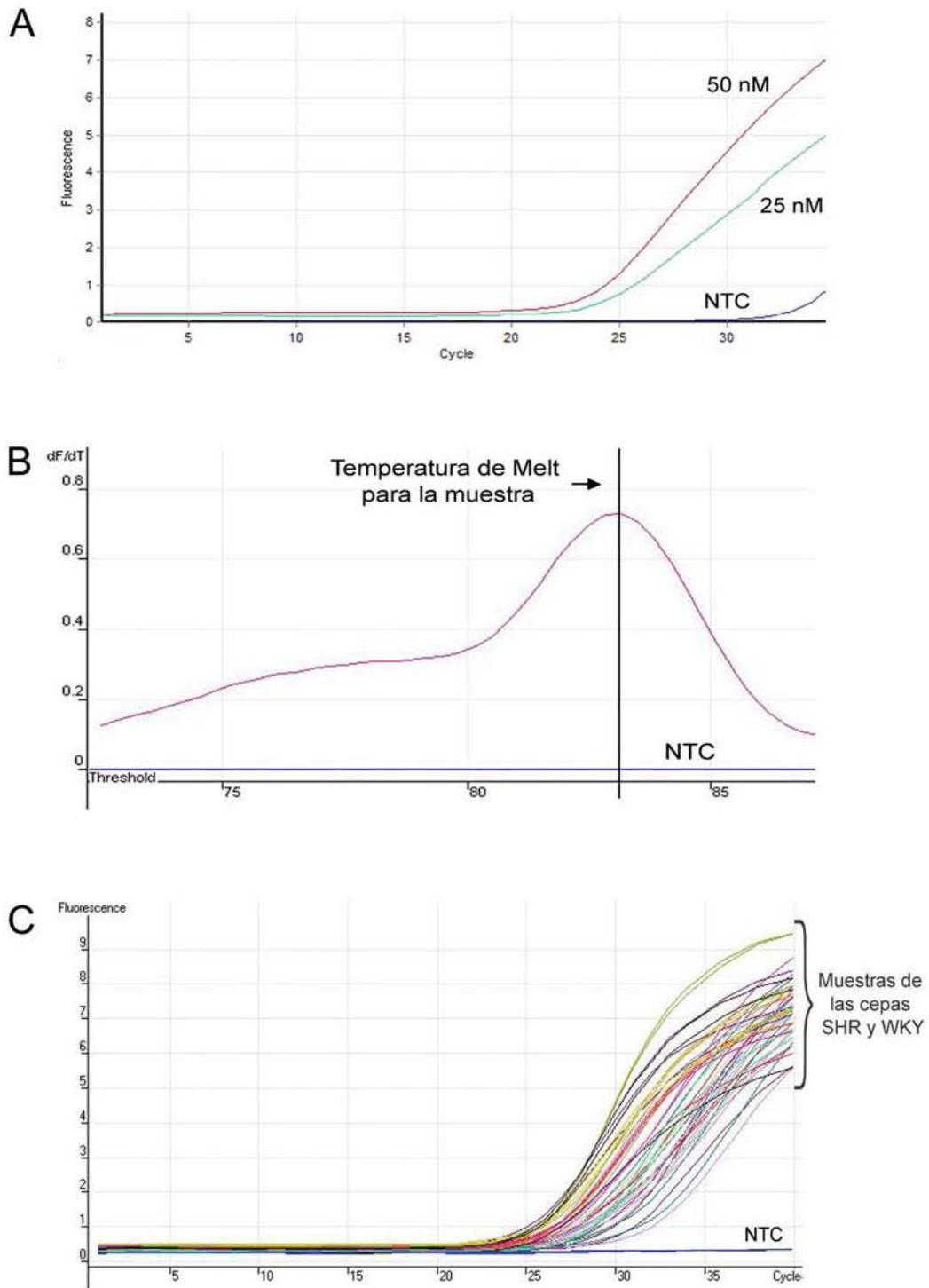


Fig. 21 **(A)** Estandarización de la concentración de los cebadores. **(B)** Análisis de Melt para el receptor α_{1d} -AR. **(C)** Reacción representativa del receptor α_{1d} -AR.

Determinaciones realizadas con sondas TaqMan®

Las sondas TaqMan® (Applied Biosystems) son un método que ya ha sido probado por el fabricante. Entre sus características se sabe que los oligonucleótidos o la sonda no complementan significativamente alguna región inespecífica del genoma del organismo, además han sido diseñadas para amplificar sobre dos exones, de manera que no es posible amplificar con DNA cromosómico como templado (www.appliedbiosystems.com). Asimismo, debido al principio de la técnica que ha sido detallado en la sección de materiales y métodos, no se realiza el análisis de Melt, pues la especificidad de los oligonucleótidos y de la sonda garantiza la especificidad de la amplificación. Además, en cada experimento se corroboró la presencia de un solo producto de PCR por electroforesis.

Receptores α_{1a} -AR y α_{1b} -AR

En la figura 22 A se muestra la reacción representativa del receptor α_{1a} -AR. En la amplificación con las muestras problema (Figura 22 B), puede observarse que el control NTC no amplifica. Del mismo modo se procedió para el receptor α_{1b} -AR (Figura 22 C y D).

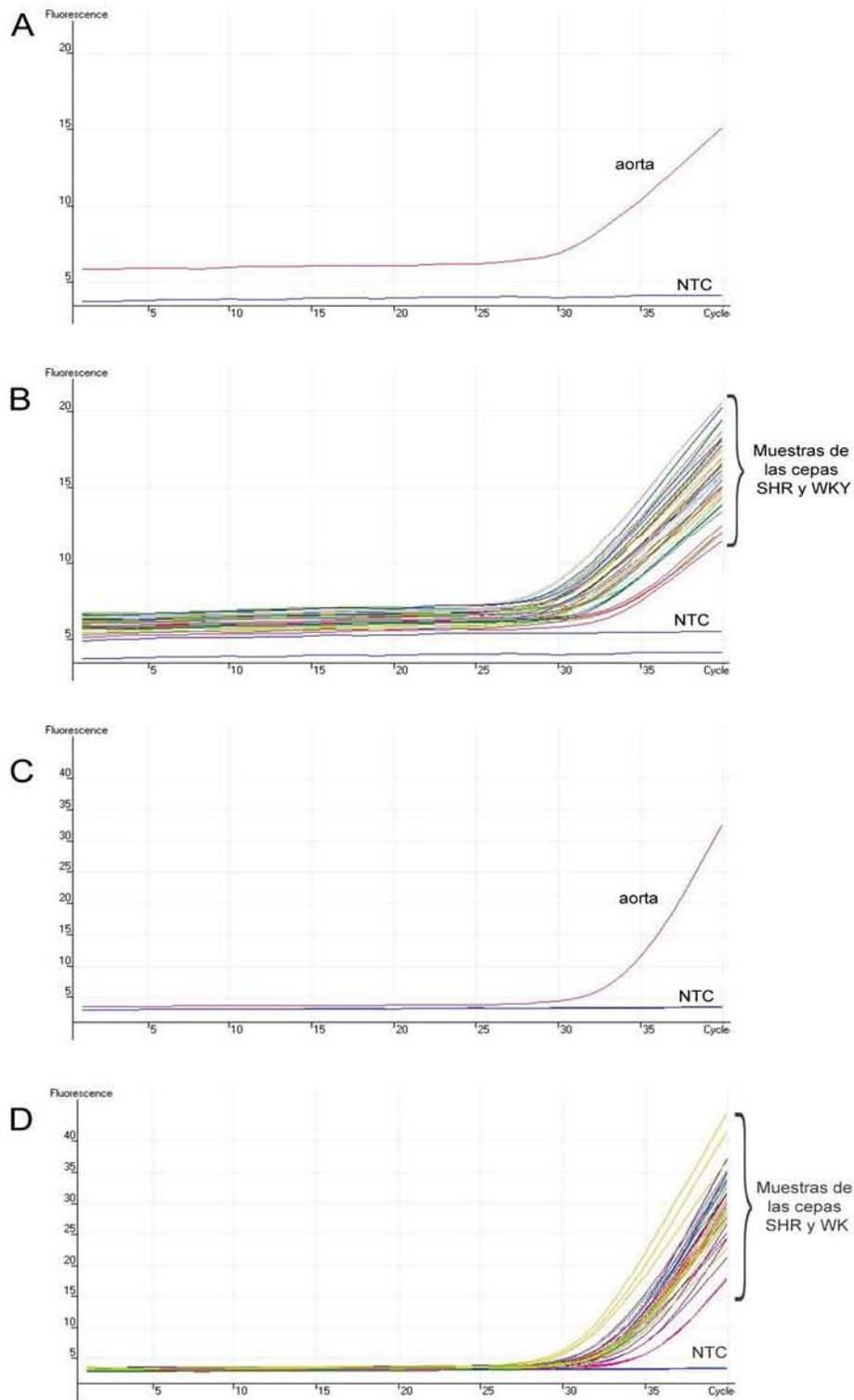


Fig. 22 (A) Prueba para el receptor α_{1a} -AR utilizando templado de aorta y como control agua. (B) Reacción representativa del receptor α_{1a} -AR. (C) Prueba para el receptor α_{1b} -AR utilizando templado de aorta y como control agua. (D) Reacción representativa del receptor α_{1b} -AR.

Análisis con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Antes de realizar el análisis de los datos se calculó el valor de los ciclos umbral (Ct), utilizando el *software* del termociclador que normaliza los basales y determina el ciclo en que la función que describe la amplificación deja de ser lineal y entra en la fase exponencial

(http://www.corbettlifescience.com/control.cfm?page=Corbett_Research_1&langID=1).

La cuantificación relativa describe los cambios en la expresión de los genes problema respecto a un amplificado de referencia. Utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ se pueden calcular estos cambios relativos en la expresión del gen determinado por el PCR en tiempo real. Los valores de Ct obtenidos de cada reacción fueron procesados en Microsoft Excel para PC. Posteriormente, los datos obtenidos se graficaron en el programa Prisma Graph para PC. A continuación se muestran las gráficas realizadas para cada receptor normalizadas contra GAPDH y 18S.

Receptor α_{1a} -AR

Los resultados obtenidos para el receptor α_{1a} -adrenérgico se resumen en la figura 23. Normalizando con rRNA 18S o GAPDH en la cepa WKY, se presenta una disminución a las 48 semanas al compararla con 10 semanas, por su parte la cepa SHR no muestra cambios con significancia estadística. Al comparar entre cepas se observa un aumento en la cepa SHR a las 48 semanas de edad (aproximadamente 2:1), este cambio es significativo al compararlo con la cepa WKY.

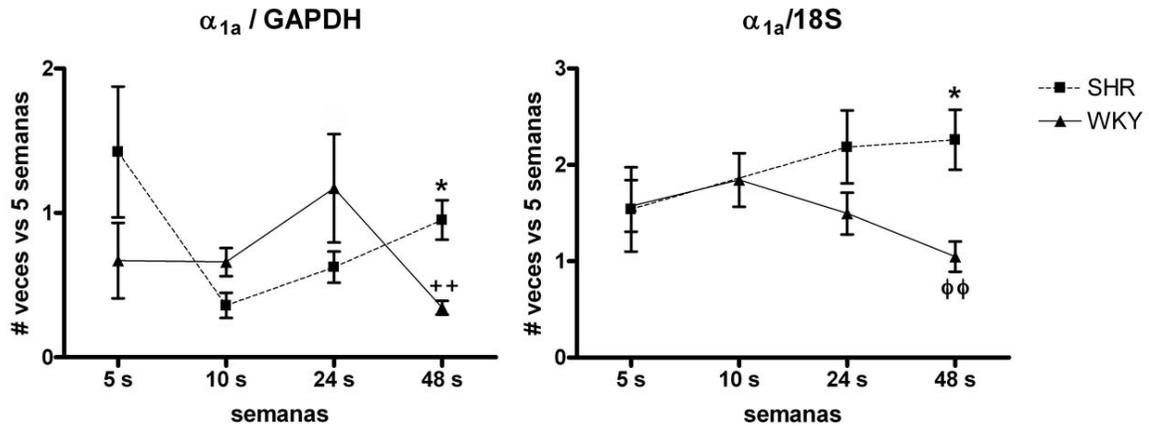


Fig. 23 Abundancias del receptor α_{1a} -AR normalizadas contra GAPDH y RNA 18S. * $p < 0.05\%$ vs. WKY.

⁺⁺ $p < 0.05\%$ vs. 10 semanas de la cepa WKY. ^{phi phi} $p < 0.05\%$ vs. 10 semanas de la cepa WKY.

Receptor α_{1b} -AR

La normalización de los datos con cualquiera de los RNAs constitutivos muestra gran similitud (Figura 24). La cepa WKY sólo presenta cambios significativos en la edad de 48 semanas con respecto a la edad de 24 s, normalizando contra GAPDH. Para la cepa de ratas hipertensas (SHR) se observa un incremento significativo a las 48 semanas normalizado contra el 18S.

Si se compara entre cepas existe una mayor abundancia en ratas hipertensas (aproximadamente 3 veces) a la edad de 48 semanas.

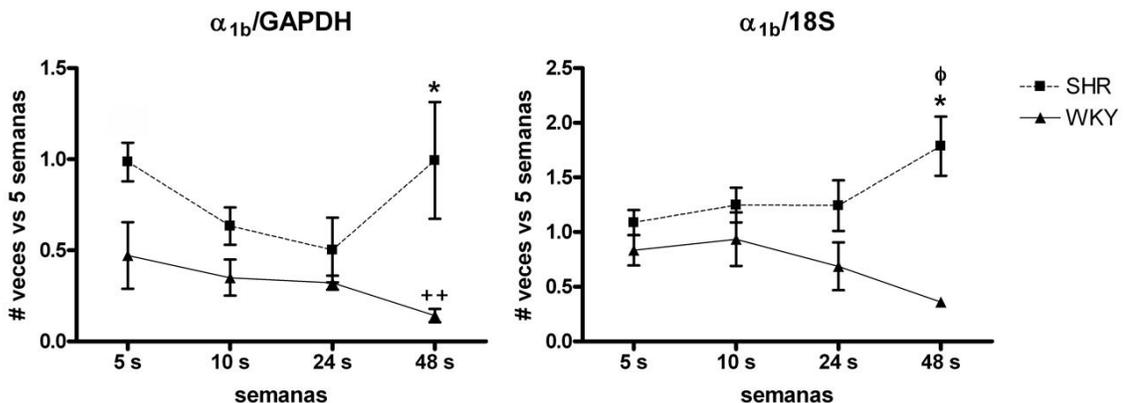


Fig. 24 Abundancias del receptor α_{1b} -AR normalizadas contra GAPDH y RNA 18S. * $p < 0.05\%$ vs. WKY.

⁺⁺ $p < 0.05\%$ vs. 24 semanas de la cepa WKY. ^{phi} $p < 0.05\%$ vs. 10 semanas de la cepa SHR.

Receptor α_{1d} -AR

El análisis de los datos para el receptor α_{1d} -AR mostró que en la cepa SHR existe una diferencia en la edad de 48 semanas contra 5 semanas normalizado con GAPDH. Al comparar ambas cepas se observó que el nivel de expresión del mRNA de este receptor es consistentemente mayor en las ratas hipertensas (SHR) a lo largo de todo el intervalo de edades analizado (5, 24 y 48 semanas), esta diferencia podría ser fisiológicamente relevante.

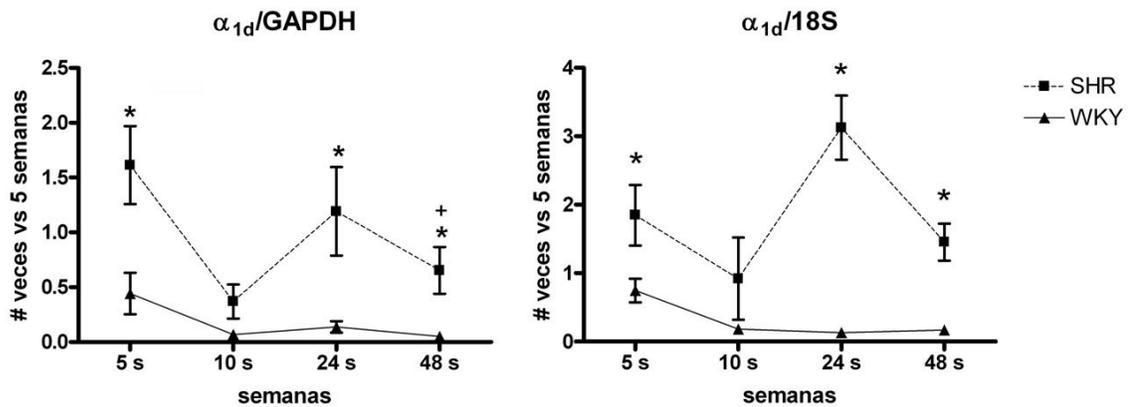


Fig. 25 Abundancias del receptor α_{1d} -AR normalizadas contra GAPDH y RNA 18S. * $p < 0.05\%$ vs. WKY.

+ $p < 0.05\%$ vs. 5 semanas de la cepa SHR.

Análisis de proporción de los receptores α_1 -AR

Otro de los objetivos de este trabajo fue comparar la proporción de los tres subtipos de α_1 -AR, en cada edad y en cada cepa, para lo cual se calcularon los porcentajes correspondientes a cada transcrito (Figura 26).

El análisis de los datos permite visualizar que en ambas cepas y en todas las edades analizadas existe mayor cantidad del receptor α_{1d} -AR (en un rango de 67 a 95%), seguido del α_{1a} -AR (4 a 34%), mientras que el α_{1b} -AR se encuentra en muy baja proporción (0.15 a 0.9%). Estos datos los podemos comparar con otros trabajos realizados por Martí *et al.*, donde se realizó una cuantificación de los niveles del mRNA de los tres subtipos de α_1 -AR, demostrando que el receptor α_{1d} es predominante en las arterias aorta y mesentérica (Martí *et al.*, 2005).

Además, las determinaciones revelan que a las edades de 24 y 48 semanas, existe un aumento en la proporción de receptores α_{1a} en ratas SHR vs. WKY (17 vs. 34% para 24 semanas y 11 vs. 34 % a las 48 semanas) (Figura 26). Al conjuntar estos datos a la par de la abundancia relativa, se puede sugerir que la proporción se modifica debido a un aumento en el número de receptores α_{1a} .

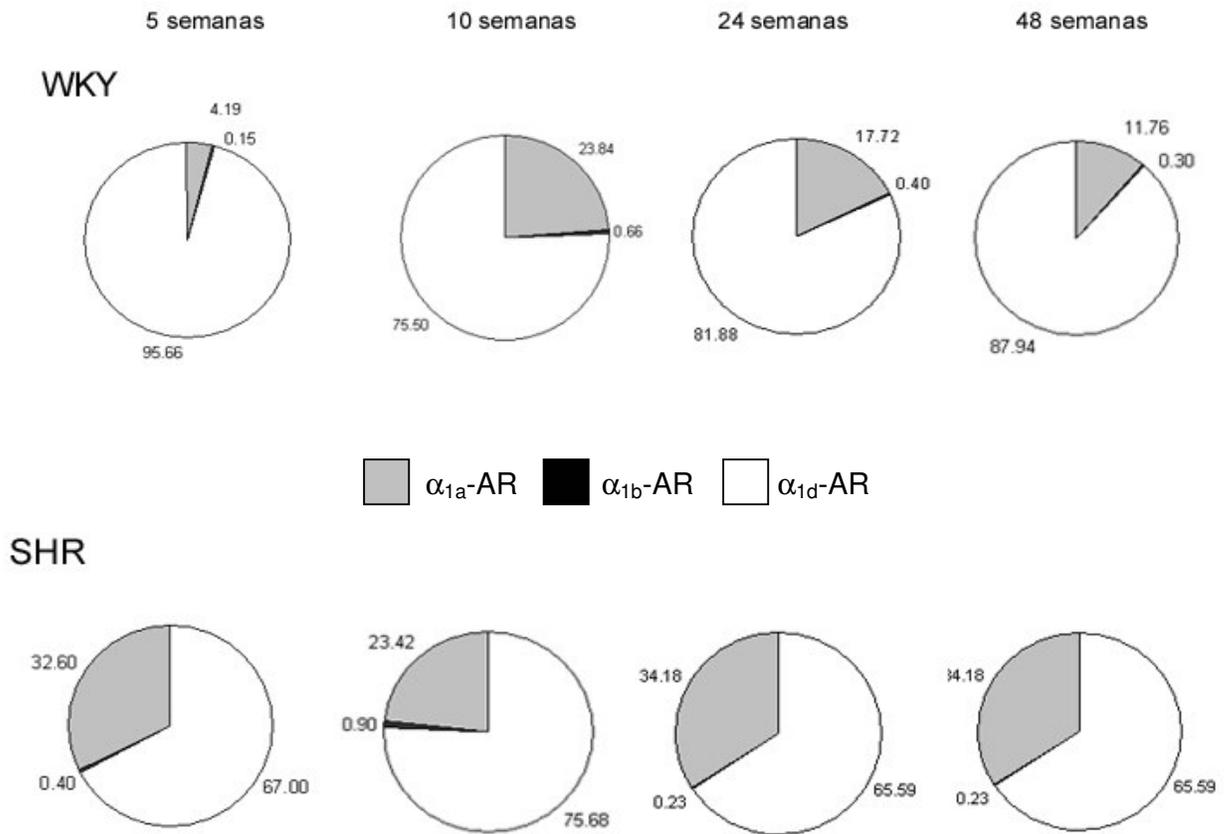


Fig. 26 Comparación de la cantidad proporcional de los receptores α_1 -AR en cada edad para las cepas WKY y SHR.

Discusión

En el presente trabajo se analizaron las abundancias relativas de los transcritos de los receptores α_1 -AR en la arteria aorta de ratas normotensas e hipertensas, en varias edades a lo largo de la vida del animal, con el fin de detectar si en alguna edad existen cambios críticos en la abundancia de estos transcritos.

La cuantificación de los niveles de mRNA para cada subtipo se realizó por PCR semicuantitativo y PCR en tiempo real.

Para el PCR semicuantitativo el paso inicial fue el diseño de cebadores para los tres receptores α_1 -adrenérgicos. Estos cebadores se diseñaron a partir de las secuencias de cada cDNA obtenidas de la base de datos del NCBI. Se analizaron con herramientas bioinformáticas como el programa BLAST, para tener certeza de su especificidad, en todos los casos tuvieron 100% de similitud con la secuencia blanco y no existen otros cDNAs conocidos con una semejanza mayor a 50%. Adicionalmente se realizó una predicción de la formación de dímeros entre cebadores, en el programa fastPCR (www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/fastpcr.htm). El *software* predijo que no habría formación de dímeros a una temperatura mayor a 40° C, en ninguno de los tres diseños, lo cual indicó que en un ciclo de PCR no se formarían estos complejos.

En los tres casos se utilizó fastPCR para aproximarnos a la temperatura de alineamiento de los cebadores y posteriormente se refinó experimentalmente. Asimismo, se determinó el ciclo en el cual la cantidad de producto fuera detectable y la reacción no llegara a saturación. Adicionalmente, los cebadores se probaron utilizando como templado mezclas de reverso transcripción sin enzima o agua (NTC), y en ninguno de los casos hubo productos de amplificación.

Para los receptores α_{1a} y α_{1b} , las reacciones amplificaron un solo producto del tamaño esperado (146 y 129 pares de bases, respectivamente), estas reacciones se analizaron con SYBR[®] Green, en el analizador de imágenes FLA5000 (Fujifilm), cuya

sensibilidad es del orden de los ng, mayor al uso de bromuro de etidio y no se detectaron productos inespecíficos.

En el caso del α_{1d} se observó además del amplificado del tamaño esperado (117 pares de bases) una banda de aproximadamente 50 pares de bases (pb). Esta banda varía de forma inversamente proporcional a la acumulación del transcrito por lo que se sugiere que se trata de cebadores dimerizados, al analizar estas mezclas en una corrida de Melt de 80 a 100° C, sólo se detectó el pico correspondiente al producto principal, lo que permite sugerir que la banda de 50 pb se forma a una temperatura menor a 80° C, es decir cuando la reacción se enfría. En este caso dicha banda es intrascendente y no interfiere con la determinación de la abundancia del transcrito analizado. De hecho al estandarizar estos mismos cebadores para reacciones con SYBR[®] Green en tiempo real, se observó que al disminuir la concentración de cebadores en la reacción en un rango de 500 nM a 50 nM el producto inespecífico desapareció.

Los resultados obtenidos por PCR semicuantitativo indicaron que los tres subtipos α_1 se expresan en la aorta de rata, tanto para la cepa WKY como para la SHR. Datos similares ya han sido descritos donde se ha determinado la coexpresión de los tres subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos en la aorta de rata por métodos de unión de radio ligandos (Tanaka *et al.*, 2006; Tanaka *et al.*, 2004) y por RT-PCR (Marti *et al.*, 2005; Faber *et al.*, 2001).

El análisis de los resultados, normalizando con ambos RNAs constitutivos, muestra que el nivel de expresión del receptor α_{1a} es mayor en ratas hipertensas desde 5 hasta 24 semanas sugiriendo un papel en el surgimiento del proceso hipertensivo. Para el caso de los receptores α_{1b} y α_{1d} sólo se destaca que a la edad de 64 semanas, la abundancia de ambos transcritos es aproximadamente el doble en ratas hipertensas que en normotensas. Sin embargo el nivel de transcrito es similar en todo el rango de edades analizado.

Para las reacciones en tiempo real que se realizaron por medio de la técnica de SYBR[®] Green, se optimizó la concentración de cebadores y se confirmó la amplificación mediante análisis de Melt. Como se mencionó previamente el análisis de Melt o análisis de la curva de disociación es una poderosa tecnología que permite determinar si hay productos de PCR espurios; en este análisis se toma en cuenta que para una secuencia de DNA dada hay una temperatura específica en la que se presenta un máximo de doble cadena. Como se sabe el SYBR[®] Green sólo se une a doble cadena, por tanto una curva de temperatura versus fluorescencia nos indica cuántos fragmentos de DNA existen en una mezcla, pues se observa un pico por cada fragmento.

En los tres casos (rRNA 18S, GAPDH y α_{1d} -AR) se realizó el análisis de Melt para los productos obtenidos y se observó un solo pico, es decir, un producto único. Los receptores α_{1a} y α_{1b} -AR se amplificaron empleando sondas TaqMan[®], el procedimiento se realizó según las especificaciones del fabricante (Applied Biosystems).

Cabe mencionar, que el análisis por PCR en tiempo real se limitó a un rango de edades menor. De 5 a 48 semanas, sin incluir la muestra de 32 semanas. El análisis de los resultados para el receptor α_{1a} mostró que al normalizar contra el rRNA 18S utilizando el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, existe una mayor abundancia del transcrito en las ratas hipertensas que en los testigos a las 48 semanas. Este aumento en la acumulación del transcrito a edades avanzadas en ratas hipertensas se observa también en PCR semicuantitativo, sin embargo por tiempo real la diferencia se detecta más temprano, lo cual puede ser debido a la sensibilidad del método.

Para el receptor α_{1b} , normalizando con GAPDH o rRNA 18S, se observa que el transcrito es más abundante en SHR que en WKY a las 48 semanas. Similar a lo que sucede con el receptor α_{1a} , existe acumulación a edades avanzadas en SHR.

La cantidad de receptor en cada cepa cambia en forma inversamente proporcional, pues mientras que para la cepa testigo la cantidad de ambos transcritos disminuye con la edad, para la cepa hipertensa aumenta. Estos datos son acordes a otros estudios, por ejemplo, en el modelo de la aorta sin endotelio de ratones intactos se ha descrito que la respuesta contráctil disminuye entre las 10 a 40 semanas de edad, sin haber cambios en la afinidad de los receptores por prazosina, es posible que estos cambios observados reflejen cambios en el número de receptores (Tanaka *et al.*, 2006), aunque es posible que entre rata y ratón existan diferencias.

Finalmente, el transcrito del receptor α_{1d} es más abundante en ratas hipertensas en todo el intervalo de edades analizado, esto resulta lo esperado pues en estudios funcionales previos el análisis de la contractilidad de arterias aisladas indica que este subtipo es el responsable del aumento de la respuesta presora en la arteria aorta (Ibarra *et al.*, 1998; Villalobos-Molina e Ibarra, 1996). Las discrepancias que existen en los datos semicuantitativos pueden atribuirse a la sensibilidad del método.

El análisis de la proporción de cada subtipo de receptor α_1 mostró que el α_{1d} es el subtipo más abundante en ambas cepas de ratas, en todo el intervalo analizado, siendo de aproximadamente 85% en promedio. Estos datos coinciden con los reportados por Martí *et al.*, 2005, que determinaron un valor del 79% para animales adultos de 3 meses de edad, resaltando su papel en la regulación de la contractilidad arterial. Del mismo modo existe correspondencia en el hecho de que el receptor α_{1b} es el menos abundante con proporciones cercanas a 1%.

En estos estudios se muestra que existen cambios relacionados con la edad en la expresión de los subtipos de los receptores α_1 -AR. Estos datos correlacionan con los análisis de la contractilidad vascular a los agonistas α_1 -adrenérgicos (Villalobos-Molina *et al.*, 1999; Ibarra *et al.*, 1997; Villalobos-Molina e Ibarra, 1996).

Conclusión

- La arteria aorta de rata, tanto para la cepa WKY como para la SHR, expresa los tres subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos.
- Para los transcritos de los receptores α_{1a} y α_{1b} , en edades avanzadas (48 semanas) hay acumulación de transcrito en ratas hipertensas mientras que en normotensas existe disminución.
- En el caso del transcrito del receptor α_{1d} , se encuentra elevado aproximadamente al doble en todo el rango de edades analizado, en ratas hipertensas con respecto a ratas testigo.
- El análisis de la proporción de cada uno de los transcritos nos indica que el receptor α_{1d} -AR es el predominante en esta arteria, siendo similar para ambas cepas.
- En conjunto, es posible sugerir que el α_{1d} -AR participa en el surgimiento y el mantenimiento de la hipertensión y la hiperreactividad vascular a agentes adrenérgicos. Los otros dos subtipos sólo se modifican en la senescencia pero su papel fisiológico no ha sido estudiado.

Referencias

- Bas A, Forsberg G, Hammarström S, Hammarström ML. 2004. Utility of the Housekeeping Genes 18S rRNA, β -Actin and Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase for Normalization in Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Analysis of Gene Expression in Human T Lymphocytes. *Scan J of Immuno.* 59(6), 566–573.
- Benowitz NL. 2001. Antihipertensores. En: Bertram Katzung, Farmacología básica y clínica. Octava edición. El Manual Moderno. México, D.F.
- Bourne HR y Zastrow M. 2001. Receptores de fármacos y farmacodinamia. En: Bertram Katzung, Farmacología básica y clínica. Octava edición. El Manual Moderno. México, D.F.
- Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Molinoff PB, Ruffolo Jr. RR, Trendelenburg U. 1994. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev.* 46, 121-136.
- Chomczynski P y Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Ann Biochem.* 162, 156-159.
- Cotecchia, S, Schwinn DA, Randall RR, Lefkowitz RJ, Caron MG, Kobilka BK. 1988. Molecular cloning and expression of the cDNA for the hamster α_1 -adrenergic receptor. *PNAS USA.* 85, 7159-63.
- Deng XF, Chemtob S, Varma DR. 1996. Characterization of α_1 -adrenoceptor subtypes in rat myocardium, aorta and other tissues. *Br J Pharmacol.* 119,269.
- Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zulma A. 2004. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques.* 37, 112-119.
- Faber JE, Yang N, Xin X. 2001. Expression of alpha-adrenoceptor subtypes by smooth muscle cells and fibroblasts in rat and in cell culture. *J Pharmacol Exp Ther.* 298(2), 44152.
- Fort P, Marty L, Piechaczyk M, Sabrouy S, Dani C, Jeanteur P, Blanchard JM. 1985. Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase multigenic family. *Nuc Ac Res.* 11; 13(5), 1431–1442.

- Ganong W. 1990. Fisiología Médica. Manual Moderno S.A de C.V. México D.F. Pp 520-530.
- García-Sáinz J, Vázquez-Prado J, Medina LC. 2000. α_1 -Adrenoceptors: function and phosphorylation. Review. *Eur J of Pharmacol.* 389, 1-12.
- García-Sáinz J, Vázquez-Prado J, Villalobos-Molina R. 1999. α_1 -Adrenoceptors: Subtypes, Signaling, and Roles in Health and Disease. *Arch of Med Res.* 30, 449-458.
- Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. 2001. An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression. *METHODS.* 25, 386-401.
- Goetz AS, King H K, Ward SD, Trae TA, Rimele TJ, Suassy DL Jr. 1995. BMY 7378 is a selective antagonist of the D subtype of alpha 1- adrenoceptores. *Eur J Pharmacol.* 272, R5-6.
- Gomez-Jarabo GE. 1997. Farmacología de la conducta: manual básico para psicoterapeutas y clínicos. Segunda edición. Síntesis, SA. Madrid.
- Guadalajara JF. 2006. Programa de actualización continúa para Cardiología. Academia Nacional de Medicina, Parte A. En línea: www.drscope.com/cardiologia/pac/arterial.htm Actualizado 2006. Revisado: 25 agosto 2006.
- Gurdal H, Tilakaratne N, Brown RD, Fonseca M, Friedman E, Johnson M. 1995. The Expression of α_1 - Adrenoceptor Subtypes Changes with Age in the Rat Aorta. *The J of Pharmacol and Exp Therap.* 275, 1656-1662.
- Guyton AC y Hall JE. 1998. Papel dominante de los riñones en la regulación a largo plazo de la presión arterial y en la hipertensión: el sistema integrado de control de la presión, en: Tratado de Fisiología Médica. Novena edición. Mc GRAW-HILL. México.
- Hamm HE y Gilchrist A. 1996. Heterotrimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 8, 189-196.
- Hieble JP, Bylund DB, Clarke DE, Eikenburg DC, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Ruffolo Jr. RR. 1995. International Union of Pharmacology: X. Recommendation for nomenclature of α_1 -adrenoceptors: consensus update. *Pharmacol Rev.* 47, 267-270.
- Hieble JP y Ruffolo RR Jr. 1996. The use of α -adrenoceptor antagonist in the pharmacological management of benign prostatic hypertrophy: an overview. *Pharmacol Res.* 33, 145.

- Hoffman BB, 2001. Activadores de los receptores adrenérgicos y otros simpatomiméticos. En: Bertram Katzung, Farmacología básica y clínica. Octava edición. El Manual Moderno. México, D.F.
- Hoffman BB, 2001. Catecolaminas, Fármacos Simpatomiméticos y Antagonistas de los receptores adrenérgicos. En: Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Décima edición. Volumen I, Mc GRAW-HILL. México, D.F.
- Hoffman BB y Taylor P. 2001. Neurotransmisión, Sistemas nerviosos autónomo y motor somático. En: Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Décima edición. Volumen I, Ed. Mc GRAW-HILL. México, D.F.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. 1991. Detection of Specific Polymerase Chain Reaction Product by Utilizing the 5' 3' Exonuclease Activity of *Thermus aquaticus* DNA Polymerase. *PNAS*, 88, 7276-7280.
- Ibarra M, López-Guerrero JJ, Villalobos-Molina R. 1997. Evidence for an age-dependent functional expression of α_{1D} -adrenoceptors in the rat vasculature. *Eur J of Pharmacol.* 322, 221-224.
- Ibarra M, López-Guerrero JJ, Villalobos-Molina R. 1998. Further evidence for the predominance of α_{1D} -adrenoceptors in arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Pharmacol Rev Commun.* 10, 135.
- Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Boletín de prensa No. 234 Sedentarismo, obesidad, tabaquismo y estrés: riesgos de hipertensión arterial. Domingo 4 de mayo de 2003. En línea:
www.imss.gob.mx/NR/rdonlyres/_D970F903-FC2E-47BE-9AADC2C1741B5647/0/_B234_.pdf. Revisado: 25 de septiembre 2005.
- Jain M, Nijhawan A, Tyagi AK, Khurana JP. 2006. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun.* 345(2), 646-51.
- Kenny BA, Chalmers DH, Philpott PC, Taylor AM. 1995. Characterization of a α_{1D} -adrenoceptor mediating the contractile response of rat aorta to noradrenaline. *Br J of Pharmacol.* 115, 981-986.

- Kok JB, Roelofs RW, Giesendorf BA, Pennings JL, Waas ET, Feuth T, Swinkels DW, Span PN. 2005. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab Invest.* 85, 154–159.
- Lefkowitz RJ. 2003. A Magnificent Time With the “Magnificent Seven” Transmembrane Spanning Receptors. *Circ. Res.* 92, 342-344.
- Lefkowitz RJ. 2004. Historical review: A brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *TRENDS in Pharmacol Sci.* 25, 8.
- Livak KJ y Schmittgen TD. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *METHODS.* 25, 402-408.
- Lomasney JW, Cotecchia S, Lorenz W, Leung WY, Shwinn DA, Yang-Fen TL, Brownstein M, Lefkowitz RJ, Caron MG. 1991 Molecular cloning and expression of the cDNA for the α_{1A} -adrenergic receptor. The gene for wich is located on human chromosome 5. *J Biol Chem.* 266, 6365-9.
- Lovatt A. 2002. Applications of quantitative PCR in the biosafety and genetic stability assessment of biotechnology products. *J Biothechnol.* 82(3), 279-300.
- Martí D, Miquel R, Ziani K, Gisbert R, Ivorra MD, Anselmi E, Moreno L, Villagrasa V, Baretino D, D'Ocon P. 2005. Correlation between mRNA levels and functional role of α_1 -adrenoceptor subtypes in arteries: evidence of α_{1L} as a functional isoform of the α_{1a} -adrenoceptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* H1923-H1932.
- Milano CA, Dolber PC, Rockman HA, Bond RA, Venable ME, Allen LF, Lefkowitz RJ. 1994. Myocardial expression of a constitutively active α_{1B} -adrenergic receptor in transgenic mice induces cardiac hypertrophy. *PNAS.* 91, 10109.
- Neer EJ. 1995. Heterotrimeric G proteins: Organizers of transmembrane signals. *Cell.* 80(2), 249-257.
- Piasik MT, Guarino RD, Smith MS, Soltis EE, Saussy DL Jr, Perez DM. 1995. The specific contribution of the novel α_{1D} adrenoceptor to the contraction of vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* 275, 1583.
- Piascik MT, Hrometz SL, Edelmann SE, Guarino RD, Hadley RW, Brown RD. 1997. Immunocytochemical localization of the alpha-1B adrenergic receptor and the contribution of this and other subtypes to vascular smooth muscle contraction: analysis with selective ligands and antisense oligonucleotides. *J Pharmacol Exp Ther.* 283, 854.

- Piascik MT y Perez DM. 2001. α_1 -Adrenergic Receptors: New Insights and Directions. *The J of Pharmacol and Exp Therap.* 298, 403-410.
- Piascik MT, Smith MS, Soltis EE, Perez DM. 1994. Identification of the mRNA for the novel in vascular smooth muscle. *Mol Pharmacol.* 46, 30.
- Plan Nacional de Salud 2001-2006 presentado por el secretario del ramo doctor Julio Frenk Mora. En línea: <http://www.invdes.com.mx/antiores/Abril2002/htm/silencioso.html>. Revisado: 22 agosto 2006.
- Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leona FT, Douglas SH, Field SL, Bell SM, Combaret V, Puisieux A, Mighell AJ, Robinson PA, Inglehearn CF, Isaacs JD, Markham A. 2003. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology.* 3, 18.
- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. 1997. Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves During the Polymerase Chain Reaction. *Anal Biochem.* 245, 154-160.
- Schoen FJ y Cotran RS. 2003. Vasos sanguíneos. En: Cotran, Kumar y Collins. Patología Estructural y Funcional. Sexta edición. Ed. Mc GRAW-HILL. México, D.F.
- Scofield MA, Liu F, Abel PW, Jeffries WB. 1995. Quantification of steady state expression of mRNA for alpha-1 adrenergic receptor subtypes using reverse transcription and a competitive polymerase chain reaction. *J Pharmacol Exp Ther.* 75,1035.
- Simpson P. 1983. Norepinephrine-stimulated hypertrophy of cultured rat myocardial cells is an α_1 -adrenergic response. *J Clin Invest.* 72, 732.
- Starke K. 1987. Presynaptic α autoreceptors. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 107, 73-145.
- Tanaka Y, Funabiki M, Muchikawa H, Koike K. 2006. Effects of aging on alpha1-adrenoceptor mechanisms in the isolated mouse aortic preparation. *J Smooth Muscle Res.* 42(4), 131-8.
- Tanaka T, Zhang L, Suzuki F, Muramatsu I. 2004. Alpha-1 adrenoceptors: evaluation of receptor subtype-binding kinetics in intact tissues and comparison with membrane binding. *Br Pharmacol.* 141(3), 468-76.

- Villalobos-Molina R e Ibarra M. 1996. α_1 -adrenoceptors mediating contraction in arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats are of the α_{1D} , α_{1A} subtypes. *Eur J Pharmacol.* 298, 257-263.
- Villalobos-Molina R, López-Guerrero JJ, Ibarra M. 1999. Functional evidence of α_{1D} -adrenoceptors in the vasculature of young and adult spontaneously hypertensive rats. *Br J of Pharmacol.* 126, 1534-1536.
- Wang Y, Hou R, Li P, Li J, Yan J, Yin F, Han C, Zhang Y. 2004. Gene expression profiles in response to the activation of adrenoceptors in A7r5 aortic smooth muscle cell. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 31(9), 602-7.
- Xin X, Yang N, Eckhart AD, Faber JE. 1997. α_{1D} -Adrenergic receptors and mitogen-activated protein kinase mediate increased protein synthesis by arterial smooth muscle. *Mol Pharmacol.* 51, 764.
- Xu K y Han C.1996. Quantification of mRNAs for three types in rat aorta by solution hybridization. *Life Sci.* 21, PL343.
- Xu K, Lu Z, Wei H, Zhang Y, Han C. 1998. Alteration of subtypes in aortas of 12-month-old spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 344, 31.