



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

---

---

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E  
INVESTIGACIÓN

**EXPRESIÓN Y PARTICIPACIÓN FUNCIONAL DE LOS  
RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS D1 Y D3, EN  
ANILLOS DE AORTA DE RATA CON HIPERTENSIÓN  
ARTERIAL SISTÉMICA ESPONTÁNEA.**

**T E S I S**  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUIMICOBIOLOGICAS

**P R E S E N T A**  
ALDRIN MARTÍNEZ VÁSQUEZ

DIRECTORES  
DR. EDUARDO RAMÍREZ SAN JUAN  
DRA. MARÍA DE JESÚS GÓMEZ VILLALOBOS



MÉXICO, DF

DICIEMBRE, 2011



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

## SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 12:00 horas del día 23 del mes de Noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas para examinar la tesis titulada:

**Expresión y participación funcional de los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> y D<sub>3</sub>, en anillos de aorta de rata con hipertensión arterial sistémica espontánea**

Presentada por el alumno:

Martínez	Vásquez	Aldrin
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)
Con registro:		
B	0	9 1 0 2 4

aspirante de:

Maestría en Ciencias Quimicobiológicas

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

  
 \_\_\_\_\_  
 Dr. Eduardo Ramírez San Juan

  
 \_\_\_\_\_  
 Dra. Maria de Jesús Gómez Villalobos

  
 \_\_\_\_\_  
 Dr. Fidel de la Cruz López

  
 \_\_\_\_\_  
 Dr. Abraham Miranda Páez

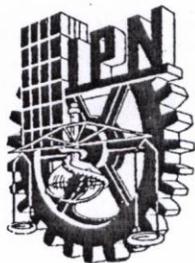
  
 \_\_\_\_\_  
 Dr. Sergio Roberto Zamudio Hernández

  
 \_\_\_\_\_  
 Dra. Lucía Quevedo Corona

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

  
 \_\_\_\_\_  
 Dr. Manuel Jesús Piñón López





**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*CARTA CESIÓN DE DERECHOS*

En la Ciudad de México, D.F., el día 5 del mes Diciembre del año 2011, el (la) que suscribe Aldrin Martínez Vásquez alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias Quimicobiológicas con número de registro B091024, adscrito a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Eduardo Ramírez San Juan y ceden los derechos del trabajo intitulado , al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección esanjuan@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Aldrin Martínez Vásquez

Dr. Eduardo Ramírez San Juan

## ÍNDICE

<b>1. ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>I</b>
<b>2. ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>I</b>
<b>3. ABREVIATURAS</b> .....	<b>II</b>
<b>4. RESUMEN</b> .....	<b>III</b>
<b>5. ABSTRACT</b> .....	<b>IV</b>
<b>6. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
6.1.1. Hipertensión arterial sistémica .....	1
6.1.2. La dopamina como neuromodulador central y periférico .....	3
6.1.3. Propiedades farmacológicas de la dopamina .....	5
6.1.4. Estructura del receptor dopaminérgico .....	6
6.1.5. Clasificación de los receptores dopaminérgicos .....	7
6.1.6. Receptores dopaminérgicos en vasos sanguíneos .....	9
6.1.7. Participación de la dopamina y los receptores dopaminérgicos en la HAS	13
6.1.8. Modelos animales de hipertensión arterial sistémica .....	15
<b>7. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>17</b>
<b>8. HIPÓTESIS</b> .....	<b>17</b>
<b>9. OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
9.1.1. General .....	18
<b>9.1.2. Específicos</b> .....	18
<b>10. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>19</b>
10.1.1. Animales .....	19
10.1.2. Equipo .....	19
10.1.3. Soluciones y fármacos .....	20
10.1.4. Medición de la presión arterial .....	22
10.1.5. Estudios Fisiológicos Farmacológicos .....	23
10.1.6. Técnica de “Western Blot”.....	25
<b>11. DIAGRAMA DE TRABAJO</b> .....	<b>26</b>
<b>12. ANÁLISIS Y PRESENTACIÓN DE RESULTADOS</b> .....	<b>27</b>
<b>13. RESULTADOS</b> .....	<b>28</b>

13.1.1. Medida de la presión arterial en las cepas de ratas estudiadas.-----	28
13.1.2. reactividad vascular-----	29
13.1.2.1. Efecto de la fenilefrina en anillos de aorta de rata SD, WK y SH con y sin endotelio -----	29
13.1.2.2. Efecto de la acetilcolina en anillos de aorta pre contraídos con fenilefrina de rata SD, WK y SH CE y SE-----	30
13.1.2.3. Efecto de la dopamina y agonistas dopaminérgicos sobre anillos de aorta de rata -----	31
13.1.2.4. Efecto del SKF (agonista D1) en la aorta de rata con y sin endotelio -----	32
13.1.2.5. Efecto del 7-OH-DPAT (agonista dopaminérgico D <sub>3</sub> ) en aorta de rata sin endotelio-----	35
<b>14. DISCUSIÓN -----</b>	<b>39</b>
<b>15. CONCLUSIONES -----</b>	<b>44</b>
<b>16. REFERENCIAS -----</b>	<b>45</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	22
Figura 2	24
Figura 3	29
Figura 4	30
Figura 5	31
Figura 6	31
Figura 7	33
Figura 8	35
Figura 9	36

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	2
Tabla 2	8
Tabla 3	28

## **ABREVIATURAS**

A – Adrenalina

AC – Adenilato ciclasa

ACh – Acetilcolina

AMPc – 3',5' - monofosfato cíclico de adenosina

DA – Dopamina

DM – Diabetes mellitus

HAS – Hipertensión arterial sistémica

HPLC- Cromatografía de líquidos de alta resolución

IP<sub>3</sub> – 1,4,5- trifosfato inositol

NA - Noradrenalina

NOS – Óxido nítrico sintasa

OMS- Organización Mundial de la Salud

PA – Presión arterial

Phe - Fenilefrina

PIP<sub>2</sub> – Fosfatidil 1,4-bifosfato de inositol

SD – Sprague Dawley

SH – hipertensión espontánea

SHR – ratas con hipertensión espontánea

SNC – Sistema nervioso central

SNP – Sistema nervioso periférico

WK – Wistar Kyioto

## RESUMEN

Hay reportes que demuestran la presencia de los receptores dopaminérgicos  $D_1$  y  $D_3$  en diferentes lechos vasculares, su localización y función son controversiales, más aún no está clarificada su participación en una patología como la hipertensión arterial sistémica. Por lo que en este trabajo se decidió estudiar el efecto de la activación de los receptores dopaminérgicos de los subtipos  $D_1$  y  $D_3$  en anillos de aorta de rata con hipertensión arterial espontánea. Se utilizaron ratas macho de la cepa SHR (con hipertensión espontánea) WK (Wistar Kyoto) y SD (Sprague Dawley). Se obtuvieron anillos aórticos, que fueron colocados en una cámara de perfusión, se ajustó una tensión basal de 2 gr y se realizaron curvas concentración respuesta en anillos precontraídos y sin precontraer respectivamente, con los agonistas dopaminérgicos ( $D_1$ -SKF-38393,  $D_3$ -7-OH-DPAT,  $10^{-9}$  a  $10^{-4}$  M) en anillos con endotelio (CE) y sin endotelio (SE). Se realizaron los mismos protocolos en presencia de los antagonistas dopaminérgicos ( $D_1$ -SCH-23390,  $D_3$ -U-99194A,  $10^{-5}$  M) respectivamente. A otro grupo de ratas se les realizó la extracción de la aorta torácica y se aplicó la técnica de western blot para corroborar la presencia de los receptores dopaminérgicos. Los resultados muestran que el 7-OH-DPAT produjo vasoconstricción en anillos CE y SE, efecto dosis dependiente, en las 3 cepas, el cual fue significativamente menor en ratas SH a la dosis máxima ( $10^{-5.5}$  M) comparada con las ratas WK y SD el efecto fue similar en anillos CE y SE. Este efecto de contracción en ratas WK se bloqueó al aplicar el antagonista  $D_3$  (U-99194A), en un 40 % a la dosis máxima usada. El SKF-38393 en anillos precontraídos con fenilefrina, mostró un efecto vasodilatador en anillos CE 71 % y SE 56 %, siendo mayor el efecto en las ratas SH a la dosis máxima al compararlas con las ratas SD y WK, y al aplicar el antagonista  $D_1$  (SCH-23390) en ratas SH hubo un bloqueo de la relajación del 15 % en la dosis máxima. Se corroboró la expresión de los receptores dopaminérgicos  $D_1$  y  $D_3$  con los ensayos del western blot. Estos resultados sugieren que los receptores dopaminérgicos  $D_1$  y  $D_3$  están presentes en la aorta de rata SD, WK y SHR. La activación del receptor  $D_1$  produce vaso relajación efecto que se ve incrementado

en ratas hipertensas. La activación del receptor D<sub>3</sub> produce vasoconstricción y este efecto se ve disminuido en ratas hipertensas. Lo que sugiere una autorregulación de los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> y D<sub>3</sub> para tener un mejor control de la presión arterial en ratas hipertensas.

## ABSTRACT

There are reports that show the presence of dopamine receptors D<sub>1</sub> and D<sub>3</sub> in different vascular beds, its location and function are controversial, also is not further clarified their participation in a disease such as hypertension. In this work we decided to study the effect of D<sub>1</sub> and D<sub>3</sub> dopamine receptor activation, in rat aortic rings with spontaneous hypertension. Aortic rings were obtained from male rats (SHR-spontaneously hypertensive, WK - Wistar Kyoto and SD-Sprague Dawley), which were placed in a perfusion chamber, basal tension was adjusted to 2 g and concentration response curves were performed in aortic rings, in presence or not of phenylephrine. Dopamine agonists (SKF-38 393 D<sub>1</sub>-, D<sub>3</sub>-7 -OH-DPAT, 10<sup>-9</sup> to 10<sup>-4</sup> M) were tested in aortic rings with endothelium (EC) and without endothelium (SE). Same protocols were performed in the presence of dopamine antagonists (D<sub>1</sub>-SCH-23 390, D<sub>3</sub>-U-99194A, 10<sup>-5</sup> M), respectively. Another group of rats underwent removal of the thoracic aorta and Western blot assay was made to verify the presence of D<sub>1</sub> and D<sub>3</sub> dopamine receptors. The results show that 7-OH-DPAT produced vasoconstriction in aortic rings CE and SE, dose-dependent effect in the 3 strains rats used, which was significantly lower in SH rats with the highest concentration used compared with WK and SD rats, where the effect was similar. This vasoconstriction effect was significantly less in the presence of the specific antagonist of the D<sub>3</sub> dopamine receptor (U-99194A). The SKF-38393 in rings precontracted with phenylephrine, showed a vasodilator effect in aortic rings CE and SE 71% and 56%, respectively, being the greater effect in SH rats at the highest dose used, when compared with SD and WK rats. The relaxation effect

was decreased in the presence of the specific antagonist of the D<sub>1</sub> dopamine receptor (SCH-23390) in SH rats, close to 15% at maximum effect observed. It was confirmed the expression of dopamine receptors D<sub>1</sub> and D<sub>3</sub> with the Western blot assays in the aorta tissues studied. These results suggest that D<sub>1</sub> and D<sub>3</sub> dopamine receptors are present in the aorta tissues from SD, WK and SHR rats. D<sub>1</sub> receptor activation induces a relaxation effect and was increased in hypertensive rats. D<sub>3</sub> receptor activation causes vasoconstriction and this effect was less in hypertensive rats. This suggests an up-regulation for D<sub>1</sub> and down-regulation for D<sub>3</sub> dopamine receptors in order to maintain a balance of blood pressure in hypertensive rats.

## INTRODUCCIÓN

### HIPERTENSIÓN ARTERIAL SISTÉMICA.

La hipertensión arterial es una de las enfermedades crónicas de mayor prevalencia en México, ya que afecta al 30.8 % de la población de entre 20 y 69 años de edad. A pesar de la facilidad que se tiene para su diagnóstico, cerca del 60 % de los individuos afectados lo ignoran, y de los que reciben tratamiento sólo un mínimo porcentaje tienen un control adecuado.

La hipertensión arterial sistémica (HAS) es un factor de riesgo importante para el desarrollo de enfermedades cerebrovasculares y renales. La mortalidad por estas complicaciones ha mostrado un aumento sostenido durante las últimas décadas y a pesar de que es causa número uno de consulta en la especialidad de cardiología, es una patología de la cual se desconocen sus causas y los mecanismos fisiopatológicos que llevan a sus complicaciones como la hipertrofia ventricular, insuficiencia cardíaca o los accidentes cerebrovasculares.

La hipertensión arterial sistémica es un padecimiento que se caracteriza por la presencia de niveles promedio y sostenidos de la presión arterial por arriba de 140/90 mmHg (Chobanian y cols., 2003). La Guía de Tratamiento Farmacológico para el Control de la Hipertensión Arterial 2009, *addendum* a la NOM 030, nos da la siguiente clasificación de la hipertensión arterial (tabla 1).

TABLA 1. CLASIFICACIÓN DE LOS VALORES DE PRESIÓN ARTERIAL SISTÉMICA

CATEGORIA	SISTÓLICA (mmHg)	DIASTÓLICA (mmHg)
Normal	120-129	80-84
Normal alta	130-139	85-89
Hipertensión grado 1	140-159	90-99
Hipertensión grado 2	160-179	100-109
Hipertensión grado 3	≥180	≥110

En el 95 % de los casos de HAS entre los 18 y 65 años de edad no se identifica ninguna causa, por lo que se considera como primaria, esencial o idiopática. En el 5 % restante puede ser secundaria a: enfermedad renal (3-4 %), hipertensión renovascular 0.5-1 %, endocrina (0.1-0.3 %) (feocromocitoma, síndrome de Cushing, aldosteronismo primario) y causas misceláneas 0.1-0.3 %.

Se han implicado múltiples factores fisiopatológicos en el origen de la HAS: aumento del tono simpático, quizás relacionado con una respuesta al estrés psicosocial; sobreproducción de hormonas retenedoras de sodio y vasoconstrictoras; ingestión excesiva y prolongada de sodio, así como un aporte inadecuado de calcio y potasio en la dieta; secreción de renina aumentada o inapropiada, con la resultante sobreproducción de angiotensina II y aldosterona; producción deficitaria de sustancias vasodilatadoras tales como prostaciclina y óxido nítrico y de péptidos natriuréticos; alteraciones en la expresión del sistema de las caliceínas-cininas que afectan el tono vascular y la regulación renal del sodio; anomalías en la resistencia vascular, incluyendo lesiones selectivas en la microvasculatura renal; diabetes mellitus (DM); resistencia a la insulina;

obesidad; actividad aumentada de factores de crecimiento vascular; alteraciones en los receptores adrenérgicos que afectan el cronotropismo, inotropismo y el tono vascular, y alteraciones en el transporte iónico celular; también se ha reportado que la alteración en los receptores dopaminérgicos está relacionada con el incremento de la presión arterial que tienen las personas con HAS (Oparil y cols., 2003). Pero a pesar de que se han planteado múltiples teorías sobre la generación de la hipertensión arterial aún no está claro cuál es el mecanismo que da origen a la generación de esta patología, por lo que muchos científicos se han dedicado al estudio de la hipertensión. El presente trabajo tiene como objetivo aportar conocimiento acerca de la función de la dopamina en la regulación de la presión arterial que tienen las ratas con HAS.

### **La dopamina como neuromodulador central y periférico**

La dopamina es una amina simpaticomimética de acción mixta. Estructuralmente pertenece al grupo de las catecolaminas, está formada por un grupo catecol y una cadena lateral etilamina. Las porciones moleculares que le confieren su efecto farmacológico son los grupos hidroxilo del anillo aromático y el grupo amino.

La dopamina (DA) es un intermediario de la biosíntesis de noradrenalina (NA) y adrenalina, así como un neuromodulador importante en el sistema nervioso central y periférico (Missale y cols., 1998). Tiene una participación esencial en una gran variedad de funciones, así como en algunos estados fisiopatológicos. Estas catecol aminas son sintetizadas a partir de su aminoácido precursor, la tirosina, por una serie de reacciones catalizadas por enzimas. La primera etapa es la hidroxilación de la tirosina por la enzima hidroxilasa de tirosina, es seguida por una descarboxilación que da origen a la dopamina, la cual es hidroxilada por la enzima dopamina  $\beta$ -hidroxilasa, en el carbono beta de la cadena lateral para dar origen a la NA. La dopamina se sintetiza a través de la misma ruta que la NA, las neuronas dopaminérgicas carecen de la enzima dopamina  $\beta$ -hidroxilasa y por tanto, no producen NA (Fillenz, 1990). Además, otra característica es la presencia de un

sistema transportador de dopamina que está involucrado en la recaptura del neurotransmisor por la terminal nerviosa (Laakso y cols., 1998; Page y cols., 1998).

El grupo hidroxilo en posición meta del anillo aromático en relación con el sustituyente etilamina, le confieren propiedades parciales de acción directa sobre los receptores adrenérgicos  $\alpha$  y  $\beta$ , mientras que el grupo hidroxilo en posición para, le confiere propiedades de acción indirecta sobre estos receptores adrenérgicos, de ahí que sea una catecolamina de acción mixta. Además su grupo hidroxilo y amino le permiten interaccionar y activar a los receptores dopaminérgicos.

El sistema de modulación dopaminérgica está representada por la presencia de neuronas que sintetizan y liberan dopamina, en las cuales coexiste un transportador de DA, además de receptores selectivos en las células en donde la DA produce diferentes efectos fisiológicos. Actualmente se considera que las diversas acciones de la DA, las efectúa a través de cuando menos 5 subtipos de receptores de DA, acoplados al sistema de proteínas G expresadas en la membrana de las células blanco (Andersen y cols., 1990; Jackson y Westlind-Danielsson, 1994; Missale y cols., 1998).

La modulación dopaminérgica en el sistema nervioso central (SNC) se ha caracterizado bien y está involucrada en varias funciones, como en el control de la locomoción, funciones cognoscitivas, en las emociones y afecto, así como en la secreción neuroendocrina (Flores y cols., 1996<sup>a</sup>, 1996<sup>b</sup>; Missale y cols., 1998). En el sistema nervioso periférico (SNP) hay evidencia de que la DA se secreta en algunos tejidos y ésta puede ser detectada en sangre, así como se ha detectado la presencia de receptores dopaminérgicos en diversos tejidos como el corazón, riñones, vasos sanguíneos, linfocitos B y en la glándula suprarrenal, donde participan en la homeostasis del sodio, tono vascular y secreción de hormonas (Amenta y cols., 1997, 2001; Goldberg y cols., 1978, 1983; José y cols., 1996, 1998; Kopia, 1989).

La alteración en la síntesis de DA, así como en la expresión y/o función de los receptores dopaminérgicos se han involucrado en alteraciones cardiovasculares como la insuficiencia cardiaca congestiva y la hipertensión arterial sistémica (Asico y Cols., 1998; Civelli y cols., 1993; Francis, 1995; José y cols., 1996, 1998). Por lo cual la infusión de dopamina se ha utilizado a nivel clínico.

### **Propiedades farmacológicas de la dopamina**

A dosis bajas (1 – 3  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ , iv) actúa a nivel de los receptores dopaminérgico D1, el cual ha sido identificado postsinápticamente en las células de músculo liso vascular renal, coronario, pulmonar, cerebral, adrenal, mesentérico, gástrico y el lecho arterial hepático. La estimulación de este receptor conduce a vasodilatación por estimulación de la adenililciclase (AC) y aumento del AMPc. La activación de los receptores D2 presinápticos, (que suprimen la liberación de NA por una inhibición de la actividad de la AC, y/o un aumento de la conductancia del  $\text{K}^+$  y/o una disminución de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , contribuye también a la aparición de un efecto vasodilatador. El efecto clínico más significativo de la actividad de estos receptores dopaminérgicos es el aumento del filtrado glomerular, el aumento en el flujo renal sanguíneo y de la excreción de sodio (Jerome y O'Hara, 2000; Hussain y cols., 1998).

A dosis intermedias (3 - 10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ , iv) estimula a los receptores adrenérgicos  $\beta_1$  en el corazón, provocando un efecto inotrópico y cronotrópico positivo (este último se presenta con un aumento inicial seguido de una disminución, conforme la velocidad de infusión continúa). Estos efectos son provocados debido a la estimulación de la AC y aumento del AMPc. El efecto clínico más significativo de esta dosis de DA es el aumento del gasto cardiaco, sin producir elevaciones considerables de la frecuencia cardiaca o la resistencia periférica. También aumenta la perfusión renal por la estimulación cardiaca que ejerce (Jerome y O'Hara, 2000; Hussain y cols., 1998).

A dosis elevadas (10 -20  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ; iv limite  $\beta$  y 20-50  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ , iv; limite  $\alpha$ ) estimula a los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$ , provocando vasoconstricción por formación de 1, 4, 5- trifosfato de inositol ( $\text{IP}_3$ ), de diacilglicerol (DAG) y aumento en el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Estos efectos dan origen a un aumento de la presión capilar pulmonar, aparición de vasoconstricción renal y aumento de la resistencia vascular sistémica (Jerome y O'Hara, 2000; Hussain y cols., 1998).

### **Estructura del receptor dopaminérgico**

Desde que se aisló por primera vez el cDNA del receptor dopaminérgico  $\text{D}_2$  por Bunzow y cols., en 1988, se conoce la existencia de otros subtipos de receptores, así como variaciones de un mismo receptor tabla 2. Todos los subtipos de receptores dopaminérgicos tienen una estructura similar con siete regiones hidrofóbicas o dominios transmembranales denominados TMI-TMVII. Entre estos dominios existen tres asas de aminoácidos denominadas (CPL1, CPL2, CPL3) que protruyen dentro y fuera del citoplasma. El extremo amino terminal es extracelular y presenta el mismo número de aminoácidos en todos los subtipos de receptores, así como un número variable de sitios para glicosilación. Los receptores de la familia  $\text{D}_2$  tienen una asa intracelular (CPL3) muy larga, una característica que es común en los receptores que interactúan con el sistema de proteínas  $\text{G}_i$ , para inhibir la adenililciclasa. Mientras que los receptores de la familia  $\text{D}_1$  se caracterizan por una CPL3 corta, como muchos de los receptores que se acoplan a las proteínas  $\text{G}_s$  y que estimulan la producción de AMPc. El extremo carboxilo terminal protruye dentro del citoplasma y es 7 veces más largo para la familia de los receptores  $\text{D}_1$  que para los de la familia  $\text{D}_2$ . Esta porción es rica en residuos de serina, treonina lo cual es un sustrato para la fosforilación (Missale y cols., 1998). Esta organización topográfica se considera una característica importante entre los receptores que se acoplan al sistema de proteínas G membranales (Jackson y Westlind, 1994).

## **Clasificación de los receptores dopaminérgicos**

La primera clasificación de receptores dopaminérgicos fue propuesta por Keabian y Calne en 1979, de acuerdo con la evidencia farmacológica y bioquímica, como dos familias de receptores, una acoplada positivamente a AC y otra inhibiendo el sistema de generación de 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). Los receptores de la familia D<sub>1</sub> están acoplados a proteínas G<sub>s</sub>, induciendo un aumento en la producción de AMPc y los receptores de la familia D<sub>2</sub> están acoplados a proteínas G<sub>i</sub>, induciendo una menor actividad de AC y menor producción de AMPc (Civelli y cols., 1993; Jackson y Westlind, 1994; Missale y cols., 1998). Estas diferencias funcionales son actualmente explicadas por las diferencias estructurales que existen entre las dos familias de receptores dopaminérgicos.

Con el advenimiento de la biología molecular y las nuevas técnicas para sintetizar drogas específicas, es posible identificar la presencia de diversos receptores dopaminérgicos, especialmente en el SNC. Se conoce clásicamente que en la familia de los receptores D<sub>1</sub> se incluye a los subtipos D<sub>1</sub> y D<sub>5</sub>, mientras que, dentro de la familia de los receptores D<sub>2</sub> se encuentran los subtipos D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub> (tabla 2).

TABLA 2. Tipos y características de los receptores dopaminérgicos.

Nombre aceptado	D1	D2	D3	D4	D5
Otros nombres	D <sub>1A</sub>	D <sub>2A</sub> , D <sub>2L</sub> , D <sub>2S</sub> , D <sub>2(444)</sub> , D <sub>2(415)</sub>	D <sub>2B</sub>	D <sub>2C</sub>	D <sub>1B</sub>
Aminoácidos	446 aa*	Corto: 414 aa*  Largo: 443 aa*	400 aa*	386-515 aa*	477 aa*
Aminoácidos en la tercer asa citoplasmática	57*	Corto: 134*  Largo: 443*	120*	101-261*	50*
Aminoácidos en la porción COOH terminal	113*	16*	16*	18*	116*
Intrones	0	6	5	3	0
Localización cromosómica	5q 35.1	11q 22-23	3q 13.3	11p 15.5	4p 15.1-16.1
Agonistas selectivos	R(+)-SKF-38393 A-68930	U-91,356 <sup>a</sup>	Pd 128,907 R(+)- 7-OH-DPAT	PD 168,077	R(+)-SKF-38393 A-68930
Antagonistas selectivos	SCH-23390 SCH-39166	L-741,626	S(-) Nafadotrida	L-741,870 L-750,667 RBI-257 U-101,387	SCH-23390 SCH-39166
Segundos mensajeros	Gs (↑ AMPC)	Gi (modula AMPC) Gq/11(↑IP3/DAG)	Gi (modula AMPC)	Gi (modula AMPC)	Gs (↑ AMPC)
Radioligando	[ <sup>3</sup> H]-SCH-23390 [ <sup>125</sup> I]-SCH-23982	[ <sup>3</sup> H]-Nemonaprida [ <sup>3</sup> H]-Espiperona	[ <sup>3</sup> H]- Nemonaprida [ <sup>3</sup> H]- Espiperona	[ <sup>3</sup> H]-Nemonaprida [ <sup>3</sup> H]- Espiperona	[ <sup>3</sup> H]-SCH-23390 [ <sup>125</sup> I]-SCH-23982

\*En humano. aa = aminoácidos. Modificado del RBI Handbook of Receptor Classification and signal Transduction. 3<sup>rd</sup>. Edition 1998 y Missale y cols., 1998.

## **Receptores dopaminérgicos en vasos sanguíneos**

Los receptores dopaminérgicos periféricos fueron originalmente caracterizados a través de estudios fisiológicos como cambios en el flujo sanguíneo en respuesta a la administración de agonistas y antagonistas de la dopamina (Goldberg y cols., 1978). Estudios realizados por McDonald y cols., en 1964 demostraron que la dopamina produce los efectos duales dependiendo de la dosis descritos anteriormente, al aplicar una infusión intravenosa de DA en sujetos sanos del género masculino, observaron una marcada reducción de la resistencia vascular a nivel renal. Este hecho provocó que la investigación de la DA a nivel periférico se enfocara en la arteria renal de los animales. De esta forma, se tiene registrado en el estudio de McNay y cols., en 1965 que la inyección de DA en la arteria renal de los perros anestesiados causa vasodilatación a dosis bajas, vasoconstricción a dosis elevadas y el pretratamiento con fenoxibenzamina, un agente  $\alpha$  bloqueante, suprime sólo la vasoconstricción. En forma similar, en el perro anestesiado pretratado con fenoxibenzamina (Goldberg y cols., 1972) observaron que la inyección de DA en las arteria renal y mesentérica produce vasodilatación, y mostraron que bajo estas condiciones, el efecto no es antagonizado por propranolol (antagonista adrenérgico  $\beta$ ), atropina (bloqueador muscarínico) o antagonistas de la histamina pero, si es selectivamente atenuado por haloperidol, fenotiacinas y bulbocapina, es decir por neurolepticos, sustancias con probada acción de antagonistas de los receptores dopaminérgicos centrales. Este hallazgo obviamente reforzó la hipótesis de la existencia de receptores dopaminérgicos específicos en lechos vasculares (Goldberg y cols., 1972).

A finales de la década de los 70's se demostró la existencia de receptores dopaminérgicos periféricos específicos a través de pruebas funcionales, como la medición del flujo sanguíneo renal y la aceleración cardíaca, proponiéndose dos subtipos de receptores, los cuales se planteó eran diferentes a los receptores dopaminérgicos del SNC (Missale y cols., 1998).

Posteriormente, Goldberg y cols., (1995), clasificaron a los receptores dopaminérgicos periféricos en DA1 y DA2. Esta clasificación era similar al esquema de los receptores dopaminérgicos del SNC, debido a que los DA1 comparten propiedades farmacológicas comunes a la familia D1, y los DA2 a la familia D2. Estudios subsecuentes tanto bioquímicos como de biología molecular en tejidos periféricos, demostraron igualdad entre los receptores dopaminérgicos periféricos y los centrales, por lo que la clasificación DA1 y DA2 fue eliminada (Missale y cols., 1998).

Después del hallazgo de estos dos subtipos de receptores a nivel periférico, las investigaciones para encontrar y caracterizar más subtipos tomó auge, para dar como resultado que, todos los receptores dopaminérgicos, en mamíferos, inicialmente clonados del cerebro, se encontraban expresados en sitios periféricos como la glándula adrenal, vasos sanguíneos, cuerpos carotídeos, riñón, tracto urinario, corazón, intestinos, y glándula parótida (Missale y cols., 1998).

Diversos estudios han mostrado que la activación selectiva de los receptores dopaminérgicos periféricos ejercen profundos efectos hemodinámicos y en la liberación de noradrenalina, como: vasodilatación renal y periférica, diuresis, natriuresis e inhibición de la liberación de NA en las terminales noradrenérgicas periféricas (Zeng y cols., 2007). En humano los agonistas no selectivos de los receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> son capaces de reducir la liberación de NA (Abadie y cols., 1996; Rump y cols., 1995), por lo que se ha sugerido que la activación de los receptores dopaminérgicos presinápticos D<sub>2</sub>, ejercen una modulación inhibitoria del sistema nervioso simpático, predominante en la periferia. La dopamina, provoca vasodilatación de las arterias renales, coronarias, carotídeas, vasos mesentéricos y celiacos (Lokhandwala y Jandhyala, 1979; Kopia y Valocik, 1989; Zeng y cols., 2004; Zeng y cols., 2007), lo que conlleva a una disminución de la presión sanguínea. Este efecto es mediado por la estimulación directa de los receptores dopaminérgicos de la familia D1 y D2 presentes en estos vasos sanguíneos (Missale y Cols., 1998, Zeng y cols., 2007). Los receptores de la familia D1, están localizados en el músculo liso vascular (postsinápticos), los

cuales median la relajación del músculo, mientras que los receptores de la familia D2 están localizados en nervios simpáticos (presinápticos), que inhiben la liberación de NA (Francis, 1995; Kopia y Valocik, 1989; Lokhandwala y cols., 1985; Zeng y cols., 2007).

La presencia de los receptores dopaminérgicos específicos en vasos sanguíneos se postuló como resultados de experimentos hechos en perros anestesiados (Goldberg y cols., 1972, 1978). Estos estudios han demostrado que la DA además de producir una vasoconstricción mediada por la activación de los receptores adrenérgicos  $\alpha$ , también reduce la presión sanguínea en forma dependiente de la dosis, y los antagonistas  $\beta$  adrenérgicos no bloquean dicho efecto (Eble, 1964; Goldberg y cols., 1963; Horwitz y cols., 1960), pero si, los antagonistas con propiedades dopaminérgicas. En estudios posteriores, en que la respuesta vasodilatadora a la DA se analizó en el lecho renal y mesentérico del perro anestesiado, dicha respuesta fue dependiente de la dosis y se bloqueó con metoclopramida, agente con propiedades bloqueadoras dopaminérgicas (Hahn y Wardell, 1980). Además, se demostró que el haloperidol (un antagonista dopaminérgico), en una dosis que no afecta a los adrenoreceptores  $\alpha$  o  $\beta$ , reduce significativamente la acción vasodilatadora de la dopamina en el lecho renal y mesentérico del perro (Yeh y cols., 1969). Estos resultados demuestran que los receptores dopaminérgicos estimulados por dopamina inducen vasodilatación en esos lechos vasculares. Posteriormente se evidenció la existencia de los receptores dopaminérgicos en otros lechos vasculares como el coronario, cerebral, hepático y femoral (Lokhandwala y Barreto, 1982).

En un intento por discernir el tipo de receptores involucrados en la respuesta inducida por la dopamina, se analizaron sus efectos sobre la contractilidad cardíaca, la presión arterial, el flujo sanguíneo renal y femoral en el perro anestesiado. En estos estudios y con el empleo de distintos agonistas y antagonistas dopaminérgicos, se demostró que la vasodilatación inducida en el lecho renal era consecuencia de la activación de los receptores D<sub>1</sub>. Y que la disminución del tono femoral y de la contractilidad cardíaca, resultaba de la

inhibición de la liberación de catecolaminas, por la acción de la dopamina sobre receptores del tipo D<sub>2</sub> presinápticos (Segawa y cols., 1998).

En los estudios *invitro* de Brodde (1982), se demostró el efecto relajante inducido por la dopamina y algunos dopaminométicos, vasos mesentéricos y renales perfundidos del perro y rata respectivamente; así como anillos de arteria renal, mesentérica, esplénica, coronaria y cerebral de conejo. Estos modelos, según Brodde, proporcionan la ventaja de poder realizar una cuantificación más precisa de los efectos de los agonistas y antagonistas, lo que conduce a una mejor caracterización de los receptores involucrados en dicho efecto. El orden de potencia encontrado (a través de una relación estructura actividad farmacológica para el receptor dopaminérgico) para los distintos agonistas empleados fue: 7-DTN mayor que el N,N-di-n-propil-dopamina (agonista parcial) mayor que apomorfina (agonista parcial) los antagonistas empleados fueron: (+)-butaclamol, metoclopramida y droperidol. Encontraron que ambos presentan un antagonismo competitivo sobre el efecto relajante inducido por la dopamina, mostraron así la existencia de receptores dopaminérgicos postsinápticos que median un efecto vasorrelajante en algunos lechos vasculares.

Estudios subsecuentes usando radioligandos y estudios autorradiográficos o mediciones de la actividad de la adenilato ciclasa (AC) confirman o amplían los resultados de los estudios fisiológicos. De esta forma, los receptores D<sub>1</sub> que se asocian con la estimulación de AC han sido identificados en la arteria renal, mesentérica y esplénica, se encuentran concentrados en la capa media y son insensibles a la simpatectomía química. Los receptores D<sub>2</sub> están localizados en la adventicia así como también en el borde de la adventicia y la media, y la capa íntima, en las arterias renal, mesentérica y esplénica, estos receptores están asociados con una inhibición de la AC. La simpatectomía química reduce la densidad de los receptores D<sub>2</sub> localizados en la adventicia y el borde entre la adventicia y la media pero, no en la íntima, sugiriendo la presencia de receptores dopaminérgicos presinápticos y postsinápticos en estos vasos sanguíneos. El

papel funcional de los receptores D<sub>2</sub> postsinápticos aún no ha sido totalmente esclarecido (Strange, 2002; Zeng y cols., 2004, 2007).

Los estudios mencionados anteriormente, muestran que los receptores dopaminérgicos periféricos no se concentran sólo en una región, sino que se encuentran distribuidos; esto puede significar que la dopamina en la periferia, pudiera ejercer efectos más extensos y complejos de lo que hasta ahora se ha determinado. De hecho, la localización presináptica de los receptores dopaminérgicos, especialmente de los subtipos D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub>, sugieren que podrían participar, primordialmente en la regulación de la liberación de NA en las terminales nerviosas. Pero su localización postsináptica también sugiere una acción dopaminérgica directa (Missale y cols., 1998; Zeng y cols., 2007).

Sin embargo, las herramientas farmacológicas específicas necesarias para lograr avances en la caracterización y estudio de los receptores dopaminérgicos vasculares son escasas. En este sentido, por ejemplo el fenoldopam es un agonista selectivo para la familia D<sub>1</sub> ampliamente usado en la investigación: pero el SKF-38393, es otro agonista D<sub>1</sub> que muestra una mayor selectividad y no ha sido utilizado suficientemente en estas investigaciones. Además, en forma general, no se ha logrado definir el papel funcional de los receptores dopaminérgicos vasculares, tanto de aquellos presentes en el músculo liso como de aquellos presentes en el endotelio, (Missale y cols., 1998; Strange, 2002).

### **Participación de la dopamina y los receptores dopaminérgicos en la HAS**

Existen evidencias de que la dopamina puede estar participando en la regulación de la presión arterial sistémica a nivel central y periférico. A nivel central se ha evidenciado que, la estimulación eléctrica o química del área tegmental ventral del cerebro de rata, la cual es la región de origen del sistema dopaminérgico A10, produce un aumento de la presión arterial, efecto que fue bloqueado por el haloperidol, antagonista de los receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>, (Cornish y Van Den Buuse, 1994). Adicionalmente, la actividad neuronal del área tegmental ventral y sus proyecciones en el sistema mesolímbico dopaminérgico,

se alteran por cambios en la presión arterial, balance de electrolitos y sal, estrés e ingestión de agua, cambios a su vez relacionados con la hormona vasopresina (Van Den Buuse, 1998). Las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra* liberan dopamina, que a su vez, regulan la actividad de disparo de las células del núcleo subtalámico (Cragg y cols., 2004). La disminución de dopamina a nivel de la sustancia *nigra* se ha relacionado con la enfermedad de Parkinson, situación que se asocia con hipotensión ortostática (Goldstein y cols., 2002).

A nivel periférico existe evidencia experimental de que la dopamina y/o los receptores dopaminérgicos pueden estar participando en el desarrollo de HAS. Los estudios de Habuchi y cols., en 1995, mostraron que la concentración de dopamina tisular, medida por HPLC en corazón (ventrículo derecho e izquierdo) de ratas con hipertensión espontánea (SHR) y su cepa control (Wistar Kioto; WK), fue significativamente mayor en las ratas con hipertensión espontánea que en las del grupo control. Hace unos años se reportó que la supresión genética del receptor dopaminérgico D<sub>3</sub> en ratones, aumenta la producción renal de renina y produce retención de sodio, con la consecuente HAS (Asico y cols., 1998).

Adicionalmente existen diversos estudios experimentales en los que se demuestra que la sobreactividad simpática contribuye al daño tisular ocasionado por la HAS (Akiyama y cols., 2002). La inhibición de la actividad simpática ha mostrado efectos benéficos e incluso regresión de los efectos secundarios de la HAS en diversos tejidos. La inhibición de la actividad simpática puede realizarse a diversos niveles. A nivel periférico en el sistema cardiovascular, el uso de antagonistas de los receptores alfa y beta adrenérgicos, que bloquean las acciones de la NA, son tratamientos farmacológicos aceptados en el control de la HAS. Por otro lado, la administración de agonistas selectivos de los receptores dopaminérgicos como el fenoldopam han mostrado ser útiles para el control de la HAS (Taylor y cols., 1999; Tumlin y cols., 2000). Desde el enfoque fisiológico es probable que la inhibición de la dopamina-beta-hidroxilasa, enzima necesaria para la conversión de DA a NA en las terminales nerviosas, es un mecanismo efectivo para disminuir la síntesis y liberación de NA y aumentar los niveles de la dopamina

con la subsecuente reducción en los valores de la presión arterial, como se ha demostrado por diversos autores (Gellai y cols., 1990; Ohlstein, 1987, 1988; Stainley y cols., 1997). El uso de inhibidores de la dopamina-betahidroxilasa como el nepicastat a mostrado que reduce los niveles de la presión arterial significativamente, en ratas con HAS, (Ohlstein, 1987; Stainley, 1997). En sujetos con deficiencia genética de dopamina-betahidroxilasa en las terminales nerviosas periféricas y en la médula adrenal, las concentraciones de NA en plasma y en líquido cerebrospinal, no son detectables (Rea y cols., 1990). En estos casos la DA es el neuromodulador que se libera en las terminales nerviosas y particularmente en las neuronas noradrenérgicas actúa como un neuromodulador falso (Robertson y cols., 1991). Los sujetos tienen hipotensión ortostática grave que limita sus actividades. En el 2004 Zeng y cols., descubrieron que la estimulación simultánea del receptor D<sub>3</sub> y D<sub>1</sub> causan vasorrelajación mediante sinergismo estos mismos autores en el 2007 nos dan una amplia perspectiva de los efectos de los receptores dopaminérgicos a nivel periférico mostrando que están implicados en la regulación de la presión arterial, y que los efectos al activar los receptores dopaminérgicos se ven alterados en sujetos con hipertensión arterial.

En resumen los estudios mostrados sugieren que en condiciones fisiológicas, la transmisión simpática mediada por NA es regulada por la transmisión dopaminérgica a nivel central y periférico y que, por lo tanto, al modificar la transmisión dopaminérgica en forma externa se puede regular el tono simpático periférico, lo cual sería de gran relevancia en diversos estados fisiopatológicos cardiovasculares como la HAS, en donde el aumento del tono simpático desempeña una función predominante en mantener y desarrollar complicaciones secundarias a esta patología.

### **Modelos animales de hipertensión arterial sistémica**

Existen diversos modelos de experimentación de HAS (Badyal y cols., 2003). Los modelos animales de hipertensión arterial aportan más evidencia sobre los cambios que sufren los órganos a consecuencia de un aumento de la presión

arterial a corto, mediano y largo plazo. La HAS de origen genético es uno de los modelos más usados por su similitud con la HAS en los humanos. Con el desarrollo de animales de laboratorio que espontáneamente desarrollan hipertensión arterial, por Okamoto y Aoki en 1973 y que originalmente recibieron el nombre de cepa Okamoto-Aoki, para posteriormente ser denominadas SHRs (por sus siglas en inglés, spontaneously hypertensive rats) ratas con hipertensión espontánea. Esta cepa de ratas, revolucionó los modelos experimentales que anteriormente se usaban y que algunos investigadores aún manejan como son la aplicación crónica de un clip metálico en la aorta torácica, en la arteria renal, o la administración crónica de corticosteroides. En las ratas SH la presión arterial gradualmente se incrementa hasta mantenerse en un nivel elevado sostenido a partir de las 12 semanas de edad, (Badyal y cols., 2003; Kurtz y cols., 1990) este modelo de HAS también desarrolla complicaciones similares a las observadas en los humanos con HAS esencial, como eventos vasculares cerebrales.

Por lo tanto, la corroboración de la existencia de los receptores dopaminérgicos en las diferentes capas del sistema vascular y los cambios que presenten, en ratas con hipertensión espontánea probablemente nos ayudarán a entender más, acerca de la fisiopatología de la HAS, por lo tanto, es un campo de investigación relevante.

## **JUSTIFICACIÓN**

Existe evidencia experimental de que los receptores dopaminérgicos pueden estar participando en el desarrollo de HAS a nivel periférico. También hay reportes de que los receptores dopaminérgicos se encuentran presentes en el sistema vascular, aunque aún no está clara cuál es su participación en condiciones fisiológicas y menos aún en condiciones fisiopatológicas. Particularmente en aorta de rata, hay evidencia de que los receptores dopaminérgicos de la familia D2 están expresados en las regiones preunional y postunional respectivamente. Sin embargo, aún no está clarificada su participación funcional, ni su mecanismo de acción. Menos aún se conoce su participación en condiciones patológicas como la HAS.

Los protocolos propuestos en este proyecto nos darán, en general, mayor información acerca de la participación de los receptores dopaminérgicos en el sistema vascular arterial, lo cual también nos ayudará a entender los mecanismos mediante los cuales, éstos estarían participando en el desarrollo de la HAS y ser blanco de estudio en proyectos posteriores.

## **HIPÓTESIS**

A nivel de la aorta de rata se expresan los receptores dopaminérgicos que participan en la regulación del tono vascular. En la HAS existen cambios que podrían estar relacionados con un aumento y/o disminución en la expresión y/o desensibilización de los receptores dopaminérgicos, localizados en la aorta de la rata SH y que están íntimamente relacionados el aumento de la presión arterial que desarrollan estos animales.

## **OBJETIVO**

### **General**

Determinar las probables alteraciones en el efecto fisiológico de los receptores dopaminérgicos en la aorta torácica de rata con hipertensión arterial espontánea.

### **Objetivos Específicos**

1. Comparar la presión arterial de las tres cepas de ratas estudiadas SD, WK, SHR.
2. Identificar farmacológicamente los receptores dopaminérgicos D1 y D<sub>3</sub> en la aorta torácica de rata con hipertensión arterial espontánea.
3. Corroborar la expresión de los receptores dopaminérgicos D1 y D<sub>3</sub> en la aorta torácica de rata con hipertensión arterial espontánea.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Animales**

Se utilizaron ratas de la cepa SHR (ratas con hipertensión espontánea), WK (Wistar-Kyoto) y SD (Sprague Dawley). Las cepas originales se adquirieron de Charles Rivers y se reprodujo en el bioterio del laboratorio. Los animales fueron manejados con alimento a libre demanda y con control de luz-oscuridad (12 X 12 h), con regulación de la temperatura (23 °C) y de humedad (60 %). El protocolo estuvo de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de México (Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999). Las ratas SHR y sus controles fueron estudiadas durante un período de 2 meses, para corroborar que los animales de experimentación mantuvieron durante ese tiempo los valores de presión arterial para ser considerados como controles o hipertensos.

### **Equipo**

#### **Equipo para medir la presión arterial.**

- Caja de calentamiento para la rata.
- Caja de acrílico. Kent Scientific Corporation
- Mangos oclusores.
- Pletismógrafo (Sensor de cambios de volumen)

Sistema de medición de presión arterial modelo XBP1000 de Kent Scientific Corporation (transductor)

- Tarjeta de conversión analógica/digital ADC 100 (pico technology Limited).
- Programa de computo Pico Scope

#### **Equipo para medir reactividad vascular**

- Baño María. Poly science Series 8000

-Cámaras para perfusión de tejidos con entrada de carbógeno (O<sub>2</sub> al 95% y CO<sub>2</sub> al 5%) y entrada y salida interna de agua. Espacios para la entrada y salida de solución fisiológica.

-Ganchos de acero inoxidable.

-Transductor de tensión isométrica FT 03 (CANNON)

-Amplificador de señal GRASS modelo P11T.

-Convertor Pico Technology modelo ADC 16.

-Programa de cómputo Picolog Recorde.

### **Equipo para realizar Western Blot**

Mortero

Ultracentrífuga

Politron

Equipo para corrimiento electroforético

Equipo para transferencia

Caset fotográfico

Película radiográfica

### **Soluciones y fármacos**

Pentobarbital sódico

Solución fisiológica para vasos sanguíneos (composición mM: NaCl, 119.0; KCl, 4.7; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.17; CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, 1.6; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.18; NaHCO<sub>3</sub>, 24.0; EDTA, 0.03; Dextrosa, 5.5).

Fenilefrina (Phe), agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico.

Acetilcolina (ACh), agonista muscarínico.

Dopamina, agonista dopaminérgico.

SKF 38393, agonista dopaminérgico D1

SCH-23390, antagonista dopaminérgico D1

7-OH-DPAT, agonista dopaminérgico D<sub>3</sub>

U 99194A, antagonista dopaminérgico D<sub>3</sub>

Anticuerpo primario contra los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>3</sub>

Anticuerpo secundario

2-metilbutano y hielo seco

Inhibidores de proteasas

Búfer de lisis

Búfer de resuspensión

Gel de agarosa

Membrana de nitrocelulosa

Búfer de transferencia

Leche al 5 %

TBS Tween

Luminol

## Medición de la presión arterial

La medida de la presión arterial se realizó a través del método indirecto en la cola de rata a través del sistema de medición de presión arterial (modelo XBP1001 de Kent Scientific Corporation). Para el registro se utilizó un sistema de adquisición y conversión de datos, el cual está instalado en una computadora (PICO). El sistema permite obtener el registro de la presión sistólica y diastólica del animal de experimentación. El sistema es altamente sensible y exacto. Está basado en el principio de pletismografía de extremidades, el cual mide el retorno del flujo sanguíneo después de una oclusión previa figura 1. Se realizaron de 4-6 registros de presión arterial, en cada rata durante cada medición se tomó el promedio de estos valores como la presión arterial. Los criterios para el desarrollo de la HAS fueron con base a los valores de la presión arterial sistólica y diastólica sostenidos durante el período de seguimiento. Se estableció el diagnóstico de HAS, cuando la presión sistólica fue mayor de 160 mm de Hg y la presión diastólica mayor 110 mm de Hg, de acuerdo con los criterios diagnósticos para la HAS en ratas.

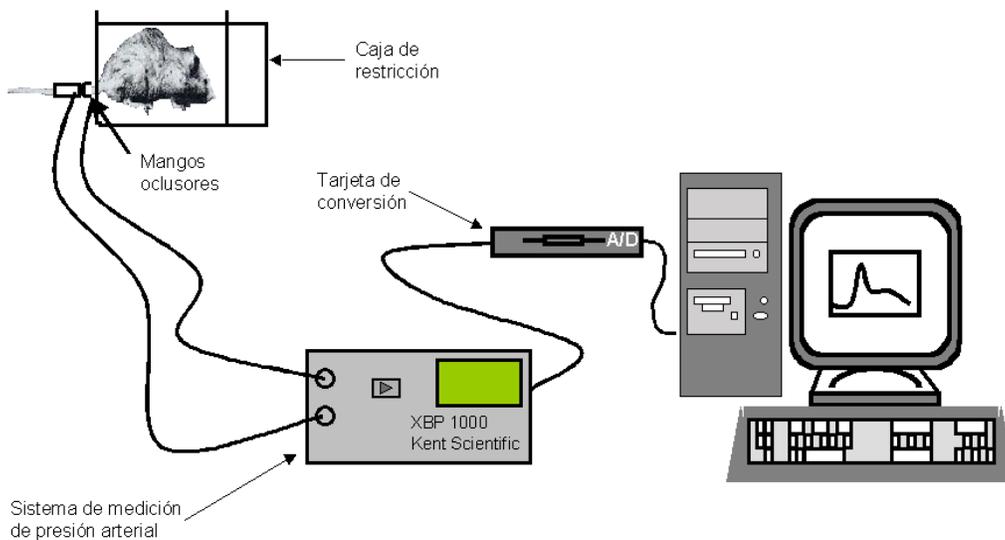


Figura 1. Esquema del sistema para la medición de PA en ratas.

## **Estudios fisiológicos y farmacológicos.**

Se calibró el equipo a 2 g de tensión, también se preparó la solución fisiológica para vasos, con la cual se llenaron las cámaras para perfusión de tejidos y se ajustó la temperatura a 37, 38 °C. La solución fisiológica para vasos fue perfundida con carbógeno (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>), burbujeo constante para mantener en condiciones adecuadas el tejido.

La rata fue pesada y en relación con ello se le aplicó una dosis de pentobarbital sódico (0.1 ml / 100 g de peso) con 0.1 ml de heparina. Se realizó una toracotomía media y se extrajo la aorta torácica, posteriormente a ésta se le retiró el tejido conectivo y sangre, y se procedió a cortarla en anillos de 3 mm a 4 mm aproximadamente. En un grupo experimental se preservó el endotelio vascular y en otro se eliminó, al producir un raspado intravascular del mismo, esto para analizar si el efecto es dependiente o independiente de endotelio. Los anillos de aorta se colocaron en tres cámaras de vidrio de capacidad de 10 ml cada una, se colocaron entre dos ganchos de acero inoxidable en forma de "L", un extremo se engancho a la cámara y el otro al transductor de tensión muscular FT03. El transductor es sensible al movimiento mecánico de la aorta, ya sea de contracción o de relajación y esa señal mecánica la convierte en señal eléctrica que posteriormente pasa a un amplificador de señal GRASS modelo P11T y de éste al programa de cómputo (pico Technology) en donde fueron analizados y registrados los cambios ocurridos en los anillos de aorta figura 2.

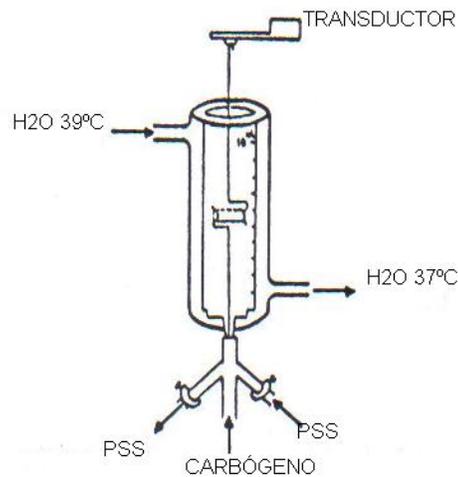


Figura 2. Esquema de la cámara para perfusión de tejido utilizada para medir la contracción y relajación de tejido aislado de anillos de aorta.

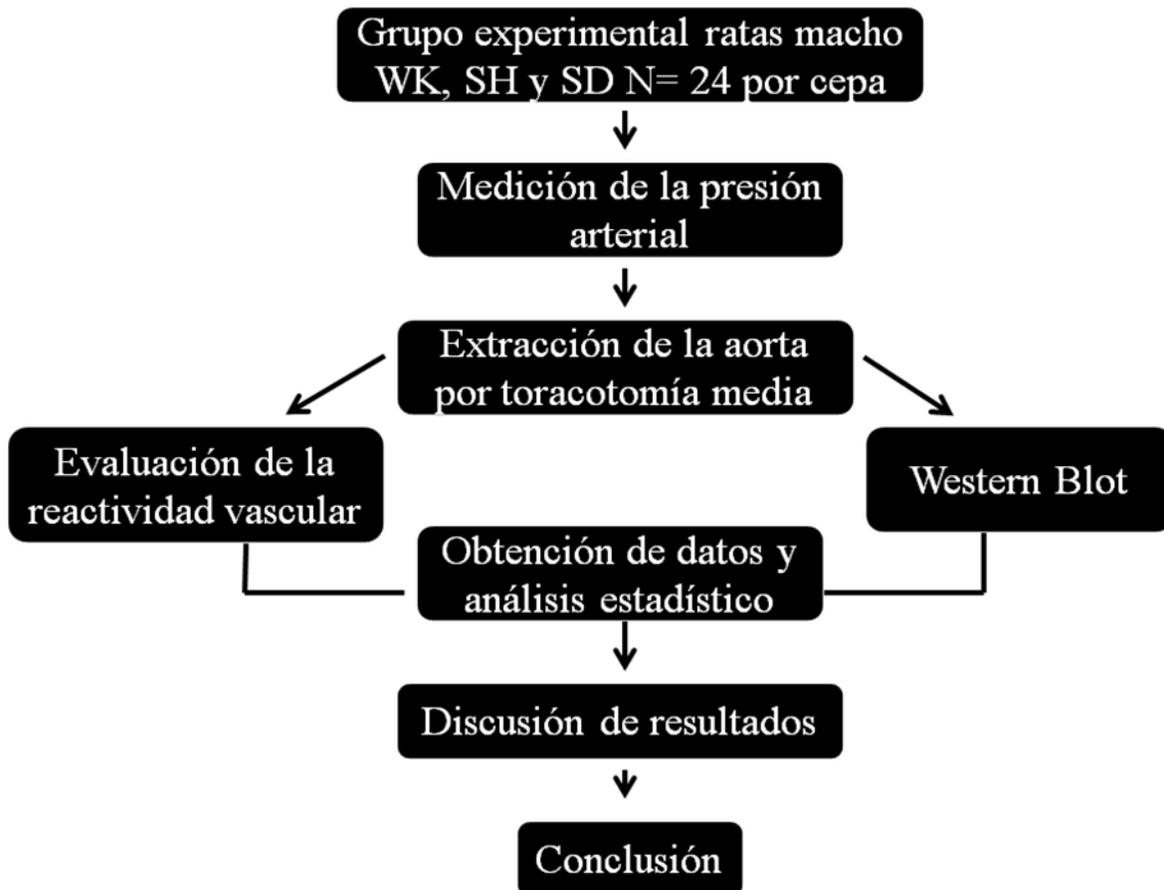
Para realizar este protocolo se montaron en las cámaras los anillos de aorta en condiciones fisiológicas, se dejó estabilizar el tejido durante media hora, con lavados cada 10 minutos con solución fisiológica para vasos, después de la estabilización del tejido se hizo una aplicación de fenilefrina  $10^{-6}$  M para alcanzar la contracción máxima del tejido, y posteriormente se aplicó acetilcolina  $10^{-6}$  M para observar el porcentaje de relajación con respecto a la contracción. Este procedimiento es para corroborar que los tejidos no sufrieron daño al momento de ser extraídos o montados en las cámaras de perfusión de tejidos, la corroboración se hizo en ratas control cuando la contracción con fenilefrina fue mayor al 50 % y la relajación con acetilcolina fue mayor al 50 % con respecto a la contracción, se lavó el tejido y se estabilizó nuevamente el tejido a 2 g de tensión, después de la estabilización se aplicó dopamina y los agonistas dopaminérgicos desde concentraciones de 1 nM hasta concentraciones  $\mu$ M . Adicionalmente se realizó la aplicación de los agonistas mencionados en presencia de su antagonista dopaminérgico, para corroborar que los efectos observados fueron mediados por los receptores dopaminérgicos.

## Técnica de Western Blot

Se anestesió la rata con pentobarbital sódico, y se realizó una toracotomía media, para extraer la aorta torácica, posteriormente se le retiró el tejido conectivo y sangre, se procedió a congelarla en solución de 2-metilbutano y hielo seco, se trituró en un mortero y homogeneizó en amortiguador de lisis 10 ml/g con inhibidores de proteasas (Roche diagnostic meilan Francia) se homogeneizó durante 20 segundos usando un politron 3000 rpm, se centrifugó a 2000 rpm durante 15 min a 4 °C, se obtuvo el sobrenadante y homogeneizó el pellet en 5 ml de amortiguador de lisis (20 seg.) se centrifugó a 2000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, se unió los sobrenadantes y centrifugó a 15000 rpm. Se obtuvo el pellet y se removió el sobrenadante, el pellet se resuspendió en amortiguador de resuspensión para realizar el corrimiento electroforético. La concentración de proteínas se calculó por el método de Lowry para determinar la cantidad de proteína a correr en el proceso de electroforesis

Se desnaturizó la proteína a 95 °C por 15 min y se depositó en los posillos del gel de agarosa, se corrieron 50 mg de proteína y se transfirió en una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µ Bio Rad laboratorios con número de catalogo 162-0115), con amortiguador de transferencia. La membrana se bloqueó con leche al 5 % (BD DIFCO numero de catálogo 23100) disuelta en TBS tween durante 1 hora a temperatura ambiente (tween 0.1 %), y se incubó con el anticuerpo primario durante toda la noche en cuarto frío y en agitación, se lavó 3 veces durante 5 min en TBS tween y se incubó en el anticuerpo secundario durante 1 hora (Laboratorios Santa Cruz número de catalogo SC-2004, anti-rabbit) se realizaron 3 lavados de 5 min nuevamente y se llevaron al cuarto de revelado, la membrana se colocó en luminol durante 4 min (quimioluminiscencia luminata forte Western HRP Substrate numero de catalogo WDLUF0500) se colocó en el caset fotográfico y se reveló en película radiográfica (kodak medical X-ray general purpose Blue numero de referencia 6040331). Se identificó la banda correspondiente al peso molecular esperado para cada uno de los receptores estudiados, en el film de rayos X y posteriormente se escaneo para su presentación.

DIAGRAMA GENERAL



## **ANÁLISIS Y PRESENTACIÓN DE RESULTADOS**

Los resultados se expresaron en valores absolutos como promedio  $\pm$  el error estándar de la media (EEM). Los resultados entre los diferentes grupos de estudio fueron analizados por el método de ANOVA bifactorial, seguido del método de Student-Newman-Keuls para la comparación de grupos. El efecto de los antagonistas fue analizado con t de student. Las curvas concentración respuesta de los agonistas usados para determinar la EC50, se analizaron por regresión no lineal con el programa GraphPad Prism. Un valor de  $p < 0.05$  se consideró significativo.

## Resultados

### Medida de la presión arterial en las cepas de ratas estudiadas.

Comparando las presiones arteriales basales sistólicas y diastólicas de las tres cepas estudiadas, se encontró que las presiones se encuentran aumentadas en las ratas SH, y que las ratas WK se pueden considerar ratas prehipertensas esto quiere decir que las ratas presentan valores de presión arterial, que están en el límite para ser categorizadas hipertensas, por lo que se consideró como cepa normotensa a las ratas SD, ya que presentaron valores de presión arterial en un intervalo considerado normal. Como se puede observar en la tabla 3, los valores obtenidos muestran diferencia significativa entre los tres grupos, en cuanto a las presiones diastólicas y sistólicas, por lo que se decidió continuar con los siguientes protocolos en los tres grupos.

Tabla 3. Muestra las presiones arteriales basales obtenidas de las ratas vivas por método no invasivo: SD, WK y SH, se presenta el promedio de los grupos  $\pm$  el error estándar.

Cepa de ratas	Presión sistólica mmHg	Presión diastólica mmHg
SD N=24	121 $\pm$ 3 A	88 $\pm$ 3 A
WK N=24	162 $\pm$ 5 B	96 $\pm$ 6 B
SH N=24	176 $\pm$ 3 C	117 $\pm$ 3 C

Letras diferentes denotan diferencia significativa entre cepas  $p < 0.05$

## REACTIVIDAD VASCULAR

### Efecto de la fenilefrina en anillos de aorta de rata SD, WK y SH con y sin endotelio

La fenilefrina, un agonista adrenérgico  $\alpha_1$ , induce contracción de los anillos de aorta de las ratas SD, WK, y SH, se encontraron diferencias en la reactividad vascular de los anillos provenientes de las diferentes cepas de ratas, los anillos de las ratas SD con y sin endotelio mostraron mayor contracción que los anillos de las ratas WK y éstas a su vez mayor contracción que los anillos arteriales de las ratas SHR, el efecto de la fenilefrina en los anillos sin endotelio, fue significativamente mayor que el efecto en los anillos con endotelio en ratas SD, WK, SH (figura 3).

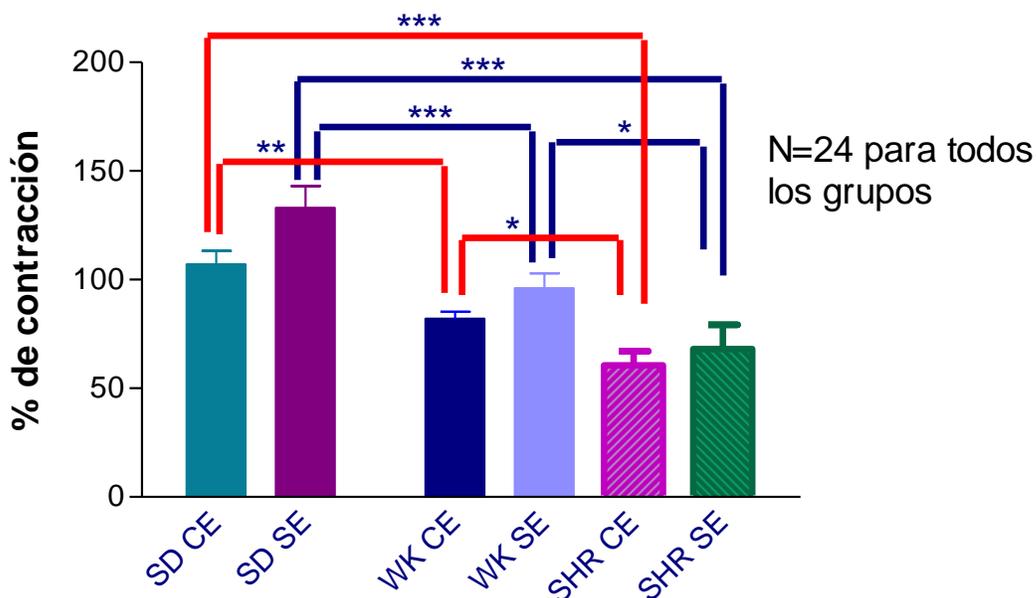


Figura 3. Contracción inducida por la fenilefrina en anillos aórticos de rata SD, WK y SH CE y SE, respectivamente. Los anillos fueron incubados con fenilefrina 1  $\mu$ M durante 10 min. Se realizó ANOVA bifactorial, seguido de Student-Newman-Keuls \* $p < 0.05$ , \*\* $p < .001$ , \*\*\* $p < .0001$

## Efecto de la acetilcolina en anillos de aorta pre contraídos con fenilefrina de rata SD, WK y SH CE y SE

En la figura 4 se muestra el efecto de aplicar acetilcolina (ACh) a los anillos de aorta se presenta una disminución del tono vascular o relajación, siendo ésta mayor, en los anillos de aorta de la rata SD con endotelio que en anillos de aorta WK y SHR con endotelio, las ratas WK presentan mayor relajación que las SHR, en los anillos de aorta de rata sin endotelio, para los tres grupos, el efecto de relajación está notablemente disminuido y no muestran diferencias significativas

### Reactividad vascular frente a ACh $10^{-6}$ M

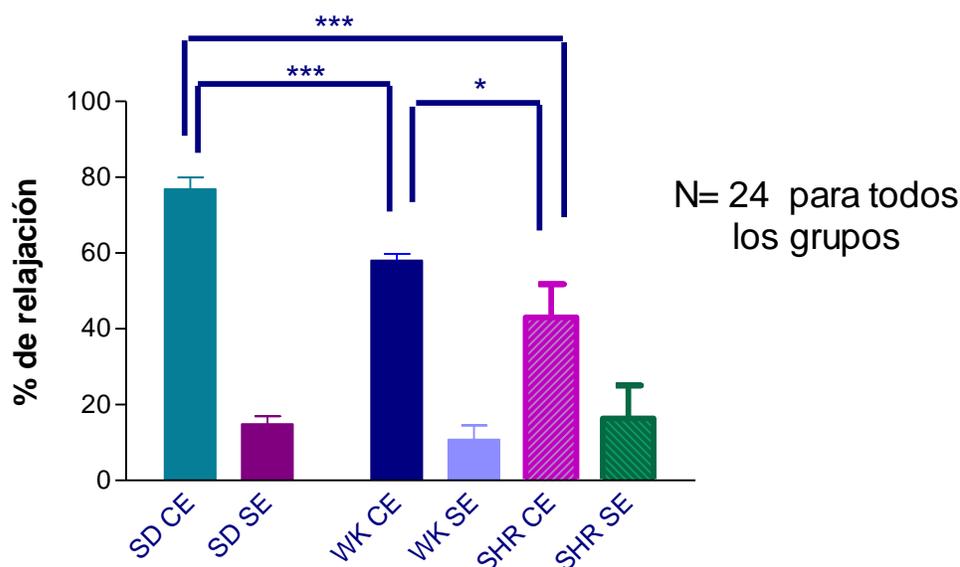


Figura 4: Relajación inducida por la acetilcolina en anillos de rata SD, WK y SH con y sin endotelio precontraídos con Phe. Los anillos se incubaron con ACh  $1 \mu\text{M}$  durante 10 min y se tomó el máximo de relajación. Se realizó ANOVA bifactorial seguido de el método de Student-Newman-Keuls \* $p < 0.05$ , \*\* $p < .001$ , \*\*\* $p < .0001$ .

### Efecto de la dopamina y agonistas dopaminérgicos sobre anillos de aorta de rata

Se realizaron curvas concentración efecto acumulativas de dopamina desde concentraciones nanomolares hasta concentraciones micromolares, en anillos de aorta CE y SE, sin contracción previa, esto para corroborar el efecto de un fármaco simpaticomimético, el cual está ampliamente demostrado. Se utilizó a la dopamina debido a que se estudiaron agonistas dopaminérgicos y porque ya está descrito el efecto de este fármaco sobre los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$ . La figura 5 nos muestra que la dopamina induce efecto de contracción, dependiente de la concentración, sobre los anillos de aorta, siendo esta contracción mayor en los anillos de las ratas SD, a partir de la concentración 1 micromolar, comparada con las respuestas de las ratas WK y SHR, entre las ratas SHR y WK no se encontró diferencia significativa.

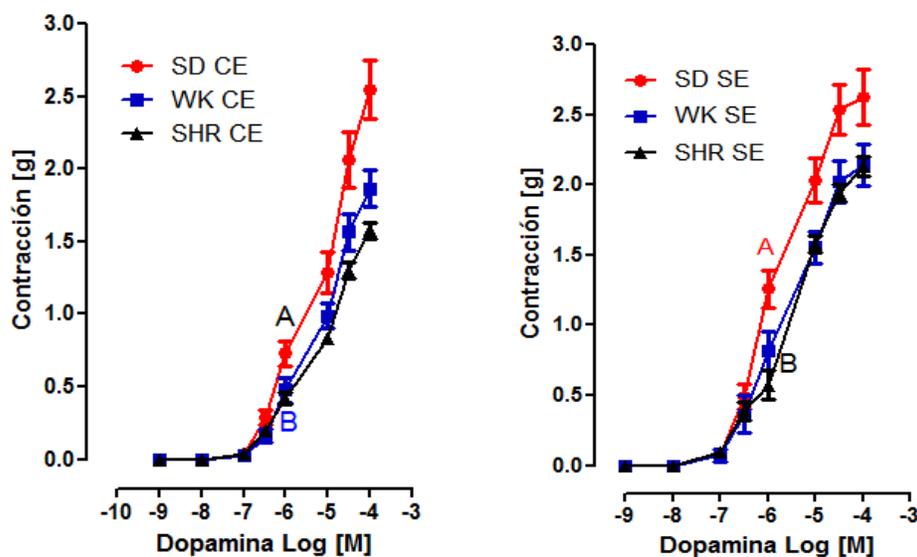


Figura 5: Efecto de la dopamina sobre los anillos de aorta de ratas SD, WK, SHR, CE y SE, sin contracción previa, los anillos se incubaron con concentraciones desde 1 nM hasta 100  $\mu$ M durante 10 minutos, para cada concentración N=12. Se realizó ANOVA de dos vías con medidas repetidas (RM) seguido del método de Student-Newman-Keuls. SD  $DE_{50}$  10.3  $\mu$ M, WK  $DE_{50}$  20.15  $\mu$ M, SHR  $DE_{50}$  35.26  $\mu$ M. Letras diferentes denotan diferencia significativa en toda la curva a partir de la concentración en donde se localizan  $p < 0.05$  entre cepas.

## EFFECTO DEL SKF (AGONISTA D1) EN LA AORTA DE RATA CON Y SIN ENDOTELIO

Se realizaron curvas concentración efecto acumulativas de SKF 38349 desde concentraciones nanomolares hasta concentraciones micromolares en anillos de aorta CE y SE, contracción previa con fenilefrina. La figura nos muestra que el SKF 38349 tiene efecto de vasorrelajación sobre los anillos de aorta, siendo mayor esta relajación en los anillos de las ratas SHR a partir de la concentración 300 nM hasta  $10^{-5}$  M, comparada con la respuesta de los anillos de las ratas SD y WK, las respuestas de las ratas SD y WK no muestran diferencia significativa (figura 6).

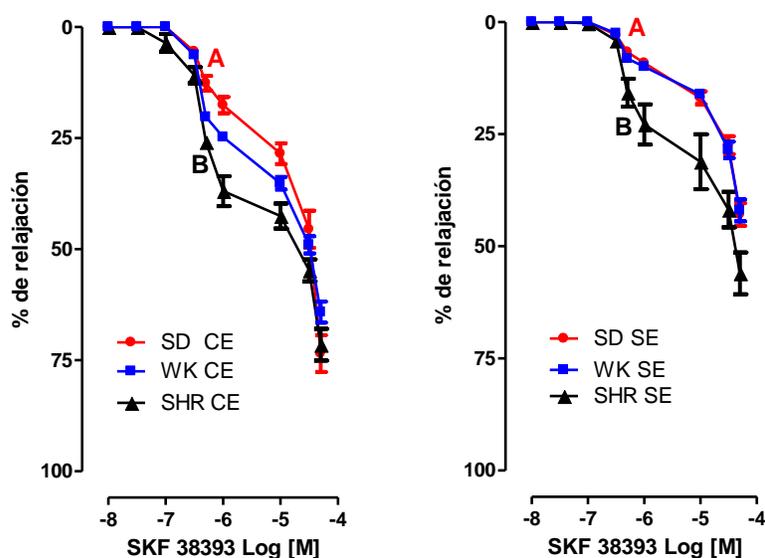
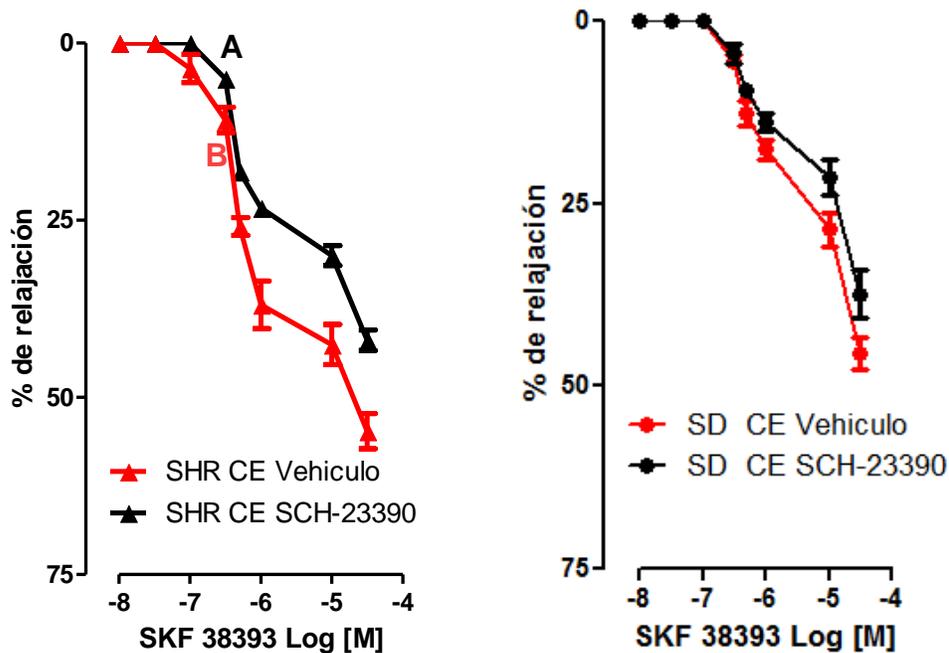


Figura 6: Efecto del SKF 38393 sobre anillos de aorta SD, WK, SHR, con endotelio y contracción previa con fenilefrina 1  $\mu$ M, los anillos se incubaron con concentraciones desde 1 nM hasta 50  $\mu$ M de SKF 38393, durante 10 minutos para cada dosis, N= 12. Se realizó ANOVA de dos vías con medidas repetidas (RM) con el método de Student-Newman-Keuls. SD  $DE_{50}$  9  $\mu$ M, WK  $DE_{50}$  1  $\mu$ M, SHR  $DE_{50}$  754 nM. Letras diferentes denotan diferencia significativa  $p < 0.05$  entre cepas.

Se realizaron curvas concentración efecto acumulativas de SKF 38349 desde dosis nanomolares hasta dosis micromolares, en anillos de aorta con endotelio con contracción previa con fenilefrina, también se realizó la curva en presencia del antagonista. La figura 7 nos muestra que el SKF 38349 induce efecto de relajación y en presencia del antagonista específico para el receptor D1 (SCH-23390) este efecto se ve bloqueado significativamente en ratas SHR a partir de la concentración 500 nanomolar.



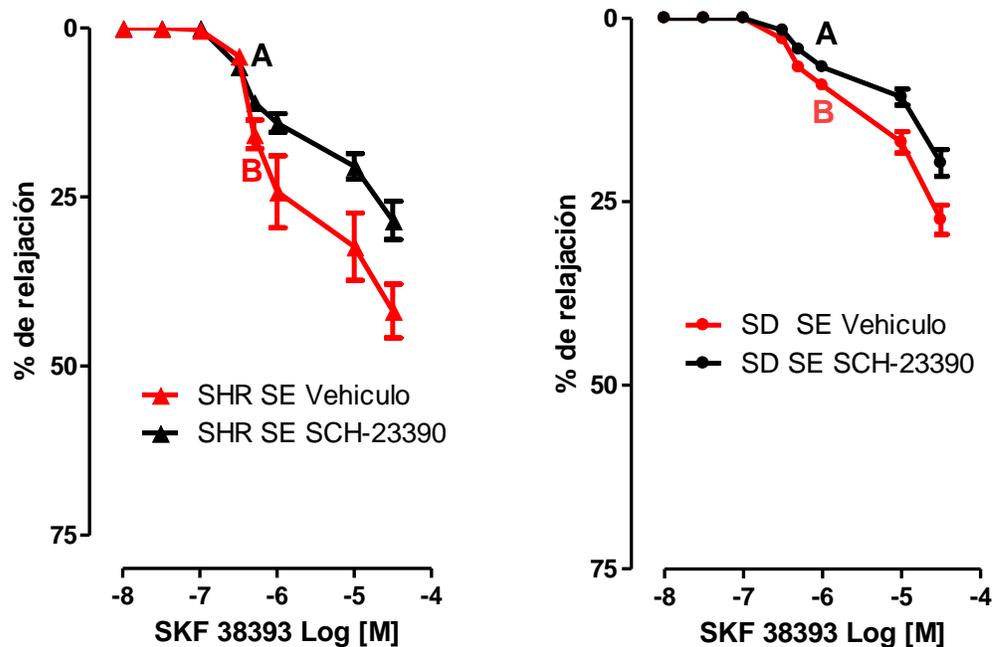


Figura 7: Efecto del SKF 38393 en ausencia y presencia del antagonista dopaminérgico D1 SCH-23390 sobre la reactividad vascular de los anillos de aorta SHR, con endotelio y precontraídos con fenilefrina 1  $\mu$ M, los anillos se incubaron con el antagonista D1 a una concentración de 10  $\mu$ M y posteriormente se realizó la curva concentración respuesta, a concentraciones desde 1 nM hasta 10  $\mu$ M de SKF 38393, durante 10 minutos para cada dosis, N= 12. SHR  $DE_{50}$  550 nM, antagonista 738 nM. Letras diferentes denotan diferencia significativa  $p < 0.05$  entre tratamientos.

## EFFECTO DEL 7-OH-DPAT (AGONISTA DOPAMINERGICO D<sub>3</sub>) EN AORTA DE RATA SIN ENDOTELIO

Se realizaron curvas concentración efecto acumulativas de 7-OH-DPAT desde dosis nanomolares hasta dosis micromolares en anillos de aorta sin endotelio sin contracción previa. La figura 8 nos muestra que el 7-OH-DPAT induce un efecto de contracción sobre los anillos de aorta, siendo esta contracción mayor en los anillos de las ratas WK a partir de la concentración 100 nanomolar, comparada con las ratas SD y SHR, las ratas SD muestran una contracción mayor que las ratas SHR.

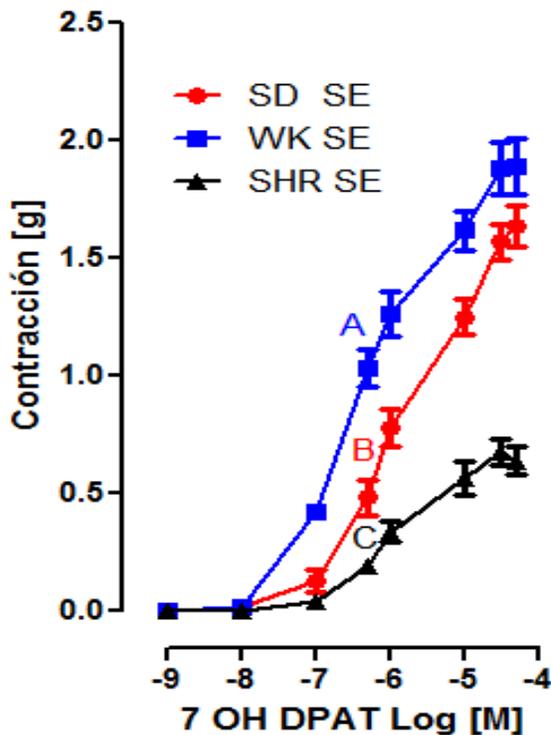


Figura 8: Efecto del 7-OH-DPAT sobre la reactividad vascular de los anillos de aorta de ratas SD, WK, SHR, sin endotelio y sin contracción previa, los anillos se incubaron con concentraciones desde 1 nM hasta 50  $\mu$ M, durante 10 minutos para cada dosis N= 12. Se realizó ANOVA de dos vías con medidas repetidas (RM) seguido del método de Student-Newman-Keuls SD DE<sub>50</sub> 1.16  $\mu$ M, WK DE<sub>50</sub> 405 nM, SHR DE<sub>50</sub> no alcanza el efecto. Letras diferentes denotan diferencia significativa en la curva a partir de la dosis donde se localizan  $p < 0.05$  entre cepas.

Se realizaron curvas concentración efecto acumulativas de 7-OH-DPAT desde concentraciones nanomolares hasta concentraciones micromolares en anillos de aorta de ratas SD, WK, y SH, sin endotelio, sin contracción previa con fenilefrina, también se realizó la curva en presencia del antagonista dopaminérgico D<sub>3</sub> U-99194A. La figura 9 nos muestra que el 7-OH-DPAT induce efecto de contracción y en presencia del antagonista específico este efecto se ve disminuido significativamente en las ratas SD y WK a partir de la dosis 100 nanomolar. En ratas SH en presencia del antagonista se observó que el 7-OH-DPAT tiene un menor efecto, aunque el efecto no fue significativo probablemente por el poco efecto que tiene el 7-OH-DPAT en ratas hipertensas.

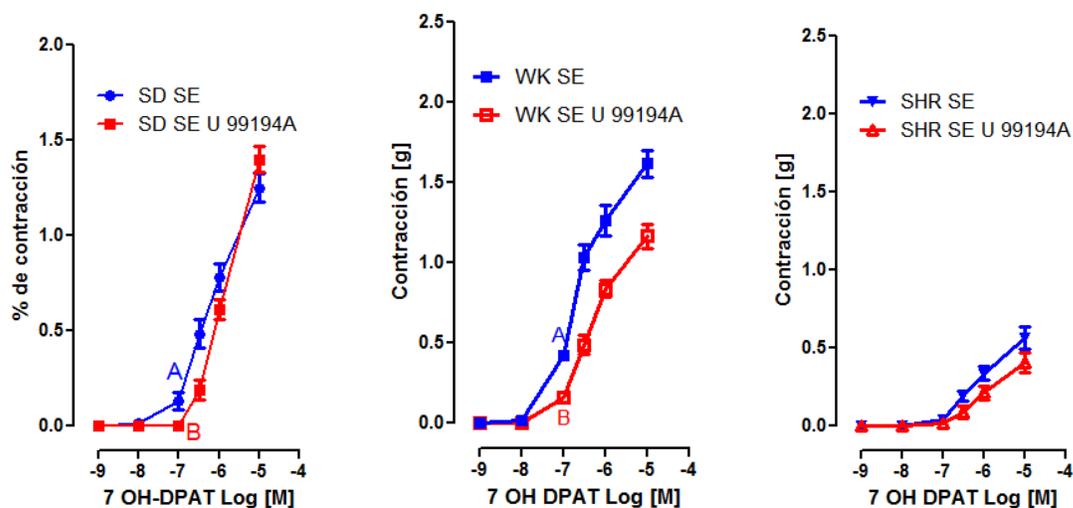


Figura 9: Efecto del 7-OH-DPAT en presencia y ausencia del antagonista dopaminérgico D<sub>3</sub> U-99194A sobre la reactividad vascular de los anillos de aorta de rata SD, sin endotelio y sin contracción previa con fenilefrina, los anillos se incubaron con 1 concentración 10  $\mu$ M de U-99194A durante 10 minutos, previa a la administración del agonista dopaminérgico D<sub>3</sub> desde 1 nM hasta 10  $\mu$ M, para cada concentración, N= 12. SD DE<sub>50</sub> 577 nM, DE<sub>50</sub> del agonista en presencia del antagonista 1.7  $\mu$ M, el antagonista por sí solo no tiene efecto. Letras diferentes denotan diferencia significativa a partir de la dosis donde se localizan, excepto en la última dosis p < 0.05 entre tratamientos.

## RESULTADOS DE WESTERN BLOT

Se determinó la expresión del receptor dopaminérgico  $D_3$  mediante la técnica de Western blot, como podemos observar en las figura 10, se muestra la detección del receptor  $D_3$  y la actina, se detectaron bandas a 70 y 43 kDa respectivamente tejido vascular, el anticuerpo usado contra el receptor dopaminérgico  $D_3$  muestra la banda a 45-70 kDa, y el anticuerpo contra actina muestra las bandas a 43 kDa. El receptor dopaminérgico  $D_3$  se encuentra presente en la aorta de rata de las tres cepas estudiadas (SD, WK y SH), se observa una mayor densidad de la banda para las ratas WK seguida por la SD, las ratas SH muestran una menor intensidad de la banda lo que no estaría diciendo que las ratas SH presentan una menor cantidad de receptores dopaminérgicos  $D_3$ , lo cual se podría correlacionar con la diferencia de presiones arteriales.

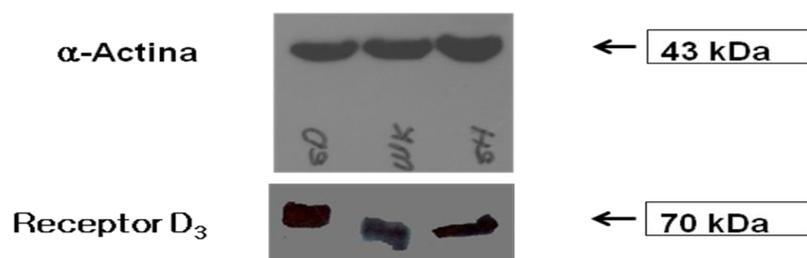


Figura 10. Muestra las bandas correspondientes al receptor D<sub>1</sub> en aorta de rata de las cepas SD, WK, y SH. N=2

Se determino la expresión del receptor D<sub>1</sub> mediante la técnica de western blot, la expresión de las bandas para este receptor se expresan a 63 kDa, el receptor está presente en aorta de ratas de las 3 cepas mostrando una banda correspondiente al receptor D<sub>3</sub> de mayor densidad en ratas hipertensas, seguida por las ratas WK, mientras que en las ratas SD la banda es de menor densidad.

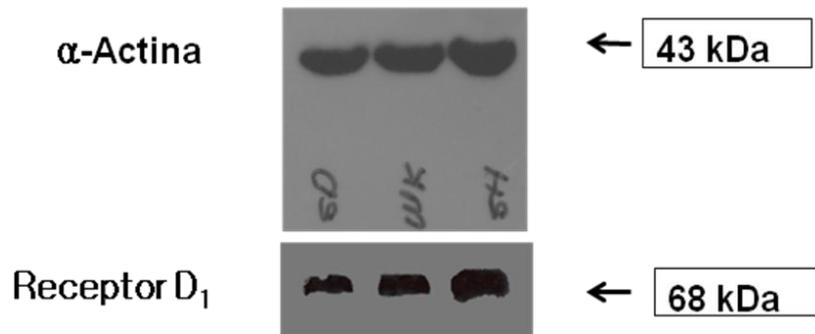


Figura 11. Muestra las bandas correspondientes al receptor D<sub>3</sub> en aorta de rata de las cepas SD, WK, y SH. N=2

## DISCUSIÓN

### **Modelos experimental de hipertensión arterial espontánea**

Se ha demostrado que las ratas hipertensas tienen elevada la presión arterial por arriba de lo que se puede considerar como normal para una rata y también hay reportes que muestran que las ratas WK se pueden comportar como ratas hipertensas (son consideradas ratas prehipertensas) por lo que no serían un buen grupo control para el análisis de la hipertensión arterial, debido a este motivo en el presente trabajo se introdujo de un nuevo grupo, las ratas de la cepa SD.

Al determinar la presión arterial de las tres cepas se pudo observar que entre los diferentes grupos experimentales existen diferencias significativas en los valores de presión arterial, mostrando valores de ratas normotensas las SD y de ratas hipertensas la cepa SHR, las ratas WK mostraron valores intermedios entre las ratas SD y SHR, esta dato puede servir para intentar una explicación sobre el efecto de los agonistas y antagonistas dopaminérgicos  $D_1$  y  $D_3$  en ratas con hipertensión arterial sistémica.

Los resultados de las curvas concentración efecto de la fenilefrina en anillos de aorta de rata corroboraron el efecto de contracción ya reportado para este fármaco y se observó que las ratas hipertensas presentan una contracción menor comparadas con las ratas WK y SD, y aunque se mencionó que en las ratas hipertensas hay un incremento de la transmisión catecolaminérgica, es probable que la contracción, mediada por receptores alfa 1, se encuentre disminuida debido a una respuesta de regulación descendente de estos receptores para evitar un mayor daño en el sistema cardiovascular por el incremento sostenido de la presión arterial, pero esta disminución de los receptores alfa 1 no es suficiente para mantener la presión arterial en sus niveles normales, con las consecuencias que esto tiene.

También se ha reportado que las ratas con hipertensión espontánea, muestran daño en el endotelio de sus arterias debido al incremento en la presión arterial que éstas presentan, por lo que muestran disminución en la respuesta de relajación de los vasos sanguíneos, ya que este efecto es mediado por el endotelio. Este hecho se pudo corroborar en los experimentos con acetilcolina, las aortas con endotelio de las ratas hipertensas, muestran una reducción en la respuesta de relajación comparada con las ratas WK y SD, mostrando una mayor relajación las ratas SD, esto se debe a que las ratas SD muestran valores de presión arterial más bajos que los otros dos grupos. La respuesta de relajación de las aortas sin endotelio no mostraron diferencias significativas, ya que sin endotelio, se bloquea la relajación en los 3 grupos, debido a que la relajación inducida por acetilcolina, depende del endotelio.

Una gran cantidad de estudios demuestran la importancia de la dopamina en la regulación de la presión arterial y más recientemente los receptores dopaminérgicos han sido implicados en este control, esto mediante la regulación de la concentración de  $\text{Na}^+$  (el sodio es una ión osmóticamente activo que influye en el volumen sanguíneo y con esto afecta a la presión arterial), y la resistencia periférica (los agonistas de los receptores dopaminérgicos afectan la relajación y la contracción de las arterias y con ello controlan la resistencia al paso de la sangre por éstas) Hussain y Lokhandwala 2003, Oparil y cols., 2003. Zeng y cols., 2004, 2007, 2011. Los receptores dopaminérgicos se han estudiado ampliamente en riñón y en el sistema vascular, los lechos vasculares analizados mediante diferentes protocolos son las arterias renales, coronarias, celiacas y vasos mesentéricos, en el presente trabajo se realizó el análisis de los receptores dopaminérgicos en la aorta torácica.

La curva concentración efecto de dopamina, muestra mayor contracción en los anillos de las ratas SD comparándolas con las ratas WK y SHR, entre las ratas WK y SHR no hay diferencia significativa, esto probablemente se debe a que las ratas WK suelen presentar presiones de ratas hipertensas, debido a los datos obtenidos las ratas SD serían un control adecuado para comparar el daño que

produce un incremento de la presión arterial, ya que esta cepa tiene valores de presión arterial normal.

Las curvas concentración respuesta a SKF 38393, en anillos de aorta de rata precontraídos con fenilefrina, mostraron la relajación mencionada para los agonistas dopaminérgicos  $D_1$ , este efecto ya había sido reportado en diferentes arterias con el fenoldopam, Zeng y cols. 2004 y 2007 demostraron este efecto en arterias mesentéricas, aunque hay varios reportes para el fenoldopam, no se ha estudiado a fondo el efecto del SKF 38393 un agonista más específico y que podríamos tomar en cuenta para el tratamiento de la presión arterial, el mecanismo mediante el cual produce la vasorrelajación es mediado por el incremento del AMPc en las células del músculo liso, el cual activa la fosforilación de proteínas y entre ellas a la cinasa de la cadena ligera de la miosina la cual es importante para realizar la fosforilación de la cadena ligera de la miosina, la inhibición de esta cinasa, produce la relajación de los anillos de aorta, el efecto relajante producido por el agonista  $D_1$  fue parcialmente bloqueado con el antagonista específico. Al observar el efecto producido en los tres grupos, se mostró que el SKF 38393 tiene un mayor efecto en las ratas hipertensas comparado con las ratas SD y WK, esto sugiere que las ratas hipertensas tienen una mayor expresión de los receptores dopaminérgicos  $D_1$ , lo cual sería de gran importancia, ya que este fármaco produciría disminución del incremento de la presión arterial que tienen las ratas hipertensas, y por lo tanto, se tendría un mejor control de esta variable.

El efecto del 7 OH-DPAT un agonista dopaminérgico  $D_3$ , en condiciones fisiológicas no es muy claro, ya que se han obtenido resultados diferentes a lo ya reportado por otros autores, aunque la arteria en estudio es diferente aún no nos explicamos el porqué de este efecto. La curva concentración respuesta a 7 OH-DPAT, con contracción previa de los anillos de aorta con fenilefrina, no mostró el efecto de vasorrelajación reportado por Zeng y cols., 2004, en anillos de vasos mesentéricos. Debido a que no se encontró efecto del 7 OH-DPAT con contracción previa de los anillos de aorta, se realizó la aplicación del 7 OH-DPAT

sin contracción previa y pudimos observar que el efecto del 7 OH-DPAT en aorta de rata es vasoconstrictor, el mecanismo mediante el cual podría estar produciendo este efecto sería dado por el receptor dopaminérgico  $D_3$  con la disminución de AMPc, y con ello permitir el acople del fosfato con las cabezas de miosina y así llevar a un incremento en la contracción de las células de músculo liso, otro posible mecanismo sería el acople del receptor  $D_3$  con la fofolipasa C (Gómez y Silva 2002. José y cols., 1998). Este efecto podría deberse a la diferencia del comportamiento de las arterias frente a cambios fisiológicos ya que dependiendo de la alteración en la homeostasis podríamos ver un cambio en algún nivel del los lechos vasculares esto para regresar al estado de homeostasis requerido por el organismo, este efecto ya lo han reportado algunos otros autores como es el caso del efecto de agonistas del recepto  $D_1$  que en la cola de la rata produce un efecto de contracción (Rashed y Songu 1995) mientras que en arterias renales y mesentéricas produce un efecto vasorelajante (Ventura y cols., 1984: Zeng y cols., 2004 y 2007), los estudios han mostrado que los receptores  $D_2$  tienen un efecto dilatador mediante la acción de los receptores presinapticos, pero un efecto vasoconstrictor en anillos en reposo con un tono vascular bajo (José y cols., 1998). El efecto del 7 OH-DPAT se pudo bloquear parcialmente con el antagonista específico de los receptores  $D_3$ , lo cual nos dice que el efecto mostrado es mediado por el recepto  $D_3$ . Al realizar el experimento en los 3 grupos pudimos observar que este fármaco tiene menor efecto en ratas (SHR) que en ratas WK y SD esto podría deberse a que las ratas hipertensas tendrían un efecto de regulación a la baja de los receptores que aumentan la constricción de la aorta para intentar disminuir el incremento de la presión arterial que presentan las ratas hipertensas, las ratas WK mostraron una mayor contracción que las ratas SD, esto nos podría estar diciendo que cuando las ratas inician con un incremento de la presión arterial hay un aumento en la densidad y/o sensibilidad de los receptores dopaminérgicos  $D_3$ .

Para corroborar que los efectos de los agonistas  $D_1$  y  $D_3$  en la aorta de la rata son producidos por la acción de los receptores dopaminérgicos, se realizo la

comprobación de la presencia de éstos mediante la técnica de Western blot, con la cual identificamos la presencia de los receptores dopaminérgicos  $D_1$  y  $D_3$  en la aorta de rata de las tres cepas estudiadas y se pudo observar que los receptores dopaminérgicos se encuentran expresados en cantidades diferentes, esto dependiendo de si la rata es SD, WK o SHR. Para el receptor  $D_3$  observamos una mayor expresión de esta proteína en las ratas WK posteriormente en ratas SD y las ratas SH mostraron la expresión más baja para este receptor. Estos resultados son concordantes con el efecto producido por el agonista dopaminérgico  $D_3$  en las aortas de las ratas. La expresión del receptor  $D_1$  en la aorta de la rata muestra un incremento en la expresión de estos en ratas hipertensas al ser comparados con las ratas WK y SD lo que es concordante con los estudios fisiológicos realizados para este receptor, el control utilizado para este protocolo fue la actina, la cual nos mostró lo ya reportado para esta proteína corroborando con esto que los protocolos realizados fueron correctos.

Los resultados de este estudio sugieren la presencia de receptores dopaminérgicos  $D_1$  y  $D_3$  en la aorta de las ratas de las cepas SD, WK y SH. En forma concordante con los reportes previos de la literatura el efecto de la activación del receptor  $D_1$  en aorta de rata induce una disminución del tono vascular efecto mediado por un mecanismo dependiente de endotelio y otro por un mecanismo directo sobre musculo liso sugiriendo la expresión de este receptor en el endotelio y en musculo liso de aorta. En relación al receptor  $D_3$  nuestros resultados son contradictorios en relación a lo reportado en la literatura, ya que se ha reportado también un efecto relacionado con la disminución del tono vascular y potenciado en presencia de agonistas  $D_1$ , mientras que nuestros resultados indican que tiene un efecto de aumento del tono vascular en aorta. Estos resultados contradictorios pueden ser explicados por los diferentes vasos usados en los estudios (en arterias mesentéricas). Adicionalmente y en forma relevante el efecto diferente observado con el uso de agonistas específicos de estos receptores en los aortas de los animales estudiados sugieren que existe una regulación de cada uno de estos receptores en las condiciones patológicas de

HAS espontánea. Específicamente para el receptor  $D_1$  parece haber una upregulation tratando de mantener reducido el tono vascular, mientras que para el  $D_3$  parece que hay un downregulation, con un efecto opuesto sobre el tono vascular y por lo tanto contribuyendo también a mantener los valores del tono vascular en condiciones cercanas a lo fisiológico. En caso de que nuestros resultados puedan ser verificados y repetidos por otros grupos de investigación en el área, la repercusión en el tratamiento farmacológico de la HAS primaria sería importante pues orientaría a que el uso de fármacos agonistas dopaminérgicos  $D_1$  y antagonistas dopaminérgicos  $D_3$  deberían ser una primera herramienta farmacológica en esta condición patológica.

## **CONCLUSIONES**

El agonista dopaminérgico  $D_1$  (SKF 38393) produce vasodilatación de la aorta, en ratas SD, WK y SHR. Este efecto es dependiente e independiente del endotelio, esto nos sugiere que el receptor  $D_1$  está presente en células de músculo liso. Pero también en ratas con endotelio ya que incrementa la relajación lo que nos sugiere que el efecto tiene una porción dependiente de endotelio.

El antagonista específico para el receptor  $D_1$  produjo un bloqueo parcial del efecto del agonista

El efecto producido por el SKF 38393 se ve incrementado en las ratas SH, comparado con las ratas WK y SD.

El agonista dopaminérgico  $D_3$  (7 OH-DPAT) induce un efecto contráctil en los anillos de aorta de rata SD, WK y SH, y este efecto es independiente del endotelio.

El antagonista específico para el receptor  $D_3$  produjo un bloqueo parcial del efecto del agonista en las 3 cepas estudiadas

El efecto vasoconstrictor producido por el 7 OH-DPAT, se ve disminuido en las ratas SH, e incrementada en las ratas WK con respecto a la SD.

Los resultados obtenidos para el western blot corroboras los protocolos farmacológicos realizados para el receptor D<sub>1</sub> y D<sub>3</sub>.

#### REFERENCIAS

1. ABADIE C, FOUCART S, PAGÉ P, NADEAU R. (1996). Modulation of noradrenaline release from isolated human atrial appendages, *J Autonom. Nervous System*. 61:269–276.
2. AKIYAMA-UCHIDA Y, ASHIZAWA N, OHTSURU A, SETO S, TSUKAZAKI T, KIKUCHI H, YAMASHITA S, KATSUSUKE YANO (2002). Norepinephrine enhances fibrosis mediated by TGF-beta in cardiac fibroblasts. *Hypertension* 40:148–154
3. AMENTA F (1997). Light microscope autoradiography of peripheral dopamine receptor subtypes. *Clin Exp Hypertens* 19:27-41
4. AMENTA F, RICCI A, ROSSODIVITA I, AVOLA R, TAYEBATI SK (2001). The dopaminergic system in hypertension. *Clin Exp Hypertens* 23: 15-24
5. ANDERSEN PH, GINGRICH JA, BATES MD, DEARRY A, FALARDEAU P, SENOGLES SE, CARON MG (1990). *Dopamine receptor subtypes: beyond the D1/D2 classification*. *TIPS*. 11:231-236.
6. ASICO LD, LADINES C, FUSHS S, ACCILI D, CAREY RM, SEMERARO C, POCCHIARI F, FELDER RA, EISNER GM, JOSE PA (1998). Disruption of the dopamine D3 receptor gene produces renin-dependent hypertension[J]. *J Clin Invest*, 102:493-498.
7. BADYAL, DK, LATA H, DADHICH, AP (2003). *Animal models of hypertension and effect of drugs*. *Indian Journal of Pharmacology* 35: 349-362

8. BRODDE OE. (1982). Vascular dopamine receptors: demonstration and Characterization by in vitro studies. *Life Sci.* 26;31(4):289-306.
9. BUNZOW JR, VAN TOL HH, GRANDY DK, ALBERT P, SALON J, CHRISTIE M, MACHIDA CA, NEVE KA, CIVELLI O (1988). Cloning and expression of rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature*; 336: 783-7
10. CHOBANIAN AV, BAKRIS GL, BLACK HR et al (2003). The National High Blood Education Program Committee. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension* . 20:1788-1802
11. CIVELLI O, BUNZOW RJ, GRANDY KD (1993). Molecular diversity of dopamine receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:281-307
12. CORNISH JL, VAN DEN BUUSE M (1994). Pressor responses to electrical and chemical stimulation of the rat brain. A10. dopaminergic system. *Neurosci Lett* 76:142-146
13. CRAGG SJ, BAUFRETON J, XUE Y, BOLAM JP, AND BEVAN MD (2004). "Synaptic release of dopamine in the subthalamic nucleus". *European Journal of Neuroscience* 20 (7): 1788–1802.
14. EBLE J.N. (1964) A proposed Mechanism for the depressor effect of dopamine in the anesthetized dog. *J Pharmacol Exp Ther.* Jul; 145:64-70
15. FILLENZ M (1990). *Noradrenergic Neurons*. Cambridge University Press. 6-48.
16. FLORES G, BARBEAU D, et al. (1996a). Decreased expression of dopamine D3 receptors in limbic subregions following neonatal bilateral lesion of rat hippocampus. *J Neurosci* 16;2020-2026.
17. FLORES G, WOOD G, LIANG J, QUIRION R, AND SRIVASTAVA LK (1996b). Enhanced amphetamine sensitivity and increased expression of dopamine D2 receptor in postpubertal rats after neonatal excitotoxic lesions of the medial prefrontal cortex. *J. Neurosci.* 16 7366-7375.

18. FRANCIS S (1995). Receptor systems involved in norepinephrine release in Heart failure: focus on dopaminergic systems. *Clin. Cardiol.* 18:1-13-1-16.
  
19. GELLAI M, DEWOLF R , RUFFOLO R (1990). Effect of dopamine beta-hydroxylase inhibition on systemic hemodynamics in conscious, spontaneously hypertensive rats *Pharmacology* 41:82-90.
  
20. GOLDBERG L.I. MCDONALD R.J., ZIMMERMAN A. (1963) Sodium diuresis produced by dopamine in patients with congestive heart failure. *N Engl Med.* Nov 14;269:10604
  
21. GOLDBERG L.I. (1972) Cardiovascular and renal actions of dopamine: Potential clinical applications. *Pharmacological reviews*, 24:1-29
  
22. GOLDBERG IL, PAUL HV, AND KOHLR DJ (1978). A comparison of the vascular dopamine receptor with other dopaminergic receptors. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 18:57-79.
  
23. GOLDBERG IL, AND KOHLR DJ (1983). Peripheral dopamine receptors: a classification based on potency series and specific antagonism. *TIPS*, 64-66.
  
24. GOLDBERG L.I., AND RALFER S.I. (1985) dopamine receptors: applications in clinical cardiology. *Circulation* 72: 245-24
  
25. GOLDSTEIN DS, HOLMES CS, DENDI R, BRUCE SR, LI ST (2002). Orthostatic hypotension from sympathetic denervation in Parkinson's disease. *Neurology* 58(8):1247-1255.
  
26. GOMEZ P. AND SILVA P.S. (2002). Role of camp-PKA-PLC signaling cascade on dopamine-induced PKC-mediated inhibition of renal Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity. *Am J Physiol Renal Physiol* 282: F1084–F1096.
  
27. HABUCHI Y, LING-LING L, KOMORI T, OKAMOTO S, NISHIMURA M, MORIKAWA J AND YOSHIMURA M. (1995). Does dopamine act on myocardial cells? *Hypertens Res.* 18:s157-S159.

28. HAHN R.A. WARDELL JR. JR., (1980) Antagonismo of the renal vasodilatador activity of dopamine by metoclopramide. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* Nov; 314 (2):177-182
  
29. HORWITZ D., GOLDBERG L.I., SJOERDSMA A.,( 1960) increased blood pressure response to dopamine and norepinephrine produced by monoamine Oxidase inhibitors in man. *J Lab Clin Med.* Nov; 56:747-753
  
30. HUSSAIN T., MUSTAFA F., LOKHANDWALA., (1998) Renal dopamine Receptor Funtion in hypertension. *Hypertension* 32:1987-1997
  
31. JACKSO M, AND WESTLIND-DANIELSSON A (1994). Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspect. *Pharmacol. Ther.* 64: 291–369.
  
32. JEROME F., AND O'HARA, (2000) Low-dose "renal" dopamine, anesthesiology. *Clinics of North America*; 18:835-847
  
33. JOSE PA, EISNER GM, FELDER RA. (1999). Role of dopamine in the pathogenesis of hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl*: 26:S10-3 Review
  
34. JOSE PA, EISNER GM, FELDER RA (1998). Renal dopamine receptors in health and hypertension. *Pharmacol Ther.* 80:149-182.
  
35. JOSE PA, EISNER GM, DRAGO J, CAREY RM, FELDER RA (1996). Dopamine receptor signaling defects in spontaneous hypertension. *Am J Hypertens* 9;4 Pt 1:400-405.
  
36. KEBABIAN JW, AND CALNE DB (1979). Multiple receptors for do-. pamine. *Nature*, 277: 93–96.
  
37. KOPIA GA, VALOCIK RE (1989). *Demonstration of specific dopamine-1* receptor-mediated coronary vasodilation in the anesthetized dog. *J Pharmac. Exp. Ther.* 248:215-221.
  
38. KURTZ TW, CASTRO R, SIMONET L, PRINTZ MP (1990). Biometric genetic. analysis of blood pressure in the spontaneously hypertensive. rat. *Hypertension* 16:718-724.

39. LAAKSO A, BERGMAN J, HAAPARANTA M, VILKMAN H, SOLIN O, AND HIETALA J (1998). [18F]β-CFT ([18F]WIN 35428), a radioligand to study the dopamine transporter with PET: characterization in human subjects. *Synapse*, 28(3):244-250.
40. LOKHANDWALA MF, JANDHYALA BS (1979). The role of sympathetic nervous system in the vascular actions of dopamine. *J Pharmacol Exp Ther*. 210:120-126
41. LOKHANDWALA M.F., BARRETT R.J., (1982) cardiovascular dopamine receptors : physiological, pharmacological and therapeutic implications. *J Auton Pharmacol*. Sep;2(3):189-215
42. LOKHANDWALA MF, WATKINS HO, SABOUNI MH, ALKADHI KA (1985). *Pharmacological analysis of the actions of SKF 82526 on cardiovascular dopamine receptors*. *J. Pharmac. Exp. Ther*. 234:337-344.
43. MCDONALD R.H.,JR. GOLDBERG J.L. MCNAY, E.P. (1964) Tuttle effects of dopamine in man: augmentation of sodium excretion, glomerular filtration rate, and renal plasma flow. *J Clin Invest*. 1964; 43(6):1116–1124
44. MCNAY J.L., MCDONALD R.H., JR. AND GOLDBERG J.I. (1965) Direct renal vasodilatation produced by dopamine in the dog. *Circulation Research*, 16:510-517
45. MISSALE C, NASH SR, ROBINSON SW, JABER M, CARON MG (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78:. 189-225.
46. OHLSTEIN EH, KRUSE LI, EZEKIEL M, SHERMAN SS, ERICKSON R, DEWOLF WE JR, BERKOWITZ BA (1987). Cardiovascular effects of a new potent dopamine β-hydroxylase inhibitor in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 241:554-559
47. OHLSTEIN E.H, KRUSE LI, EZEKIEL M, WILLETTERN, FURTHER (1988). characterization of the cardiovascular effects of the dopamine beta-hydroxylase inhibitor SKF 102698 in conscious hipertensive rats. *J. Pharmacol Exp Ther*. 247:189-195
48. OKAMOTO K, AOKI K (1973). Establishment of stroke prone spontaneously hipertensiverats (SHR). *Cir Rese*:34:145-153.

49. OPARIL S., AMIN M.Z., AND CALHOUN D.A., (2003) Pathogenesis of Hypertension. *Ann Intern Med.* Nov 4;139(9):761-76. Review
50. PAGE G, CHALON S, BARRIER L, PIRIOU A, HUGUET F (1998). *Characterization of both dopamine uptake systems in rat striatal slices by specific pharmacological tools.* *Neurochem Int*, 33(5):459-66.
51. REA RF, BIAGGIONI I, ROBERTSON RM, HAILE V, ROBERTSON D (1990). Reflex control of sympathetic nerve activity in dopamine beta-hydroxylase deficiency, *Hypertension*. 15:107-112.
52. ROBERTSON D, HAILE V, PERRY SE, ROBERTSON RM, PHILLIPS JA, BIAGGIONI I (1991). *Dopamine beta-hydroxylase deficiency. A genetic disorder of cardiovascular regulation.* *Hypertension* 18:1-8
53. RUMP CL, KNORRENSHILD RG, SCHWERTFEGER E, BOHMANN C, SPILLNER G, AND SCHOLLMEYER P (1995). Dopaminergic and  $\alpha$ -adrenergic control of neurotransmission in human right atrium. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 26(3):462-470.
54. SEGAWA T, ITO H, INOUE K, WADA H, MINATOGUCHI S, FUJIWARA H (1998). Dopamine releases endothelium-derived relaxing factor via alpha 2-adrenoceptors in canine vessels: comparisons between femoral arteries and veins. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1998 Sep;25(9):669-75
55. STANLEY WC, LI B, BONHAUS DW, JOHNSON LG, LEE K, PORTER S, WALKER K, MARTINEZ G, EGLER RM, WHITING RL, HEGDE SS (1997). Catecholamine modulatory effects of nopicastat (RS-25560-197), a novel potent and selective inhibitor of dopamine- beta-hydroxylase. *Br J Pharmacol* 1997;121:1803-1809.
56. STRANGE P.G., (2002) Dopamine receptors. School of animal and microbial sciences, University of Reading Whiteknights, *Toctris Review* 1-6
57. TAYLOR AA, SHEPHERD AM, POLVINO W, MANGOO-KARIM R, BALLARD K, SUNTHORNYOTHIN S, LUTHER RR, POOL JL (1999). Prolonged fenoldopam infusions in patients with mild to moderate hypertension: pharmacodynamic and pharmacokinetic effects. *Am J Hypert* 12:906-914

58. TUMLIN JA, DUNBAR LM, OPARIL S, BUCKALEW V, RAM CV, MATHUR V, ELLIS D, MCGUIRE D, FELLMANN J, LUTHER RR (2000). Fenoldopam, a dopamine agonist, for hypertensive emergency: a multicenter, randomized trial. Fenoldopam Study Group. *Acad Emerg med* 7(6):653-662.
59. VAN DEN BUUSE M (1998). Role of the mesolimbic dopamine system in cardiovascular homeostasis. Stimulation of the ventral tegmental area modulates the effect of vasopressin on blood pressure in conscious rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 25:661-668.
60. YEH B.K., MCNAY J.L., AND GOLDBERG L.I. (1969) Attenuation of dopamine renal and mesenteric vasodilation by haloperidol: evidence for a specific dopamine receptor
61. Zeng C, Wang D, Asico LD, Welch WJ, Wilcox CS, Hopfer U, Eisner GM, Felder RA, Jose PA., (2004) Aberrant D1 and D3 dopamine receptor transregulation in hypertension. *Hypertension*. Mar;43(3):654-60.
62. Zeng C, Armando I, Luo Y, Eisner GM, Felder RA, Jose PA. (2007) Dysregulation of dopamine-dependent mechanisms as a determinant of hypertension: studies in dopamine receptor knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Feb;294(2):H551-69.
63. Zeng C, Luo Y, Asico LD, Hopfer U, Eisner GM, Felder RA, Jose PA. (2003) Perturbation of D1 dopamine and AT1 receptor interaction in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. Oct;42(4):787-92.
64. Zeng C, Wang Z, Li H, Yu P, Zheng S, Wu L, Asico LD, Hopfer U, Eisner GM, Felder RA, Jose PA. (2006) D3 dopamine receptor directly interacts with D1 dopamine receptor in immortalized renal proximal tubule cells. *Hypertension*. Mar;47(3):573-9.
65. Zeng C, Wang D, Yang Z, Wang Z, Asico LD, Wilcox CS, Eisner GM, Welch WJ, Felder RA, Jose PA. (2004) Dopamine D1 receptor augmentation of D3 receptor action in rat aortic or mesenteric vascular smooth muscles. *Hypertension*. Mar;43(3):673-9.
66. Zeng C, Sanada H, Watanabe H, Eisner GM, Felder RA, Jose PA. (2004) Functional genomics of the dopaminergic system in hypertension. *Physiol Genomics*. Nov 17;19(3):233-46.
67. Zeng C, Yang Z, Wang Z, Jones J, Wang X, Altea J, Mangrum AJ, Hopfer U, Sibley DR, Eisner GM, Felder RA, Jose PA. (2005) Interaction of angiotensin II type 1 and D5 dopamine receptors in renal proximal tubule cells. *Hypertension*. Apr;45(4):804-10.

68. Zeng C, Zhang M, Asico LD, Eisner GM, Jose PA. (2007) The dopaminergic system in hypertension. *Clin Sci (Lond)*. Jun;112(12):583-97.
69. Li Z, Yu C, Han Y, Ren H, Shi W, Fu C, He D, Huang L, Yang C, Wang X, Zhou L, Asico LD, Zeng C, Jose PA. Inhibitory effect of D1-like and D3 dopamine receptors on norepinephrine-induced proliferation in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Jun;294(6):H2761-8.