



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

Departamento de Biomedicina molecular

**CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO MOLECULAR
RESPONSABLE DE LA PÉRDIDA DEL EFECTO
VASODILATADOR BETA ADRENÉRGICO EN EL MUSCULO
LISO DURANTE LA MADURACIÓN DE LA RATA.**

Tesis que presenta

Oscar Alberto López Canales

Para obtener el Grado de

Doctor en Ciencias

en la Especialidad de

Biomedicina Molecular

Directores de la tesis:

Dr. Bruno Alfonso Escalante Acosta

Dra. María del Carmen Castillo Hernández

ASESORES

Dr. Gustavo Guevara Balcázar

Dra. María Teresa Estrada García

Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda

Dr. Vianney Ortiz Navarrete

Esta tesis fue realizada en el departamento de biomedicina molecular del centro de investigación y de estudios avanzados (CINVESTAV) del instituto politécnico nacional y el departamento de posgrado e investigación de la escuela superior de medicina (ESM) del instituto politécnico nacional, bajo la tutoría del Dr. Bruno A. Escalante Acosta y de la Dra. María del Carmen Castillo Hernández.

Para la realización de los estudios de doctorado durante el periodo comprendido de Septiembre de 20011 a Agosto de 2015, se obtuvo la beca otorgada por el concejo nacional de ciencia y tecnología (CONACyT) con el número de registro 233374, institución a la cual agradezco el apoyo brindado.

Este trabajo se realizó bajo la asesoría del Dr. Bruno Escalante Acosta y de la Dra. Carmen Castillo Hernández, a quienes agradezco sus consejos, apoyo, confianza y las enseñanzas que me han brindado a lo largo de estos años.

A toda mi familia en general les agradezco el amor y el apoyo que me han brindado, y sobre todo:

Gracias a mi pequeña gran familia (mi hermosa Uvita, me encantador Manguito y mi bella Piñita)

ÍNDICE

RELACIÓN DE TABLAS Y FIGURAS	I
LISTA DE ABREVIATURAS	III
RESUMEN	V
ABSTRAC	VI
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	4
<i>Receptores adrenérgicos</i>	4
<i>Subfamilias de receptores adrenérgicos</i>	5
<i>Receptores beta adrenérgicos</i>	6
<i>Estructura de la aorta</i>	7
<i>Disfunción endotelial</i>	8
<i>Agonistas del músculo liso</i>	11
<i>Sistema de transducción de señal de los receptores beta adrenérgicos</i> ...	12
<i>Vía de señalización de los βAR en el músculo liso</i>	14
<i>Subtipos de adenilato ciclasa</i>	15
<i>Efecto del AMPc en las células de músculo liso vascular</i>	17
<i>Vía de señalización de la relajación dependiente de βAR en el músculo liso</i>	19
ANTECEDENTES DIRECTOS	20
<i>Efecto de la edad sobre la actividad vascular de los βAR</i>	20
<i>Agonista fisiológico detonante de la disminución en la respuesta relajante a los βAR</i>	26
JUSTIFICACIÓN	34
HIPÓTESIS	35
OBJETIVO GENERAL	36
OBJETIVOS PARTICULARES	37
METODOLOGÍA	38
<i>Estudios funcionales</i>	38
<i>Preparación de los anillos aórticos</i>	38
<i>Fármacos utilizados</i>	39
<i>Análisis estadístico de los resultados</i>	40
<i>Estudios moleculares</i>	41
<i>Extracción de proteínas para análisis de western-blot</i>	41
<i>Cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford</i>	42
<i>Electroforesis SDS-PAGE</i>	42
<i>Inmunotransferencia</i>	43
<i>Cuantificación de AMPc por enzimoimmunoensayo (EIA)</i>	44

<i>Extracción de ARN para análisis de expresión a nivel de mensajero.</i>	45
<i>RT-PCR para obtención de cDNA</i>	45
<i>qPCR para la cuantificación de los niveles de ARNm</i>	46
<i>Obtención del cultivo celular primario de células de músculo liso</i>	47
<i>Inmunohistoquímica</i>	48
<i>Identificación del agonista fisiológico responsable de los cambios</i> ...	48
<i>Orquiectomía bilateral</i>	49
<i>Reemplazo de testosterona</i>	49
<i>Protocolo experimental</i>	50
RESULTADOS	59
<i>Influencia de la maduración de la rata sobre la actividad de los receptores beta adrenérgicos en el músculo liso</i>	53
<i>Especificidad en la pérdida de función βAR</i>	54
<i>Cuantificación de los βAR a nivel de proteína</i>	55
<i>Participación funcional de cada subtipo beta adrenérgico</i>	57
<i>Prueba de funcionalidad de los βAR2 por fosforilación</i>	58
<i>Participación diferencial del AMPc en las diferentes edades</i>	60
<i>Cuantificación de AMPc durante la maduración de la rata</i>	62
<i>Producción de AMPc en respuesta a un agonista exógeno</i>	63
<i>Cuantificación del ARNm de los subtipos de adenilato ciclasa</i>	64
<i>Cuantificación del ARNm de las proteínas reguladoras del calcio</i>	65
<i>Obtención de cultivo primario de células de músculo liso</i>	67
<i>Identificación del agonista fisiológico responsable de detonar los cambios</i>	69
<i>Expresión de los subtipo de βAR en animales orquiectomizados</i>	69
<i>Ensayo in vitro de la función relajante en animales orquiectomizados</i>	70
<i>Participación de la vía del AMPc en las ratas orquiectomizadas</i>	73
<i>Cuantificación del AMPc en las ratas orquiectomizadas</i>	74
<i>Expresión de los subtipos de adenilato ciclasa en ratas orquiectomizadas</i>	75
<i>Expresión de las proteínas reguladoras del calcio en ratas orquiectomizadas</i>	77
<i>Identificación de secuencias consenso para secuencia are</i>	78
DISCUSIÓN	80
CONCLUSIONES	95
PERSPECTIVAS	96
REFERENCIAS	97

RELACIÓN DE TABLAS Y FIGURAS

Titulo	Página
Tabla 1. Lesiones en algunos órganos de la rata que están directamente relacionadas con la maduración y envejecimiento de la rata	2
Imagen 1. Clasificación de los receptores adrenérgicos	5
Tabla 2. Predominio y función de los subtipos de receptores beta adrenérgicos en diversos órganos y tejidos del organismo	7
Imagen 2. Funciones importantes del endotelio vascular.....	9
Imagen 3. Registro representativo obtenido con el programa ACQKnowledge®	10
Figura 1. Inmunohistoquímica donde se muestra la expresión y localización de los β AR	12
Imagen 4. Representación esquemática de la vía de señalización inicial de los receptores beta adrenérgicos	14
Imagen 5. Estructura general de las nueve isoformas de adenilato ciclasa .	16
Imagen 6. Mecanismos involucrados en la disminución del calcio citoplasmático mediados por la PKA y PKG	19
Figura 2. Efecto de la edad en la relajación mediada por los β AR	21
Figura 3. Niveles de ARNm de los receptores adrenérgicos y de una cinasa de GPCR	22
Figura 4. Valores de AMPc producido por los cultivos celulares provenientes de diferentes grupos de edad	23
Tabla 3. Valores de densidad de receptores y cuantificación de AMPc por medio de inmunoensayos	23
Figura 5. Efecto de la edad sobre la relajación inducida por el isoproterenol en anillos de aorta	25
Imagen 7. Patrón de exposición a la testosterona durante la vida del macho	27
Figura 6. Valores obtenido de la presión arterial, a 3 años antes, durante y 3 años después de la pubertad	28
Imagen 8. Mecanismos genómico y no genómicos de los andrógenos	30
Figura 7. Efecto de la estimulación de los receptores adrenérgicos sobre el flujo de calcio citoplasmático	31
Figura 8. Efectos de los agonistas adrenérgicos en la actividad del canal RyR, el NCX y el fosfolamban	32
Tabla 4. Soluciones para preparar Tris-Glicina-PAGE en geles de 1.5 mm de espesor	43

Tabla 5. Secuencia de los iniciadores utilizados para la cuantificación de ARNm	46
Figura 9. Curva concentración respuesta a isoproterenol en anillos de aorta torácica sin endotelio	54
Figura 10. Curva concentración respuesta a nitroprusiato sódico en anillos de aorta torácica sin endotelio	55
Figura 11. Niveles de expresión relativa de cada subtipo beta adrenérgico en la aorta de la rata en los diferentes grupos de edad	56
Figura 12. Efecto de diferentes antagonistas beta adrenérgicos sobre la relajación inducida por isoproterenol	58
Figura 13. Niveles de expresión relativa del subtipo β_2 adrenérgico fosforilado en sus residuos 355 y 356	59
Figura 14. Efecto del SQ 22536 sobre la relajación inducida por isoproterenol en anillos de aorta torácica sin endotelio	60
Figura 15. Efecto del H-89 sobre la relajación inducida por isoproterenol en anillos de aorta torácica sin endotelio	61
Figura 16. Cuantificación de AMPc en tejido de aorta de rata tratado con isoproterenol	62
Figura 17. Curva concentración respuesta a forskolina en anillos de aorta torácica sin endotelio	63
Figura 18. Análisis comparativo de la abundancia de transcrito de las isoformas AC3, AC5 y AC6	65
Figura 19. Análisis comparativo de la abundancia de transcrito de las proteínas reguladoras del calcio citoplasmático NCX, SERCA y RyR3	67
Figura 20. Cultivos primarios de células de músculo liso obtenidos por clonas en las diferentes edades	68
Figura 21. Influencia de la testosterona en los niveles de expresión relativa de cada subtipo β AR	70
Figura 22. Efecto de la orquiectomía sobre la relajación inducida por isoproterenol	71
Figura 23. Efecto de la testosterona sobre la relajación inducida por isoproterenol	72
Figura 24. Efecto del SQ 22536 sobre la relajación inducida por isoproterenol en anillos de aorta provenientes de ratas orquiectomizadas ..	73
Figura 25. Cuantificación de AMPc en tejido de aorta de rata orquiectomizada tratado con isoproterenol	74
Figura 26. Análisis comparativo de la abundancia de transcrito de las isoformas AC3, AC5 y AC6	76
Figura 27. Análisis comparativo de la abundancia de transcrito de las proteínas reguladoras del calcio citoplasmático	77
Tabla 6. Identificación <i>in silico</i> de secuencia ARE en los diferentes genes de interés	79

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Adenilato ciclasa
Ach	Acetilcolina
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
ATP	Adenosin trifosfato
CaM	Calmodulina
CaMK	Cinasa de calcio calmodulina
CE ₅₀	Concentración efectiva 50
CREB	Elemento de unión en respuesta a AMPc
EDHF	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
EEM	Error estándar de la media
Egr-1	Factor de transcripción de respuesta temprana de crecimiento 1
E _{max}	Efecto máximo
Fen	Fenilefrina
GPCR	Receptores acoplados a proteína G
GRE	Elemento de respuesta a glucocorticoides
GRK	Cinasa de receptores acoplados a proteínas G
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GTP	Guanosina trifosfato
IP3	Inositol trifosfato
IP3R	Receptor de inositol trifofato
ISO	Isoproterenol
KCl	Cloruro de potasio

L-name	Clorhidrato de N ω -Nitro-L-arginina metil éster
LTCC	Canales de calcio tipo L
MAGI-3	Guanilato ciclasa invertida asociada a membrana 3
MaxiK	Canales de potasio activados por calcio
NF- κ B	Factor nuclear κ B
HERF1	Factor regulador del intercambiador de Na $^{+}$ /H $^{+}$ 1
NO	Oxido nítrico
NOS1	Oxido nítrico sintasa neuronal
NOS2	Oxido nítrico sintasa inducible
NOS3	Oxido nítrico sintasa endotelial
PGE2	Prostaglandina E2
PI3K	Fosfoinositol 3 cinasa
PKA	Protein cinasa dependiente de AMPc
PKG	Protein cinasa dependiente de GMPc
PLC	Fosfolipasa C
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SERCA	ATPasa de Ca $^{2+}$ del retículo endoplásmico
TEA	Tetraetilamonio
TIAR	Proteína relacionada con el antígeno intracelular de células T
VOCC	Canales de Ca $^{2+}$ dependientes de voltaje
β AR	Receptor beta adrenérgico

RESUMEN

Durante el desarrollo normal del organismo se presentan una gran cantidad de cambios, los cuales pueden estar asociados a cambios hormonales. En este trabajo se aborda de manera específica a los receptores beta adrenérgico, ya que se ha reportado que conforme la rata aumenta de edad su función se va perdiendo, sin que se haya esclarecido fehacientemente el mecanismo molecular. El abordaje experimental se realizó mediante ensayos *in vitro* y estudios moleculares con tejido proveniente de ratas de 3 y 9 semanas de edad, además de ratas orquiectomizadas con y sin reemplazo de testosterona. Los resultados indican que a las 9 semanas el músculo liso pierde su capacidad de relajar en respuesta a los β AR, lo que se relaciona con la incapacidad de producir AMPc y con la regulación de la expresión de los subtipos de adenilato ciclasa ya que las isoformas AC5 y AC6 se sobreexpresan en la etapa adulta coincidiendo con el aumento de la expresión de la proteína RyR, estos cambios se encuentran relacionados con la presencia de testosterona ya que el grupo de orquiectomizados no presenta ninguno de los cambios observados y si los presenta el grupo de orquiectomizados con terapia de reemplazo de testosterona, por último se logro estandarizar un cultivo primario de células músculo liso. En conclusión la perdida de la función de los β AR se debe a un cambio en los patrones de expresión de las isoformas de ACs y de las proteínas reguladoras del flujo de calcio, pasando de un fenotipo excitatorio a uno inhibitorio controlado por el aumento de calcio citoplasmático, todo esto orquestado por el aumento en la cantidad de testosterona que se presenta durante la maduración de la rata.

ABSTRAC

During normal development of the organism a lot of changes occur, which may be associated with hormonal changes. This thesis is addresses specifically the beta adrenergic receptors, since it has been reported that increases age the vascular function is lost, without having clarified the molecular mechanism reliably. The experimental approach was used by in vitro assays, and molecular studies of tissue from rats 3 and 9 weeks of age plus orchiectomized rats with or without testosterone replacement. The results show that at 9 weeks the smooth muscle loses its ability to relax in response to β AR, which is related to the inability to produce cAMP and differentially regulate the expression of adenylyl cyclase subtypes since isoforms AC5 and AC6 are overexpressed in adulthood coinciding with the increased expression of the RyR protein, these changes are related to the presence of testosterone because orchiectomy group has none of the changes observed and the orchiectomy group with testosterone replacement therapy does present the changes, it was possible to standardize a primary culture of smooth muscle cell retaining phenotype cAMP loss. In conclusion The loss of vascular function of β AR is due to a change in the expression patterns of the isoforms of ACs and regulatory proteins of calcium flux, moving from one excitatory to inhibitory phenotype controlled by the likely increase in cytoplasmic calcium, all orchestrated by the increase in the amount of testosterone that occurs during maturation of the rat.

INTRODUCCIÓN

Durante el desarrollo biológico de cualquier organismo se sufren una gran cantidad de cambios como consecuencia natural del proceso de maduración y envejecimiento, estos cambios están influenciados por la etapa de desarrollo en la que se encuentre el organismo, en la rata es posible distinguir las etapas de: lactancia, pubertad, adultez y vejez, estas etapas se distinguen entre sí principalmente por características físicas como el peso corporal, el comportamiento y la función sexual (Bisset, 1999; Regalado, 2006).

El periodo de lactancia es aquel en el que la rata es aún amamantada por su madre, periodo que va desde el primer día de nacimiento hasta los 21 días de desarrollo y el peso al final del periodo oscila entre los 30 y los 40 gramos aproximadamente (Baker, 1979; Harlan laboratories). Un aspecto importante para distinguir el final de esta etapa es el inicio del juego entre las ratas pequeñas el cual va en aumento hasta llegar a un máximo que se da en la pubertad (Regalado, 2006). El periodo de pubertad es aquel en donde se da el desarrollo completo de los caracteres sexuales, presentándose cambios importantes tanto en el macho como en la hembra, así por ejemplo, en la hembra el orificio vaginal se abre y comienzan los ciclos estrales (Eckstein, 1973), mientras que en el macho los testículos descienden y comienza la producción de liquido seminal en pequeñas cantidades (Baker, 1979), el final de esta etapa se da cuando la rata adquiere la capacidad reproductiva completa. Este periodo está comprendido entre el día 21 y el día 60 aproximadamente, el peso de los animales varía desde los 40 gramos al inicio de la

pubertad, hasta los 220-260 gramos en machos y 170-200 gramos en hembras al final de esta etapa (Baker, 1979). La etapa adulta está comprendida entre los 60 y los 450 días de desarrollo y es el periodo en el cual la rata es capaz de reproducirse con cada ciclo estral, el cual dura 102 horas (Bake, 1979). El peso en esta etapa varía de los 250 gramos en el macho y 200 gramos en la hembra, hasta llegar a los 500 gramos aproximadamente. Finalmente, la etapa de vejez empieza a partir de los 450 días hasta la muerte de la rata y está marcada en la ratas hembra por la ausencia de los ciclos estrales (Baker, 1979). El peso puede llegar a alcanzar hasta los 700 gramos.

Durante estas etapas es posible distinguir dos tipos de cambios importantes los cambios degenerativos y los adaptativos (Schutzer, 2003), siendo los primeros los más evidentes y fáciles de detectar (Tabla 1).

Tabla 1. Lesiones en algunos órganos de la rata que están directamente relacionadas con la maduración y envejecimiento de la rata.

Órgano	Lesiones asociadas a cambios degenerativos en la rata
Corazón	Trombosis, fibrosis.
Riñón	Daño renal crónico, glomeruloesclerosis.
Sistema genital	Edema intersticial, degeneración del túbulo seminífero.
Vasos sanguíneos	Periarteritis nodosa, engrosamiento.
Aorta	Degeneración basofílica, acumulación de mucopolisacárido, arteriosclerosis, necrosis, calcificación, metaplasia cartilaginosa y ósea.

Los cambios degenerativos suelen asociarse al envejecimiento del organismo como consecuencia de trastornos glandulares (Samaras, 2014), procesos genéticos (Kitano 2014) o del desgaste de órganos y tejidos principalmente en mitocondrias por radicales libres (Correia-Melo, 2015); Por otro lado, los cambios adaptativos, suelen presentarse durante la maduración del organismo cuando este se está desarrollando y tiene que adaptarse a nuevos requerimientos fisiológicos, dentro de estos cambios destacan los relacionados con el tamaño del organismo y el desarrollo de órganos necesarios para la reproducción, siendo el eje rector de estos cambios la gran movilización hormonal que se presenta durante la pubertad, existen ejemplos evidentes de estos cambios adaptativos como son el aumento de tamaño de todos los órganos y la aparición de caracteres sexuales secundarios (Bake, 1979) pero existen otros más sutiles como el aumento en la presión arterial (Shankar, 2005), cambios en el comportamiento (Blaustein, 2015) y cambios en la cantidad de hormonas circulantes en el plasma (Dwyer, 2015).

En lo que respecta al sistema cardiovascular se han descrito gran cantidad de cambios directamente relacionados con la edad, unos de ellos degenerativos como el aumento en la apoptosis de los cardiomiocitos (Lie, 1988), pérdida de células marcapasos (Cheitlin, 2003), rigidez de los vasos sanguíneos (O'Leary, 1999) y disfunción endotelial (Wei, 1992) entre otros; y cambios adaptativos como el incremento en el diámetro de las arterias, aumento de tamaño de los cardiomiocitos y el incremento en la resistencia vascular periférica (Lakatta, 2003).

En el caso particular de los vasos sanguíneos, la regulación del tono de los mismos está bajo el control de varios sistemas homeostáticos dentro de los cuales destaca el sistema nervioso simpático. La forma en que éste opera se modifica con la edad y guarda una estrecha relación con el ambiente hormonal del animal (Tsuji moto, 1987; Paul, 2007). Ejemplo destacado de esta modificación y en la que pondremos especial interés, ya que es el tema central de este trabajo, es la disminución en la respuesta al estímulo de los receptores beta adrenérgico (β AR) ya que se ha reportado ampliamente que conforme la rata aumenta de edad la capacidad de relajar los vasos sanguíneos en respuestas a estos receptores se va perdiendo llegando a desaparecer completamente en las ratas más viejas (Tsuji moto, 1986; Emel, 2007; Hakan, 1995). Antes de adentrarnos en los antecedentes directos es necesario entender que son y cómo funcionan los β AR que pertenecen a un gran grupo de receptores denominados receptores adrenérgicos.

ANTECEDENTES

RECEPTORES ADRENÉRGICOS

La función del sistema simpático no sería posible sin la participación de moléculas capaces de reconocer los estímulos del medio ambiente, estas moléculas son los receptores adrenérgicos los cuales se clasifican como glicoproteínas que siempre se encuentran localizadas en la membrana de las células (Hoffman, 1996) y que responden a los agonistas adrenérgicos fisiológicos noradrenalina y adrenalina formando parte de la gran familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) las

cuales enlazan guanosina trifosfato (GTP), quedando de esta forma activadas (Limbird, 2004).

SUBFAMILIAS DE RECEPTORES ADRENÉRGICOS

Los receptores adrenérgicos están clasificados dentro de dos grandes familias o tipos, que son los receptores alfa adrenérgico (α AR) y los receptores beta adrenérgicos (β AR). Cada tipo de receptor adrenérgico se subdivide, a su vez, en al menos 2 subtipos. Así, los receptores α se subdividen en α_1 y α_2 y los β AR se subdividen en β_1 , β_2 y β_3 ; por último existe una subdivisión de los subtipos α AR dividiendo los α_1 en α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} , mientras que los α_2 se dividen α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} y α_{2D} (Woodcock, 2004; Imagen 1).

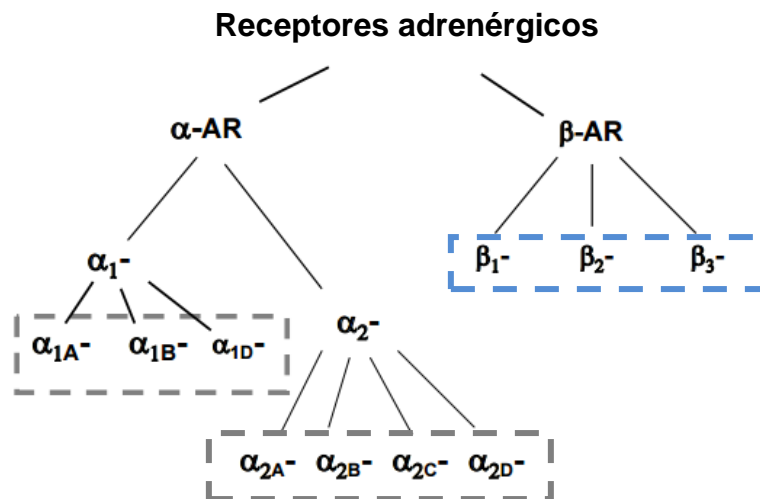


Imagen 1. Clasificación de los receptores adrenérgicos, se remarca en color azul los receptores beta adrenérgicos, tema de estudio de este trabajo (Tomado y modificado de Woodcock 2004).

RECEPTORES BETA ADRENÉRGICOS

Los GPCR comparten la característica estructural de tener 7 regiones transmembranales, lo que permite la formación de tres horquilla o “loops” extracelulares y tres intracelulares, estas horquillas son importantes porque es donde se encuentran sus sitios de regulación, por ejemplo, en la tercer horquilla extracelular se presenta el sitio de unión al ligando y en la tercer horquilla intracelular se encuentra el sitio de unión a la proteína G, la cual puede ser de diferentes tipos dependiendo de la función que se requiera realizar, pudiendo ser Gs o Gq para efectos excitatorios o Gi para efectos inhibitorios (Tautermann, 2014).

Los tres subtipos de β AR se distinguen entre sí por sus características estructurales y farmacológicas encontrándose ampliamente distribuidos en el organismo donde llevan a cabo diferentes funciones dependiendo del tejido donde se encuentren; De manera general se acepta que el subtipo β_1 se encuentra principalmente en corazón causando efectos excitatorios como son el aumento en la frecuencia y fuerza de contracción, el subtipo β_2 predomina en el músculo liso vascular causando vasodilatación y por último el subtipo β_3 predomina en el tejido adiposo (Hoffman,1996), para una visión más detallada de la distribución y función de estos receptores ver la tabla 2 que se presenta a continuación.

Tabla 2. Predominio y función de los subtipos de receptores beta adrenérgicos en diversos órganos y tejidos del organismo.

Estructura	Receptor predominante	Efecto
Músculo liso	β_2	Relajación
Endotelio	$\beta_{3>2}$	Liberación de óxido nítrico
Corazón	β_1	Efecto inotrópico positivo Efecto cronotrópico positivo
Hígado (Hepatocitos)	β_2	Aumento de glucógenolisis y gluconeogénesis
Músculo esquelético	β_2	Captación de potasio y glucógenolisis.
Islotes de Langerhans (células beta)	β_2	Aumento en la secreción de insulina
Glándula pineal	$\beta_{1=2}$	Estimulo de síntesis de melatonina
Adipocitos	β_3	Lipólisis y termogénesis

ESTRUCTURA DE LA AORTA

El modelo de estudio que hemos planteado para poder estudiar los cambios en la respuesta vascular beta adrenérgica dependiente de la edad, es en arteria aorta *in vitro*, esta arteria está constituida por tres capas; la capa íntima, es la que se encuentra en contacto directo con la sangre y está constituida por la capa endotelial y la lámina elástica interna; la segunda capa es la llamada capa media, la cual tiene la característica de mantener directamente el tono vascular al estar formada por fibras de músculo liso, por último la capa más externa, conocida como capa adventicia, la cual se compone de lamina elástica externa, tejido conjuntivo y el *vasa vasorum* (Intengan, 2000).

De todas estas estructuras las más importantes para mantener y regular el tono vascular son el músculo liso y el endotelio, el primero por ser el que provee la fuerza para mantener la tensión de la pared vascular además de regularse bajo situaciones específicas y dependientes de señales externas, mientras que el endotelio es importante por ser capaz de regular la actividad del músculo liso a través de la liberación de diferentes compuestos tanto contráctiles como relajantes, destacando al óxido nítrico (NO), el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) como compuestos relajantes y la endotelina-1 como compuesto contráctil (Intengan, 2000; Vanhoutte, 1996).

Una vez conociendo las estructuras de la aorta podremos reconocer que el cambio en la respuesta relajante dependiente de la edad puede verse influenciado por el endotelio y por el músculo liso; en lo que respecta al endotelio ya se ha descrito una gran cantidad de trabajos que se han enfocado en dilucidar su funcionamiento y sobre todo las fallas en cada una de sus funciones, acuñando el término de disfunción endotelial, para referirse a la incapacidad que tiene el endotelio de llevar adecuadamente cualquiera de sus funciones.

DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

El endotelio ha tomado parte protagónica en este escenario ya que no solo se encarga de regular el tono vascular sino que tiene funciones importantes dentro de la respuesta inmune, angiogenesis, hemostasis y metabolismo de lipoproteínas, etc.,

encontrado alteraciones que modifican estas funciones, como se puede ver en la siguiente imagen:

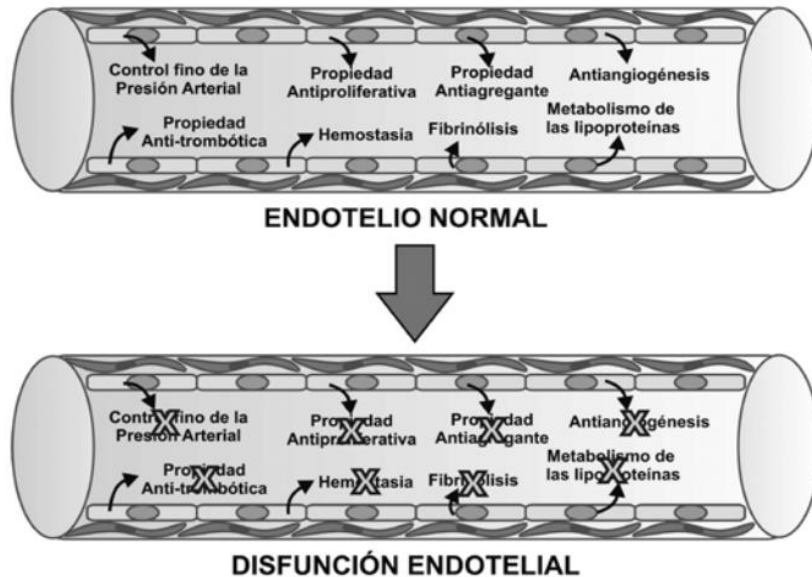


Imagen 2. Funciones importantes del endotelio vascular, las cuales bajo condiciones patológicas son alteradas generando lo que se conoce como disfunción endotelial. Tomada de Acosta Alejandro Guillermo, 2006.

Como se puede apreciar en la imagen el control fino de la presión arterial también se considera causa de disfunción endotelial y ha sido abordado por una gran cantidad de autores (Drexler, 1997; Kawashima, 2004; Sturza, 2013; Prieto, 2014), interesantemente, algunos reportes recientes han mencionado que la disfunción endotelial puede ser secundaria a los valores elevados de presión arterial originados por otras causas, lo que dejaría a la disfunción endotelial como una consecuencia y no una causa de la presión arterial elevada (Bernatova, 2014, Zhao 2015).

En el laboratorio, trabajando con un sistema de órgano aislado, es relativamente sencillo montar un modelo de disfunción endotelial, para realizar esto solo se requiere de frotar levemente con un filamento de acero inoxidable la parte interna del vaso sanguíneo tratando de desprender la mayor cantidad de células endoteliales de la arteria, demostrando la efectividad de éste método por la ausencia de respuesta a acetilcolina (Ach), fármaco capaz de relajar las arterias al liberar óxido nítrico (NO) de forma completamente dependiente del endotelio (Furchgott, 1980), ver imagen 3 más adelante.

De esta manera es posible manipular si los experimentos que deseamos se realizarán con los dos componentes, endotelio y músculo liso o solamente con este último, como serán la mayoría de nuestros ensayos. El utilizar un modelo de arterias sin endotelio nos brinda la gran ventaja de tener un sistema más limpio para identificar los cambios que ocurren en el músculo liso vascular de forma específica.

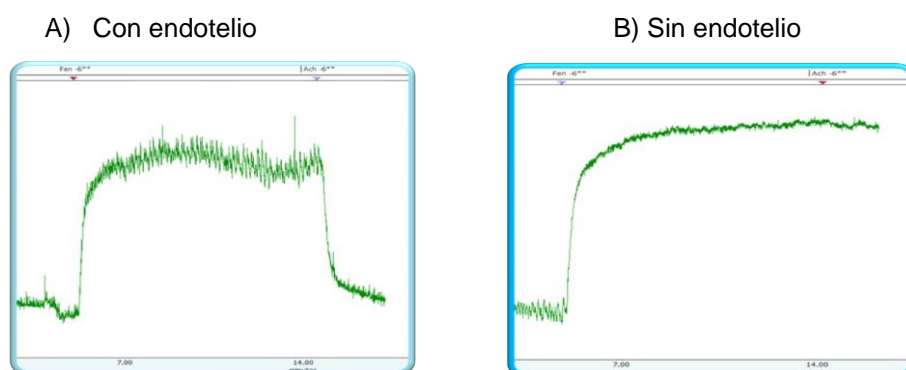


Imagen 3. Registro representativo obtenido con el programa ACQKnowledge® de un anillo de aorta, en presencia de fenilefrina $10^{-6}M$ y acetilcolina $10^{-6}M$. Se puede observar que en el inciso A la adición de fenilefrina incrementa el tono basal y este se recupera al adicionar la acetilcolina, confirmando que el anillo aún conserva la función endotelial, mientras que en el inciso B, la adición de acetilcolina no revierte la precontracción ocasionada por la fenilefrina por lo que el anillo se considera sin endotelio.

AGONISTAS DEL MÚSCULO LISO

Habiendo dejado claro que este trabajo de tesis se centra en el estudio de la pérdida de respuesta relajante beta adrenérgica en el músculo liso vascular para regular el tono vascular en diferentes condiciones fisiológicas, es indispensable abordar con más detalle el funcionamiento y la vía por la que responden las células de músculo liso vascular a los agonista beta adrenérgicos. No sin antes demostrar que estos receptores se expresan en el músculo liso vascular, durante la tesis de maestría (López, 2011) se realizaron ensayos inmunohistoquímicos con el fin de localizar en que parte de la arteria aorta se encontraban expresados estos receptores, en cada una de las etapas de desarrollo que se analizaron, demostrando que tanto el subtipo β_1 como el β_2 se expresan en la células del músculo liso de la aorta (Figura 1).

Habiendo demostrado que la expresión de estos receptores se mantiene durante las condiciones del experimento y que efectivamente se expresan en células de músculo liso, es conveniente enfocarnos en como llevan a cabo su función ya que, como se observo en la tabla 2, ésta depende del tejido que se estudie, de tal manera que nos enfocaremos en la vía de señalización que tienen estos receptores, dentro de las células de músculo liso vascular.

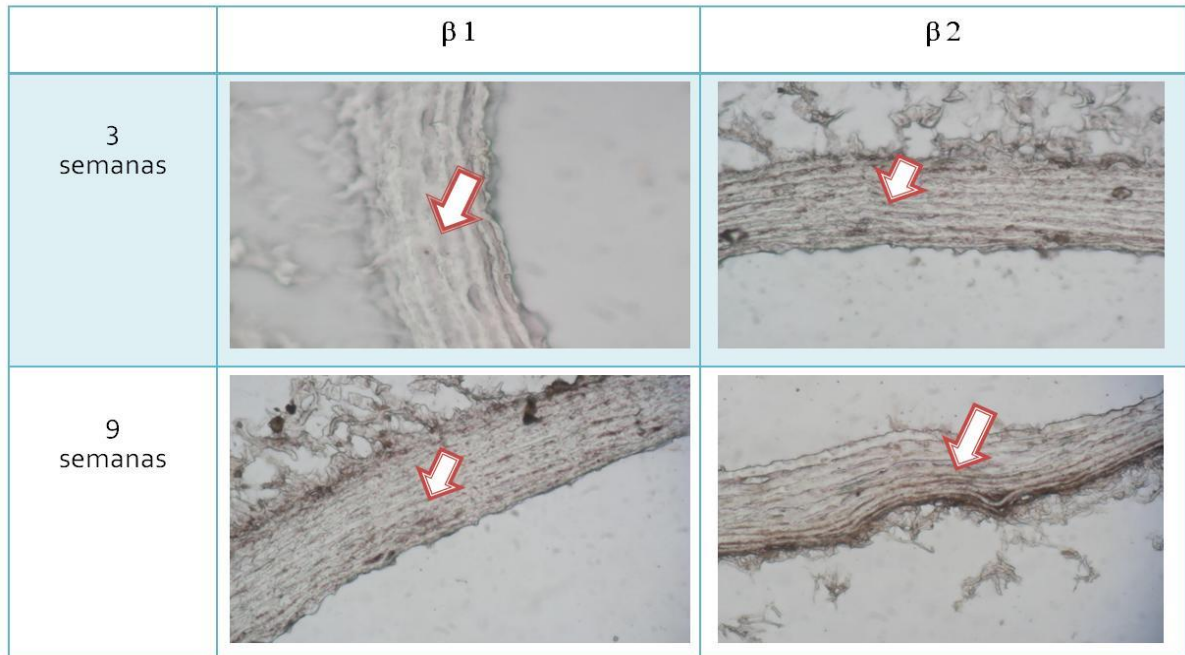


Figura 1. Inmunohistoquímica donde se muestra la expresión y localización de los subtipos β_1 y β_2 adrenérgicos en dos diferente etapas del desarrollo de la rata. En el panel superior se muestran cortes incluidos en parafina de $10\mu\text{m}$ de espesor de arterias aortas provenientes de ratas de 3 semanas de edad, las flechas muestran la expresión tanto del subtipo β_1 como del β_2 en la región de la capa media, es decir, del músculo liso. En el panel inferior se muestra que la expresión de los dos subtipos se mantiene por lo menos hasta las 9 semanas de edad, siendo predominante su expresión en músculo liso como lo indican las flechas.

SISTEMA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑAL DE LOS β AR

Independientemente del tipo celular que se estudie, la vía de señalización de los β AR se comparte hasta cierto punto, lo primero que tiene que suceder para tener un efecto en la célula es la estimulación del receptor por su agonista ya sea fisiológico, como la noradrenalina o uno artificial como el isoproterenol, esta unión

permite un cambio conformacional en toda la estructura de la proteína, desde el sitio de unión del ligando hasta el sitio de unión de la proteína Gs (estimulante), lo que provoca que esta última se libere formando dos subunidades la alfa y la beta-gama (Rasmussen, 2007). La subunidad alfa de la proteína G ($Gs\alpha$), es capaz de activar la función de otra proteína de membrana llamada adenilato ciclasa (AC), esta enzima tiene como función la conversión de adenosin trifosfato (ATP) a adenosin monofosfato cíclico (AMPc) el cual actuará como segundo mensajero activando a un tercer tipo de proteína, la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA), esta última enzima es la responsable del efecto específico de cada tejido ya que tiene como blanco múltiples proteínas. Por otro lado la estimulación debe mantenerse regulada ya que un exceso de estimulación resultaría en efectos no deseados, esto lo ha resultado la célula con dos mecanismos independientes, el primero es a través de la ruptura de las moléculas de AMPc, llevada a cabo por proteínas de la familia de las fosfodiesterasas (PDE) lo que impediría seguir estimulando a la PKA y el segundo mecanismo se debe a la desensibilización del receptor que se presenta cuando éste es fosforilado en sus horquillas intracelulares por cinasas del tipo PKA o del tipo de cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRK) y su posterior internalización al ser rodeado por moléculas de arrestina que le brindan un marcaje para su endocitosis mediada por clatrina, una vez endocitado el receptor puede seguir dos caminos, se recicla a membrana o se marca para degradación en lisosomas (Rosenbaum, 2009; Imagen 4).

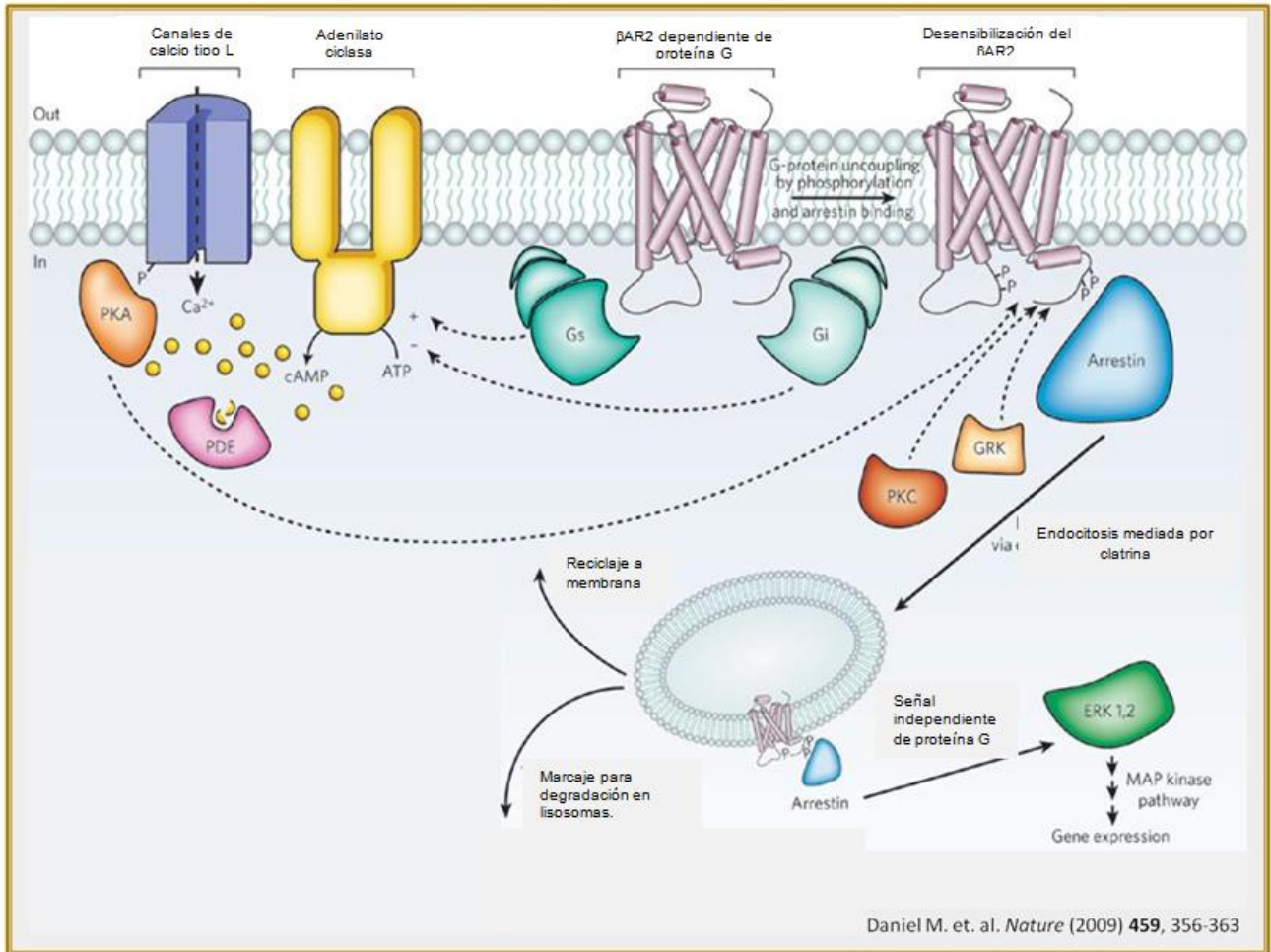


Imagen 4. Representación esquemática de la vía de señalización inicial de los receptores beta adrenérgicos. La unión del ligando permite la liberación de la subunidad $G_s\alpha$, la cual activa a la AC, enzima responsable de generar AMPc, que a su vez activará a la PKA. Los niveles de AMPc se disminuyen por acción de las PDE mientras que el receptor es susceptible a fosforilación y posterior internalización (tomado y modificado de Rosenbaum, 2009).

VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LOS β AR EN EL MÚSCULO LISO

Uno de los mecanismos más importantes para relajar el músculo liso es a través de la producción de nucleótidos cíclicos como el GMPc y el AMPc (Morgado, 2012), el primero lo podemos descartar de nuestro sistema ya que nuestros

experimentos se realizaran en arterias sin endotelio y éste se produce en respuesta a la liberación de NO que difunde desde las células endoteliales a el músculo liso vascular activando a la enzima guanilato ciclasa soluble (Moncada, 2006). Esto nos deja como único nucleótido cíclico importante al AMPc, que como vimos anteriormente se produce en respuesta a la estimulación de los β AR.

Antes de revisar que efectos tienen el AMPc para poder relajar el músculo liso vascular es conveniente hacer un paréntesis y abordar con más detalle las características de la enzima responsable de formar este segundo mensajero.

SUBTIPOS DE ADENILATO CICLASA

Dada la gran importancia y la ubicuidad del AMPc, el organismo ha desarrollado varias maneras de regular la producción de este segundo mensajero, una de las más importantes y que está tomando relevancia es la existencia de por lo menos nueve subtipos de esta enzima en los mamíferos. Pese a que todas las isoformas llevan a cabo la misma función, formar AMPc, estas se expresan y se regulan de manera diferencial en cada tejido o tipo celular. Esta distribución y regulación es sumamente compleja y requeriría un trabajo independiente para poderlo abordar a detalle, a manera de resumen; estructuralmente la enzima es una proteína de membrana con 12 regiones transmembranales distribuidas en dos clústeres llamados TM1 y TM2 unido por una horquilla intracelular con dos regiones C1a y C1b, sitio donde se encuentra la región catalítica de esta enzima (Halls, 2011; Imagen 5).

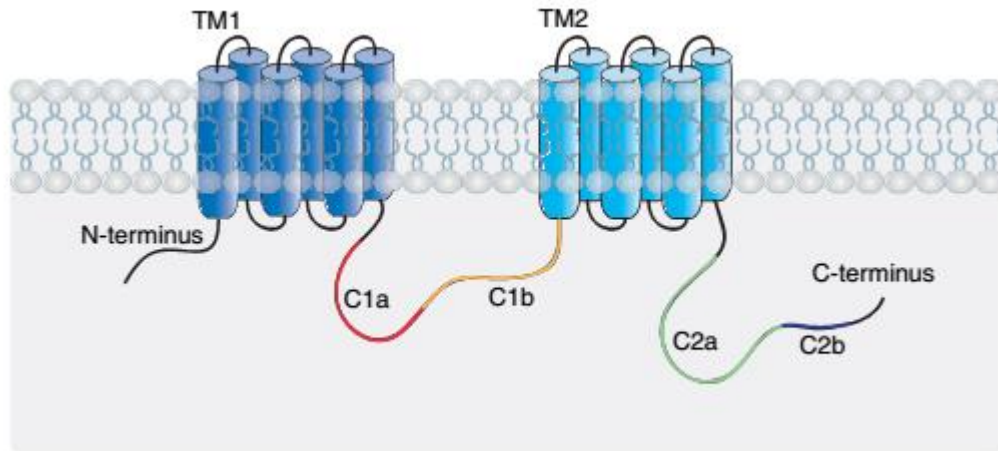


Imagen 5. Estructura general de las nueve isoformas de adenilato ciclasa, cada una de las nueve isoformas está constituida por dos clústeres TM1 y TM2 cada uno con seis regiones transmembranales, unido entre sí por una horquilla larga con dos dominios C1a y C1b, región donde se encuentra el sitio catalítico de la enzima (Tomado de Halls, 2011).

En cuanto a la regulación es muy diversa y se han identificado varias moléculas capaces de regular la función de estas enzimas como son: fármacos exógenos como la forskolina (Onda, 2001; Premont, 1996; Cumbay, 2004), las proteínas G (Iyengar, 1993; Federman, 1992; Chen, 1993; Taussig, 1994; Tang, 1991; Gao, 1991; Gao, 2007, entre otros), cinasas (Ostrom, 2012), entre otros. Un mecanismo importante en la regulación de estas isoformas y que ha ido evolucionando con este sistema es otro segundo mensajero ubicuo, el calcio, este ion se ha reportado tiene potencial para regular de manera diferencial a todas las isoformas de adenilato ciclasa (Halls, 2011), de tal forma que los subtipos de adenilato ciclasa se han agrupado en tres grandes grupos dependiendo de cómo se regule su actividad por el calcio, así los subtipos AC1, AC3 y AC8 son activados por calcio, los subtipos AC5 y AC6 son inhibidos y los subtipos AC2, AC4, AC7 y AC9 no

se modifican por la presencia de calcio (Halls, 2011). Es importante enfocarnos en nuestro sistema ya que se ha descrito que en células de músculo liso vascular de cultivo primario provenientes de arterias aortas, se expresan únicamente los subtipos AC3, AC4, AC5, AC6 y AC8 (Webb, 2001), sin embargo, aún no se ha investigado si los niveles de expresión de cada subtipo se modifican durante la maduración y que significado biológico podría tener esta expresión diferencial.

EFFECTO DEL AMPc EN LAS CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR

Una vez que se expuso el posible nivel de regulación de la producción del AMPc, pasamos a describir que efecto tiene este nucleótido una vez que se forma en respuesta a la estimulación de los β AR, se ha descrito que su principal función es activar a la PKA la cual es la responsable del efecto directo, esta cinasa es una proteína heterotrimérica (Oakhill, 2001), compuesta por la subunidad catalítica α , la subunidad β que actúa como proteína de andamiaje y la subunidad γ que tiene el sitio de unión del AMPc (Stein, 2000). Aunque es difícil generalizar sobre los mecanismos efectores por lo que se lleva a cabo la relajación en el músculo liso, ya que estos dependen de la especie que se esté estudiando, del estímulo que haya causado la precontracción y del lecho vascular que se estudie entre otros factores, se han podido establecer tres mecanismos generales por los que el músculo se relaja (Halls, 2011):

- 1) Disminución del calcio intracelular
- 2) Hiperpolarización de la membrana celular y
- 3) Desensibilización la maquinaria contráctil.

De estos mecanismos el que más nos interesa es el primero, ya que guarda una estrecha dependencia con la regulación que habíamos revisado de las adenilato ciclasas. El aumento en el calcio intracelular es un paso indispensable para que se efectúe la contracción del músculo liso al activarse la cinasa de la cadena ligera de la miosina 20 (MLC₂₀; Takuwa, 1996), por tanto una disminución en la cantidad de calcio que se encuentra en el citoplasma se refleja en el efecto contrario, es decir, en una relajación vascular. Teniendo en cuenta esto es indispensable conocer cuáles son las fuentes de calcio dentro de la célula, el primero y más importante reservorio es el retículo endoplásmico, éste orgánulo es capaz de almacenar grandes cantidades de calcio, el cual libera tras activarse al receptor de inositol trifosfato (IP3R) con su ligando el inositol trifosfato (IP3) que es liberado por acción de la fosfolipasa C (PLC) que se encuentra en la membrana celular (Rainbow, 2009) y la proteína canal RyR, así la PKA puede inhibir tanto al IP3R como la formación de IP3 tras desactivar la función de la PLC (Halls, 2011), aunado a este impedimento para que el calcio salga del retículo endoplásmico, la PKA puede llevar a cabo la activación la ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico (SERCA) al fosforilar al fosfolamban que se encuentra normalmente bloqueando la función de esta ATPasa (Brading, 2002; Matsushita, 2006; Giembycz, 2006), logrando que los niveles del calcio citoplasmático se reduzcan rápidamente.

La segunda fuente de calcio importante en la contracción del músculo liso es la fuente exógena, es decir, el que entra a la célula por medio de los canales de calcio presentes en la membrana celular, estos canales son importantes en el mantenimiento del suministro de este ion y por lo tanto de las respuestas a largo plazo. Existen varios transportadores que se engloban dentro de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VOCC), siendo el más importante los canales de calcio tipo L (LTCC), estos canales tienen la función de permitir el paso selectivo de iones calcio desde el exterior de la célula hasta el interior (Moosmang, 2003) aumentando la concentración citoplasmática, es aquí donde entra en función la PKA impidiendo la apertura de estos canales para disminuir la entrada de este ion (Ruiz, 1998). Aunado a este mecanismo que impide la entrada del calcio la PKA es capaz de activar el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), esta molécula es capaz de disminuir significativamente las concentraciones de calcio citoplasmático en respuesta a forskolina en estudio con aorta torácica de ratón (Karashima, 2007; Imagen 6).

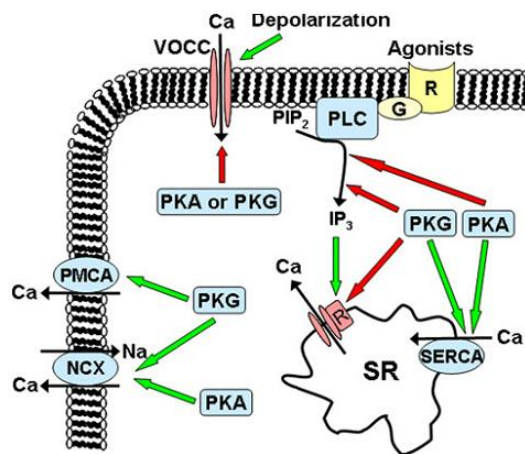


Imagen 6. Mecanismos involucrados en la disminución del calcio citoplasmático mediados por la PKA y PKG. Las flechas verdes indican activación mientras que las flechas rojas indican inhibición, para más detalle ver el texto. (Tomado de Morgado, 2012)

Hasta este momento hemos revisado con gran detalle como los β AR son capaces de relajar el músculo liso de las arterias de manera normal, sin embargo, como se mencionó anteriormente la maduración y el envejecimiento provocan modificaciones en la respuesta de estos receptores, siendo estos cambios y el mecanismo por el cual ocurren el tema principal de esta trabajo.

ANTECEDENTES DIRECTOS

EFECTO DE LA EDAD SOBRE LA ACTIVIDAD VASCULAR DE LOS β AR

Desde hace ya más 40 años se describió que el envejecimiento de la rata provoca que la respuesta relajante mediada por los receptores beta adrenérgicos en la arteria aorta se disminuya (Deisher, 1989; Tsujimoto, 1986; Emel, 2007; Mahmoud, 2007, entre otros).

Estudios hechos in vitro con anillos de aorta con endotelio proveniente de ratas de diferentes edades han demostrado ser un buen modelo para evaluar la función de los β AR, en la figura 2 se muestra un ejemplo claro de lo que se ha reportado sobre la pérdida de la función relajante, Schutzer en el 2006 realizó la comparación de la respuesta relajante a isoproterenol en ratas de 2, 6 12 y 24 meses, corroborando que conforme la rata aumenta de edad la capacidad de relajar en respuesta a los β AR va disminuyendo siendo la edad más avanzada la que menos capacidad de relajar tiene.

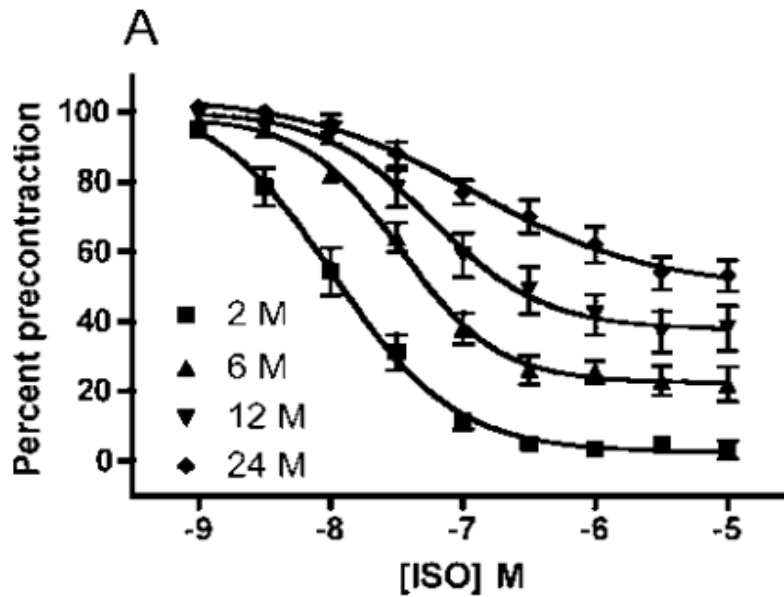


Figura 2. Efecto de la edad en la relajación mediada por isoproterenol en anillos aorta de ratas de 2, 6, 12 y 24 meses de edad, previa contracción con fenilefrina. Cada punto representa la media \pm el EEM (Tomado de Schutzer, 2006).

Esta pérdida de función ha dado pie a múltiples trabajos que tratan de explicar el porqué de esta disminución, así se ha planteado diferentes teorías que abarcan casi todas las moléculas involucradas en la vía de señalización. Una de las primeras ideas que surgió era que conforme la rata envejecía esta disminuía la expresión de los receptores beta adrenérgicos en la membrana lo que se reflejaba en la pérdida de la función (Lakatta, 1980; Scarpace, 1991), sin embargo, estudios más recientes han demostrado que la expresión de estos receptores tanto a nivel de ARNm como de proteína no se modifica con la edad, en la figura 3, se muestran los resultados obtenidos por Oliver en el 2009, donde comparan ratas de 6 semanas contra ratas de 16 semanas, demostrando que la cantidad de ARNm de los tres subtipos de β AR no se modifica con la edad.

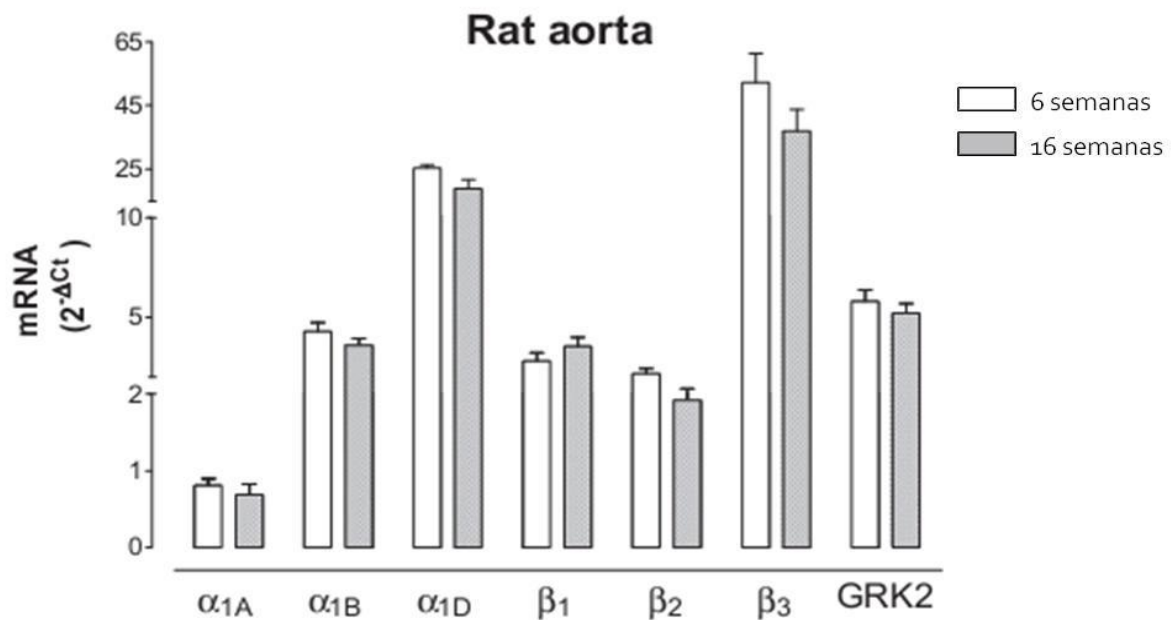


Figura 3. Niveles de ARNm de los receptores adrenérgicos y de una cinasa de GPCR, las barras blancas representan aortas provenientes de ratas de 6 semanas y las barras grises representas aortas provenientes de ratas de 16 semanas. Los valores representan $2^{-\Delta Ct}$ usando GAPDH como control (Tomado de Oliver, 2009).

El siguiente punto importante en la vía de señalización es la producción de AMPc, donde la mayoría de los reportes hablan de una disminución en la producción de este segundo mensajero (Deisher, 1989; Emel, 2007; Mahmoud, 2007), sin embargo, existe controversia cuando se trata de explicar porque no se produce éste nucleótido, por ejemplo, Schutzer en el 2006 caracterizó cultivos celulares provenientes de ratas de 2, 6, 12 y 24 meses de edad, demostrando que la producción de AMPc disminuía en respuesta a isoproterenol pero la producción de AMPc no se alteraba si el estímulo era de forskolina, esto nos sugiere un defecto en el acoplamiento del receptor β con la adenilato ciclasa (Schutzer, 2011; Figura 4).

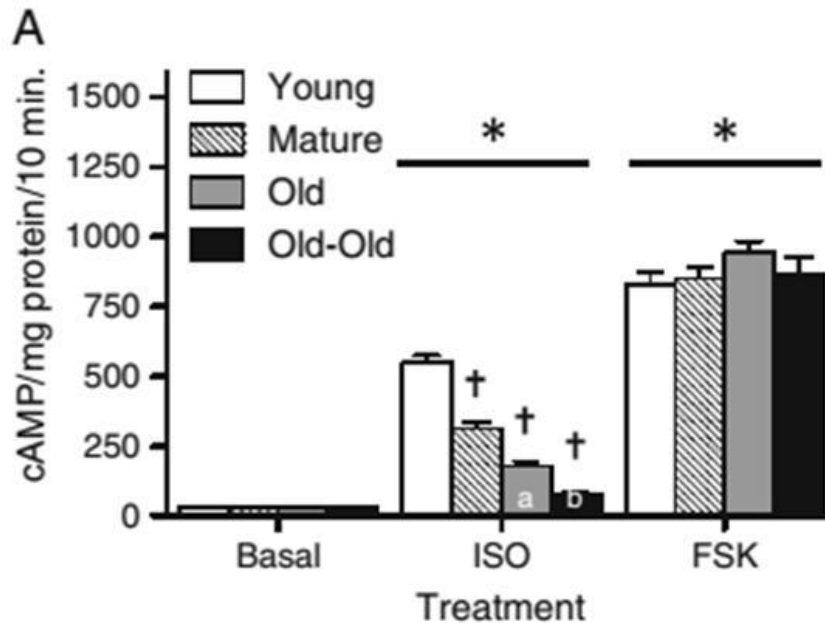


Figura 4. Valores de AMPc producido por los cultivos celulares provenientes de diferentes grupos de edad, tratados con isoproterenol o con forskolina (Tomado de Schutzer, 2011).

Por otro lado Gaballa en el 2000 había reportado un resultado parecido en respuesta a isoproterenol, es decir, la producción de AMPc disminuía cuando se comparaban ratas de 6 y 23 meses de edad, pero a diferencia del reporte anterior esta producción también disminuía en respuesta a forskolina, este diferencia tan sutil cambia completamente el mecanismo ya que ahora se sugiere que el problema está en la propia adenilato ciclasa ya que no es capaz de formar AMPc independientemente del estímulo que reciba (Gaballa, 2000; Tabla 3).

Tabla 3. Valores de densidad de receptores y cuantificación de AMPc por medio de inmunoensayos en diferentes condiciones experimentales en ratas BN344.

Age	β -AR number	Basal AC	Iso-AC (10^{-4} M)	NaF-AC (10^{-2} M)	Forskolin-AC(10^{-2} M)
6 month	15.3 ± 1.7	60 ± 23.6	64 ± 20.3	74.5 ± 16.6	84 ± 4.6
23 month	18.5 ± 0.5	$46.5 \pm 27.6^*$	$41 \pm 15.6^*$	$48.5 \pm 2.1^*$	$52 \pm 15.6^*$

Estas discrepancias hacen necesario abordar el tema con mayor profundidad, dándonos a la tarea de elucidar cual es el mecanismo responsable de que los receptores beta adrenérgicos pierdan su capacidad de relajar las arterias conforme aumenta la edad del animal.

Como se puede observar la gran mayoría de trabajos se enfocan en la perdida de la función vascular en etapas avanzadas del desarrollo casi en la vejez ya que los cambios son más evidentes, es por esto que durante nuestro trabajo de maestría (López, 2011) nos dimos a la tarea de verificar si este cambio se presentaba desde etapas tempranas del desarrollo, utilizando para ello tres grupos de ratas de 3, 9 y 15 semanas de edad, los resultados se muestran a continuación.

Como se puede observar en la figura 5, durante la etapa de la pubertad (en la rata se presenta entre la 7ma y la 8va semana) existe un cambio que causa que los receptores beta adrenérgicos disminuyan su capacidad de relajar las arterias, sin embargo, este cambio permanece sin modificaciones hasta la edad de 15 semanas, lo que hace pensar que el cambio observado en la vejez que se ha reportado ampliamente, no necesariamente es el mismo que se presenta durante la pubertad de la rata.

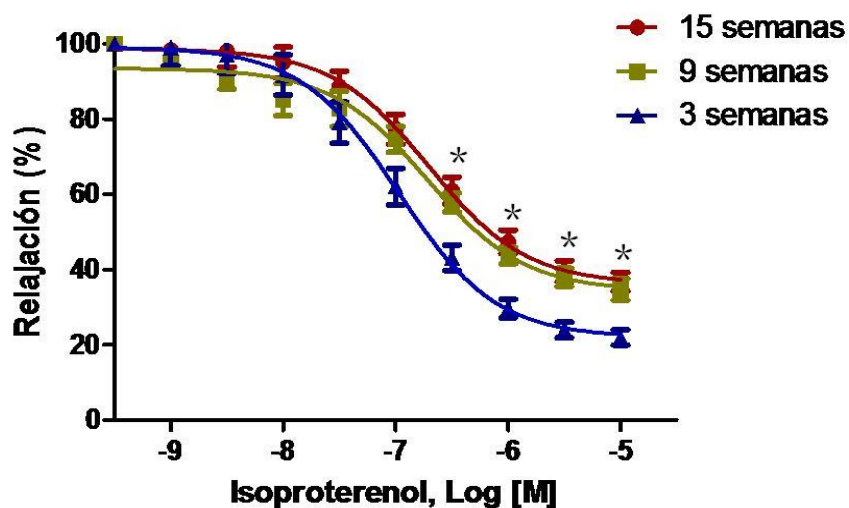


Figura 5. Efecto de la edad sobre la relajación inducida por el isoproterenol en anillos de aorta con endotelio precontraídos con fenilefrina provenientes de ratas de diferentes edades. Cada punto representa la media \pm el EEM. * $p \leq 0.05$.

Con estos datos en mente el objetivo del proyecto empieza a quedar claro, y es evaluar el mecanismo molecular por el cual los receptores beta adrenérgicos pierden la capacidad de relajar el músculo liso durante la pubertad, solo nos resta un punto trascendental que casi ningún trabajo a explorado y es tratar de encontrar a un agonista fisiológico que sea responsable de detonar los cambios que se observan en la vía de señalización de los β AR.

AGONISTA FISIOLÓGICO DETONANTE DE LA DISMINUCIÓN EN LA RESPUESTA RELAJANTE A LOS β AR

Como se mencionó anteriormente durante la pubertad de la rata se presentan una gran cantidad de cambios adaptativos que tiene como agente detonante la presencia de ciertas hormonas, siendo las hormonas gonadales (testosterona y estrógenos) las que más influencia tiene sobre estos cambios (Wehkalampi, 2012).

En lo que respecta a la testosterona, se han hecho observaciones importantes que nos guiaron a proponer a este agonista como responsable de iniciar los cambios en la respuesta beta adrenérgica y son básicamente tres observaciones:

- 1) Relación temporal entre el cambio observado y el aumento en las concentraciones plasmáticas de testosterona.
- 2) La testosterona puede actuar directa o indirectamente en la regulación del tono vascular.
- 3) Cambios en la actividad de los β AR relacionados directamente con la testosterona.

Como vimos en nuestros antecedentes la pérdida de la función vascular de los β AR, empieza desde etapas tempranas del desarrollo específicamente durante la pubertad y es bien sabido que durante esta etapa la producción de testosterona se incrementa, como se muestra en la siguiente imagen.

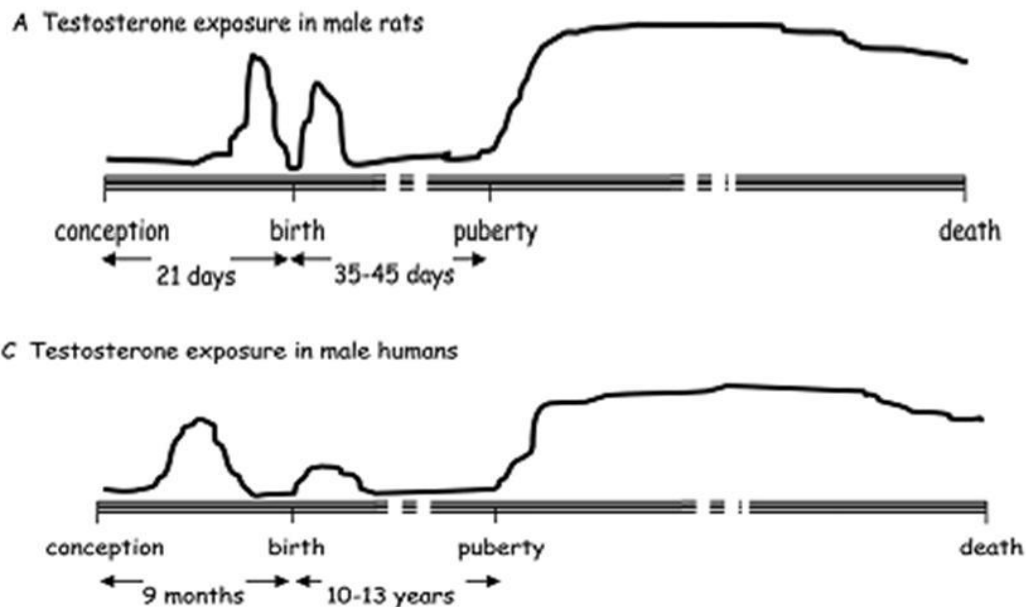


Imagen 7. Patrón de exposición a la testosterona durante la vida del macho, inciso A representa la exposición en ratas mientras que el inciso C la exposición en humanos, siendo muy similares con una leve exposición durante el nacimiento la cual disminuye hasta que en la pubertad (máximo 45 días para la rata) empieza la producción endógena de testosterona la cual se mantiene hasta la muerte tanto en la rata como en el humano (tomado de Gillies, 2010).

Para darle un poco más de peso a esta observación vale la pena mencionar un estudio realizado en humanos por Shankar en el 2005, en este estudio realizaron mediciones de la presión arterial en mujeres y hombre tres años antes que iniciara la pubertad, durante el inicio y el fin de la pubertad y tres años después de esta etapa, encontrando los siguientes resultados (Figura 6).

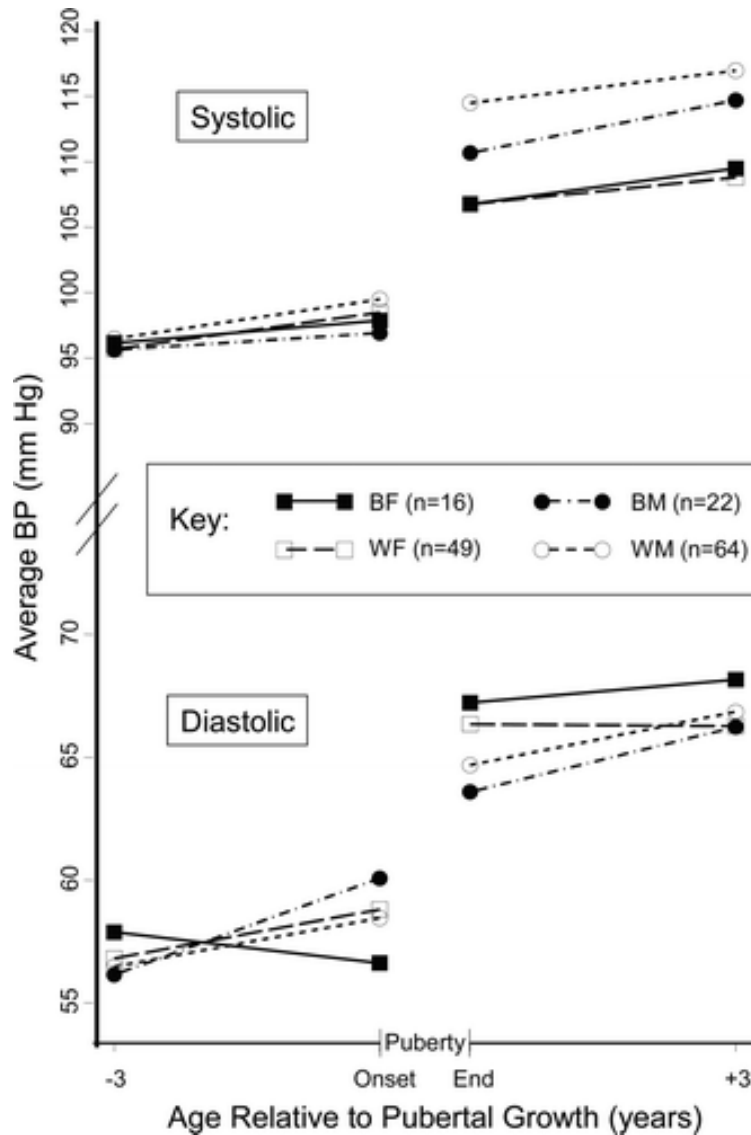


Figura 6. Valores obtenidos de la presión arterial, a 3 años antes, durante y 3 años después de la pubertad. En el panel superior se muestran las mediciones de la presión sistólica y en el panel inferior las mediciones de la presión diastólica (Tomado de Shankar, 2005).

De estos resultados podemos resaltar dos conclusiones importantes, la primera es que tanto los hombres como las mujeres aumentan su presión arterial durante la pubertad, tanto la sistólica como la diastólica y recordemos que una mayor presión arterial se relaciona con un aumento en el tono vascular que puede ser relejo de una

disminución en la relajación de los vasos sanguíneos e interesantemente si se observa la presión sistólica a detalle en la etapa pospuberal, se puede ver que en los hombres se incrementa de manera significativa comparándola con la de las mujeres lo que nos indica que en el hombre hay algún metabolito producido durante la pubertad, muy probablemente la testosterona, que está causando que éstos cursen con una presión arterial un poco más elevada después de la pubertad (Shankar, 2005).

Es segundo punto le dará más peso a esta hipótesis, ya que la testosterona es capaz de regular el tono vascular tanto de forma directa como indirecta; de forma directa se ha reportado que la administración de testosterona en estudios *in vitro* causa relajación mediada por receptor (Montaño, 2008), sin embargo, estos efectos solo se observan con dosis altas de testosterona que normalmente no se encuentran en condiciones fisiológicas, así que en nuestro modelo descartamos este tipo de efecto, por otro lado los efectos indirectos si son de gran importancia para nosotros. Estos efectos indirectos se deben principalmente a la capacidad que tienen la testosterona de regular a nivel transcripcional la expresión de una gran cantidad de genes, esto lo logra gracias a la presencia de receptores de andrógenos que se encuentran en el citoplasma de la célula y que al unirse a su ligando, se dimerizan para entrar al núcleo y actuar como factores de transcripción uniéndose a los promotores que tenga un elemento de respuesta a andrógenos (ARE) cuya secuencia ya se ha reportado (Nelson, 2002), permitiendo la expresión de dichos genes (liu, 2003; Imagen 9)

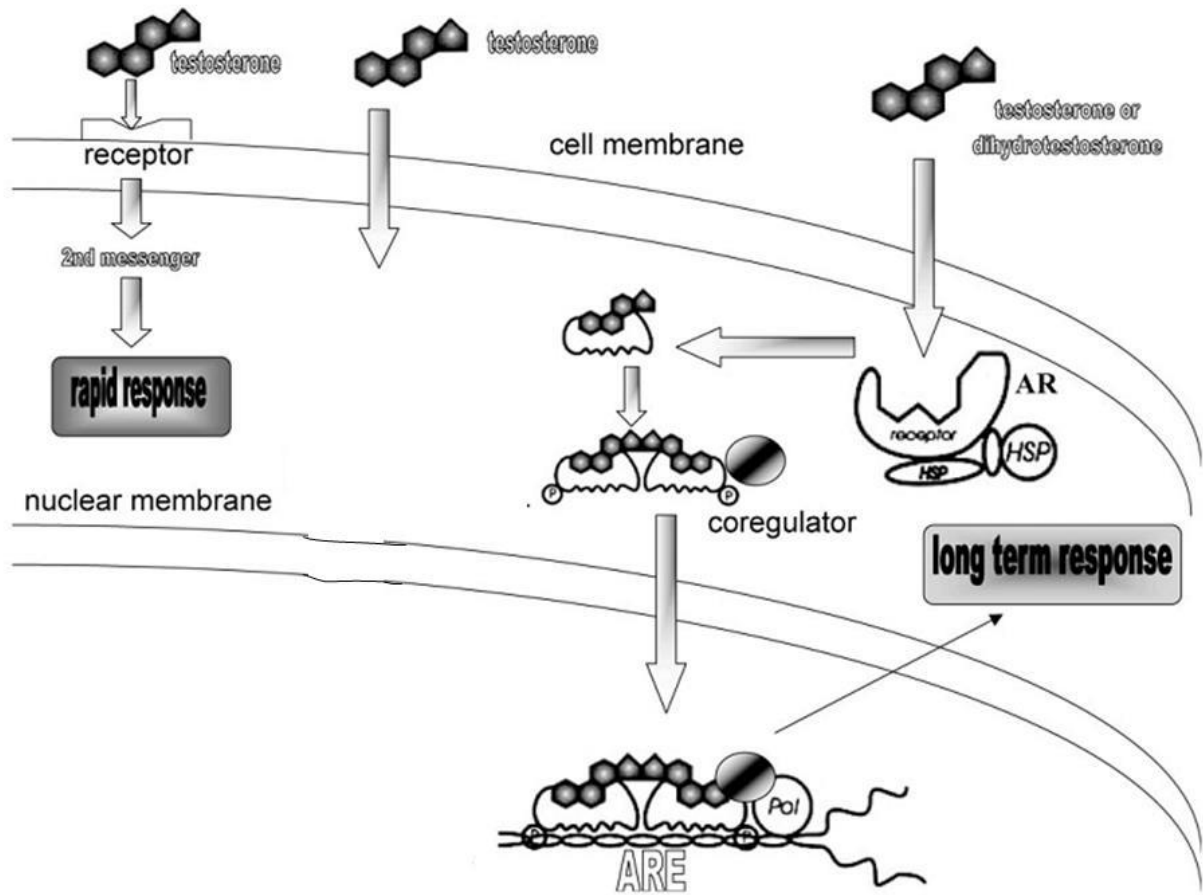


Imagen 8. Mecanismos genómico y no genómicos de los andrógenos. Al lado izquierdo se muestra los efectos no genómicos que se caracterizan por ser respuesta rápidas. En el lado derecho se muestran los efectos genómicos que son respuestas a largo plazo (Tomado y modificado de Liu, 2003).

Estos efectos no genómicos es posible que se vean reflejados en molécula importantes en la regulación del tono vascular, específicamente en la regulación del calcio citoplasmático, ya que como recordamos la cantidad de calcio se encuentra íntimamente ligada al estado de contracción o relajación del vaso sanguíneo además de regular diferencialmente a las isoformas de las adenilato ciclasas. Apoyando esta idea se encuentra el trabajo de Tsang hecho en el 2009 donde demuestra que la

testosterona puede modificar la función de los receptores adrenérgicos, utilizando el corazón de animales orquitectomizados como modelo de estudio (Figura 7).

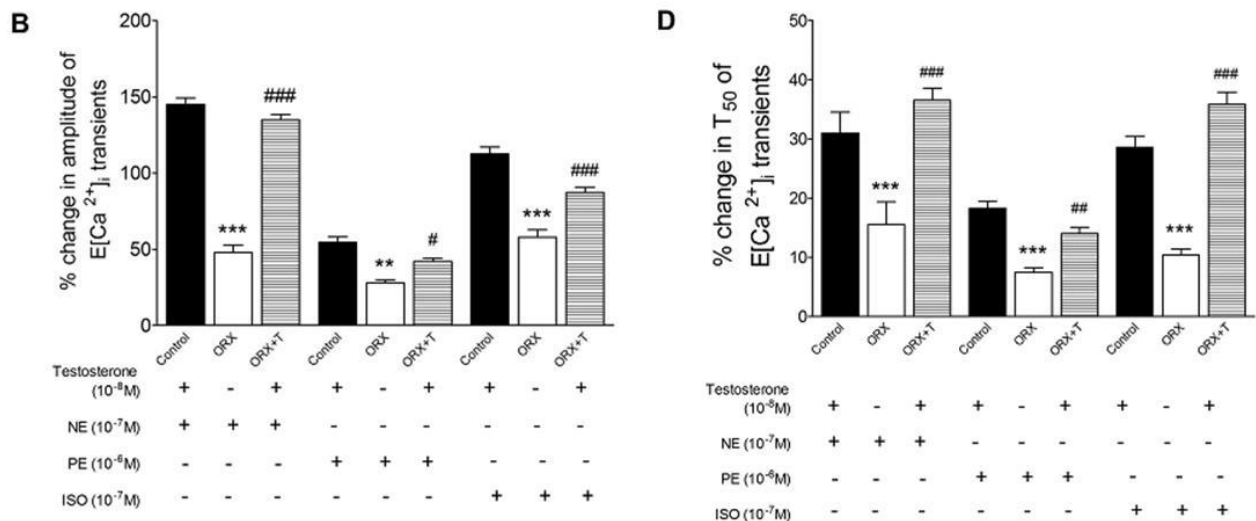


Figura 7. Efecto de la estimulación de los receptores adrenérgicos en % de cambio del calcio citoplasmático y él % de la vida media del calcio en el citoplasma en animales control, gonadectomizados y gonadectomizados con terapia de reemplazo de testosterona (Tomado de Tsang, 2009).

De la figura anterior se puede obtener dos conclusiones, la primera que la presencia de testosterona provoca que se incremente más el calcio citoplasmático en respuesta al estímulo de los α AR y β AR (inciso B) y la segunda conclusión es que el calcio dure más tiempo en el citoplasma (inciso D), estos datos se complementan con la siguiente figura (Figura 8) donde demuestran que el cambio en los niveles de calcio citoplasmático se deben a que la testosterona modifica la función de las proteínas reguladoras del calcio como son el canal RyR, el NCX y la SERCA (Tsang, 2009).

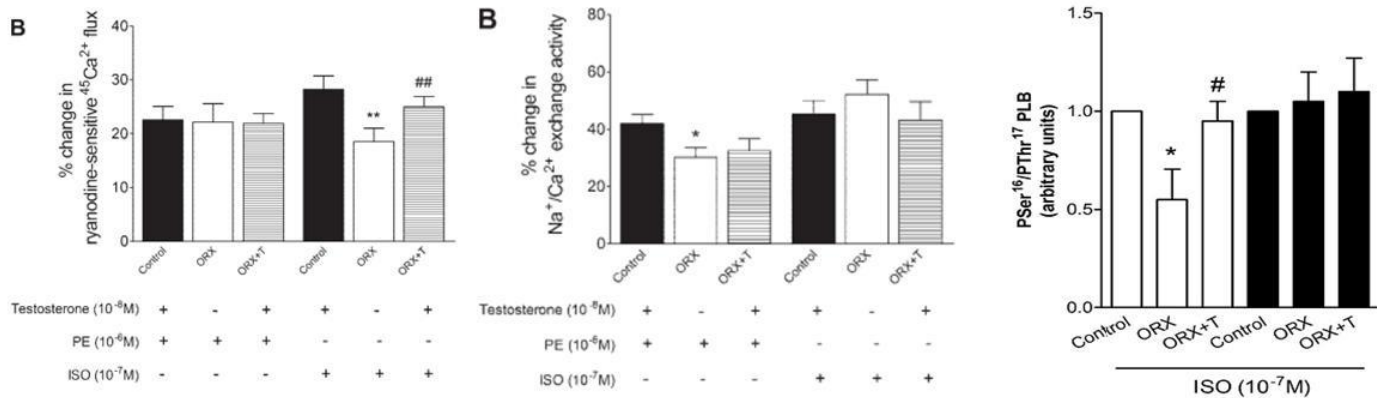


Figura 8. Efectos de los agonistas adrenérgicos en la actividad del canal RyR, el NCX y el fosfolamban, en animales gonadectomizados con y sin terapia de reemplazo hormonal (Tomado de Tsang, 2009).

Por último, existen datos que relacionan directamente a la testosterona con la función de los β AR o con su vía de señalización, a este respecto un estudio realizado por Sun en el 2011, demostró en un modelo de falla cardiaca que la presencia de testosterona modifica la expresión de las proteínas Gs, GRK2, Gi y de los receptores β 2 y β 3, lo que impide que la pérdida de la función cardiaca se vea exacerbada por la orquiectomía de la rata. Mientras otro estudio más reciente demostró que la ingesta elevada de sodio provoca hipertensión la cual se debe a una disminución en la respuesta relajante causada por el AMPc, interesantemente, en este mismo estudio se demuestra que la orquiectomía de la rata impide que esta pérdida de relajación en las ratas con ingesta alta de sodio suceda y que el reemplazo de testosterona restablece esta disminución en la respuesta relajante (Oloyo, 2013), sin embargo, este trabajo no va más allá y no explica el mecanismo molecular por el cual la testosterona está involucrada con la pérdida de relación dependiente de AMPc.

No obstante que estas teorías aquí presentadas han permitido avanzar en la elucidación del mecanismo molecular responsable de la pérdida de la función vascular de los receptores beta adrenérgicos, el conocimiento de éste todavía es incompleto. Por la razón anterior, este trabajo se realiza con el fin de aportar información adicional al respecto de la modificación en el mecanismo molecular que sufren estos receptores durante la etapa de maduración, específicamente en los cambios sufridos en el músculo liso, empleando con este fin aortas sin endotelio de de ratas de 3 y 9 semanas de edad (etapa de la pubertad). Además se aportará información adicional sobre el posible agonista fisiológico responsable de los cambios observados en el mecanismo molecular de estos receptores o de los componentes de su vía de señalización.

JUSTIFICACIÓN

Durante la maduración y el envejecimiento el organismo sufre una gran cantidad de cambios, tanto adaptativos como degenerativos, algunos de estos cambios guardan estrecha relación con los niveles hormonales; un cambio adaptativo importante que se ha descrito es en relación a la respuesta vascular beta adrenérgica que se ha descrito disminuye con forme el organismo aumenta de edad. Actualmente no se ha descrito un factor celular que explique completamente ésta pérdida de función y por lo tanto la causa principal de este desequilibrio homeostático aun no se ha identificado. El presente trabajo intenta aportar información adicional que ayude a clarificar los conceptos sobre el mencionado tema. Concretamente se pretende observar si existen diferencias en la vía de señalización utilizada por estos receptores en el músculo liso durante la maduración, aportando un mecanismo de acción así como la identificación de un posible agonista fisiológico responsable de estos cambios. El trabajo realizado se justifica porque aporta nuevos conocimientos que podrían reflejarse en el planteamiento de nuevas estrategias en el manejo de múltiples cambios.

HIPÓTESIS

Durante la maduración de la rata el aumento en la cantidad de testosterona causa que el músculo liso vascular sufra una pérdida de función relajante en respuestas a los β AR provocada por un desacoplamiento de la vía de señalización del AMPc.

OBJETIVO GENERAL

Demostrar que durante la maduración existe una disminución en la relajación del musculo liso vascular en respuesta a los receptores beta adrenérgicos e identificar los mecanismos y la molécula responsable de dicho cambio.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Demostrar que existen cambios dependientes de la maduración de la rata en la respuesta vascular beta adrenérgica.
 - Demostrar que la respuesta es específica a receptores beta adrenérgicos.

2. Identificar los mecanismos de señalización intracelular involucrados en la pérdida de la función vasodilatadora beta adrenérgica en el músculo liso vascular.
 - Estudiar la expresión a nivel de proteína de los receptores beta adrenérgicos.
 - Estudiar los cambios en la vía de señalización del AMPc.
 - Estudiar la expresión de proteínas involucradas en la vía de señalización de los receptores beta adrenérgicos.

3. Identificar el agonista fisiológico responsable de la pérdida en el efecto beta adrenérgico vascular.
 - Demostrar el papel de la testosterona en la pérdida del efecto relajante beta adrenérgico dependiente de la edad.
 - Caracterizar el mecanismo por el cual la testosterona modifica la respuesta vascular beta adrenérgica dependiente de la edad.

METODOLOGÍA

Con el fin de cumplir los objetivos anteriores se realizaron tanto estudios funcionales como moleculares, utilizando ratas macho de la cepa Wistar divididas en dos grupos de edad, ratas de 3 semanas (prepuberales) y ratas de 9 semanas de edad (adultas) las cuales fueron mantenidas en el bioterio del centro de investigaciones y de estudios avanzados del IPN, con un ciclo luz/oscuridad de 12:12, con agua y alimento *ad libitum*. Los experimentos se condujeron bajo protocolos aprobados por el comité de investigación animal de la institución.

ESTUDIOS FUNCIONALES

PREPARACIÓN DE LOS ANILLOS AÓRTICOS

Después de anestesiar y sacrificar al animal por decapitación, se extrajo la aorta descendente, desde su emergencia en el cayado aórtico hasta la bifurcación de las arterias ilíacas. Inmediatamente después, se colocó en solución Krebs (ver composición adelante) y bajo oxigenación constante con carbógeno (5% CO₂ y 95% O₂) para después limpiar el tejido conectivo circundante. Tomando como referencia el diafragma se separó el segmentos torácico (exceptuando el cayado aórtico), el cual se cortó en anillos de aproximadamente 5mm de ancho. Por estudios previos, siempre se utilizaran 4 anillos torácicos por cada animal para obtener los mejores resultados. A continuación los anillos se montaron en dos

ganchos de acero inoxidable en forma de “L” para después se colocarlos en una cámara para órgano aislado de 10 mL de volumen que contiene solución Krebs, con la siguiente composición en mM: NaCl 118, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 7H₂O 1.2, CaCl₂ 2H₂O 2.5, NaHCO₃ 25, dextrosa 11.7 y edetato disódico y cálcico 0.026. En todos los casos la solución se mantuvo constante a 37° C, pH 7.4 y se burbujeo con una mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂. Uno de los ganchos que sostiene la preparación se fija al fondo de la cámara y el otro a un transductor de tensión modelo 1030 de UFI conectado a un modulo MP150 de Biopac Systems Inc. que convierte la señal analógica a digital para ser capturada y presentada en tiempo real a través de una computadora personal mediante el programa *ACQKnowledge*® 3.1 bajo ambiente Windows®. Esto permitió registrar los cambios de tensión en la preparación. A cada anillo se le dio una tensión inicial (1.5 g para la rata de 3 semanas y 2 gramos en el caso de la de 9 semanas) y se le dejo estabilizar por dos horas antes de iniciar el experimento. Durante este periodo se realizaron las pruebas de viabilidad con fenilefrina (Fen; 10⁻⁶ M), para corroborar la capacidad del musculo liso de contraer y en casi todos los casos se les retiró el endotelio, frotándolos sobre la punta de unas pinzas de disección, corroborando la ausencia de endotelio por la falta de respuesta relajante a acetilcolina (Ach; 10⁻⁶ M).

FÁRMACOS UTILIZADOS

Clorhidrato de fenilefrina, clorhidrato de acetilcolina, clorhidrato de isoproterenol, sal metanosulfonato (±)-2-Hidroxi-5-[2-[[2-hidroxi-3-[4-[1-metil-4-

(trifluorometil)-1H-imidazol-2-il] fenoxil]propil]amino]etoxi]- benzamida(CGP-12177A), hidrocloreto de (\pm)-1-[2,3-(Dihidro-7-metil-1H-inden-4-il)oxi]-3-[(1-metiletil)amino]-2-butanol (ICI 118,551), 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ), H-89 hidrato de dihidrocloreto, KT 5823, SQ 22,536, clorhidrato de N ω -Nitro-L-arginina metil Ester(L-name), cloruro de tetraetilamonio (TEA), cloruro de potasio (KCl), anhido de teofilina, anhido de forskolina; los cuales se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, U.S.A.).

Todos los fármacos se prepararon el día de su uso y las diluciones se realizaron empleando agua bidestilada, excepto el SR 59230A y el ODQ los cuales se diluyeron en dimetilsulfoxido (DMSO).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

El cambio en la tensión, producida por la contracción o relajación de los anillos de aorta de rata, se representan como curvas concentración-respuesta (C-R) donde se graficó el valor negativo del logaritmo de la concentración del agonista (en ausencia y presencia de un inhibidor específico), contra el porcentaje de la relajación producida por el agonista beta en anillos precontraídos con fenilefrina (10^{-6} M). Los datos se expresan como la media \pm el error estándar de la media (EEM.). Mediante el uso de un software especializado (GraphPad Prism[®]) se realizó el cálculo del efecto máximo (E_{max}) y se corroboró si existe o no diferencias significativas entre las distintas variables realizando las comparaciones

estadísticas mediante análisis de varianzas bifactorial (ANOVA) aunado a un análisis post hoc con ajuste de Bonferroni, tomando como valor de significación a $p < 0.05$. En todos los experimentos, n indica el número de ratas a partir de las cuales se obtuvieron los anillos. En todos los caso un valor de p menor de 0.05 fue considerado como estadísticamente significativo.

ESTUDIOS MOLECULARES

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS PARA ANÁLISIS DE WESTERN-BLOT

Las muestras de cada grupo y cada variable se colocaron en tubos de precipitado los cuales contenían una solución de Tris-HCl, pH 7.4 y un coctel de inhibidores de proteasas a 4 °C. Posteriormente los tejidos se homogenizaron (Tissue Tearor; Biospec Products, INC. U.S.A.) a una velocidad de entre 10,000 y 19,000 rpm durante 2 minutos. Después el homogénado se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min en una centrifuga Sorvall Biofuge Fresco (Kendro laboratory Products, Germany). El sobrenadante se separó en alícuotas para la cuantificación de proteínas y realización de western-blot. Las muestras se almacenaron a -80° C hasta el momento de uso.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE EL MÉTODO DE BRADFORD

La cuantificación de la concentración de proteína total presente en los homogenizados de aorta, se llevó a cabo mediante la construcción de una curva de calibración (0.2-1.4 mg) empleando albúmina sérica bovina (ASB) como proteína patrón y un colorante hidrofóbico, reactivo de Bradford (Sigma Aldrich). La reacción se midió en un espectrofotómetro (DU-800, Beckman Coulter, USA) a 595 nm. Las concentraciones serán expresadas como mg de proteína/mL.

ELECTROFORESIS SDS-PAGE

Una vez homogenizados los tejidos fueron examinados para ver su patrón electroforético de proteínas, mediante geles de poliacrilamida al 6-10% en presencia de un detergente anionico dodecil sulfato de sodio (SDS), utilizando alícuotas de 5 µg de proteína por carril bajo condiciones reductoras, usando un sistema con formato de minigel mini protean III (Bio-Rad, Richmond, CA). La corrida se realizó a 80 V constantes incluyendo un marcador de peso molecular Dual colors (Bio-Rad, Richmond, CA). Al término de la corrida los geles fueron teñidos con una solución de azul de coomasie R-250 durante 1 hora, para posteriormente ser desteñidos con metanol, ácido acético y glicerol.

Tabla 4. Soluciones para preparar Tris-Glicina-PAGE en geles de 1.5 mm de espesor.

Solución	Gel al 10% (ml)	Gel al 6 % (ml)
Agua desionizada	4.0	1.4
Tris 1.5 M (pH 8.8)	2.5	-----
Tris 0.5 M (pH 6.8)	-----	0.25
SDS 10 %	0.1	0.02
Bis-Acrilamida al 30 %	3.3	0.33
Persulfato de amonio al 10 %	0.1	0.02
TEMED	0.004	0.002
Abreviaturas: SDS, Dodecil sulfato de sodio; TEMED, N,N,N',N' tetrametil etilendiamida.		

INMUNOTRANSFERENCIA

La inmunotransferencia (western-blot) se realizó utilizando 5 µg de proteína por carril en geles de poliacrilamida al 6-10% con SDS bajo condiciones reductoras. La transferencia de la proteína a la membrana Inmobilon-P (Millipore, Medford, USA) se realizó durante 18 horas aproximadamente con 40V constantes a 4°C utilizando el método descrito por Towbin. La identificación de los receptores βAR o βAR fosforilados se realizó con anticuerpos monoclonales específicos, los mismo que serán detectados mediante el uso de un anticuerpo policlonal secundario acoplado a peroxidasa (kit VectaStain ABC Universal, Vector, Burlingame, CA, USA), finalmente la actividad de peroxidasa se revelara bajo

condiciones de emisión de quimioluminiscencia (ECL®Amersham Pharmacia Biotech, USA). Como control positivo se utilizó el receptor β 2 adrenérgico recombinante de rata. La intensidad relativa de las bandas será capturada usando un analizador de imágenes (UVP, Southern, CA, USA).

CUANTIFICACIÓN DE AMP_c POR ENZIMOINMUNOENSAYO (EIA)

La cuantificación de AMP_c en las muestra de tejido de aorta se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (Cayman chemical's Cyclic AMP EIA Kit), en resumen, el tejido obtenido de las diferentes condiciones experimentales se congelo rápidamente para evitar la degradación del nucleótido, una vez congelado el tejido se pulverizó y se le adicionó de 5 a 10 volúmenes de una solución al 5% de acido triclororacético (TCA), para luego separar por centrifugación a 1,500 g por 10 minutos, recuperando el sobrenadante en un tubo nuevo. Después se extrajo el TCA adicionando éter sobresaturado con agua a 5 volúmenes de éter por cada volumen de sobrenadante. Por último se elimina todo el exceso de éter calentando la muestra a 70°C por 5 minutos. Una vez obtenidas las muestras, estas se ensayaron por triplicado junto a un estándar de AMP_c como lo indica el fabricante.

EXTRACCIÓN DE ARN PARA ANÁLISIS DE EXPRESIÓN A NIVEL DE MENSAJERO

Las muestras de tejido a estudiar de cada grupo y de cada variable fueron homogenizadas y se les extrajo el ARN total por el método del Trizol de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La pureza y concentración del ARN se calculó utilizando la relación en la densidad óptica (OD) de 260/280 nm y su integridad se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Este ARN se almacenó a -80°C hasta el momento de su uso.

RT-PCR PARA OBTENCIÓN DE cADN

El cADN se obtuvo utilizando el Superscript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En resumen, se realizaron dos mezclas de reacción que contenían lo siguiente:

- Mezcla 1: 2 µg de ARN total, 5 µM de oligo Dt, 1 mM de cada desoxirribonucleótido trifosfato y agua DEPC hasta llevar a un volumen de 10 µL
- Mezcla 2: Buffer RT 1X, 5 mM de MgCl₂, 10 mM DTT, 40 U RnaseOUT™ y 200 U de SuperScript™ III RT.

La mezcla 1 se incubó a 65°C por 5 minutos y se colocó en hielo. Después de incubada, a la mezcla 1, se le añadió la mezcla 2 y se incubó a 50°C por 50

minutos. Esta mezcla de reacción (RT-PCR) se detuvo incubando a 85°C por 5 minutos y añadiendo 1 µL de RNAasa H.

qPCR PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE ARNm

Las reacciones de PCR en tiempo real (qPCR) se llevaron a cabo en un sistema STEP ONE (Applied Biosystem) usando SYBR® Green master mixes® de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La secuencia de los iniciadores se obtuvo de la página PrimerBank® auspiciada por el hospital general de Massachusetts y la escuela de medicina de Harvard.

Tabla 5. Secuencia de los iniciadores utilizados para la cuantificación de ARNm de cada proteína involucrada en la vía de señalización por medio de utilizando el método de SYBER® Green.

Proteína	Secuencia	pb
Adenilato ciclasa 3 (AC3)	Sentido: 5'-ACCAAGATCAAACCATC-3' Antisentido: 5'-GAAAAAGGTCAGAAGCTC-3'	180
Adenilato ciclasa 5 (AC5)	Sentido: 5'- CTTGGGGAGAAGCCGATTCC-3' Antisentido: 5'-ACCGCTTAGTGGAGGGTCT-3'	171
Adenilato ciclasa 6 (AC6)	Sentido: 5'-GATGAACGGAAAACAGCTTGGG-3' Antisentido: 5'-GGTGGCTCCGCATTCTTGA-3'	72
Intercambiador Sodio-calcio (NCX)	Sentido: 5'-GGGGTGATCTTGCCCATTTG-3' Antisentido: 5'-TGGTCTCTCCATTCGGTTTCT-3'	187
ATPasa de calcio del retículo endoplásmico (SERCA)	Sentido: 5'-CGTCGCTTCTCGGTGACAG -3' Antisentido: 5'-AAGAGGTCCTCAAAGTCTCC-3'	235
Proteína canal RyR3	Sentido: 5'-ACCAGCAGGAGCAAGTACG-3' Antisentido: 5'-GGGGTCGTGTCAAAGTAGTCA-3'	292

OBTENCIÓN DEL CULTIVO CELULAR PRIMARIO DE CÉLULAS DE MÚSCULO LISO

Para poder abordar los cambios observados en el tejido de una manera más detallada es necesario recurrir a la obtención de cultivos celulares primarios, estos se realizaron siguiendo la metodología propuesta por Schutzer en el 2011 donde se propone obtener un cultivo utilizando selección clonal, en resumen, se realizó lo siguiente; En condiciones de esterilidad se obtuvieron las aortas de las ratas de los dos grupos de estudio de 3 y 9 semanas, las cuales fueron cortadas transversalmente y se les removió el endotelio al frotar la parte interna del vaso con la punta de las pinzas de disección, para después cortar la arteria en piezas de aproximadamente 10mm² y colocarlas en cajas para cultivo de 100mm con la capa media adherida hacia el plástico. Los cortes de la arteria se mantuvieron así hasta asegurar su adherencia a la placa y después se le adicionó medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) adicionado de penicilina y estreptomina.

Después de 10 días de crecimiento a los cultivos se les realizó el primer pase en placas nuevas con medio acondicionado (1:1 medio fresco con medio DMEM filtrado). A partir de este pase se realizó la separación y observación de las clonas que dieron origen a las colonias, dejándolas crecer por otros 10 días. Cada colonia derivada de una clona fue cultivada en una nueva placa de cultivo de 100 mm a una densidad de 500 cel/cm², dejándolas proliferar por dos semanas más. Durante el último pase se realizó la caracterización morfológica y de marcadores de cada una de las clonas, para esto se utilizaron técnicas inmunohistoquímicas

con dos anticuerpos marcadores, uno de células de músculo liso (anti alfa SM-actina) y el otro de células endoteliales (anti factor de Von Willbrand) teniendo que tener cultivo positivos a SM-actina y negativos a Factor de Von Willbrand.

INMUNOHISTOQUÍMICA

Las muestras de cultivo fueron procesadas por Inmunohistoquímica usando el método de detección Envisión de Dako (Dako Envision System-Peroxidase. CA. USA). Se utilizaron anticuerpos policlonales específicos contra anti alfa SM-actina, marcador específico de células de músculo liso y anti factor de Von Willbrand, marcado de células endoteliales, para observar la expresión o no expresión de cada proteína dentro de las células del cultivo. Las imágenes fueron capturadas en un microscopio óptico.

IDENTIFICACIÓN DEL AGONISTA FISIOLÓGICO RESPONSABLE DE LOS CAMBIOS

Con el fin de demostrar que la testosterona es el agonista fisiológico responsable de los cambios antes observados se realizaron estudios tanto funcionales como moleculares con ratas macho de la cepa Wistar divididas en tres grupos: orquiectomizadas, sham operadas y orquiectomizadas con reemplazo de testosterona, las cuales fueron mantenidas en el bioterio del centro de investigaciones y de estudios avanzados del IPN, con un ciclo luz/oscuridad de

12:12, con agua y alimento *ad libitum*. Los experimentos se condujeron bajo protocolos aprobados por el comité de investigación animal de la institución.

ORQUIECTOMÍA BILATERAL

Para realizar la privación de la testosterona se realizaron orquiectomías bilaterales en ratas de 3 semanas las cuales fueron anestesiadas con una mezcla de xilacina y ketamina, una vez anestesiadas se procedió a realizar una pequeña incisión en el escroto (aprox. 5mm) denominada a “testículo abierto”, con unas pinzas se separó el tejido conjuntivo de la bolsa escrotal para exponer el testículo al corte de sus capa serosa, las cuales fueron rasgadas con una hoja de bisturí, se realizó un poco de presión para que el testículo saliera de sus capas, una vez expuestos los testículos se ligó el cordón espermático y los vasos sanguíneos de cada uno con ligadura absorbible 4-0 para evitar hemorragias al momento del corte. Una vez retirados los testículos se procedió a suturar la incisión realizada en el escroto. Al grupo sham operado se le realizó el mismo procedimiento sin la ligadura del cordón espermático y sin el corte de los testículos.

REEMPLAZO DE TESTOSTERONA

El reemplazo de testosterona se realizó desde el primer día de operadas las ratas para evitar la influencia de la falta de esta hormona, se utilizó propionato de testosterona diluido en aceite de maíz administrado una vez al día por vía subcutánea a dosis fisiológicas (de 1 a 2 mg/kg, dependiendo de la edad). Para el

caso de las ratas sham operadas y las orquiectomizadas sin reemplazo se les inyectara la misma cantidad de aceite de maíz como control. Esta terapia se continuó durante seis semanas hasta que las ratas alcanzaron las nueve semanas de edad. Transcurrido este tiempo las ratas se sacrificaron por medio de decapitación y se les extrajo la aorta para realizar los estudios funcionales y moleculares que se realizaron durante la primera etapa de esta tesis.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

1. Con el objeto de evaluar si el músculo liso pierde la capacidad de relajar en respuesta a los receptores beta adrenérgicos durante la maduración se utilizaron anillos de aorta sin endotelio provenientes de animales control de 3 y 9 semanas de edad, comparando los resultados de administrar isoproterenol en los anillos previamente contraídos con Fen (10^{-6} M).

2. El siguiente paso es corroborar que los receptores beta adrenérgicos se expresen en cantidades similares en los dos grupos de edad y que estos aún se mantenga funcionales, para lo cual se realizaron ensayos de western-blot para cada subtipo y para el subtipo β_2 fosforilado.

3. Para explorar el mecanismo funcional que se altera en el músculo liso durante la maduración se utilizaron anillos aórticos sin endotelio de las diferentes edades, realizando una serie de curvas concentración respuesta en presencia y

ausencia de inhibidores específicos de las principales vías de señalización descritas para estos receptores, empezando con la vía clásica de AMPc.

4. Para explicar las posibles diferencias encontradas en el punto anterior éstas se corroboraron, cuantificando por medio PCR en tiempo real la expresión de los componentes principales de la vía de señalización involucrada en cada etapa de desarrollo, enfocándonos en los subtipos de adenilato ciclasa reguladas por calcio y en las proteínas reguladoras del calcio citoplasmático.

5. Para establecer un modelo de estudio en el que se pudieran realizar diferentes ensayos como la cuantificación de calcio citoplasmático y la realización de ensayos de expresión por medio del gen reportero para futuros trabajos se procedió a estandarizar cultivos celulares primarios provenientes de aorta de ratas de 3 y 9 semanas de edad, corroborando que dichos cultivos fueran de músculo liso y no de endotelio por la expresión de SM-actina y la ausencia de factor de Von Willbrand.

6. Con el objetivo de demostrar que la testosterona es el agonista fisiológico de los cambios en la actividad de los receptores beta adrenérgicos, se realizaron curvas concentración respuesta a isoproterenol en anillos aórticos sin endotelio provenientes de animales orquiectomizados con y sin reemplazo hormonal así como de animales Sham operados.

7. Con el propósito de aportar información adicional sobre el mecanismo por el cual la testosterona esta influenciando el cambio en la función de los receptores beta adrenérgicos, se realizó la metodología antes descrita tanto de estudios funcionales como moleculares pero utilizando como fuente de tejido las arterias provenientes de animales orquiectomizados con y sin reemplazo de testosterona.

RESULTADOS

INFLUENCIA DE LA MADURACIÓN DE LA RATA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LOS RECEPTORES BETA ADRENÉRGICOS EN EL MÚSCULO LISO

El primer paso fue corroborar que el músculo liso perdía la capacidad de relajar durante la maduración de la rata, recordado los antecedentes de maestría mencionados en la figura 4, cuando se comparan los datos de relajación de una arteria completa (con músculo liso y endotelio) proveniente de una rata de 3 semanas contra una de 9 semanas la pérdida de la función es relativamente poca, pasando de un $78.02 \pm 1.45\%$ a un $65.64 \pm 0.77\%$, lo que le permite conservar aún la función fisiológica. Sin embargo, cuando nos enfocamos solo en el músculo liso de la arteria, se obtienen resultados como el que se aprecia en la figura 9, en donde se muestra una curva concentración respuesta (C-R) a isoproterenol (ISO), un agonista beta adrenérgico no selectivo en anillos de aorta sin endotelio provenientes de ratas de 3 y 9 semanas de edad, donde se observa que la capacidad de relajación del músculo liso se reduce considerablemente de un $86.18 \pm 1.29\%$ hasta un $14.52 \pm 3.38\%$, demostrando de esta manera que el músculo liso durante la maduración de la rata pierde la capacidad para relajar en respuesta a los receptores beta adrenérgicos.

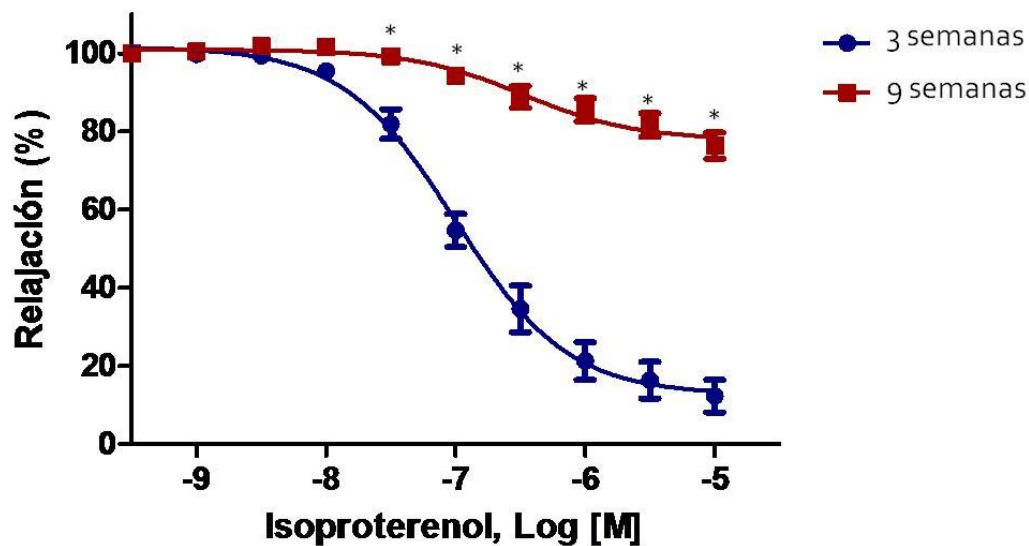


Figura 9. Curva concentración respuesta a isoproterenol (10^{-9} a 10^{-5} M) en anillos de aorta torácica sin endotelio, previa contracción con fenilefrina 10^{-6} M. Cada punto representa la media \pm E.E.M; n=6; * $p \leq 0.05$.

ESPECIFICIDAD EN LA PERDIDA DE FUNCIÓN β AR

Una vez observado este fenómeno nos dimos a la tarea de corroborar que la pérdida de la función relajante fuera específica de la vía de los β AR y no que fuera una incapacidad del músculo a relajar sin importar el estímulo que recibiera, para esto se realizaron C-R a nitroprusiato sódico (NPS), éste resultado se presenta en la figura 10, mostrando que el músculo liso tanto de las arterias provenientes de las ratas de 3 semanas como las de 9 semanas aún conservan la capacidad de relajar bajo el estímulo correcto obteniendo los efectos máximos (E_{max}) de $104.39 \pm 1.9\%$ para la rata de 3 semanas y de $112.7 \pm 3.0\%$ para la de 9 semanas, sin que haya diferencias significativas entre las dos edades.

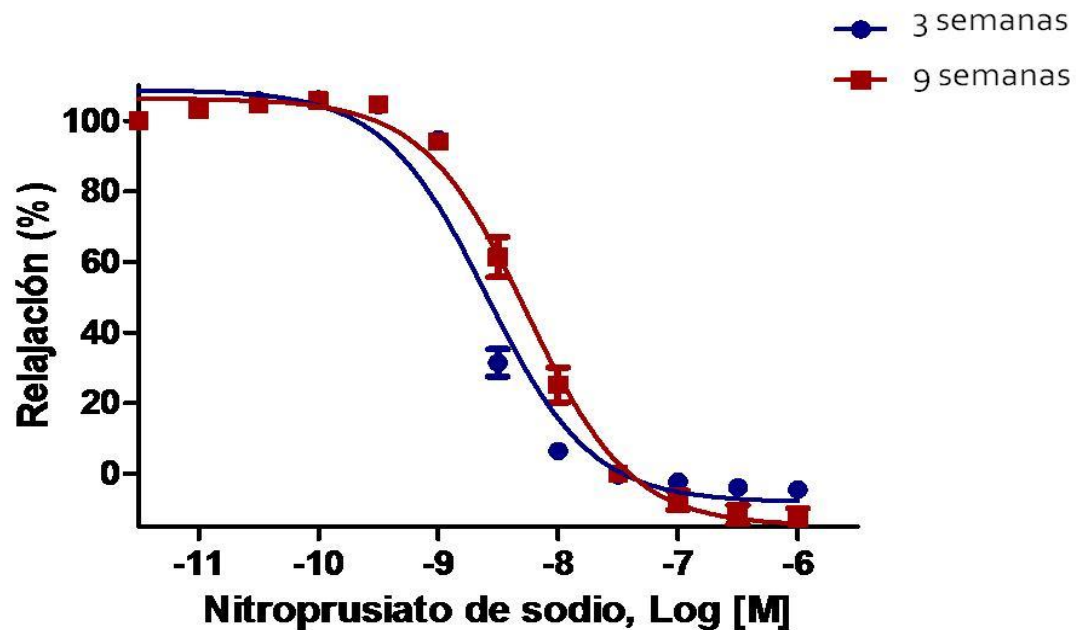


Figura 10. Curva concentración respuesta a nitroprusiato sódico (10^{-11} a 10^{-6} M) en anillos de aorta torácica sin endotelio, previa contracción con fenilefrina 10^{-6} M. Cada punto representa la media \pm E.E.M; n=6; *p \leq 0.05.

CUANTIFICACIÓN DE LOS β AR A NIVEL DE PROTEÍNA

Una de las primeras causas que puede estar desencadenando la pérdida de la función relajante es la pérdida del propio receptor, para analizar este fenómeno utilizamos extractos de aorta libre de células endoteliales (comprobado por la ausencia de respuesta a factor de Von Willbrand, resultados no mostrados) para cuantificar por medio de western blot la cantidad de receptores presentes en cada grupo de edad, el resultado se muestra en la figura 11, donde el inciso A nos muestra una membrana representativa con la expresión del receptor β 1 y actina en los dos grupos de edad, mientras que la cuantificación densitométrica se

muestra en la gráfica de barras, encontrando que la densidad relativa pasa de un 1.15 ± 0.1 UA a un 0.95 ± 0.2 UA en las ratas de 3 y 9 semanas respectivamente, sin que haya diferencias significativas en la expresión de dicho subtipo, lo mismo pasa para el subtipo β_2 que se presenta en el inciso B, donde la expresión relativa pasa de 1.17 ± 0.1 a las 3 semanas a un 1.03 ± 0.15 UA a las 9 semanas, sin que haya diferencias significativas.

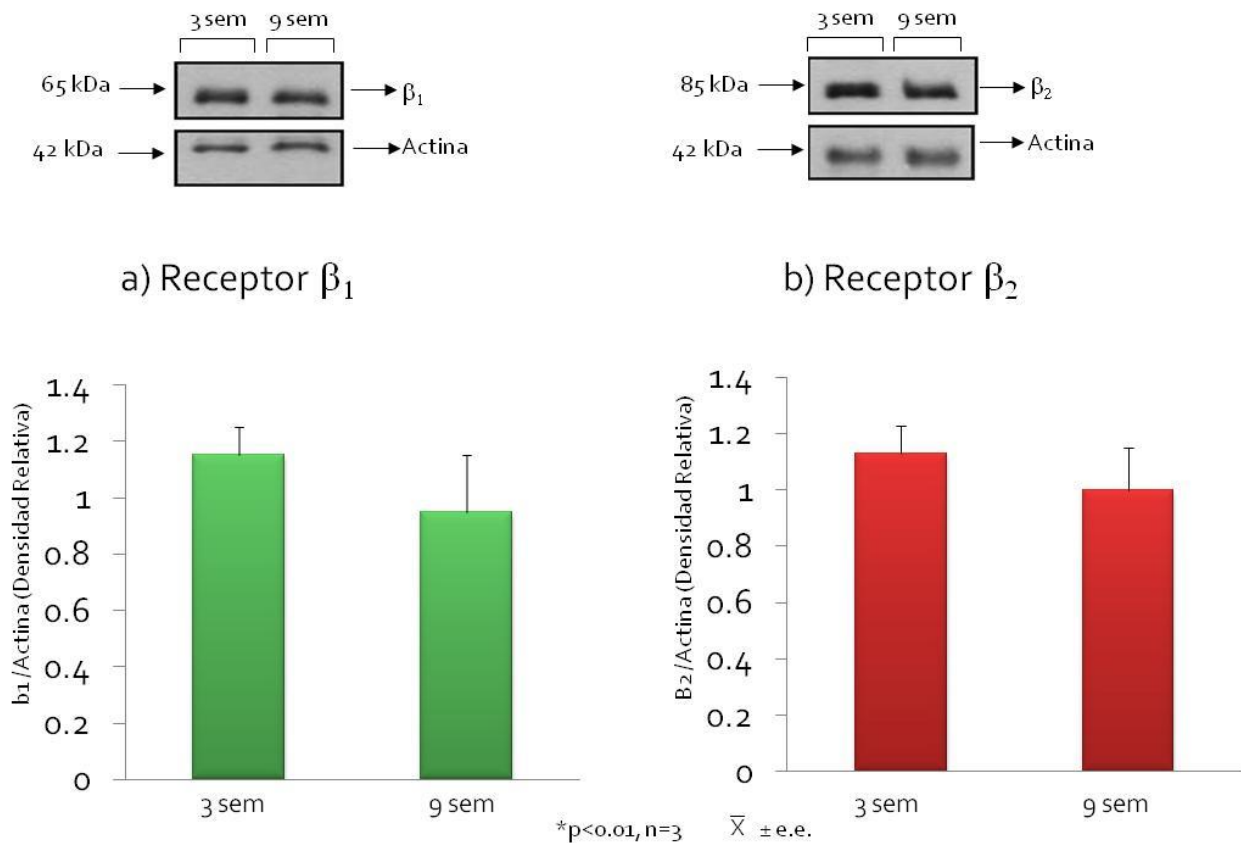


Figura 11. Niveles de expresión relativa de cada subtipo beta adrenérgico en la aorta de la rata en los diferentes grupos de edad. Cada barra representa la media \pm E.E.M. $n=3$ * $p \leq 0.01$

PARTICIPACIÓN FUNCIONAL DE CADA SUBTIPO BETA ADRENÉRGICO

Para demostrar que subtipo de β AR es el que participa funcionalmente en la relajación del músculo liso se realizaron ensayos in vitro con antagonistas para cada uno de ellos, CGP 20710A para el subtipo β 1, ICI 118551 para el subtipo β 2 y SR 59230A para el subtipo β 3, los resultados se muestra en la figura 12, donde el inciso A pertenece a los datos obtenidos para el subtipo β 1, observando que en las ratas de 3 semanas el E_{max} llega a un $26.27 \pm 3.21\%$ sin inhibidor mientras que con inhibidor la relajación es de $28.87 \pm 1.98\%$ por lo que no hay diferencias significativas, por otro lado el inciso B muestra los datos obtenidos con el uso del antagonista β 2, donde la relajación se inhibe de forma competitiva modificando el log de la CE_{50} pasando de un -7.63 sin inhibidor a un -6.22 con inhibidor en el grupo de 3 semanas y de un -6.35 sin inhibidor a un -5.51 con inhibidor en las ratas de 9 semanas, mostrando en los dos grupos diferencias significativas; por último en el ensayo con el antagonista β 3 mostrado en el inciso C, se demuestra que la relajación no se modifica en ninguno de los dos grupos de edad ya que pasa de un $18.45 \pm 5.35\%$ sin inhibidor a un $24.57 \pm 4.89\%$ con inhibidor en el grupo de 3 semanas y en el grupo de 9 semanas pasa de un $42.70 \pm 5.23\%$ sin inhibidor a un $38.12 \pm 3.87\%$ con inhibidor, sin que existan diferencia significativas entre los grupos. Es importante mencionar que a partir de este punto solo nos enfocaremos en el subtipo β 2 por los resultados anteriores.

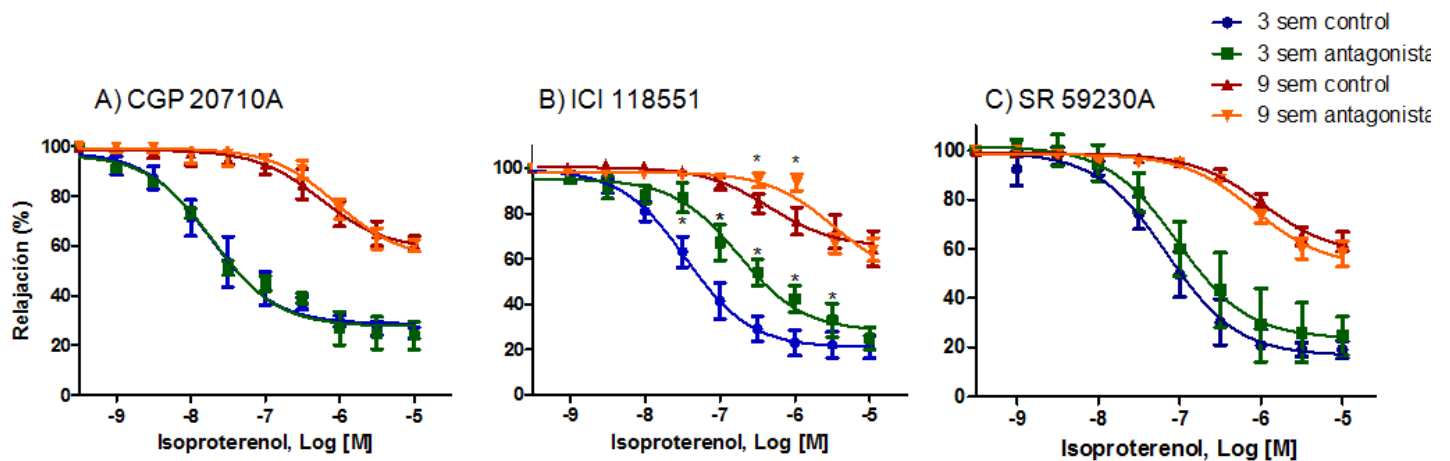


Figura 12. Efecto de diferentes antagonistas beta adrenérgicos sobre la relajación inducida por isoproterenol (10^{-9} a 10^{-5} M) en anillos de aorta torácica sin endotelio, previa contracción con fenilefrina 10^{-6} M. A) en presencia de CGP 20710A inhibidor β_1 , B) en presencia de ICI 118551 antagonista β_2 y C) en presencia de SR 59230A antagonista β_3 . Cada punto representa la media \pm E.E.M; $n=6$; $*p \leq 0.05$.

PRUEBA DE FUNCIONALIDAD DE LOS β_2 POR FOSFORILACIÓN

Después se realizó un ensayo de fosforilación del receptor en los residuos de serina 355 y 356, utilizando un anticuerpo específico para la forma fosforilada del subtipo β_2 , el experimento se realizó tomando como grupo control aortas sin tratamiento y dos grupos con 15 y 30 minutos de tratamiento con ISO. En la figura 13 se muestra una membrana representativa de 3 experimentos para el grupo de 3 semanas y otra para el grupo de 9 semanas mientras que el análisis densitométrico se muestra en la grafica de barras. Los resultados muestran que la fosforilación del receptor es baja en condiciones basales ya que su expresión relativa es de 0.33 ± 0.21 a las 3 semanas y de 0.16 ± 0.09 UA a las 9 semanas, sin que haya diferencias significativas entre los dos grupos, tras 15 minutos de

estimulación con ISO, la cantidad de receptor $\beta 2$ fosforilado se incrementa de manera significativa cuando se compara con el grupo sin tratamiento en las dos edades pasando a una expresión relativa de 0.97 ± 0.19 para el grupo de 3 semanas y de 1.21 ± 0.18 UA para las 9 semanas, por último se observa que tras 30 minutos de estimulación la cantidad de receptor $\beta 2$ que se fosforila es aún más grande llegando a una expresión relativa de 1.50 ± 0.09 en 3 semanas y 1.77 ± 0.11 UA a las 9 semanas, cabe destacar que no existe diferencias estadísticamente significativas cuando se comparan las ratas de 3 semanas con las ratas de 9 semanas en los diferentes grupos de tratamiento.

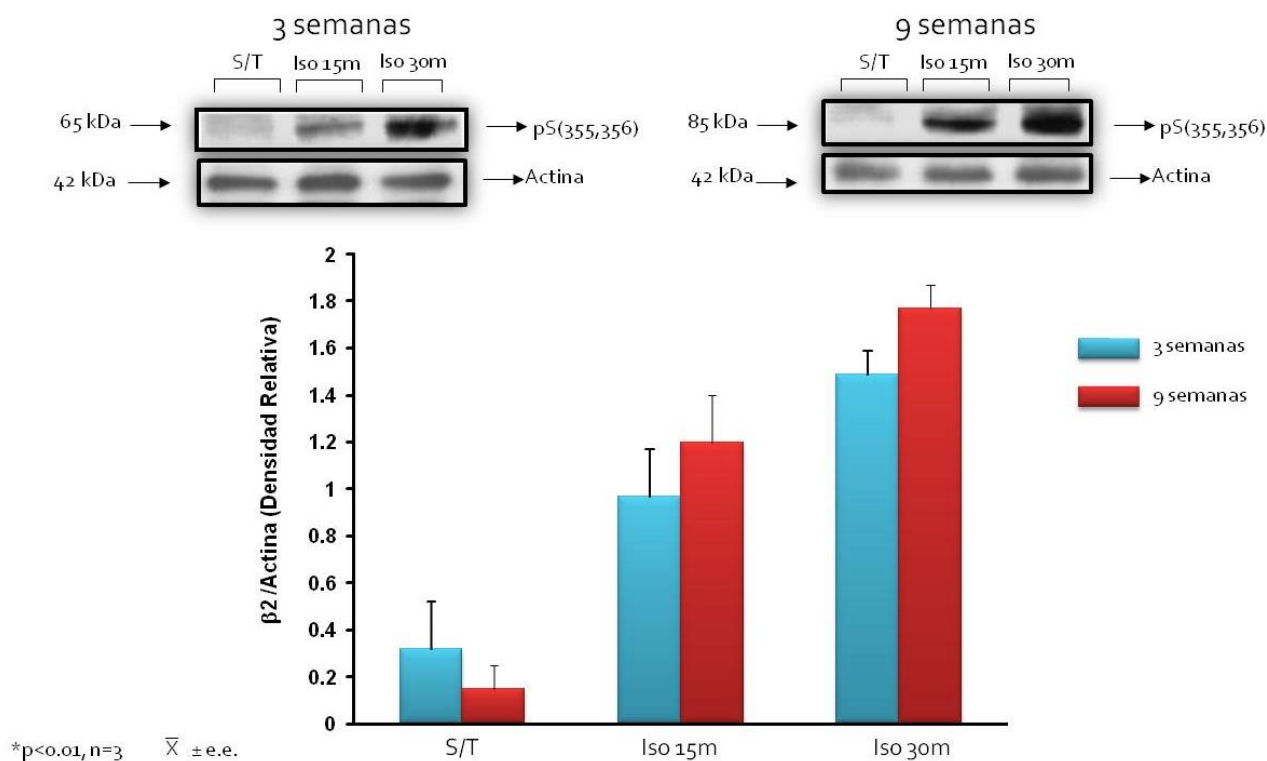


Figura 13. Niveles de expresión relativa del subtipo $\beta 2$ adrenérgico fosforilado en sus residuos 355 y 356, en la aorta de la rata en los diferentes grupos de edad durante la cinética de estimulación por ligando. Cada barra representa la media \pm E.E.M. n=3 *p<0.01

PARTICIPACIÓN DIFERENCIAL DEL AMPc EN LAS DIFERENTES EDADES

El siguiente paso fue realizar ensayos funcionales con diferentes antagonistas específicos de la vía de señalización de β AR, empezando con un inhibidor de adenilato ciclasa, el SQ 22536. Al comparar los resultados en la figura 14, se muestra que en las ratas de 3 semanas la relajación producida en respuesta a los β AR se inhibe pasando de un E_{max} de $89.04 \pm 1.98\%$ hasta uno de $34.86 \pm 2.94\%$ mientras que a las 9 semanas la relajación no se modifica significativamente ya que el E_{max} pasa de $19.20 \pm 2.74\%$ hasta un $23.48 \pm 4.78\%$.

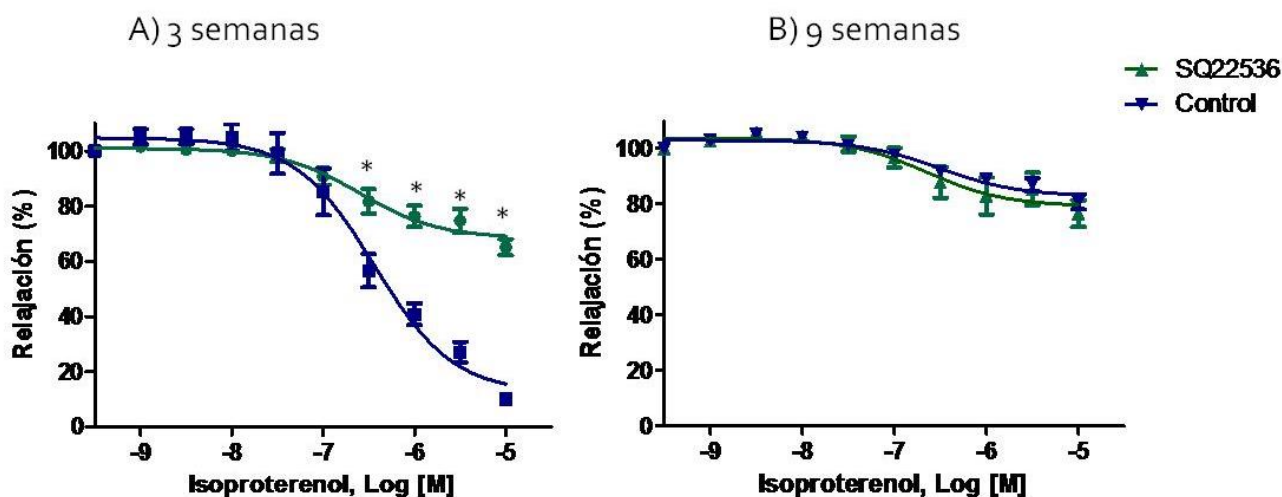


Figura 14. Efecto del SQ 22536 sobre la relajación inducida por isoproterenol (10^{-9} a 10^{-5} M) en anillos de aorta torácica sin endotelio, previa contracción con fenilefrina 10^{-6} M, presentando en el inciso A el grupo de 3 semanas de edad y en el inciso B el grupo de 9 semanas. Cada punto representa la media \pm E.E.M; $n=6$; $*p \leq 0.05$.

Aunado al resultado anterior se realizaron ensayos con H-89 un inhibidor de la PKA el cual inhibió la respuesta relajante en las ratas de 3 semanas disminuyendo el E_{max} de 75.46 ± 7.48 hasta un $50.61 \pm 3.44\%$ mostrando diferencias significativas, mientras que en las ratas de 9 semanas la respuesta relajante no se modificó significativamente ya que el E_{max} paso de un 33.22 ± 7.69 hasta un $22.75 \pm 2.12\%$, sin modificar la CE_{50} (Figura 15).

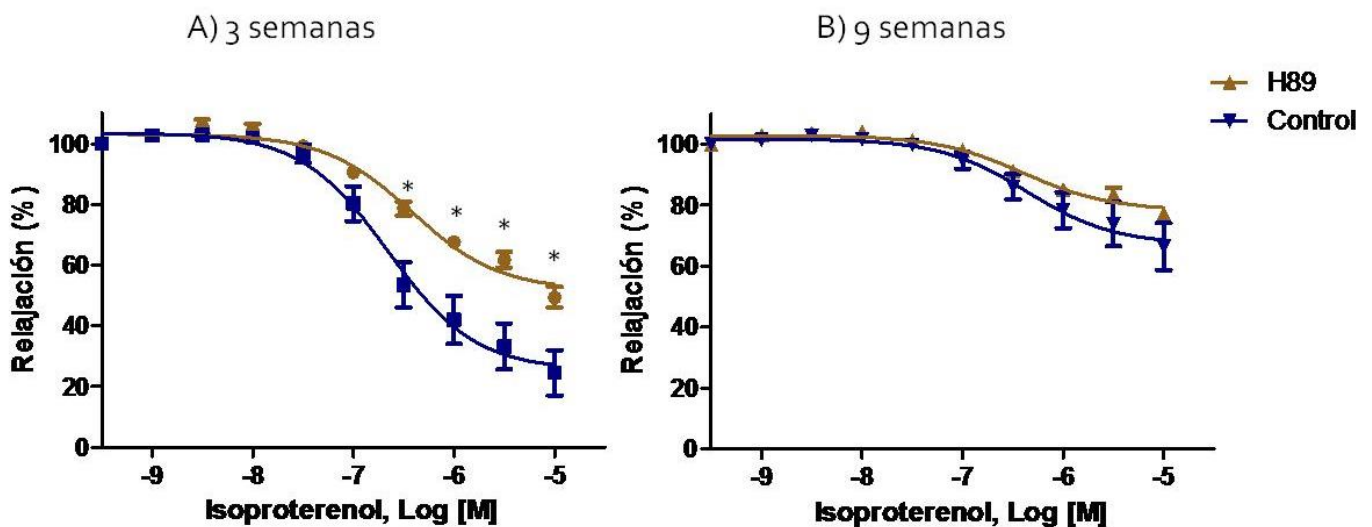


Figura 15. Efecto del H-89 sobre la relajación inducida por isoproterenol (10^{-9} a 10^{-5} M) en anillos de aorta torácica sin endotelio, previa contracción con fenilefrina 10^{-6} M, presentando en el inciso A el grupo de 3 semanas de edad y en el inciso B el grupo de 9 semanas. Cada punto representa la media \pm E.E.M; n=6; * $p \leq 0.05$.

CUANTIFICACIÓN DE AMPc DURANTE LA MADURACIÓN DE LA RATA

Posteriormente se procedió a cuantificar la producción de AMPc en respuesta a isoproterenol, obteniendo aortas de los dos grupo de edades, los resultados de dicho experimento se muestran en la figura 16, donde se observa que la cantidad de AMPc que se produce durante una curva C-R a isoproterenol disminuye drásticamente con la edad ya que en las ratas de 3 semanas se producen 20.14 ± 1.45 pmol/ml de AMPc mientras que en las ratas de 9 semanas solo se producen 2.89 ± 0.95 pmol/ml de AMPc. Para analizar la participación de las PDE en este fenómeno se analizó la producción de AMPC adicionando dos grupos más con presencia de teofilina, un inhibidor de PDE4 no selectivo, donde se muestra que la presencia de este inhibidor no revierte la diferencia encontrada durante la maduración ya que el grupo de 3 semanas alcanza 27.76 ± 4.02 pmol/ml de AMPc mientras que en las ratas de 9 semanas solo se producen 9.23 ± 0.48 pmol/ml de AMPc, conservando la diferencia significativa entre ambos grupos.

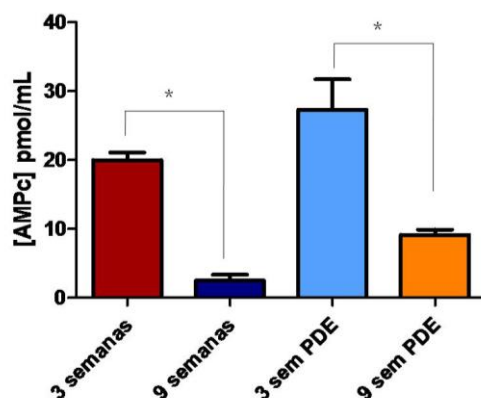


Figura 16. Cuantificación de AMPc en tejido de aorta de rata tratado con isoproterenol (10^{-9} a 10^{-5} M) en los diferentes grupos de edad en presencia o ausencia de teofilina un inhibidor de PDE4. Cada barra representa la media \pm E.E.M. n=3 *p<0.01

PRODUCCIÓN DE AMP_c EN RESPUESTA A UN AGONISTA EXÓGENO

El siguiente experimento se realizó con un agonista artificial no selectivo para la adenilato ciclasa, la forskolina. En ensayos de órgano aislado se comprobó que tanto las ratas de 3 semanas como las ratas de 9 semanas expresan y tienen funcional por lo menos una adenilato ciclasa que hace que la relajación que alcancen sea del $123 \pm 3.92\%$ y $101.18 \pm 1.16\%$ respectivamente, mientras que el log de CE₅₀ es de -6.73 en las ratas de 3 semanas y de -6.76 para las ratas de 9 semanas, sin que haya diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos de edad (figura 17).

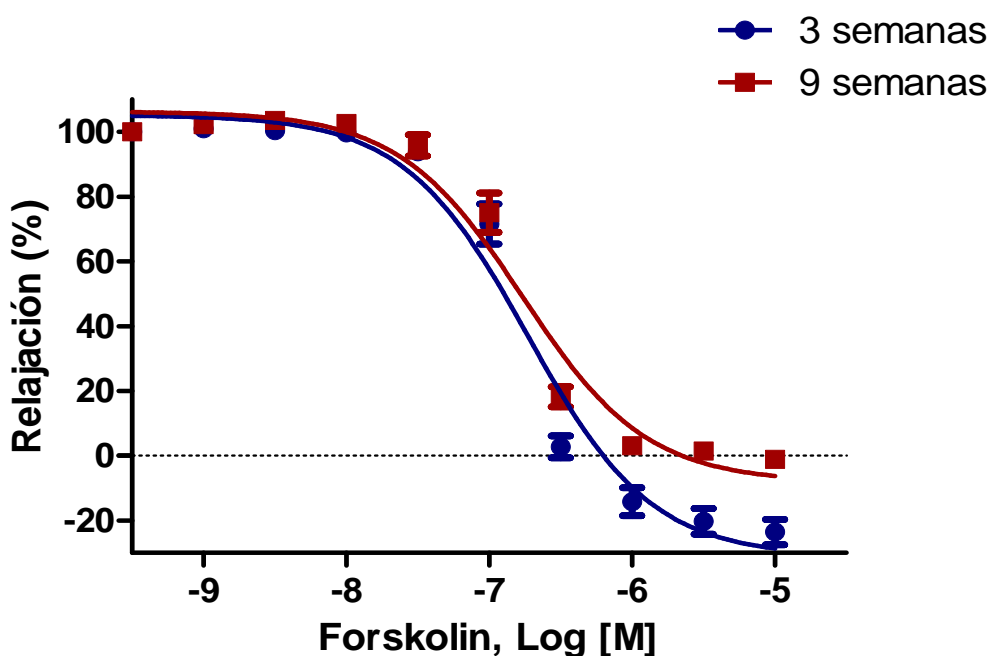


Figura 17. Curva concentración respuesta a forskolina (10^{-9} a 10^{-5} M) en anillos de aorta torácica sin endotelio, previa contracción con fenilefrina 10^{-6} M. Cada punto representa la media \pm E.E.M; n=6; * $p \leq 0.05$.

CUANTIFICACIÓN DEL ARNm DE LOS SUBTIPOS DE ADENILATO CICLASA

Para corroborar si existen cambios en la expresión de los subtipos de adenilato ciclasa que se expresan en el músculo liso, se realizó la cuantificación de ARNm por medio de qPCR, obteniendo los resultados siguientes. En la figura 18 se muestra un gel representativo de agarosa al 2% donde se corrieron los productos de la qPCR, para corroborar el tamaño del amplificado, observando que para los tres subtipos el tamaño es el teórico esperado (180, 171 y 72 pb), además se presenta la gráfica de barras por el método de delta-delta Ct. En esta gráfica se observa que el subtipo AC3 disminuye de manera estadísticamente significativa la cantidad de transcrito cuando la rata alcanza las 9 semanas de edad, ya que la expresión relativa disminuye hasta 0.61 ± 0.20 UA al compararlo con el grupo control de 3 semanas, por otro lado los subtipo AC5 y AC6 aumenta su expresión relativa hasta 1.79 ± 0.31 UA y hasta 1.72 ± 0.15 UA, respectivamente. Obteniendo diferencia estadísticamente significativas al comparar el grupo control de 3 semanas con el grupo de 9 semanas en todos los subtipos.

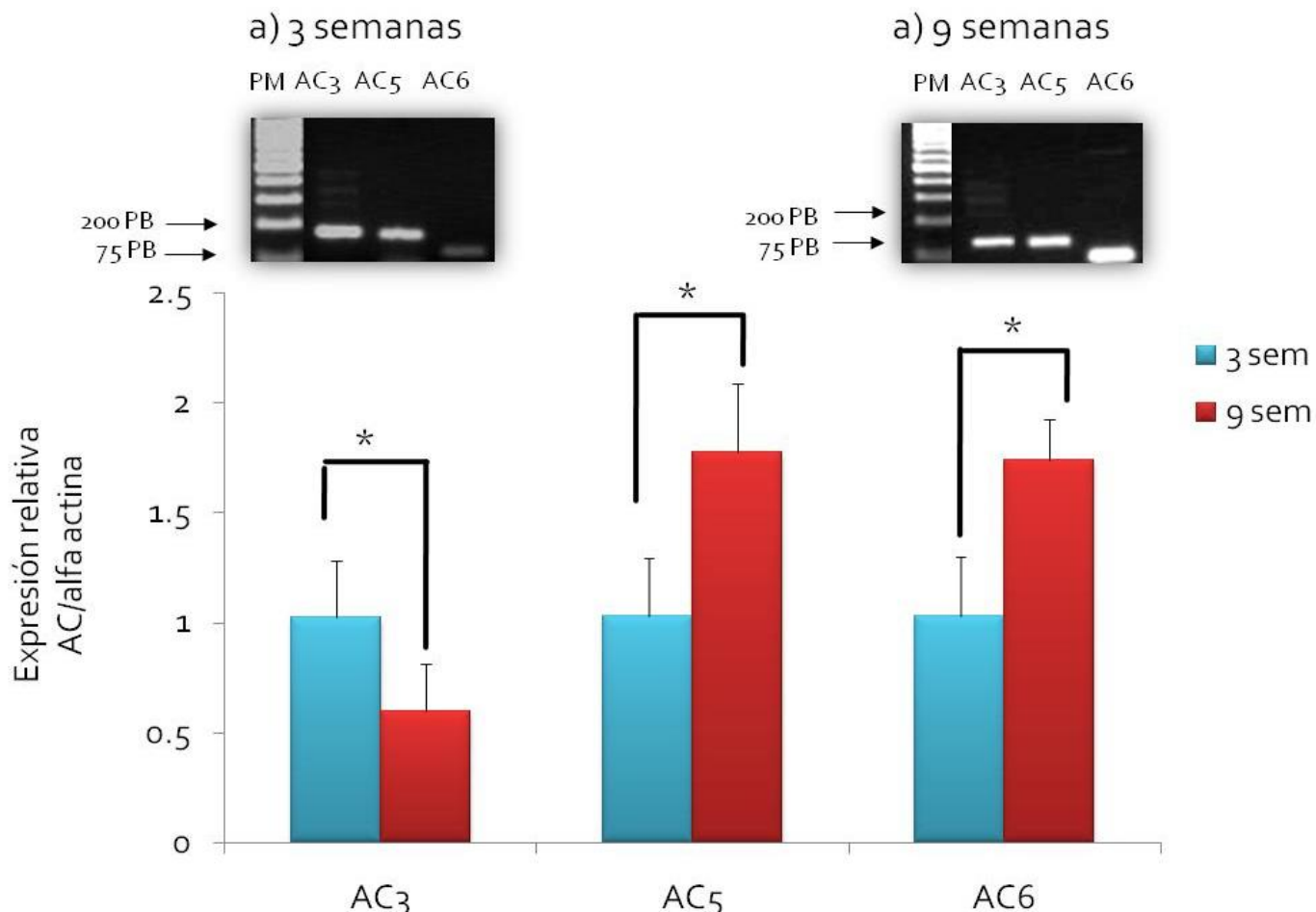


Figura 18. Análisis comparativo de la abundancia de transcrito de las isoformas AC3, AC5 y AC6. La qPCR se realizó con ADNc de tejido de ratas de 3 y 9 semanas de edad. Los valores de la expresión relativa fueron calculados por el método de delta-delta Ct usando el valor medio de 3 semanas como calibrador o control. Todos los valores fueron normalizados. Cada barra representa la media \pm 1 SD con n=3.

CUANTIFICACIÓN DEL ARNm DE LAS PROTEÍNAS REGULADORAS DEL CALCIO

Considerando a las proteínas reguladoras del flujo de calcio que están directamente relacionadas con la vía de señalización de los β AR, nos enfocamos en tres de ellas, el NCX, la proteína SERCA y el canal RyR3. Para cuantificar el

transcrito de estas proteínas se procedió a realizar ensayos de qPCR en los cuales se utilizó la expresión de actina y el grupo de 3 semanas de edad como punto de control, es importante mencionar que todos los grupos se encuentran en condiciones basales, es decir, sin estimulación con ISO. Analizando la figura 19, podemos observar que el transcrito de las proteínas NCX y SERCA, tienden a disminuir su expresión pasando de 1.00 ± 0.17 UA en las ratas de 3 semanas a 0.712 ± 0.18 UA en las ratas de 9 semanas para el NCX y de 1.00 ± 0.25 UA en 3 semanas a 0.70 ± 0.15 UA en las ratas de 9 semanas para la proteína SERCA, sin embargo, estas diferencias solo se mantienen como tendencias ya que no son estadísticamente significativas, por otro lado la proteína RyR3 aumenta significativamente su tasa de transcripción durante la maduración de la rata, pasando de 1.00 ± 0.38 UA en las ratas de 3 semanas hasta 2.79 ± 0.48 UA en las ratas de 9 semanas.

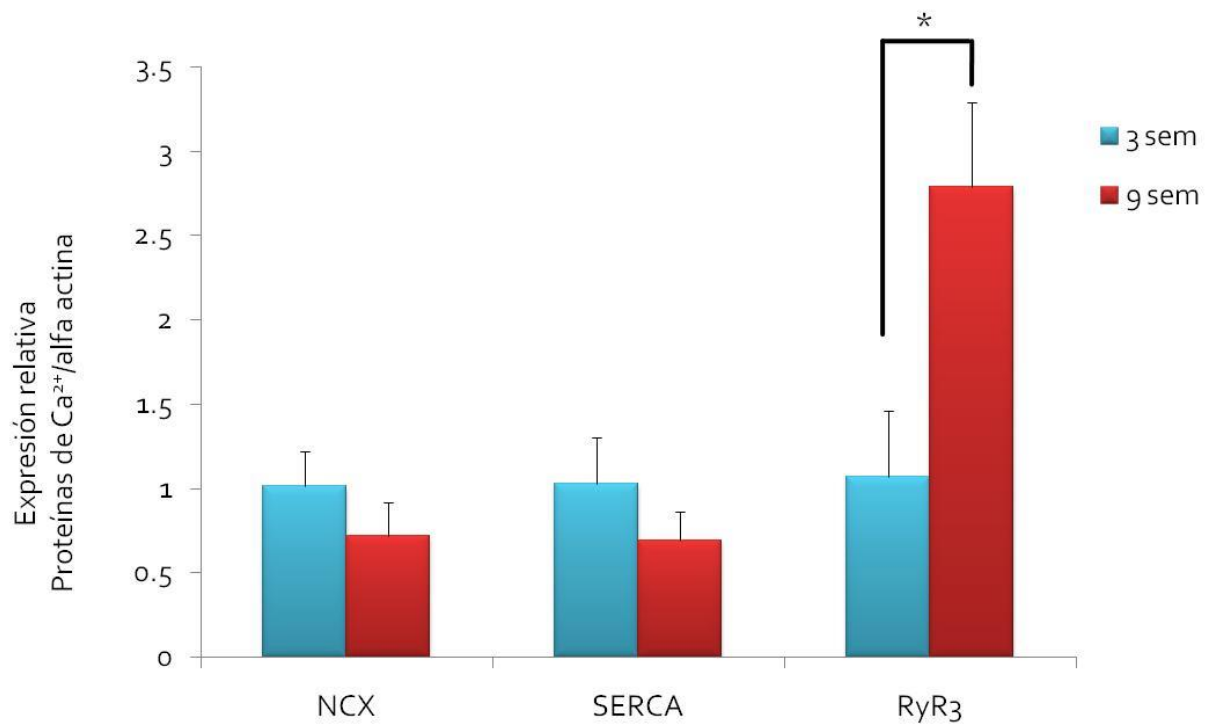


Figura 19. Análisis comparativo de la abundancia de transcrito de las proteínas reguladoras del calcio citoplasmático NCX, SERCA y RyR3. La qPCR se realizó con ADNc de tejido de ratas de 3 y 9 semanas de edad. Los valores de la expresión relativa fueron calculados por el método de delta–delta Ct usando el valor medio de 3 semanas como calibrador o control. Todos los valores fueron normalizados. Cada barra representa la media \pm 1 SD con $n=3$.

OBTENCIÓN DE CULTIVO PRIMARIO DE CELULAS DE MÚSCULO LISO

Durante esté trabajo también se procedió a estandarizar la técnica para obtener cultivos primarios a partir de clonas, tomando como base la técnica reportada por Schutzer en el 2011 obtuvimos cultivos purificados de células de músculo liso.

En la figura 20 se aprecian imágenes representativas de los cultivos obtenidos por clonas, las tinciones se realizaron por dos metodologías, tanto por inmunohistoquímicas como por inmunofluorescencia, se muestran que las células obtenidas tanto del grupo de 3 semanas como el de 9 semanas la señal es negativa para el factor de Von Willbrand, mientras que las células son positivas a SM-actina evidenciado por inmunofluorescencia, es de hacer notar la morfología característica de células musculares las cuales son alargadas y nucleadas, es importante mencionar que de estos cultivos solo se obtuvieron dos lotes de cada grupo por falta de tiempo, pero una vez estandarizado el método ya es posible obtener cultivos de manera más sencilla.



Figura 20. Cultivos primarios de células de músculo liso obtenidos por clonas en las diferentes edades. En el panel superior se muestran unas imágenes representativas de la tinción negativa a factor de Von Willbrand y positiva por inmunofluorescencia a SM-actina, mientras que en el panel inferior la respuesta negativa a factor de Von Willbrand se denota por la falta de color y la prueba positiva a SM-actina.

IDENTIFICACIÓN DEL AGONISTA FISIOLÓGICO RESPONSABLE DE DETONAR LOS CAMBIOS

Siguiendo con nuestros resultados para investigar el posible papel de la testosterona en este fenómeno se obtuvieron grupos de ratas con orquiectomías bilaterales con o sin terapia de reemplazo de testosterona durante 6 semanas.

EXPRESIÓN DE LOS SUBTIPO DE β AR EN ANIMALES ORQUIECTOMIZADOS

Una vez obtenidos los grupos a estudiar que fueron tres, sham operados, orquiectomizados sin testosterona y orquiectomizados con reemplazo de testosterona, se procedió a realizar un ensayo para observar si la operación modificaba los niveles de expresión de los β AR. Estos resultados se presentan en la figura 21 donde se muestra una imagen representativa de la expresión del subtipo β 1 (banda de 65kDa) y β 2 (banda de 85kDa) en los tres grupos que se manejan, la cuantificación por densidad relativa de las bandas nos deja ver que tanto el subtipo β 1 como el subtipo β 2 no modifican su expresión de manera significativa en ningún grupo ya que esta tiene valores para el subtipo β 1 de 0.87 ± 0.1 , 0.73 ± 0.2 y 0.80 ± 0.1 UA para el grupo sham, orquiectomizado sin testosterona y orquiectomizado con testosterona, respectivamente, mientras que para el subtipo β 2 la expresión es de de 1.70 ± 0.1 , 1.65 ± 0.2 y 2.05 ± 0.3 UA para el grupo sham, orquiectomizado sin testosterona y orquiectomizado con testosterona, respectivamente.

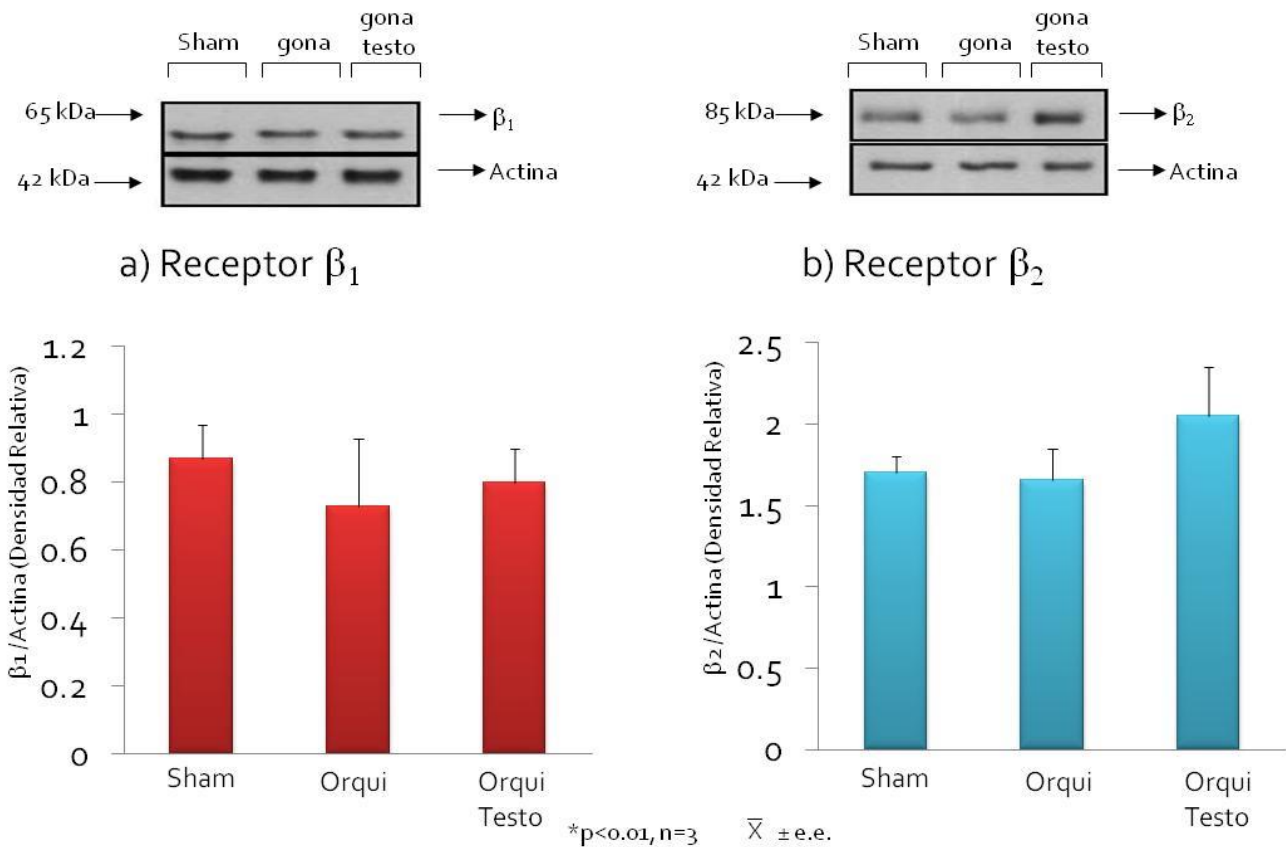


Figura 21. Influencia de la testosterona en los niveles de expresión relativa de cada subtipo beta adrenérgico en aortas provenientes de ratas de los diferentes grupos. a) se muestran los resultados para el subtipo β_1 y b) se muestran los resultados del subtipo β_2 . Cada barra representa la media \pm E.E.M. n=3 *p \leq 0.01

ENSAYO IN VITRO DE LA FUNCIÓN RELAJANTE EN ANIMALES ORQUIECTOMIZADOS

Mediante ensayos funcionales se determinó el efecto que tiene la orquiectomía, resultados que se muestran en la figura 22 donde se puede apreciar que los grupos control de 3 semanas y 9 semanas tienen E_{max} de $101.14 \pm 6.38\%$ y $54.65 \pm 5.37\%$, respectivamente, mientras que el grupo de ratas

orquiectomizadas sin testosterona recupera la relajación hasta alcanzar un $89.05 \pm 2.91\%$ mostrando diferencias significativas al ser comparados los datos con los del grupo control de 9 semanas, por otro lado el grupo de ratas sham operadas tiene un E_{max} de $49.86 \pm 7.85\%$. y no presenta diferencias significativas al compararlo con el grupo control pero si al compararlo con el grupo de ratas orquiectomizadas.

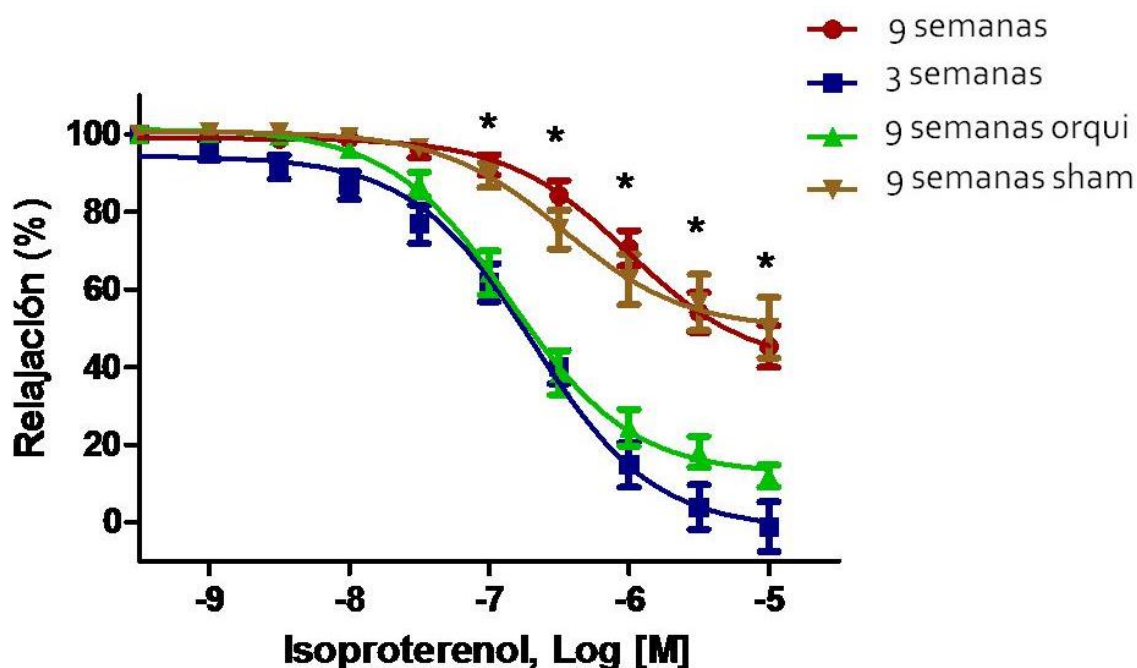


Figura 22. Efecto de la orquiectomía sobre la relajación inducida por isoproterenol (10^{-9} a 10^{-5} M) en anillos de aorta torácica sin endotelio, previa contracción con fenilefrina 10^{-6} M. Cada punto representa la media \pm E.E.M; n=6; *p<0.05.

Para determinar que la ausencia de la testosterona es la verdadera responsable de impedir la pérdida de la relajación y no cualquier otra causa derivada de la operación se analizó el grupo orquiectomizado con reemplazo de testosterona, obteniendo los siguientes resultados.

Como habíamos obtenido anteriormente en las ratas orquiectomizadas sin reemplazo de testosterona, la respuesta relajante a las nueve semanas se conserva alcanzando un $76.63 \pm 5.03\%$ de relajación mientras que en el grupo de ratas orquiectomizadas con reemplazo de testosterona la respuesta relajante disminuye llegando hasta un E_{max} de $35.55 \pm 4.61\%$, mostrando diferencias significativas por la presencia de testosterona (Figura 23).

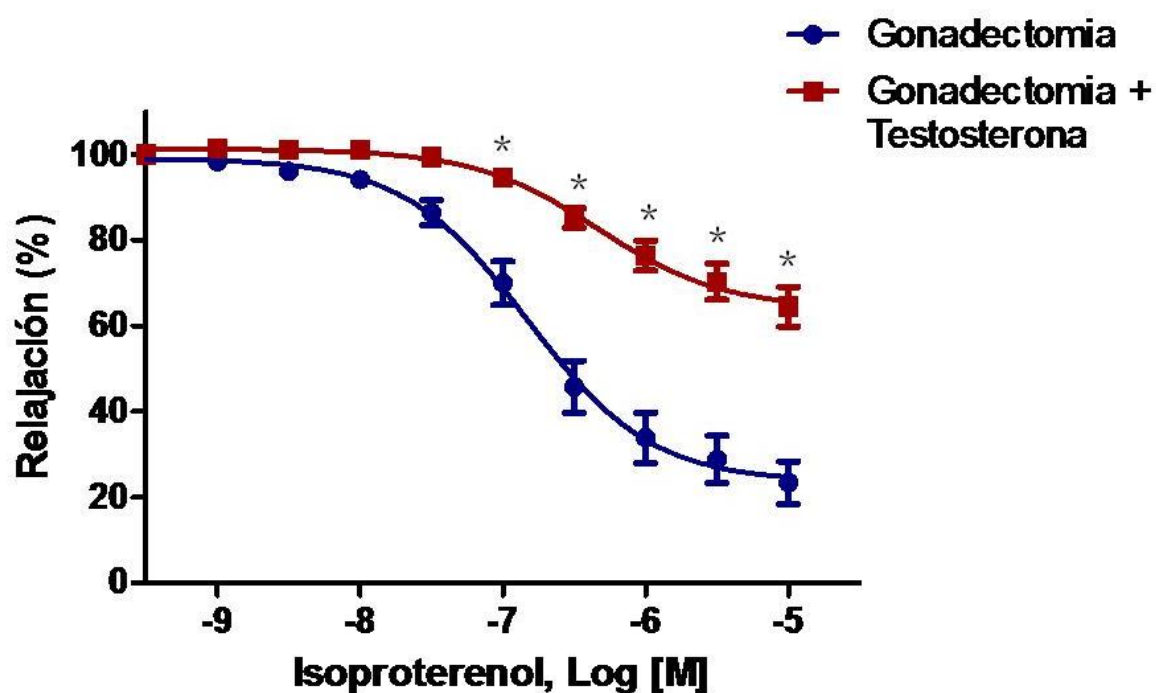


Figura 23. Efecto de la testosterona sobre la relajación inducida por isoproterenol (10^{-9} a 10^{-5} M) en anillos de aorta torácica sin endotelio provenientes de ratas orquiectomizadas con y sin reemplazo de testosterona, previa contracción con fenilefrina 10^{-6} M. Cada punto representa la media \pm E.E.M; $n=6$; $*p \leq 0.05$.

PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DEL AMPc EN LAS RATAS ORQUIECTOMIZADAS

El siguiente paso fue corroborar que la ausencia de testosterona mantenía activa vía del AMPc, para analizar este fenómeno realizamos ensayos funcionales con arterias provenientes de rata orquiectomizadas en presencia y ausencia de SQ 22536, encontrando que la presencia del inhibidor disminuye la respuesta relajante de un 88.05 ± 2.91 % en el grupo orquiectomizados hasta un 40.01 ± 5.37 % en las arterias tratadas con SQ 22536, como se muestra en la figura 24.

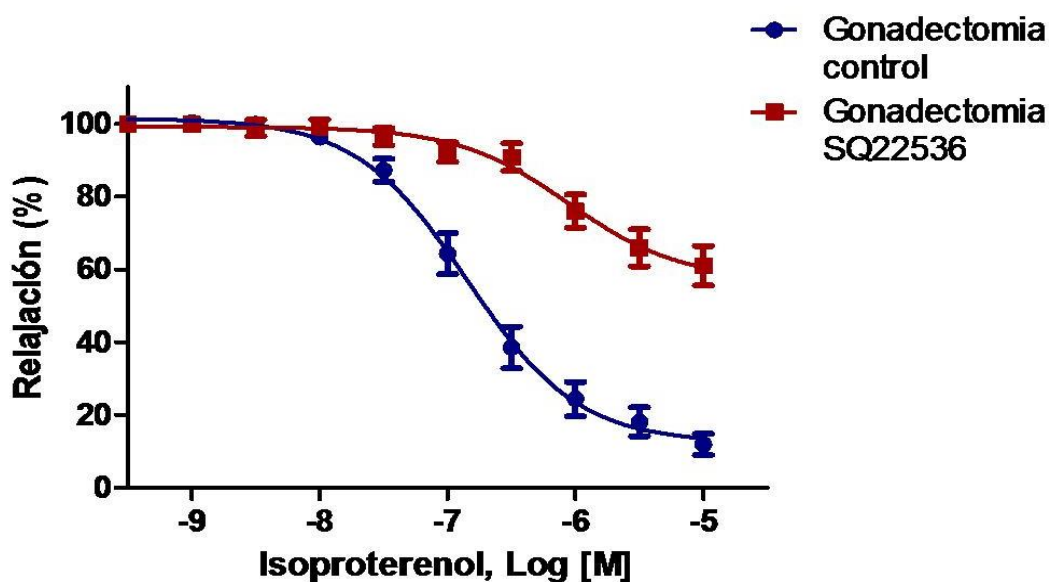


Figura 24. Efecto del SQ 22536 sobre la relajación inducida por isoproterenol (10^{-9} a 10^{-5} M) en anillos de aorta torácica sin endotelio provenientes de ratas orquiectomizadas sin reemplazo de testosterona, previa contracción con fenilefrina 10^{-6} M. Cada punto representa la media \pm E.E.M; n=6; * $p \leq 0.05$.

CUANTIFICACIÓN DEL AMPc EN LAS RATAS ORQUIECTOMIZADAS

Para demostrar que la relajación en las ratas orquiectomizadas era provocada por el AMPc, realizamos la cuantificación de AMPc por medio de un inmunoensayo, en tejidos de aorta provenientes de los tres grupos, sham, orquiectomizados sin testosterona y orquiectomizados con testosterona. Encontrando que la cantidad de AMPc en el grupo sham se encontraba disminuido con solo 6.73 ± 2.04 pmol/ml de AMPc al igual que el grupo de orquiectomizados con testosterona el cual fue de solo 5.88 ± 1.37 pmol/ml de AMPc, los cuales al ser comparados con el grupo orquiectomizados sin testosterona muestran diferencias significativas ya que este grupo alcanza los 24.28 ± 2.04 pmol/ml de AMPc, como se puede ver en la figura 25.

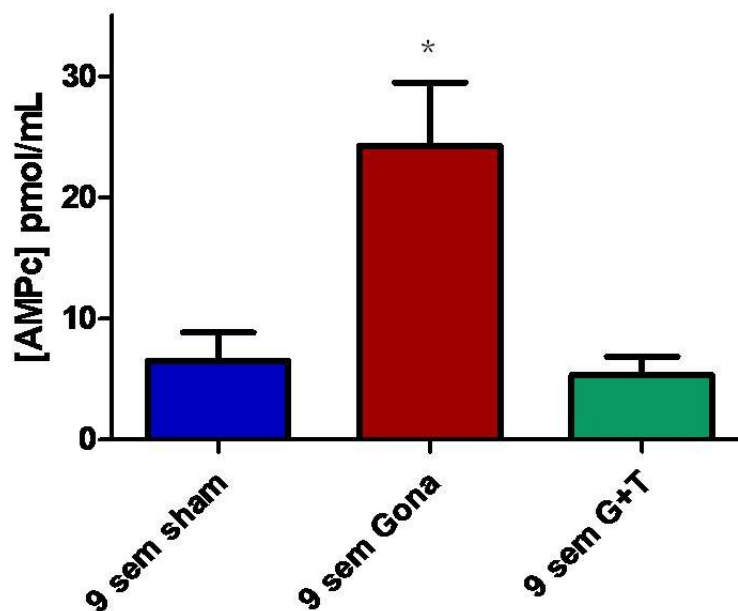


Figura 25. Cuantificación de AMPc en tejido de aorta de rata tratado con isoproterenol (10^{-9} a 10^{-5} M) en los diferentes grupos de ratas orquiectomizadas con y sin reemplazo de testosterona y el grupo sham operado. Cada barra representa la media \pm E.E.M. n=3 *p \leq 0.01

EXPRESIÓN DE LOS SUBTIPOS DE ADENILATO CICLASA EN RATAS ORQUIECTOMIZADAS

Ahora solo nos falta corroborar que los cambios encontrados durante la maduración de la rata en la expresión tanto de los subtipos de adenilato ciclasa como de las proteínas reguladoras del calcio guarde relación con la presencia o ausencia de testosterona, para cumplir este objetivo se realizaron ensayos de qPCR para cuantificar los niveles de ARNm que codifica para cada una de las proteínas, como se realizó anteriormente, pero con muestras provenientes de animales orquiectomizados de nuestros tres grupos que hemos manejado.

En la figura 26 se puede apreciar que la falta de testosterona, representada por el grupo de orquiectomizados, causa que la expresión relativa de la AC3 se incremente pasando de 1.00 ± 0.38 UA en el grupo sham operado a 3.12 ± 0.61 UA en el grupo orquiectomizado, expresión que se reduce significativamente en el grupo con reemplazo de testosterona ya que solo alcanza el 1.72 ± 0.67 UA, por otro lado el subtipo AC5 en ausencia de testosterona disminuyen su expresión de 1.00 ± 0.11 UA para el grupo sham operado hasta un 0.56 ± 0.22 UA para el grupo orquiectomizado sin testosterona, mientras que el grupo de ratas orquiectomizadas con reemplazo de testosterona recupera la expresión alcanzando 1.03 ± 0.27 UA; algo similar pasa con el subtipo AC6 ya que el grupo sham tiene una expresión relativa de 1.00 ± 0.11 UA mientras que el grupo de animales orquiectomizados sin testosterona solo alcanza 0.63 ± 0.16 UA y el grupo con reemplazo de testosterona recupera la expresión hasta un 0.98 ± 0.12

UA, sin embargo, tanto para el subtipo AC5 como para el AC6 las diferencias no son estadísticamente significativas.

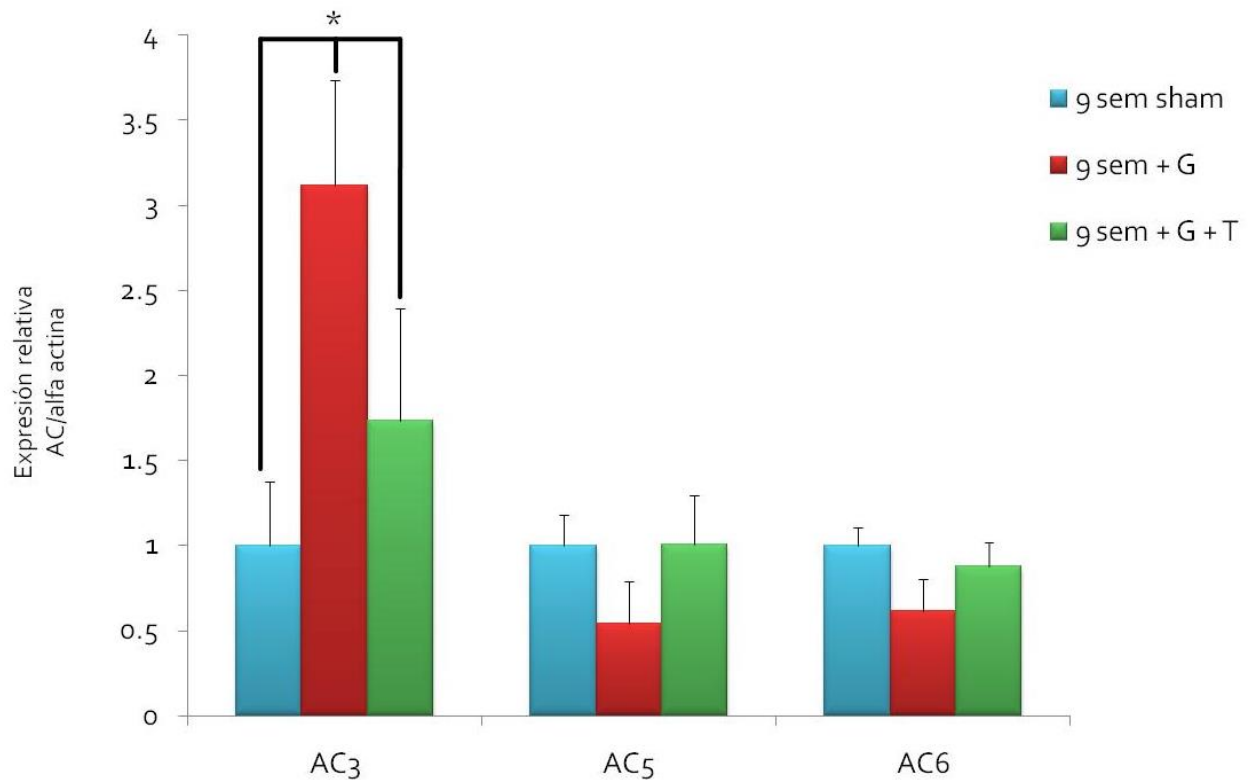


Figura 26. Análisis comparativo de la abundancia de transcrito de las isoformas AC3, AC5 y AC6. La qPCR se realizó con ADNc de tejido de ratas 9 semanas de edad orquiectomizados con y sin testosterona. Los valores de la expresión relativa fueron calculados por el método de delta–delta Ct usando el valor medio de 9 semanas sham como calibrador o control. Todos los valores fueron normalizados. Cada barra representa la media \pm 1 SD con n=3.

EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS REGULADORAS DEL CALCIO EN RATAS ORQUIECTOMIZADAS

En lo que respecta a las proteínas reguladoras del calcio se realizó el mismo procedimiento anterior, comparando al grupo sham operado como control contra los otros dos grupos. Obteniendo que los niveles de expresión relativa solo se modifican de manera significativa en la proteína RyR3 ya que los niveles de expresión relativa pasan de 1.00 ± 0.18 UA en el grupo sham operado a 0.34 ± 0.16 UA en el grupo sin testosterona y dicha expresión se recupera en el grupo con testosterona hasta 0.96 ± 0.31 UA, en lo que respecta al transcrito de las proteínas NCX y SERCA este se modifica ya que la expresión relativa de NCX pasa de 1.00 ± 0.28 en el grupo sham operado a 0.67 ± 0.17 UA y 0.71 ± 0.16 UA en los grupos sin y con testosterona respectivamente, algo similar se observa en la proteína SERCA donde los niveles de expresión relativa pasan de 1.00 ± 0.25 UA en el grupo sham operado hasta 0.89 ± 0.18 UA y 0.94 ± 0.25 UA en los grupos sin y con testosterona respectivamente, sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas y solo se mantienen como tendencias, estos datos se muestran en la figura 27.

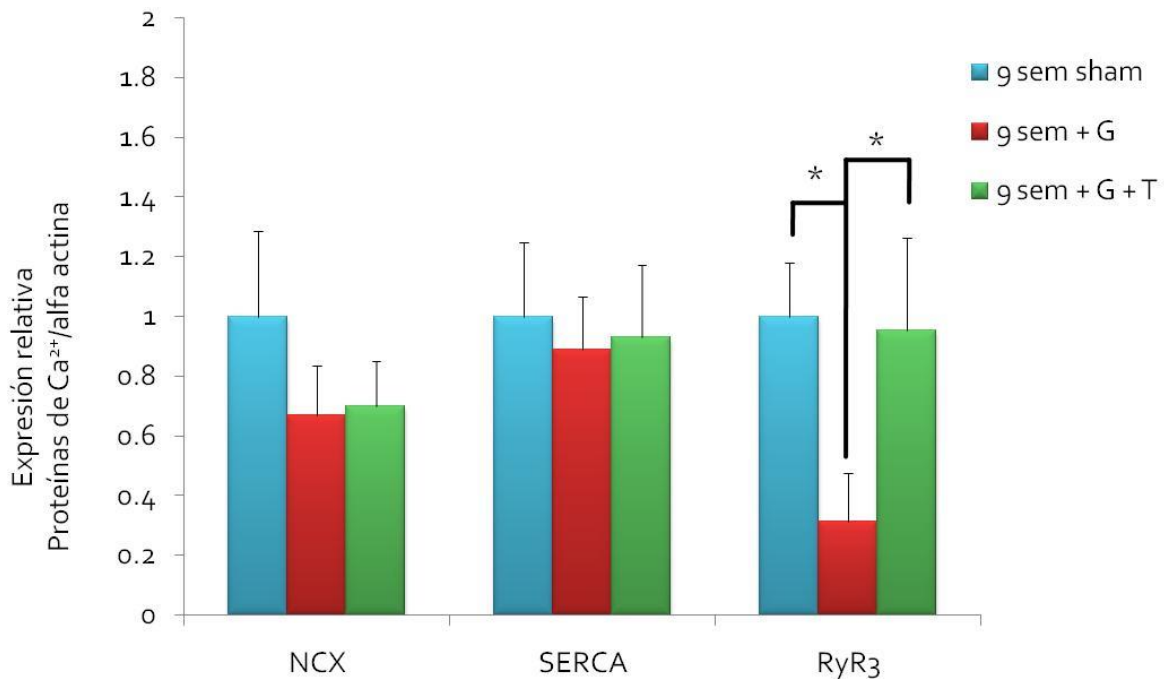


Figura 27. Análisis comparativo de la abundancia de transcrito de las proteínas reguladoras del calcio citoplasmático. La qPCR se realizó con ADNc de tejido de ratas 9 semanas de edad orquiectomizadas con y sin testosterona. Los valores de la expresión relativa fueron calculados por el método de delta–delta Ct usando el valor medio de 9 semanas sham como calibrador o control. Todos los valores fueron normalizados. Cada barra representa la media \pm 1 SD con n=3.

IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS CONSENSO PARA SECUENCIA ARE

Con el fin de aportar información adicional, se realizó un análisis *in silico* de las secuencias promotoras de los genes que codifican para cada una de las proteínas revisadas durante este trabajo, en busca de secuencias conocidas como elementos de respuesta a andrógenos (ARE) cuya secuencia consenso fue reportada en el 2002 por Nelson, AGAACANNNTGTTCT, donde N representa cualquier nucleótido.

En la siguiente tabla se muestra la secuencia, la homología y la posición dentro del promotor de varias secuencias que podrían ser capaces de funcionar como secuencias ARE (Tabla 6).

Tabla 6. Identificación *in silico* de secuencia ARE en los diferentes genes de interés.

Gen	Secuencia	Posición	Homología
ADCY3 (AC3)	AGTTCTAGCTGATCA	-396	58%
ADCY5 (AC5)	AAAAAATGTGTTAT	-2045	75%
ADCY6 (AC6)	AGAAGATATTGACCC	-2124	66%
ATP2A3 (SERCA)	CGAGCCTGGTTTTCT	-767	66%
SLC8A1 (NCX)	AAAAATCATTGATAT	-807	58%
RYR1 (RYR)	TGGCCAGGCTGGCCT	-659	58%

DISCUSIÓN

Nuestros resultados nos indican que durante la pubertad de la rata el músculo liso vascular pierde la función de relajar al estímulo de los β AR, ya que estos pierden la capacidad de producir AMPc al sobreexpresarse las isoformas de AC que son inhibidas por el probable aumento de calcio en el citoplasma ocasionado por la proteína RyR3, siendo todos estos cambios propiciados por el aumento en la cantidad de testosterona que se presenta durante la pubertad. Esta observación en la pérdida de función vascular de los β AR conforme aumenta la edad se realizó hace ya más de cuarenta años (Fleisch, 1970) tanto en animales (Tsujiyamoto, 1986) como en humanos (Pan, 1986) y no solo en vasos sanguíneos sino también en músculo liso pulmonar (Vanscheeuwijck, 1989) y otros lechos vasculares (Dobson, 2003).

El primer paso que realizamos fue corroborar que el músculo liso perdía la función de relajar en respuesta a ISO durante la etapa temprana del desarrollo, específicamente durante la pubertad de la rata ya que la mayoría de los reportes que abordan este tema solo se enfocan en etapas tardías del desarrollo que van desde los 12 (Schutzer, 2011) hasta los 24 meses (Gaballa, 2000); Uno de los trabajos que más se acerca a nuestra visión en cuanto a las etapas de desarrollo es el realizado por Gaballa en el 2000 u Oliver en el 2009 donde comparan grupos de 6 semanas contra grupos de 6 meses, intervalo que consideramos muy amplio ya que no se puede distinguir adecuadamente el inicio de la pubertad mientras que la etapa adulta ya está bien establecida. Así en nuestro modelo de estudio se

montaron anillos de aorta sin endotelio provenientes de ratas de 3 y 9 semanas de edad, encontrando que la pérdida en la función vascular que habíamos reportado durante la maestría (aprox. 10%) en anillos de aorta con endotelio se hacía mucho más evidente cuando solo evaluábamos una arteria sin endotelio, este resultado nos sugiere que durante la pubertad existe un metabolito que desencadena la pérdida de función beta adrenérgica en el músculo liso pero a su vez el endotelio empieza a suplir dicha carencia, este resultado concuerda con reportes que mencionan que la respuesta relajante beta adrenérgica pasa de ser independiente de endotelio en etapas tempranas del desarrollo a dependiente de dicha capa en la etapa adulta (El-Mas, 2007); Sin embargo, para este trabajo nos interesa caracterizar el cambio sufrido en la función del músculo liso vascular dependiente de la edad en respuesta a los β AR, este es un aporte importante del trabajo ya que existen pocos reportes que mencionen la pérdida de función del músculo liso vascular ya que la mayoría de trabajos sólo reportan la disfunción endotelial como causa importante del desbalance homeostático (Paneni, 2015).

Para continuar con este trabajo era importante demostrar que la pérdida de función vascular era específica para los β AR y no se debía a un defecto global en el músculo liso, con esto en mente se realizaron ensayos con un agonista que actuara de manera independiente a la vía de los β AR, condición que cumple el nitroprusiato sódico que funciona como donador de NO para activar la vía del GMPc (Lincoln, 1984), observando que el músculo liso vascular de las ratas de 9 semanas aún conservaban la capacidad de relajar y por lo tanto la pérdida de relajación que habíamos encontrado es específica para los β AR.

Una vez planteadas las bases del proyecto procedimos a resolver dos grandes objetivos, el primero es establecer el mecanismo molecular por el cual los β AR pierden la capacidad de relajar el músculo liso vascular durante la pubertad y el segundo objetivo era establecer un posible agente fisiológico que diera inicio a dichos cambios.

Con el paso de los años se han planteado varias hipótesis que pretenden explicar el mecanismo molecular de la pérdida de función relajante, empezando por una alteración en el número de receptores, dato que aún hoy en día es controversial ya que existen reportes contradictorios, por ejemplo en un análisis de western-blot de arterias carótidas provenientes de ratas de 2 y 12 meses de edad se demostró que no existen diferencias en la expresión de los subtipos β 1 y β 2 (Schutzer, 2011b) mientras que otro estudio del mismo año reporta que en hígado la cantidad de transcrito medido por RT-PCR del subtipo β 1 aumenta significativamente cuando se comparan ratas de 4 meses contra ratas de 24 meses de edad (Jin 2011) e incluso hay reportes hechos en corazón de ratas de 2, 8 y 24 meses que mencionan una pérdida en la densidad de receptores dependiente de la edad medido por ensayos de radio ligando (O'Donnell, 1984; Xiao, 1998), de cualquier modo en nuestro sistema los resultados nos demostraron que no existen diferencias significativas cuando se compara la cantidad de receptor medido por western-blot entre las ratas de 3 y de 9 semanas por lo que podemos descartar que una baja en el número de receptores sea la causa de la disminución en la relajación. Aunado a este resultado se realizó un

ensayo de fosforilación del receptor β_2 , que demostró ser el único subtipo que participa funcionalmente en la relajación, para demostrar que éste aún se encontraba activo y era capaz de regularse, ya que se ha demostrado que cuando el receptor aún es funcional la unión del ligando causa una desensibilización mediada por GRK (Xin, 2008) y que después de 30 minutos de estimulación con isoproterenol la gran mayoría de receptores presentes en las muestras se fosforilan en sus residuos S355-356 específicos para GRK, fosforilación que se mantiene constante hasta que se retira el agonista (Iyer, 2006), este resultado que concuerda con los nuestros donde a los 30 minutos la cantidad de receptor fosforilado era la máxima, dejándonos ver que además de estar presentes los receptores estos aún eran funcionales, de tal manera que podemos descartar a los receptores *per se* como causa de la pérdida de la función vascular.

Después nos enfocamos en caracterizar los cambios sufridos en la vía de señalización del AMPc, para esto lo primero que hicimos fue corroborar funcionalmente que la vía del AMPc se perdía con la edad, realizando ensayos *in vitro* encontramos que el SQ 22536 (inhibidor de AC) y el H89 (inhibidor de la PKA), inhibían la relajación a ISO sólo en las ratas de 3 semanas mientras que a las 9 semanas el remanente de relajación no se modificaba, este resultado nos sugiere que la vía del AMPc solo es funcional a las 3 semanas y esta funcionalidad se pierde durante la pubertad de la rata lo que concuerda con lo descrito en la literatura donde mencionan que conforme la rata aumenta de edad el efecto de esta vía, es decir, la producción de AMPc se va perdiendo (Gaballa, 2000; Schutzer, 2006), sin embargo, este efecto biológico que observamos puede

deberse a que no se está produciendo AMPc o que se esté degradando rápidamente por las PDE (Zhai, 2012), con la intención de aclarar la respuesta en nuestro sistema se cuantificó la producción de AMPc encontrando que en las ratas de 9 semanas la cantidad que se produce de AMPc en respuesta a los β AR es mucho menor que la cantidad que se produce a las 3 semanas, además el grupo con inhibidor de PDE nos demostró que el AMPc no se estaba degradando y realmente era poca cantidad la que se estaba produciendo en respuesta a los β AR resultado en el que se tienen un mayor consenso y que concuerda con lo descrito en la literatura por Baloğlu en el 2007 reporta que la cantidad de AMPc que se produce en respuesta a ISO disminuye cuando se comparan ratas de 1 contra ratas de 3 meses de edad, sin embargo, este cambio también se presenta en condiciones basales y no solo al estímulo de los β AR lo que los autores atribuyen a un aumento en la expresión de la proteína Gi, por otro lado la comparación hecha por Schutzer en el 2011 menciona que está perdida en la producción de AMPc es específica para los β AR y se acentúa cuando se comparan ratas de 6 contra ratas de 24 meses de edad, defecto que se atribuye a una pérdida en la capacidad de estimular a la AC.

Como se puede apreciar a pesar de que la pérdida de AMPc es una constante en este tema, aún no se ha aclarado el mecanismo por el cual este AMPc no se está produciendo, y puede haber dos explicaciones lógicas que tiene que ver con la enzima responsable de formar este AMPc, la primera sería porque no se está expresando ningún isotipo de AC, sin embargo, esta es una explicación poco probable ya que el AMPc interviene en muchos procesos fisiológicos normales que

si no se lleven adecuadamente causarían la apoptosis de la célula (Safa, 2014), lo que nos deja una sola explicación la cual podría ser que la AC está siendo regulada de forma selectiva al unirse a los β AR, para tratar de resolver este punto realizamos ensayos funcionales con un agonista artificial de las AC encontrando que la relajación producida por foskolina en los dos grupos es de casi el 100% lo que nos demuestra que la enzima o por lo menos una de sus isoformas si se expresa y es capaz de ser activada, este resultado también era controversial en las etapas avanzadas del desarrollo ya que algunos autores reportan que existen defectos en la adenilato ciclasa que impiden formar AMPc bajo cualquier estímulo (Premont, 1992; Gaballa, 2000) mientras que otros autores mencionan que esta falta de producción de AMPc solo es en respuesta a los β AR (Gurdal, 1995; Schutzer, 2011a), de esta manera nuestros datos nos hacen pensar en una regulación negativa dependiente de la edad de los subtipos de adenilato ciclasa que se encuentra unidos al receptor beta adrenérgico durante la posible formación del señalosoma (Ostrom, 2012; Niesor, 2015).

Con lo anterior en mente consideramos a las isoformas de adenilato ciclasa que se expresan en las células de músculo liso, las cuales son la AC3, AC4, AC5, AC6 y AC8 de las cuales solo la AC3, AC5 y AC6 son reguladas por el calcio de manera diferencial. Con la intención de corroborar que un cambio en la expresión de estas isoformas pudiera estar impactando en la función de los β AR se evaluó la expresión relativa de los transcrito de dichos subtipos encontrando que la AC3 tiende a disminuir su expresión cuando se comparan ratas de 3 contra ratas de 9 semanas, sin embargo, esta diferencia no es estadísticamente significativa; Por

otro lado los subtipo AC5 y AC6 en la atapa adulta aumentan su expresión de forma significativa, este resultado nos sugiere que las isoformas que tiene más probabilidad de unirse a los β AR en las ratas de 9 semanas son las isoformas AC5/6, esto tiene importancia porque si recordamos el modelo experimental la precontracción de los anillos aórticos se lleva a cabo con fenilefrina, un agonista α_1 , que provoca aumentos en la concentración de calcio citoplasmático en el músculo liso (Langlands, 1990), de tal manera que las isoformas AC5/6 unidas al receptor se estarían inhibiendo por la presencia de dicho ion, probablemente al estar desplazando al Mg^{2+} que es requerido como cofactor de estas enzimas (Mou, 2009) impidiendo la formación del AMPc que reportamos a las 9 semanas. Este cambio podría reflejarse en un cambio de fenotipo ya que se ha reportado que en condiciones fisiológicas los subtipos pueden alterar su expresión para modificar el comportamiento del tejido, como lo reportado para las ratas preñadas que aumentan la expresión de la isoforma AC6 durante la gestación para mantener al útero quiescente y durante el último día de gestación aumentan rápidamente los niveles de la isoforma AC2 para promover un fenotipo excitatorio y promover la labor de parto (Suzuki, 1997), el resultado anterior además se ha relacionado con la presencia hormonas que normalmente se aumentan durante el embarazo (Asano, 2005), sugiriendo que los cambios de expresión en las isoformas de AC que demostramos, podrían estar relacionados con los cambios hormonales observados durante la maduración de la rata.

El calcio es un segundo mensajero que al igual que el AMPc es ubicuo dentro del organismo y se ha demostrado que tiene la capacidad de regular de

forma directa o indirecta las nueve isoformas de adenilato ciclasa, de hecho es tan importante la regulación de este ion que las isoformas se han clasificado con base en como son reguladas por el calcio, de tal forma que las isoformas AC1, AC3 y AC8 son activadas indirectamente por el calcio ya que se ha demostrado por sistemas de sobreexpresión que la presencia de este ion activa a la proteína calmodulina (CaM) formando un complejo calcio-calmodulina (Ca-CaM) capaz de unirse a la AC y activarla (Wang, 2007), por otro lado los subtipos AC5 y AC6 son inhibidos directamente por la presencia de calcio ya que se ha demostrado por medio de estructuras cristalina que el calcio puede unirse al sitio catalítico de la enzima e impedir de esta forma su activación (Mou, 2009) y por último los subtipos AC2, AC4, AC7 y AC9 no modifican su actividad por la presencia de calcio pero podrían ser reguladas por moléculas que aumentan la concentración de calcio como la PKC (Halls, 2011).

Con estos argumentos sería lógico pensar que cambios en la concentración de calcio citoplasmático podrían reflejarse en cambios en la actividad de las isoformas de AC que se unan a los β AR, para explorar esta hipótesis se cuantificó la cantidad de transcrito de proteínas encargadas de regular el flujo de este ion en el citoplasma, de tal manera que nuestros resultados demuestran que durante la maduración de la rata se modifican los niveles de expresión de las proteínas encargadas de regular el tráfico de calcio dentro de la célula, manteniendo una tendencia a la baja de las proteínas que tienen como función disminuir el calcio dentro del citoplasma (NCX y SERCA) y aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa si guarda relación con lo observado en neuronas

donde describen que durante la vejez la función de la proteína SERCA disminuye lo que trae como consecuencia que aumente las concentraciones del calcio citoplasmático (Tsai, 1998), por otro lado demostramos un incremento en el transcrito de la proteína encargada de aumentar los niveles de calcio (RyR3) el cual si es estadísticamente significativo, coincidiendo con el reporte que hace Vanterpool en el 2006 donde sugiere que el envejecimiento normal provoca cambios en la expresión de este canal en los ganglios de la rata, aumentando los niveles desde los 6 meses hasta los 12 meses para después declinar hasta los 24 meses lo que se reflejaría en un flujo de calcio hacia el citoplasma más elevado durante la etapa adulta; con estos datos podemos sugerir que en la semana 9 la rata tiene niveles de calcio más elevados que a las 3 semanas de edad, lo cual tendría como consecuencia un estado de mayor constricción en la aorta y una probable regulación negativa de las isoformas AC5/6 que se expresan durante la maduración de la rata, lo que impide que estas sean capaces de producir AMPc en respuesta a los β AR.

El establecimiento del cultivo primario de células de músculo liso es fundamental para poder explorar con más detalle y confirmar las sugerencia que se han hecho durante este trabajo, empezando por demostrar que a las 9 semanas los niveles de calcio en nuestra condiciones de trabajo son mayores que a las 3 semanas, otro aporte importante sería observar la interacción que se da entre los β AR y los subtipos de AC para corroborar que esta se modifica con la edad ya que se ha demostrado que se forman complejos temporales con proteínas de andamiaje como la AKAP (Bauman, 2006) y estos son específicos de isoforma

(Piggott, 2008) y que el contacto estrecho entre las proteínas de la vía de señalización es necesario para su activación (Ostrom, 2012).

Para tratar de establecer la relación que existe entre el aumento de testosterona durante la pubertad y la pérdida de función beta adrenérgica, utilizamos ratas orquiectomizadas, encontrando que dicha operación modifica la respuesta relajante a isoproterenol en la etapa adulta impidiendo que esta se pierda durante la pubertad como normalmente ocurre, para corroborar que era la falta de testosterona la responsable de impedir la pérdida de función relajante se realizó el experimento con el grupo de ratas orquiectomizadas con reemplazo de testosterona encontrando que el ISO pierde la capacidad de relajar el músculo liso, dándonos la prueba de que la testosterona estaba relacionada con la pérdida de la función relajante posiblemente alterando la vía del AMPc como lo sugiere Oloyo en el 2013, donde demuestra que en ratas hipertensas la capacidad de relajar de la aorta se ve disminuida en presencia de testosterona ya que los ratas orquiectomizadas son capaces de relajar completamente.

Siguiendo el curso de los hallazgos de este trabajo procedimos a evaluar la capacidad que tienen los animales orquiectomizados de producir AMPc encontrando que la falta de testosterona permitía seguir produciendo AMPc en los extractos de arterias sin endotelio, mientras que la adición de testosterona recuperaba el fenotipo incapaz de producir AMPc, esto concuerda con la teoría de que los andrógenos son capaces de regular la función de la adenilato ciclasa en células del estroma prostático, donde demuestran que bajas concentraciones de

testosterona se reflejan en una mayor actividad de la AC (Oliver, 2010), este es un hallazgo importante, sin embargo, es necesario tratar de entender que está realizando la testosterona para impedir la formación del AMPc. Para entender esto es necesario recordar que la testosterona puede actuar a dos niveles básicos a nivel no genómico con una respuesta rápida mediada por receptor que causa una relajación en el músculo liso vascular por la hiperpolarización de la membrana ocasionada por la apertura de los canales de potasio dependientes de ATP, voltaje y calcio (Unemoto, 2007); Por otro lado a nivel genómico se ha demostrado que la testosterona puede atravesar la membrana y unirse a los receptores de andrógenos, los cuales al unirse a su ligando se puede dimerizar para penetrar en el núcleo y actuar como factores de transcripción de genes que cuenten con secuencias consenso conocidas como elementos de respuesta a andrógenos (ARE), una vez unidos al ADN estos factores de transcripción pueden aumentar (Nelson, 2002) o disminuir (Gu, 2014) la tasa de expresión dependiendo en qué lugar del promotor se encuentre la secuencia ARE (liu, 2003) de hecho Nelson en el 2002 reportó 146 genes que alteraban su expresión en células de epitelio de próstata en presencia de andrógenos. De estos mecanismos el más probable por las condiciones de nuestros experimentos es que esté actuando a nivel genómico, modificando la expresión de varias proteínas relacionadas con la vía de señalización de los β AR ya que demostramos que durante la pubertad la expresión de las isoformas de adenilato ciclasa y de las proteínas reguladoras del calcio se encontraba alterada nos dimos a la tarea de demostrar que la testosterona estaba relacionaba con dicho cambio en la expresión.

Analizando los resultados obtenidos encontramos que los niveles de transcrito de las isoformas AC5/6 en las ratas sin testosterona son más bajos que los encontrados en los grupos que si tienen testosterona lo que nos sugiere que dicha hormona es necesaria para aumentar la expresión de estas isoformas o dicho de otra manera la testosterona actúa como un inductor de la expresión, mientras que para la isoforma AC3 el grupo orquiectomizado aumenta la expresión cuando se compara con los grupos con testosterona, lo que nos indica que la testosterona está actuando como un inhibidor de la transcripción en este gen, estos datos son difíciles de corroborar ya que hasta donde llega nuestro entendimiento no existen reportes que relacionen directamente la testosterona con la expresión de las diferentes isoformas de AC, sin embargo, de forma indirecta si se ha reportado en corazón que la testosterona es capaz de regular el flujo de calcio lo que se refleja en una modificación en la función de las isoformas de AC (Ayaz, 2015).

Al revisar nuestros datos referentes a la expresión de las proteínas reguladoras de calcio encontramos que la NCX y la SERCA no se modifican con la presencia o ausencia de testosterona lo que permite que su función sea constante durante la maduración de la rata, por otro lado los resultados de la proteína RyR3 nos indican que ésta requiere de testosterona para aumentar su expresión es por esto que los niveles de expresión se elevan a las 9 semanas de edad de la rata, estos datos nos sugieren que la testosterona es capaz de aumentar el calcio citoplasmático ya que aumenta la salida del ion desde el retículo endoplásmico hacia el citoplasma pero este aumento no puede ser contrarrestado sacando más

calcio ya que las proteínas que se encargan de dicho trabajo no aumentan su expresión y mantiene un nivel de trabajo similar por lo que tardarían más tiempo en sacar el calcio del citoplasma, permitiendo de esta manera que el calcio regule la función de la AC5/6 por más tiempo, este dato es similar a lo reportado en corazón donde ya que se ha demostrado que la testosterona modifica la respuesta de los receptores adrenérgicos al modificar la función de las proteínas reguladoras del calcio RyR, NCX y SERCA (Tsang, 2009; Witayavanitkul, 2013) y para mejorar la relación con nuestros datos se ha demostrado que esta modificación en la función se debe a cambios de expresión, y aunque no se ha abordado a detalle a que se debe este aumento en la expresión si se reporto en músculo liso del cuerpo cavernoso que los animales castrados tenían menos cantidad de ARNm de la proteína RyR1 (Luo, 2009), lo que probablemente sea el reflejo de una secuencia ARE dentro de la región promotora de este gen a la cual se esté uniendo el receptor de andrógenos dimerizado actuando como factor de transcripción (Chan, 2014).

Por último es útil hacer el señalamiento del análisis *in silico* que se realizó de las secuencias de la región promotora de los genes que codifican para las proteínas que se revisaron durante esta trabajo ya que se encontró que todas tienen una potencial secuencia ARE con homologías que van desde 75% hasta el 58%, si bien parece que en algunos caso la homología es muy pobre, se ha demostrado de manera experimental que secuencia con solo el 50% de homología a la secuencia ARE consenso son capaces de unir al factor de transcripción AR y actuar como secuencia reguladora de la expresión, como es el caso del gen

CDKN 1A (Nelson, 2002). Para futuros trabajos un análisis de la expresión con ensayos de gen reportero nos podrían indicar sin lugar a dudas que la testosterona está modificando de manera directa la expresión de las proteínas que se alteraron durante la pubertad, pudiendo incluir en los ensayos mutaciones en la secuencias consenso para demostrar la unión y la secuencia necesaria para que la testosterona modifique la expresión de las isoformas de AC y de las proteínas reguladoras del flujo de calcio.

Es importante mencionar antes de terminar esta discusión el posible papel fisiológico que tiene este cambio y es que es difícil pensar que un cambio fisiológico normal como la pubertad se vea reflejado en un daño o en la incapacidad de un tejido a llevar a cabo su función adecuadamente, pero debemos recordar que solo estamos viendo una pequeña parte del todo, y si bien este probable aumento en el calcio dentro del músculo liso vascular se refleja en la incapacidad de producir AMPc en respuesta a los β AR, esta alteración pudiera tener una explicación más allá de la función relajante, ya que se ha demostrado que los niveles constantemente elevados de AMPc están relacionados con proliferación celular (Sassone, 2012), proliferación que se presenta durante el desarrollo y que debe detenerse cuando el vaso sanguíneo llega a su tamaño normal. No debemos olvidar además que el endotelio parece suplir la función del músculo liso durante la pubertad y que se ha demostrado que la testosterona modula la síntesis de NO en las células de Leydig (Andric, 2010) que de igual manera podría estar haciéndolo en las células endoteliales y reemplazar el efecto relajante del AMPc por el del GMPc. Además este aumento de calcio no solo se

refleja en pérdida de función, ya que en el corazón los aumentos de calcio generalmente se relacionan con un mejor funcionamiento del mismo como lo describe recientemente Ayaz donde además hace hincapié en la relación de la testosterona con estas modificaciones en la regulación del calcio dentro del corazón.

CONCLUSIÓN

La pérdida de la función vascular de los β AR se debe a la incapacidad de producir AMPc provocado por un cambio en los patrones de expresión de las isoformas de ACs y de las proteínas reguladoras del flujo de calcio, pasando de un fenotipo excitatorio a uno inhibitorio controlado por el probable aumento de calcio citoplasmático, todo esto orquestado por el aumento en la cantidad de testosterona que se presenta durante la maduración de la rata.

PERSPECTIVAS

El tema central que es la modificación en la respuesta vasodilatadora mediada por receptores adrenérgicos β , dista mucho de quedar agotado con el presente trabajo. Dentro de los numerosos aspectos que quedan por elucidar podemos mencionar los siguientes:

- Demostrar que la interacción de los subtipos de adenilato ciclasa con los β AR se modifica con la edad.
- Demostrar que los niveles de calcio citoplasmático se elevan durante la pubertad.
- Demostrar por ensayos de gen reportero que la testosterona modifica la expresión de las proteínas analizadas.
- Ahondar en el papel fisiológico de dichos cambios, enfatizando el posible mecanismo general.
- Evaluar el mecanismo que desencadena la participación del endotelio en respuesta a los β AR durante la etapa adulta.
- Evaluar si la testosterona es responsable de que el endotelio empiece a reemplazar la función del músculo liso.

REFERENCIAS

1. Acosta Alejandro G., Vermolen Johnny, Andara Carla V., Bermúdez Pirela, Bermúdez Arias F. Mecanismos moleculares de la disfunción endotelial: de la síntesis a la acción del óxido nítrico. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*. 2006. **25**(2): 54-59.
2. Andric SA, Janjic MM, Stojkov NJ, Kostic TS. Testosterone-induced modulation of nitric oxide-cGMP signaling pathway and androgenesis in the rat Leydig cells. *Biol Reprod*. 2010; **83**(3): 434-42.
3. Arner M, Uski T, Högestätt ED. Endothelium dependence of prostanoid-induced relaxation in human hand veins. *Acta Physiol Scand*. 1994; **150**(3): 267-72.
4. Asano K, Okawa T, Matsuoka I, Suzuki Y, Sato A. Effects of sex steroids on expression of adenylyl cyclase messenger RNA in rat uterus. *J Endocrinol Invest*. 2005; **28**(4): 357-62.
5. Ayaz O, Howlett SE. Testosterone modulates cardiac contraction and calcium homeostasis: cellular and molecular mechanisms. *Biol Sex Differ*. 2015; **6**: 9-24.
6. Baker H. J., Russel Lindsey J. y Weisbroth S. H. The laboratory rat. Volumen 1 Biology and diseases. Editorial Academic Press. 1979. USA.
7. Baloğlu Emel, Kızıltepe Özlem, Gürdal Hakan. The role of Gi proteins in reduced vasorelaxation response to β -adrenoceptor agonists in rat aorta during maturation. *Eur J Pharmacol*. 2007; **564**: 167–173.

8. Bauman AL, Soughayer J, Nguyen BT, Willoughby D, Carnegie GK, Wong W, Hoshi N,. Dynamic regulation of cAMP synthesis through anchored PKA-adenylyl cyclase V/VI complexes. *Mol Cel.* 2006; **23**: 925–931.
9. Bayewitch ML, Avidor-Reiss T, Levy R, Pfeuffer T, Nevo I, Simonds WF y Vogel Z. Inhibition of adenylyl cyclase isoforms V and VI by various Gbetagamma subunits. *FASEB J.* 1998. **12**: 1019–1025.
10. Bernatova I. Endothelial dysfunction in experimental models of arterial hypertension: cause or consequence? *Biomed Res Int.* 2014; **2014**:1-14.
11. Bers DM. Cardiac sarcoplasmic reticulum calcium leak: basis and roles in cardiac dysfunction. *Annu Rev Physiol.* 2014; **76**: 107–27.
12. Bisset-Valiente D., Alfonso Z. C., Bernardo-Fuentes M. G., Molina García J. R. y González-Cabrales V. T. (1999). Crecimiento y composición corporal de las crías de ratas sometidas a restricción alimentaria. *Rev Cubana Invest Biomed.* **18**(2): 104-10.
13. Blaustein JD, Ismail N, Holder MK. Review: Puberty as a time of remodeling the adult response to ovarian hormones. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015. pii: **S0960-0760**(15)00139-9.
14. Brading AF. The sarcoplasmic reticulum in disease and smooth muscle dysfunction: therapeutic potential. *Novartis Found Symp.* 2002; **246**:244-54.
15. Chan SC, Dehm SM. Constitutive activity of the androgen receptor. *Adv Pharmacol.* 2014; **70**:327-66.
16. Cheitlin MD. Cardiovascular physiology—changes with aging. *Am J Geriatr Cardiol.* 2003; **12**(1):9–13

17. Correia-Melo C, Passos JF. Mitochondria: Are they causal players in cellular senescence? *Biochim Biophys Acta*. 2015. pii: **S0005-2728**(15)00098-5.
18. Cumbay MG y Watts VJ. Novel regulatory properties of human type 9 adenylate cyclase. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004. **310**:108–115.
19. Dobson JG Jr, Fray J, Leonard JL, Pratt RE. Molecular mechanisms of reduced beta-adrenergic signaling in the aged heart as revealed by genomic profiling. *Physiol Genomics*. 2003; **15**(2):142-7.
20. Drexler H. Endothelial dysfunction: clinical implications. *Prog Cardiovasc Dis*. 1997; **39**: 287–324.
21. Dwyer AA, Phan-Hug F, Hauschild M, Elowe-Gruau E, Pitteloud N. TRANSITION IN ENDOCRINOLOGY: Hypogonadism in adolescence. *Eur J Endocrinol*. 2015; **173**(1):R15-R24.
22. Eckstein B., Golan R., y Shani J. Onset of puberty in the immature female rat induced by 5 α -Androstane-3 β , 17 β -diol. *Endocrinology*. 1973. **92**: 941-945.
23. El-Mas MM, Sharabi FM, El-Gowilly SM, El-Din MM. Inhibition of nitric oxide-guanylate cyclase-dependent and -independent signaling contributes to impairment of beta-adrenergic vasorelaxations by cyclosporine. *Biochem Pharmacol*. 2007; **73**(3):359-67.
24. Emel Baloglu, Özlem Kizitepe y Haken Gürdal. The role of Gi proteins in reduced vasorelaxation response to b-adrenoceptor agonist in rat aorta during maturation. *Eur J Pharmacol*. 2007; **564**: 167-173.
25. Farrell SR y Howlett SE. The age-related decrease in catecholamine sensitivity is mediated by beta(1)-adrenergic receptors linked to a decrease

- in adenylate cyclase activity in ventricular myocytes from male Fischer 344 rats. *Mech Ageing Dev.* 2008; **129**(12): 735-44.
26. Federman AD, Conklin BR, Schrader KA, Reed RR, Bourne HR. Hormonal stimulation of adenylyl cyclase through Gi protein beta gamma subunits. *Nature.* 1992. **356**:159–161.
27. Fleisch Jerome H., Moling Harriet M. y Brodie Bernard B. Beta-Receptor Activity in Aorta: Variations with Age and Species. *Circ. Res.* 1970; **26**: 151-62.
28. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980 Nov 27; **288**(5789):373-6.
29. Gaballa MA, Eckhart AD, Koch WJ, Goldman S. Vascular beta adrenergic receptor adenylyl cyclase system in maturation and aging. *J Mol Cell Cardiol.* 2000; **32**(9):1745-55.
30. Gaballa Mohamed A., Eckhart Andrea D., Koch Walter J. y Goldman Steven. Vascular β -Adrenergic Receptor Adenylyl Cyclase System in Maturation and Aging. *J Mol Cell Cardiol.* 2000. **32**, 1745–1755.
31. Gao BN y Gilman AG . Cloning and expression of a widely distributed (type IV) adenylyl cyclase. *Proc Nat Acad Sci.* 1991. **88**:10178–10182.
32. Gao X, Sadana R, Dessauer CW y Patel TB. Conditional stimulation of type V and VI adenylyl cyclases by G protein betagamma subunits. *J Biol Chem.* 2007. **282**: 294–302.
33. Giembycz M. A. y Newton R. Beyond the dogma: novel β 2-adrenoceptor signalling in the airways. *Eur Respir J.* 2006. **27**: 1286–1306.

34. Gillies Glenda E. Y McArthur Simon. Estrogen Actions in the Brain and the Basis for Differential Action in Men and Women: A Case for Sex-Specific Medicines. *Pharmacol Rev.* 2010. **62**:155–198.
35. Gu S, Honisch S, Kounenidakis M, Alkahtani S, Alarifi S, Alevizopoulos K, Stournaras C, Lang. Membrane androgen receptor down-regulates c-src-activity and beta-catenin transcription and triggers GSK-3 beta-phosphorylation in colon tumor cells. *Cell Physiol Biochem.* 2014; **34**(4): 1402-12.
36. Guillou JL, Nakata H y Cooper DMF. Inhibition by calcium of mammalian adenylyl cyclases. *J Biol Chem.* 1999. **274**: 35539– 45.
37. Gurdal, H., Friedman, E. y Johnson M. Beta-adrenoceptor-G alpha S coupling decreases with age in rat aorta. *Mol. Pharmacol.* 1995; **47**: 772–778.
38. Halls Michelle L. y Cooper Dermot M.F. Regulation by Ca²⁺ Signaling Pathways of Adenylyl Cyclases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011. **3**:a004143
39. Hoffman Brian B. y Lefkowitz Robert J. (1996). Catecholamines, sympathomimetic drugs, and adrenergic receptor antagonists. Goodman & Gilman's. The Pharmacological basis of Therapeutics. Hardman Joel G y Limbird Lee E. Novena edición. Editorial McGraw-Hill.
40. Hu B, Nakata H, Gu C, De Beer T, Cooper DMF. 2002. A critical interplay between Ca²⁺ inhibition and activation by Mg²⁺ of AC5 revealed by mutants and chimeric constructs. *J Biol Chem.* **20277**:33139–33147.

41. Intengan Hope D. y Schiffrin Ernesto L. Structure and Mechanical Properties of Resistance Arteries in Hypertension. *Hypertension*. 2000. **36**: 312.
42. Iyengar R. Molecular and functional diversity of mammalian Gs-stimulated adenylyl cyclases. *FASEB J*. 1993. **7**:768–775.
43. Iyer V, Tran TM, Foster E, Dai W, Clark RB, Knoll BJ. Differential phosphorylation and dephosphorylation of beta2-adrenoceptor sites Ser262 and Ser355,356. *Br J Pharmacol*. 2006; **147**(3):249-59.
44. Jin W. Age-related increase of beta1-adrenergic receptor gene expression in rat liver: a potential mechanism contributing to increased beta-adrenergic receptor density and responsiveness during aging. *J Recept Signal Transduct Res*. 2011; **31**(1):96-102.
45. Karashima E, Nishimura J, Iwamoto T, Hirano K, Hirano M, Kita S, Harada M y Kanaide H. Involvement of Na⁺-Ca²⁺-exchanger in cAMP-mediated relaxation in mice aorta: evaluation using transgenic mice. *Br J Pharmacol*. 2007. **150**(4):434–444.
46. Kawashima S, Mitsuhiro Y. Dysfunction of Endothelial Nitric Oxide and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; **24**: 998-1005.
47. Kitano K. Structural mechanisms of human RecQ helicases WRN and BLM. *Front Genet*. 2014; **5**: 366.
48. Lakatta EG. Age-related alterations in the cardiovascular response to adrenergic mediated stress. *Fed Proc*. 1980; **39**(14):3173-7.
49. Lakatta EG. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease. *Circulation*. 2003; **107**(1):139–146.

50. Langlands JM, Diamond J. The effect of phenylephrine on inositol 1,4,5-trisphosphate levels in vascular smooth muscle measured using a protein binding assay system. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990; **173**(3): 1258-65.
51. Lie JT, Hammond PI. Pathology of the senescent heart: anatomic observations on 237 autopsy studies of patients 90 to 105 years old. *Mayo Clin Proc*. 1988; **63**(6):552–564.
52. Limbird LE. The receptor concept: a continuing evolution. *Mol Interv*. 2004; **4**(6):326-36.
53. Lincoln TM, Fisher-Simpson V. A comparison of the effects of forskolin and nitroprusside on cyclic nucleotides and relaxation in the rat aorta. *Eur J Pharmacol*. 1984; **101**(1-2):17-27.
54. Liu Peter Y., Death Alison K. y Handelsman Anddavid J. Androgens and Cardiovascular Disease. *Endo Rev*. 2003. **24**(3): 313–340.
55. López Canales Oscar A. Evaluación molecular y funcional de los subtipos de receptores beta adrenérgicos en la aorta durante la maduración de la rata (tesis de maestría). 2011. Centro de investigación y de estudios avanzados del IPN unidad Zacatenco. Distrito Federal. México.
56. Luo H, Yang HF, Jiang R. Androgen correlates with expressions of ryanodine receptor 1 and voltage-gated calcium channel 1.3 in rat corpus cavernosum smooth muscle. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2009; **15**(10): 895-900.
57. Mahmoud M., Sharabi Fouad M., Gowilly Sahar M., Mahmoud M. y Mohy Din. (2007). Inhibition of nitric oxide-guanylate cyclase-dependent and-

- independent signaling contributes to impairment of α -adrenergic vasorelaxations by cyclosporine. *Biochem Pharm.* 2007. **73**: 359–367
58. Malcolm Johnson. The β -Adrenoceptor. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998. **158**: S146–S153.
59. Matsushita M. y Yoshio Tanaka. (2006). Studies on the mechanisms underlying α -adrenoceptor-mediated relaxation of rat abdominal aorta. *J Smooth Muscle Res.* **42**(6): 217-223.
60. Moncada S y Higgs EA. Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb Exp Pharmacol.* 2006. **176** Pt 1:213-54.
61. Montaña LM, Calixto E, Figueroa A, Flores-Soto E, Carbajal V y Perusquía M. Relaxation of androgens on rat thoracic aorta: testosterone concentration dependent agonist/antagonist L-type Ca^{2+} channel activity, and 5 β -dihydrotestosterone restricted to L-type Ca^{2+} channel blockade. *Endocrinology.* 2008. **149**(5): 2517-26.
62. Moosmang S, Schulla V, Welling A, Feil R, Feil S, Wegener JW, Hofmann F y Klugbauer N. Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation. *EMBO J.* 2003. **22**(22):6027–34.
63. Morgado Manuel, Cairrao Elisa, Santos Silva Antonio Jose y Verde Ignacio. Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. *Cell. Mol. Life Sci.* 2012. **69**:247–266.
64. Mou TC, Masada N, Cooper DM, Sprang SR. Structural basis for inhibition of mammalian adenylyl cyclase by calcium. *Biochemistry.* 2009; **48**(15): 3387-97.

65. Nelson PS, Clegg N, Arnold H, Ferguson C, Bonham M, White J, Hood L, Lin B. The program of androgen-responsive genes in neoplastic prostate epithelium. *Proc Natl Acad Sci*. 2002. **99**(18):11890-5.
66. Niesor EJ, Benghozi R. Potential Signal Transduction Regulation by HDL of the β 2-Adrenergic Receptor Pathway. Implications in Selected Pathological Situations. *Arch Med Res*. 2015. pii: **S0188-4409**(15)00126-5.
67. O'Donnell SR y Wanstall JC. Beta-1 and beta-2 adrenoceptor-mediated responses in preparations of pulmonary and aorta from young and aged rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 1984; **228**: 733–738.
68. Oakhill JS, Steel R, Chen ZP, Scott JW, Ling N, Tam S y Kemp BE. AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase. *Science*. 2011. **332**(6036): 1433–1435.
69. O'Leary DH. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. *N Engl J Med*. 1999; **340**(1):14–22.
70. Oliver Eduardo, Martí Daniel, Monto Fermí, Flacco Nicla, Moreno Lucrecia, Baretino Domingo, Ivorra M. Dolores y D'Ocon Pilar. The Impact of α 1-Adrenoceptors Up-Regulation Accompanied by the Impairment of β -Adrenergic Vasodilatation in Hypertension. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009. **328**: 982–90.
71. Oliver VL, Anderson C, Ventura S, Haynes JM. Androgens regulate adenylate cyclase activity and intracellular calcium in stromal cells derived from human prostate. *Prostate*. 2010; **70**(11):1222-32.

72. Oloyo AK, Sofola OA, Anigbogu CN, Nair RR, Vijayakumar HS y Fernandez AC. Testosterone reduces vascular relaxation by altering cyclic adenosine monophosphate pathway and potassium channel activation in male Sprague Dawley rats fed a high-salt diet. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2013; 7(2):75-85.
73. Onda T, Hashimoto Y, Nagai M, Kuramochi H, Saito S, Yamazaki H, et al. Type-specific regulation of adenylyl cyclase. Selective pharmacological stimulation and inhibition of adenylyl cyclase isoforms. *J Biol Chem.* 2001. **276**: 47785–93.
74. Orshal Julia M. y Khalil Raouf A. Gender, sex hormones, and vascular tone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004. **286**:R233-R249.
75. Ostrom Rennolds S., Bogard Amy S., Gros Robert y Feldman Ross D. Choreographing the adenylyl cyclase signalosome: sorting out the partners and the steps. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2012. **385**: 5–12.
76. Pan HY, Hoffman BB, Pershe RA, Blaschke TF. Decline in beta adrenergic receptor-mediated vascular relaxation with aging in man. *J Pharmacol Exp Ther.* 1986; **239**(3):802-7.
77. Paneni F, Costantino S, Cosentino F. Molecular pathways of arterial aging. *Clin Sci (Lond).* 2015; **128**(2):69-79.
78. Paul Richard J., Bowman P. S., Johnson J. y Martin A. F. Effects of sex and estrogen on myosin COOH-terminal isoforms and contractility in rat aorta. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.* 2007. **292**: R751-7.
79. Piggott LA, Bauman AL, Scott JD y Dessauer CW. The Akinase anchoring protein Yotiao binds and regulates adenylyl cyclase in brain. *Proc Nat Acad Sci U S A.* 2008; **105**: 13835–13840.

80. Premont RT, Jacobowitz O, Iyengar R. Lowered responsiveness of the catalyst of adenylyl cyclase to stimulation by GS in heterologous desensitization: a role for adenosine 3',5'-monophosphate-dependent phosphorylation. *Endocrinology*. 1992; **131**(6): 2774-84.
81. Premont RT, Matsuoka I, Mattei MG, Pouille Y, Defer N y Hanoune J. Identification and characterization of a widely expressed form of adenylyl cyclase. *J Biol Chem*. 1996. **271**: 13900–7.
82. Prieto D, Contreras C y Sánchez A. Endothelial dysfunction, obesity and insulin resistance. *Curr Vasc Pharmacol*. 2014; **12**(3):412-26.
83. Rainbow RD, Macmillan D y McCarron JG. The sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ store arrangement in vascular smooth muscle. *Cell Calcium*. 2009. **46**(5-6): 313-22.
84. Regalado M., Torrero C. y Salas M. Características del juego social de ratas púberes desnutridas y estimuladas. Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología. Instituto de Neurobiología. Campus UNAM Juriquilla, Querétaro, Qro. 2006. México. Simposio.
85. Rosenbaum DM, Rasmussen SGF y Kobilka BK. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*. 2009. **459**, 356-363.
86. Ruiz-Velasco V, Zhong J, Hume JR, Keef KD. Modulation of Ca²⁺ channels by cyclic nucleotide cross activation of opposing protein kinases in rabbit portal vein. *Circ Res*. 1998. **82**(5):557–565.
87. Safa M, Mousavizadeh K, Noori S, Pourfathollah A, Zand H. cAMP protects acute promyelocytic leukemia cells from arsenic trioxide-induced caspase-3 activation and apoptosis. *Eur J Pharmacol*. 2014; 736: 115-23.

- 88.Samaras N, Papadopoulou MA, Samaras D, Ongaro F. Off-label use of hormones as an antiaging strategy: a review. *Clin Interv Aging*. 2014; **9**:1175-86.
- 89.Sassone-Corsi Paolo. The Cyclic AMP Pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012; **4**:a011148.
- 90.Scarpace PJ, Tumer N, Mader SL. Beta-adrenergic function in aging. Basic mechanisms and clinical implications. *Drugs Aging*. 1991; **1**(2):116-29.
- 91.Schutzer WE, Xue H, Reed J, Oyama T, Beard DR, Anderson S, Mader SL. Age-related β -adrenergic receptor-mediated vasorelaxation is changed by altering G protein receptor kinase 2 expression. *Vascul Pharmacol*. 2011b; **55** (5-6):178-88.
- 92.Schutzer WE., Beard Douglas R., Reed John F. y Mader Scott L. Characterization of Clonal Vascular Smooth Muscle Cell Lines Derived from Young and Old Fischer 344 Rats. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Animal*. 2011a. **47**: 445–450.
- 93.Schutzer William E., Xue Hong, Reed John F. y Mader Scott L. Effect of Age on Vascular α 2-Adrenergic Receptor Desensitization Is Not Mediated by the Receptor Coupling to G α i Proteins. *J Gerontol*. 2006. **61A**(9): 899–906.
- 94.Schutzer, W.E. y Mader, S.L. Age-related changes in vascular adrenergic signaling: clinical and mechanistic implications. *Ageing Res. Rev*. 2003; **2**: 169–190.
- 95.Shankar R. Ravi, Eckert George J., Saha Chandan, Tu Wanzhu y Pratt J. Howard. The Change in Blood Pressure during Pubertal Growth. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005. **90**(1): 163–167.

96. Stein SC, Woods A, Jones NA, Davison MD, Carling D. The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. *Biochem J*. 2000. **345**(Pt 3): 437–443.
97. Steiner D, Saya D, Schallmach E, Simonds WF, Vogel Z. Adenylyl cyclase type-VIII activity is regulated by G $\beta\gamma$ subunits. *Cell Signal*. 2006. **18**: 62–68.
98. Sturza A, Leisegang MS, Babelova A, Schröder K, Benkhoff S, Loot AE, et al. Monoamine oxidases are mediators of endothelial dysfunction in the mouse aorta. *Hypertension*. 2013; **62**(1):140-6.
99. Sun J, Fu L, Tang X, Han Y, Ma D, Cao J, Kang N, Ji H. Testosterone modulation of cardiac β -adrenergic signals in a rat model of heart failure. *Gen Comp Endocrinol*. 2011; **172**(3):518-25.
100. Suzuki Y, Shen T, Miyamoto N, Defer N, Matsuoka I y Hanoune J. Changes in the expression of adenylyl cyclases in the rat uterus during the course of pregnancy. *Biol Reprod*. 1997; **57**(4): 778-82.
101. Takuwa Y. Regulation of vascular smooth muscle contraction. The roles of Ca²⁺, protein kinase C and myosin light chain phosphatase. *Jpn Heart J*. 1996. **37**(6): 793-813.
102. Tang WJ, Krupinski J y Gilman AG. Expression and characterization of calmodulin-activated (type I) adenylyl cyclase. *J Biol Chem*. 1991. **266**: 8595–8603.
103. Tautermann CS. GPCR structures in drug design, emerging opportunities with new structures. *Bioorg Med Chem Lett*. 2014; **24**(17):4073-9.

104. Tsai H., Pottorf W.J., Buchholz J.N., Duckles S.P. Adrenergic nerve smooth endoplasmic reticulum calcium buffering declines with age. *Neurobiol. Aging*. 1998; **19**: 89–96.
105. Tsang S, Wong SS, Wu S, Kravtsov GM, Wong TM. Testosterone-augmented contractile responses to alpha1- and beta1-adrenoceptor stimulation are associated with increased activities of RyR, SERCA, and NCX in the heart. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009. **296**(4): C766-82.
106. Tsujimoto Gozoh, Lee Chi-Ho y Hoffman Brian B. Age-Related decrease in beta adrenergic receptor-mediated vascular smooth muscle relaxation. *J Pharmacol Exp Ther*. 1986. **239**: 411-15.
107. Unemoto T, Matsushita M, Tamura K, Tanaka Y, Koike K, Kogo H. Role of BK channels in testosterone-induced relaxation of the aorta in spontaneously hypertensive rats. *Biol Pharm Bull*. 2007; **30**(8): 1477-80.
108. Vanhoutte P. M. y Mombouli J. V. Vascular endothelium: vasoactive mediators. *Prog Cardiovasc Dis*. 1996. **39**(3): 229-38.
109. Vanscheeuwijck P, Van de Velde E, Fraeyman N. Effect of aging on properties and function of beta-adrenoceptors in rat lung. *Eur J Pharmacol*. 1989; **172**(4-5):373-80.
110. Vanterpool CK, Vanterpool EA, Pearce WJ, Buchholz JN. Advancing age alters the expression of the ryanodine receptor 3 isoform in adult rat superior cervical ganglia. *J Appl Physiol*. 2006; **101**(2):392-400.
111. Wang H, Gong B, Vadakkan KI, Toyoda H, Kaang BK, Zhuo M. Genetic evidence for adenylyl cyclase 1 as a target for preventing neuronal

- excitotoxicity mediated by N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem.* 2007; **282**:1507–1517.
112. Wang H-Y, Burns LH. 2006. G $\beta\gamma$ that interacts with adenylyl cyclase in opioid tolerance originates from a Gs protein. *J Neurobiol.* 2006. **66**: 1302– 10.
113. Webb Jerry G., Yates Phillip W., Yang Qing, Mukhin Yurii V. y Lanier Stephen M. Adenylyl cyclase isoforms and signal integration in models of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001. **281**: H1545–H1552.
114. Wehkalampi K, Hovi P, Dunkel L, Strang-Karlsson S, Järvenpää A-L, Eriksson JG et al. Advanced pubertal growth spurt in subjects born preterm: the Helsinki study of very low birth weight adults. *J of Clin Endo and Met.* 2012; **96**(2): 525-33.
115. Wei JY. Age and the cardiovascular system. *N Engl J Med.* 1992; **327**(24):1735–1739.
116. Witayavanitkul N, Woranush W, Bupha-Intr T y Wattanapermpool J. Testosterone regulates cardiac contractile activation by modulating SERCA but not NCX activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013; **304**(3): H465-72.
117. Woodcock Elizabeth A. The roles of α 1A- and α 1B-adrenergic receptors in heart: insights from studies of genetically modified mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007; **34**(9): 884-8.

118. Xiao RP, Tomhave ED, Wang DJ, Ji X, Boluyt MO, Cheng H, Lakatta EG. Age-associated reductions in cardiac beta1- and beta2-adrenergic responses without changes in inhibitory G proteins or receptor kinases. *J Clin Invest.* 1998; **101**(6):1273-82.
119. Xin W, Tran TM, Richter W, Clark RB, Rich TC. Roles of GRK and PDE4 activities in the regulation of beta2 adrenergic signaling. *J Gen Physiol.* 2008; **131**(4): 349-64.
120. Zhai K, Hubert F, Nicolas V, Ji G, Fischmeister R, Leblais V. β -Adrenergic cAMP signals are predominantly regulated by phosphodiesterase type 4 in cultured adult rat aortic smooth muscle cells. *PLoS One.* 2012; **7**(10): e47826.
121. Zhao Y, Flavahan S, Leung SW, Xu A, Vanhoutte PM, Flavahan NA. Elevated pressure causes endothelial dysfunction in mouse carotid arteries by increasing local angiotensin signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015. **308**(4):H358-63.