



VNIVERSITAT ID VALÈNCIA

Doctorado en Farmacología

**DISTRIBUCIÓN, FUNCIÓN Y
VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LOS
ADRENOCEPTORES β A NIVEL VASCULAR**

NICLA FLACCO

**Tesis Doctoral
Valencia, 2014**

**Directora:
M^a Dolores Ivorra Insa**



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA

M^a Dolores Ivorra Insa, Catedrática de Farmacología de la Universitat de València,

CERTIFICA:

Que la memoria titulada ***“Distribución, función y vías de señalización de los adrenoceptores β a nivel vascular”***, realizada por la Licenciada en Farmacia **Nicla Flacco**, ha sido llevada a cabo en el Departamento de Farmacología de la Universitat de València, bajo mi dirección y asesoramiento.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizo su presentación para que sea juzgado por el Tribunal correspondiente.

Valencia, febrero de 2014

M^a Dolores Ivorra Insa



University of Glasgow | College of Medical, Veterinary & Life Sciences

Date: 14th Jan 2014

Dto.Farmacología - Facultad de Farmacia
Universitat de Valencia
Av. Vicente Andres Estelles s/n
46100 Burjassot (Valencia) - España

Re: Certificate of Foreign Study (Nicla Flacco)

Dear Sir/Madam

I wish to confirm that Ms Nicla Flacco completed a period of study (20th Aug to 20th Dec, 2007) in my laboratory within the Institute of Biomedical and Life Sciences. The study period was funded by the "Ministerio de Educación y Ciencia" (Spain).

During her time in my lab Nicla was trained in a variety of new techniques and dissections. In particular, Nicla learned to use small vessel wire myography and confocal microscopy to study adrenergic mechanisms within the wall of small blood vessels. Overall, the project was a complete success and was of significant benefit to both Nicla and our general research effort.

I would be happy to provide any further information as required.

Yours Sincerely,

Prof. JC McGrath

John C McGrath
BSc PhD
Emeritus Professor Physiology
School of Life Sciences, West Medical Building (room 440)
University Avenue, Glasgow G128QQ. Tel: 0141 330 6606
Ian.McGrath@Glasgow.ac.uk

“Chi ha pazienza può ottenere ciò che vuole”

Benjamin Franklin
(1709-1790)

Ahora que por fin la tengo terminada, me gustaría agradecer a todas las personas que han contribuido, de una manera u otra, a la realización de esta Tesis:

En primer lugar a mi directora Loles, por haberme introducido en el mundo de la ciencia, hace ya nada menos que 10 años. Entonces yo venía de estancia de la Universidad de Bologna, y ella aceptó dirigir la parte experimental de mi Trabajo de Final de Carrera. Después de esa primera experiencia, cuando volví a Valencia ya Licenciada en Farmacia, me acogió nuevamente en el grupo, aceptando dirigir la presente Tesis. Durante todo este tiempo, ha sido siempre mi guía. He aprendido mucho de ella, a nivel profesional y también personal. Le agradezco sobretodo su entera disponibilidad y dedicación en todo el proyecto, además de sus animos y su buen humor.

A Pilar y Marian, por ser siempre tan amables y disponibles, por la ayuda y el apoyo recibidos cuando los he necesitado.

A Elisabeth Vila y a Francesc de Barcelona, por su amistad, sus consejos y su inestimable ayuda.

To Ian McGrath and Craig Daly, for their friendly welcome in the laboratory of Glasgow. To Laura, Claire and Joyce, for making my stay so enjoyable. A Sonia de Barcelona, por su enorme simpatía y compañerismo.

A todos mis compañeros del laboratorio. Como han sido muchos durante estos años, empiezo nombrando a los más antiguos, que dejaron el laboratorio hace tiempo, pero con algunos de los cuales siguo teniendo una grande amistad: Lara, Raquel, Ana O., José Miguel, Esperanza, Nourdine, Inma, Nadia, Isabel B., Zeng, Jaime, Dani. A los compañeros de mi grupo, con los que he trabajado codo a codo y a los que quiero de forma especial: Vanessa, Fermí, Edu, Miguel, Diana, Cristina, Sebastián, Nuria, Juan Fran. A los de otros grupos: Nuria, Isabel García, Maria Valls, Mariado, Marieta, Isabel Andújar, Javier, Lidia, Rosa, Aitana, Victoria, Rita, Julia, Jorge, Victor, Carmen, y a todos los que por descuido no he mencionado, les agradezco su compañerismo y amistad, además de los buenos momentos que hemos pasado juntos.

A la secretaría del Departamento, Mamen, Irene y Raquel, y a los técnicos del laboratorio, Carlos y Ángel, les doy las gracias por echarme una mano cuando se lo he solicitado. A todos los Profesores del Departamento de Farmacología les agradezco el interés, el apoyo y los animos que siempre me han dado.

A mio padre, mia madre, Mirko e nonna Assunta, per volermi bene cosí come sono e per appoggiarmi in tutte le decisioni. A nonna Giovina e ai nonni Nicola e Nicola, per avermi sempre incoraggiata a studiare: ovunque si trovino, non li dimenticheró mai. Ai miei suoceri Nicola e Maria, perché sono un esempio di forza, saggezza e rispetto per il prossimo.

A Massimo, per l'amore e la tranquillità che mi trasmette, per essermi stato sempre vicino, ma soprattutto per essere il padre meraviglioso che é. A Mayra e Nicol, perché sono la gioia piú grande della mia vita.

La realización de la presente Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la concesión de las siguientes ayudas:

BECA:

- ✓ Beca pre-doctoral del programa nacional de Formación del Profesorado Universitario (FPU).
Financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (AP2005-5076).

PROYECTOS:

- ✓ “Función, distribución y formas de expresión de los subtipos de adrenoceptores beta a nivel vascular: implicaciones terapéuticas”.
Financiado por CICYT (SAF 2007-62120).

- ✓ “Diferencias en función del género en la expresión y funcionalidad de adrenoceptores y GRKs en patología cardiovascular”.
Financiado por el Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 2008-PI070509).

Durante la realización de la presente Tesis Doctoral se han publicado los siguientes trabajos:

Oliver E, **Flacco N**, Arce C, Ivorra MD, D'Ocon P, Noguera MA (2014) Adrenoceptors and GRK2 in L-NAME-induced hypertension compared to spontaneously hypertensive rats. *J Vasc Res.* (Aceptado)

Perez-Aso M, **Flacco N**, Carpena N, Montesinos MC, D'Ocon P, Ivorra MD (2014) β_2 -adrenoceptors differentially regulate vascular tone and angiogenesis of rat aorta via ERK1/2 and p38. *Vascul Pharmacol.* (En revisión).

Flacco N, Segura V, Perez-Aso M, Estrada S, Seller JF, Jiménez-Altayó F, Noguera MA, D'Ocon P, Vila E, Ivorra MD (2013) Different β -adrenoceptor subtypes coupling to cAMP or NO/cGMP pathways: implications in the relaxant response of rat conductance and resistance vessels. *Br J Pharmacol.* 169:413-25.

Flacco N, Parés J, Serna E, Segura V, Vicente D, Pérez-Aso M, Noguera MA, Ivorra MD, McGrath JC, D'Ocon P (2013) α_{1D} -Adrenoceptors are responsible for the high sensitivity and the slow time-course of noradrenaline-mediated contraction in conductance arteries. *Pharmacol Research & Perspectives.* 1:1-14.

Segura V, **Flacco N**, Oliver E, Baretino D, D'Ocon P, Ivorra MD (2010) Alpha1-adrenoceptors in the rat cerebral cortex: new insights into the characterization of alpha1L- and alpha1D-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol.* 641:41-8.

Oliver E, Marti D, Monto F, **Flacco N**, Moreno L, Baretino D, Ivorra MD, D'Ocon P (2009) The impact of alpha1-adrenoceptors up-regulation accompanied by the impairment of beta-adrenergic vasodilatation in hypertension. *J Pharmacol Exp Ther.* 328:982-990.

ABREVIATURAS

A	Adrenalina
AC	Adenilato ciclasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADP	Adenosin difosfato
<i>Adrb1</i>	Gen para el AR β_1 en roedores
<i>Adrb2</i>	Gen para el AR β_2 en roedores
<i>Adrb3</i>	Gen para el AR β_3 en roedores
ADV	Capa adventicia
Akt	Proteína cinasa B
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
A.M.R.	Arterias mesentéricas de resistencia
AR	Adrenoceptor o Receptor Adrenérgico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosin trifosfato
BH ₄	Tetrahidrobiopterina
BSA	Albúmina sérica bovina (del inglés: <i>bovine serum albumin</i>)
Ca ⁺²	Calcio
CaM	Calmodulina
CCR	Curva concentración-respuesta
CE	Célula endotelial
CLM	Cadena ligera de miosina
CML	Célula muscular lisa
Cols.	Colaboradores
DAG	Diacilglicerol
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMSO	Dimetil sulfóxido
E	Endotelio

EDHF	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
EDRF	Factor relajante derivado del endotelio (NO)
e.e.m.	Error estándar de la media
E_{\max}	Efecto máximo
eNOS	Enzima óxido nítrico sintasa endotelial
ERK	Cinasa de respuesta exógena (del inglés: <i>extracellular signal-related kinase</i>)
FAD	Flavin adenina dinucleótido
FCLM	Fosfatasa de la cadena ligera de miosina
FMN	Flavin mononucleótido
GAPDH	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
<i>Gapdh</i>	Gen para el GAPDH en roedores
GC	Guanilato ciclasa
GCs	Guanilato ciclasa soluble
Gi	Proteína G inhibidora
GMPc	Guanosin monofosfato cíclico
GPCR	Receptor acoplado a proteína G (del inglés: <i>G protein-coupled receptor</i>)
GRK	Proteína cinasa de los receptores acoplados a proteína G
Gs	Proteína G estimuladora
IBMX	3-isobutil-1-metixamina
iNOS	Enzima óxido nítrico sintasa inducible
IP ₃	Inositol trifosfato
K ⁺	Potasio
KCLM	Cinasa de la cadena ligera de miosina
λ	Longitud de onda
LE	Lámina elástica
LEE	Lámina elástica externa
LEI	Lámina elástica interna
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina metil éster
L-NMMA	N ^G -mono-metil-L-arginina
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno (del inglés: <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
NA	Noradrenalina

NADPH	Nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato reducido
NF-kB	Factor de transcripción nuclear kappa beta
nNOS	Enzima óxido nítrico sintasa neuronal
NO	Óxido nítrico (del inglés: <i>nitric oxide</i>)
NOS	Enzima óxido nítrico sintasa
<i>Nos3</i>	Gen para la enzima eNOS en roedores
O ₂	Oxígeno
pA ₂	Potencia del antagonista calculada con el método de Schild
PBS	Tampón fosfato salino (del inglés: <i>phosphate buffered saline</i>)
PBS-T	PBS + Tween
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés: <i>polimerase chain reaction</i>)
pEC ₅₀	Logaritmo negativo (-log) de la concentración molar del agonista necesaria para producir el 50% del E _{max}
PDE4	Fosfodiesterasa 4
PI3K	Fosfatidil inositol-3 cinasa
PKA	Proteína cinasa A (o proteína cinasa dependiente de AMPc)
pK _{act}	Logaritmo negativo (-log) de la constante de activación de los agonistas en los estudios de estimulación de la AC
pK _B	Logaritmo negativo (-log) de la constante de afinidad del antagonista
PKC	Proteína cinasa C
PKG	Proteína cinasa G (o proteína cinasa dependiente de GMPc)
pK _i	Logaritmo negativo (-log) de la constante de inhibición del competidor frente al sitio de fijación del radioligando
PLC	Fosfolipasa C
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RS	Retículo sarcoplásmico
RT	Transcripción reversa o retrotranscripción (del inglés: <i>reverse transcription</i>)
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SHR	Rata espontáneamente hipertensa (del inglés: <i>spontaneously hypertensive rat</i>)
SNS	Sistema nervoso simpático
T ^a	Temperatura
TM	Dominio transmembrana

ÍNDICE

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. EL SISTEMA VASCULAR

1.1 Estructura de los vasos sanguíneos	1
1.2 Clasificación de los vasos sanguíneos	4
1.3 Regulación del sistema vascular por el sistema nervioso autónomo. Adrenoceptores (AR)	7
1.4 Regulación del tono vascular	13
1.4.1 Contracción.....	14
1.4.2 Relajación	16
1.5 Endotelio vascular y óxido nítrico (NO)	17
1.5.1 Biosíntesis del NO	19
1.5.2 Características de las isoformas de la NOS.....	20
1.5.3 Mecanismo de acción del NO en la regulación del tono vascular	22
1.5.4 Acciones vasculares del NO	25

2. ADRENOCEPTORES β

2.1 Clasificación de los AR	27
2.2 Características estructurales y regulación de los AR β	29
2.3 Características farmacológicas de los AR β	35
2.3.1 Agonistas	36
2.3.2 Antagonistas	37
2.4 Distribución y función de los AR β	41
2.4.1 Distribución y función de los AR β a nivel vascular	42
2.5 Vías de señalización de los AR β	46
2.5.1 Vía de señalización clásica del AMPc.....	46
2.5.2 Vía de señalización dependiente del NO endotelial	49

2.5.3	Vía de señalización de las MAPK	53
2.5.3.1	Efecto de los AR β sobre la activación de las MAPK.....	55
2.5.3.2	Efecto de las MAPK sobre la reactividad vascular.....	58
II.	OBJETIVOS	60
III.	MATERIAL Y MÉTODOS	
1.	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y EXTRACCIÓN DE LOS TEJIDOS.....	62
2.	EXTRACCIÓN Y CULTIVO DE LAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS (CML) Y ENDOTELIALES (CE) DE LA AORTA	65
3.	CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS AR β y DE LA eNOS.....	67
3.1	Extracción de ARN total	67
3.2	Transcripción reversa (RT)	68
3.3	PCR cuantitativa a tiempo real.....	69
3.4	Análisis de los resultados	69
4.	EXPRESIÓN PROTEICA DE LOS AR β POR INMUNOFLUORESCENCIA	70
5.	FORMACIÓN DE LOS NUCLEÓTIDOS AMPc y GMPc	71
5.1	Estimulación de las muestras.....	71
5.2	Extracción de AMPc y GMPc	72
5.3	Cuantificación de AMPc y GMPc.....	73
5.4	Análisis de los resultados	73
6.	EFFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS MAPK.....	74

6.1 Estimulación de las muestras.....	74
6.2 Extracción y cuantificación del contenido proteico.....	75
6.3 Inmunodetección de proteínas (Western Blot).....	75
6.4 Análisis de los resultados.....	76
7. ESTUDIOS FUNCIONALES DE REACTIVIDAD VASCULAR	77
7.1 Miografía.....	77
7.2 Baño de órgano aislado.....	79
7.3 Protocolos experimentales.....	81
7.4 Análisis de los resultados.....	84
8. FÁRMACOS UTILIZADOS.....	85
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	86

IV. RESULTADOS

1. EXPRESIÓN GÉNICA Y LOCALIZACIÓN DE LOS AR β	87
2. PARTICIPACIÓN DE LOS SUBTIPOS DE AR β EN LA FORMACIÓN DE AMPc Y GMPc.....	91
2.1 Acción de los agonistas.....	92
2.2 Acción de los antagonistas.....	93
3. INFLUENCIA DE LAS VÍAS DE AMPc Y GMPc EN LA VASODILATACIÓN MEDIADA POR LOS AR β	98
4. PARTICIPACIÓN DE LOS SUBTIPOS DE AR β EN LA VASODILATACIÓN.....	110
4.1 Acción de los agonistas.....	110
4.1.1 A.M.R.....	111
4.1.2 Aorta.....	111
4.2 Acción de los antagonistas.....	113
4.2.1 A.M.R.....	113
4.2.2 Aorta.....	115

5. PAPEL DEL ENDOTELIO Y DEL NO EN LA VASODILATACIÓN MEDIADA POR LOS SUBTIPOS DE AR β	121
5.1 A.M.R.....	121
5.2 Aorta	124
6. INFLUENCIA DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LAS MAPK (ERK1/2 y p38) EN LA VASODILATACIÓN MEDIADA POR LOS AR β EN AORTA.....	132
6.1 Efecto de los AR β sobre la activación de las MAPK	133
6.2 Efecto de las MAPK sobre la vasodilatación de los AR β	136
V. DISCUSIÓN.....	142
1. LOCALIZACIÓN Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN EL EFECTO VASODILATADOR DE LOS SUBTIPOS DE AR β EN A.M.R.	143
2. LOCALIZACIÓN Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN EL EFECTO VASODILATADOR DE LOS SUBTIPOS DE AR β EN AORTA	146
3. PAPEL DE LOS DIFERENTES SUBTIPOS DE AR β EN A.M.R. Y EN AORTA	152
4. AR β Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LAS MAPK EN AORTA	156
VI. CONCLUSIONS.....	163
VII. RESUMEN	165

VIII. ENGLISH VERSION167

IX. BIBLIOGRAFÍA.....186

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



1. SISTEMA VASCULAR	
1.1 Estructura de los vasos sanguíneos	1
1.2 Clasificación de los vasos sanguíneos	4
1.3 Regulación del sistema vascular por el sistema nervioso autónomo. Adrenoceptores (AR)	7
1.4 Regulación del tono vascular	14
1.5 Endotelio vascular y óxido nítrico (NO)	17
2. ADRENOCEPTORES β	
2.1 Clasificación de los AR	27
2.2 Características estructurales y regulación de los AR β	29
2.3 Características farmacológicas de los AR β	35
2.4 Distribución y función de los AR β	41
2.5 Vías de señalización de los AR β	46

1. EL SISTEMA VASCULAR

El sistema vascular, también llamado aparato circulatorio, consta de los vasos que transportan sangre y linfa a través del cuerpo. En esta revisión, nos ocuparemos del sistema vascular sanguíneo, omitiendo el sistema linfático.

Los vasos del sistema vascular sanguíneo conducen la sangre con la finalidad de suministrar oxígeno y nutrientes a los tejidos y eliminar los desechos que allí se producen. Hay dos tipos principales de vasos sanguíneos: las arterias, que alejan la sangre del corazón hacia los capilares a una presión relativamente alta, y las venas que llevan la sangre de vuelta al corazón desde los capilares, a una presión relativamente baja.

1.1 Estructura de los vasos sanguíneos

La pared de los vasos sanguíneos está constituida fundamentalmente por tres capas o túnicas concéntricas: una interna o íntima, una central o media y una más externa denominada adventicia (Imagen 1).

La **túnica íntima** es la capa interna del vaso que se encuentra en contacto directo con la sangre circulante. Está formada por una monocapa de células epiteliales planas altamente especializadas que se denomina endotelio. Las células endoteliales (**CE**) están unidas entre sí mediante uniones ocluyentes, uniones tiponexo y uniones estrechas (Dejana y cols., 1995; Telò y cols., 1997; Schnittler, 1998; Michiels, 2003). La capa de CE descansa sobre una lámina basal rica en colágeno, elastina, fibronectina, laminina y proteoglicanos (Sumpio y cols., 2002). A su vez la lámina basal descansa sobre una lámina elástica interna (LEI) muy fina y fenestrada (Briones y cols., 2003) que separa la túnica íntima de la túnica media.

El endotelio no es simplemente una barrera física que separa la sangre de los tejidos y que facilita el intercambio selectivo de sustancias, como se pensaba hace 30 años, sino que es un órgano muy importante, que participa en muchos procesos metabólicos y funcionales, incluyendo la regulación de la homeostasis

y el tono vascular, la respuesta inflamatoria, la coagulación, la angiogénesis, la defensa inmune, la producción de factores de crecimiento o la formación de la matriz extracelular (Sumpio y cols., 2002; Félétou y cols., 2011; Garland y Weston, 2011; Szabó y Papapetropoulos, 2011). Nuestro trabajo se centra sobre todo en el papel que desempeña el endotelio en la modulación del tono vascular, que se detalla con más profundidad en el apartado 1.5 “Endotelio vascular y óxido nítrico (NO)”.

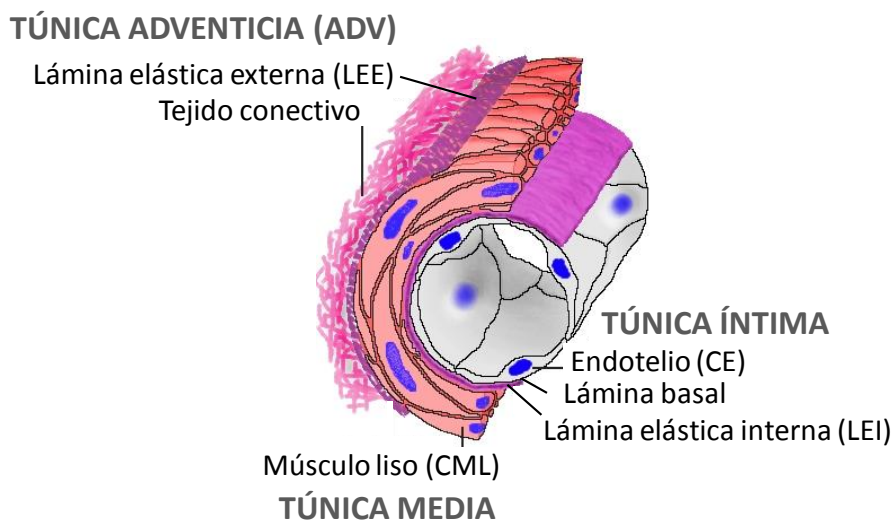


Imagen 1. Estructura de los vasos sanguíneos.

La **túnica media** es la capa intermedia del vaso sanguíneo y la de mayor grosor. Está formada predominantemente por células musculares lisas (**CML**) que se disponen en capas concéntricas, reforzadas por capas de tejido elástico que forman la lámina elástica (LE). Las CML están embebidas en una matriz extracelular rica en elastina y colágeno, tienen un único núcleo central, son fusiformes y dispuestas circular o helicoidalmente alrededor de la luz del vaso.

La túnica media, además de servir como soporte muscular de la pared vascular, es la encargada de la actividad vasomotora, de forma que la contracción o relajación de las CML afecta al diámetro interno del vaso. El aparato contráctil se encuentra en el interior de las CML y está formado por filamentos finos de actina y gruesos de miosina (más adelante, en el apartado 1.4 “Regulación del tono vascular”, se describe el mecanismo de contracción del

músculo liso). La presencia de uniones tipo nexo entre células vecinas aseguran la unidad funcional y facilitan la coordinación de la contracción (Lagaud y cols., 2002). Asimismo, las CML mantienen contacto con las CE a través de las fenestras de la LEI.

La **túnica adventicia (ADV)** es la capa más alejada de la luz del vaso y rodea la túnica media, de la cual está separada a través de una membrana llamada lámina elástica externa (LEE). La ADV está formada por diferentes tipos de células (como fibroblastos, macrófagos, mastocitos y adipocitos) y por tejido conectivo (colágeno y elastina). A través de la ADV circulan una red de vasos de calibre muy pequeño denominados *vasa vasorum* (que irrigan de manera profunda los vasos de grueso calibre) y penetran las fibras nerviosas que inervan las arterias y arteriolas (Hirst y Edwards, 1989).

Tradicionalmente se ha considerado que la función principal de la ADV era ejercer de soporte estructural de los vasos sanguíneos. No obstante, hoy en día se piensa que puede jugar un papel importante en la regulación del tono vascular y en la patogenia de algunas enfermedades cardiovasculares como la arterioesclerosis (Gutterman, 1999) y la hipertensión (Arribas y cols., 1997a, 1997b; Kantachuvesiri y cols., 2001).

A pesar de que esta disposición en tres túnicas sea común a todos los vasos sanguíneos, existen diferencias dependiendo del tipo de vaso (arterias, venas y vasos linfáticos), pudiendo variar, entre otros parámetros, la proporción y el grosor de cada túnica o el grado de inervación de los tejidos (Hirst y Edwards, 1989).

1.2 Clasificación de los vasos sanguíneos

Los vasos sanguíneos cumplen diferentes funciones, según las cuales se clasifican en: arterias de **conductancia**, arterias de **resistencia**, vasos de **intercambio** y vasos de **capacitancia** (Levick, 2003; Imagen 2). En cada clase de vaso, la pared vascular está adaptada a su papel fisiológico.

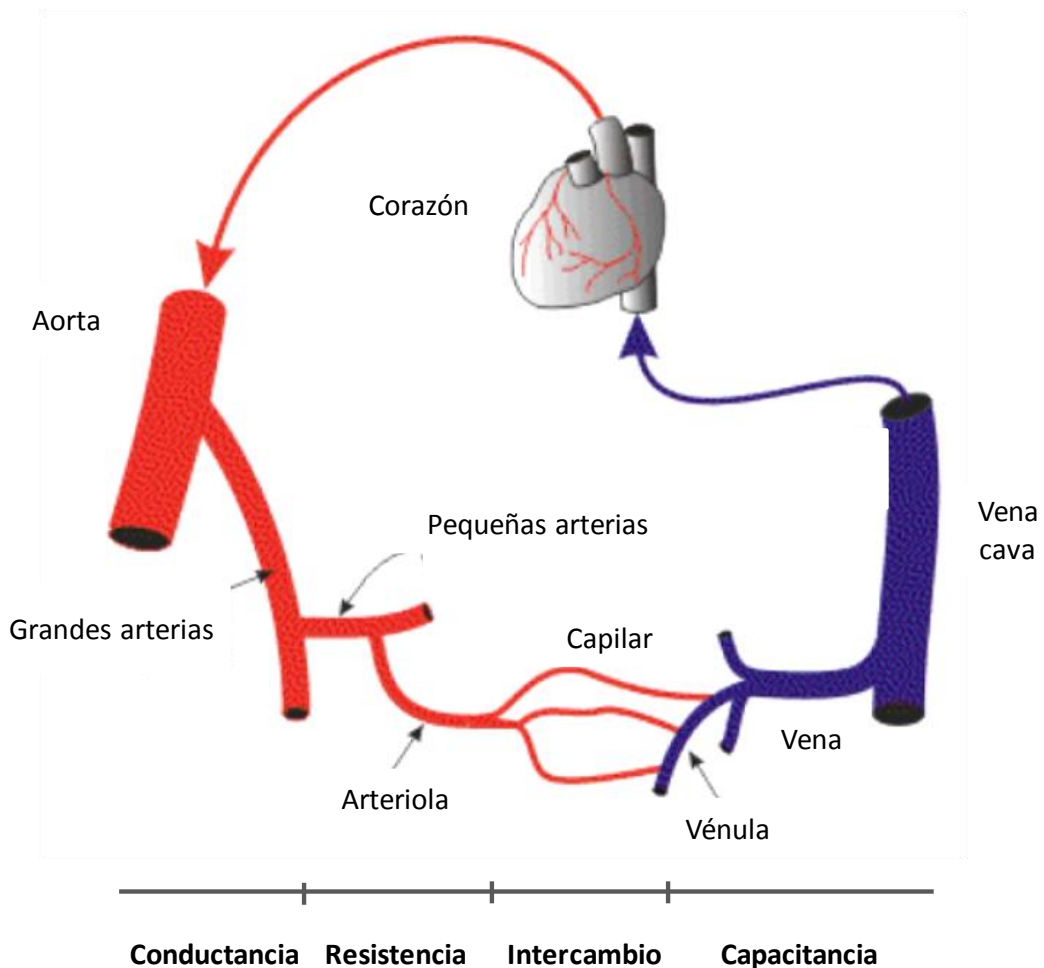


Imagen 2. Diferentes tipos de vasos sanguíneos.

Las **arterias de conductancia**, que distribuyen la sangre a todo el organismo, pueden ser elásticas o musculares. Las arterias elásticas son las grandes arterias como la aorta y la ílica, que en humanos presentan un diámetro entre 1 y 2 cm. Tienen una pared muy distensible porque su túnica media consiste en varias capas de LE fenestradas que se alternan con las capas de CML. La elastina, proteína extracelular 6 veces más extensible que el caucho, permite que las arterias elásticas se expandan alrededor de un 10 % en cada

latido cardíaco, acomodándose para la expulsión de la sangre. La retracción de los vasos elásticos durante la diástole transforma el flujo pulsátil de la aorta ascendente en un flujo continuo en las arterias más distales. El colágeno que es 100 veces más rígido que la elastina, impide la sobredistensión del vaso. Estas arterias juegan un doble papel fisiológico: son conductoras y reguladoras del caudal sanguíneo.

Las arterias musculares de conductancia son arterias de mediano y pequeño calibre como las coronarias o las cerebrales, con un diámetro entre 0,1-1 cm en humanos. Presentan una túnica media más gruesa respecto a las arterias elásticas, con abundantes CML, entre las cuales se encuentran fibras de colágeno y proteoglicanos. La pared gruesa impide el colapso en los lugares en los que hay curvaturas afiladas como en el codo y la rodilla. Fisiológicamente, su función es controlar la luz del vaso y regular el flujo sanguíneo.

Las **arterias de resistencia** son arterias musculares de diámetro pequeño (< 500 μm en humanos). Las arterias musculares poseen una rica inervación autonómica (Fuxe y Sedvall, 1965; Furness y Marshall, 1974; Bevan, 1979). Al contrario que las grandes arterias, las arterias de resistencia influyen sobre la presión arterial media local y el flujo sanguíneo (Christensen y Mulvany, 2001). Dado que estos vasos controlan la resistencia al flujo, sirven como “grifos” de la circulación, pudiendo aumentar o disminuir el flujo para adecuarse a la demanda local. Cuando los vasos de resistencia se dilatan, la resistencia cae y el flujo local aumenta. En cambio, la vasoconstricción aumenta la resistencia a nivel local, reduciendo el flujo sanguíneo. Estas arterias musculares, al ramificarse, van disminuyendo de calibre de forma gradual, hasta acabar en las arteriolas, que a su vez se abren en un sistema de vasos muy delgados, que se denominan capilares. Las arteriolas terminales también ajustan la perfusión sanguínea a nivel capilar (Levick, 2003).

El **intercambio** de gases y metabolitos tiene lugar principalmente en los capilares, muy numerosos y pequeños (diámetro de 4-7 μm). La pared de los capilares consta de una sola capa de CE de 0,5 μm de grosor, que facilita el paso de sustancias. Parte del intercambio gaseoso tiene lugar en las vénulas

pericíticas y postcapilares (diámetro de 15-50 μm) que carecen de capa muscular lisa. No obstante, parte del O_2 pasa también a través de las arteriolas. Estrictamente hablando, el término vasos de intercambio comprende microvasos de los dos lados de la red capilar. Aunque los capilares son muy estrechos, el lecho capilar en su conjunto presenta una resistencia baja al flujo y una caída modesta de la presión. Ello es debido al gran número de capilares estructurados en paralelo y a su pequeña longitud (aproximadamente 1 mm). La gran área de la sección del lecho capilar disminuye la velocidad a 0,5/1 mm/s. Como resultado, cada glóbulo rojo tarda entre 0,5 a 2 segundos en atravesar los capilares. Este tiempo de tránsito es suficiente para que el glóbulo rojo pueda dejar O_2 y capturar CO_2 de los tejidos (Levick, 2003).

Los **vasos de capacitancia** son vasos venosos que actúan como depósito. Las vénulas (diámetro de 50-200 μm) y las venas (diámetro de 0,2-5 mm) difieren principalmente en tamaño y número. Tienen una pared delgada que comprende la túnica íntima, la túnica media (con musculatura lisa y colágeno) y la ADV. Las vénulas y las venas pequeñas son más numerosas que sus correspondientes arteriolas y arterias, tienen menos músculo y su resistencia neta es muy baja. Una caída de presión de sólo 10-15 mmHg es suficiente para conducir el gasto cardíaco de las vénulas hacia la aurícula derecha. Dado su gran número y tamaño, las venas contienen aproximadamente dos tercios de la sangre circulante por lo que se denominan *vasos de capacitancia*. Pero, debido a que tienen una pared muy fina, se distienden o colapsan con facilidad actuando como depósitos de sangre. Muchas venas periféricas están inervadas por fibras nerviosas, por lo que el volumen sanguíneo en el depósito venoso puede ser controlado activamente: por ejemplo, en situaciones de estrés, los vasos de capacitancia se contraen y desplazan la sangre al corazón y a las arterias. Todas las venas confluyen en las venas cavas (superior e inferior, con un diámetro de hasta 3 cm) que finalmente desembocan en la aurícula derecha del corazón.

1.3 Regulación del sistema vascular por el sistema nervioso autónomo. Adrenoceptores (AR)

El sistema vascular está regulado por el sistema nervioso autónomo, que influye en la vasculatura principalmente a través de cambios en la liberación de las catecolaminas noradrenalina (NA) y adrenalina (A) de las terminales nerviosas simpáticas y la médula suprarrenal. La NA se libera de las terminaciones noradrenérgicas posganglionares y ambas catecolaminas (NA y mayoritariamente A) se secretan de la médula suprarrenal.

Los vasos sanguíneos están inervados por las fibras del sistema nervioso autónomo, las cuales penetran por la ADV para alcanzar las CML y las CE. Esta inervación se extiende a lo largo de todo el lecho vascular, desde las arterias hasta las venas, excluidos los capilares, siendo más abundante en los vasos de resistencia que en los de conductancia. De esta forma se ha descrito que los vasos de resistencia, como las arterias mesentéricas de pequeño calibre (A.M.R.), están altamente inervados, mientras que los vasos de conductancia, como la aorta, están pobremente inervados (Fuxe y Sedvall, 1965; Furness y Marshall, 1974; Bevan, 1979).

Existen dos tipos de inervación vascular:

- una **inervación simpática** (noradrenérgica) que puede ejercer una acción **vasoconstrictora**, a través de la activación de los receptores adrenérgicos o adrenoceptores (AR) α , o **vasodilatadora**, a través de la activación de los AR β ;
- una **inervación parasimpática** (colinérgica) que ejerce una acción **vasodilatadora**, a través de activación de los receptores muscarínicos (M_3) que producen la liberación de NO de las CE.

No obstante, el control de la circulación y el mantenimiento de la presión sanguínea dependen mayoritariamente de la inervación simpática vasoconstrictora (Tsuru, 1999). Los nervios vasoconstrictores actúan constantemente, es decir que existe un tono vasoconstrictor que mantiene a las arterias en un estado de permanente semicontracción. La supresión de dicho tono en un territorio vascular provoca una vasodilatación. Si se excitan entonces

los nervios vasodilatadores de esa zona, se producirá una dilatación aún mayor de los vasos.

El principal neurotransmisor de la inervación simpática es la NA, además de otros como A y dopamina. Las terminaciones noradrenérgicas, junto con la NA, contienen también cotransmisores como ATP y neuropéptido Y (Donoso y cols., 1997; Tsuru y cols., 2002) (Imagen 3).

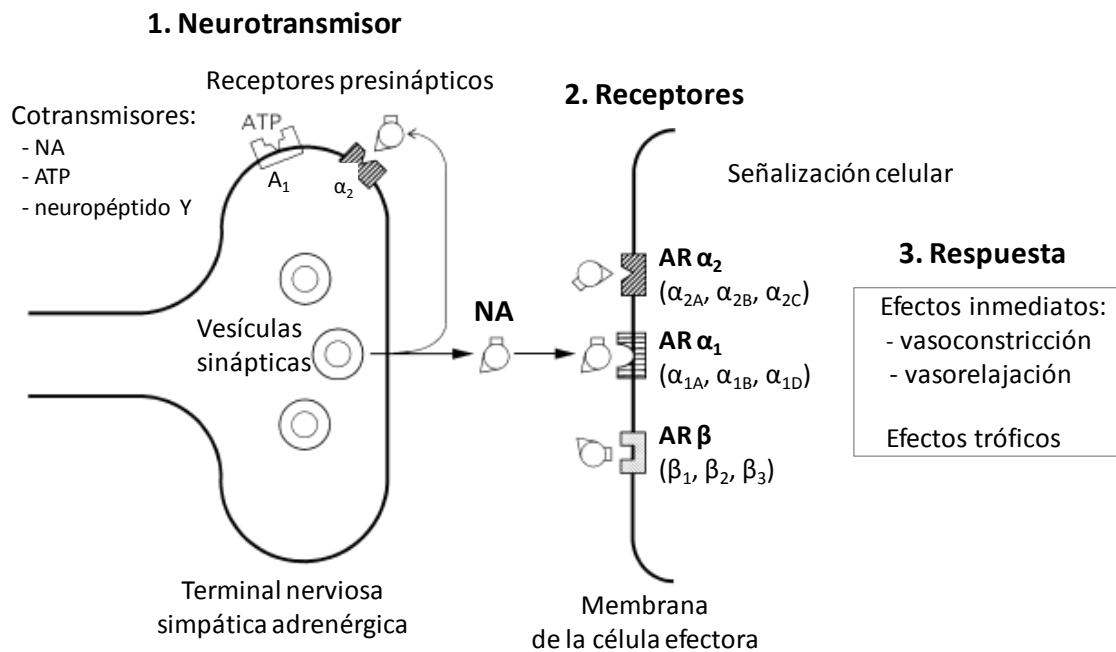


Imagen 3. Inervación simpática y mecanismo neuroefector adrenérgico en los vasos sanguíneos (modificado de Tsuru y cols., 2002).

1. Neurotransmisor: el neurotransmisor noradrenalina (NA) es liberado por la terminación nerviosa simpática. Las fibras nerviosas simpáticas pueden contener cotransmisores como ATP y neuropéptido Y. La liberación de NA puede ser modulada presinápticamente, por ejemplo a través de los AR α₂ o del receptor de adenosina A₁.

2. Receptores: en la membrana de la célula efectora se encuentran diferentes tipos (α₁, α₂ y β) y subtipos (α_{1A}, α_{1B}, α_{1D}, α_{2A}, α_{2B}, α_{2C}, β₁, β₂ y β₃) de AR. Existen diferencias regionales notables en la población de los subtipos de AR.

3. Respuesta: la inervación simpática puede producir tanto efectos inmediatos, como la vasoconstricción y la vasodilatación, como efectos tróficos a largo plazo sobre los vasos sanguíneos.

La NA es una catecolamina (como la dopamina y la A) que se sintetiza en todas las sinapsis adrenérgicas del sistema nervioso central y periférico, se almacena en las vesículas sinápticas y se libera al espacio sináptico por exocitosis. Una vez en la hendidura sináptica, la NA actúa sobre tres tipos de receptores específicos: AR α_1 , α_2 y β , situados tanto a nivel pre como postsináptico (Guimaraes y Moura, 2001) (Imagen 3). Además, puede ser recaptada por la neurona, donde se incorpora a nuevas vesículas sinápticas o se degrada mediante la enzima monoaminoxidasa (MAO) o catecol-O-metil transferasa (COMT) (Hein, 2006).

Los AR presinápticos localizados en las terminaciones nerviosas son, tradicionalmente, los AR α_2 (Imagen 3): su activación inhibe la liberación de NA (Enero y cols., 1972), ejerciendo un control por retroalimentación negativa de la función del sistema autónomo. Pero, en algunas neuronas noradrenérgicas presinápticas, se ha descrito también la presencia de los AR β , cuya estimulación facilita la liberación de NA (Marín y Balfagón, 1998). Estudios más recientes demuestran la presencia de AR α_1 y β en nervios de arterias mesentéricas de ratón y A.M.R. de rata que pueden ser o bien terminales nerviosas simpáticas o nervios sensoriales (Briones y cols., 2005; McGrath y cols, 2005). De hecho, Scotland y cols. (2004) han descrito la presencia de nervios sensoriales en las arterias de mesentéricas que pueden participar de forma local en la regulación del tono miógeno de estos vasos.

Los AR postsinápticos pueden ser de los tres tipos (α_1 , α_2 y β) (Imagen 3) y pueden expresarse tanto en las CML como en las CE. En las CML, la NA liberada desde las terminaciones nerviosas o la A circulante pueden activar los AR α_1 y β . Ambos son receptores acoplados a proteína G, pero desencadenantes de acciones opuestas. En el caso de los AR α_1 , tras su estimulación, se activa la fosfolipasa C (PLC) y se produce un incremento en los segundos mensajeros inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG), provocando la liberación de calcio (Ca^{2+}) intracelular y vasoconstricción (García-Sainz y cols., 2000) (ver: apartado 1.4.1 "Contracción" e Imagen 5). En el caso de los AR β , su unión a la NA activa la adenilato ciclasa (AC), produciendo un incremento de adenosin monofosfato cíclico (AMPC), el cual activa la proteína cinasa A (PKA) y provoca la disminución

en los niveles de Ca^{2+} intracelular, originando la relajación del músculo liso vascular (Werstiuk y Lee, 2000) (ver: apartado 2.5.1 “*Vía de señalización clásica del AMPc*” e Imagen 12).

La respuesta neta a la NA y A es el resultado de la estimulación de ambos tipos de receptores (α_1 y β), y depende de la abundancia relativa de cada uno de ellos. La NA posee mayor afinidad por los AR α_1 que por los β , y debido al predominio de los receptores α_1 en las CML, el efecto global producido por la NA liberada desde las terminaciones nerviosas adrenérgicas es vasoconstrictor (Sastre y cols., 2010). La A es un agonista de los AR α y β , y puede producir dos tipos de efectos: el que predomina normalmente es el vasoconstrictor, aunque en algunos lechos vasculares puede producir una vasodilatación (Rang y cols, 2012).

En las CE se ha descrito la presencia de los tres tipos de AR (α_1 , α_2 y β). Diversos estudios evidencian que la activación de los AR α_2 endoteliales provoca la liberación de NO, lo cual atenúa la vasoconstricción producida por los AR α_1 musculares (Angus y Cocks, 1989; Vanhoutte y Miller, 1989; Guimaraes y Moura, 2001). Sin embargo diversos trabajos apuntan a que son los AR α_1 los principales implicados en la relajación dependiente del endotelio, inducida por NA y mediada a través de la liberación de NO (Jones y cols., 1993; Kaneko y Sunano, 1993; Amerini y cols., 1995; Zschauer y cols., 1997; Boer y cols., 1999; Tuttle y Falcone, 2001; Gurdal y cols., 2005). Además se postula que los AR β también se encuentran a nivel endotelial, desempeñando un papel fisiológico en la modulación del tono contráctil inducido por altas dosis de NA a través de la liberación de NO (Arribas y cols., 1994; Brawley y cols., 2000a; Vanhoutte, 2001; Akimoto y cols., 2002).

Debido a que la distribución de los AR α_1 , α_2 y β con regulación simpática cambia según los tipos celulares (CML y CE) y los lechos vasculares, la respuesta a la NA varía dependiendo del tipo de vaso (Tsuru y cols., 2002). Además, como se describe en el apartado 2.1 “*Clasificación de los AR*”, cada uno los tres tipos de AR (α_1 , α_2 y β), se divide a su vez en tres subtipos diferentes, con lo que actualmente se acepta la existencia de 9 subtipos de AR (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} , α_{2A} , α_{2B} ,

α_{2C} , β_1 , β_2 , β_3) (Imagen 3) (Alexander y cols., 2011; Bond y cols., 2013), y cada subtipo se localiza y actúa preferentemente en una región vascular u otra.

En el caso de los AR α_1 , aunque los 3 subtipos se encuentran expresados en los diferentes lechos vasculares (Miller y cols., 1996; Zhong y Minneman 1999), la respuesta vasoconstrictora depende mayoritariamente de uno de ellos. De esta forma, el subtipo α_{1A} es el principal responsable de la respuesta adrenérgica en los vasos de resistencia como las A.M.R. (Philipp y Hein, 2004; Martí y cols., 2005; Methven y cols., 2009a) o la arteria caudal de rata (Lachnit y cols., 1997; Piascik y cols., 1997; Gisbert y cols., 2003; Taki y cols., 2004; Tanaka y cols. 2004; Flacco y cols., 2013), mientras el subtipo α_{1D} lo es en los vasos de conductancia como la aorta (Kenny y cols., 1995; Piascik y cols., 1995; Testa y cols., 1995; Hussain y Marshall, 1997; Rudner y cols., 1999; Gisbert y cols., 2000, 2003; Martí y cols., 2005; Flacco y cols., 2013), la íliaca (Piascik y cols., 1995; Martí y cols., 2005) o la carótida (Villalobos-Molina e Ibarra, 1996; Methven y cols., 2009b) (Imagen 4). Sin embargo, existen pocas evidencias de la participación del subtipo α_{1B} en la contracción de los vasos (Cavalli y cols., 1997; Daly y cols., 2002; Tanoue y cols., 2003; Cotecchia, 2010; Docherty, 2010).

Resultados de nuestro grupo de investigación han puesto de manifiesto un diferente comportamiento de los subtipos de AR α_1 que determina las características contráctiles del vaso en el que se encuentran. Así la estimulación del subtipo α_{1A} da lugar, en los vasos en los que se expresa, a respuestas rápidas, que desaparecen también rápidamente al eliminar el agonista adrenérgico, mientras el subtipo α_{1D} es el responsable de respuestas lentas que desaparecen también lentamente al eliminar el agonista, manteniendo de esta forma el tono contráctil durante un tiempo y evitando cambios bruscos en el calibre de estos vasos (Ziani y cols., 2002; Flacco y cols., 2013) (Imagen 4). Nuestra hipótesis es que en los tramos más alejados y densamente inervados del árbol arterial, como son las A.M.R. o la arteria caudal de rata, la alta expresión y participación funcional de los AR α_{1A} garantiza una rápida respuesta ante un estímulo noradrenérgico, seguido de una rápida desaparición del tono tras la eliminación del agonista, permitiendo así un ajuste rápido y fino del calibre vascular y del flujo sanguíneo a las necesidades del tejido irrigado. Por el

contrario, en los vasos de conductancia como la aorta de rata, la estimulación adrenérgica ejerce un papel modulador del tono contráctil: la alta participación funcional de los AR α_{1D} impide cambios bruscos en el calibre de los vasos y controla, por lo tanto, el mantenimiento del flujo sanguíneo en unos niveles estables (Gisbert y cols., 2000; Ziani y cols., 2002; Flacco y cols., 2013).

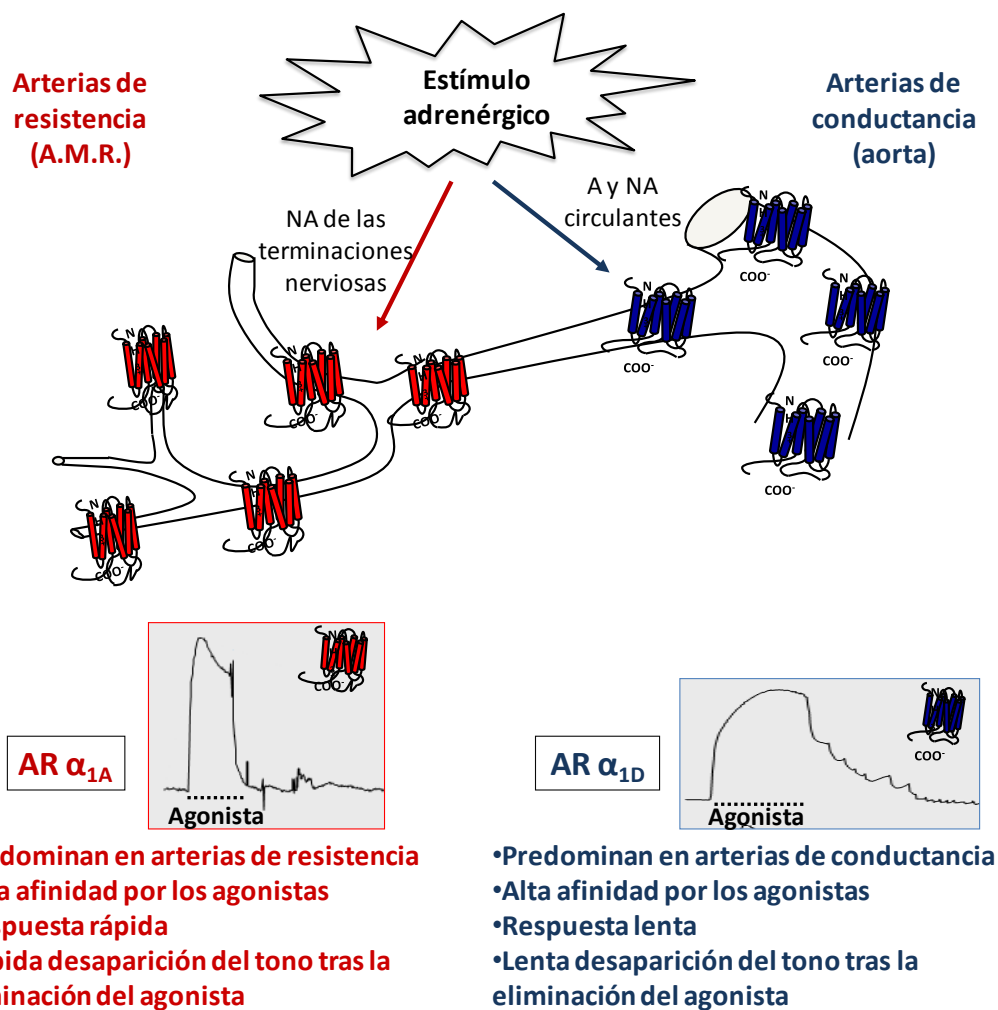


Imagen 4. Distribución y tipo de respuesta funcional de los AR α_{1A} y α_{1D} en los vasos de resistencia y de conductancia, respectivamente
(modificado de Flacco y cols., 2013).

A: adrenalina; A.M.R.: arteria mesentérica de resistencia; NA: noradrenalina.

Es importante señalar el posible papel que juegan los AR α_1 en enfermedades cardiovasculares como la hipertensión arterial (Guimaraes y Moura, 2001). Diversos autores han sugerido que uno de los factores implicados en esta patología puede ser el aumento en la reactividad vascular que se observa en diferentes modelos de esta enfermedad frente a la estimulación de los AR α_1 (Villalobos-Molina y cols, 1999; Gisbert y cols., 2002). Resultados de nuestro grupo han evidenciado un aumento en la expresión génica y funcionalidad del AR α_{1D} en aorta y A.M.R. en ratas hipertensas (SHR), que por sus características peculiares anteriormente descritas (alta afinidad por los agonistas y recuperación lenta del tono basal tras eliminación del estímulo adrenérgico), podría ser el responsable del aumento en la resistencia vascular periférica que se produce en esta patología (Gisbert y cols., 2002; Oliver y cols, 2009). Otros autores han descrito también en ratas SHR un aumento de la transmisión noradrenérgica, que conlleva un aumento de la respuesta vasoconstrictora (Jiménez-Altayó y cols., 2003).

El papel que ejercen los diferentes subtipos de AR β en los distintos lechos vasculares se describe en el apartado 2.4.1 “*Distribución y función de los AR β a nivel vascular*”. Este sigue siendo un tema controvertido y es uno de los objetivos de la presente Tesis Doctoral.

1.4 Regulación del tono vascular

El tono vascular está modulado por distintos factores locales (músculo liso, endotelio), sistémicos (sistema renina-angiotensina-aldosterona) y nerviosos (sistema nervioso autónomo) (Sastre y cols., 2010), siendo el resultado de múltiples estímulos que en última instancia provocan la contracción o la relajación del músculo liso vascular. Seguidamente se detallan estos mecanismos de contracción y relajación.

1.4.1 Contracción

Como hemos visto anteriormente en el apartado 1.1 “Estructura de los vasos sanguíneos”, la contracción de las arterias se realiza en el músculo liso. Las CML contienen filamentos de miosina y de actina que forman un aparato contráctil alineado aproximadamente con el eje largo de la célula. La contracción está impulsada por la interacción entre las cabezas de miosina y actina adyacentes. Durante esta interacción, la cabeza de miosina hidroliza ATP. La hidrólisis del ATP y la liberación de ADP y P_i producen una serie ordenada de cambios alostéricos en la conformación de la miosina. Como resultado, parte de la energía liberada se acopla a la producción de movimiento, así al sufrir un cambio cíclico de conformación, la cabeza de miosina va estirando el filamento de actina, haciendo que éste se deslice sobre el filamento de miosina (Alberts y cols., 1996). La contracción se produce porque las células musculares se acortan, y ello origina una disminución del calibre de los vasos sanguíneos para regular el flujo y la presión sanguínea (Hilgers y Webb, 2005).

La contracción en las CML se produce, entre otros estímulos, por la NA liberada por el sistema simpático. La NA activa los AR α_1 , produciendo la liberación del segundo mensajero IP_3 que, a su vez, desencadena la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares del retículo sarcoplásmico (RS) (Imagen 5) (García-Sainz y cols., 2000). Además este Ca^{2+} provoca una despolarización de la membrana, con la consecuente apertura de los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes tipo L y la entrada de más Ca^{2+} del exterior celular (Imagen 5) (Hilgers y Webb, 2005).

El otro segundo mensajero liberado por la activación de los AR α_1 , el DAG, activa la proteína cinasa C (PKC) que promueve la contracción fosforilando los canales de Ca^{2+} voltaje dependiente tipo L u otras proteínas implicadas en regular el cambio cíclico de conformación de la miosina (Imagen 5).

El incremento de Ca^{2+} citosólico propicia la formación del complejo Ca^{2+} -calmodulina (Ca^{2+} -CaM) (Imagen 5). La calmodulina (CaM) es una pequeña proteína ácida (17 KDa) sensible a los cambios en el influjo de Ca^{2+} y activa un amplia variedad de proteínas diana. La mayor parte de los efectos del complejo Ca^{2+} -CaM están mediados por proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} -CaM,

siendo la más importante para el proceso contráctil la cinasa de la cadena ligera de miosina (CLM) (Cheung, 1980). La unión de Ca^{2+} -CaM a la cinasa de la CLM (KCLM) produce la fosforilación de la Ser19 de la CLM (Hilgers y Webb, 2005). Cuando la CLM se fosforila, la cabeza de miosina interactúa con un filamento de actina lo cual desencadena un deslizamiento de los filamentos gruesos de miosina a lo largo de los de actina, con la consecuente contracción del músculo (Sommerville y Harsthone, 1986) (Imagen 5). En algunas CML la fosforilación de la CLM se mantiene a bajos niveles en ausencia de estímulos: esta actividad es conocida como tono del músculo liso (Hilgers y Webb, 2005).

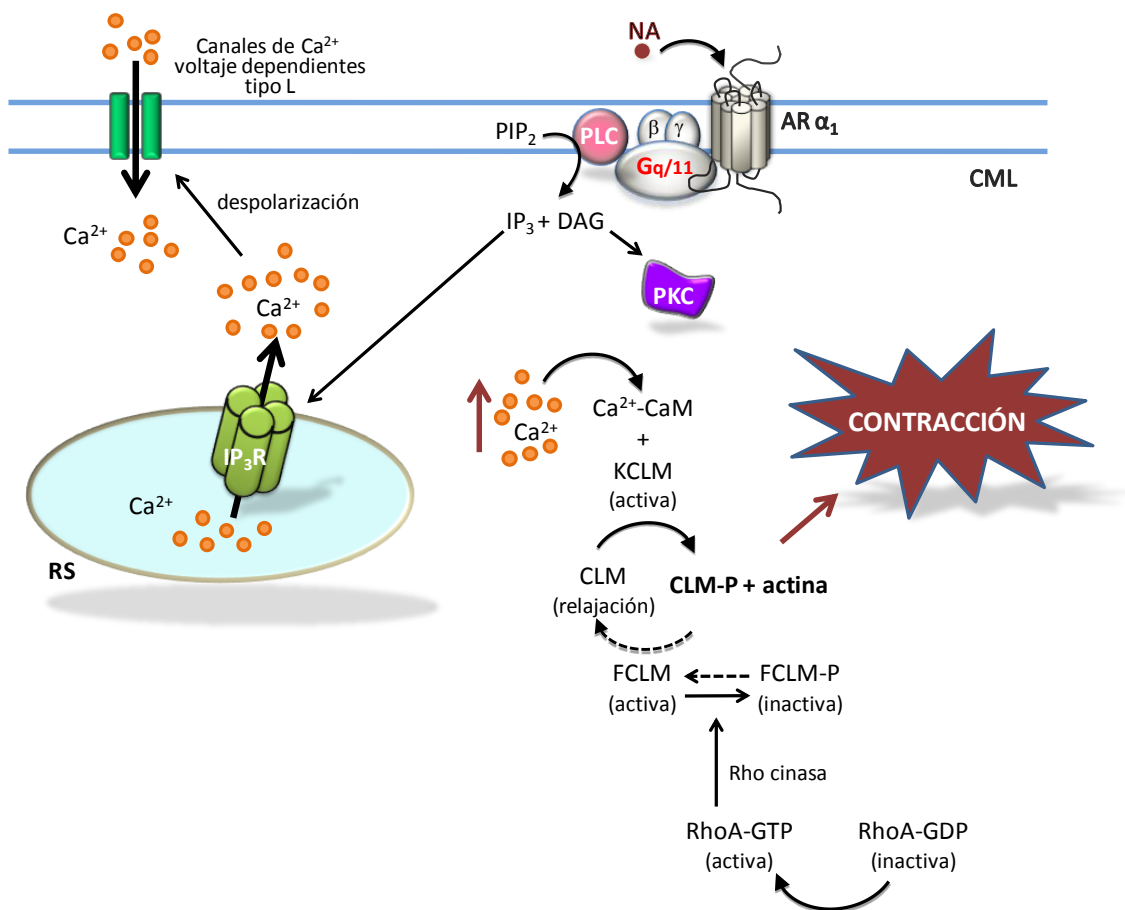


Imagen 5. Regulación de la contracción del músculo liso vascular por activación de los $\text{AR } \alpha_1$ por agonistas.

AR: adrenoceptor; Ca^{2+} : calcio; CaM: calmodulina; CLM: cadena ligera de miosina; CML: célula del músculo liso; DAG: diacilglicerol; FCLM: fosfatasa de CLM; IP_3 : inositol trifosfato; IP_3R : receptor de IP_3 ; KCLM: cinasa de CLM; NA: noradrenalina; PIP_2 : fosfatil inositol bifosfato; PKC: proteína cinasa C; PLC: fosfolipasa C; RS: retículo sarcoplásmico; P: estado fosforilado; flecha continua: contracción; flecha punteada: relajación.

Además de la activación Ca^{2+} dependiente de la KCLM, su estado de fosforilación es regulado por la fosfatasa de la CLM (FCLM) también llamada miosin fosfatasa. Esta enzima cuando está fosforilada es inactiva, permitiendo que la CLM permanezca fosforilada y por tanto que haya contracción. Pero cuando la FCLM se activa, elimina el fosfato de la CLM produciendo que la cabeza de miosina tienda a disociarse de la actina y por tanto el músculo liso se relaja (Imagen 5).

El incremento de Ca^{2+} es transitorio, por ello la respuesta contráctil es mantenida por un mecanismo de sensibilización al Ca^{2+} que se produce por la inhibición de la FCLM por la actividad de la Rho cinasa. La activación de RhoA conlleva la participación de un factor de intercambio de nucleótidos de guanina y la migración a la membrana plasmática de las proteínas RhoA que aumentan la actividad de la Rho cinasa. La enzima Rho cinasa fosforila la subunidad de unión a miosina de la FCLM inhibiendo su actividad (Webb, 2003) (Imagen 5).

1.4.2 Relajación

La relajación del músculo liso ocurre tras la retirada del estímulo contráctil o por acción de compuestos que inhiben la maquinaria contráctil. Para que se produzca la relajación, se debe de producir una reducción de la concentración de Ca^{2+} y un aumento de la actividad de la FCLM (Imagen 6).

Hay varios mecanismos implicados en la disminución del Ca^{2+} citosólico, que citamos a continuación. En la membrana del retículo sarcoplásmico (RS), la ATPasa de Ca^{2+} dependiente de Mg^{2+} , cuando está fosforilada, bombea Ca^{2+} desde el citosol al lumen del RS (Imagen 6). Varias proteínas del RS como la calsecuestrina y la calreticulina unen Ca^{2+} favoreciendo así el descenso de los niveles de Ca^{2+} citosólicos. La membrana plasmática también contiene una ATPasa de Ca^{2+} dependiente de Mg^{2+} y un transportador de intercambiado (antiporte) de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que bombean Ca^{2+} al espacio extracelular (Imagen 6). Otro mecanismo adicional para reducir el flujo de Ca^{2+} es la inhibición de los

canales de Ca^{2+} voltaje dependientes tipo L y asociados a receptor (Webb, 2003) (Imagen 6).

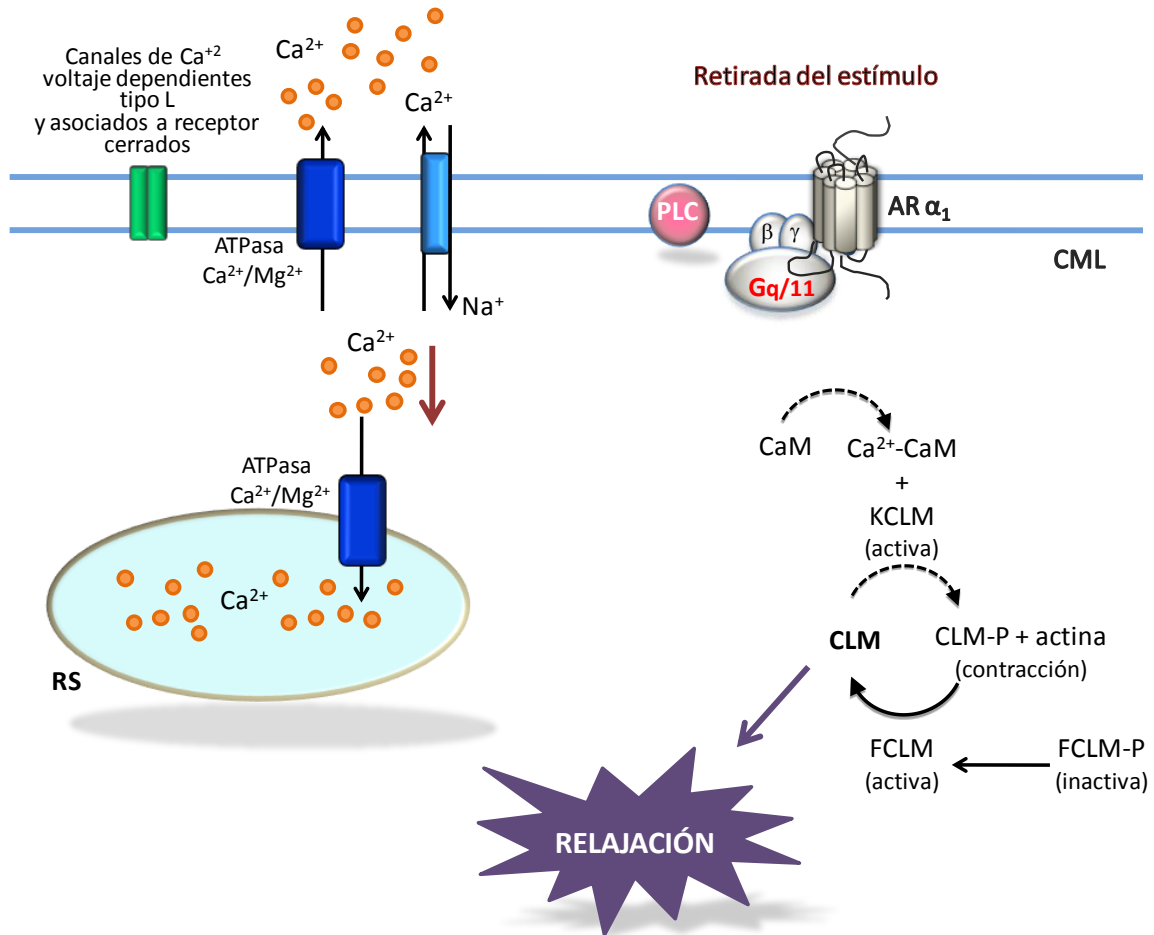


Imagen 6. Regulación de la relajación del músculo liso vascular.

AR: adrenoceptor; Ca^{2+} : calcio; CaM: calmodulina; CLM: cadena ligera de miosina; CML: célula del músculo liso; FCLM: fosfatasa de CLM; KCLM: cinasa de CLM; PLC: fosfolipasa C; RS: retículo sarcoplásmico; P: estado fosforilado; flecha continua: relajación; flecha punteada: contracción.

1.5 Endotelio vascular y óxido nítrico (NO)

Hoy en día está ampliamente aceptado que el endotelio vascular juega un papel muy importante en la función del sistema cardiovascular (Moncada y cols., 1991a), además de participar dinámicamente en varios procesos metabólicos, funcionales y de regulación del organismo. Así, una de sus funciones más importantes es procesar las señales que recibe, traduciéndolas

en mecanismos reguladores del tono vascular y de la resistencia periférica, contribuyendo de forma importante al control de la presión arterial (Vallance y cols., 1989).

Las CE modulan el tono vascular liberando una serie de sustancias, principalmente vasorelajantes, pero también de naturaleza contráctil. Entre las vasorelajantes, se encuentran: el óxido nítrico (NO) (antiguamente conocido como “Factor relajante derivado del endotelio” o EDRF), el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), la prostaciclina y la bradicinina. Entre las sustancias de naturaleza contráctil, se encuentran: las endotelinas, los prostanoïdes como el tromboxano A₂ y la prostaglandina H₂, las especies reactivas de oxígeno como el anión superóxido (O₂⁻), y los componentes del sistema renina-angiotensina-aldosterona como la angiotensina II (Sánchez-Ferrer y Marín, 1990; Félétou y Vanhoutte, 2006; Xu y Zhou, 2009; Garland y cols., 2011a). En condiciones patológicas, como por ejemplo en la hipertensión, el balance entre estos compuestos se rompe: aumenta la producción de los productos contráctiles y disminuye la disponibilidad de los productos vasorelajantes, fundamentalmente del NO (Versari y cols., 2009) (ver apartado 1.5.4 “*Acciones vasculares del NO*”).

Furhrott y Zawadski (1980) fueron los primeros en describir que la relajación mediada por acetilcolina en el músculo liso vascular requería la presencia del endotelio intacto, y propusieron que el endotelio vascular liberaba una sustancia relajante a la que denominaron “Factor relajante derivado del endotelio” o EDRF. Más tarde, en 1987, se demostró que esta sustancia era en realidad el gas NO (Ignarro y cols., 1987; Palmer y cols., 1988).

El NO es el principal compuesto de naturaleza vasorelajante producido por el endotelio. Es un gas inestable, con una vida media muy corta y de fácil difusión a través de las membranas biológicas (Welch y Loscalzo, 1994). Presenta una solubilidad moderada en agua y características de radical libre, lo que le permite actuar como un débil oxidante o reductor (Kanner y cols., 1991). El NO puede reaccionar con el O₂⁻ formando peroxinitrito (ONOO⁻) que es un potente oxidante que parece estar implicado en la oxidación de proteínas en

condiciones fisiológicas. Además puede reaccionar con los grupos sulfhidrilo (-SH) formando S-nitrosotioles que son potentes inhibidores de la agregación plaquetaria y vasodilatadores (Welch y Loscalzo, 1994; Farrell y Blake, 1996; Heinrich y cols., 2013).

1.5.1 Biosíntesis del NO

El NO se sintetiza en las CE por la conversión de L-arginina en L-citrulina (Palmer y cols., 1988) (Imagen 7). Esta reacción es catalizada por la enzima NO sintasa (NOS), la cual requiere de la presencia de O₂ molecular y de 4 cofactores que son: flavin mononucleótido (FMN), flavin adenina dinucleótido (FAD), tetrahidrobiopterina (BH₄) y nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH). Además la NOS contiene un grupo Hemo y posee un sitio de unión a la proteína reguladora CaM, así cuando el Ca²⁺ se une a la CaM se produce un cambio conformacional que permite a esta proteína unirse a la enzima NOS (Li y Poulos, 2005; Rafikov y cols., 2011; Förstermann y Sessa, 2012).

La estructura de la NOS consiste en dos dominios funcionales. El dominio amino terminal con actividad catalítica oxidasa contiene los sitios de unión para el grupo prostético Hemo, el cofactor redox BH₄ y el substrato L-arginina. El dominio carboxilo terminal posee actividad catalítica reductasa con sitios de unión para el FAD, FMN y NADPH (Richards y Marletta, 1994; Ghosh y Stuehr, 1995; McMillan y Masters, 1995). La enzima NOS en su forma monomérica es inactiva y necesita dimerizar para ser activa (Rafikov y cols., 2011).

Al tratarse de una molécula gaseosa, el NO se sintetiza según la demanda existente y no se almacena; simplemente difunde a través de las membranas celulares, donde interacciona con dianas intracelulares. Cuando finaliza su actividad, es metabolizado a consecuencia de la oxidación producida por especies reactivas de oxígeno.

1.5.2 Características de las isoformas de la NOS

Se han descrito tres isoformas de la NOS: **neuronal (nNOS o NOSI)**, **inducible (iNOS o NOSII)** y **endotelial (eNOS o NOSIII)**. Se ha postulado también la existencia de otras isoformas, como la mitocondrial (mNOS) o la osteoartrítica (OA-NOS). Pero, en el caso de mNOS, parece que se trata de una isoforma de iNOS asociada a la membrana de la mitocondria (Eissa y cols., 1996) y por lo que respecta a OA-NOS, podría ser una isoforma de nNOS presente en los condrocitos y cartílago de pacientes osteoartríticos (Amin y cols., 1995).

Inicialmente, en la nomenclatura se aplicó el término de “inducible” para definir a la isoforma de NOS cuya síntesis de NO no se producía en las células inflamatorias, a menos que fuera inducida por inmunoactivación. Esto la diferenciaba de las otras formas “constitutivas”, que se expresan constitutivamente en diversos tipos celulares, incluyendo neuronas (nNOS) y células endoteliales (eNOS). Actualmente, se conoce que la expresión génica de las nNOS y eNOS podría también inducirse bajo diversas condiciones fisiológicas y que la función de iNOS podría considerarse como constitutiva en determinadas condiciones en algunas células (Guo y cols., 1995; Rafikov y cols., 2011). Otra característica importante que diferencia las tres isoformas es la dependencia del Ca^{2+} , siendo la activación de iNOS independiente del Ca^{2+} , mientras la activación de nNOS y eNOS sí dependiente de los aumentos en los niveles de Ca^{2+} intracelular (Rafikov y cols., 2011).

Las secuencias génica y proteica de las isoformas de NOS se encuentran muy conservadas entre las diferentes especies. Por ejemplo en humanos y roedores, nNOS, eNOS e iNOS presentan una homología secuencial de un 96%, 93% y 80% respectivamente. En humanos, las tres isoformas comparten una homología de un 51-59% en su secuencia de aminoácidos, aunque cada isoforma posee características estructurales propias (Alderton y cols., 2001; Rafikov y cols., 2011). A continuación se resumen las principales características de las tres isoformas de NOS.

- **nNOS**

La nNOS se identificó por primera vez en tejido neuronal central y periférico, pero se encuentra también fuera del sistema nervioso, como por ejemplo en el sistema vascular, tanto en las CE (Papapetropoulos y cols., 1999; 1997a) como en las CML (Boulanger y cols., 1998; Papadaki y cols., 1998; Schwarz y cols., 1999; Papapetropoulos y cols., 1999). Así, además de jugar un papel importante en la plasticidad sináptica del sistema nervioso central, participa también en diferentes aspectos del control cardiovascular, como la regulación de la presión arterial y la vasodilatación (Förstermann y Sessa, 2012). Como hemos dicho, su activación es dependiente de los aumentos en los niveles de Ca^{2+} intracelular, lo cual promueve su unión a la CaM (James, 1998; Rafikov y cols., 2011). Su síntesis se modula por corticoides, prostaciclina y agonistas de los AR β , entre otros (Marín y Balfagón, 1998; Sastre y cols., 2010).

- **iNOS**

La iNOS está presente en las células del sistema inmune, como los macrófagos (Stuehr y cols., 1991) y las plaquetas (Mehta y cols., 1995), pero además se encuentra en todos los tipos celulares del sistema vascular, como las CE y las CML (Beasley y cols., 1991; Papapetropoulos y cols., 1999). Actúa en situaciones patológicas y habitualmente necesita un estímulo inflamatorio para activarse: su expresión es inducida en las células del sistema inmune como parte de una respuesta inmune y, por tanto, su acción es independiente de los niveles de Ca^{2+} intracelular (Stuehr y cols., 1991; James, 1998; Li y Poulos, 2005; Rafikov y cols., 2011). Genera grandes cantidades de NO en cortos períodos y de forma puntual (Marín y Rodríguez-Martínez, 1997; Moncada, 1997). Tiene un papel destacado en la defensa inmune contra patógenos (Förstermann y Sessa, 2012).

- **eNOS**

La eNOS es la isoforma más abundante en el sistema vascular (Rafikov y cols., 2011). Se expresa principalmente en las CE, donde se encontró por primera vez, siendo la responsable de producir el clásico “Factor relajante derivado del endotelio” o EDRF descrito por Furchgott y Zawadski (1980). El NO

producido por la eNOS de las CE mantiene los vasos sanguíneos dilatados, controla la presión arterial y tiene números otros efectos vasoprotectores y anti-ateroscleróticos (ver apartado 1.5.4 “*Acciones vasculares del NO*”). Pero, además de en las CE, la eNOS se expresa también en otras células del sistema cardiovascular, como los cardiomiocitos (Balligand y cols., 1993) y las plaquetas (Mehta y cols., 1995; Sase y Michel, 1995). La eNOS, al igual que la nNOS, posee expresión constitutiva y es $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ dependiente, produciéndose un aumento en la síntesis de NO al aumentar los niveles de Ca^{2+} intracelular. No obstante, con niveles bajos de Ca^{2+} , es capaz de proporcionar una liberación basal de NO (Rafikov y cols., 2011). También se ha descrito una activación de la eNOS por mecanismos independientes de un aumento del Ca^{2+} intracelular. En el siguiente apartado, se profundiza en la modulación de la síntesis del NO por factores físicos y por agonistas que movilizan o no movilizan el Ca^{2+} intracelular.

Las tres isoformas de la NOS pueden ser inhibidas competitivamente por compuestos análogos de la L-arginina, como L-NAME (N^{G} -nitro-L-arginina metil éster) o L-NMMA (N^{G} -mono-metil-L-arginina), mientras que la iNOS se inhibe por corticoides (Moncada y cols., 1991a).

1.5.3 Mecanismo de acción del NO en la regulación del tono vascular

Como ya se ha comentado, en el sistema vascular, el NO se libera en condiciones basales y en respuesta a varios estímulos, como por ejemplo algunos agonistas. La mayoría de los agonistas regulan la actividad de la eNOS a través de un aumento del Ca^{2+} intracelular en el endotelio, por lo que se produce un aumento del complejo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, que a su vez activa la eNOS, la cual sintetiza NO a partir de L-arginina (como se ha descrito en el apartado 1.5.1 “*Biosíntesis del NO*”) (Imagen 7). Estos agonistas que movilizan el Ca^{2+} intracelular son por ejemplo: acetilcolina, bradicinina (Gosink y Forsberg, 1993), sustancia P, ADP, estradiol (Goetz y cols., 1999), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Papapetropoulos y cols., 1997b) o los agonistas de

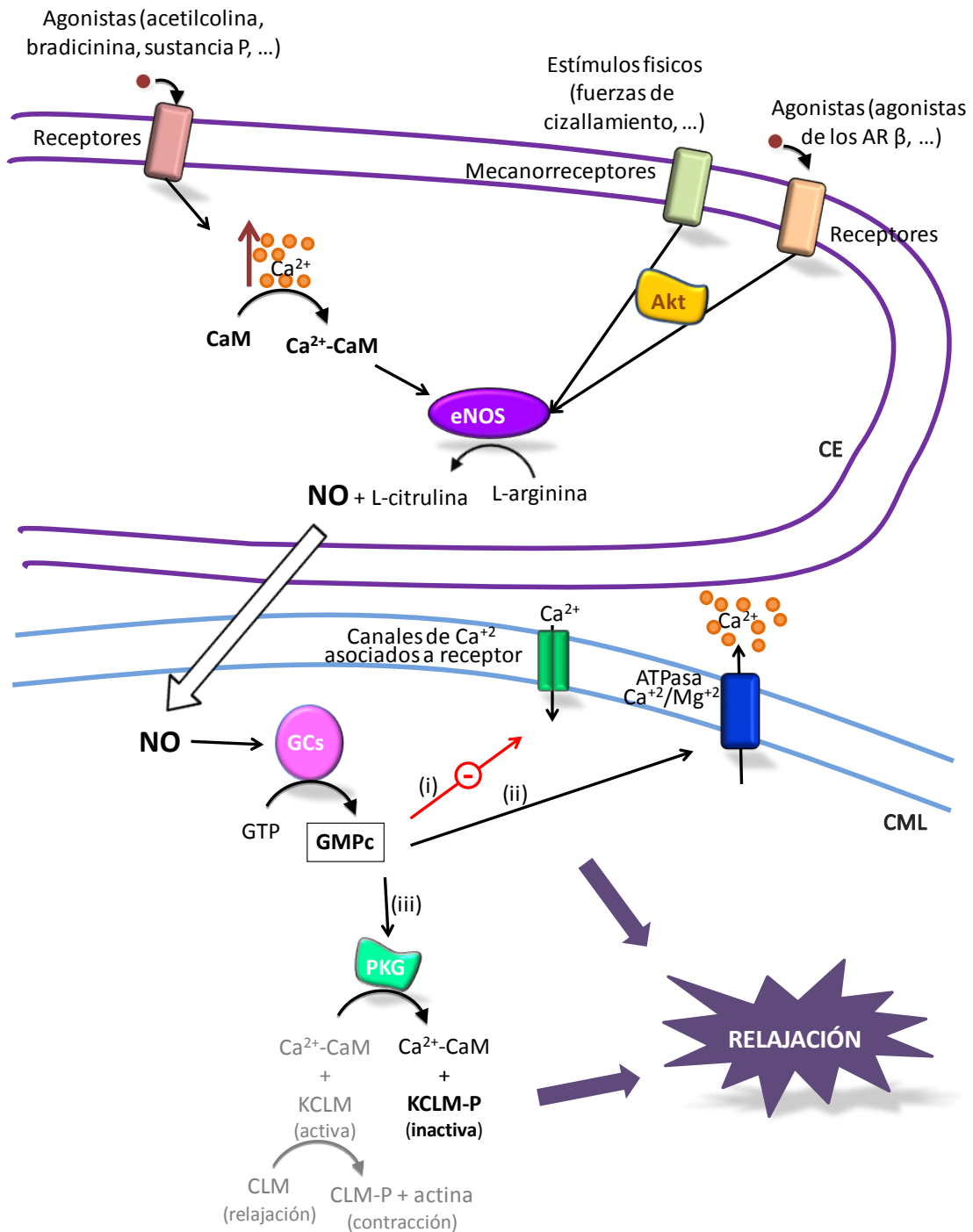


Imagen 7. Mecanismo de relajación mediado por el NO.

En la CE, la activación de la eNOS en respuesta a varios estímulos, da lugar a la síntesis de NO y L-citrulina a partir de L-arginina. El NO atraviesa la membrana celular y difunde a la CML donde activa la GCs, incrementando los niveles intracelulares de GMPc. El incremento de GMPc produce relajación en la CML por diferentes mecanismos: (i); (ii); (iii).

Akt: proteína cinasa B; Ca²⁺: calcio; CaM: calmodulina; CE: célula endotelial; CLM: cadena ligera de miosina; CML: célula del musculo liso; GCs: guanilato ciclasa soluble; KCLM: cinasa de CLM; PKG: proteína cinasa G; P: estado fosforilado.

los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR γ) (Balakumar y Kathuria, 2012).

La síntesis de NO puede ocurrir también en ausencia de variaciones de Ca^{2+} intracelular. De este modo, se ha descrito que la fosforilación de residuos específicos de la eNOS, la hace más activa a una determinada concentración de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, lo que puede incrementar la síntesis de NO en ausencia de variaciones de Ca^{2+} intracelular. Este mecanismo es el que está implicado en la liberación de NO en respuesta a estímulos físicos, como la fuerza de cizallamiento, o en respuesta a otros agonistas, como los agonistas de los AR β (como veremos en el apartado 2.5.2 "*Vía de señalización dependiente del NO endotelial*"). Se ha postulado que la activación de la eNOS mediante fosforilación se produce a través de una proteína cinasa denominada Akt (proteína cinasa B) (Queen y Ferro, 2006; Queen y cols, 2006; Rang y cols., 2012) (Imagen 7).

Se ha descrito que también los agonistas de los AR α_1 son capaces de aumentar la producción de NO endotelial (Jones y cols., 1993; Kaneko y Sunano, 1993; Amerini y cols., 1995; Zschauer y cols., 1997; Boer y cols., 1999; Tuttle y Falcone, 2001; Gurdal y cols., 2005) y parece que es el subtipo α_{1D} el responsable de esta acción (Filippi y cols., 2001). Algunos autores describen que este efecto se produce por un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular en el endotelio (Tuttle y Falcone, 2001; Filippi y cols., 2001), aunque otros sugieren que es un efecto independiente del Ca^{2+} y que podría ser debido a un estrés mecánico en las CE inducido por la contracción y/o a la difusión del Ca^{2+} de las CML a las CE, después de la estimulación de las CML de aorta por el agonista α_1 (Gurdal y cols., 2005).

El NO así sintetizado en las CE, atraviesa la membrana celular y difunde a las CML donde activa la guanilato ciclasa soluble (GCs), incrementando los niveles intracelulares de guanosin monofosfato cíclico (GMPc) (Ignarro y Kadowitz, 1985; Lincoln, 1989) (Imagen 7). El incremento de GMPc produce relajación en las CML por diferentes mecanismos. Entre ellos, podemos mencionar la inhibición de la entrada de Ca^{2+} a través de los canales asociados a

receptor (Imagen 7, (i)) y la estimulación de la ATPasa de Ca^{2+} dependiente de Mg^{2+} de la membrana (Imagen 7, (ii)). Además, el GMPc activa la proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG) que fosforila la KCLM. La fosforilación de KCLM disminuye su afinidad por el complejo Ca^{2+} -CaM, lo cual reduce la fosforilación de la CLM y la contracción del músculo (Hathaway y cols., 1985; Welch y Loscalzo, 1994) (Imagen 7, (iii)). La activación de la PKG puede también producir la fosforilación de los transportadores de Ca^{2+} , acomplejando el Ca^{2+} intracelular, lo que facilita la relajación del músculo liso (Blatter y Wier, 1994).

1.5.4 Acciones vasculares del NO

En el sistema vascular, el NO producido por el endotelio es el responsable de la respuesta vasodilatadora, que es un componente esencial para la regulación de la presión arterial y la integridad vascular (Liu y Huang, 2008; Balakumar y Kathuria, 2012). El NO difunde entre las células y los tejidos, ejerciendo un papel protector a nivel cardiovascular ya que relaja las CML, previene la adhesión de los leucocitos y su migración en la pared arterial, así como la adhesión y la agregación plaquetaria (Moncada y cols., 1991a; Naseem, 2005; Desjardins y Balligand, 2006; Balakumar y cols., 2008; Jindal y cols., 2008; Kaur y cols., 2010). Además es capaz de frenar o prevenir la proliferación de algunos tipos celulares como las CML de los vasos (Li y Förstermann, 2000).

En condiciones fisiopatológicas, que incluyen la presencia de factores de riesgo cardiovascular, pueden producirse estrés oxidativo y disfunción endotelial en los vasos. En la disfunción endotelial, el endotelio sufre alteraciones funcionales y estructurales, perdiendo su papel protector y convirtiéndose en una estructura proaterosclerótica. Se produce un desajuste de la biodisponibilidad del NO y por tanto de la relajación fisiológica dependiente de endotelio. Esto puede ser debido a una reducción de la producción de NO o a un incremento de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Vanhoutte y cols., 2009; Versari y cols., 2009; Förstermann y Sessa, 2012).

Cuando la disponibilidad del NO se reduce, el endotelio pone en marcha mecanismos compensadores como la liberación de otras sustancias relajantes como la prostaciclina o el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF). Sin embargo, el endotelio también se convierte en la fuente de liberación de sustancias vasoconstrictoras perjudiciales para la pared arterial, como la endotelina, el tromboxano A₂, la prostaciclina y ROS (Vanhoutte y cols., 2009; Versari y cols., 2009). La presencia de disfunción endotelial, caracterizada por la deficiencia de NO y activación de la vasoconstricción endotelio-dependiente, se ha visto implicada en la patogénesis de la aterosclerosis y trombosis (Taddei y cols., 2003; Brunner y cols., 2005; Vanhoutte y cols., 2009; Versari y cols., 2009; Förstermann y Sessa, 2012). Además se ha relacionado con factores de riesgo como el envejecimiento, tabaquismo, menopausia, diabetes mellitus, hipercolesterolemia e hipertensión (Brunner y cols., 2005; Vanhoutte y cols., 2009).

Farmacológicamente, la funcionalidad de la eNOS puede ser restaurada y el estrés oxidativo y la disfunción endotelial pueden ser reducidos por el tratamiento con los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (IECA), los bloqueantes de los receptores de la angiotensina o con las estatinas (Förstermann y Sessa, 2012).

Por último, señalar que, además de una reducción en la síntesis de NO o en la eficacia de su sistema efector, se puede dar también una producción excesiva de NO, lo que es igualmente inapropiado y puede estar implicado en patologías como la hipotensión, los accidentes isquémicos cerebrovasculares, la depresión miocárdica o la sepsis (Li y Förstermann, 2000).

2. ADRENOCEPTORES β

Los AR β pertenecen a la más amplia familia de receptores de 7 dominios transmembrana, los cuales ejercen sus efectos intracelulares a través de la activación de la proteína G (Guimaraes y Moura, 2001; Rockman y cols., 2002; Lefkowitz, 2004; Warne y cols., 2008; Rasmussen y cols., 2011), y por eso llamados GPCR, del inglés: *G protein-coupled receptor*. Como ya se ha comentado, los AR β , como los AR α_1 y α_2 , son activados por las catecolaminas endógenas NA y A, liberadas desde las terminaciones nerviosas (NA) y la médula suprarrenal (NA y A). Estos receptores están situados, entre otras localizaciones, en la membrana de las células del músculo vascular y cardíaco, de ahí que juegan un papel importante en la regulación de la respuesta contráctil y dilatadora en vasos sanguíneos y miocardio, controlando la actividad cardiovascular.

2.1 Clasificación de los AR

El descubrimiento de los AR se atribuye a Dale, en 1906. Sin embargo, la primera clasificación de los AR en dos tipos, α y β , fue establecida en 1948 por Ahlquist, a partir de estudios funcionales realizados en diferentes tejidos, teniendo en cuenta el rango de potencia mostrado por las catecolaminas NA, A e isoprenalina.

Los AR α se definieron como aquellos receptores que mediaban respuestas celulares en las cuales el orden de potencia que se obtenía era: A > NA >> isoprenalina. Las respuestas observadas fueron la mayoría “excitatorias”, como la vasoconstricción, la contracción del útero y de la membrana nictitante. Para las respuestas mediadas por los AR β se obtenía un orden de potencia que era: isoprenalina > A > NA. Las respuestas definidas farmacológicamente según este orden de potencia fueron la mayoría “inhibitorias”, como la vasodilatación y la relajación del útero, y una “excitatoria”, la estimulación del miocardio (inotropismo positivo). Posteriormente, esta clasificación resultó insuficiente

para explicar las acciones de las catecolaminas, por eso los AR α y β se subdividieron en ulteriores subtipos.

Los AR α se clasificaron en α_1 y α_2 (Langer, 1974), cada uno de los cuales se subdividió más tarde en varios subtipos, quedando actualmente establecida la clasificación de los AR α_1 en: α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} y de los AR α_2 en: α_{2A} , α_{2B} y α_{2C} (Alexander y cols., 2011; Bond y cols., 2013) (Imagen 8).

Los AR β se clasificaron en β_1 y β_2 (Lands y cols., 1967), el primero localizado en corazón y tejido adiposo, y el segundo localizado en músculo liso bronquial y vascular. Pero estos dos subtipos se mostraron insuficientes para explicar algunos efectos mediados por los AR β , como por ejemplo la resistencia que mostraban en el tejido adiposo a ser bloqueados por los antagonistas β clásicos, como el propranolol (Arch y cols., 1984). Para explicar estas respuestas atípicas, en 1983 Tan y Curtis-Prior postularon la existencia de un tercer receptor, el AR β_3 localizado en adipocitos de rata, y esta hipótesis fue confirmada más tarde, mediante la clonación, secuenciación y expresión del gen que codifica el receptor β_3 adrenérgico humano y el de otras especies (Emorine y cols., 1989; Krief y cols., 1993; Granneman y cols., 1994).

Posteriormente fue propuesta la existencia de otro subtipo de AR β en el músculo cardíaco, el AR β_4 (Arch y Kaumann, 1993; Barnes, 1995; Kaumann y Molenaar, 1996, 1997; Kaumann y cols., 1998; Galitzky y cols., 1998; Brodde y Michel, 1999), pero las evidencias experimentales indicaron que no existe (Strosberg y cols., 1998) y que, en realidad, es un estado conformacional de baja afinidad del AR β_1 (Konkar y cols., 2000; Kompa y Summers, 2000; Kaumann y cols., 2000, 2001). Actualmente se admite que el AR β_1 existe en al menos dos conformaciones o estados activos que presentan diferentes propiedades farmacológicas (Granneman, 2001; Molenaar, 2003; Baker y cols., 2003a; Arch, 2004; Baker, 2005b). El estado de baja afinidad del AR β_1 se caracteriza por poseer baja afinidad por el propranolol y activarse con agonistas parciales no convencionales como el CGP12177 a concentraciones mayores de las necesarias para antagonizar los AR β clásicos β_1 y β_2 (Mallem y cols., 2005a). Por lo tanto,

hoy en día se acepta la división de los AR β en 3 subtipos: β_1 , β_2 y β_3 (Alexander y cols., 2011; Bond y cols., 2013) (Imagen 8).

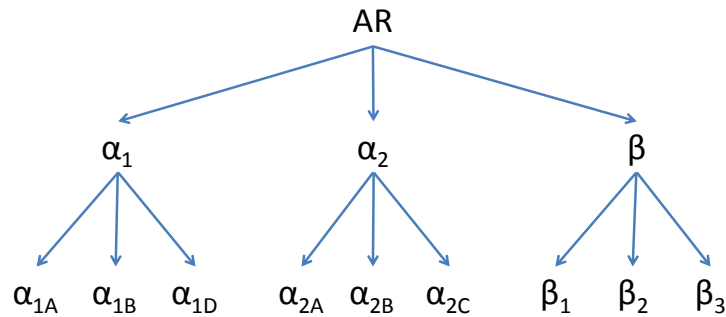


Imagen 8. Clasificación actual de los adrenorreceptores (AR) según: Alexander y cols., 2011; Bond y cols., 2013.

Los tres subtipos de AR β se diferencian entre sí por estructura, distribución, función y propiedades farmacológicas, presentando un diferente perfil de selectividad por agonistas y antagonistas específicos. Estas características diferenciales, que se resumen en la Tabla A, se tratan con mayor profundidad en los siguientes apartados.

2.2 Características estructurales y regulación de los AR β

Los tres subtipos de AR β (β_1 , β_2 y β_3) han sido clonados y en humanos están codificados por genes localizados en los cromosomas 10, 5 y 8 respectivamente (Bylund y cols., 1994) (Tabla A). A diferencia de los genes que codifican los subtipos β_1 y β_2 , el gen del subtipo β_3 contiene intrones (Tabla A), lo que permite la existencia de diferentes isoformas del receptor, como se ha descrito en roedores (Evans y cols., 1999), donde las isoformas a y b del AR β_3 presentan una expresión variable dependiendo del tejido donde se expresen, además de activar vías de señalización diferentes (Hutchinson y cols., 2002). Esto explicaría la complejidad observada en la caracterización farmacológica de este subtipo.

Tabla A. Características diferenciales de los tres subtipos de AR β .

AR	β_1	β_2	β_3
Localización cromosomal	10	5	8
Intrones	NO	NO	SÍ
Num. aminoácidos	477	413	408
Fosforilación por PKA y GRK	SÍ	SÍ	NO
Proteína G acoplada	Gs	Gs, Gi	Gs, Gi
Efactor principal	AC	AC	AC, GCs
Orden de potencia	ISO > NA > A	ISO > A > NA	ISO > NA = A
Agonistas selectivos	NA Dobutamina Xamoterol RO363	Salbutamol Procaterol Zinterol Salmeterol Formoterol Terbutalina Fenoterol	CL316243 SR58611A BRL37344 SB251023 CGP12177A L742791 L755507 Carazolol
Antagonistas selectivos	CGP20712A Atenolol Betaxalol Bisoprolol Practolol	ICI118551 Butoxamina	SR59230A L748337
Tejido predominante	Corazón	Pulmón Vasos	Tejido adiposo
Función fisiológica principal	Aumenta velocidad y fuerza de contracción del corazón	Broncodilatación y vasodilatación	Lipólisis, relajación gastrointestinal y cardioinhibición

(Modificado de: Alexander y cols., 2011; Bond y cols., 2013)

A: adrenalina; AC: adenilato ciclasa; GCs: guanilato ciclasa soluble; Gi: proteína G inhibidora; GRK: protein cinasa asociada al AR β ; Gs: proteína G estimuladora; ISO: isoprenalina; NA: noradrenalina, PKA: protein cinasa A (o proteína cinasa dependiente de AMPc)

Los genes de los AR β_1 , β_2 y β_3 codifican para unas proteínas que en humanos contienen 477, 413 y 408 aminoácidos respectivamente (Tabla A). El AR β_1 tienen una secuencia de aminoácidos muy parecida al AR el β_2 , pero el β_1 tiene un mayor peso molecular debido a que posee una región extracelular amino-terminal y un dominio I3 citoplasmático mayor (Chakraborti y cols., 2000).

Como ya se ha comentado, los AR β son receptores que se caracterizan por tener una homología estructural, formando parte de la superfamilia de receptores con 7 dominios transmembrana acoplados a proteínas G (GPCR) (Guimaraes y Moura, 2001; Rockman y cols., 2002; Lefkowitz, 2004; Warne y cols., 2008; Rasmussen y cols., 2011) (Imágenes 9 y 10). La estructura α helicoidal de estos AR está formada por una cadena polipeptídica que contiene 7 dominios hidrofóbicos transmembrana (TM) de 22 a 35 aminoácidos cada uno, conectados entre sí por 3 bucles intracelulares (I1, I2 e I3) y 3 bucles extracelulares (E1, E2 y E3) (Imagen 9). Los dominios transmembrana (TM), exactamente el TM3, TM4, TM5 y TM6, y el bucle intracelular I3 presentan los lugares de unión del receptor con las proteínas G (Dohlman y cols., 1990; Rang y cols., 2012) (Imagen 9). Las diferencias en longitud y función de los dominios confieren propiedades específicas a cada tipo de receptor (Baldwin, 1993).

El extremo amino-terminal es de localización extracelular y presenta sitios de glicosilación para la unión con las catecolaminas endógenas u otros agonistas y antagonistas (Imagen 9). En cambio el extremo carboxilo-terminal es intracelular y presenta un sitio de palmitoilación que ayuda al anclaje del receptor con la membrana plasmática (Warne y cols., 2008; Sanz-Rosa, 2011; Warne y cols., 2011) (Imagen 9). Además el extremo carboxilo-terminal, junto con el I3, es importante para la unión con dos cinasas diferentes: la PKA y las cinasas de los GPCR (GRK) (Sanz-Rosa, 2011). Las GRK desempeñan un papel importante en la regulación de los AR β : la fosforilación del AR β activo y unido al agonista, por parte de las GRK, es un proceso rápido que favorece la desensibilización del receptor. Una vez fosforilado por la GRK, el AR se une a la β -arrestina, favoreciendo una inhibición estérica de la activación de las proteínas G (Chakraborti y cols., 2000).

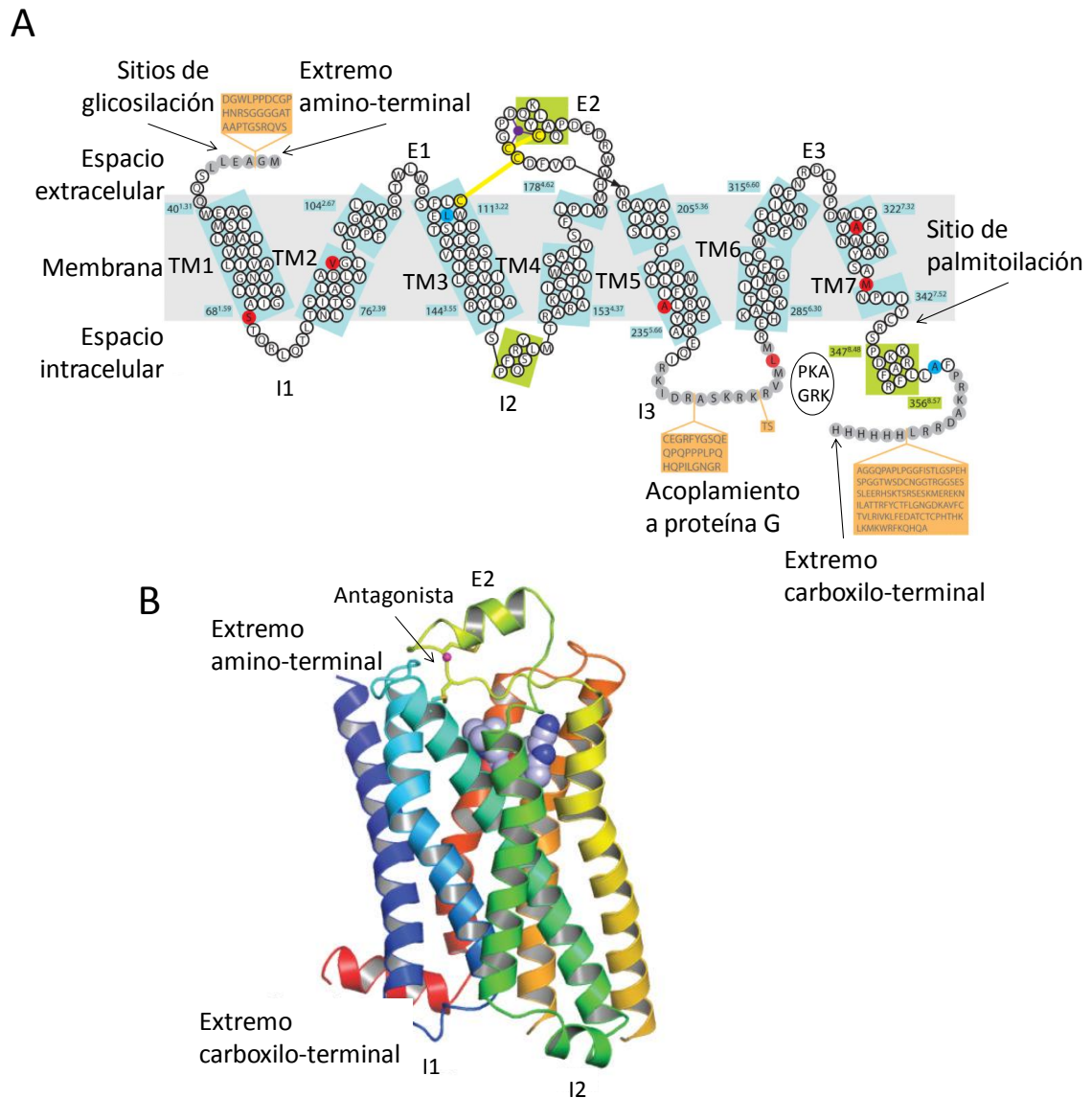


Imagen 9. Estructura primaria (A) y cristalina (B) del AR β_1
(modificado de Warne y cols., 2008).

E: región extracelular; I: región intracelular; TM: dominios transmembrana.

Solamente los subtipos β_1 y β_2 contienen sitios de fosforilación para la PKA y las GRK, mientras que en el subtipo β_3 no se han encontrado y de hecho posee pocos residuos de serina o treonina en el extremo carboxilo-terminal susceptibles de ser fosforilados (Strosberg, 1993) (Tabla A). De esta forma, el AR β_3 no podría ser desensibilizado tras la activación por catecolaminas, confiriéndole la capacidad de ser resistente a este mecanismo de regulación,

permaneciendo siempre disponible ante la llegada de nuevos estímulos (Granneman, 1992; Liggett y cols., 1993; Portillo y cols., 1995). En este sentido, algunos autores han descrito una disminución regulada a nivel génico para este subtipo, a través de mecanismos dependientes de la vía AMPc/PKA tras la propia activación del AR β_3 o incluso de la PKC activada por otras vías, siendo ambas cinasas capaces de fosforilar factores de transcripción necesarios para la expresión del AR, tras largas exposiciones al agonista (Bengtsson y cols., 2000).

Como ya se ha comentado, los AR β ejercen sus efectos intracelulares a través de la activación de proteínas G. Las proteínas G son proteínas heterotriméricas, formadas por 3 subunidades: la subunidad α que se une e hidroliza a la guanosin trifosfato (GTP), la subunidad β y la subunidad γ . Las proteínas G se dividen en cuatro familias según la subunidad α : Gs, Gi, Gq y G₁₂. Los tres subtipos de AR β se encuentran acoplados a la proteína Gs (“s” de estimuladora) (Tabla A, Imagen 10), que activa positivamente la AC (Dixon y cols., 1986; Frielle y cols., 1987; Emorine y cols., 1989; Gudermann y cols., 1995; Tanaka y cols., 2005; Rasmussen y cols., 2011; Sanz-Rosa, 2011).

Aunque los tres subtipos de AR β están acoplados a la proteína Gs, es posible que uno o cada uno de ellos interactúe con diferentes combinaciones de la subunidad α con uno de los cinco u once productos genéticos de las subunidades β o γ , respectivamente. Por otro lado, la AC también presenta 8 isoformas distintas y se piensa que los AR β_3 estimulan una isoforma diferente de la estimulada por los otros dos receptores. Esto se encontró en adipocitos, tejido predominantemente β_3 , donde la isoforma principalmente expresada de AC es la tipo III, por lo que se piensa que esta es la isoforma a la que el receptor β_3 se acopla preferentemente (Strosberg, 1997b).

Por otro lado, los AR β_2 y β_3 , además de acoplarse a la proteína Gs, también se pueden acoplar a la proteína Gi (“i” de inhibidora) (Tabla A) (Chaudhry y cols., 1994; Xiao y cols., 1995, 1999; Gauthier y cols., 1996; Daaka y cols., 1997; Johnson, 1998; Altschuld y Billman, 2000; Zamah y cols., 2002; Hasseldine y cols., 2003; Zheng y cols., 2005), cuya activación provoca la inhibición de la AC y la activación de rutas de señalización alternativas o “no

clásicas” (como veremos más adelante en el apartado 2.5 “Vías de señalización de los AR β ”). Ambos AR β_2 y β_3 , una vez acoplados a las proteínas Gs o Gi, van a ejercer efectos diferentes según el tejido donde estén presentes.

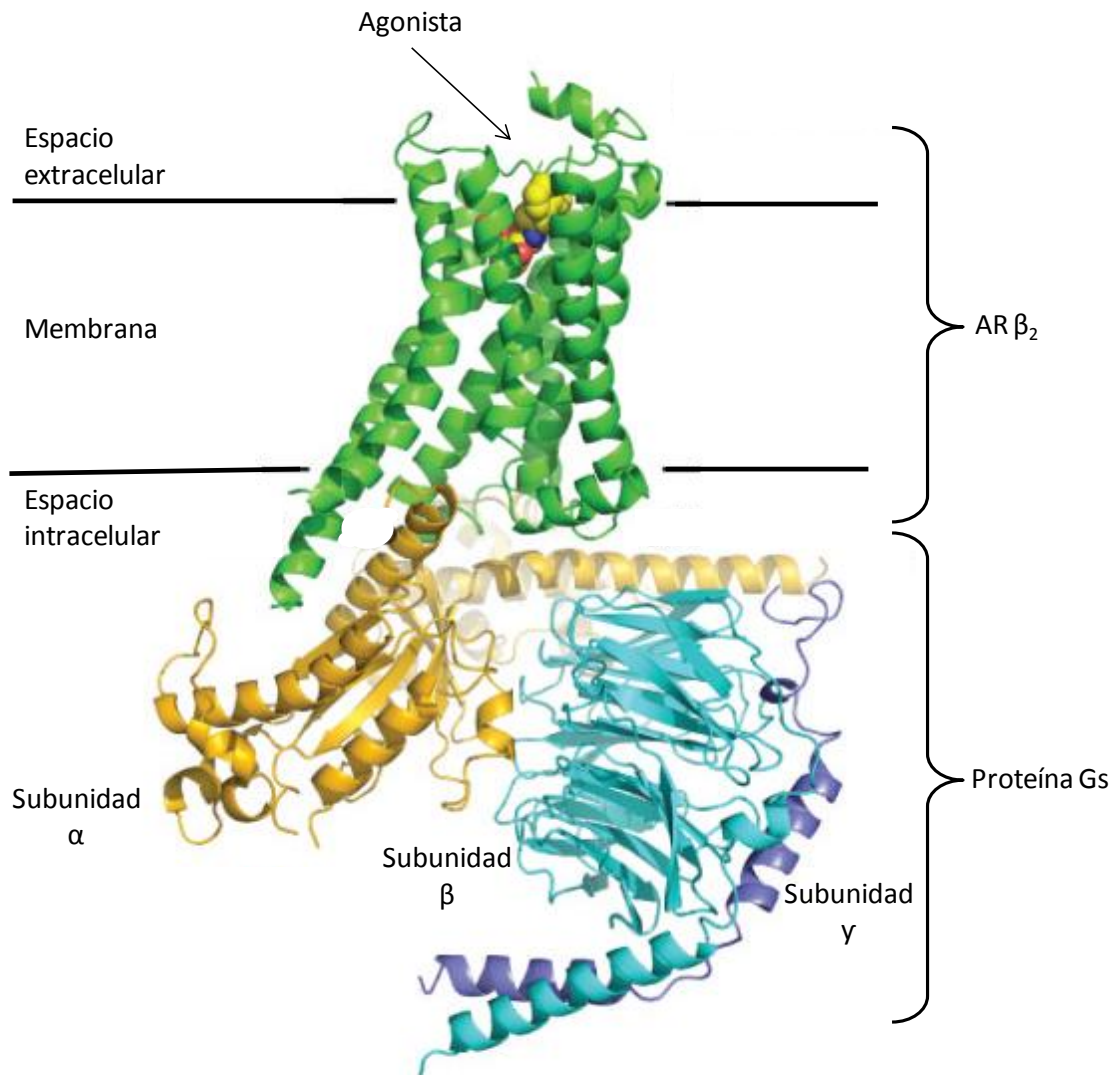


Imagen 10. Representación tridimensional del complejo: agonista/AR β_2 /proteína Gs (modificado de Rasmussen y cols., 2011).

El AR β_2 (verde) está unido en la parte extracelular con un agonista (esferas de colores) y en la parte intracelular con la proteína Gs (estimuladora), constituida por las subunidades α (naranja), β (turquesa) y γ (morado).

Por último, es importante señalar que se ha demostrado con receptores clonados y expresados en distintos tipos celulares, que los receptores acoplados a proteínas G, y entre ellos los AR, interactúan con otras proteínas, entre las que se encuentra el mismo o algún otro subtipo de AR, siendo capaces de formar homo- o hetero-dímeros u oligómeros, que presentan unas características funcionales y farmacológicas diferentes, modulando además algunas propiedades del receptor como su localización celular y su vías de señalización (Xiao y cols., 2006). Así, los tres subtipos de AR α_1 y los AR β_1 y β_2 pueden formar homodímeros (Park y Palczewski, 2005; Uberti y cols., 2003; Hebert y cols., 1996). Además los AR β_1 y β_2 pueden formar heterodímeros en células HEK 293 (Lavoie y Hebert, 2003) y, lo que es más importante, en un territorio nativo como los cardiomiocitos de ratón (Zhu y cols., 2005). La heterodimerización produce una alteración en algunas propiedades funcionales y de señalización de estos receptores, así facilita las interacciones de los ligandos con el receptor, produciendo un aumento en la eficiencia de la señal de los AR β y optimizando la modulación de la contractilidad cardíaca mediada por estos receptores (Zhu y cols., 2005). Por tanto, los dímeros de los AR β_1/β_2 pueden considerarse como una población de AR β farmacológica y funcionalmente diferente.

2.3 Características farmacológicas de los AR β

Para identificar los subtipos de AR β presentes en un tejido, normalmente se utilizan técnicas de unión de radioligandos, empleando agonistas y antagonistas selectivos para cada subtipo. Además se pueden medir los niveles de proteínas y/o ARNm de cada subtipo mediante técnicas de biología molecular, como el Western Blot y/o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), respectivamente. Sin embargo, un receptor detectado con estas técnicas no siempre se corresponde con un receptor funcional. Por eso, los subtipos de AR β implicados en las respuestas fisiológicas tienen que ser identificados inequívocamente a través de estudios funcionales, con la ayuda de los agonistas

y sobre todo de los antagonistas selectivos de cada subtipo, que son una herramienta muy valiosa para estos estudios (Tanaka y cols., 2005).

En la presente Tesis Doctoral se han caracterizado los subtipos de AR β responsables de la función vascular, utilizando agonistas y antagonistas selectivos de los tres subtipos de AR β . La Imagen 11 muestra las estructuras químicas de los ligandos de los AR β que hemos utilizado en nuestro estudio, además de los agonistas endógenos A y NA. Las Tablas B y C muestran los valores de afinidad y potencia de estos compuestos en líneas celulares que expresan los diferentes subtipo de AR β y en tejidos nativos que expresan preferentemente un subtipo de AR β , respectivamente.

2.3.1 Agonistas

Los AR β se activan por los agonistas endógenos **NA** y **A**, sin embargo estas catecolaminas tienen una afinidad diferente según el tipo de receptor: la NA tiene una afinidad mayor por el AR β_1 , mientras la A por el AR β_2 (Westfall y Weston, 2007). El AR β_3 es activado por las catecolaminas, pero a concentraciones mayores de las necesarias para activar los AR β_1 y β_2 (Gauthier y cols., 2007), sugiriendo que este receptor se activa en situaciones en las que el tono catecolaminérgico está elevado. NA y A actúan también sobre los AR α .

Isoprenalina (Imagen 11) es una catecolamina sintética derivada de la NA, no presente en el organismo, que presenta selectividad por los AR β respecto a los AR α_1 y α_2 . Dentro de los subtipo de AR β , presenta una menor actividad por el AR β_3 (Tabla B, C).

Dobutamina (Tabla B), xamoterol y RO363 son agonistas selectivos de los AR β_1 mientras que **salbutamol** (Tabla B y C), procaterol, zinterol, salmeterol, formoterol, terbutalina y fenoterol son selectivos de los AR β_2 respecto a los otros subtipos. La dobutamina y el salbutamol son catecolaminas sintéticas (Imagen 11).

Entre los agonistas que activan con más afinidad y potencia el subtipo β_3 respecto a los otros subtipos, se encuentran las feniletanolaminas como **CL316243**, **SR58611A** (Imagen 11, Tabla B y C) y BRL37344, y las arilpropilaminas como CGP12177A. Algunos compuestos, como CL316243 (Hutchinson y cols., 2001) y CGP12177A (Kaumann y Molenaar, 1996), son antagonistas de los AR β_1 y β_2 , pero agonistas de los AR β_3 . En conjunto, los estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro* describen una farmacología compleja para el subtipo β_3 , con una marcada variabilidad entre las especies. Existen diferencias farmacológicas entre los AR β_3 humanos y de roedores, así CL316243 y BRL37344 que son agonistas selectivos en los roedores, tienen baja eficacia en los humanos, mientras CGP12177A y L755507 activan los receptores humanos (Sato y cols., 2008).

2.3.2 Antagonistas

El antagonista estándar selectivo por los AR β es el **propranolol** (derivado del naftaleno, Imagen 11) que presenta alta afinidad por los AR β_1 y β_2 (pKi 8,2–9,1; Tabla B). El subtipo β_3 es relativamente resistente al propranolol, ya que presenta una afinidad baja por este antagonista (pKi 6,7–7,2; Tabla B), de hecho, una de las características diferenciales del subtipo β_3 es su baja afinidad atípica por los antagonistas clásicos de los AR β como propranolol o nadolol. A nivel funcional también se aprecian estas diferencias (Tabla C).

Los antagonistas selectivos más ampliamente utilizados son:

- **CGP20712A** (Imagen 11, Tabla B y C) y atenolol para los AR β_1 .
- **ICI118551** (Imagen 11, Tabla B y C) y butoxamina para los AR β_2 .
- **SR59230A** (Tabla B y C) para los AR β_3 . SR59230A es una ariloxipropanolaminotetralina (Imagen 11) que presenta una alta afinidad por los AR β_3 en roedores (Manara y cols., 1996), pero no discrimina bien entre los tres subtipos de AR en humanos (Candelore y cols., 1999).

Revisión Bibliográfica

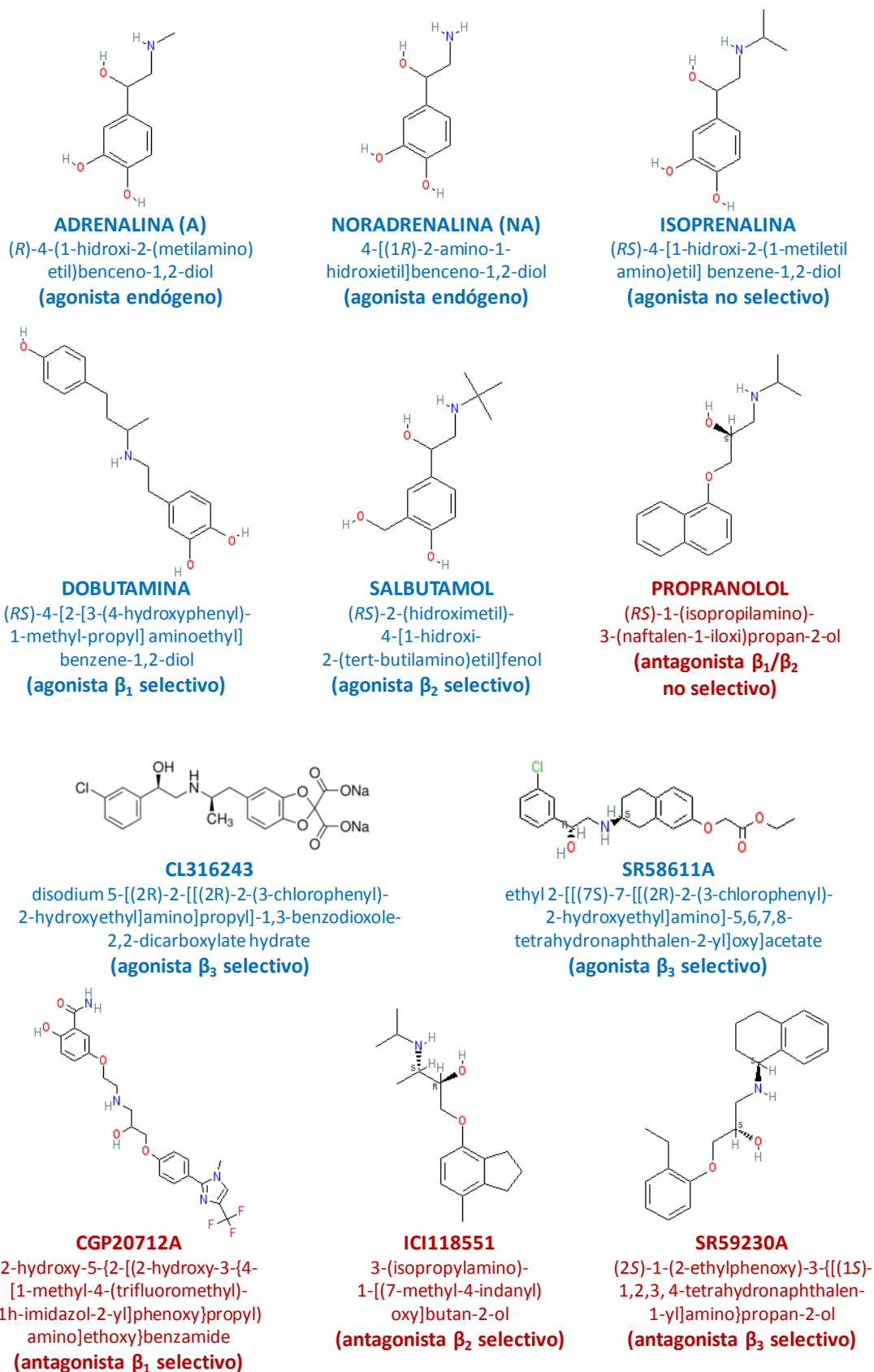


Imagen 11. Estructura química de algunos agonistas (en azul) y antagonistas (en rojo) selectivos de los tres subtipos de AR β .

Tabla B. Características farmacológicas de los AR β_1 , β_2 y β_3 clonados humanos, expresados en células de ovario de hámster chino (CHO). Los valores están determinados mediante estudios de unión con radioligando (binding) y estudios de estimulación de la AC.

Agonistas β	β_1		β_2		β_3	
	pK _i	pK _{act}	pK _i	pK _{act}	pK _i	pK _{act}
Isoprenalina	6,06 ⁽⁴⁾	8,46 ⁽³⁾	6,64 ⁽⁴⁾	8,22 ⁽⁴⁾	5,52 ⁽⁴⁾	7,35 ⁽¹⁾
	6,65 ⁽⁷⁾	8,59 ⁽⁴⁾	6,34 ⁽⁷⁾	8,40 ⁽¹⁰⁾	5,80 ⁽⁷⁾	7,41 ⁽⁴⁾
	5,80 ⁽¹⁰⁾	8,75 ⁽¹⁰⁾	5,82 ⁽¹⁰⁾	8,39 ⁽¹²⁾	4,73 ⁽¹⁰⁾	7,02 ⁽⁶⁾
	5,97 ⁽¹²⁾	8,41 ⁽¹²⁾	6,17 ⁽¹²⁾	8,60 ⁽¹⁵⁾	4,55 ⁽¹¹⁾	7,37 ⁽¹⁰⁾
	5,69 ⁽¹⁵⁾	9,72 ⁽¹⁵⁾	6,60 ⁽¹⁵⁾		4,55 ⁽¹²⁾	7,99 ⁽¹¹⁾
					5,32 ⁽¹³⁾	7,99 ⁽¹²⁾
Dobutamina		7,18 ⁽³⁾	5,84 ⁽⁴⁾	6,32 ⁽⁴⁾	5,09 ⁽⁴⁾	6,27 ⁽¹⁾
		6,81 ⁽⁴⁾				6,37 ⁽⁴⁾
Salbutamol	4,66 ⁽²⁾	6,50 ⁽³⁾	6,12 ⁽²⁾	7,72 ⁽⁴⁾	4,33 ⁽²⁾	5,76 ⁽¹⁾
	4,68 ⁽⁴⁾	6,21 ⁽⁴⁾	6,01 ⁽⁴⁾	8,28 ⁽¹⁵⁾	3,98 ⁽⁴⁾	6,01 ⁽⁴⁾
	5,61 ⁽⁷⁾	7,13 ⁽¹⁵⁾	5,66 ⁽⁷⁾		4,27 ⁽⁷⁾	6,58 ⁽¹⁵⁾
			5,80 ^{*(8)}		4,28 ⁽¹⁵⁾	
CL316243	< 3 ⁽²⁾	Antag. ⁽¹⁵⁾	4,10 ⁽²⁾	Antag. ⁽¹⁵⁾	5,11 ⁽²⁾	6,03 ⁽¹⁾
					5,87 ⁽¹⁴⁾	9,80 ⁽¹⁴⁾
					4,85 ⁽¹⁵⁾	7,17 ⁽¹⁵⁾
SR58611A	4,41 ⁽¹⁵⁾	4,92 ⁽¹⁵⁾	6,73 ⁽¹⁵⁾	7,44 ⁽¹⁵⁾	5,20 ⁽⁵⁾	7,90 ⁽¹⁴⁾
					6,99 ⁽¹⁴⁾	7,60 ⁽¹⁵⁾
					5,18 ⁽¹⁵⁾	

Antagonistas β	β_1		β_2		β_3	
	pK _i	pK _i	pK _i	pK _i	pK _i	pK _i
Propranolol	8,16 ⁽²⁾				6,93 ⁽²⁾	
	8,15 ⁽³⁾		9,08 ⁽²⁾		6,73 ⁽⁷⁾	
	8,74 ⁽⁷⁾		9,10 ⁽⁷⁾		7,19 ⁽¹³⁾	
	8,67 ⁽⁹⁾					
CGP20712A	8,81 ⁽²⁾		6,11 ⁽²⁾		5,19 ⁽²⁾	
	9,19 ⁽³⁾		5,39 ⁽⁷⁾		5,63 ⁽⁷⁾	
	8,33 ⁽⁷⁾		5,74 ⁽¹⁵⁾		5,64 ⁽¹⁵⁾	
	8,82 ⁽¹⁵⁾					
ICI118551	6,52 ⁽²⁾		9,26 ⁽²⁾		6,44 ⁽²⁾	
	6,77 ⁽³⁾		9,15 ⁽⁷⁾		6,21 ⁽⁷⁾	
	7,31 ⁽⁷⁾		8,92 ⁽¹⁵⁾		6,59 ⁽¹⁵⁾	
	6,92 ⁽¹⁵⁾					
SR59230A	8,17 ⁽³⁾		8,45 ⁽⁴⁾		7,37 ⁽⁴⁾	
	7,54 ⁽⁴⁾		9,30 ⁽⁶⁾		8,38 ⁽⁶⁾	
	8,40 ⁽⁶⁾		7,21 ⁽⁷⁾		6,91 ⁽⁷⁾	
	7,79 ⁽⁷⁾					

pK_i = logaritmo negativo de la constante de inhibición en los estudios de competición con radioligandos.
 pK_{act} = logaritmo negativo de la constante de activación en los estudios de estimulación de la AC.

* = en células COS-7

Valores tomados de la literatura: ⁽¹⁾Baker, 2005a; ⁽²⁾Baker, 2005b; ⁽³⁾Baker, 2005c; ⁽⁴⁾Baker, 2010; ⁽⁵⁾Blin y cols, 1993; ⁽⁶⁾Candelore y cols., 1999; ⁽⁷⁾Hoffmann y cols., 2004; ⁽⁸⁾Isoyaga y cols., 1999; ⁽⁹⁾Joseph y cols., 2004; ⁽¹⁰⁾Konkar y cols., 1999; ⁽¹¹⁾Mehta y cols., 2000; ⁽¹²⁾Nikulín y cols., 2006; ⁽¹³⁾Popp y cols., 2004; ⁽¹⁴⁾Sato y cols., 2007; ⁽¹⁵⁾Strosberg, 1997b.

Tabla C. Características farmacológicas de los AR β_1 , β_2 y β_3 determinadas mediante estudios funcionales, en tejidos que expresan preferentemente un subtipo de AR β .

Agonistas β	β_1	β_2	β_3
	pEC ₅₀	pEC ₅₀	pEC ₅₀
Isoprenalina	8,0-8,2 ⁽⁷⁾ (íleon ro. β_3 -KO) 7,69-8,76 ⁽¹¹⁾ (cardiomiocitos r.) 8,95 ⁽¹⁴⁾ (aurícula r.) 8,30 ⁽¹⁵⁾ (aurícula c.)	8,00 ⁽¹⁴⁾ (tráquea r.)	7,70-7,80 ⁽⁷⁾ (íleon ro.) 7,34 ⁽¹⁴⁾ (esófago r.)
Salbutamol	5,54 ⁽²⁾ (A.M.R. r.)	9,60 ^{o(3)} (pulmón ro.)	-
CL316243	(Antag.)	(Antag.)	8,50-8,80 ⁽⁷⁾ (íleon ro.) 7,91 ⁽⁸⁾ (adipocitos ro.) 9,02 ⁽⁹⁾ (colon r.) 7,05 ⁽¹²⁾ (esfínter anal r.)
SR58611A	-	-	8,15 ⁽⁹⁾ (colon r.)

Antagonistas β	β_1	β_2	β_3
	pK _B / *pA ₂	pK _B / *pA ₂	pK _B / *pA ₂
Propranolol	8,30*(1) (aurícula c.) 8,50 ⁽⁵⁾ (corazón h.) 8,90 ⁽⁷⁾ (íleon ro. β_3 -KO)	8,64*(1) (útero c.) 8,90 ⁽⁵⁾ (corazón h.) 9,0-10,2 ⁽¹⁶⁾ (mioblastos r.)	7,76*(4) (colon h.) 6,00-6,50 ⁽⁹⁾ (colon r.)
CGP20712A	9,40 ⁽⁷⁾ (íleon ro. β_3 -KO) 9,60 ⁽¹⁰⁾ (corazón g.) 8,99 ⁽¹⁵⁾ (aurícula c.)	5,40 ⁽¹⁰⁾ (corazón g.) 5,85 ⁽¹⁵⁾ (útero c.) 5,90 ⁽¹⁶⁾ (mioblastos r.)	4,61-4,80*(6) (adipocitos r.) < 5,50 ⁽⁹⁾ (colon r.) 6,21-6,41 ⁽¹⁷⁾ (adipocitos r.)
ICI118551	7,17*(1) (aurícula c.) < 7 ⁽⁷⁾ (íleon ro. β_3 -KO)	9,26*(1) (útero c.) 8,4-9,6 ⁽¹⁶⁾ (mioblastos r.)	5,33-5,49*(6) (adipocitos r.) < 7 ⁽⁷⁾ (íleon ro.) < 5,50 ⁽⁹⁾ (colon r.) 5,88-5,99 ⁽¹⁷⁾ (adipocitos r.)
SR59230A	7,40 ⁽⁷⁾ (íleon ro. β_3 -KO) 7,31*(13) (aurícula c.)	6,63*(13) (tráquea c.) 6,00 ⁽¹⁶⁾ (mioblastos r.)	7,89-8,12*(4) (colon h.) 8,30 ⁽⁷⁾ (íleon ro.) 7,91 ⁽⁸⁾ (adipocitos ro.) 6,40-7,50 ⁽⁹⁾ (colon r.) 8,76*(13) (colon r.) 8,20-8,87 ⁽¹⁷⁾ (adipocitos r.)

pEC₅₀ = logaritmo negativo de la concentración del agonista que produce la mitad del efecto máximo.

pK_B = logaritmo negativo de la constante de afinidad del antagonista.

pA₂ = potencia del antagonista calculada con el método de Schild.

c. = cobaya; g = gato; h. = humano; r. = rata; ro. = ratón; KO = knockout.

° = pK_D determinado mediante estudios de unión con radioligando (binding).

Valores tomados de la literatura: ⁽¹⁾Bilski y cols., 1983; ⁽²⁾Briones y cols., 2005; ⁽³⁾Callaerts-Vegh y cols., 2001; ⁽⁴⁾De Ponti y cols., 1999; ⁽⁵⁾Gille y cols., 1985; ⁽⁶⁾Hollenga y Zaagsma, 1989; ⁽⁷⁾Hutchinson y cols., 2001; ⁽⁸⁾Hutchinson y cols., 2005; ⁽⁹⁾Kaumann y Molenaar, 1996; ⁽¹⁰⁾Lemoine y Kaumann, 1991; ⁽¹¹⁾Lewis y cols., 2004; ⁽¹²⁾Li y cols., 2004; ⁽¹³⁾Manara y cols., 1996; ⁽¹⁴⁾Mehta y cols., 2000; ⁽¹⁵⁾Molenaar y Summers, 1987; ⁽¹⁶⁾Nevzorova y cols., 2002; ⁽¹⁷⁾Nisoli y cols., 1996.

2.4 Distribución y función de los AR β

Los AR β juegan un papel muy importante en el control de la actividad vascular, cardíaca, respiratoria y metabólica del organismo. Estos receptores se encuentran en la mayor parte de las células de mamíferos y roedores, sin embargo su distribución y proporción varían de un tejido a otro, y en cada especie animal (Mersmann, 2002).

El AR β_1 se expresa en múltiples tejidos y células sanguíneas, pero predomina en el corazón, donde tiene un efecto cronotrópico e inotrópico positivo: su estimulación provoca un aumento en la velocidad y en la fuerza de contracción (Tabla A). En el riñón, el subtipo β_1 está implicado en la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona, ya que media la liberación de renina (Brodde y Michel, 1999). Su presencia ha sido también evidenciada en algunos territorios vasculares produciendo un efecto vasodilatador como se detalla en el apartado siguiente (O'Donnell y Wanstall, 1984; Graves y Poston, 1993; Chruscinsky y cols., 2001; Briones y cols., 2005).

Aunque su distribución es ubicua, el AR β_2 se expresa mayoritariamente en el músculo liso (bronquial, vascular y uterino) y su estímulo causa tanto la broncodilatación de las vías respiratorias, como la vasodilatación de los vasos sanguíneos, modulando el tono vascular (Tanaka y cols., 2005) (Tabla A).

Los AR β son dianas farmacológicas en enfermedades de origen cardiovascular y tienen una particular importancia en procesos tales como la hipertensión (Werstiuk y Lee, 2000), en la que existe un tono vascular elevado, y la isquemia de miocardio, con una perfusión del miocardio insuficiente. De hecho, los antagonistas selectivos de los AR β , principalmente β_1 pero también β_1 y β_2 , se utilizan desde hace tiempo en terapéutica como fármacos antihipertensivos (Williams y cols., 2004), en el tratamiento de la angina de pecho y de la insuficiencia cardíaca (Sanz-Rosa, 2011), y han demostrado tener beneficio pronóstico en la prevención cardiovascular tras un infarto agudo de miocardio. Otras patologías en las que los antagonistas β_1 y β_2 han mostrado utilidad son el glaucoma y la profilaxis de la migraña. Por otro lado, los agonistas

de los AR β_2 se utilizan en el tratamiento del asma por sus efectos broncodilatadores.

Respecto al AR β_3 , el más recientemente caracterizado, se ha visto que se distribuye preferentemente en tejido adiposo marrón y blanco (Tabla A), donde participa en la regulación del metabolismo energético y la termogénesis (Strosberg, 1997a, 1997b), pero también se ha localizado en el tracto gastrointestinal, donde media la relajación intestinal (McLaughlin y MacDonald, 1990; Bianchetti y Manara, 1990; De Ponti y cols, 1995a, 1995b, 1996, 1999; Manara y cols., 1995; Kaumann y Molenaar, 1996; Roberts y cols. 1997, 1999), y a nivel cardiovascular donde produce efectos cardiodepresores, inhibiendo la contracción del miocardio, y produciendo relajación en algunos vasos (Gauthier y cols., 1996, 2000; Rozec y Gauthier, 2006) (Tabla A). Por ello, los compuestos selectivos de los AR β_3 pueden ser de gran interés por su posible uso en el tratamiento de la obesidad y de algunos trastornos gastrointestinales, aunque todavía no se conoce bien su potencial terapéutico. Recientemente, también se apunta al posible uso de los compuestos selectivos por los AR β_3 en las enfermedades cardiovasculares (Gauthier y cols., 2011).

2.4.1 Distribución y función de los AR β a nivel vascular

Como hemos comentado, a nivel vascular, los tres subtipos de AR β parecen estar implicados en la relajación del músculo liso. Sin embargo, se ha visto que la contribución de uno u otro subtipo varía entre especies, pero además depende del lecho vascular estudiado e incluso se ha postulado que puede ser diferente según las condiciones experimentales utilizadas en los estudios en órgano aislado (agente y/o tono precontráctil utilizado para poder evaluar el efecto relajante) (Guimaraes y Moura, 2001).

Tradicionalmente, se ha aceptado que los AR β implicados en la acción relajante de los vasos sanguíneos pertenecían al subtipo β_2 (Lands y cols., 1967), sin embargo estudios posteriores han demostrado que también los AR β_1 participan en esta acción (O'Donnell y Wanstall, 1984; Graves y Poston, 1993;

Chruscinsky y cols., 2001). De hecho, estudios más recientes demuestran la participación mayoritaria del subtipo β_1 en la relajación (Briones y cols., 2005) y en la hiperpolarización (Garland y cols., 2011b) del músculo liso en A.M.R. de rata.

La idea de un tercer subtipo de AR β , distinto de los β_1 y β_2 e involucrado en la regulación del tono vascular, surgió a raíz de los resultados obtenidos en diversos estudios *in vivo*, en los cuales se observó que los agonistas selectivos β_3 , como CL316243, BRL26830 y BRL37344, producen vasodilatación periférica en perros (Shen y cols., 1996) y ratones (Rohrer y cols., 1999), y aumentan el flujo sanguíneo en tejido adiposo pardo de ratas (Takahashi y cols., 1992). Posteriormente, se propuso la presencia de AR β_3 vasorrelajantes en diversos estudios funcionales *in vitro* en arteria carótida de rata (Oriowo, 1994; MacDonald y cols., 1999), en aorta torácica de rata (Trochu y cols., 1999; Matsushita y cols., 2003) y en arteria pulmonar de rata (Sooch y Marshall, 1997) y de perro (Tagaya, 1999), basándose en la resistencia de la isoprenalina en estos tejidos a ser bloqueada por el propranolol y en que los agonistas adrenérgicos selectivos β_3 (SR58611A, BRL37344, ZD2079) y el agonista parcial β_3 (CGP12177A) producían una vasodilatación. Además, se observó que el efecto vasodilatador de SR58611A en aorta torácica de rata fue inhibido por los antagonistas selectivos β_3 SR59230A (Trochu y cols., 1999) y L-748,337 (Rozec y cols., 2006) y que los efectos de BRL37344 en arteria carótida y de SR58611A en aorta eran atenuados o inhibidos en presencia de L-NAME o con la eliminación del endotelio (MacDonald y cols., 1999; Trochu y cols., 1999), sugiriendo con ello que la vasodilatación estaba mediada por AR β_3 localizados principalmente en el endotelio vascular y mediante un mecanismo NO dependiente. Otros vasos en los que se ha postulado la existencia y la participación funcional del AR β_3 son las arterias coronarias (Dessy y cols., 2004, 2005), mamaria (Rozec y cols., 2005) y placentaria (Rouget y cols., 2006) humanas.

Sin embargo, diversos estudios funcionales hablan de la existencia de un AR β atípico, distinto del AR β_3 , en los siguientes vasos aislados de rata: aorta (Oriowo, 1995; Shafiei y Mahmoudian, 1999; Brawley y cols., 2000b), arteria mesentérica (Torrens y cols., 2002; Kozłowska y cols., 2003), arteria carótida

(Oriowo, 1994)... En estos estudios, se postuló que los efectos vasodilatadores de los agonistas β_3 no estaban mediados por los AR β_3 sino por un AR β atípico al encontrar importantes diferencias farmacológicas entre ellos.

Además, es importante señalar que algunos autores ponen en duda la participación funcional de los AR β_3 en diversos vasos como aorta y arteria mesentérica de rata. De hecho, en aorta de rata aunque su ARNm ha sido detectado y algunos autores defienden su papel en la vasodilatación (Trochu y cols., 1999; Rautureau y cols., 2002), otros autores sostienen su falta de funcionalidad (Brahmadevara y cols., 2003, 2004). Así, los efectos relajantes de CGP12177A y BRL37344 se producían en tejido contraído con fenilefrina (agonista α_1), pero no se producían en tejidos contraídos con prostaglandina $F_{2\alpha}$, introduciéndose la idea de que la vasodilatación podía deberse, al menos en parte, al bloqueo de los AR α_1 (Brahmadevara y cols., 2003). Esta hipótesis ha sido recientemente corroborada mediante estudios de desplazamiento de radioligandos selectivos del AR α_1 como el [3 H]-prazosín: en estos estudios se ha observado que diversos agonistas y antagonistas del subtipo β_3 (CGP12117A, BRL37344, bupranolol, SR59230A) tienen también afinidad por los AR α_1 , y por ello se ha postulado que los efectos relajantes de estos ligandos adrenérgicos β_3 en tejido vascular pueden ser debidos a su acción antagonista α_1 y no a su acción agonista β_3 (Leblais y cols., 2004; Brahmadevara y cols., 2004). Sin embargo el agonista β_3 CL316243 no tiene efecto sobre los AR α_1 (Leblais y cols., 2004) y por ello se ha utilizado en la presente Tesis.

En arterias de resistencia, con diámetros entre 2 y 300 μ M, son pocos los estudios acerca de la participación del subtipo β_3 en la vasorelajación mediada por los AR β . En A.M.R. de rata, Briones y cols. (2005) evidencian una participación mayoritaria del subtipo β_1 , localizado en el músculo liso, en la vasodilatación, excluyendo además la participación de los subtipos β_2 y β_3 en esta respuesta.

De todo lo expuesto, parece que la participación del subtipo β_3 en el efecto relajante producido por la estimulación β dependa del lecho vascular estudiado, pero, además, hay que destacar que en algunos vasos los resultados

obtenidos han sido contradictorios y por tanto, podemos concluir que a pesar de que se ha evidenciado la expresión génica de los AR β_3 en algunos lechos vasculares (Viard y cols., 2000; Rautureau y cols., 2002; Dessy y cols., 2004) su funcionalidad se ha puesto en duda y son necesarios más estudios para evidenciar su papel a nivel vascular.

Además se ha visto que un mismo receptor puede encontrarse en distintos “estados conformacionales”, que conducen a una diferente afinidad por un determinado fármaco. En el caso de los AR β se ha demostrado, utilizando líneas celulares que expresan los subtipos β_1 o β_3 , la existencia de estados de alta y baja afinidad para estos subtipos (Baker, 2005a, 2005c). Estos estados de baja afinidad también se han puesto en evidencia en territorios nativos y así, como hemos comentado anteriormente, el AR “ β_4 ” caracterizado farmacológicamente en corazón, se ha visto que en realidad se corresponde con un estado de baja afinidad del subtipo β_1 (Granneman, 2001; Molenaar, 2003; Baker y cols., 2003a; Arch, 2004; Baker, 2005b). Estudios recientes han demostrado también la participación funcional de este estado de baja afinidad del AR β_1 en el efecto relajante independiente del endotelio observado en aorta de rata, estando disminuido dicho efecto en ratas espontáneamente hipertensas (SHR), lo que ha llevado a los autores a hipotetizar la implicación de este estado de baja afinidad en la hipertensión arterial (Mallem y cols., 2004, 2005a), patología en la que se sabe que existe una disminución de la vasodilatación inducida por estimulación β adrenérgica (Arribas y cols., 1994; Gross y cols., 2000; Oliver y cols., 2009). Además, algunos autores sugieren que algunos β -bloqueantes de tercera generación pueden ejercer su efecto vasodilatador a través de la activación del estado de baja afinidad del subtipo β_1 y/o del subtipo β_3 (Mallem y cols., 2004, 2005a; Dessy y cols., 2005; Rozec y Gauthier, 2006).

En resumen, a pesar de los numerosos trabajos que estudian la participación de los AR β en la vasodilatación, no hay ningún estudio que de forma sistemática y utilizando las mismas condiciones experimentales establezca la participación relativa de cada subtipo de AR β en la respuesta funcional a nivel vascular. Uno de los objetivos de la presente Tesis es analizar

este aspecto utilizando dos territorios vasculares representativos de vasos de resistencia (A.M.R. de pequeño calibre) y de conductancia (aorta).

Asimismo, se ha descrito que los AR β , además de estar localizados en la capa muscular del vaso, se encuentran también en el endotelio vascular (Vanhoutte, 2001; Daly y cols., 2010; Daly y McGrath, 2011) pudiendo contribuir al efecto relajante a través de la liberación de NO (Queen y Ferro, 2006). Sin embargo también los estudios sobre el papel del endotelio y del NO en el efecto vasodilatador de los AR β varían de un vaso a otro e incluso en el mismo vaso se han descrito resultados contradictorios. En este aspecto se profundiza en el apartado 2.5.2 “*Vía de señalización dependiente del NO endotelial*” de la presente memoria. La localización de los diferentes subtipos de AR β a nivel endotelial y el papel que pueda ejercer el NO sobre la relajación mediada por estos receptores son unos de los objetivos de la Tesis Doctoral.

2.5 Vías de señalización de los AR β

La vasorelajación inducida por los AR β está mediada por la vía de señalización clásica del AMPc, pero también por otras vías “no clásicas”, como la producción de NO endotelial. Además recientemente se ha descrito que, a parte de las señales de membrana, los AR β pueden activar vías intracelulares como la vía de señalización de las cinasas activadas por mitógenos, MAPK (ERK1/2 y p38). Estas vías de señalización se comentan a continuación.

2.5.1 Vía de señalización clásica del AMPc

El mecanismo clásico de transducción de la señal de los AR β , tras su unión con el agonista, implica el acoplamiento de la proteína estimuladora Gs a la AC, que se activa y cataliza la conversión de adenosina trifosfato (ATP) a adenosin monofosfato cíclico (AMPc) produciendo un aumento de los niveles de AMPc (Dixon y cols., 1986; Frielle y cols., 1987; Emorine y cols., 1989) (Imagen 12).

Los niveles elevados de AMPc posteriormente activan la cinasa dependiente de AMPc (PKA), la cual fosforila proteínas de membrana o intracelulares relacionadas con el control del tono del músculo liso (**vía AC/AMPc/PKA**) (Werstiuk y Lee, 2000; Guimaraes y Moura, 2001; Tanaka y cols., 2005) (Imagen 12).

Así, se produce la fosforilación de la cinasa de la cadena ligera de miosina (KCLM), la cual, una vez fosforilada, pierde afinidad por el complejo Ca^{2+} -calmodulina (Ca^{2+} -CaM) (Murray, 1990), disminuyendo con ello la sensibilidad de las proteínas contráctiles (Imagen 12). Además, mediante el mecanismo AC/AMPc/PKA-dependiente, se inhibe la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares, disminuye la entrada de Ca^{2+} del exterior celular a través la membrana citoplasmática y se activa la recaptación de Ca^{2+} por los depósitos intracelulares, lo que disminuye la concentración de Ca^{2+} disponible para formar el complejo Ca^{2+} -CaM. Todo esto provoca una menor formación del complejo

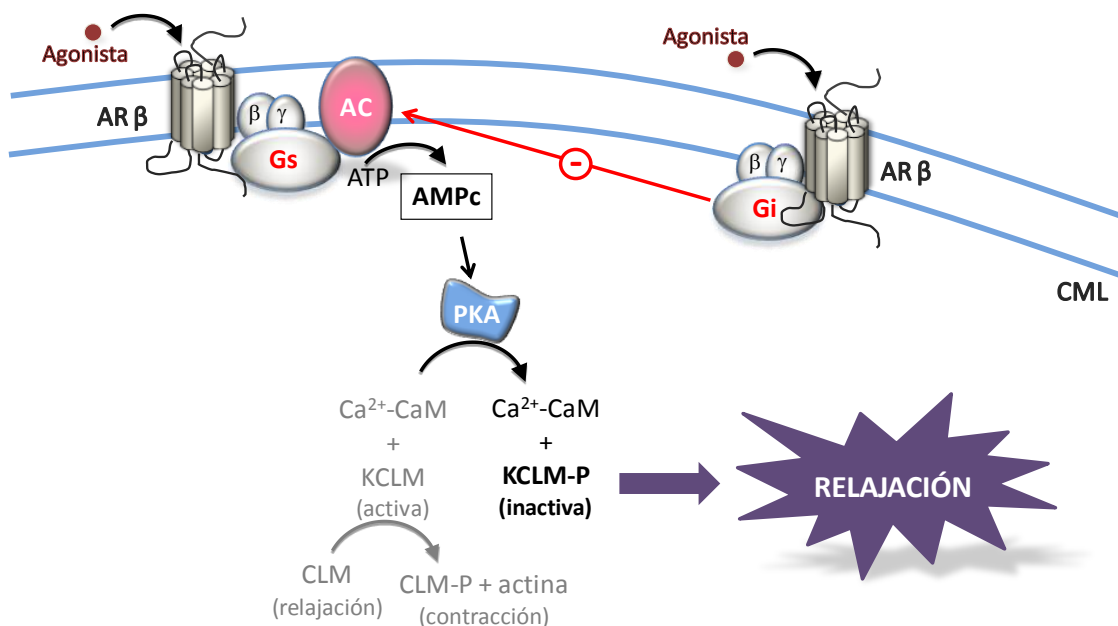


Imagen 12. Vía de señalización clásica del AMPc, mediante el cual los $\text{AR}\beta$ producen vasorelajación en el músculo liso vascular.

AC: adenilato ciclasa; AR: adrenoceptor; Ca^{2+} : calcio; CaM: calmodulina; CLM: cadena ligera de miosina; CML: célula del músculo liso; Gi: proteína G inhibidora; Gs: proteína G estimuladora; KCLM: cinasa de CLM; PKA: proteína cinasa A; P: estado fosforilado.

Ca^{2+} -CaM, fundamental para la contracción del músculo liso y por lo tanto, se produce la relajación muscular (Rembold, 1992; Johnson, 1998).

Los tres subtipos de AR β (β_1 , β_2 y β_3) se encuentran acoplados a este sistema de transducción y durante años se ha pensado que los AR β inducen una relajación a través del aumento del AMPc en las CML. De los tres subtipos de AR, el más estudiado es el AR β_2 en el músculo liso de las vías respiratorias, donde se ha demostrado la intervención del AMPc en la vía de transducción de la señal inducida por estos receptores (Tanaka y cols., 2005). De esta forma, se ha observado que los efecto relajantes de isoprenalina y salbutamol elevan significativamente el AMPc tisular y este efecto es abolido por un inhibidor de la AC como SQ22536 (Koike y cols., 2004). Además, la relajación de isoprenalina se potencia con un inhibidor específico de la fosfodiesterasa 4 (PDE4, enzima encargada de la degradación de AMPc) (Tanaka y cols., 2003). En el caso del subtipo β_3 , estudios recientes han evidenciado que en algunos vasos como la arteria pulmonar de perro (Tamaoki y cols., 1998) o en arterias de la placenta humana (Rouget y cols., 2006), la relajación está asociada con un aumento en los niveles de AMPc. Sin embargo, diversos estudios indican que éste no parece ser el único mecanismo por el que los AR β median su acción, barajándose la posibilidad de que hayan otros mecanismo algunos de ellos independientes de AMPc (Tanaka y cols. 2005; Queen y Ferro, 2006).

Como ya se ha comentado, los AR β_2 y β_3 , según la localización y/o el tiempo de estimulación por el agonista, también pueden mediar respuestas a través de otra proteína G, la G_i (Tabla A), que ejerce efectos inhibitorios respecto a la AC y todos los procesos que se inician con su activación (Imagen 12). Además, se ha demostrado que la proteína G_i puede inducir la activación de vías “no clásicas” independientes de la inhibición de la AC.

Así, se ha demostrado que en corazón el AR β_2 , tras una estimulación sostenida, se acopla a la proteína G_i que inhibe la AC (Xiao y cols., 1995; Daaka y cols., 1997). Estudios más recientes demuestran que el acoplamiento de los AR β_2 a la proteína G_i activa en el corazón rutas “no clásicas” de señalización como: i) activación de la PDE4, que disminuye la producción de AMPc (Osadchii y cols.,

2006); ii) activación de la ruta de la PI3K (fosfatidil inositol-3 cinasa), la expresión del factor de transcripción NF- κ B (factor nuclear kappa beta) y la activación de la Akt (proteína cinasa B); iii) activación de la vía de las MAPK (ERK1/2 y p38) (Sanz-Rosa, 2011). En el caso de los AR β_3 , el acoplamiento a la proteína Gi en corazón modula una actividad cronotrópica e inotrópica negativa (Gauthier y cols., 1996), que no parece estar relacionada con la inhibición de la AC, sino con la producción de NO que favorece la síntesis de GMPc y la activación de la PKG (Sanz-Rosa, 2011).

2.5.2 Vía de señalización dependiente del NO endotelial

Aunque tradicionalmente se considera que la relajación inducida por los AR β se produce a través de la estimulación de la AC y el consiguiente aumento del AMPc en las CML, éste no es el único mecanismo por el que los AR β median su acción. Otro mecanismo de acción por el cual los AR β median la vasorelajación es la liberación de NO a nivel de las CE (Imagen 13). De hecho se ha demostrado la presencia de AR β en las CE (Vanhoutte, 2001). La estimulación de los AR β endoteliales produce la activación de la eNOS y el consiguiente aumento de la formación de NO (Queen y Ferro, 2006; Queen y cols, 2006). Como ya se ha comentado en un apartado anterior (1.5.3 “*Mecanismo de acción del NO en la regulación del tono vascular*”), el NO difunde al músculo liso vascular, donde produce una relajación a través de la activación de la GCs que cataliza la formación de GMPc (**vía NO/GCs/GMPc**). El GMPc activa la PKG que, a su vez, reduce la concentración de Ca^{2+} intracelular e inhibe proteínas contráctiles, provocando la relajación vascular (Imagen 13).

Se ha postulado que los AR β median la activación de la eNOS mediante un mecanismo dependiente del AMPc, pero también mediante mecanismos intracelulares independientes del AMPc. El primer mecanismo es la vía de señalización clásica, que incluye la proteína Gs, AC, AMPc y PKA (Imagen 13, (i)), mientras los mecanismos independientes del AMPc son: la vía de las MAPK, que implica a MEK1/2 y ERK1/2, y que se puede activar a través del acoplamiento

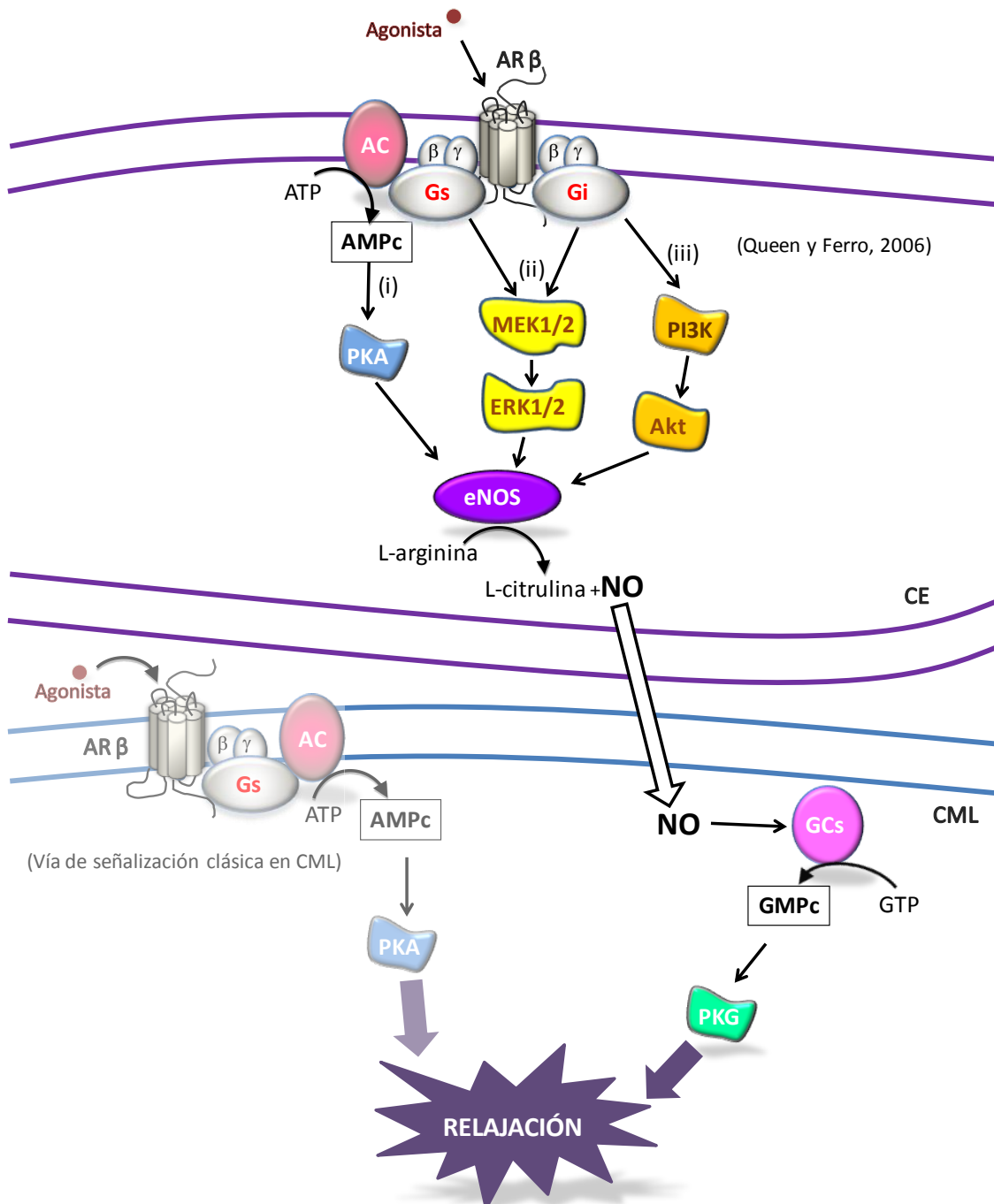


Imagen 13. Vías de señalización dependientes del NO endotelial, mediante las cuales los AR β producen vasorelajación: (i) vía clásica, que incluye la proteína Gs, AC, AMPc y PKA; (ii) vía de las MAPK, que incluye MEK1/2 y ERK1/2, acoplada a la proteína Gs o Gi; (iii) vía de la PI3K/Akt, acoplada a la proteína Gi. Se incluye también la vía de señalización clásica de los AR β en el músculo liso vascular (CML), anteriormente descrita en la Imagen 12.

AC: adenilato ciclasa; Akt: proteína cinasa B; AR: adrenoceptor; CE: célula endotelial; CML: célula del músculo liso; eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial; GCs: guanilato ciclasa soluble; Gi: proteína G inhibidora; Gs: proteína G estimuladora; NO: óxido nítrico; PI3K: fosfatidil inositol-3 cinasa; PKA: proteína cinasa A; PKG: proteína cinasa G.

del AR β a la proteína Gs o Gi (Imagen 13, (ii)), y la vía PI3K/Akt, que se activa a través de la proteína Gi (Imagen 13, (iii)) (Queen y Ferro, 2006).

Varios estudios realizados en CE de vena umbilical (HUVEC) demuestran que, tras estimular los AR β_2 , se produce una elevación de los niveles de AMPc que aumenta la activación de la PKA y la fosforilación de la eNOS, con la consecuente vasodilatación dependiente de NO (Ferro y cols., 1999). También se ha visto en estudios de arterias mesentérica de rata, que los niveles de NO y GMPc aumentan tras la estimulación de los AR β_1/β_2 y AR β_3 con adrenalina y diferentes agonistas de los AR β (Figueroa y cols., 2009).

Los AR β_2 , pero no los β_1 , pueden activar la proteína inhibidora Gi (Tabla A), mediante la cual pueden estimular a la cinasa Akt, vía PI3K. En aorta de rata, se ha visto que las vías implicadas tras la activación de los AR β_2 , son AMPc/PKA y PI3K/Akt y que median la relajación de este tejido mediante un componente dependiente de NO (Ferro y cols., 2004). Ciccarelli y cols. (2007) demuestran que la activación de los AR β_2 produce una activación de la eNOS en cultivos de CE de aorta y una vasodilatación de arteria carótida, a través de la vía PI3K/Akt.

Sin embargo, la contribución del NO en la respuesta vasorelajante mediada por los AR β es una cuestión controvertida, en cuanto puede variar según los territorios vasculares y según las diferentes especies, y en algunos casos es un tema a resolver. En algunos tejidos, la producción de NO mediada por los AR β endoteliales puede pesar más que los efectos vasorelajantes directos de los AR β localizados en las CML (Ferro y cols., 1999; Xu y cols., 2000), mientras que en otros esta contribución es insignificante (MacDonald y cols., 1987; Béa y cols., 1994).

Hay grupos que describen efectos opuestos incluso en el mismo tejido, como por ejemplo en A.M.R. o aorta de rata. Así, Briones y cols. (2005) describen que la relajación mediada por los AR β en A.M.R. es independiente del NO endotelial, mientras otros autores defienden que depende del NO (Graves and Poston, 1993). En aorta, Gray y Marshall (1992) describen que la relajación de los AR β depende totalmente del endotelio mientras otros autores demuestran que depende sólo parcialmente del endotelio (Van der Zyppe y cols.,

2000; Brawley y cols., 2000a; Ferro y cols., 2004) o no depende en absoluto del mismo (Moncada y cols., 1991b; Eckly y cols., 1994; Satake y cols., 1996). Estas discrepancias en los resultados obtenidos pueden ser debidas, como se ha comentado, a varios factores: el agente constrictor usado, el grado de precontracción (Eckly y cols., 1994), las diferencias en la edad de los animales empleados (Van der Zyppe y cols., 2000) o la destrucción incompleta del endotelio (Gray y Marshall, 1992).

En cuanto a los subtipos implicados en esta vía de señalización, hay pocos estudios realizados. Como ya hemos comentado, Ferro y cols. (2004) describen la participación mayoritaria del subtipo β_2 en la vasorelajación producida en aorta de rata mediante dos mecanismos: un mecanismo dependiente del NO, que ocurre vía activación PKA y PI3K/AKT, y un mecanismo independiente del NO, mediado por PKA. Por otra parte, en este mismo territorio, Trochu y cols. (1999) evidencian la participación del subtipo β_3 , demostrando que la relajación inducida por agonistas β_3 es dependiente del endotelio y produce un aumento en los niveles de GMPc. Otros territorios en los se ha evidenciado un efecto relajante de los agonistas β_3 dependiente del NO son las arterias humanas como la arteria mamaria interna (Rozec y cols., 2005) y las microarterias coronarias (Dessy y cols., 2005).

En la presente Tesis se profundiza en la contribución relativa de ambas vías de señalización (AC/AMPc/PKA y NO/GCs/GMPc) en la relajación de las A.M.R. y la aorta, y en la caracterización farmacológica de los subtipos de AR β implicados en la formación de ambos nucleótidos (AMPc y GMPc).

2.5.3 Vía de señalización de las MAPK

Las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK, del inglés: *mitogen-activated protein kinase*) son una familia de serina/treonina cinasas que son capaces de traslocarse al núcleo para, allí, modificar la actividad de algunas proteínas, incluso factores de transcripción, y así regular la transcripción y modular la expresión de distintos genes, decidiendo el destino de procesos tan importantes como crecimiento, diferenciación y muerte celular (Krishna y Narang, 2008). Entre los miembros de la familia MAPK se encuentran tres diferentes sub-familias: **ERK** (cinasa de respuesta exógena, del inglés: *extracellular signal-related kinase*), **p38** y **JNK** (del inglés: *c-Jun amino-terminal kinase*). Las principales ERK de mamífero son la **ERK1 (p44)** y la **ERK2 (p42): ERK1/2**.

De forma general, las cascadas de señalización de las MAPK se organizan en módulos individuales, que se activan por estímulos extracelulares (como: mitógenos, factores de crecimiento, estrés, citocinas...) o también a través de distintos tipos de receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Para la generación de la señal, estas MAPK deben ser doblemente fosforiladas en los residuos serina/treonina y tirosina por una MAPK-cinasa (MAPKK, también llamada MEK) que es fosforilada por una MAPK-cinasa-cinasa (MAPKKK, también llamada MEKK) (Johnson y Lapadat, 2002) (Imagen 14).

ERK1/2 está activada por mitógenos, factores de crecimiento o GPCR (May y Hill, 2008); su ruta pasa por las cinasas: Ras, Raf y MEK1/2 (Imagen 14). Dentro de sus efectores, se incluyen factores de transcripción (Elk-1, Ets 1, Sap1a, m-Myc), transductores de señal y activadores de señales de transcripción (STAT), entre otros. El estudio de las consecuencias fisiológicas de la señalización de ERK1/2 se ha visto facilitado por la disponibilidad de inhibidores farmacológicos de su acción, como U0126 (Alessi y cols., 1995; Davies y cols., 2000) y PD98059 (Alessi y cols., 1995; Favata y cols., 1998). Ambos inhibidores bloquean la señalización de ERK1/2 a través de la inhibición de sus activadores inmediatamente situados por arriba, MEK1/2 (Imagen 14). Desde una perspectiva fisiológica, la señalización por ERK1/2 está implicada en la

proliferación, crecimiento y supervivencia celular (Imagen 14), y en algunas circunstancias determina también la diferenciación celular (Roux y Blenis, 2004).

p38 y **JNK**, algunas veces referidas como “proteínas cinasas activadas por estrés” (Lewis y cols., 1998), se activan por estímulos estresantes extracelulares y por citocinas inflamatorias, o por GPCR (Raingeaud y cols., 1996) (Imagen 14). La cinasa p38 es activada por Rac, MEKK1/4 y MEK3/6, mientras JNK es activada por Rac, MEKK1/4 y MEK4/7, entre otros. Los efectores de la familia p38 incluyen factores de transcripción (ATF-2, Elk-1) y enzimas (MAPKAP cinasa).

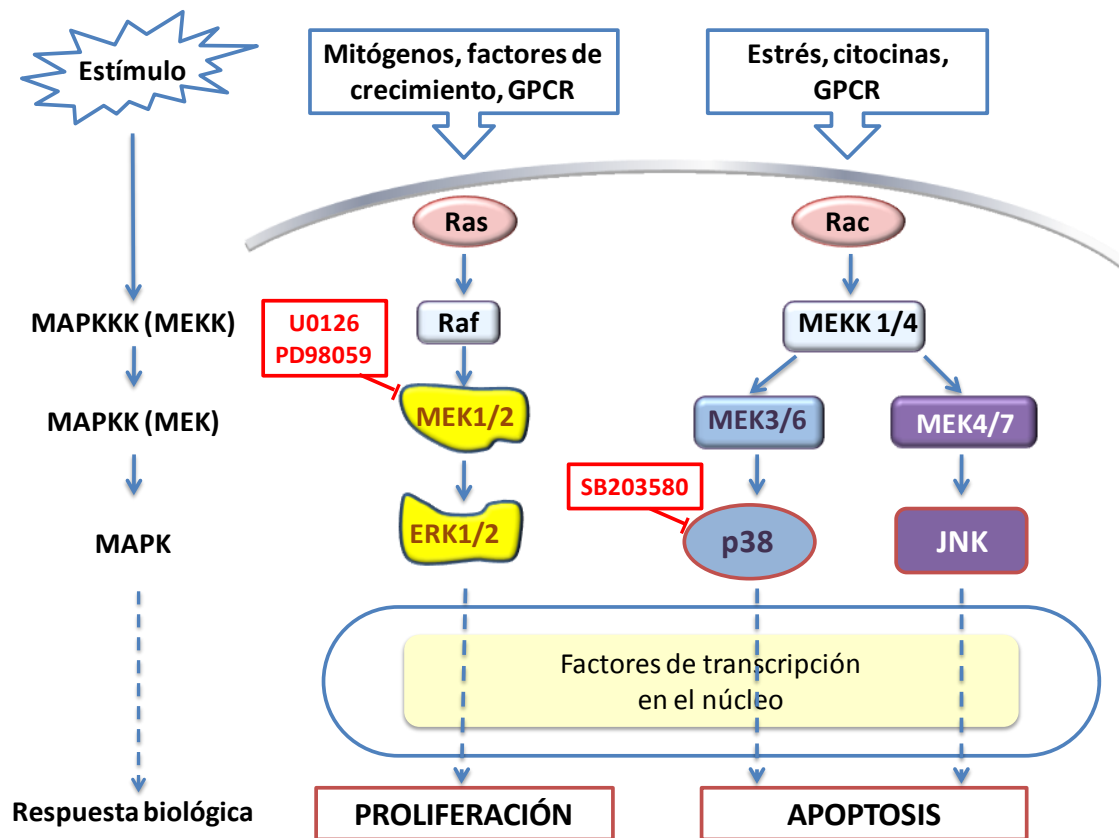


Imagen 14. Vía de señalización de las MAPK
 (modificado de Pearson y cols., 2001; Roux y Blenis, 2004).
 GPCR: receptores acoplados a proteína G.

El estudio de las consecuencias fisiológicas de la señalización de p38 se ha visto facilitado por la disponibilidad de inhibidores farmacológicos de su acción, como SB203580 (Gallagher y cols., 1997), que bloquean la señalización de p38. Las rutas p38 y JNK median respuestas a choques osmóticos, procesos inflamatorios y otras agresiones frecuentemente asociadas con decisiones de supervivencia y apoptosis, transmitiendo señales inhibitorias del crecimiento (Nemoto y cols., 1998; Pearson y cols., 2001; Roux y Blenis, 2004) (Imagen 14).

Dados los procesos fisiológicos que estas enzimas controlan, se ha explorado su posible uso en terapéutica: así los inhibidores de ERK1/2 podrían ser usados como agentes anti-cáncer por su importancia en el control de la división celular, mientras los inhibidores de p38 y JNK podrían ser efectivos en el control de enfermedades causadas por citocinas inflamatorias y estrés ambiental, como la artritis reumatoide, el asma o las enfermedades autoinmunes (Johnson y Lapadat, 2002).

2.5.3.1 Efecto de los AR β sobre la activación de las MAPK

Entre los GPCR, se ha visto que los AR β son capaces de activar las vías de señalización de las MAPK, y así se ha descrito en distintos tipos celulares (células HEK 293, COS-7, fibroblastos, ...) que los AR β provocan un aumento en la actividad de la ERK1/2 a través de la fosforilación de la misma (Evans y cols., 2010). Los tres subtipos de AR β parecen acoplados a esta vía de señalización. Sin embargo, algunos autores demuestran una defosforilación de ERK1/2 producida por los AR β_2 en queratinocitos (Pullar y cols., 2003) y células epiteliales de córnea (Ghoghawala y cols., 2008).

Otra de las cinasas sobre las que actúan los AR β es la p38. La mayoría de los estudios demuestran su activación por el subtipo β_2 en distintos tipos celulares como cardiomiocitos (Communal y cols., 2000; Zheng y cols., 2000; Magne y cols., 2001), linfocitos B (McAlees y Sanders, 2009) y células HEK293 (Yamauchi y cols., 1997; Gong y cols., 2008). También se ha descrito que la estimulación del subtipo β_3 produce una fosforilación de la p38 en adipocitos

(Cao y cols., 2004) y en células CHO-K1 que expresan dicho subtipo (Sato y cols., 2008). Sin embargo, como ocurre con la ERK1/2, algunos estudios demuestran una defosforilación de la p38 mediada por la estimulación de los AR β en células de microglía espinal (Morioka y cols., 2009) y en cardiomiocitos de pollo (Tsang y Rabkin, 2009).

Lógicamente, la activación de las MAPK por los AR influirá sobre las funciones biológicas de estas enzimas, ósea en los procesos de proliferación, diferenciación celular y apoptosis. Así, se ha relacionado la fosforilación de la ERK1/2 por el subtipo β_2 con un aumento en la proliferación celular en fibroblastos cardíacos (Kim y cols., 2002) y en las CE de aorta bovina (Iaccarino y cols., 2005); asimismo, se ha descrito que la fosforilación de la ERK1/2 mediada por los subtipos β_1 y β_2 puede estar implicada en el aumento de la proliferación celular de las CE en el hemangioma infantil (Ji y cols., 2013). Sin embargo, otros estudios han demostrado la defosforilación de ERK1/2 por los AR β y la consecuente disminución en la proliferación en CML vascular (Kim y cols., 2009) o en la migración de queratinocitos (Pullar y cols., 2003) y en células epiteliales de la córnea (Ghoghawala y cols., 2008).

Además, la p38 ha sido ampliamente estudiada en tejido cardíaco, estando implicada en la muerte celular causada por isquemia-reperfusión (Kaiser y cols., 2004), en el infarto agudo de miocardio (Tenhunen y cols., 2006) y en la insuficiencia cardíaca (Nishida y cols., 2004). Su papel como mediador en los procesos de apoptosis ha sido establecido en CE de aorta bovina (Iaccarino y cols., 2005) y en cardiomiocitos adultos (Zhu y cols., 2001). Así, se puede establecer que la vía de señalización de la p38 es perjudicial en la mayoría de los modelos de insuficiencia cardíaca, y que la inhibición crónica sistémica de esta vía mediante agentes farmacológicos reduce la severidad de la enfermedad (Liu y cols., 2005; Widder y cols., 2004). Sin embargo, se ha visto que la vía de señalización de la ERK1/2 tiene propiedades cardioprotectoras, en parte debido a una inhibición de la apoptosis de cardiomiocitos derivada de un proceso de isquemia-reperfusión o debida al estrés oxidativo que se produce (Yue y cols., 2000).

Las MAPK han sido estudiadas también por su relación con la angiogénesis, que consiste en la formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de vasos preexistentes (Carmeliet, 2003). La angiogénesis es un proceso fisiológico normal durante el desarrollo embrionario, el crecimiento del organismo y la cicatrización de las heridas (Folkman, 2006), pero influye también en la transformación maligna del crecimiento tumoral. En relación con este fenómeno, la vía de la ERK1/2 ha sido identificada como pro-angiogénica (Zachary, 2003), mientras la vía de la p38 como anti-angiogénica (Matsumoto y cols., 2002; Issbrucker y cols., 2003). Por lo que concierne los AR β , la activación del subtipo β_2 ha sido descrita como pro-angiogénica en la angiogénesis post-isquémica (Iaccarino y cols., 2005; Ciccarelli y cols., 2011), pero existen estudios aparentemente contradictorios sobre los efectos de la inhibición β adrenérgica. De este modo, los antagonistas β se han descrito por un lado como agentes anti-angiogénicos (Annabi y cols., 2009; Lamy y cols., 2010; Ristori y cols., 2011), beneficiosos en el tratamiento de hemangiomas infantiles (Storch y Hoeger, 2010) y leucemia (Hajighasemi y Hajighasemi, 2009), pero por otro lado como compuestos pro-angiogénicos, provechosos para la reparación de heridas (Romana-Souza y cols., 2009; Pullar y cols., 2012).

Por último, es importante señalar que, recientemente, se ha demostrado que algunos ligandos de los AR β presentan eficacias diferentes para un mismo receptor, y así pueden interactuar con diferentes conformaciones del receptor, activando distintas vías de señalización y provocando distintas respuestas biológicas (Evans y cols., 2010). Así, algunos antagonistas, como propranolol o SR59230A, actúan como clásicos antagonistas competitivos de la vía de señalización del AMPc, pero también actúan como agonistas de la vía de señalización de las MAPK (Azzi y cols., 2003; Baker y cols., 2003b; Galandrin y Bouvier, 2006; Sato y cols., 2007, 2008; Galandrin y cols., 2008; Evans y cols., 2010), presentando lo que se ha denominado “selectividad funcional” y comportándose como agonistas sesgados (del inglés: “biased agonists”).

2.5.3.2 Efecto de las MAPK sobre la reactividad vascular

A nivel vascular, existen numerosos trabajos que describen el papel que juega la activación de las MAPK (ERK1/2 y p38) en la respuesta contráctil de diferentes vasos, en condiciones fisiológicas o en patologías como la hipertensión (Kim y cols., 2005, 2006; Giachini y cols., 2010).

La mayoría de los estudios describen que la activación de las MAPK aumenta la contracción en los diferentes tejidos vasculares y así, por ejemplo, la inhibición de la ERK1/2 produce una reducción de la contracción mediada por diferentes agentes contráctiles, como: los agonistas α_1 en arteria de útero ovino (Xiao y Zhang, 2002; Xiao y cols., 2004), en arteria carótida de rata (Tsai y Jiang, 2005) o en aorta de ratón (Bhattacharya y cols., 2011); los agonistas α_2 en arteria auditiva (Bhattacharya y Roberts, 2003) o vena palmar (Roberts 2001, 2004) de porcino; la endotelina en aorta de rata (Kim y cols., 2004; Kwon y cols., 2003, 2004; Lee y cols., 2007); la serotonina en arteria de útero bovino (Xiao y Zhang, 2002); la angiotensina II en arteria mesentérica o A.M.R. de rata (Touyz y cols., 1999, 2002). Por otro lado, se ha descrito que estos mismos agentes contráctiles provocan un aumento en la fosforilación de la ERK1/2 en diferentes tejidos vasculares como: las CML de aorta humana (Chen y cols., 2009) y de rata (Touyz y cols., 1999); la aorta (Kim y cols., 2004; Kwon y cols., 2004; Lee y cols., 2007) y la arteria caudal de rata (Tsai y Jiang, 2005); la arteria auditiva (Bhattacharya y Roberts, 2003) y la vena palmar (Roberts, 2001, 2004) de porcino; la aorta de hurón (Dessy y cols., 1998).

Por lo que respecta a la p38, se ha visto que su inhibición disminuye la respuesta contráctil a la endotelina en aorta (Kwon y cols., 2003, 2004; Kim y cols., 2004; Lee y cols., 2007) y en arteria mesentérica de rata (Ohanian y cols., 2001) y a la NA en arteria mesentérica de rata (Ohanian y cols., 2001). En estos trabajos se ha visto que estos agonistas, a su vez, aumentan la actividad de la p38.

Sin embargo hay muy pocos estudios sobre la influencia que las MAPK pueden tener en la respuesta relajante mediada por la activación de los AR β . Recientemente, como ya se ha comentado anteriormente, se ha postulado que

otro mecanismo de acción, diferente de la vía de señalización clásica del AMPc, por el cual los AR β median la vasorelajación, es el acoplamiento a la proteína Gi y la consiguiente activación de la vía de las MAPK (Queen y Ferro, 2006) (ver Imagen 13). Además se ha visto que la estimulación de los AR β activa la vía de las MAPK en diferentes tipos celulares (Evans y cols., 2010). No obstante, hasta el momento han sido publicados solamente dos trabajos en tejidos nativos, demostrando que la inhibición de la fosforilación de la ERK1/2 aumenta el efecto relajante de isoprenalina en bronquiolos porcinos (Lelliot y cols., 2012), y de isoprenalina y salbutamol pero no de xamoterol en arterias coronarias porcinas (Uhiara y cols., 2009).

La mayoría de los estudios en los que se demuestra la activación de las MAPK inducida por los AR β han sido realizados en diferentes tipos de líneas celulares en los que existe una sobreexpresión de receptores, y algunos de ellos han sido realizados en células aisladas como cardiomiocitos, linfocitos y adipocitos, pero se conoce muy poco lo que ocurre en un tejido intacto.

En la presente Tesis se ha profundizado en el efecto de la estimulación de los AR β sobre la fosforilación de la ERK1/2 y la p38 en aorta y en CE y CML aisladas de aorta y, por otro lado, se ha determinado el papel que ejercen estas cinasas en la acción vasodilatadora mediada por isoprenalina en aorta de rata.

OBJETIVOS



Los AR β son receptores con siete dominios transmembrana, acoplados a proteínas G y activados por las catecolaminas endógenas NA y A. Estos receptores están situados, entre otras localizaciones, en las células de los vasos sanguíneos, donde producen vasodilatación: de ahí que juegan un papel fundamental en la regulación del tono vascular. Aunque existen numerosos trabajos acerca de la participación de los diferentes subtipos de AR β (β_1 , β_2 y β_3) en el efecto relajante a nivel vascular, los resultados de la literatura son contradictorios y hasta el momento no se ha establecido bien la funcionalidad de cada uno de los subtipos en los diferentes lechos vasculares.

Además, aunque tradicionalmente se considera que la relajación inducida por los AR β se produce a través de la estimulación de la adenilato ciclasa (AC) en las células musculares lisas (CML), con el consiguiente aumento del AMPc y la activación de la PKA (vía de señalización clásica: AC/AMPc/PKA), se conocen otros mecanismos de transducción de la señal por los cuales los AR β median la vasodilatación, como por ejemplo: la liberación de NO en las células endoteliales (CE), que lleva a la activación de la guanilato ciclasa soluble (CGs) y a la formación de GMPc (vía de señalización: NO/GCs/GMPc). Sin embargo, en la literatura existen datos discordantes sobre la contribución relativa de la vía de señalización clásica y la vía del NO en la relajación mediada por los distintos subtipos de AR β y en distintos territorios vasculares.

Recientemente se ha descrito que, además de las señales de membrana, los AR β pueden activar vías intracelulares como la vía de señalización de las cinasas activadas por mitógenos, MAPK (ERK1/2 y p38). No obstante, existen muy pocos estudios que determinen el efecto de los AR β sobre las MAPK a nivel vascular y sobre todo la influencia que pueda tener esta vía de señalización en la funcionalidad de los mismos en un tejido vascular nativo.

Ante estas evidencias, en la presente Tesis nos proponemos el estudio de la localización de los subtipos de AR β en las diferentes células vasculares, su función y sus vías de señalización, utilizando dos lechos vasculares con diferentes características fisiológicas: un vaso de resistencia de pequeño calibre,

Objetivos

como la arteria mesentérica de resistencia (A.M.R.) y un vaso de conductancia de calibre mayor, como la aorta. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar la expresión génica y proteica, así como la distribución celular en la pared vascular (CE, CML y/o adventicia) de los tres subtipos de AR β (β_1 , β_2 y β_3), en los dos tejidos (A.M.R. y aorta).
2. Determinar los mecanismos de señalización por los cuales los tres subtipos de AR β median la vasodilatación en A.M.R. y aorta: la vía clásica de activación AC/AMPC/PKA y/o la vía NO/GCs/GMPc.
3. Determinar la participación funcional de cada uno de los tres subtipos de AR β en la vasodilatación mediada por estimulación β adrenérgica, de forma sistemática y utilizando las mismas condiciones experimentales en los dos tejidos en estudio.

Además, determinamos si los AR β son capaces de señalar a través de la vía de las MAPK (ERK1/2 y p38), en aorta entera y en los principales tipos celulares de este vaso (CE y CML aisladas de aorta), analizando el papel que esta vía puede desempeñar en la acción vasodilatadora mediada por los AR β .

MATERIAL Y MÉTODOS



1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y EXTRACCIÓN DE LOS TEJIDOS	62
2. EXTRACCIÓN Y CULTIVO DE LAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS (CML) Y ENDOTELIALES (CE) DE LA AORTA	65
3. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS AR β y DE LA eNOS	67
4. EXPRESIÓN PROTEICA DE LOS AR β POR INMUNOFLUORESCENCIA	70
5. FORMACIÓN DE LOS NUCLEÓTIDOS AMPc y GMPc	71
6. EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS MAPK	74
7. ESTUDIOS FUNCIONALES DE REACTIVIDAD VASCULAR	77
8. FÁRMACOS UTILIZADOS	85
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	86

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y EXTRACCIÓN DE LOS TEJIDOS

El cuidado y el tratamiento de los animales se realizó siguiendo la legislación española recogida en el Real Decreto 1201/2005, de 10 de Octubre, sobre “Protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos” (ratificación de la Directiva Europea 86/609/CEE), y según Decreto 13/2007, de 26 de Enero, del Consell de la Comunidad Valenciana. Los protocolos realizados fueron aprobados por el Comité Ético de la Universidad de Valencia.

Se emplearon ratas adultas macho de raza Wistar, criadas en el servicio de Producción animal del SCSIE de la Universidad de Valencia, con un peso comprendido entre 275 y 325 g. Todos los animales fueron estabulados hasta su sacrificio, siguiendo ciclos de luz–oscuridad de 12 horas, a una Tª ambiental de 22°C y 60 % de humedad, con alimentación artificial y agua de bebida *ad libitum*.

Las ratas previamente anestesiadas con Isoflurano (IsoFlo®, Esteve), se sacrificaron por decapitación y se desangraron, teniendo en cuenta las recomendaciones para la eutanasia de los animales de la Dirección general de medio ambiente (DGXI) de la Comisión Europea, para el sacrificio con el mínimo sufrimiento físico y mental del animal (Close y cols., 1996). Después del sacrificio, se extrajeron dos tipos de tejido vascular diferente: vasos de resistencia (arterias mesentéricas de pequeño calibre) y un vaso de conductancia (aorta torácica), tal y como se expone a continuación:

- ARTERIAS MESENTÉRICAS DE RESISTENCIA (A.M.R.)

Se realizó una laparotomía mediante una incisión a nivel abdominal, se extrajo el intestino y se puso en una placa conteniente solución fisiológica de Krebs (NaCl 118 mM, KCl 4,75 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 1,2 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, NaHCO₃ 25 mM y glucosa 11 mM) a pH = 7,4. El intestino se extendió con cuidado con unas pinzas, para visualizar mejor los tejidos adiposo y conectivo

que se encuentran adheridos a la vasculatura esplácnica. La separación de dichas adherencias mediante la utilización de material especial quirúrgico permitió visualizar la arteria mesentérica superior y sus ramas (Imagen IA). A continuación, con la ayuda de una lupa de disección de 20 aumentos (Leica S6E), se aislaron las segundas y terceras ramas de las A.M.R. (Imagen IA). Cuando el protocolo exigía la ausencia de endotelio, éste fue eliminado mediante fricción con un fino alambre. Esta operación se llevó a cabo con cuidado para no dañar la capa muscular del vaso y perder así su capacidad contráctil y relajante.

- AORTA TORÁCICA

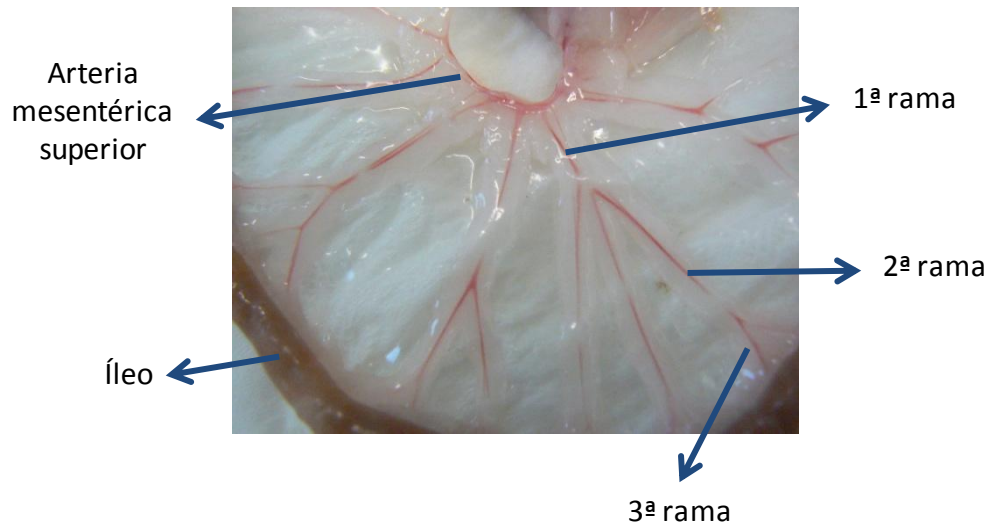
Tras realizar una toracotomía, se separaron los pulmones y el corazón visualizándose la arteria aorta, la cual se extrajo con cuidado, desde el cayado aórtico hasta el diafragma. El segmento extraído se colocó en una placa Petri con solución fisiológica de Krebs y se limpió cuidadosamente de la grasa perivascular (Imagen IB). Para la eliminación del endotelio, se utilizó una cánula fina que se introdujo en la luz del vaso repetidas veces.

Inmediatamente después de su extracción, los tejidos fueron manipulados de diferente forma, según las técnicas que se iban a realizar y que se describen en los apartados correspondientes:

- Obtención de las células musculares y endoteliales.
- Estudios de expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real (los tejidos se congelaron a -80°C hasta su posterior utilización).
- Inmunofluorescencia.
- Estudios funcionales de formación de AMPc y GMPc o de reactividad vascular en baño de órgano.
- Western Blot.

A

**ARTERIAS MESENTÉRICAS
DE RESISTENCIA (A.M.R.)**



B

AORTA TORÁCICA



Imagen I:

Fotografías de una arteria mesentérica de resistencia (A.M.R.) (A) y una aorta torácica (B) recién aisladas de una rata Wistar.

2. EXTRACCIÓN Y CULTIVO DE LAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS (CML) Y ENDOTELIALES (CE) DE LA AORTA

Las células de músculo liso (CML) y las células endoteliales (CE) procedentes de la arteria aorta se extrajeron y cultivaron según el protocolo que se describe a continuación.

- CML

Tras eliminar el endotelio, raspando el interior de la aorta con una pipeta Pasteur cuya punta fue hecha roma, y triturar el tejido haciendo uso de un bisturí, la masa homogénea obtenida se vertió en 2,5 ml de medio DMEM F12-HAM (Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA), suplementado con: penicilina 180 U/ml, estreptomycin 180 µg/ml, L-glutamina 20 nM, fungizona 2,5 U/ml y gentamicina 4 mg/ml. Seguidamente se realizó una centrifugación a 180 x *g* durante 4 minutos, tras la cual se resuspendió el pellet en 2,5 ml de una solución de colagenasa (2,5 mg/ml, Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA) en el mismo medio. Durante 90 minutos se incubó el tejido en la solución de colagenasa a una Tª constante de 37°C y en agitación. Cada 10 minutos la solución fue agitada fuertemente y cada 30 minutos se realizó una disgregación mecánica utilizando una pipeta Pasteur cuya punta fue estrechada, con el objetivo de obtener una disgregación eficiente. Posteriormente, el tejido disgregado se sometió a una centrifugación a 390 x *g* durante 10 minutos. El pellet fue resuspendido en el medio DMEM F12-HAM y se repitió la centrifugación.

El pellet resultante, conteniente las CML, se utilizó para el cultivo celular o fue congelado a -80°C. En este último caso, las células que no fueron cultivadas sino guardadas directamente tras su obtención, se denominaron: CML frescas.

Para el cultivo de las CML, el pellet fue resuspendido en el medio DMEM F12-HAM suplementado con los componentes anteriormente mencionados y suero bovino fetal (SBF, Gibco BRL, Gaithersburg MD, USA) al 12%. Las células fueron sembradas en placas Petri de 30mm de diámetro y el medio se renovó cada 3 días.

- CE

Para obtener las CE, se utilizaron anillos de aorta (de 2 mm de largo) que fueron sumergidos separadamente en 50 µl de Matrigel (del inglés: "*Basement Membrane Matrix*"; BD Bioscience, San Jose CA, USA) en una placa de 96 pocillos, con 200 µl de medio EGM-MV2 (del inglés: "*Endothelial Cell Growth Medium MV2*"; Promocell GmbH, Heidelberg, Alemania), suplementado con: anfotericina B (Lonza Group Ltd., Basel, Suiza) y gentamicina (Schering-Plugh SA, Madrid). El medio se renovó cada 2 días. Después de 5 días, los anillos de aorta se desecharon y las CE formadas de los nuevos túbulos se aislaron como se detalla a continuación: el Matrigel se disgregó mecánicamente utilizando una pipeta Pasteur con 200 µl de tripsina fría (Gibco BRL, Gaithersburg MD, USA). El volumen total (4 ml) fue centrifugado a 1000 rpm durante 5 minutos y el pellet resultante fue resuspendido en el medio EGM-MV2. Las CE se sembraron en placas Petri de 30 mm de diámetro y el medio se renovó cada 3 días.

El cultivo en placa tanto de las CML como de las CE se mantuvo en atmósfera húmeda a 37°C y 5% de CO₂. Los experimentos en los cultivos celulares fueron realizados entre el pase 2 y 6.

3. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS AR β y DE LA eNOS

Se cuantificó el ARN mensajero (ARNm) de los 3 subtipos de AR β y de la enzima eNOS, previamente retrotranscrito a ADN complementario (ADNc), mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real, en: los tejidos enteros (A.M.R. y aorta), las CML frescas recién aisladas de aorta y los cultivos de CML y CE de aorta, tal y como se describe a continuación.

3.1 Extracción de ARN total

Antes de proceder a la extracción de ARN total, los tejidos enteros (segmentos de las segundas y terceras ramas de A.M.R. y anillos de aorta previamente congelados y almacenados a -80°C) se pulverizaron finamente con la ayuda de un mortero de acero enfriado.

El ARN total de los tejidos pulverizados, las CML frescas y los cultivos de CML y CE de aorta, se extrajo utilizando el reactivo de lisis *Tripure Isolation Reagent* (Roche Applied Science, Alemania), que destruye las membranas celulares de manera que los ácidos nucleicos, acompañados de otros compuestos (proteínas, enzimas, carbohidratos), queden disponibles para su posterior procesamiento. Seguidamente, con el fin de eliminar restos celulares no lisados, se realizó una primera centrifugación a $12.000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C . Al sobrenadante se le añadió cloroformo ($200 \mu\text{L}$ por cada ml de reactivo *Triprure*), se agitó durante 15 segundos, seguidos de 10 minutos de reposo a T^{a} ambiente; posteriormente, se realizó una segunda centrifugación a $12.000 \times g$ durante 15 minutos a 4°C con objeto de favorecer la separación de fases: i) fase superior acuosa, donde se localiza el ARN total; ii) interfase; iii) fase inferior orgánica, donde se encuentra el ADN.

A continuación se recogió la fase acuosa a la que se añadió isopropanol, dejándola reposar 10 minutos a T^{a} ambiente para que los ácidos nucleicos

precipitaran. Las muestras se centrifugaron de nuevo a 12.000 x *g* durante 10 minutos a 4°C, obteniendo un pellet de ARN total. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol diluido al 70 % en agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC). Para recoger el pellet lavado, se realizó una última centrifugación a 8.000 x *g* durante 5 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y el pellet se sometió a secado bajo la luz de un flexo. Finalmente, el pellet se resuspendió en agua tratada con DEPC y se congeló a -80°C hasta su posterior análisis.

La integridad y la concentración del ARN total obtenido se evaluaron con la ayuda de un sistema de electroforesis automático (*ExperionTM*, Bio-Rad Hercules CA, USA), empleando unos chips y un kit de sensibilidad estándar para análisis de ARN total, según las instrucciones dadas por el fabricante.

3.2 Transcripción reversa (RT)

Una vez aislado el ARN total, se procedió a la síntesis del ADN complementario (ADNc), mediante la reacción de transcripción reversa o retrotranscripción (RT). El ARN total (2 µg) y el cebador oligo (dT) (250 ng) fueron precalentados en agua tratada con DEPC a 70°C para favorecer su unión, y luego enfriados en hielo. La reacción de RT fue ajustada a un volumen de 25 µl, conteniente: 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT (Ditiotreitol), 40 U del inhibidor de ribonucleasas RNAsin® (Promega Corp. Madison, USA), 2 mM de cada deoxinucleósido trifosfato y 300 U de Transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (Moloney Murine Leukemia Virus reverse Transcriptase, M-MLV RT) (Promega Corp. Madison, USA). La reacción transcurrió a 42°C durante 60 minutos y al final la enzima fue desactivada por calentamiento a 70°C durante 15 minutos.

Una vez finalizadas las reacciones, el ADNc sintetizado se almacenó a -20°C hasta su posterior uso.

3.3 PCR cuantitativa a tiempo real

Los ARNm codificantes para cada uno de los 3 diferentes subtipos de AR β (β_1 , β_2 y β_3), para la enzima eNOS y para *Gapdh* como control interno, se cuantificaron mediante el empleo de sondas Taqman® con propiedades fluorescentes, usando un termociclador *GeneAmp 5700 sequence-detection system* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Diluciones 1/10 de la reacción de RT previa, se analizaron por duplicado mediante ensayos de expresión génica (*Taqman® Gene Expression Assays*, Applied Biosystems, FosterCity, CA, USA), consistentes en una mezcla 20X de cebadores y sondas Taqman® MGB (Rn00824536_s1 para el ***Adrb1***; Rn00560650_s1 para el ***Adrb2***; Rn00565393_m1 para el ***Adrb3***; Rn02132634_s1 para la enzima ***Nos3***; Rn99999916_s1 para ***Gapdh***).

Las reacciones se ajustaron a un volumen de 25 μ l con *Taqman® Universal Master Mix (AmpliAq Gold® DNA Polymerase*; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), incluyendo 5 μ l de la dilución de la reacción de RT y 1,2 μ l de la mezcla 20X de sonda (250 nM) y cebadores (900 nM). El ADNc fue amplificado según las condiciones del fabricante: un primer paso de activación de la polimerasa a 95°C durante 10 minutos y 40 ciclos compuestos de dos pasos: desnaturalización a 95°C durante 15 segundos e hibridación/extensión a 60°C durante 1 minuto.

3.4 Análisis de los resultados

Al finalizar el proceso de amplificación, se obtuvieron los valores del ciclo umbral Ct (*“threshold cycle”*: número de ciclo en el cual la fluorescencia sobrepasa el umbral determinado automáticamente por el sistema) para cada gen. Los valores Ct fueron normalizados usando como gen de referencia el *Gapdh*, siendo Δ Ct la diferencia entre Ct del gen estudiado y Ct de *Gapdh*. El valor Δ Ct se transformó matemáticamente mediante la expresión $2^{-\Delta Ct}$, directamente proporcional al número inicial de copias de cada gen (Livak y Schmittgen, 2001).

4. EXPRESIÓN PROTEICA DE LOS AR β POR INMUNOFLUORESCENCIA

Segmentos de las terceras ramas de A.M.R. y anillos de aorta recién extraídos del animal, se fijaron con paraformaldehído (4 %; pH 7,4) durante 1 hora. A continuación se realizaron 3 lavados, de 10 minutos cada uno, con tampón fosfato salino (PBS; 0,1 M; pH 7,4) y las arterias se mantuvieron toda la noche en una solución de sacarosa al 30 % en PBS. Posteriormente fueron transferidas a un criomolde de plástico (Bayer Química Farmacéutica, España), sumergidas en el medio de inclusión Tissue-Tek[®] OCT (Optimum Cutting Temperature, Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, Holanda), se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su utilización posterior.

Los segmentos arteriales se cortaron con un criostato en secciones transversales de 14 μm de grosor, y se colocaron en un portaobjetos gelatinado. Después de 90 minutos de secado a 37°C , se bloquearon en una cámara húmeda durante 2 horas (37°C) con PBS (pH 7,4) + Tween 20 (0,3 %) (PBS-T), que contenía 5 % de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA). Las secciones se incubaron en la cámara húmeda durante 1 hora (37°C), con anticuerpos primarios específicos para cada subtipo de AR β : anticuerpo policlonal de conejo anti- β_1 (sc-568; dilución 1:30; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA); anticuerpo policlonal de conejo anti- β_2 (sc-9042; dilución 1:30; Santa Cruz); anticuerpo policlonal de cabra anti- β_3 (sc-1473; dilución 1:30; Santa Cruz), diluidos con PBS-T, que contenía 2 % de BSA. A continuación se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS-T y posteriormente las secciones se incubaron (1 hora, 37°C , en la cámara húmeda) con los anticuerpos secundarios IgG anti-conejo o anti-cabra conjugados con CyTM3 (1:200; Jackson Immuno Research Laboratories) diluidos con PBS-T, que contenía 2 % de BSA.

Después de realizar 3 lavados de 10 minutos con PBS-T, las muestras se incubaron (10 minutos) con el colorante nuclear 2'-(4-etoxifenil)-5-(4-metil-1-piperacínil)-2,5'-bi-1H-benzimidazol (Hoechst 33342; 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; excitación $\lambda = 351-364 \text{ nm}$, emisión $\lambda = 400-500 \text{ nm}$). Finalmente, después de realizar 3

lavados de 5 minutos con PBS, las muestras se cubrieron con un cubreobjetos de vidrio y las señales inmunofluorescentes se visualizaron con un microscopio láser confocal (Leica TCS SP2) con lentes de inmersión en aceite (40X para aorta; 63X para A.M.R.). Los anticuerpos secundarios conjugados con CyTM3 se visualizaron por excitación a $\lambda = 561$ nm y emisión a $\lambda = 600-700$ nm. La autofluorescencia verde de la elastina de la lamina elástica (LE) se observó por excitación a $\lambda = 488$ nm y emisión a $\lambda = 500-560$ nm. La especificidad de la señal se evaluó por emisión del anticuerpo primario. En estas condiciones, no se observó tinción de la pared vascular.

5. FORMACIÓN DE LOS NUCLEÓTIDOS AMPc y GMPc

Para los experimentos de formación de los nucleótidos cíclicos, se utilizaron las ramas de segundo y tercer orden de las A.M.R. de 2 ratas, que se dividieron aleatoriamente en 6 muestras, mientras la aorta proveniente de cada animal se dividió en 5 anillos de 3 mm aproximadamente.

5.1 Estimulación de las muestras

Las muestras de A.M.R. y aorta se incubaron en un volumen de 5 ml de solución fisiológica de Krebs a 37°C, con burbujeo de carbógeno (95 % O₂ + 5 % CO₂; cada 10 minutos), y se estabilizaron durante un periodo de 30 minutos. A continuación se incubaron durante 30 minutos con los agentes estimulantes (forskolina, nitroprusiato sódico o los agonistas β), en presencia de IBMX (3-isobutil-1-metilxamina) 0,5 mM, como inhibidor no selectivo de las fosfodiestererasas de los nucleótidos cíclicos, con el fin de evitar la degradación de los mismos (Bender y Beavo, 2006).

Las acciones de **forskolina** 1 μ M, activador directo de la AC, y de **nitroprusiato sódico** 1 μ M, activador directo de la GCs, se analizaron en unos experimentos preliminares, como controles positivos de la generación de AMPc y GMPc, respectivamente. A continuación, la capacidad de aumentar la

producción de los nucleótidos se ensayó para los siguientes agonistas de los AR β : **isoprenalina** (no selectivo), **dobutamina** (β_1 selectivo), **salbutamol** (β_2 selectivo) y **CL316243** (β_3 selectivo), a una concentración de 1 μ M.

Para comprobar que la formación de AMPc que detectamos estaba mediada por la enzimas AC, se estudió la acción del inhibidor de la AC (**SQ22536** 100 μ M) sobre la formación de AMPc provocada por isoprenalina 1 μ M. Así mismo, para comprobar que el aumento de GMPc dependía de la liberación de NO, se estudió la acción del inhibidor de la eNOS (**L-NAME** 100 μ M) sobre la formación de GMPc provocada por isoprenalina 1 μ M. Ambos inhibidores, SQ22536 y L-NAME, se añadieron 15 minutos antes de isoprenalina.

En otro grupo de experimentos, con objeto de estudiar el efecto de los diferentes antagonistas β sobre la producción de nucleótidos inducida por isoprenalina 1 μ M, se ensayaron los siguientes antagonistas de los AR β : **propranolol** (β_1/β_2 no selectivo), **CGP20712A** (β_1 selectivo), **ICI118551** (β_2 selectivo) y **SR59230A** (β_3 selectivo), a una concentración de 1 μ M. Estos se añadieron 15 minutos antes de isoprenalina.

Una vez finalizado el tiempo de incubación con los diferentes compuestos, se procedió a congelar de forma inmediata cada muestra en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta su posterior análisis.

5.2 Extracción de AMPc y GMPc

Los tejidos congelados se trituraron en un mortero de acero enfriado hasta obtener un polvo fino, que fue suspendido en un vial con 100 μ l de HCl 0,1 N e IBMX 0,5 mM. La suspensión se agitó durante 5 segundos y se sonicó mediante ultrasonido, provocando la ruptura de las células y la liberación de los nucleótidos cíclicos. A continuación, se procedió a centrifugar el vial a 600 x g durante 5 minutos a Tª ambiente. El sobrenadante obtenido se congeló a -80°C .

Con objeto de ajustar la cantidad de proteínas por ensayo, se determinó la concentración de proteínas de cada muestra mediante el método de Bradford (1976) (Bio-Rad Hercules CA, USA), utilizando BSA como referencia. Las

muestras se diluyeron con HCl 0,1 N hasta obtener una concentración de 60 µg/ml de proteínas.

5.3 Cuantificación de AMPc y GMPc

Para la cuantificación de los nucleótidos cíclicos se emplearon dos kits comerciales específicos para la cuantificación de AMPc y GMPc (Direct Cyclic AMP Correlate-EIA TM y Direct Cyclic GMP Correlate-EIA TM, Assay Designs, Ann Arbor, MI, respectivamente). La técnica se basó en un inmunoensayo competitivo, utilizando un anticuerpo policlonal dirigido a AMPc o GMPc que se unió a los nucleótidos de la muestra, compitiendo con una molécula de fosfatasa alcalina que tenía unido covalentemente un nucleótido (AMPc o GMPc conjugado). Las muestras (o el estándar, con una concentración conocida de nucleótido) fueron incubadas por duplicado con el anticuerpo y el conjugado, a T^a ambiente, durante 2 horas, en oscuridad y con agitación. Posteriormente se lavó y se añadió un sustrato de la fosfatasa alcalina (para-nitrofenil fosfato) que se dejó a T^a ambiente, durante 1 hora, en oscuridad y sin agitación. Al finalizar la incubación, la reacción fue detenida mediante una solución “stop” incluida en el kit y se observó la formación de un color amarillo, cuya intensidad fue inversamente proporcional a la concentración de AMPc o GMPc en las muestras o en el estándar. Por último, se midió la absorbancia a $\lambda = 405$ nm en un espectrofotómetro (VICTOR 3TM U1420 multilabel counter).

5.4 Análisis de los resultados

En cada ensayo se realizó una curva estándar con concentraciones conocidas de AMPc (0,078 hasta 20 pmol/ml) o GMPc (0,08 hasta 50 pmol/ml). La concentración de AMPc o GMPc de las muestras se calculó interpolando el % de nucleótido unido en la curva estándar (mediante GraphPad Prism versión 4.0, San Diego, California). Los resultados se expresaron en pmol/mg de proteína o como porcentaje respecto a la acumulación basal del control.

6. EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS MAPK

Para estudiar el efecto de los AR β en la vía de señalización de las MAPK, se analizó la fosforilación de ERK1/2 y p38 por inmunodetección de proteínas (Western Blot), en los anillos enteros y en las diferentes células cultivadas (CML y CE) de aorta, después de la estimulación o el bloqueo de los AR β .

6.1 Estimulación de las muestras

Los anillos de aorta se incubaron en un volumen de 5 ml de solución fisiológica de Krebs a 37°C, con burbujeo de carbógeno (95 % O₂ + 5 % CO₂), y se estabilizaron durante un periodo de 30 minutos. Una vez alcanzada la confluencia requerida, las CML se mantuvieron en medio sin suero y las CE se mantuvieron en medio sin suero ni factores de crecimiento, durante 4 horas.

Los anillos de aorta y las células se incubaron en ausencia (control) y en presencia de **isoprenalina** (0,1; 1; 10 μ M) durante 5 minutos. Cuando se indica, las preparaciones se incubaron con el antagonista **propranolol** (1 μ M, 15 minutos) o con los inhibidores de ERK1/2 (**U0126**) y de p38 (**SB203580**) (10 μ M, 45 minutos), solos o antes de isoprenalina. En estos últimos experimentos el control se realizó en presencia de DMSO 0,1 % que se usó para disolver los inhibidores U0126 y SB203580. En algunos experimentos, los anillos de aorta fueron estimulados con el agonista de los AR α_1 (**fenilefrina**, 10 μ M) o con el agonista del receptor del tromboxano A₂ (**U46619**, 1 μ M), durante 5 minutos.

Al final del tratamiento, se extrajo la solución de Krebs y los anillos de aorta se congelaron de forma inmediata en nitrógeno líquido, mientras las células fueron lavadas con PBS frío y congeladas.

6.2 Extracción y cuantificación del contenido proteico

Los anillos de aorta congelados se trituraron en un mortero de acero enfriado hasta obtener un polvo fino. La aorta así pulverizada, las CML y las CE fueron suspendidas en un tubo con la solución de lisis RIPA (50 mM HEPES; 150 mM NaCl; 10 % glicerol; 1,5 mM MgCl₂; 0,1 % dodecil sulfato de sodio (SDS); 1 mM EGTA; 100 mM NaF; 1 % Tritón X-100; 1% deoxicolato sódico) junto a una mezcla comercial que contenía inhibidores de proteasas (Complete®, Roche Diagnostics, Alemania) y de fosfatasas (PhosSTOP®, Roche Diagnostics, Alemania). Los homogeneizados así obtenidos se sonicaron (Microson™ XL 2000 *Ultrasonic Liquid Processor*) durante 3 ciclos de 5 segundos y, a continuación, se centrifugaron a 16.100 x g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido, el cual contenía las proteínas solubles totales, fue alicuotado y almacenado a -80°C.

La cuantificación de las proteínas se determinó mediante el método de Bradford (1976) (Bio-Rad Hercules CA, USA), utilizando BSA para establecer la curva estándar.

6.3 Inmunodetección de proteínas (Western Blot)

Se determinó la expresión proteica de las MAPK (**ERK1/2** y **p38**) y sus formas fosforiladas (**p-ERK1/2** y **p-p38**). Para ello, 15 µg de proteínas de aorta, CML y CE se incubaron con el tampón de carga (2 % SDS; 60 mM Tris-HCl pH=6,8; 5 % β-mercaptoetanol; 0,01 % azul de bromofenol; 10 % glicerol). La separación de las proteínas se realizó mediante electroforesis húmeda utilizando geles de poliacrilamida-SDS al 10 % y con tampón de electroforesis Tris-Glicina-SDS (25 mM Tris pH = 8,3; 192 mM glicina; 0,1% SDS) a un voltaje constante de 115 V durante 90 minutos. Transcurrido ese tiempo, los geles se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinildieno (PVDF) durante 2 horas a 4°C, a un amperaje constante de 375 mA en tampón de transferencia Tris-Glicina-Metanol (25 mM Tris pH=8,3; 192 mM glicina; 20 % metanol; 0,01 % SDS). Tanto para la electroforesis como para la transferencia se utilizó el sistema

Mini-Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell System (Bio-Rad Hercules CA, USA).

Las membranas se bloquearon con BSA al 3% en PBS-T (PBS con 0,1 % Tween 20), durante 1 hora a Tª ambiente, en suave agitación. Tras varios lavados con PBS-T, las membranas se incubaron toda la noche a 4°C, en rotación, con los anticuerpos primarios, anti: **ERK1/2** (p44/42 ERK1/2 MAPK), **p-ERK1/2** (p-p44/42 ERK1/2 MAPK, Thr202/Tyr204), **p38** (1:500; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) o **p-p38** (1:500; Promega Corp. Madison, USA) de conejo. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS-T y las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa (1:2500; GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) durante 45 minutos a Tª ambiente. Se repitieron los lavados con PBS-T y finalmente las bandas fueron detectadas mediante incubación con el reactivo quimioluminiscente ECL™ *Prime Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

6.4 Análisis de los resultados

Las imágenes de quimioluminiscencia fueron capturadas mediante el *Autochemi™ System* (UVP Ltd., Cambridge, UK) y la intensidad de las bandas específicas fue cuantificada mediante el programa *LabWorks Image Acquisition and Analysis* (UVP Ltd., Cambridge, UK).

La MAPK ERK1/2 dio lugar a la aparición de dos bandas: una para ERK1 (p44) y otra para ERK2 (p42). Se cuantificó la intensidad de ambas bandas y, para el análisis de los resultados, se utilizó la media de las dos.

La intensidad de las bandas correspondientes a las MAPK fosforiladas (p-ERK1/2 y p-p38) se normalizó respecto a la intensidad de las bandas correspondientes a las MAPK (ERK1/2 y p38). El efecto de los diferentes tratamientos se expresó como porcentaje respecto al control.

7. ESTUDIOS FUNCIONALES DE REACTIVIDAD VASCULAR

Para estudiar la respuesta vasodilatadora de los AR β , se realizaron estudios funcionales de microbaños de órgano aislado (miografía) en A.M.R y de baño de órgano aislado en aorta.

7.1 Miografía

Para los experimentos funcionales se utilizaron anillos de las segundas y terceras ramas de las A.M.R., con una longitud de aproximadamente 2 mm y un diámetro de 250-350 μm . Como se ha dicho anteriormente, cuando el protocolo exigía la ausencia de endotelio, éste fue eliminado mecánicamente frotando el lumen del vaso con un fino alambre. Para cada experimento, se utilizó un solo segmento de A.M.R. por rata.

Los anillos de A.M.R. se montaron en los microbaños de un miógrafo (J. P. Tradig; Aarhus, Denmark) (Imagen II), con 5 ml de solución de Krebs termostatado a 37°C y burbujeado continuamente con carbógeno (95 % O₂ y 5 % CO₂), tal y como está descrito por Mulvany y Halpern (1977). A través del lumen de cada anillo de arteria, se introdujeron dos finos alambres que se colocaron paralelos entre si (Imagen IIC) y que fueron atados a dos soportes: uno conectado a un transductor isométrico y otro conectado a un mecanismo de desplazamiento para controlar el diámetro interno del vaso (Imagen IIB). Los cambios de tensión isométrica se registraron mediante un sistema informático de adquisición de datos (MacLab/8e, ADInstruments) en un ordenador Macintosh (Imagen IIA) utilizando como programa informático Chart v3.5.6 (ADInstruments).

Después de 30 minutos de estabilización, se procedió a la normalización de las preparaciones: a través del mecanismo de desplazamiento, los anillos fueron estirados en pasos progresivos de aproximadamente 10 μm , cada 2 minutos, y los valores de tensión de cada estiramiento se ajustaron a una curva exponencial. A través de un programa informático (Mulvany), se calculó la

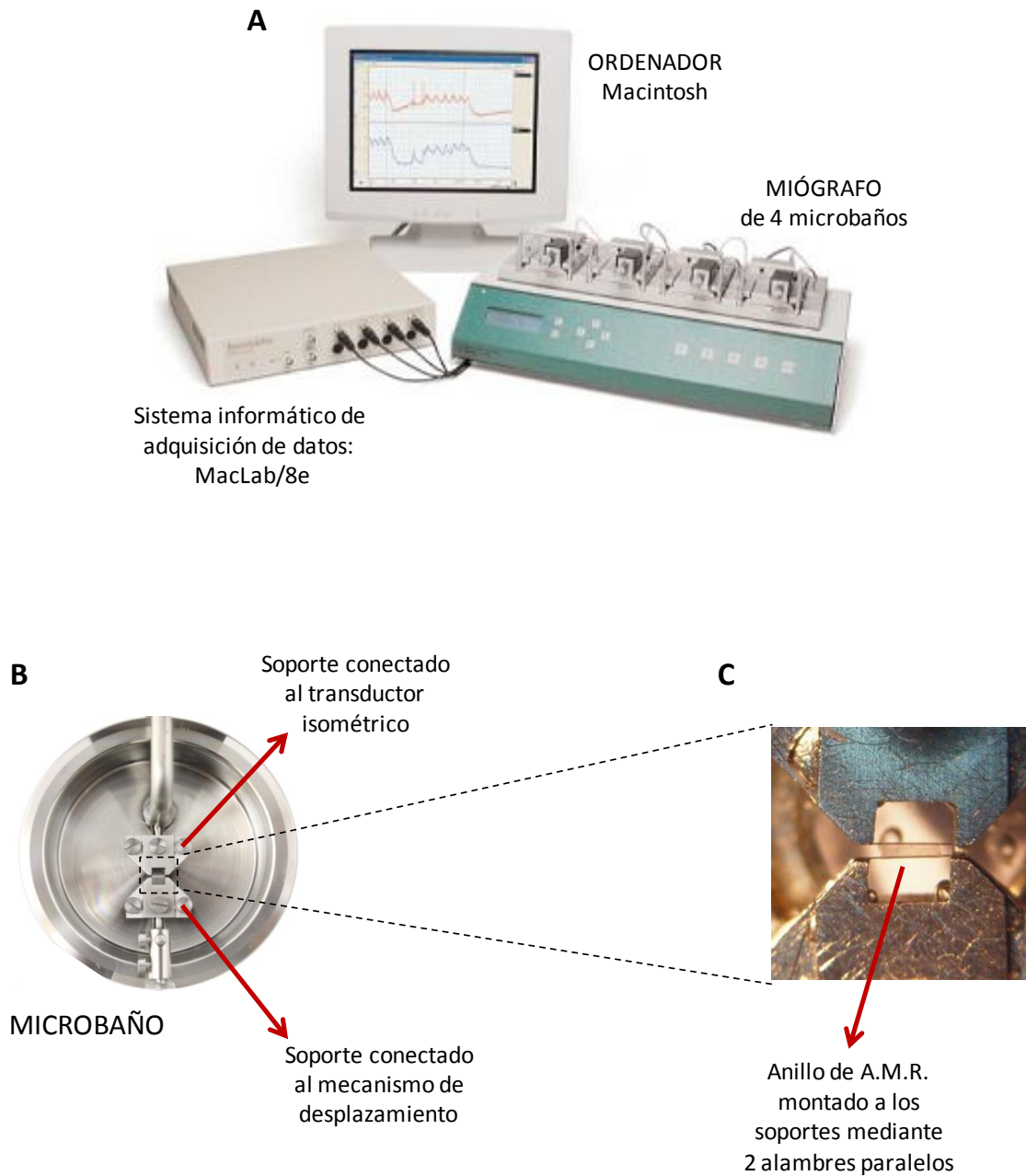


Imagen II:

- A:** Miógrafo de 4 microbaños, conectado al sistema MacLab/8e y al ordenador.
B: Microbaño con soportes para montar la arteria mesentérica de resistencia (A.M.R).
C: anillo de A.M.R. montado en el microbaño.

tensión inicial a la cual debería de ser sometido cada anillo de A.M.R., que es equivalente a 0,9 veces el diámetro estimado para una presión efectiva de 100 mmHg.

Después de la normalización, las preparaciones se dejaron reposar durante un segundo periodo de estabilización de 60 minutos, y a continuación se realizaron los diferentes protocolos experimentales (apartado 7.3).

7.2 Baño de órgano aislado

La arteria aorta recién extraída de la rata y limpiada de la grasa perivascular, se cortó en anillos de aproximadamente 4 mm de longitud. También en este caso, sí el protocolo exigía la ausencia de endotelio, éste fue eliminado mecánicamente introduciendo una fina cánula en la luz del vaso y frotando repetidas veces. Para cada experimento, se utilizó un solo anillo de aorta por rata.

A través del lumen de cada anillo de aorta, se introdujeron dos alambres de acero inoxidable paralelos entre sí: uno se fijó al baño y el otro se conectó a un transductor isométrico de fuerza-desplazamiento (Grass FT03), estando las preparaciones sumergidas en 10 ml de solución de Krebs termostataado a 37°C y burbujeadado continuamente con carbógeno (95 % O₂ y 5 % CO₂) (Imagen III). Los cambios de tensión isométrica se registraron en un ordenador mediante un sistema informático de adquisición de datos (PowerLab/8sp, ADInstruments), utilizando como programa informático Chart v5.0.2 (ADInstruments)

Antes de iniciar los protocolos experimentales (que se describen en el siguiente apartado 7.3), las preparaciones se sometieron a una tensión inicial de 1 g y se dejaron estabilizar durante un periodo de 60 minutos.

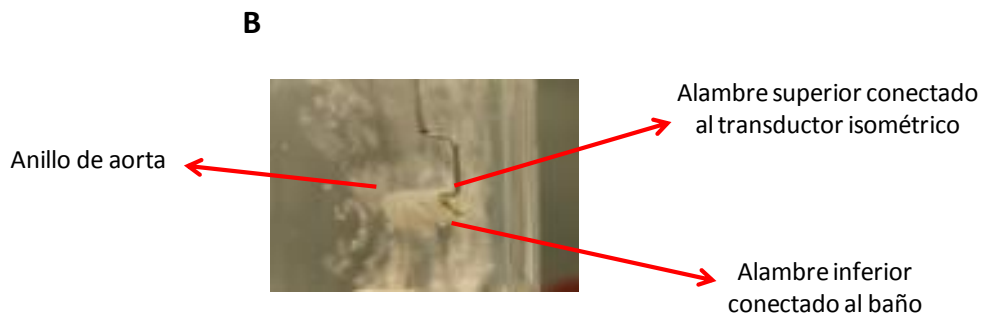
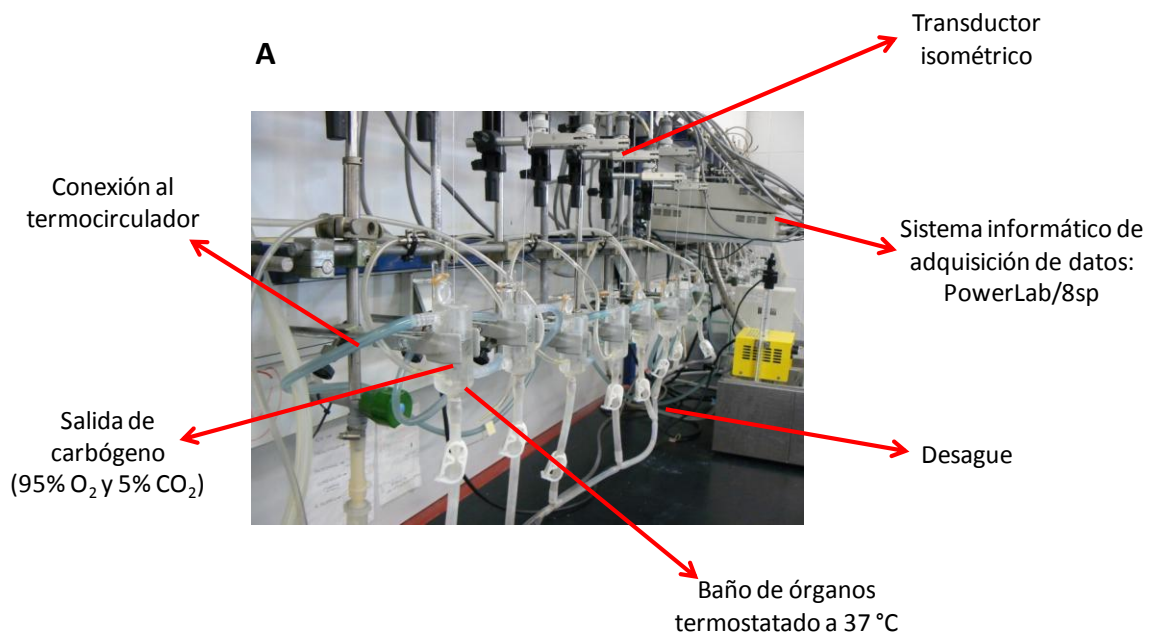


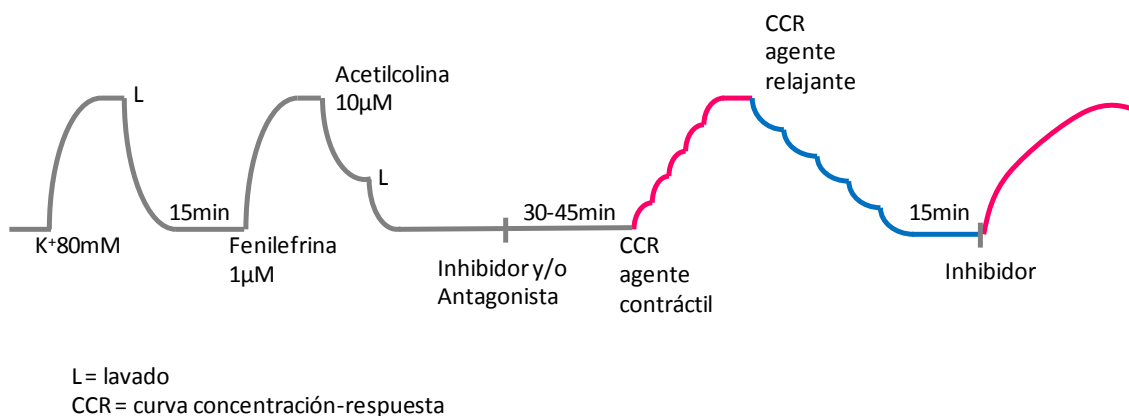
Imagen III:

A: Componentes del baño de órgano aislado.

B: Anillo de aorta montado en el baño.

7.3 Protocolos experimentales

Se detalla a continuación un Esquema general de los protocolos realizados en A.M.R. y aorta:



Al finalizar el periodo de estabilización de 60 minutos y para comprobar la capacidad contráctil de los vasos, éstos se contrajeron con una solución despolarizante de KCl 80 mM. La meseta de contracción se mantuvo durante 5 minutos en A.M.R. y 10 minutos en aorta, y su magnitud fue utilizada como contracción de referencia para los otros agentes contráctiles. La solución despolarizante de KCl tiene una composición similar a la solución de Krebs, realizándose una sustitución equimolar de NaCl por KCl a una concentración de 80 mM, y contiene: NaCl 42,75 mM, KCl 80 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 1,2 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, NaHCO₃ 25 mM y glucosa 11 mM.

Tras un periodo de lavado de 15 minutos, se comprobó la presencia o ausencia de endotelio mediante la adición de un agonista muscarínico (acetilcolina 10 µM) sobre la meseta de contracción inducida por un agonista α_1 (fenilefrina 1 µM). La ausencia de respuesta relajante a la acetilcolina (< 10 %) confirmó la destrucción total del endotelio (Furchgott y Zawadzki, 1980), mientras que una relajación mayor del 70 % indicó que el endotelio permanecía funcional.

Con el fin de determinar la influencia del endotelio y del NO en la respuesta de los fármacos utilizados, los experimentos se realizaron en diferentes condiciones experimentales:

- en anillos con endotelio, que abreviamos: **E (+)**;
- en anillos desprovistos de endotelio, que abreviamos: **E (-)**;
- en anillos con endotelio o sin endotelio, en presencia de L-NAME, que abreviamos: **E (+) L-NAME** y **E (-) L-NAME**, respectivamente.

L-NAME es un inhibidor de las tres isoformas de la NOS (eNOS, nNOS e iNOS). Se añadió a las preparaciones 30 minutos antes de los agentes contráctiles, a la concentración de 100 μ M.

Después de comprobar la integridad funcional del endotelio, las preparaciones se lavaron con solución fisiológica de Krebs hasta alcanzar la línea basal y se preincubaron en presencia de diferentes compuestos, inhibidores y/o antagonistas (según los Esquemas de los protocolos experimentales que se detallan en Resultados) durante 30-45 minutos.

Transcurrido este periodo y para obtener una meseta de contracción previa sobre la cual ensayar los agentes relajantes, se realizaron **curvas concentración-respuesta (CCR) de contracción de los agentes contráctiles: fenilefrina** (agonista selectivo de los AR α_1) y **U46619** (agonista del receptor del tromboxano A₂). Se añadieron concentraciones acumulativas crecientes de fenilefrina (de 30 nM a 10 μ M en A.M.R. y de 1 nM a 1 μ M en aorta) cada 5 minutos, y de U46619 (de 1 nM a 0,3 μ M en aorta) cada 10 minutos, hasta alcanzar el máximo de respuesta contráctil y producir una meseta de contracción estable. En los casos en que no era necesario construir las CCR de los agentes contráctiles, simplemente se añadió una concentración única de los fármacos, capaz de generar una meseta de contracción estable y duradera.

Seguidamente se construyeron las **CCR de relajación de los agonistas de los AR β** sobre las mesetas de contracción inducidas por fenilefrina (10 μ M en A.M.R. y 1 μ M en aorta) o U46619 (0,3 μ M en aorta). Para ello, se añadieron concentraciones acumulativas crecientes (de 0,1 nM a 100 μ M) de los distintos agonistas con un perfil de selectividad diferente por los subtipos de AR β : **isoprenalina** (no selectivo), **dobutamina** (β_1 selectivo), **salbutamol** (β_2 selectivo), **CL316243** y **SR58611A** (β_3 selectivos) (ver Esquema 4 de Resultados).

El intervalo de tiempo entre cada concentración ensayada fue de 5 minutos en A.M.R. y 8 minutos en aorta. Las vasodilataciones de los diversos compuestos fueron expresadas como porcentaje de relajación respecto a la contracción previa de fenilefrina o U46619.

En algunos experimentos, para aclarar el papel del NO en la vasodilatación de la arteria aorta, se realizaron **CCR de relajación de otros agentes relajantes: acetilcolina** (agonista de los receptores muscarínicos) y **nitroprusiato sódico** (donador de NO), adicionando concentraciones acumulativas crecientes (de 0,1 nM a 10 μ M y de 0,03 nM a 1 μ M, respectivamente), sobre la contracción inducida por fenilefrina 1 μ M (ver Esquema 3 de Resultados).

Para **determinar la potencia de los antagonistas de los AR β** , se realizaron CCR de relajación de los agonistas de los AR β (como se ha descrito anteriormente) en presencia y ausencia de los siguientes antagonistas con una selectividad diferente por los subtipos de AR β : **propranolol** (β_1/β_2 no selectivo), **CGP20712A** (β_1 selectivo), **ICI118551** (β_2 selectivo) y **SR59230A** (β_3 selectivo), que se añadieron al baño 30 minutos antes de la adición de fenilefrina (10 μ M en A.M.R. y 1 μ M en aorta) (ver Esquemas 5 de Resultados).

Para **determinar la participación de las vías de señalización AC/AMPC/PKA y/o NO/GCs/GMPc** en la acción vasodilatadora tras estimulación de los AR β , se realizaron CCR de relajación de isoprenalina en presencia o ausencia de los inhibidores de AC (**SQ22536** 10-100 μ M), PKA (**H89** 0,1 μ M) y GCs (**ODQ** 10 μ M), que se añadieron a las preparaciones y se dejaron incubar 30 minutos antes de las CCR de contracción de fenilefrina y se mantuvieron durante la realización de las CCR del agonista β (ver Esquema 1 de Resultados).

Para **determinar la participación de las vías de señalización de las MAPK (ERK1/2 y p38)** en la acción vasodilatadora de los AR β , se realizaron CCR de relajación de isoprenalina en presencia o ausencia de los inhibidores de ERK1/2 (**U0126** 10 μ M) y de p38 (**SB203580** 10 μ M). Éstos compuestos se prepararon en DMSO 0,1 %, se añadieron a los baños 45 minutos antes de construir las CCR de contracción de fenilefrina o U46619 y se mantuvieron durante la realización de

las CCR del agonista β (ver Esquema 7 de Resultados). El control se realizó en presencia de DMSO 0,1 %.

En algunos experimentos, se determinó **la capacidad de L-NAME 100 μ M de revertir el efecto relajante** de isoprenalina, acetilcolina y nitroprusiato sódico, y recuperar el tono contráctil previo. Para ello, el inhibidor se añadió transcurridos 15 minutos a partir de la finalización las CCR de relajación (ver Esquema 3A de Resultados). El incremento de tono (reversión) producido fue expresado como porcentaje respecto a la contracción inicial de K^+ 80 mM y fue comparado con la contracción previa de fenilefrina 1 μ M.

7.4 Análisis de los resultados

Las contracciones de fenilefrina y U46619 se expresaron como porcentaje respecto a la contracción inicial de K^+ 80 mM, mientras las relajaciones de los agonistas β y de los otros agentes relajantes se expresaron como porcentaje respecto a la contracción previa inducida por el agente contráctil. En todos los casos, las CCR de contracción o relajación fueron ajustadas por regresión no lineal mediante el programa GraphPad Prism versión 4.0 (San Diego, California), obteniendo los siguientes parámetros:

- **pCE₅₀** = logaritmo negativo de la EC₅₀ (concentración a la que el compuesto produce el 50 % del efecto máximo, sea contracción o relajación). En el caso de que el ajuste de la curva fue significativo para dos sitios de unión, se obtuvieron dos valores de potencia: **pEC₅₀(1)** y **pEC₅₀(2)**, para el sitio de unión de alta y de baja afinidad, respectivamente. En este caso también se calculó el porcentaje de receptores que hay en cada sitio.
- **E_{max}** = efecto máximo contráctil o relajante. Cuando se refirió a efecto contráctil, fue expresado como porcentaje respecto a la contracción inicial de K^+ 80 mM, a la cual se le atribuyó el valor de 100 %. Cuando se refirió a efecto relajante, fue expresado como porcentaje respecto a la contracción previa de fenilefrina o U46619, según el caso.

Para estudiar la potencia de los antagonistas β , se realizaron CCR de los agonistas β en presencia y en ausencia de dichos compuestos, y se calculó la afinidad de los antagonistas β que se expresó como pK_B (constante de disociación del antagonista), según el método de Furchgott (1972), mediante la ecuación: $pK_B = \log [B] + \log (CR - 1)$, donde: [B] es la concentración del antagonista empleada y CR es la razón de concentraciones.

CR = EC₅₀ en presencia de antagonista / EC₅₀ en ausencia de antagonista.

Con el objeto de determinar el carácter competitivo del antagonismo, en algunos experimentos se realizaron CCR de agonista en presencia y en ausencia de diferentes concentraciones de antagonista y se realizó el análisis de Schild (Schild, 1947). La recta definida por la ecuación: $\log (CR-1) = \log [B] - \log K_B$ se denomina recta de Schild, se calcula por regresión lineal mediante el programa GraphPad Prism y permite determinar la naturaleza competitiva del antagonismo, si la recta tiene una pendiente cercana a la unidad, y hacer una estimación de la constante de afinidad del antagonista por el receptor (pK_B) que, matemáticamente, es igual al logaritmo negativo de K_B y representa la intersección de la recta de Schild con el eje de abscisas.

Como puede observarse, el término pK_B coincide con el valor de $-\log [B]$ cuando CR es igual a 2. Esto corresponde al valor de pA_2 , un parámetro empírico definido como el logaritmo negativo de la concentración molar de antagonista que produce una relación de concentraciones de 2 para el agonista. El valor de pK_B se corresponde con el valor de pA_2 pero lo contrario solo es cierto cuando la regresión de Schild es lineal y tiene una pendiente igual a la unidad.

8. FÁRMACOS UTILIZADOS

Los siguientes fármacos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St Louis MO, USA): **acetilcolina**, **CGP20712A** ((±)-2-hidroxi-5-[2-[[2-hidroxi-3-[4-[1-metil-4-(trifluorometil)-1H-imidazol-2-il] phenoxi] propil] amino] etoxi]-benzamide metansulfonato), **CL316243** (disodio 5-[(2R)-2-[[2R)-2-(3-clorofenil)-2-

hidroxietil]amino] propil]-1,3-benzodioxolo-2,2-dicarboxolato hidrato), **dobutamina** hidrocloreto, (R)-(-) **fenilefrina** hidrocloreto, **forskolina**, **H89** (N-[2-(p-bromocinnamilamino) etil]-5-isoquinolin esulfonamida dihidrocloreto), **ICI118551** ((±)-1-[2,3-(dihidro-7-metil-1H-inden-4-il) oxo]-3-[(1-metiletil)amino]-2-butanol hidrocloreto), (±)-**isoprenalina** hemisulfato, **L-NAME** (N_ω-nitro-L-arginina metil éster), **nitroprusiato sódico**, **ODQ** (1H-[1,2,4] oxadiazolo[4,3-a] quinoxalin-1-one), (±)-**propranolol** hidrocloreto, **salbutamol** hemisulfato, **SB203580** (4-(4-fluorofenil) -2-(4-metilsulfinilfenil) -5-(4-piridil) -1H-imidazolo), **SQ22536** (9-(tetrahidro-2-furanil)-9H-purin-6-amina), **SR59230A** (3-(2-etilfenoxi)-1-[[[(1S)-1,2,3,4- tetraidronaft-1-il]amino]-(2S)-2-propanol oxalato), **U0126** (1,4-diamino-2,3-diciano-1,4-bis (o-aminofenilmercapto) butadieno monoetanolato), **U46619** (9,11,-dideoxi-11 α ,9 α -epoxi-metano-prostaglandina-F_{2 α}). **SR58611A** (N(2S)-7-carbetoximetoxi- 1,2,3,4- tetrahidronaft-2-il)- (2R)-2-hidroxi-2- (3-clorofenil) etanamino hidrocloreto) fue un regalo de Sanofi-Aventis (Bridgewater, N.J.).

Los fármacos se prepararon en agua destilada, excepto: isoprenalina que fue disuelta en ácido ascórbico 0,01 %; SR59230A en etilen glicol al 20 %; forskolina y U46619 en etanol absoluto; ODQ y SR58611A en etanol 20 %; U0126 y SB203580 en dimetil sulfóxido (DMSO) 0,1 %.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores se presentan como la media \pm el error estándar de la media (media \pm e.e.m.). El número (n) de experimentos se indica en las tablas y en los pies de figura.

El análisis estadístico de los datos se llevo a cabo por medio del Test de la t de Student o por medio del ANOVA seguido del Test de Dunnett, utilizando el programa GraphPad Prism versión 4.0 (San Diego, California). Las diferencias fueron consideradas significativas a partir de valores de $P < 0,05$.

RESULTADOS

IV

1. EXPRESIÓN GÉNICA Y LOCALIZACIÓN DE LOS AR β	87
2. PARTICIPACIÓN DE LOS SUBTIPOS DE AR β EN LA FORMACIÓN DE AMPc Y GMPc	91
3. INFLUENCIA DE LAS VÍAS DE AMPc Y GMPc EN LA VASODILATACIÓN MEDIADA POR LOS AR β	98
4. PARTICIPACIÓN DE LOS SUBTIPOS DE AR β EN LA VASODILATACIÓN	110
5. PAPEL DEL ENDOTELIO Y DEL NO EN LA VASODILATACIÓN MEDIADA POR LOS SUBTIPOS DE AR β	121
6. INFLUENCIA DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LAS MAPK (ERK1/2 y p38) EN LA VASODILATACIÓN MEDIADA POR LOS AR β EN AORTA	132

1. EXPRESIÓN GÉNICA Y LOCALIZACIÓN DE LOS AR β

El primer objetivo de la presente Tesis fue estudiar la expresión génica y proteica de los tres subtipos de AR β (β_1 , β_2 y β_3), en dos tejidos vasculares con diferentes características fisiológicas: un vaso de resistencia de pequeño calibre, como la A.M.R., y un vaso de conductancia de calibre mayor, como la aorta. Para ello, se cuantificaron los niveles de ARNm que codifican para los diferentes subtipos de AR β mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real, y se determinaron las proteínas de los mismos mediante experimentos de inmunofluorescencia, con la ayuda de un microscopio láser confocal.

La inmunofluorescencia nos permitió, además, estudiar la distribución celular de los tres subtipos de AR β , ya que gracias a esta técnica pudimos visualizar y diferenciar los diferentes tipos celulares en ambos tejidos: las células endoteliales (CE), las células musculares lisas (CML) y la capa adventicia (ADV). Las CE se encuentran en contacto directo con la luz del vaso, las CML se distribuyen en capas concéntricas a la luz del vaso y la ADV es la capa más externa, constituida por numerosos tipos celulares (como células nerviosas, fibroblastos, macrófagos, mastocitos y adipocitos). Los núcleos de las células fueron teñidos con el colorante Hoechst 33342 y visualizados en color azul, mientras los AR β fueron marcados con los anticuerpos específicos y visualizados mediante una señal fluorescente de color rojo.

Las láminas elásticas (LE) se visualizaron por emitir autofluorescencia en verde. En A.M.R., la línea serpenteante verde, localizada concéntricamente a luz del vaso, representa la LE interna (LEI), que separa el endotelio de las CML y la LE externa (LEE) separa las CML de la ADV (Figura 1B). La arteria aorta que, al contrario de la A.M.R., es un vaso elástico, además de la LEI y la LEE, presenta varias capas concéntricas de LE localizadas en la túnica media e intercaladas con las CML (Figura 2D).

Los resultados en A.M.R. y aorta muestran que existe expresión génica y proteica de los 3 subtipos de AR β , aunque en una proporción diferente según el vaso analizado. Se describen a continuación los resultados obtenidos en ambos vasos.

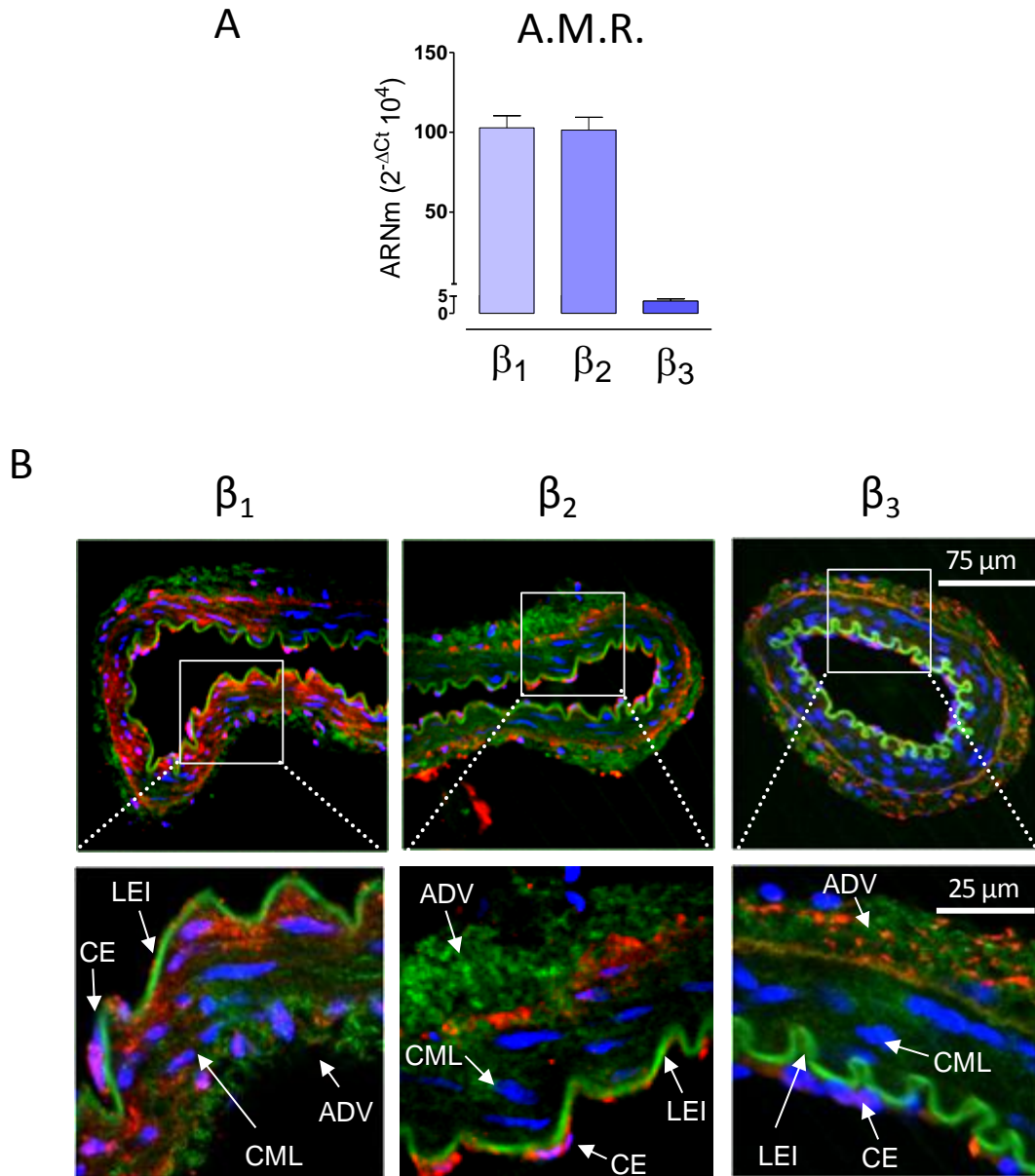


Figura 1. A) Niveles de expresión del ARNm de los tres subtipos de AR β en arteria mesentérica de resistencia (A.M.R.) entera con endotelio intacto. Los valores están normalizados usando *Gapdh* como gen de referencia y están expresados como la media de $2^{-\Delta Ct} 10^4 \pm e.e.m.$ de $n=3-5$ experimentos.

B) Imágenes representativas de inmunofluorescencia de secciones transversales de A.M.R.

ADV: capa adventicia; CE: célula endotelial; CML: célula muscular lisa vascular; LEI: lámina elástica interna (autofluorescencia en verde). Fluorescencia en azul: núcleos de las células teñidos con Hoechst 33342; fluorescencia en rojo: AR β_1 , β_2 y β_3 .

Las imágenes son representativas de al menos 3 experimentos.

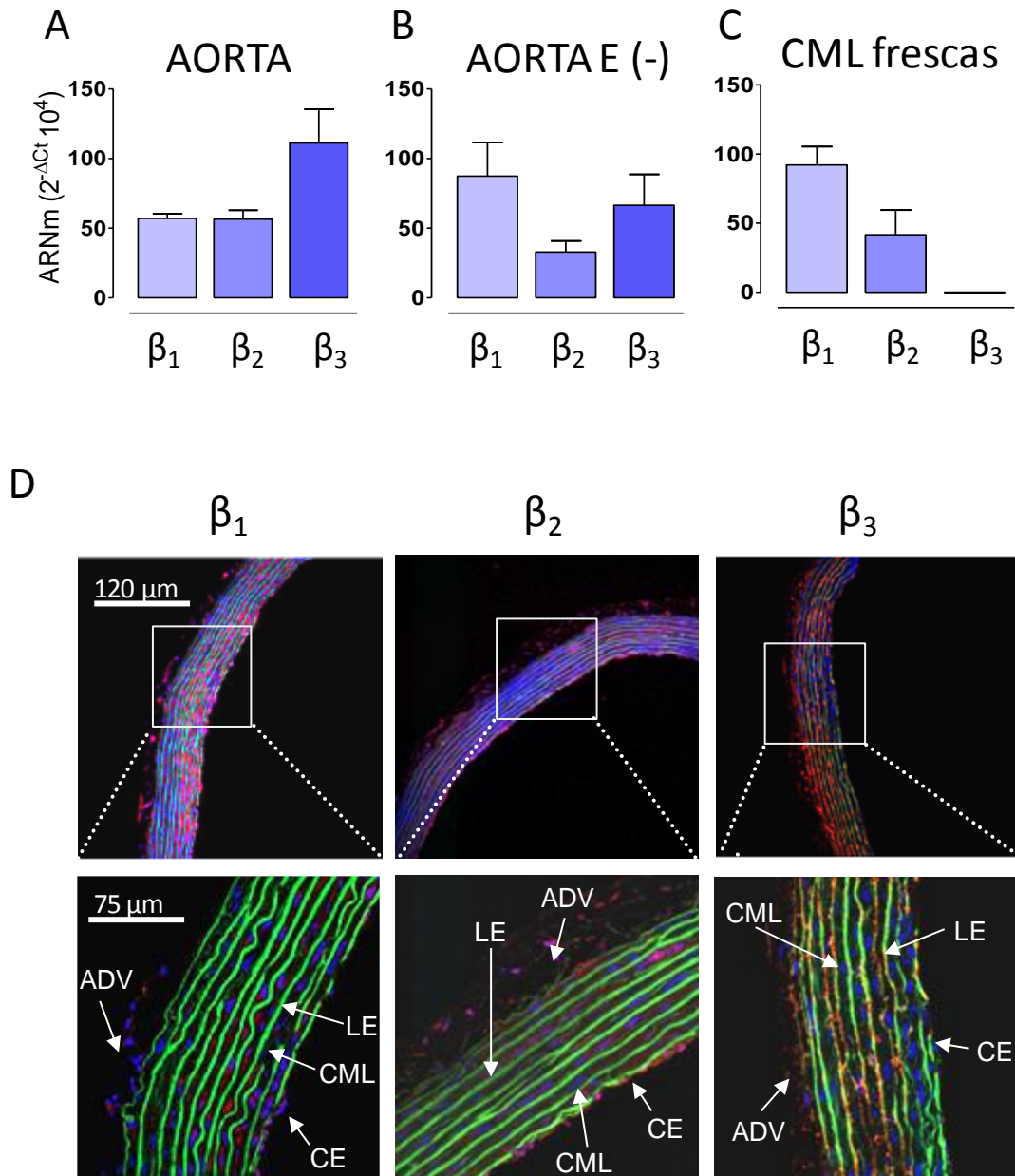


Figura 2. Niveles de expresión del ARNm de los tres subtipos de AR β en aorta entera con endotelio intacto (A); aorta sin endotelio (E (-)) (B) y células musculares lisas (CML) frescas recién aisladas de aorta (C). Los valores están normalizados usando *Gapdh* como gen de referencia y están expresados como la media de $2^{-\Delta Ct} 10^4 \pm e.e.m.$ de $n=3-5$ experimentos.

D) Imágenes representativas de inmunofluorescencia de secciones transversales de aorta.

ADV: capa adventicia; CE: célula endotelial; CML: célula muscular lisa vascular; LE: lámina elastica (autofluorescencia en verde). Fluorescencia en azul: núcleos de las células teñidos con Hoechst 33342; fluorescencia en rojo: AR β_1 , β_2 y β_3 .

Las imágenes son representativas de al menos 3 experimentos.

En **A.M.R.** se expresó el ARNm de los tres subtipos de AR β , aunque en proporciones diferentes: los subtipos β_1 y β_2 mostraron niveles de expresión similares y mayores que el AR β_3 , el cual se expresó pobremente (Figura 1A). Los experimentos de inmunofluorescencia mostraron que el subtipo β_1 se localizó en todas las capas vasculares: en las CML, las CE y la ADV, siendo la señal muy abundante e intensa en las CML. Por el contrario, los subtipos β_2 y β_3 se expresaron sólo en las CE y en la ADV, estando ausentes en las CML (Figura 1B).

En **aorta** también se expresó el ARNm de los tres subtipos de AR β , siendo en este caso la expresión de los AR β_1 y β_2 similar, y mayoritaria la del subtipo β_3 (Figura 2A). Las imágenes confocales mostraron que los AR β_1 tuvieron una localización parecida a la obtenida en la A.M.R., ya que se encontraron en todas las capas vasculares (muscular, endotelial y adventicia) y con una señal más intensa en la muscular. Los AR β_2 también se localizaron en las tres capas vasculares, pero más abundantemente en las CE. Sin embargo los AR β_3 presentaron una localización peculiar, ya que, además de en las CE y en la ADV, no parecían expresarse en las CML, sino a lo largo de las capas de elástina (LE) (Figura 2D).

Dada la particular localización de los AR β_3 en aorta, y para confirmar la distribución celular obtenida por inmunofluorescencia, decidimos comparar los niveles de ARNm de la aorta entera que presenta el endotelio intacto, con la aorta sin endotelio (E (-)) y las CML frescas recién aisladas de la aorta. Como muestra la Figura 2B, al eliminar el endotelio, la expresión del AR β_1 aumentó ligeramente, sin embargo la expresión de los AR β_2 y β_3 disminuyó. Aunque estos cambios no fueron significativos, sugieren una mayor presencia del subtipo β_1 en las CML y la presencia de los subtipos β_2 y β_3 en las CE. Finalmente, la determinación de la expresión génica en las CML frescas recién aisladas, confirmó la existencia de los subtipos β_1 y β_2 , pero excluyó la presencia del subtipo β_3 en este tipo celular, ya que su expresión desapareció por completo (Figura 2C), lo que concuerda con las imágenes de inmunofluorescencia.

2. PARTICIPACIÓN DE LOS SUBTIPOS DE AR β EN LA FORMACIÓN DE AMPc Y GMPc

Otro objetivo del presente trabajo fue estudiar los mecanismos de señalización por los cuales actúan los diferentes subtipos de AR β en los vasos: la vía clásica del AC/AMPc/PKA y la vía del NO/GCs/GMPc. Para ello, se determinó la acción de agonistas y antagonistas selectivos por los diferentes subtipos de AR β sobre la formación de los nucleótidos cíclicos AMPc y GMPc.

En estos experimentos, se consideró como control la acumulación basal de AMPc y GMPc que se produce sin la adición de ningún agonista, pero en presencia del IBMX (inhibidor no selectivo de las PDEs) con objeto de determinar niveles detectables de nucleótidos cíclicos. En A.M.R., la acumulación basal de AMPc resultó significativamente mayor que la de GMPc ($130,12 \pm 18,77$ vs. $66,32 \pm 10,50$ pmol/mg proteína, respectivamente, $P < 0,001$), mientras en aorta la acumulación basal de GMPc fue significativamente mayor que la de AMPc ($51,26 \pm 6,82$ vs. $35,63 \pm 3,54$ pmol/mg proteína, respectivamente, $P < 0,05$) (Figura 3, Tabla 1).

En unos estudios preliminares, realizados en aorta para poner a punto el procedimiento experimental, se analizaron las acciones de un activador directo de la AC (forskolina, $1 \mu\text{M}$) y de un activador directo de la GCs (nitroprusiato sódico, $1 \mu\text{M}$), como controles positivos de la acumulación de AMPc y GMPc respectivamente. En efecto, forskolina aumentó de forma significativa los niveles de AMPc (de $35,63 \pm 3,54$ a $290,40 \pm 60,80$ pmol/mg proteína, $P < 0,001$) y nitroprusiato sódico aumentó de forma significativa los niveles de GMPc (de $51,26 \pm 6,82$ a $370,80 \pm 18,10$ pmol/mg proteína, $P < 0,001$).

2.1 Acción de los agonistas

Validada la técnica experimental, se determinó la participación de los tres subtipos de AR β en la acumulación de AMPc y GMPc, utilizando los agonistas selectivos de los AR β : **isoprenalina** (no selectivo), **dobutamina** (β_1), **salbutamol** (β_2) y **CL316243** (β_3), a una concentración de 1 μ M. Todos los experimentos se realizaron en presencia de IBMX, como se describe en “*Material y Métodos*”. El agonista no selectivo isoprenalina aumentó significativamente los niveles de ambos nucleótidos respecto a los valores basales del control, pero con alguna diferencia en los dos tejidos: en A.M.R provocó un aumento mayor de AMPc que de GMPc (Figura 3A, Tabla 1), mientras en aorta provocó un aumento similar de los dos nucleótidos (Figura 3B, Tabla 1).

En **A.M.R.**, dobutamina y CL316243 aumentaron significativamente los niveles de AMPc, mientras salbutamol no tuvo ningún efecto (Figura 3A, Tabla 1). Con respecto a los niveles de GMPc, únicamente CL316243 fue capaz de producir una acumulación de este nucleótido (Figura 3A, Tabla 1). Estos resultados indican que la activación de los AR β_1 y β_3 aumenta la formación de AMPc, mientras solo el subtipo β_3 esta acoplado a la vía del GMPc. El subtipo β_2 parece no estar implicado en ninguna de estas dos vías de señalización.

En **aorta**, únicamente dobutamina produjo un aumento de los niveles de AMPc, sin embargo salbutamol y CL316243 no tuvieron efectos significativos (Figura 3B, Tabla 1). En el caso de GMPc, salbutamol y CL316243 aumentaron los niveles de este nucleótido pero, por el contrario, dobutamina no estimuló su producción (Figura 3B, Tabla 1). Estos resultados sugieren que en este vaso, el AR β_1 está acoplado a la formación de AMPc, mientras que los AR β_2 y β_3 promueven la formación de GMPc.

2.2 Acción de los antagonistas

Para confirmar la implicación de los diferentes subtipos de AR β en la formación de los nucleótidos cíclicos, se examinó la acción inhibitoria de los antagonistas selectivos de los AR β : **propranolol** (β_1/β_2), **CGP20712A** (β_1), **ICI118551** (β_2) y **SR59230A** (β_3), sobre la acumulación de AMPc y GMPc inducida por isoprenalina 1 μ M.

En **A.M.R.**, propranolol, CGP20712A y SR59230A, pero no ICI118551, inhibieron significativamente la formación de AMPc inducida por isoprenalina (Figura 4A, Tabla 2), confirmando el papel de los AR β_1 y β_3 pero no del β_2 en esta vía de señalización. Solo SR59230A ocasionó una inhibición significativa de la formación de GMPc, anulando completamente el aumento de GMPc inducido por isoprenalina (Figura 4A, Tabla 2) y corroborando que el AR β_3 está implicado en esta vía de señalización.

En **aorta**, la acumulación de AMPc inducida por isoprenalina fue inhibida por propranolol y completamente bloqueada por CGP20712A, hasta llevar la respuesta a los valores basales; sin embargo ICI118551 y SR59230A no tuvieron ningún efecto (Figura 4B, Tabla 2). La acumulación de GMPc fue inhibida por ICI118551 y fue anulada por completo por propranolol y SR59230A, sin embargo CGP20712A no produjo ninguna modificación significativa (Figura 4A, Tabla 2). Estos resultados confirman el acoplamiento del AR β_1 a la vía del AMPc, y de los AR β_2 y β_3 a la vía del GMPc.

Además, se ensayó el efecto del inhibidor de la AC, **SQ22536**, que bloqueó significativamente el aumento de AMPc inducido por isoprenalina tanto en A.M.R. (Figura 4A, Tabla 2) como en aorta (Figura 4B, Tabla 2), comprobando que la formación de AMPc que detectamos estaba mediada por la enzima AC. Asimismo, el inhibidor de NOS, **L-NAME**, anuló por completo el aumento de GMPc inducido por isoprenalina, tanto en A.M.R. (Figura 4A, Tabla 2) como en aorta (Figura 4B, Tabla 2), evidenciando que la formación de GMPc que obtuvimos dependía totalmente del NO.

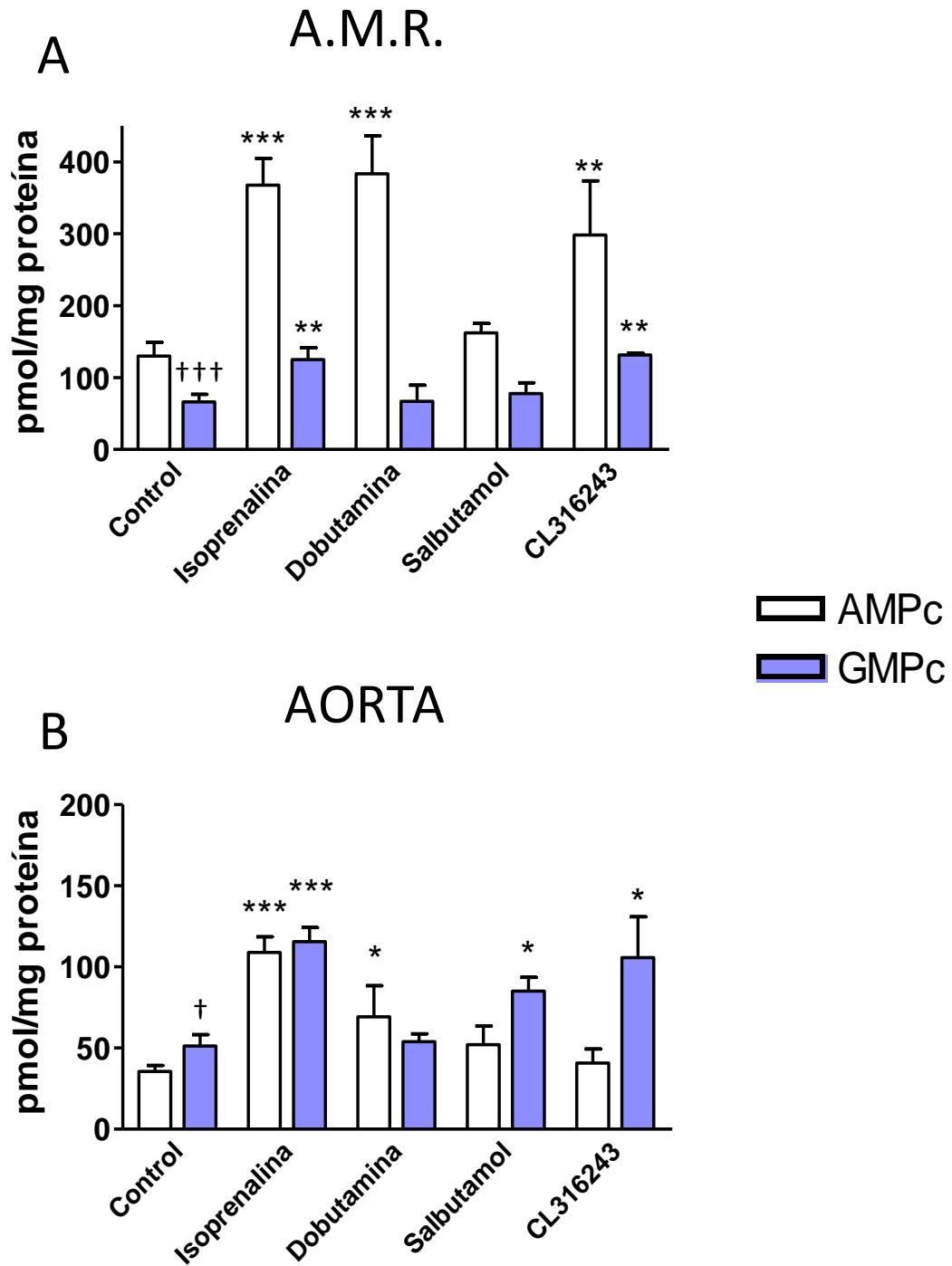


Figura 3. Acumulación de AMPc y GMPc inducida por los agonistas de los AR β ($1 \mu\text{M}$), en A.M.R. (A) y aorta (B).

Los valores son expresados en pmol/mg proteína.

Test t de Student: † $P < 0,05$; ††† $P < 0,001$ vs. AMPc;

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs. control.

Tabla 1. Acumulación de AMPc y GMPc inducida por los agonistas de los AR β ($1 \mu\text{M}$), en A.M.R. y aorta.

A.M.R.					
	AMPc		GMPc		
	pmol/mg proteína	n	pmol/mg proteína	n	
Control	130,12±18,77	15	66,32±10,50†††	15	
Isoprenalina	367,71±37,10***	10	124,91±16,55**	10	
Dobutamina	383,53±52,64***	3	66,98±22,59	3	
Salbutamol	162,01±13,19	3	77,68±15,24	3	
CL316243	298,24±75,43**	3	131,25±2,68**	3	
AORTA					
	AMPc		GMPc		
	pmol/mg proteína	n	pmol/mg proteína	n	
Control	35,63±3,54	25	51,26±6,82†	12	
Isoprenalina	108,99±9,59***	22	115,53±8,74***	11	
Dobutamina	69,20±19,19*	3	53,91±4,76	4	
Salbutamol	52,16±11,37	3	85,12±8,38*	4	
CL316243	40,74±8,63	7	105,69±25,30*	5	

Los valores son expresados como pmol/mg de proteína y representan la media \pm e.e.m. de n experimentos.

Test t de Student: † $P < 0,05$; ††† $P < 0,001$ vs. AMPc;

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs. control.

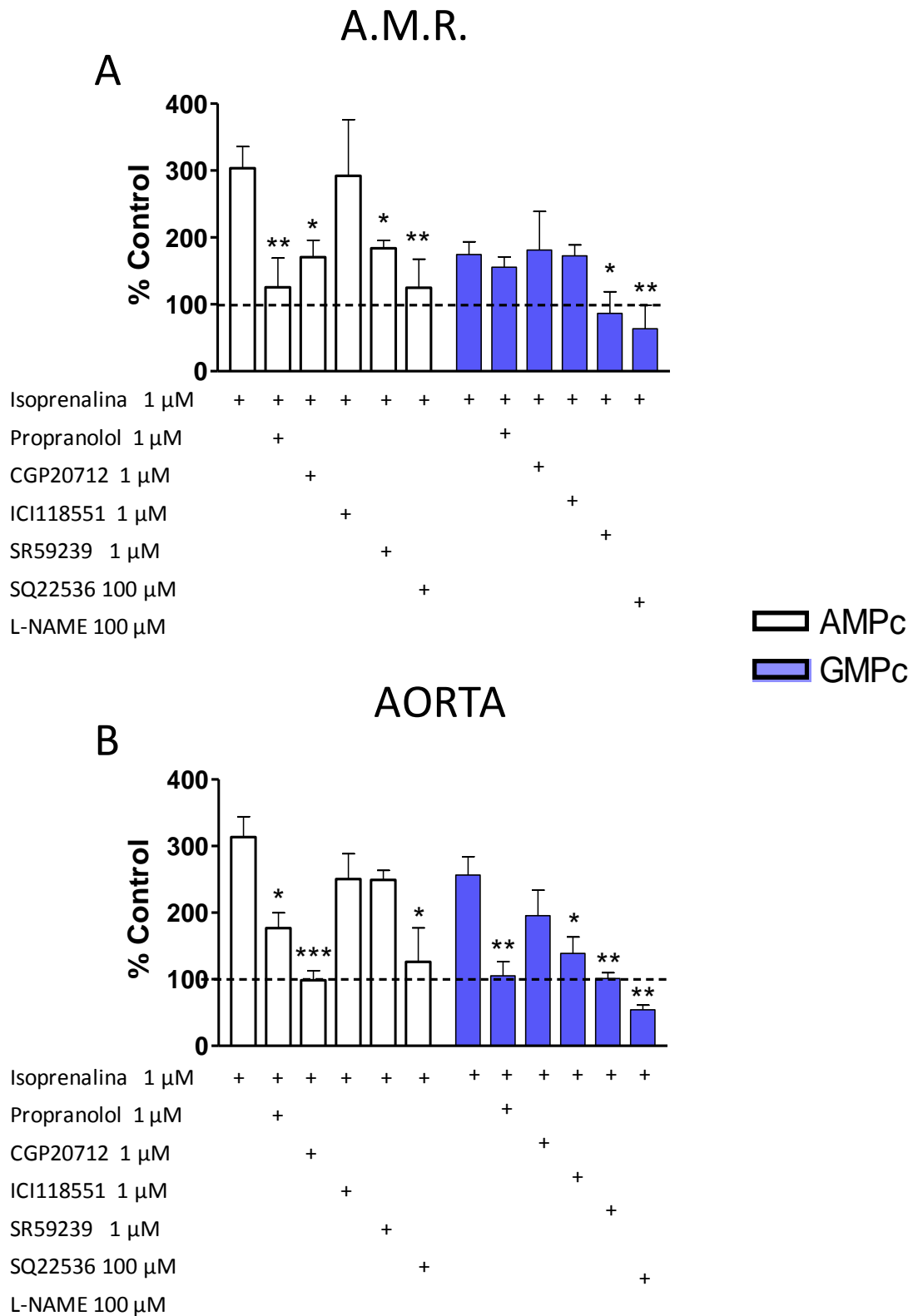


Figura 4. Acción de los antagonistas de los AR β y de los inhibidores SQ22536 y L-NAME sobre el aumento de AMPc y GMPc inducido por isoprenalina 1 μ M, en A.M.R. (A) y aorta (B).

Los valores son expresados en % respecto a la acumulación basal del control.

Test t de Student: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs. isoprenalina.

Tabla 2. Acción de los antagonistas de los AR β y de los inhibidores SQ22536 y L-NAME sobre el aumento de AMPc y GMPc inducido por isoprenalina 1 μ M, en A.M.R. y aorta.

	A.M.R.			
	AMPc		GMPc	
	%	n	%	n
Isoprenalina	303,66 \pm 32,31	8	174,63 \pm 19,01	8
Isoprenalina + Propranolol 1 μ M	125,39 \pm 43,77**	4	155,65 \pm 15,29	3
Isoprenalina + CGP20712A 1 μ M	170,51 \pm 25,27*	6	181,18 \pm 57,55	4
Isoprenalina + ICI118551 1 μ M	292,06 \pm 83,97	4	172,45 \pm 16,39	5
Isoprenalina + SR59230A 1 μ M	183,87 \pm 11,65*	4	86,53 \pm 32,22*	5
Isoprenalina + SQ22536 100 μ M	124,90 \pm 42,50**	3	-	-
Isoprenalina + L-NAME 100 μ M	-	-	63,64 \pm 35,30**	3
	AORTA			
	AMPc		GMPc	
	%	n	%	n
Isoprenalina	313,66 \pm 30,47	23	256,43 \pm 27,82	13
Isoprenalina + Propranolol 1 μ M	176,78 \pm 22,99*	6	105,13 \pm 21,38**	7
Isoprenalina + CGP20712A 1 μ M	98,37 \pm 14,40***	8	195,50 \pm 38,35	6
Isoprenalina + ICI118551 1 μ M	250,58 \pm 37,92	9	138,99 \pm 24,64*	7
Isoprenalina + SR59230A 1 μ M	249,27 \pm 14,27	3	101,09 \pm 8,61**	4
Isoprenalina + SQ22536 100 μ M	126,00 \pm 51,30*	5	-	-
Isoprenalina + L-NAME 100 μ M	-	-	54,05 \pm 7,14**	4

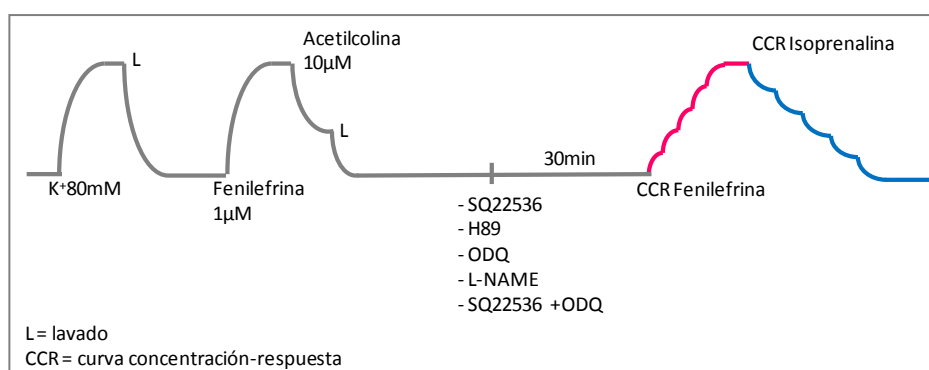
Los valores son expresados como % respecto al valor basal del control y representan la media \pm e.e.m. de n experimentos.

Test t de Student: * P < 0,05; **P < 0,01; *** P < 0,001 vs. isoprenalina.

3. INFLUENCIA DE LAS VÍAS DE AMPc Y GMPc EN LA VASODILATACIÓN MEDIADA POR LOS AR β

Con el fin de determinar la influencia de las vías de señalización de AC/AMPc/PKA y NO/GCs/GMPc en la relajación mediada por los AR β en A.M.R. y en aorta, se realizaron estudios funcionales de relajación de isoprenalina, en las arterias precontraídas con fenilefrina, en presencia o ausencia de los inhibidores selectivos de la AC (**SQ22536**), de la PKA dependiente del AMPc (**H89**), de la NOS (**L-NAME**) y de la GCs (**ODQ**).

Las preparaciones se incubaron con dichos inhibidores durante 30 minutos, transcurridos los cuales se construyeron CCR de contracción de fenilefrina, hasta alcanzar el máximo efecto contráctil (10 μ M en A.M.R. y 1 μ M en aorta), y sobre la meseta contráctil estable se construyeron las CCR de relajación de isoprenalina, tal y como se indica en el siguiente Esquema:



Esquema 1. CCR de contracción de fenilefrina y CCR de relajación de isoprenalina en presencia o ausencia de los inhibidores selectivos de la AC (SQ22536, 10-100 μ M), de la PKA dependiente del AMPc (H89, 0,1 μ M), de la GCs (ODQ, 10 μ M) y de la NOS (L-NAME, 100 μ M). En la parte inicial del protocolo, como se describe en "Material y Métodos", se comprueba la capacidad contráctil de los vasos con la solución despolarizante de K⁺ 80 mM y se verifica la presencia del endotelio mediante la relajación obtenida al adicionar acetilcolina sobre la meseta de contracción de fenilefrina. Esta parte es común en todos los protocolos de reactividad vascular.

En **A.M.R.**, la adición de concentraciones acumulativas crecientes de fenilefrina produjo una respuesta contráctil concentración-dependiente, como se muestra en la Figura 5A. Ninguno de los inhibidores utilizados afectó a las CCR de contracción de fenilefrina (Figura 5A), no produciéndose cambios significativos en el efecto máximo (E_{max}) ni en la potencia contráctil (pEC_{50}) (Tabla 3).

La adición de concentraciones acumulativas crecientes de isoprenalina produjo una respuesta vasodilatadora concentración-dependiente (Figuras 5B y 5C) cuyos parámetros efecto máximo (E_{max}) y valores de potencia (pEC_{50}) se muestran en la Tabla 3. La CCR de isoprenalina fue desplazada de manera significativa a la derecha por SQ22536 10 μ M (Figura 5B, Tabla 3) pero no por L-NAME 100 μ M o ODQ 10 μ M (Figura 5C, Tabla 3). La adición conjunta de ambos inhibidores (SQ22536 y ODQ) no tuvo un efecto adicional al producido por SQ22536 (Figura 5B, Tabla 3). Estos resultados evidencian la participación de la vía del AC/AMPC/PKA en la vasodilatación mediada por los AR β en A.M.R., y excluyen la vía del NO/GCs/GMPc.

En **aorta**, al igual que en A.M.R., la adición de concentraciones acumulativas crecientes de fenilefrina produjo una respuesta contráctil concentración-dependiente (Figura 6A), pero con una potencia significativamente mayor a la obtenida en A.M.R. (Tabla 3). La respuesta contráctil a la fenilefrina no fue modificada por SQ22536 y H89, sin embargo fue potenciada por L-NAME y ODQ, produciéndose un aumento significativo tanto del E_{max} como de la pEC_{50} (Figura 6A, Tabla 3). Estos resultados indican que en aorta se produce una liberación basal de NO que contrarresta en parte la acción vasoconstrictora del agonista α_1 .

La isoprenalina produjo una respuesta vasodilatadora concentración-dependiente (Figuras 6B y 6C), con un efecto máximo y una potencia similares a los obtenidos en A.M.R. (Tabla 3). Sin embargo, al analizar el efecto de los inhibidores en aorta se obtuvieron resultados opuestos a los descritos en la A.M.R. Así, la CCR de relajación de isoprenalina no fue modificada por SQ22536 10 μ M, ni incluso a una concentración más alta de 100 μ M. Tampoco la

Resultados

preincubación con H89 0,1 μM tuvo ningún efecto sobre la relajación de isoprenalina (Figura 6B, Tabla 3). Sin embargo, L-NAME 100 μM y ODQ 10 μM inhibieron las CCR de relajación produciendo una disminución significativa del efecto máximo y de la potencia de isoprenalina (Figura 6C, Tabla 3). La adición

A.M.R.

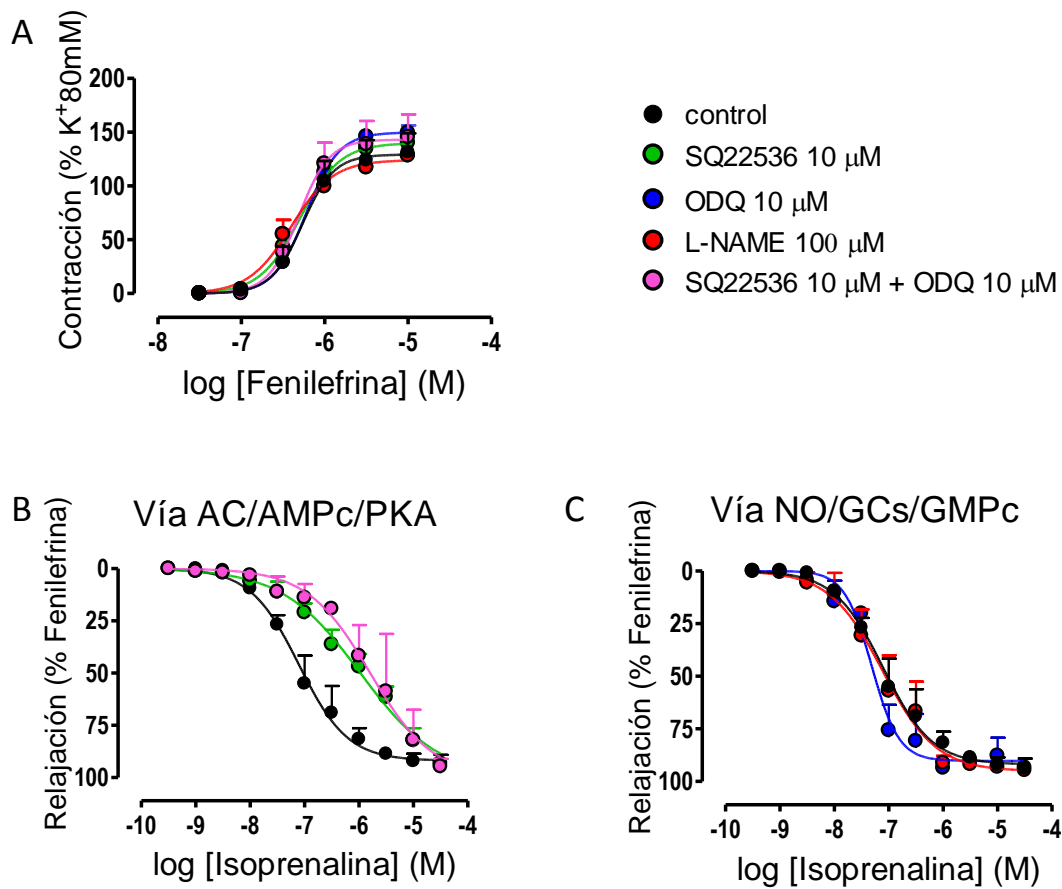


Figura 5. Efecto de los inhibidores de la AC (SQ22536), la GCs (ODQ) y la NOS (L-NAME) sobre las curvas de contracción de fenilefrina (A) y de relajación de isoprenalina (B, C) en A.M.R. con endotelio intacto.

conjunta de SQ22536 y ODQ no tuvo un efecto adicional al producido por ODQ (Figura 6C, Tabla 3). Estos resultados indican que en el caso de la aorta, la vasodilatación mediada por los AR β se produce a través de la vía del NO/GCs/GMPc, quedando excluida la vía del AC/AMPC/PKA.

AORTA

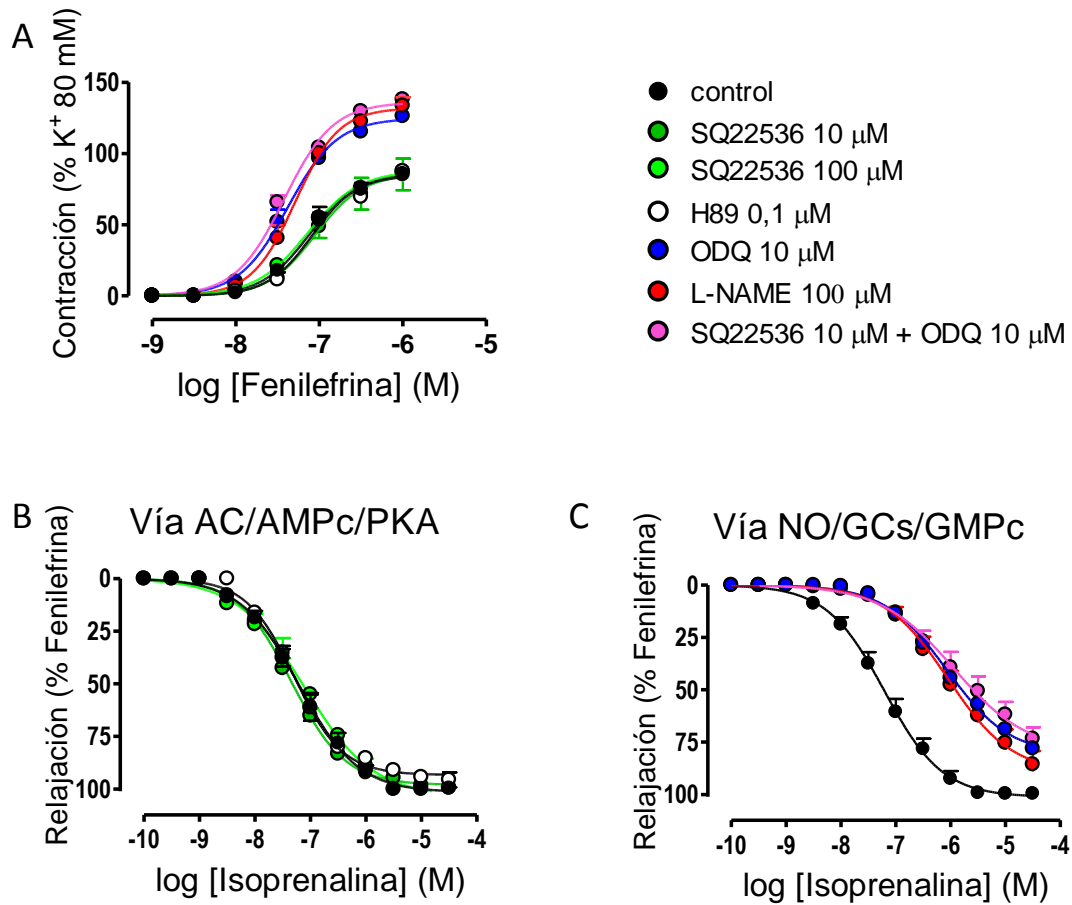


Figura 6. Efecto de los inhibidores de la AC (SQ22536), la PKA (H89), la GCs (ODQ) y la NOS (L-NAME) sobre las curvas de contracción de fenilefrina (A) y de relajación de isoprenalina (B, C) en aorta con endotelio intacto.

Resultados

Tabla 3. Parámetros obtenidos de las curvas de contracción de fenilefrina y de las curvas de relajación de isoprenalina, en presencia de los inhibidores SQ22536, H89, ODQ y L-NAME, en A.M.R. y aorta con endotelio intacto.

A.M.R.					
	Fenilefrina		Isoprenalina		
	pEC ₅₀	E _{max} (%)	pEC ₅₀	E _{max} (%)	n
Control	6,27±0,11	131,6±17,5	7,10±0,09	93,9±4,7	5
SQ22536 10 µM	6,29±0,06	140,1±8,5	5,99±0,09**	93,3±0,3	6
ODQ 10 µM	6,22±0,04	149,6±6,8	7,31±0,08	93,5±2,9	6
L-NAME 100 µM	6,40±0,06	128,4±5,6	7,11±0,14	94,8±1,4	7
SQ22536 + ODQ 10 µM	6,31±0,10	145,5±21,1	5,80±0,29**	94,8±3,6	3
AORTA					
	Fenilefrina		Isoprenalina		
	pEC ₅₀	E _{max} (%)	pEC ₅₀	E _{max} (%)	n
Control	7,12±0,04†††	85,9±1,0†	7,17±0,07	99,5±0,3	6
SQ22536 10 µM	7,05±0,11	85,3±11,1	7,35±0,04	99,3±0,5	4
SQ22536 100 µM	7,14±0,04	87,4±2,6	7,10±0,06	99,5±0,5	4
H89 0,1 µM	7,09±0,09	87,6±3,4	7,25±0,04	97,9±1,9	5
ODQ 10 µM	7,38±0,05**	126,2±4,6***	6,07±0,06***	78,1±2,7***	6
L-NAME 100 µM	7,29±0,05*	133,5±6,1***	6,04±0,15***	85,6±6,3*	6
SQ22536 + ODQ 10 µM	7,42±0,09*	137,9±2,0***	5,94±0,21***	73,4±5,4***	5

Los valores representan la media ± e.e.m. de n experimentos.

pEC₅₀ = -log [fenilefrina] e [isoprenalina] (M) necesaria para producir el 50 % de E_{max}.

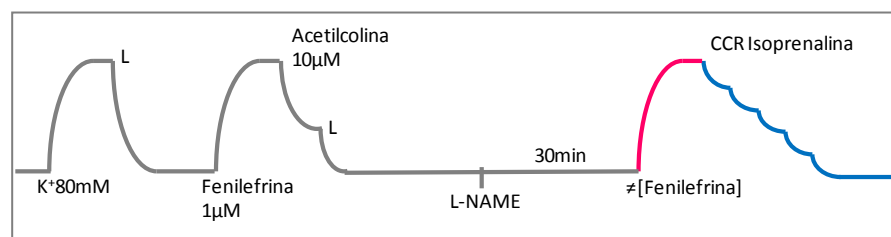
E_{max} = efecto máximo contráctil de fenilefrina, expresado como % respecto a la contracción previa de K⁺ 80 mM, o efecto máximo relajante de isoprenalina, expresado como % respecto a la contracción previa de fenilefrina.

Test t de Student: † P < 0,05; ††† P < 0,001 vs. A.M.R.;

* P < 0,05; **P < 0,01; *** P < 0,001 vs. control.

Participación del NO en la vasodilatación mediada por los AR β en aorta: posible influencia del nivel de precontracción

Los resultados anteriores ponen de manifiesto la contribución del NO en la relajación inducida por los AR β en aorta pero no en A.M.R. de rata. Sin embargo, como se ha descrito en la Revisión Bibliográfica, diferentes grupos describen resultados opuestos en cuanto a la posible intervención del NO en aorta de rata (Moncada y cols., 1991b; Gray y Marshall, 1992; Eckly y cols., 1994; Satake y cols., 1996; Brawley y cols., 2000a; Van der Zyp y cols., 2000; Ferro y cols., 2004). La discrepancia entre estos estudios puede estar relacionada con las diferencias en las condiciones experimentales, como el nivel de pre-contracción y/o el agente utilizado para obtener el tono contráctil inicial. En la presente Tesis se analizan estos aspectos en aorta de rata, donde se obtuvo un mayor nivel de precontracción de fenilefrina cuando los experimentos se realizaron en presencia de L-NAME o ODQ (Figura 6A, Tabla 3). Este mayor tono inicial, y no el bloqueo de la vía NO/GCs/cGMP, podría ser el responsable de la menor respuesta relajante de la isoprenalina (Figura 6C, Tabla 3). Para aclarar esta cuestión, se analizó la acción relajante de isoprenalina frente a diferentes niveles de precontracción, utilizando distintas concentraciones de fenilefrina en presencia de L-NAME, con la finalidad de obtener un tono inicial similar en presencia o ausencia de este inhibidor, según el siguiente Esquema:



Esquema 2. CCR de relajación de isoprenalina frente a la contracción obtenida utilizando diferentes concentraciones de fenilefrina (0,1; 0,3; 1; 3 μ M), en presencia de L-NAME 100 μ M.

AORTA

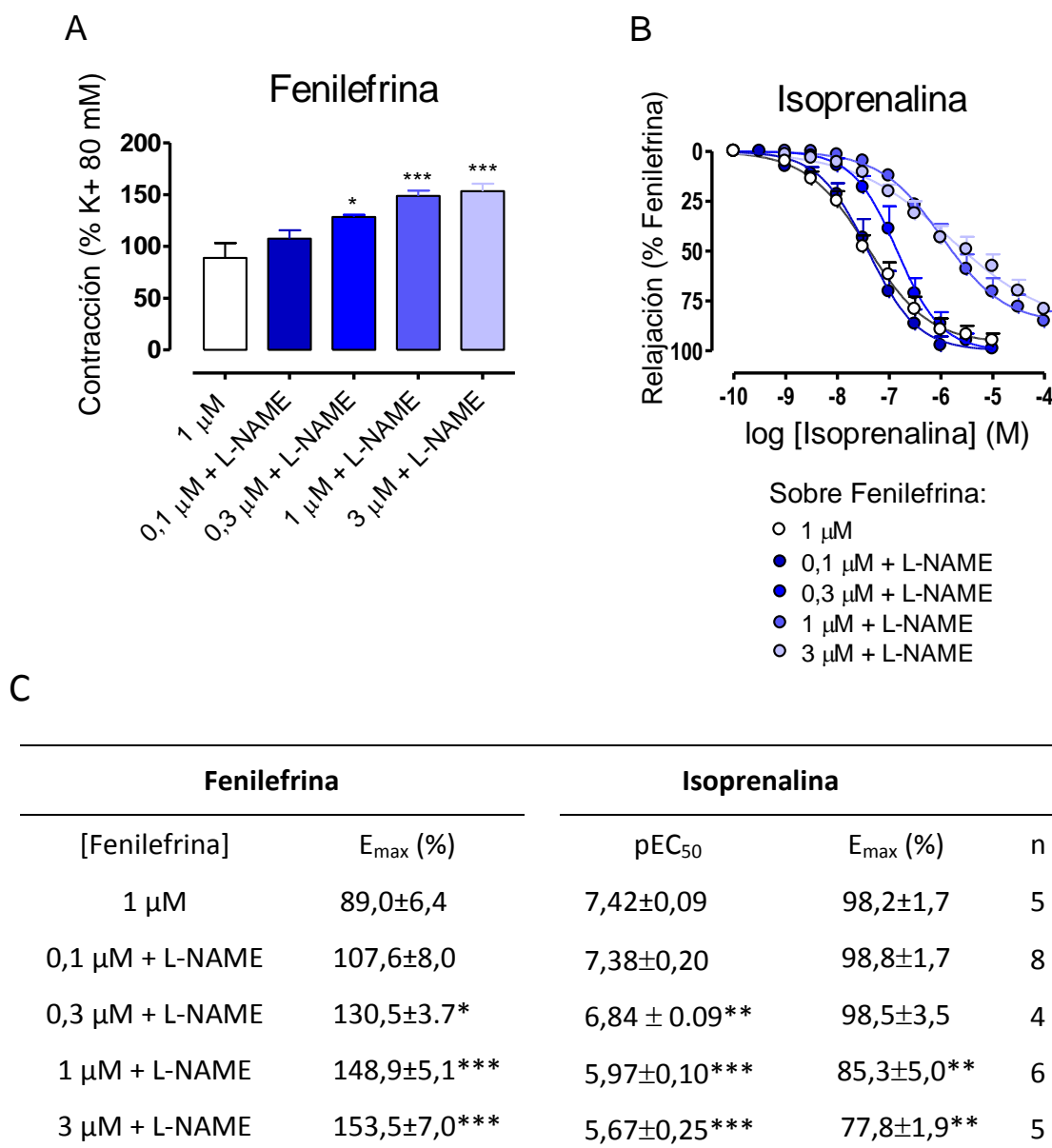


Figura 7. Efecto contráctil de diferentes concentraciones de fenilefrina en ausencia o presencia de L-NAME 100 μM (A) y correspondientes curvas concentración-respuesta de relajación de isoprenalina (B) en aorta con endotelio intacto. Parámetros de las contracciones de fenilefrina y de las relajaciones de isoprenalina (C).

Los valores representan la media ± e.e.m de n experimentos.

$pEC_{50} = -\log [\text{isoprenalina}] \text{ (M)}$ necesaria para producir el 50 % de E_{max} .

E_{max} = efecto máximo contráctil de fenilefrina, expresado como % respecto a la contracción previa de K^+ 80 mM, o efecto máximo relajante de isoprenalina expresado como % respecto a la contracción previa de fenilefrina.

Test t de Student: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs. fenilefrina 1 μM.

La fenilefrina en presencia de L-NAME dio lugar a un efecto contráctil concentración dependiente que alcanzó su máximo a la concentración de 1 μM del agonista (Figuras 7A y 7C). Como se esperaba, la preincubación con L-NAME aumentó la respuesta contráctil a la fenilefrina y así, en presencia de L-NAME, la contracción inducida por fenilefrina 1 μM fue significativamente mayor a la obtenida en ausencia de L-NAME ($148,9 \pm 5,1$ vs. $89,0 \pm 6,4$ % K^+ 80 mM, respectivamente), confirmando que en aorta la acción contráctil de fenilefrina está modulada por la liberación de NO. Un tono contráctil de magnitud similar al obtenido con fenilefrina 1 μM en ausencia de L-NAME se consiguió con fenilefrina 0,1 μM en presencia de L-NAME (Figuras 7A y 7C).

Los parámetros (potencia y el efecto máximo relajante) de isoprenalina obtenidos sobre las diferentes concentraciones de fenilefrina en presencia de L-NAME se compararon con los valores obtenidos sobre fenilefrina 1 μM en ausencia de L-NAME (Figura 7).

La relajación inducida por isoprenalina disminuyó al aumentar el tono pre-contráctil, observándose un descenso significativo en la pEC_{50} proporcional al aumento en el tono pre-contráctil (Figuras 7B y 7C). Si comparamos las potencias relajantes frente a la misma concentración de fenilefrina (1 μM), la isoprenalina mostró una menor potencia en presencia de L-NAME ($\text{pEC}_{50} = 5,97 \pm 0,10$) que en su ausencia ($\text{pEC}_{50} = 7,42 \pm 0,09$), lo cual indicaría, como ya se ha comentado, que la respuesta de isoprenalina depende de la formación de NO.

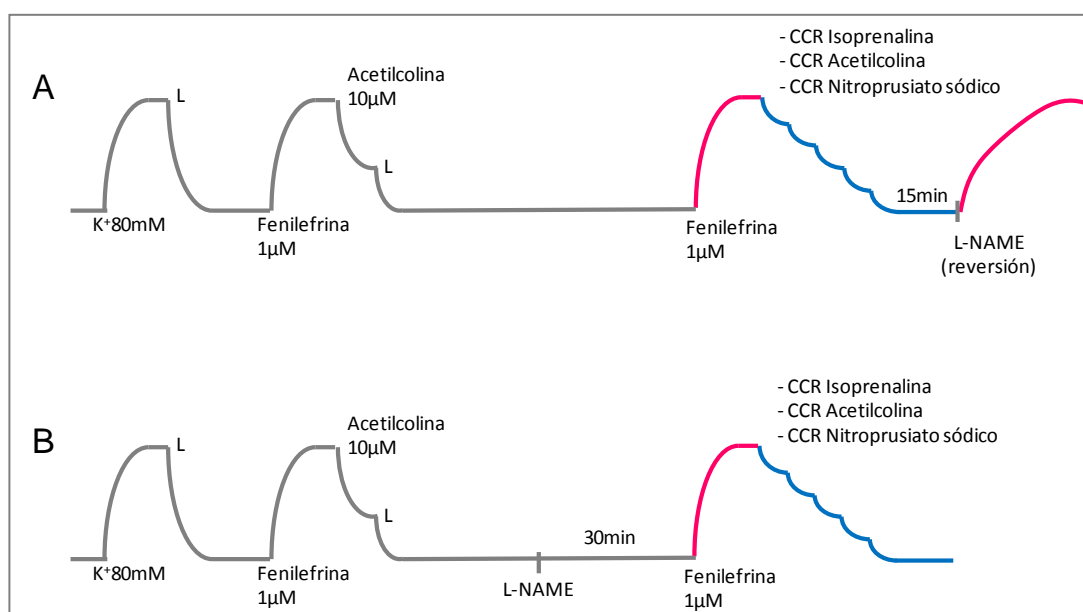
Sin embargo, la relajación inducida por isoprenalina fue similar en presencia y ausencia de L-NAME cuando el tono contráctil inicial se igualó, ajustando la concentración de fenilefrina (fenilefrina 1 μM vs. fenilefrina 0,1 μM + L-NAME), lo que indicaría que la respuesta de isoprenalina no depende del NO. Por lo tanto, dependiendo de cómo se realicen los experimentos, se pueden postular conclusiones opuestas respecto a la influencia del NO sobre la relajación β -adrenérgica inducida por isoprenalina. Esto explicaría los resultados divergentes obtenidos en los diferentes estudios de la literatura.

Para aclarar definitivamente esta cuestión, realizamos otro protocolo experimental en el que determinamos la capacidad de L-NAME de revertir el

Resultados

efecto relajante de isoprenalina en aorta, adicionándolo al finalizar la CCR de relajación de isoprenalina. Comparamos también la capacidad del L-NAME de revertir el efecto de otros agentes que relajan a través del NO endógenamente liberado por el endotelio (acetilcolina), o el NO añadido de forma exógena (nitroprusiato sódico: un agente donador de NO). Para ello, tras la realización de las CCR de **isoprenalina** (de 0,1 nM a 100 μ M), **acetilcolina** (de 0,1 nM a 10 μ M) y **nitroprusiato sódico** (de 0,03 nM a 1 μ M) sobre la aorta precontraída con fenilefrina 1 μ M, se añadió L-NAME 100 μ M sin lavar la preparación (ver Esquema 3A).

Además, el efecto relajante de los tres compuestos ensayados (isoprenalina, acetilcolina y nitroprusiato sódico) se comparó con el obtenido en presencia de L-NAME 100 μ M, realizando CCR de relajación, según se detalla en el Esquema 3B.



Esquema 3. Reversión por parte de L-NAME 100 μ M de las CCR de relajación de isoprenalina, acetilcolina y nitroprusiato sódico frente a la contracción inducida por fenilefrina (A). CCR de isoprenalina, acetilcolina y nitroprusiato sódico frente a la contracción inducida por fenilefrina, en presencia de L-NAME 100 μ M (B).

Los resultados obtenidos muestran que todos los agentes ensayados fueron capaces de relajar de forma concentración dependiente la contracción inducida por fenilefrina 1 μ M (Figura 9).

La adición de L-NAME posterior a la CCR de acetilcolina, no solo revirtió totalmente la relajación, sino que dio lugar a una contracción cuya magnitud fue significativamente mayor a la contracción de la fenilefrina (1 μ M) previa ($154,6 \pm 12,2$ vs. $94,1 \pm 3,4$ % K^+ 80 mM) (Figura 8) y similar a la que se obtuvo cuando la contracción de fenilefrina (1 μ M) se realizó en presencia de L-NAME (ver Figuras 6A y Tabla 3; Figuras 7Ay 7C). Este resultado indica que la relajación mediada por acetilcolina depende totalmente del NO.

La adición de L-NAME tras la CCR de relajación de isoprenalina, también dio lugar a una respuesta contráctil, aunque de magnitud inferior a la obtenida con la fenilefrina (1 μ M) previa ($73,0 \pm 4,7$ % vs. $94,1 \pm 3,4$ % K^+ 80 mM) evidenciando una reversión parcial de la relajación de isoprenalina (Figura 8). Este resultado indica que la acción vasodilatadora mediada por la activación de los AR β depende en parte de la liberación de NO endógeno, y tiene también un componente independiente del NO.

Sin embargo, la adición de L-NAME no fue capaz de revertir la relajación inducida por nitroprusiato sódico (Figura 8), lo que confirma que su efecto relajante es independiente del NO endógeno.

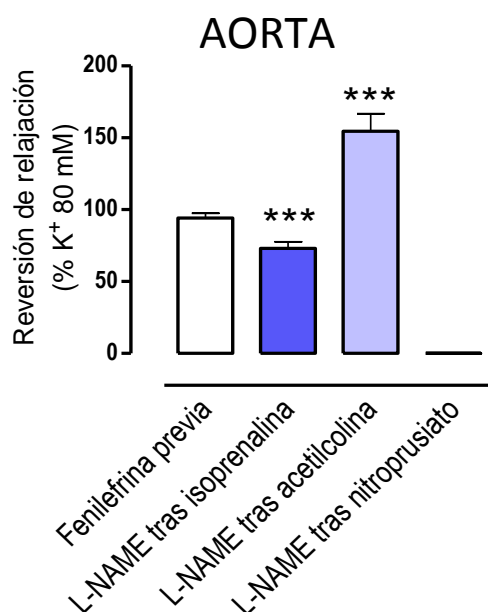


Figura 8.

Reversiones provocadas por la adición de L-NAME (100 μ M) sobre las relajaciones de isoprenalina, acetilcolina y nitroprusiato sódico, en aorta con endotelio intacto, precontraída con fenilefrina 1 μ M (fenilefrina previa).

Los valores representan la media \pm e.e.m. de 4-25 experimentos.

Test t de Student: *** $P < 0,001$ vs. fenilefrina previa.

Resultados

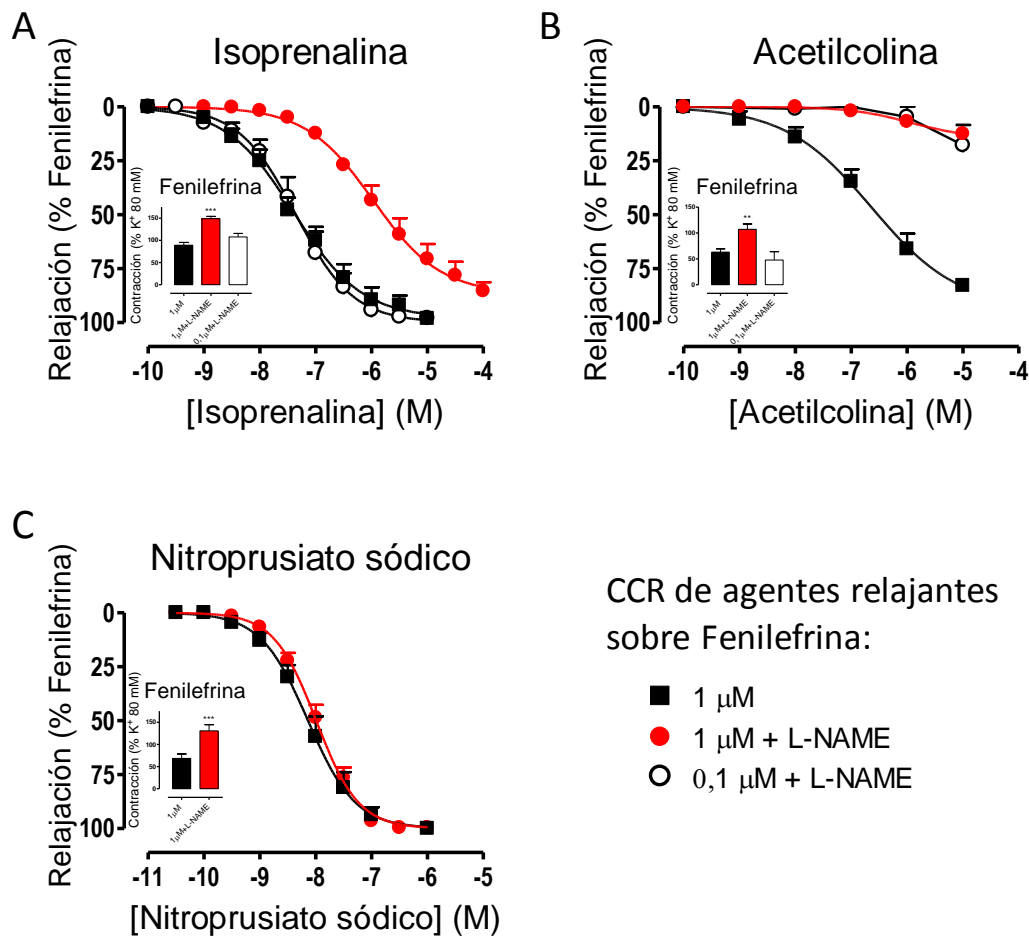
La Figura 9 muestra las CCR de relajación de acetilcolina (B) y nitroprusiato sódico (C), así como la de isoprenalina (A), frente a la contracción inducida por fenilefrina en presencia y ausencia de L-NAME 100 μ M, junto con los parámetros de dichas curvas (D). En las gráficas de relajación se incluyen los niveles previos de contracción: en todos los casos, el tono pre-contráctil alcanzado con la fenilefrina 1 μ M fue mayor en presencia que en ausencia de L-NAME, mientras que con fenilefrina 0,1 μ M en presencia de L-NAME se consiguió un tono similar al obtenido con fenilefrina 1 μ M en ausencia de L-NAME, como ya se ha comentado anteriormente (ver Figuras 7A y 7C).

El efecto del L-NAME sobre las CCR de relajación fue diferente según el agente relajante utilizado. En el caso de acetilcolina, su acción relajante fue inhibida casi completamente en presencia de L-NAME en ambas condiciones experimentales, tanto si usamos fenilefrina 0,1 o 1 μ M (Figura 9B). Estos resultados corroboran que la relajación de acetilcolina depende exclusivamente de la liberación de NO y evidencian que dicho efecto no se ve influenciado por la magnitud del tono contráctil inicial.

En el caso del nitroprusiato sódico, cuya acción relajante es independiente de la presencia de NO endógeno, aunque el tono contráctil inicial también fue diferente en presencia y ausencia de L-NAME, las CCR de relajación obtenidas en las dos condiciones experimentales fueron similares (Figura 9C), poniendo de manifiesto que el efecto relajante es independiente del tono contráctil inicial.

Como ya se ha visto (ver Figura 7B), el efecto inhibitor del L-NAME en la relajación de isoprenalina (disminuyendo tanto la pEC_{50} como el efecto máximo) solo se manifiesta cuando se realiza la CCR de relajación frente a fenilefrina 1 μ M (Figuras 9A y 9D) y no cuando se ajusta el tono precontráctil utilizando un concentración menor de fenilefrina (0,1 μ M) en presencia de L-NAME (Figura 9A). Esta discrepancia puede deberse a que la relajación de isoprenalina es parcialmente dependiente del NO pero tiene también un componente que es independiente del mismo, y las condiciones experimentales pueden determinar que se evidencie más uno u otro mecanismo.

AORTA



D

CCR de agentes relajantes sobre:

	Fenilefrina 1 μM			Fenilefrina 1 μM + L-NAME		
	pEC ₅₀	E _{max} (%)	n	pEC ₅₀	E _{max} (%)	n
Isoprenalina	7,42±0,09	98,2±1,7	5	5,97±0,10***	85,3±5,0**	6
Acetilcolina	6,94±0,09	86,3±3,3	4	-	11,8±1,9***	4
Nitroprusiato sódico	8,10±0,08	99,1±1,4	5	7,96±0,04	99,7±0,3	4

Figura 9. Curvas concentración-respuesta de relajación de isoprenalina (**A**), acetilcolina (**B**) y nitroprusiato sódico (**C**), realizadas en aorta con endotelio intacto, sobre la contracción inducida por fenilefrina 1 y 0,1 μM en ausencia y en presencia de L-NAME 100 μM . En los insertos se muestran las correspondientes precontracciones de fenilefrina 1 y 0,1 μM . Parámetros de las curvas de relajación (**D**).

Los valores representan la media \pm e.e.m de n experimentos.

pEC₅₀ = $-\log$ [agentes relajantes] (M) necesaria para producir el 50% de E_{max}.

E_{max} = efecto máximo de los agentes relajantes expresado como % respecto a la contracción previa de fenilefrina.

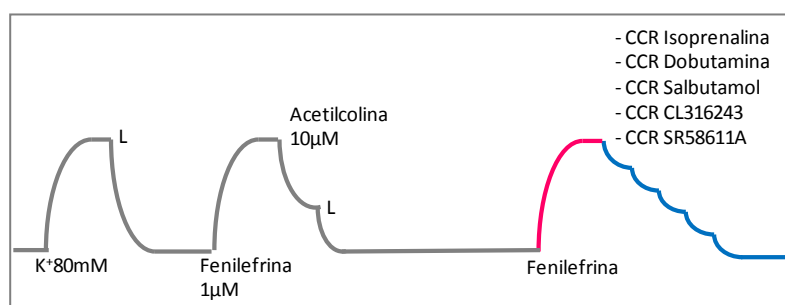
Test t de Student: **P < 0,01; *** P < 0,001 vs. fenilefrina 1 μM .

4. PARTICIPACIÓN DE LOS SUBTIPOS DE AR β EN LA VASODILATACIÓN

El tercer objetivo del presente trabajo fue determinar la participación de cada uno de los tres subtipos de AR β (β_1 , β_2 y β_3) en la respuesta vasodilatadora de los dos tejidos en estudio: A.M.R. y aorta. Para ello, analizamos la acción relajante de los agonistas selectivos por los diferentes subtipos de AR β : **isoprenalina** (no selectivo), **dobutamina** (β_1), **salbutamol** (β_2), **CL316243** y **SR58611A** (β_3). Además, se completó el estudio analizando la acción de diferentes antagonistas selectivos por los subtipos de AR β (**propranolol** (β_1/β_2), **CGP20712A** (β_1), **ICI118551** (β_2) y **SR59230A** (β_3)) frente a la relajación inducida por los agonistas.

4.1 Acción de los agonistas

Para determinar la potencia de los diferentes agonistas en los dos vasos estudiados, se adicionaron concentraciones acumulativas crecientes de isoprenalina, dobutamina, salbutamol, CL316243 y SR58611A sobre la meseta de contracción inducida por la concentración maximal de fenilefrina (10 μ M en A.M.R. y 1 μ M en aorta), según el siguiente Esquema:



Esquema 4. CCR de relajación de diferentes agonistas de los AR β frente a la contracción inducida por fenilefrina.

Todos los agonistas ensayados, excepto el agonista β_3 CL316243 en A.M.R., relajaron de manera concentración-dependiente la meseta de contracción de fenilefrina, pero con potencias diferentes en A.M.R. y aorta (Figuras 10A-10C). Aunque isoprenalina mostró una potencia similar en ambos

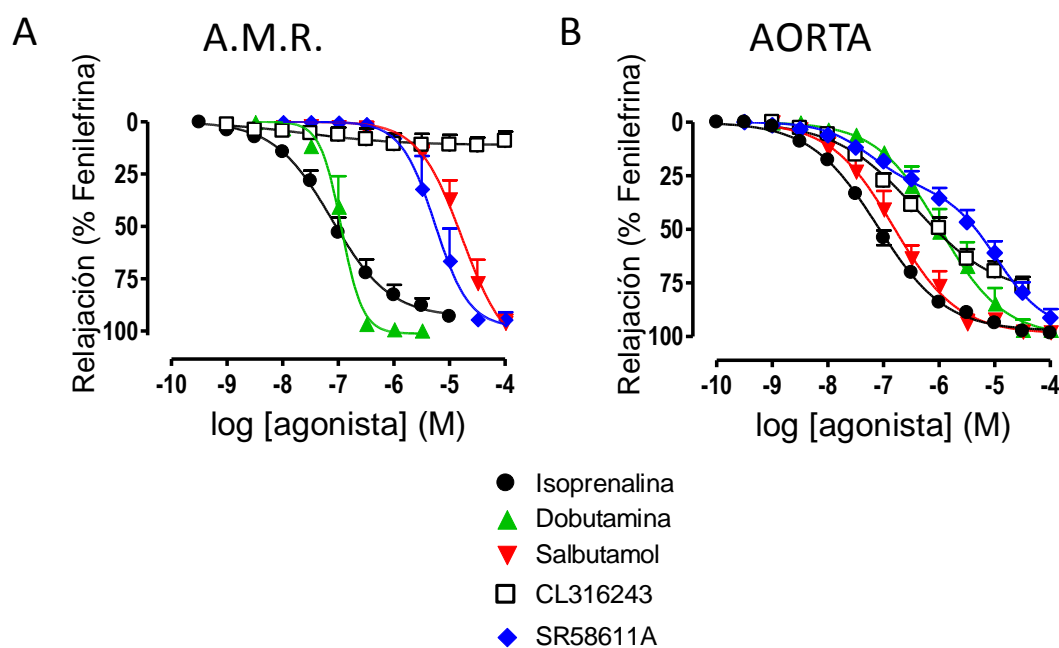
vasos, dobutamina fue más potente en A.M.R. que en aorta, mientras salbutamol mostró una mayor potencia relajante en aorta que en A.M.R. Estos resultados sugieren una mayor implicación del subtipo β_1 en la respuesta vasodilatadora de A.M.R. y un predominio del subtipo β_2 en aorta.

4.1.1 A.M.R.

En A.M.R., como ya se ha comentado, dobutamina relajó completamente, mientras que CL316243 no fue capaz de provocar ningún efecto relajante. En cambio SR58611A (agonista β_3 selectivo pero que a dosis altas es también agonista β_1/β_2) relajó con un valor de potencia bajo, que no se corresponde con el descrito para el subtipo β_3 . Además, aunque el agonista selectivo β_2 , salbutamol, relajó la meseta de contracción de fenilefrina, lo hizo también con una potencia baja que no se corresponde con la descrita para el subtipo β_2 (Figuras 10A y 10C). Estos resultados parecen excluir la participación de los subtipos β_2 y β_3 en la vasodilatación de la A.M.R. mediada por los AR β , evidenciando solo la participación funcional del subtipo β_1 .

4.1.2 Aorta

En aorta obtuvimos un escenario más complejo: todos los agonistas fueron capaces de relajar y aunque parece haber un predominio del subtipo β_2 , no se puede excluir una participación de los AR β_1 y β_3 . Así, además del salbutamol que relajó con mayor potencia en la aorta que en la A.M.R., el agonista selectivo de los AR β_1 , dobutamida, y los agonistas de los AR β_3 , CL316243 y SR58611A, también relajaron de forma concentración dependiente. En el caso del SR58611A, que como hemos comentado es un agonista selectivo de los AR β_3 pero a que a mayores dosis actúa sobre los subtipos β_1 y β_2 , la curva de relajación obtenida fue bifásica, discriminando dos poblaciones de AR β : una de elevada potencia ($pEC_{50}(1) = 7,11 \pm 0,23$) que correspondería a los AR β_3 y cuyo porcentaje fue de un 30 % respecto a la totalidad de receptores, y otra población de baja potencia ($pEC_{50}(2) = 4,94 \pm 0,25$) que correspondería a los AR β_1 y/o β_2 (Figuras 10B y 10C).



C

	A.M.R.			AORTA		
	pEC ₅₀	E _{max} (%)	n	pEC ₅₀	E _{max} (%)	n
Isoprenalina	7,00±0,10	95,9±2,4	19	7,10±0,04	98,7±1,3	12
Dobutamina	6,95±0,04	99,6±0,4	3	6,03±0,11**	96,8±5,4	3
Salbutamol	4,87±0,10	96,0±4,0	3	6,81±0,08**	98,0±1,4	3
CL316243	-	12,0±6,2	5	6,48±0,09	76,7±4,4	4
SR58611A	5,25±0,08	98,3±6,1	3	(1): 7,11±0,23 (30,0±0,05%) (2): 4,94±0,25	92,7±4,4	7

Figura 10. Curvas concentración-respuesta de relajación de los agonistas β : isoprenalina, dobutamina, salbutamol, SR58611A y CL316243 realizadas en A.M.R. (A) y aorta (B) con endotelio intacto. Parámetros de las curvas (C).

Los valores representan la media \pm e.e.m de n experimentos.

pEC₅₀ = $-\log$ [agonistas β] (M) necesaria para producir el 50 % de E_{max}.

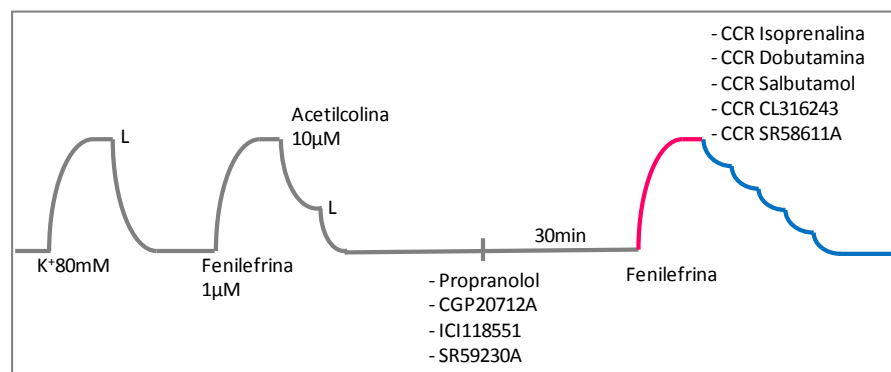
pEC₅₀ (1) o (2) = pEC₅₀ para los sitios de alta o baja potencia y %: porcentaje de sitios de alta potencia.

E_{max} = efecto máximo de los agonistas β expresado como % respecto a la contracción previa de fenilefrina.

Test t de Student: **P < 0,01: A.M.R. vs. aorta.

4.2 Acción de los antagonistas

Con objeto de confirmar y aclarar la participación de los subtipos, se analizó la acción de los antagonistas β selectivos sobre la relajación mediada por isoprenalina. Para ello, se construyeron las CCR de relajación de isoprenalina sobre la meseta de contracción inducida por la concentración maximal de fenilefrina ($10 \mu\text{M}$ en A.M.R. y $1 \mu\text{M}$ en aorta), en presencia o ausencia de los antagonistas β con un diferente perfil de selectividad: **propranolol** (β_1/β_2), **CGP20712A** (β_1), **ICI118551** (β_2) y **SR59230A** (β_3). En aorta, estos antagonistas se estudiaron también frente a sus correspondientes agonistas selectivos (dobutamina, salbutamol, CL316243 y SR58611A).

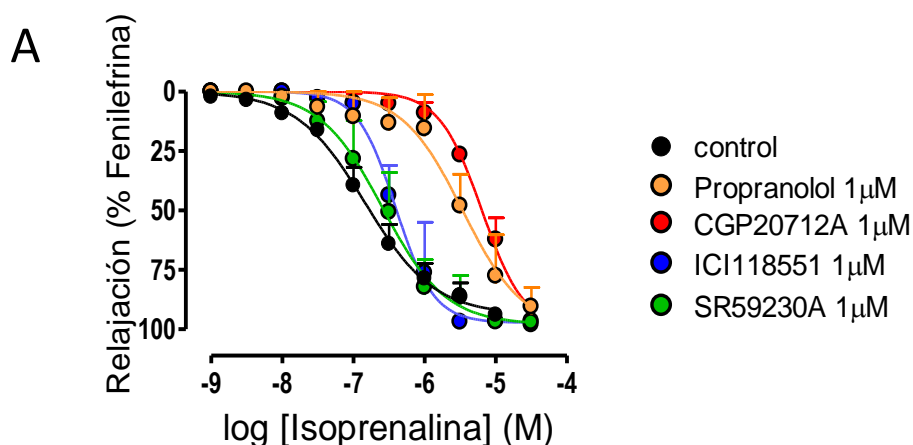


Esquema 5. CCR de relajación de isoprenalina y otros agonistas β frente a la contracción inducida por fenilefrina, en presencia de diferentes antagonistas β .

4.2.1 A.M.R.

Las CCR de relajación de isoprenalina sobre la contracción inducida por fenilefrina fueron significativamente desplazadas a la derecha por propranolol ($1 \mu\text{M}$) y CGP20712A ($1 \mu\text{M}$) (Figura 11A). En la Tabla (Figura 11B) se muestran los valores de potencia (pK_B) obtenidos para ambos antagonistas. Sin embargo, la preincubación con ICI118551 ($1 \mu\text{M}$) o SR59230A ($1 \mu\text{M}$) no modificó la CCR de relajación de isoprenalina (Figuras 11A y 11B). De nuevo, se confirma que la vasodilatación mediada por los AR β en A.M.R se produce mayoritariamente a través de los AR β_1 , quedando excluidos los subtipos β_2 y β_3 .

A.M.R.

**B**

	Isoprenalina				
	pEC ₅₀	E _{max} (%)	CR	pK _B	n
Control	7,00±0,10	95,9±2,4			8
Propranolol 1 μM	5,47±0,26***	90,6±8,1	34,1	7,52	3
CGP20712A 1 μM	5,20±0,09***	98,1±1,9	63,8	7,80	3
ICI118551 1 μM	6,65±0,19	96,7±1,3			3
SR59230A 1 μM	6,75±0,13	98,0±2,0			4

Figura 11. Curvas concentración-respuesta de relajación de isoprenalina sobre la meseta de contracción inducida por fenilefrina en ausencia (control) o presencia de los antagonistas β : propranolol, CGP20712A, ICI118551 y SR59230A en A.M.R. con endotelio intacto **(A)**. Parámetros de las curvas **(B)**.

Los valores representan la media \pm e.e.m. de n experimentos.

pEC₅₀ = $-\log$ [isoprenalina] (M) necesaria para producir el 50 % de E_{max}.

E_{max} = efecto máximo relajante de isoprenalina expresado como % respecto a la contracción previa de fenilefrina.

CR = EC₅₀ de isoprenalina en presencia del antagonista/ EC₅₀ de isoprenalina en ausencia del antagonista (control).

pK_B = $-\log$ de la constante de afinidad de los antagonistas.

Test t de Student: *** P < 0,001 vs. control.

4.2.2 Aorta

Para clarificar la participación de los subtipos de AR β en aorta de rata, donde la situación es más compleja y parece que son varios los subtipos implicados, se analizó la acción de diferentes concentraciones de antagonistas sobre las CCR de relajación de isoprenalina. Además se analizó si las CCR de los diferentes agonistas selectivos eran específicamente inhibidas por los antagonistas selectivos de dichos receptores. Los resultados obtenidos se detallan a continuación.

CCR de relajación de isoprenalina en presencia y ausencia de los antagonistas selectivos de los subtipos de AR β

Propranolol a la concentración de 10 nM no modificó la CCR de relajación de isoprenalina. Sin embargo, a las concentraciones de 0,1 y 1 μ M, la desplazó significativamente a la derecha (Figura 12A, Tabla 4). Los valores de potencia (pK_B) obtenidos para el propranolol fueron de 7,19 y 6,97 (Tabla 4). Estos valores de pK_B son bajos respecto a aquellos descritos en los tejidos que expresan mayoritariamente los AR β_1 y/o β_2 (ver Tabla C de la Revisión Bibliográfica), lo que nos indica la presencia de un componente resistente al propranolol.

El antagonista adrenérgico β_2 selectivo, ICI118551, a las tres concentraciones ensayadas (10 nM, 0,1 μ M y 1 μ M), desplazó significativamente a la derecha las CCR de isoprenalina (Figura 12C, Tabla 4). Sin embargo, la recta de Schild, representada en la Figura 12E, revela un antagonismo no competitivo, ya que la pendiente de dicha recta fue significativamente menor que la unidad ($0,55 \pm 0,07$; $P < 0,01$). Los valores de pK_B para el ICI118551 se muestran en la Tabla 4.

Sin embargo, ninguna de las concentraciones ensayadas (10 nM, 0,1 μ M y 1 μ M) de los antagonistas β_1 y β_3 selectivos, CGP20712A y SR59230A respectivamente, fue capaz de desplazar las curvas de relajación de isoprenalina (Figuras 12B y 12D, Tabla 4).

AORTA

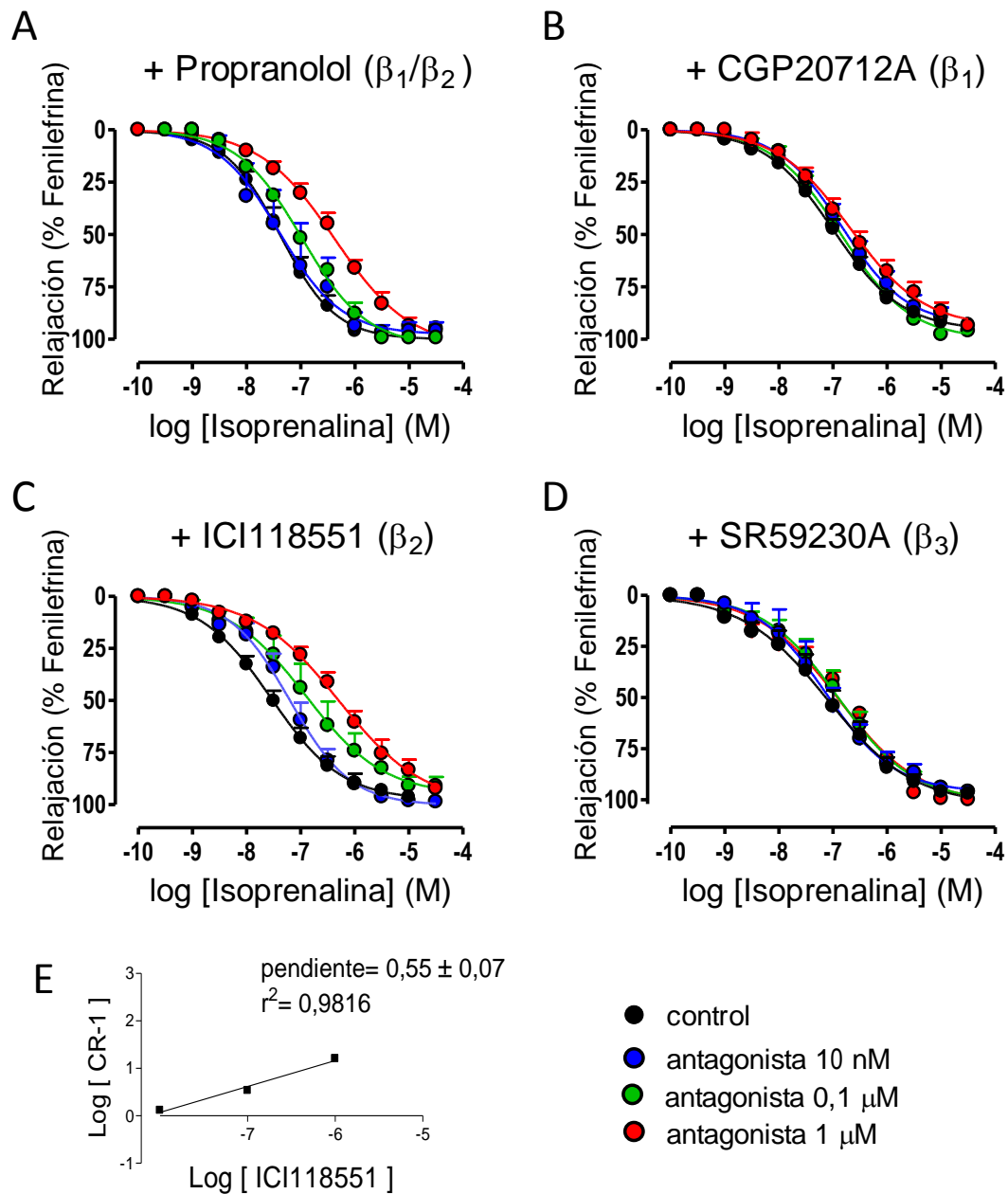


Figura 12. Curvas concentración-respuesta de relajación de isoprenalina realizadas sobre la meseta de contracción producida por fenilefrina 1 μ M, en presencia de los antagonistas β : propranolol (A), CGP20712A (B), ICI118551 (C) y SR59230A (D) a las concentraciones de 10 nM, 0,1 μ M y 1 μ M, en aorta con endotelio intacto. Recta de Schild para el ICI118551 (E).

Tabla 4. Parámetros obtenidos de las curvas concentración-respuesta de relajación de isoprenalina en ausencia (control) o presencia de los antagonistas β : propranolol, CGP20712A, ICI118551 y SR59230A, en aorta con endotelio intacto.

AORTA					
	Isoprenalina				
	pEC ₅₀	E _{max} (%)	CR	pK _B	n
Control	7,39±0,06	98,6±2,4			6
Propranolol 10 nM	7,40±0,15	96,0±4,0			3
Propranolol 0,1 μ M	6,98±0,05*	99,3±0,7	2,5	7,19	3
Propranolol 1 μ M	6,38±0,10***	94,9±3,1	10,2	6,97	6
Isoprenalina					
	pEC ₅₀	E _{max} (%)			n
Control	7,01±0,07	94,0±2,1			13
CGP20712A 10 nM	6,90±0,07	95,1±2,4			9
CGP20712A 0,1 μ M	6,84±0,01	96,0±0,6			7
CGP20712A 1 μ M	6,75±0,10	92,4±4,8			6
Isoprenalina					
	pEC ₅₀	E _{max} (%)	CR	pK _B	n
Control	7,55±0,08	96,3±2,5			15
ICI118551 10 nM	7,19±0,01*	98,7±1,6	2,3	8,10	6
ICI118551 0,1 μ M	6,91±0,19**	91,1±4,3	4,4	7,53	6
ICI118551 1 μ M	6,31±0,16***	92,3±2,2	17,1	7,21	9
Isoprenalina					
	pEC ₅₀	E _{max} (%)			n
Control	7,15±0,13	96,9±2,2			9
SR59230A 10 nM	7,15±0,12	96,1±2,0			3
SR59230A 0,1 μ M	6,91±0,11	96,0±2,1			7
SR59230A 1 μ M	6,92±0,08	99,9±0,8			7

Los valores representan la media \pm e.e.m. de n experimentos.

pEC₅₀ = $-\log$ [isoprenalina] (M) necesaria para producir el 50 % de E_{max}.

E_{max} = efecto máximo relajante de isoprenalina expresado como % respecto a la contracción previa de fenilefrina.

CR = EC₅₀ de isoprenalina en presencia del antagonista/ EC₅₀ de isoprenalina en ausencia del antagonista (control).

pK_B = $-\log$ de la constante de afinidad de los antagonistas.

Test t de Student: * P < 0,05; **P < 0,01; *** P < 0,001 vs. control.

CCR de relajación de los agonistas selectivos de los AR β en presencia y ausencia de los antagonistas selectivos de dichos subtipos

Se realizaron CCR de los agonistas adrenérgicos selectivos por los subtipos de AR, dobutamina (β_1), salbutamol (β_2), CL316243 y SR58611A (β_3) en ausencia y en presencia de los antagonistas selectivos de cada uno de ellos: CGP20712A (β_1), ICI118551 (β_2) y SR59230A (β_3). Todos los antagonistas ensayados fueron capaces de desplazar a la derecha las CCR de relajación de sus correspondientes agonistas, pero con potencias diferentes.

ICI118551 1 μ M desplazó significativamente a la derecha la curva de relajación de salbutamol (Figura 13B) obteniéndose un valor de pK_B de 8,00 que fue mayor que el obtenido frente a isoprenalina (Tabla 5 vs. Tabla 4), sugiriendo de nuevo una participación mayoritaria pero no única del subtipo β_2 .

CGP20712A 1 μ M desplazó ligeramente pero significativamente la curva de relajación de dobutamina, obteniéndose un valor de potencia como antagonista (pK_B) bajo (6,43) (Figura 13A, Tabla 5), lo que excluye una participación importante del subtipo β_1 , siendo los AR β_1 de baja afinidad los que, en cualquier caso, estarían implicados en la vasodilatación.

SR59230A 0,1 μ M también desplazó significativamente a la derecha la CCR de relajación de CL316243, obteniendo un valor de pK_B para este antagonista de 7,58 (Figura 13C, Tabla 5) que coincide con el valor de potencia descrito en la literatura (Kaumann y Molenaar, 1996; ver Tabla C de la Revisión Bibliográfica). Además, SR59230A fue capaz de anular la fracción de alta afinidad de la CCR de relajación de SR58611A que, como ya hemos comentado, correspondería a los AR β_3 , sin modificar la segunda parte de la CCR de relajación de SR58611A, que se debe a la activación de los subtipos β_1 y/o β_2 (Figura 13D, Tabla 5). De hecho, en presencia de SR59230A, la CCR del agonista β_3 es monofásica (Figura 13D, Tabla 5). Estos resultados confirman el papel, aunque minoritario, del subtipo β_3 en la respuesta vasodilatadora de aorta.

AORTA

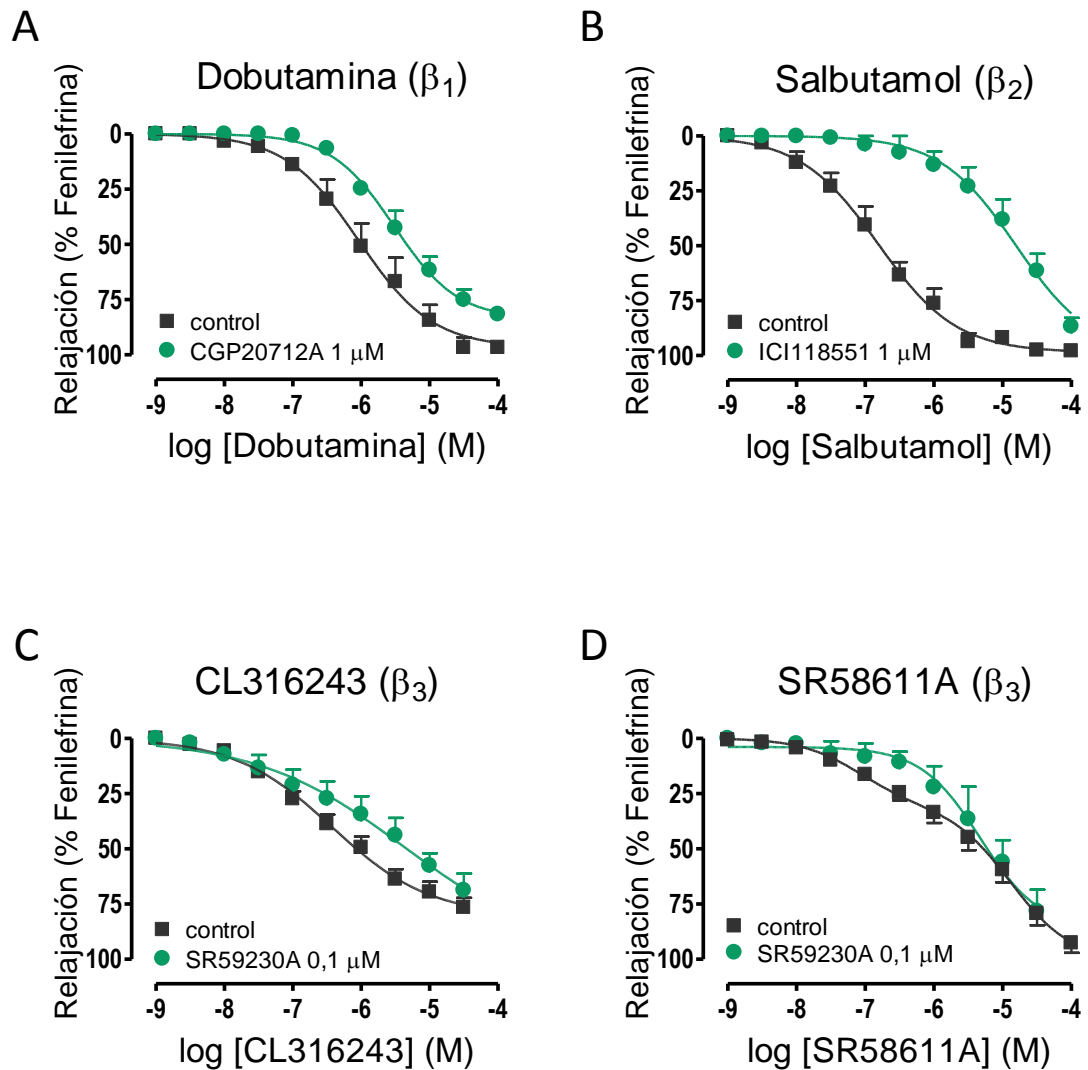


Figura 13. Curvas concentración-respuesta de relajación de los agonistas β : dobutamina (**A**), salbutamol (**B**), CL316243 (**C**) y SR58611A (**D**) y en ausencia (control) y en presencia de sus respectivos antagonista β : CGP20712A (β_1), ICI118551 (β_2) y SR59230A (β_3). Las curvas de relajación están realizadas sobre la meseta de contracción producida por fenilefrina 1 μ M, en aorta con endotelio intacto.

Resultados

Tabla 5. Parámetros obtenidos de las curvas concentración-respuesta de relajación de los agonistas β : dobutamina (β_1), salbutamol (β_2), CL316243 (β_3) y SR58611A (β_3) y en ausencia (control) y en presencia de sus respectivos antagonista β : CGP20712A (β_1), ICI118551 (β_2) y SR59230A (β_3), en aorta con endotelio intacto.

AORTA					
Dobutamina					
	pEC ₅₀	E _{max} (%)	CR	pK _B	n
Control	6,03±0,11	96,8±5,4			3
CGP20712A 1 μ M	5,46±0,08*	83,8±3,6	3,8	6,43	3
Salbutamol					
	pEC ₅₀	E _{max} (%)	CR	pK _B	n
Control	6,81±0,08	98,0±1,4			3
ICI118551 1 μ M	4,80±0,28**	86,8±3,9	101,0	8,00	3
CL316243					
	pEC ₅₀	E _{max} (%)	CR	pK _B	n
Control	6,48±0,09	76,7±4,4			4
SR59230A 0,1 μ M	5,80±0,25*	68,8±7,5	4,8	7,58	4
SR58611A					
	pEC ₅₀	E _{max} (%)			n
Control	(1)= 7,11±0,23 (30,0±0,05%) (2)= 4,94±0,25	92,7±4,4			7
SR59230A 0,1 μ M	5,32±0,18	86,8±10,3			3

Los valores representan la media \pm e.e.m. de n experimentos.

pEC₅₀ = $-\log$ [agonistas β] (M) necesaria para producir el 50 % de E_{max}.

pEC_{50 (1) o (2)} = pEC₅₀ para los sitios de alta o baja potencia y %: porcentaje de sitios de alta potencia.

E_{max} = efecto máximo relajante de los agonistas β , expresado como % respecto a la contracción previa de fenilefrina.

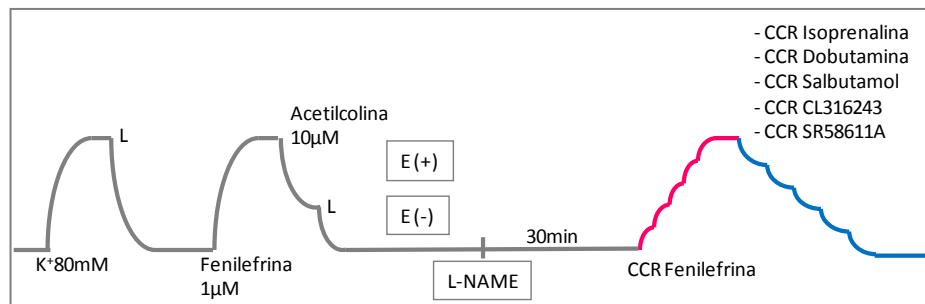
CR = EC₅₀ de agonistas β en presencia del antagonista/ EC₅₀ de agonistas β en ausencia del antagonista (control).

pK_B = $-\log$ de la constante de afinidad de los antagonistas.

Test t de Student: * P < 0,05; **P < 0,01 vs. control.

5. PAPEL DEL ENDOTELIO Y DEL NO EN LA VASODILATACIÓN MEDIADA POR LOS SUBTIPOS DE AR β

Con objeto de analizar la influencia del endotelio y del NO en la respuesta vasodilatadora mediada por los diferentes subtipos de AR β en A.M.R. y aorta, se realizaron CCR de relajación de los agonistas de estos receptores (isoprenalina (no selectivo), dobutamina (β_1), salbutamol (β_2), CL316243 (β_3) y SR58611A (β_3)) en distintas condiciones experimentales: en anillos con endotelio (E (+)) o en anillos desprovistos de endotelio (E (-)). Algunos experimentos se realizaron en presencia de L-NAME 100 μ M (inhibidor de la enzima NOS), como se muestra en el siguiente Esquema:



Esquema 6. CCR de contracción de fenilefrina y CCR de relajación de los diferentes agonistas de los AR β , en distintas condiciones experimentales: en presencia de endotelio (E (+)), en ausencia de endotelio (E (-)), en presencia o ausencia de L-NAME 100 μ M (inhibidor de la enzima NOS).

5.1 A.M.R.

En A.M.R., fenilefrina dio lugar a una respuesta contráctil concentración-dependiente, que fue similar en presencia o ausencia de endotelio o, como ya hemos comentado, cuando se realizó en presencia de L-NAME (100 μ M) (Figura 14A, Tabla 6; ver Figura 5A, Tabla 3), indicando que en este vaso la acción de fenilefrina no está influenciada por la presencia del endotelio ni por la liberación de NO.

A.M.R.

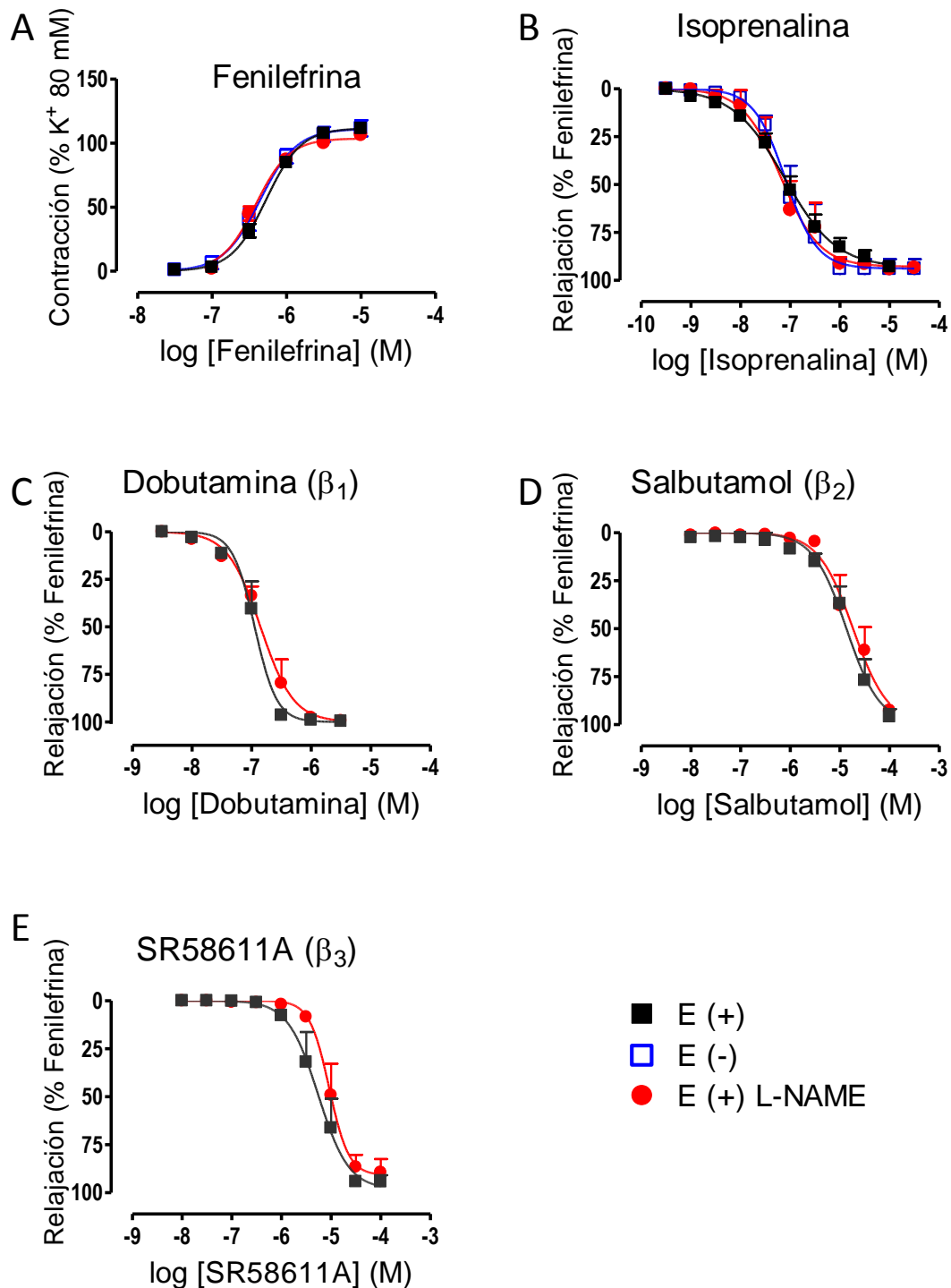


Figura 14. Curvas concentración-respuesta (CCR) de contracción de fenilefrina (A) y CCR de relajación de los agonistas β : isoprenalina (B), dobutamina (C), salbutamol (D) y SR58611A (E) realizadas en A.M.R. con endotelio intacto (E (+)), en ausencia de endotelio (E (-)) o con endotelio intacto en presencia de L-NAME 100 μ M (E (+) L-NAME).

Tabla 6. Parámetros obtenidos de las curvas concentración-respuesta (CCR) de contracción de fenilefrina y consiguientes CCR de relajación de isoprenalina, dobutamina, salbutamol y SR58611A en A.M.R con endotelio intacto (E (+)); sin endotelio (E (-)); o con endotelio intacto en presencia de L-NAME 100 μ M (E(+)-L-NAME).

A.M.R.			
Fenilefrina			
	pEC ₅₀	E _{max} (%)	n
E (+)	6,27±0,05	111,4±4,1	19
E (-)	6,36±0,06	111,6±6,3	14
E (+) L-NAME	6,42±0,06	106,4±3,5	14
Isoprenalina			
	pEC ₅₀	E _{max} (%)	n
E (+)	7,11±0,08	93,0±1,6	19
E (-)	7,10±0,10	94,0±5,0	4
E (+) L-NAME	7,18±0,11	93,6±1,6	6
Dobutamina			
	pEC ₅₀	E _{max} (%)	n
E (+)	6,95±0,04	99,6±0,4	3
E (+) L-NAME	6,85±0,06	99,3±0,9	3
Salbutamol			
	pEC ₅₀	E _{max} (%)	n
E (+)	4,87±0,10	96,0±4,0	3
E (+) L-NAME	4,74±0,17	92,7±1,9	3
SR58611A			
	pEC ₅₀	E _{max} (%)	n
E (+)	5,25±0,08	98,3±6,1	3
E (+) L-NAME	5,03±0,05	91,0±4,9	3

Los valores representan la media \pm e.e.m de n experimentos.

pEC₅₀ = $-\log$ [fenilefrina] y [agonistas β] (M) necesaria para producir el 50 % de E_{max}.

E_{max} = efecto máximo contráctil de fenilefrina, expresado como % respecto a la contracción previa de K⁺80 mM, o efecto máximo relajante de los agonistas β , expresado como % respecto a la contracción previa de fenilefrina.

La acción relajante de isoprenalina tampoco fue modificada por la eliminación del endotelio o, como ya hemos comentado, por la inhibición de la NOS mediante la preincubación con L-NAME (Figura 14B, Tabla 6; ver Figura 5C, Tabla 3). Asimismo, las CCR de relajación de los agonistas selectivos dobutamina, salbutamol y SR58611A fueron similares en presencia o ausencia de L-NAME (Figuras 14C-14E, Tabla 6). Estos resultados indican que en A.M.R. la vasodilatación mediada por los AR β no depende del endotelio ni de la producción de NO, hecho que concuerda con la falta de participación de la vía del NO/GCs/GMPc que hemos observado anteriormente en este vaso (ver Apartado 3. *“Influencia de las vías de AMPc y GMPc en la vasodilatación mediada por los AR β ”*).

5.2 Aorta

En aorta, fenilefrina produjo una respuesta contráctil concentración-dependiente en todas las condiciones experimentales ensayadas (Figura 15A, Tabla 7). En aorta sin endotelio (E (-)), el efecto contráctil de fenilefrina fue mayor, produciéndose un aumento significativo de la potencia (pEC_{50}) y de la respuesta máxima (E_{max}) con respecto a los anillos con endotelio (E (+)) (Figura 15A, Tabla 7). Un aumento semejante en el efecto contráctil de fenilefrina se observó, como ya hemos descrito, cuando las CCR de contracción se realizaron en anillos con endotelio en presencia de L-NAME (Figura 15A, Tabla 7; ver Figura 6A, Tabla 3), indicando que en aorta el NO liberado por el endotelio contrarresta la contracción inducida por fenilefrina.

Isoprenalina relajó de manera concentración-dependiente las mesetas contráctiles de fenilefrina en las distintas condiciones ensayadas, pero en este vaso sí se observaron diferencias. Como se ha comentado anteriormente en el Apartado 3. *“Influencia de las vías de AMPc y GMPc en la vasodilatación mediada por los AR β ”*, la preincubación con L-NAME redujo el efecto relajante de la isoprenalina observándose una disminución significativa de la pEC_{50} y del E_{max} (Figura 15B, Tabla 7; ver Figura 6C, Tabla 3), confirmando la participación del NO en la acción relajante mediada por los AR β . En aorta desprovista de

endotelio se observó también una disminución en el efecto relajante de isoprenalina, aunque fue menor que la observada en los experimentos realizados en presencia de L-NAME (Figura 15B, Tabla 7). Estos resultados parecen indicar que la relajación inducida por los AR β en aorta depende de la liberación de NO endotelial, pero además tiene un componente relacionado con la producción de NO que es independiente del endotelio.

Con objeto de determinar la influencia del endotelio y del NO en la vasodilatación mediada por los distintos subtipos, se analizó la acción relajante de los agonistas β selectivos en las diferentes condiciones experimentales. Las CCR de relajación del agonista β_1 , dobutamina, fueron similares en aorta con o sin endotelio, o en presencia de L-NAME (Figura 15C, Tabla 7), lo que nos indica que la vasodilatación mediada por el subtipo β_1 es independiente del endotelio y del NO.

La ausencia de endotelio o la preincubación con L-NAME desplazó a la derecha de forma similar las CCR del agonista β_3 , CL316243, produciéndose una disminución significativa de la pEC_{50} y el E_{max} respecto a la aorta con endotelio (Figura 15E, Tabla 7). Estos resultados sugieren que la vasodilatación mediada por el subtipo β_3 depende del NO liberado por el endotelio.

Sin embargo, al igual que ocurre con isoprenalina, la preincubación con L-NAME desplazó las CCR de salbutamol (agonista β_2) a la derecha en mayor medida que la ausencia de endotelio (Figura 15D, Tabla 7). Además comprobamos que, en anillos desprovistos de endotelio, L-NAME inhibió la relajación de salbutamol (Figura 15D, Tabla 7), sugiriendo que los AR β_2 presentes en las CML estimulan la producción de NO. Por tanto, los AR β_2 ejercen su función tanto en el endotelio como en el músculo liso vascular, relajando en ambos casos por un mecanismo relacionado con el NO.

Como confirmación de esta hipótesis, detectamos la presencia de eNOS no solo en la aorta con endotelio intacto, sino también en la aorta desprovista de endotelio y en las CML frescas recién aisladas de la aorta (Figura 16), indicando que esta enzima no solo se expresa de forma abundante en las CE, sino que también se expresa en la capa muscular.

AORTA

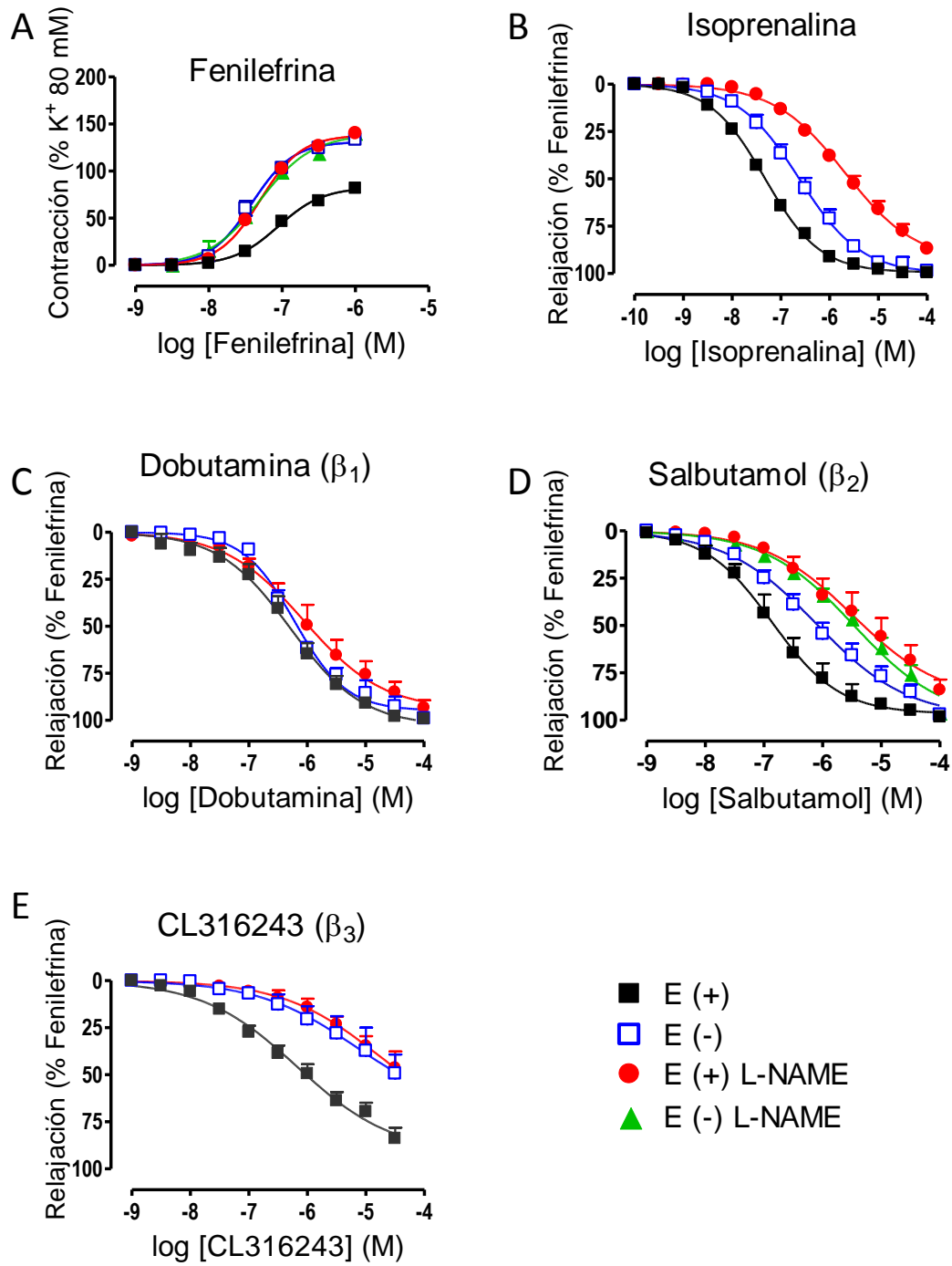


Figura 15. Curvas concentración-respuesta (CCR) de contracción de fenilefrina (A) y CCR de relajación de los agonistas β : isoprenalina (B), dobutamina (C), salbutamol (D) y SR58611A (E) realizadas en aorta con endotelio intacto (E (+)) o en ausencia de endotelio (E (-)), en presencia o ausencia de L-NAME 100 μ M (L-NAME).

Tabla 7. Parámetros obtenidos de las curvas concentración-respuesta (CCR) de contracción de fenilefrina y consiguientes CCR de relajación de los agonistas β : dobutamina, salbutamol y CL316243 en aorta con endotelio intacto (E (+)) o sin endotelio (E (-)), en presencia o ausencia de L-NAME 100 μ M (L-NAME).

AORTA			
Fenilefrina			
	pEC ₅₀	E _{max} (%)	n
E (+)	7,08±0,09	86,9±7,0	11
E (-)	7,41±0,05**	133,4±5,1***	10
E (+) L-NAME	7,30±0,04*	142,2±5,4***	14
E (-) L-NAME	7,33±0,06*	140,1±4,6***	8
Isoprenalina			
	pEC ₅₀	E _{max} (%)	n
E (+)	7,33±0,03	99,7±1,8	12
E (-)	6,62±0,09***	98,8±1,3	12
E (+) L-NAME	5,68±0,11*** ###	86,9±2,3* #	12
Dobutamina			
	pEC ₅₀	E _{max} (%)	n
E (+)	6,39±0,06	99,3±0,4	9
E (-)	6,22±0,05	99,0±1,0	3
E (+) L-NAME	6,19±0,08	93,4±4,1	4
Salbutamol			
	pEC ₅₀	E _{max} (%)	n
E (+)	6,86±0,09	98,4±0,8	5
E (-)	6,08±0,12**	98,4±2,1	13
E (+) L-NAME	5,48±0,19*** #	89,5±7,1	6
E (-) L-NAME	5,47±0,16*** #	96,5±3,0	8
CL316243			
	pEC ₅₀	E _{max} (%)	n
E (+)	6,48±0,09	76,7±4,4	4
E (-)	5,62±0,22**	49,4±10,1*	4
E (+) L-NAME	5,52±0,18**	46,4±8,7*	4

Los valores representan la media \pm e.e.m de n experimentos.

pEC₅₀ = $-\log$ [fenilefrina] y [agonistas β] (M) necesaria para producir el 50 % de E_{max}.

E_{max} = efecto máximo contráctil de fenilefrina, expresado como % respecto a la contracción previa de K⁺80 mM, o efecto máximo relajante de los agonistas β , expresado como % respecto a la contracción previa de fenilefrina. Test t de Student: * P < 0,05; **P < 0,01; *** P < 0,001 vs. E (+); # P < 0,05; ### P < 0,001 vs. E (-).

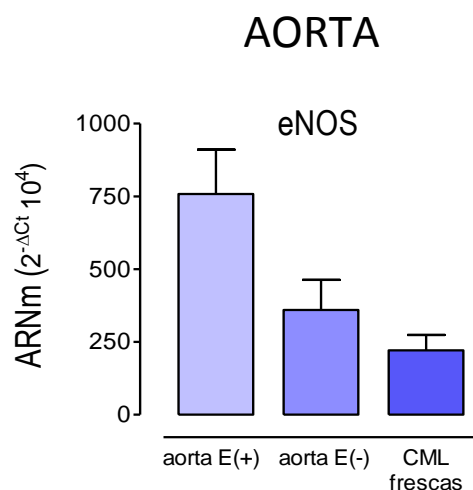


Figura 16. Niveles de expresión del ARNm de la eNOS en aorta con endotelio intacto (E (+)); aorta sin endotelio (E (-)) y células musculares lisas (CML) frescas de aorta. Los valores están normalizados usando Gapdh como gen de referencia y están expresados como la media de $2^{-\Delta Ct} 10^4 \pm e.e.m.$ de $n=3-5$ experimentos.

Estos resultados evidencian la participación funcional de una población mixta de AR β_2 y β_3 que ejercen su efecto a través de la liberación de NO. La relajación mediada por los AR β_3 depende completamente de la liberación de NO endotelial, mientras que la relajación mediada por los AR β_2 se produce a través de la liberación de NO de origen endotelial, pero también de origen no endotelial. La activación de los AR β en anillos desprovistos de endotelio y en presencia de L-NAME sigue produciendo un efecto relajante que será por tanto independiente de endotelio y de la producción de NO.

Con objeto de analizar los subtipos de AR β implicados en la vasodilatación independiente del endotelio y del NO, se estudió el efecto de los antagonistas β selectivos sobre el efecto relajante de isoprenalina en anillos desprovistos de endotelio (E (-)) y en anillos con endotelio incubados en presencia de L-NAME (E (+) L-NAME).

En ausencia de endotelio, la CCR de relajación de isoprenalina fue desplazada a la derecha por propranolol e ICI118551 1 μ M, produciéndose una disminución significativa de la pEC₅₀ de isoprenalina (Figura 17A, Tabla 8), al igual que ocurría en presencia de endotelio (ver Figura 12, Tabla 4). Pero, en esta condición experimental, el antagonista selectivo β_1 CGP20712A también

inhibió el efecto relajante de isoprenalina, aunque con un valor de potencia bajo (Figura 17A, Tabla 8). SR59230A (antagonista β_3 selectivo) no modificó las CCR de relajación de isoprenalina (Figura 17A, Tabla 8).

En presencia de L-NAME, la CCR de relajación de isoprenalina fue modificada solo por propranolol y CGP20712A, obteniéndose también en este caso unas potencias bajas para ambos antagonistas (Figura 17B, Tabla 8). Los antagonistas ICI118551 y SR59230A no provocaron ningún cambio en las curvas de relajación de isoprenalina (Figura 17B, Tabla 8).

Estos resultados demuestran que los AR β_1 y β_2 están implicados en la relajación inducida por isoprenalina en la aorta desprovista de endotelio y que por tanto, se produce únicamente por mecanismos que se desarrollan en la capa muscular. Por otro lado, solo el subtipo β_1 está implicado en la relajación de isoprenalina en presencia de L-NAME, es decir, de la relajación independiente del NO. Además, la obtención de una baja potencia (pK_B) para el antagonista β_1 (Tabla 8) nos lleva a postular que es el estado de baja afinidad del AR β_1 el que participa en la respuesta relajante mediada por la estimulación de los AR β en aorta.

En conjunto, todo el estudio en aorta indica que la vasodilatación mediada por los AR β se produce mayoritariamente a través del subtipo β_2 , presente tanto en las CE como en las CML, dependiendo en gran parte de la producción de NO. Asimismo el subtipo β_3 , presente en las CE, colabora en la respuesta relajante, y lo hace de manera totalmente dependiente de la producción de NO. Por último el subtipo β_1 de baja afinidad, presente en las CML, participa a través de un mecanismo independiente del NO.

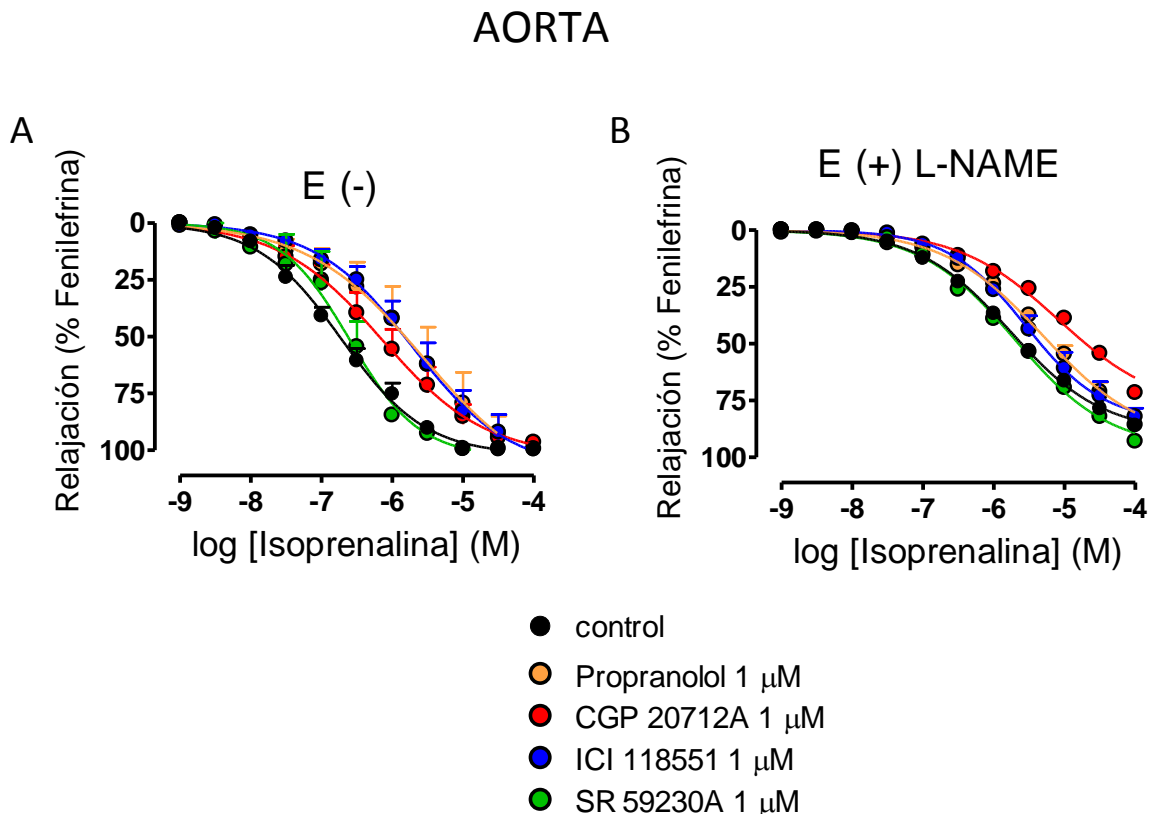


Figura 17. Curvas concentración-respuesta de relajación de isoprenalina realizadas sobre la meseta de contracción producida por fenilefrina 1 μ M, en presencia de los antagonistas β : propranolol, CGP20712A, ICI118551 y SR59230A, en aorta sin endotelio (E (-)) (**A**) o en aorta con endotelio en presencia de L-NAME 100 μ M (E (+) L-NAME) (**B**).

Tabla 8. Parámetros obtenidos de las curvas concentración-respuesta de relajación de isoprenalina en presencia de los antagonistas β : propranolol, CGP20712A, ICI118551 y SR59230A, en aorta sin endotelio (E (-)) o en aorta con endotelio en presencia de L-NAME 100 μ M (E (+) L-NAME).

AORTA					
	Isoprenalina E (-)				
	pEC ₅₀	E _{max} (%)	CR	pK _B	n
Control	6,72±0,06	100,0±0,9			8
Propranolol 1 μ M	5,91±0,19***	92,5±7,5	6,5	6,73	3
CGP20712A 1 μ M	6,14±0,15**	96,7±2,7	3,4	6,45	5
ICI118551 1 μ M	5,72±0,17***	99,5±0,5	10,0	6,95	3
SR59230A 1 μ M	6,60±0,10	99,4±0,6			3
	Isoprenalina E (+) L-NAME				
	pEC ₅₀	E _{max} (%)	CR	pK _B	n
Control	5,77±0,06	86,2±2,4			9
Propranolol 1 μ M	5,27±0,10***	85,9±3,4	3,2	6,33	3
CGP20712A 1 μ M	5,08±0,09***	71,7±3,4	4,9	6,59	4
ICI118551 1 μ M	5,54±0,15	82,3±7,7			4
SR59230A 1 μ M	5,87±0,09	90,4±6,9			3

Los valores representan la media \pm e.e.m. de n experimentos.

pEC₅₀ = $-\log$ [isoprenalina] (M) necesaria para producir el 50 % de E_{max}.

E_{max} = efecto máximo relajante de isoprenalina, expresado como % respecto a la contracción previa de fenilefrina.

CR = EC₅₀ de isoprenalina en presencia del antagonista/ EC₅₀ de isoprenalina en ausencia del antagonista (control).

pK_B = $-\log$ de la constante de afinidad de los antagonistas.

Test t de Student: **P < 0,01; *** P < 0,001 vs. control.

6. INFLUENCIA DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LAS MAPK (ERK1/2 y p38) EN LA VASODILATACIÓN MEDIADA POR LOS AR β EN AORTA

Otro objetivo de esta Tesis fue analizar si los AR β son capaces de señalizar a través de la activación de las MAPK (ERK1/2 y p38) y el papel que estas vías de señalización pueden desempeñar en la acción vasodilatadora mediada por los AR β . Para ello se analizó:

- el efecto de los AR β sobre la activación de la ERK1/2 y p38 en aorta de rata y en cultivos primarios de los principales tipos celulares de los vasos: CML y CE (ver apartado 6.1 “Efecto de los AR β sobre la activación de las MAPK”).

- el efecto que los inhibidores de la fosforilación de ERK1/2 (U0126) y p38 (SB203580) podrían tener en la acción vasodilatadora mediada por los AR β en aorta de rata (ver apartado 6.2 “Efecto de las MAPK sobre la vasodilatación de los AR β ”).

Previamente se analizó la expresión génica de los tres subtipos de AR β en los cultivos primarios de las CML y CE extraídas de la aorta, comparándola con la obtenida en aorta entera (Figuras 18A-18C).

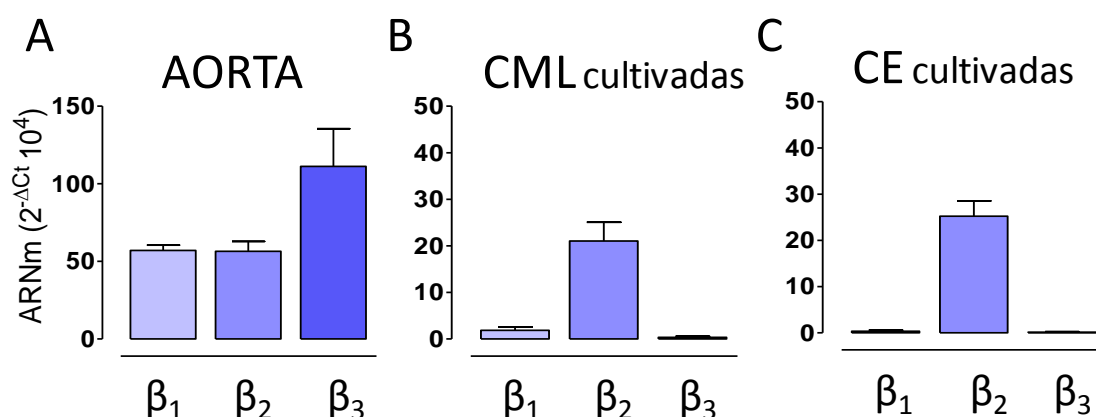


Figura 18. Niveles de expresión del ARNm de los tres subtipos de AR β en aorta entera con endotelio intacto (A), cultivos primarios de células musculares lisas (CML) (B) y células endoteliales (CE) (C) extraídas de la aorta. Los valores están normalizados usando Gapdh como gen de referencia y están expresados como la media de $2^{-\Delta Ct} 10^4 \pm$ e.e.m. de n=3-5 experimentos.

Al contrario de la aorta entera, donde ya vimos que se expresó el ARNm de los tres subtipos de AR β (Figura 18A; ver Figura 2A), en los cultivos primarios de las CML y CE se expresó mayoritariamente el subtipo β_2 , disminuyendo drásticamente la expresión de los subtipos β_1 y β_3 durante el proceso de cultivo (Figuras 18B y 18C).

La pérdida de la expresión del subtipo β_1 en los cultivos primarios, pero no en las células frescas recién aisladas (como hemos visto precedentemente, ver Figura 2C), se ha documentado ya en estudios anteriores de nuestro grupo de investigación, utilizando otros tejidos diferentes de la aorta, como la arteria caudal y el corazón de rata (Pérez Aso, 2009).

6.1 Efecto de los AR β sobre la activación de las MAPK

Para estudiar el efecto de los AR β sobre la activación de las MAPK (ERK1/2 y p38) en aorta entera y en las CML y CE extraídas de la aorta, se analizó la fosforilación de ERK1/2 y p38 mediante la técnica de inmunodetección de proteínas (Western Blot), después de la estimulación de los AR β con el agonista isoprenalina o el bloqueo de los mismos con el antagonista propranolol.

En aorta, isoprenalina (0,1; 1; 10 μ M) no modificó la fosforilación de ERK1/2 (Figura 19A). Sin embargo, en las CML, isoprenalina 0,1 μ M aumentó la fosforilación de ERK1/2 y este aumento no se produjo en presencia de propranolol 1 μ M (Figura 19B). Por el contrario, en las CE, isoprenalina 0,1 μ M disminuyó de manera significativa la fosforilación de ERK1/2 y también este efecto fue inhibido por propranolol 1 μ M (Figura 19C). Además propranolol 1 μ M, en ausencia de isoprenalina, produjo un aumento significativo de la activación de ERK1/2 en las CE (Figura 19C), pero no en las CML (Figura 19B). Como era de esperar, el inhibidor selectivo de la ERK1/2 (U0126, 10 μ M) redujo drásticamente la fosforilación de ERK1/2 en todos los tejidos ensayados: aorta entera, CML y CE (Figuras 19D-19F).

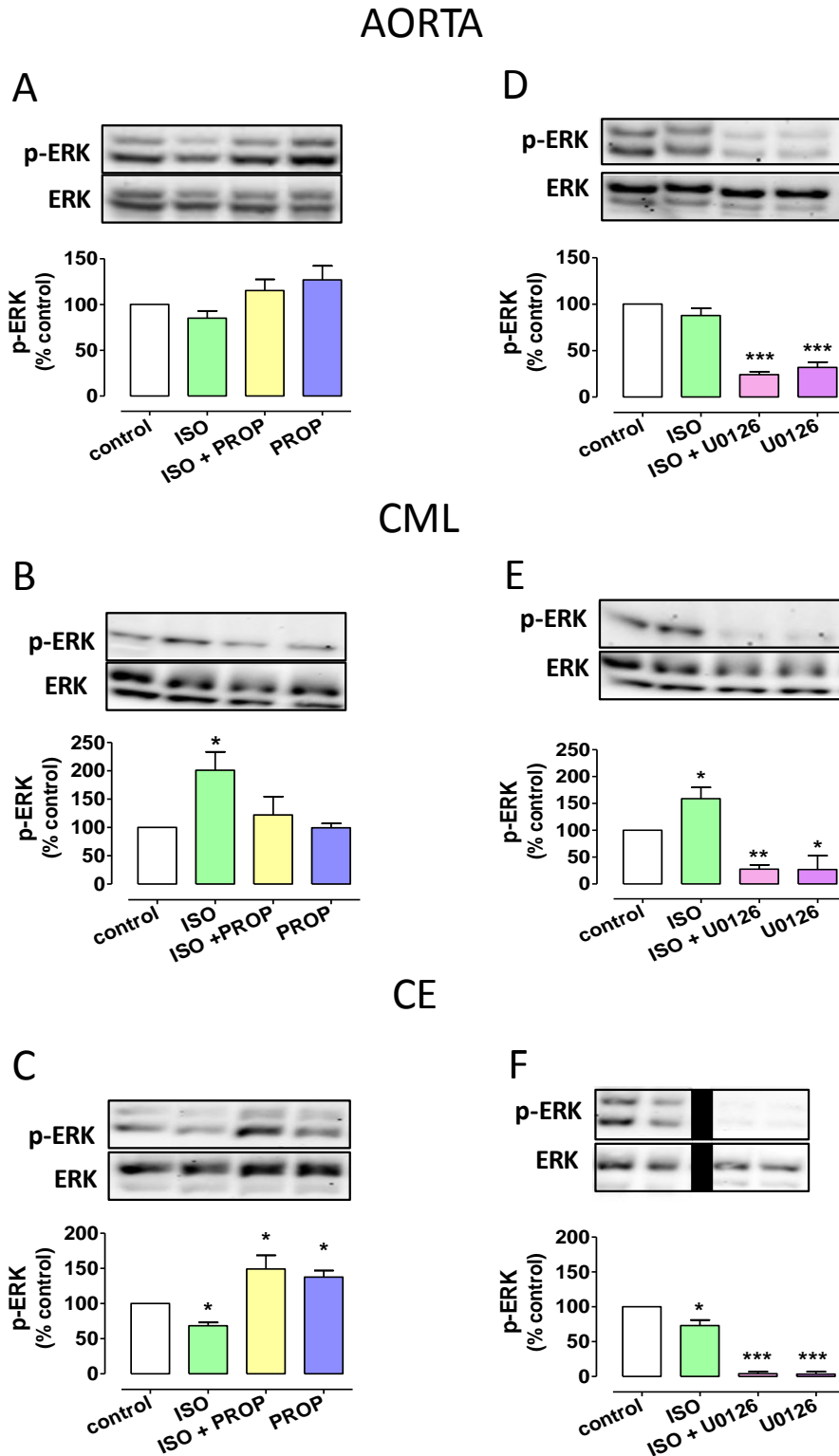
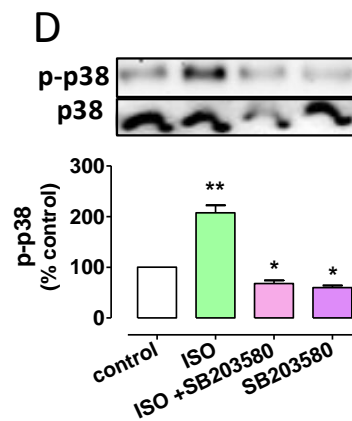
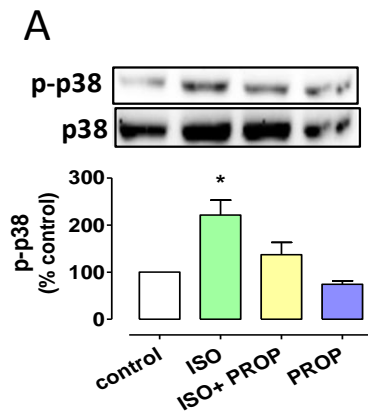


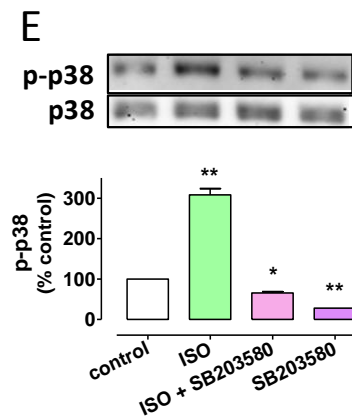
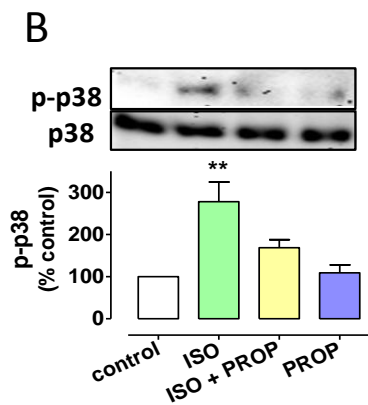
Figura 19. Western Blot y análisis densitométrico de la expresión proteica de p-ERK en presencia de isoprenalina (10 μ M en aorta y 0,1 μ M en CML y CE) y/o propranolol (1 μ M) en aorta entera (A), CML (B) y CE (C), o en presencia de isoprenalina y/o el inhibidor de ERK (U0126 10 μ M) en aorta entera (D), CML (E) y CE (F). Los datos son representativos de 3-4 experimentos.

ANOVA seguido del Test de Dunnett * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs. control.

AORTA



CML



CE

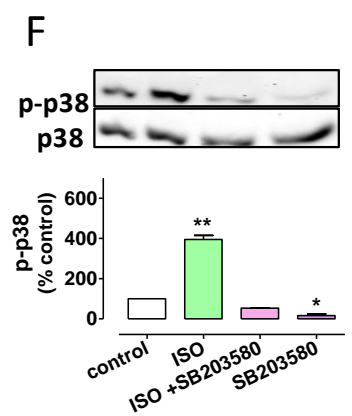
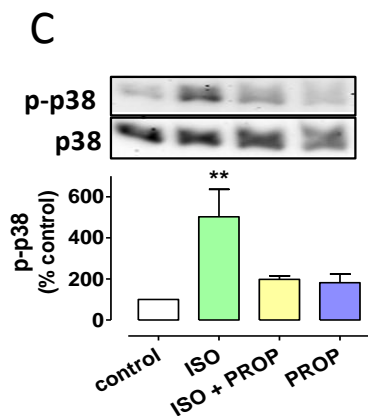


Figura 20. Western Blot y análisis densitométrico de la expresión proteica de p-p38 en presencia de isoprenalina ($10 \mu\text{M}$ en aorta y $0,1 \mu\text{M}$ en CML y CE) y/o propranolol ($1 \mu\text{M}$) en aorta entera (A), CML (B) y CE (C), o en presencia de isoprenalina y/o el inhibidor de p38 (SB203580 $10 \mu\text{M}$) en aorta entera (D), CML (E) y CE (F). Los datos son representativos de 3-4 experimentos.

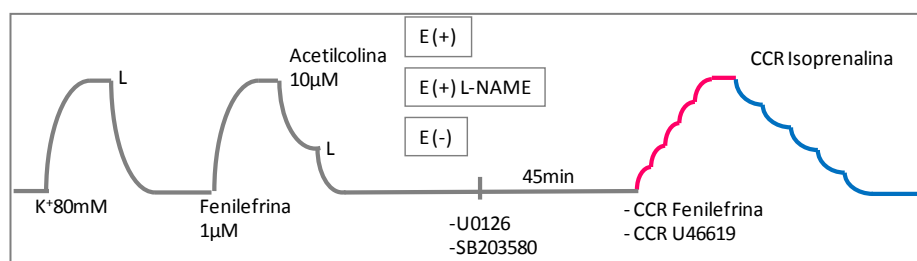
ANOVA seguido del Test de Dunnett: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs. control.

Por otra parte, isoprenalina activó la p38, produciendo un aumento en su fosforilación en aorta entera, CML y CE, y su acción fue inhibida por propranolol (Figuras 20A-20C). En este caso, también se observó que el inhibidor selectivo de la p38 (SB203580, 10 μ M) redujo drásticamente la fosforilación de esta MAPK en todos los territorios ensayados (Figuras 20D-20F).

Estos resultados indican que el efecto de los AR β sobre la activación de la ERK1/2, pero no de la p38, depende del tipo celular. Así, se observa un aumento o disminución de la activación de la ERK1/2 en CML o CE, respectivamente, y un aumento de la activación de p38 en ambos tipos celulares.

6.2 Efecto de las MAPK sobre la vasodilatación de los AR β

Para investigar si la vasodilatación de los AR β dependía de la vía de señalización de las MAPK, se realizaron estudios funcionales de reactividad vascular con los inhibidores selectivos de ERK1/2 (U0126) y p38 (SB203580). Para ello, se realizaron CCR de relajación de isoprenalina sobre las mesetas de contracción de fenilefrina o U46619, en presencia de los inhibidores U0126 y SB203580, o del correspondiente vehículo (DMSO 0,1 %). Los experimentos se efectuaron en tres condiciones distintas: en anillos con endotelio (E (+)), en ausencia o presencia de L-NAME (E (+) L-NAME), y en anillos desprovistos de endotelio (E (-)).



Esquema 7. CCR de contracción de los agentes contráctiles (fenilefrina y U46619) y CCR de relajación de isoprenalina, en presencia o ausencia de los inhibidores de ERK1/2 (U0126, 10 μ M) y de p38 (SB203580, 10 μ M), en tres condiciones experimentales: en anillos con endotelio (E (+)), en ausencia o presencia de L-NAME 100 μ M (E (+) L-NAME), y en anillos desprovistos de endotelio (E (-)).

En aorta, las CCR de contracción de los dos agentes contráctiles (fenilefrina y U46619) no fueron modificadas por la adición previa de los inhibidores U0126 10 μ M y SB203580 10 μ M, en ninguna de las condiciones experimentales, es decir E (+), E (-) o en presencia de L-NAME (Figuras 22A-22D, Tabla 9), aunque ambos agentes contráctiles produjeron un aumento significativo de la fosforilación de ERK1/2 y de p38 (Figuras 21A y 21B).

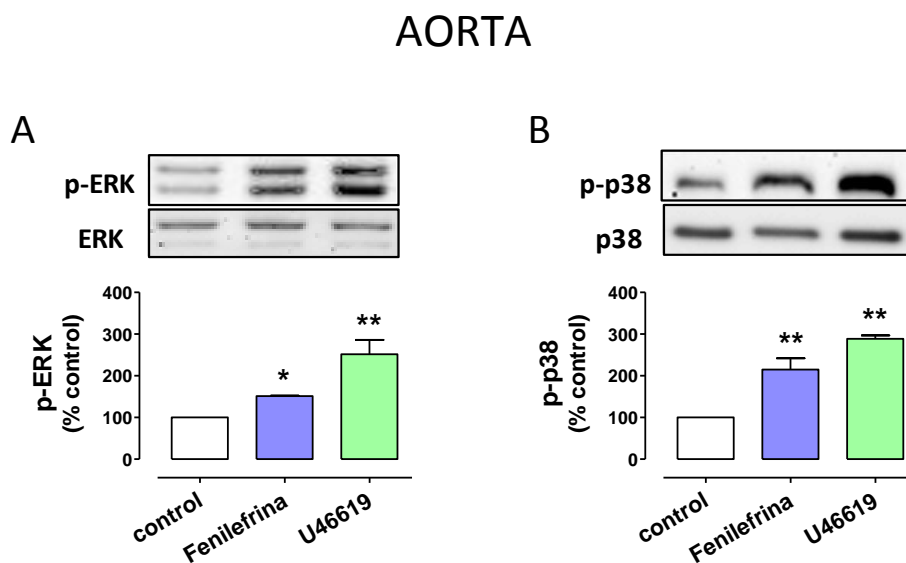


Figura 21. Western Blot y análisis densitométrico de la expresión proteica de p-ERK (A) y p-p38 (B) en presencia de fenilefrina (10 μ M) o U46619 (1 μ M). Los datos son representativos de 3-4 experimentos.

ANOVA seguido del Test de Dunnett: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs. control.

Isoprenalina produjo una relajación concentración-dependiente en todas las condiciones experimentales ensayadas (Figuras 23A-23D). En los anillos con endotelio intacto, el inhibidor de ERK1/2, U0126 10 μ M, produjo un aumento en la acción relajante de isoprenalina, desplazando a la izquierda las CCR, con un aumento significativo de la potencia en los vasos precontraídos con fenilefrina (Figura 23A, Tabla 9) y un aumento significativo del efecto máximo en los vasos precontraídos con U46619 (Figura 23C, Tabla 9). Estos resultados indican que la activación de ERK1/2 impide el efecto relajante de la isoprenalina.

AORTA

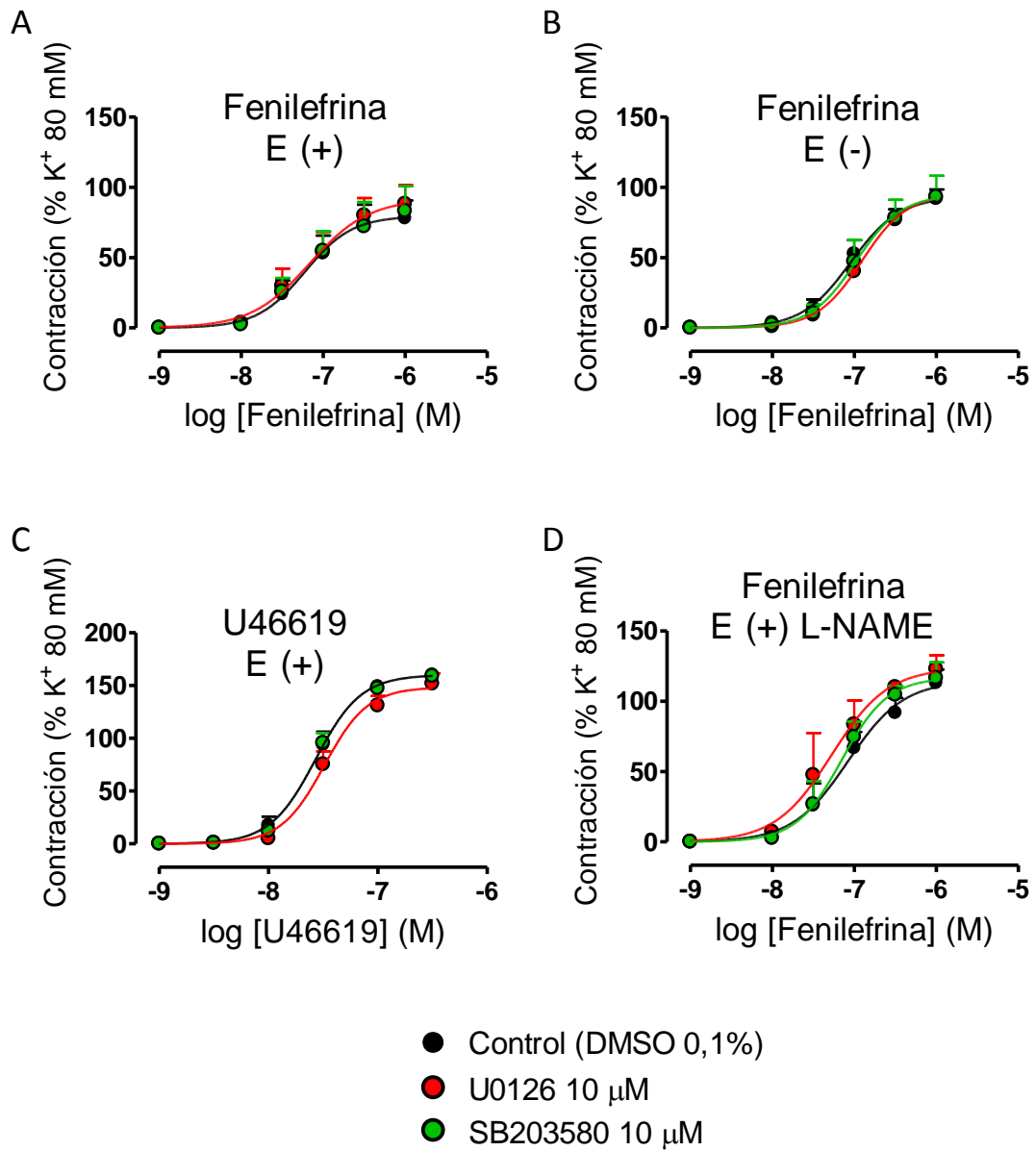


Figura 22. Efecto de los inhibidores de ERK1/2 (U0126) y p38 (SB203580) sobre las curvas de contracción de fenilefrina en aorta con endotelio (E (+)) (A), aorta sin endotelio (E (-)) (B) o con endotelio en presencia de L-NAME 100 μM (E (+) L-NAME) (D), y sobre las curvas de contracción de U46619 en aorta con endotelio (E (+)) (C).

AORTA

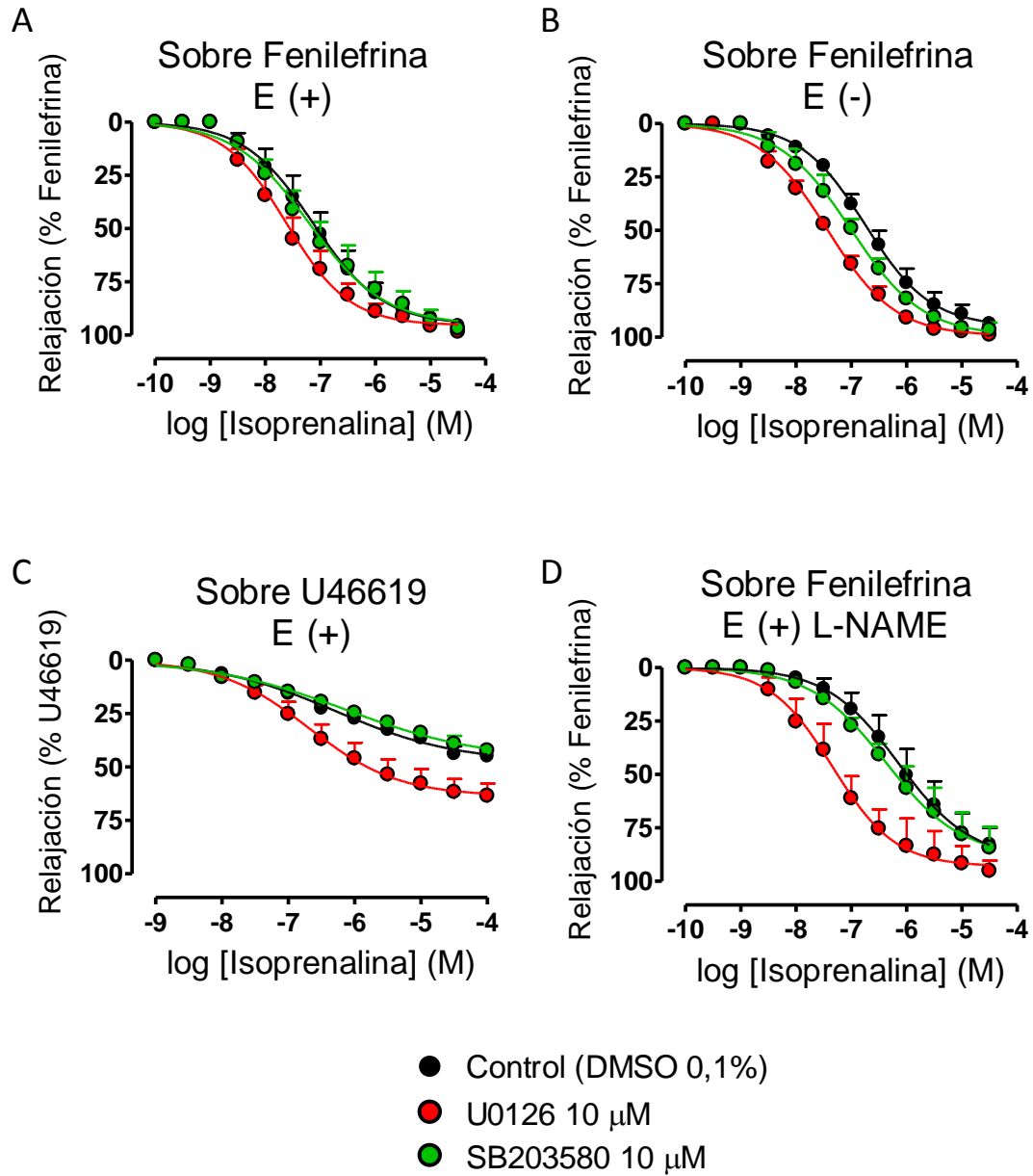


Figura 23. Efecto de los inhibidores de ERK1/2 (U0126) y p38 (SB203580) sobre las curvas de relajación de isoprenalina en los vasos precontraídos con fenilefrina 1 μ M: en aorta con endotelio (E (+)) (A), aorta sin endotelio (E (-)) (B) o con endotelio en presencia de L-NAME 100 μ M (E (+) L-NAME) (D); y en aorta con endotelio (E (+)) precontraída con U46619 0,3 μ M (C).

Resultados

Tabla 9. Parámetros obtenidos de las CCR de contracción de fenilefrina o U46619 y de las respectivas CCR de relajación de isoprenalina, en presencia del vehículo (DMSO 0,1 %) o de los inhibidores U0126 y SB203580, en aorta con endotelio (E (+)), sin endotelio (E (-)) o con endotelio en presencia de L-NAME 100 μ M (E (+) L-NAME).

AORTA					
	Fenilefrina E (+)		Isoprenalina sobre fenilefrina E (+)		n
	pEC ₅₀	E _{max} (%)	pEC ₅₀	E _{max} (%)	
Control (DMSO 0,1 %)	7,22±0,16	78,0±12,6	7,13±0,12	95,6±1,9	4
U0126 10 μ M	7,17±0,20	88,2±13,2	7,61±0,09*	98,5±0,8	6
SB203580 10 μ M	7,21±0,21	83,1±17,6	7,20±0,14	97,0±2,6	5
	U46619 E (+)		Isoprenalina sobre U46619 E (+)		n
	pEC ₅₀	E _{max} (%)	pEC ₅₀	E _{max} (%)	
Control (DMSO 0,1 %)	7,57±0,04	160,2±4,4	6,43±0,08	45,0±2,4	5
U0126 10 μ M	7,49±0,05	151,7±9,9	6,70±0,11	63,5±5,7*	6
SB203580 10 μ M	7,58±0,03	158,9±5,6	6,38±0,08	42,3±1,5	5
	Fenilefrina E (-)		Isoprenalina sobre fenilefrina E (-)		n
	pEC ₅₀	E _{max} (%)	pEC ₅₀	E _{max} (%)	
Control (DMSO 0,1 %)	7,04±0,09	92,4±6,0	6,75±0,09	93,7±3,1	7
U0126 10 μ M	6,91±0,05	92,3±3,8	7,43±0,05***	98,9±0,7	4
SB203580 10 μ M	6,98±0,15	93,2±15,0	7,00±0,09	96,6±3,4	3
	Fenilefrina E (+) L-NAME		Isoprenalina sobre fenilefrina E (+) L-NAME		n
	pEC ₅₀	E _{max} (%)	pEC ₅₀	E _{max} (%)	
Control (DMSO 0,1 %)	7,08±0,18	113,0±9,5	6,15±0,25	82,8±7,6	3
U0126 10 μ M	7,28±0,16	122,8±9,7	7,34±0,13*	95,2±4,8	3
SB203580 10 μ M	7,15±0,10	116,4±11,1	6,38±0,20	84,4±9,9	3

Los valores representan la media \pm e.e.m. de n experimentos.

pEC₅₀ = $-\log$ [fenilefrina], [U46619] e [isoprenalina] (M) necesaria para producir el 50 % de E_{max}.

E_{max} = efecto máximo contráctil de fenilefrina o U46619 expresado como % respecto a la contracción previa de K⁺ 80mM, o efecto máximo relajante de isoprenalina expresado como % respecto a la contracción previa de fenilefrina o U46619.

Test t de Student: * P < 0,05; *** P < 0,001 vs. control.

Cuando los experimentos se realizaron en anillos desprovistos de endotelio (Figura 23B) o cuando se preincubaron con el inhibidor de NOS, L-NAME (Figura 23D), se obtuvieron resultados similares: U0126 10 μ M desplazó a la izquierda las CCR de relajación de isoprenalina, con un aumento significativo de la pEC_{50} (Tabla 9), lo que demuestra que el efecto que produce la activación de la ERK1/2 sobre la vasodilatación es independiente de la presencia de endotelio, por tanto se produce a nivel de las CML, y además es también independiente de la síntesis de NO.

Sin embargo el inhibidor de p38, SB203580 10 μ M, no produjo ningún cambio significativo en la vasodilatación inducida por isoprenalina, en ninguna de las condiciones experimentales (Figuras 23A-23D, Tabla 9), excluyendo la participación de esta vía en la relajación de la isoprenalina.

DISCUSIÓN

V

- | | |
|--|-----|
| 1. LOCALIZACIÓN Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN EL EFECTO VASODILATADOR DE LOS SUBTIPOS DE AR β EN A.M.R. | 143 |
| 2. LOCALIZACIÓN Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN EL EFECTO VASODILATADOR DE LOS SUBTIPOS DE AR β EN AORTA | 146 |
| 3. PAPEL DE LOS DIFERENTES SUBTIPOS DE AR β EN A.M.R. Y EN AORTA | 152 |
| 4. AR β Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LAS MAPK EN AORTA | 156 |

La presente Tesis estudia la distribución, el papel funcional y las vías de señalización AC/AMPC/PKA y/o NO/GCs/GMPc de los tres subtipos de AR β (β_1 , β_2 , β_3) en dos territorios vasculares representativos de los vasos de resistencia (A.M.R.) y de conductancia (aorta). Para ello, se ha abordado la caracterización farmacológica de los subtipos de AR β que participan en la formación de los nucleótidos cíclicos (AMPC y/o GMPc), la implicación de estas vías de señalización en el efecto vasodilatador así como la contribución de los diferentes subtipos en dicho efecto, utilizando agonistas y antagonistas con diferente perfil de selectividad por los subtipos de AR β , y diferentes inhibidores de la formación de los nucleótidos cíclicos.

Cabe destacar que, para aclarar la variabilidad de resultados que se encuentran en la literatura respecto a la participación de uno u otro subtipo en los distintos vasos, probablemente debida a las diferentes condiciones experimentales utilizadas (Guimaraes y Moura, 2001), el presente estudio se realizó de forma sistemática, unificando las condiciones experimentales en los dos territorios (A.M.R. y aorta), adoptando los mismos protocolos y las mismas herramientas en ambos vasos.

Los resultados obtenidos evidencian, tal y como se discute en los siguientes apartados 1, 2 y 3 que, aunque el ARNm y las proteínas de los tres subtipos de AR β están presentes en la A.M.R. y en la aorta de rata, la respuesta vasodilatadora de cada territorio está mediada por distintos subtipos, estando implicadas distintas vías de señalización. Por lo tanto nuestro trabajo sugiere que los AR β tienen un papel fisiológico diferente en la regulación de los vasos de resistencia y de conductancia.

Además, dado que recientemente se ha puesto de manifiesto en diferentes líneas celulares la acción de los AR β sobre otras vías de señalización como las MAPK (ERK1/2 y p38), se ha analizado también la implicación de estas vías en la estimulación β a nivel vascular y en tejido entero, concretamente en la aorta de rata, y en cultivos primarios de los dos tipos principales de células vasculares (CML y CE). Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que los AR β tienen efectos distintos según el tipo celular (CML o CE) y así, por ejemplo en

las CML, activan la ERK1/2 y de esta manera modulan la vasodilatación, dificultándola. Estos aspectos se discuten en el apartado 4.

1. LOCALIZACIÓN Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN EL EFECTO VASODILATADOR DE LOS SUBTIPOS DE AR β EN A.M.R.

En la presente Tesis se evidencia la expresión de los tres subtipos de AR β en A.M.R., aunque con un diferente perfil de expresión génica y localización proteica en los distintos tipos celulares. Los experimentos de inmunodetección demuestran que el subtipo β_1 se localiza mayoritariamente, pero no exclusivamente, en las CML, mientras los subtipos β_2 y β_3 se localizan en las CE y en la ADV. La localización de los AR β_2 en la ADV, bordeando la túnica media, podría indicar su presencia en los nervios o en los pericitos, como se ha sugerido anteriormente para los AR β (Briones y cols., 2005). En este último trabajo, se describió la presencia de los AR β en las CML, CE y ADV, usando el ligando fluorescente BODIPY-TRM-CGP12177 (Briones y cols., 2005), pero con esta herramienta no se pudo determinar de qué subtipos se trataba, ya que no es capaz de discriminar entre los subtipos de AR β , al presentar una afinidad similar por los subtipos β_1 y β_2 (Baker y cols., 2003c). Sin embargo nosotros pudimos discriminar la localización de cada uno de los subtipos de AR β , mediante la utilización de anticuerpos específicos para cada subtipo.

A pesar de detectar la presencia de los tres subtipos en la pared vascular, los resultados obtenidos demuestran que la respuesta vasodilatadora en A.M.R. está mediada principalmente por el subtipo β_1 que, localizado en las CML, ejerce su función a través de la vía de señalización clásica de los AR β , es decir la activación de la AC y la formación de AMPc, excluyendo la participación de la vía NO/GCs/GMPc. Esta suposición está respaldada por diversas evidencias:

(i) isoprenalina y dobutamina (agonista selectivo β_1), pero no salbutamol (agonista selectivo β_2) y CL316243 (agonista selectivo β_3), aumentan los niveles de AMPc y relajan la arteria;

(ii) la acumulación de AMPc y la relajación inducidas por isoprenalina son inhibidas por propranolol y el antagonista selectivo de los AR β_1 (CGP20712A), pero no por los antagonistas selectivos de los AR β_2 o β_3 (ICI118551 o SR59230A, respectivamente);

(iii) la vasodilatación de isoprenalina es inhibida por el inhibidor de la AC (SQ22536) pero no por el inhibidor de la GCs (ODQ), lo cual excluye la participación de la vía GCs/GMPc en la relajación mediada por los AR β_1 ;

(iv) la eliminación del endotelio o el tratamiento con el inhibidor de la NOS, L-NAME, no afectan a la relajación inducida por isoprenalina, excluyendo una implicación importante del NO.

El papel principal de los AR β_1 en el control del tono vascular en arterias de resistencia concuerda con estudios previos (Graves y Poston, 1993; Chruscinsky y cols., 2001; Briones y cols., 2005; Garland y cols., 2011b) y refuerza la hipótesis de que este mecanismo podría estar alterado en pacientes que toman antagonistas de los AR β (Garland y cols., 2011b). Además, aunque en trabajos previos se había sugerido la participación del NO en la acción relajante mediada por los AR β en arterias de resistencia de rata (Graves y Poston, 1993), los resultados obtenidos en la presente Tesis excluyen la participación del NO, tal como se describe en estudios más recientes (Briones y cols., 2005; Garland y cols., 2011b), y apuntan a la activación de AC/formación de AMPc como la principal vía de señalización vinculada con la activación de los AR β_1 y su acción vasodilatadora en A.M.R.

Por lo que concierne a los AR β_2 , a pesar de presentar unos niveles de expresión génica similares a los de los AR β_1 y aunque estén localizados en las CE y en la ADV, como los AR β_3 , el perfil de actuación de los agonistas/antagonistas de estos receptores excluye su participación tanto en la formación de los nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPc) como en la vasodilatación de la A.M.R. Sin embargo, es importante señalar que en este vaso, Garland y cols. (2011b) describen un efecto hiperpolarizante mediado por los AR β_1 y β_2 endoteliales,

que es independiente de la acumulación de AMPc o de la formación de NO, y que no es esencial para la vasodilatación. Estos autores sugieren que la hiperpolarización inducida por los AR β puede estar relacionada con la capacidad de que la vasodilatación se extienda o propague a lo largo de la pared arterial a través del endotelio. Esta hipótesis podría explicar no solo la presencia, sino también la función, de los AR β_2 en las CE de las A.M.R.

El hecho de que el agonista selectivo β_3 , CL316243, aumente los niveles de AMPc y GMPc y que el antagonista selectivo β_3 , SR59230A, produzca una inhibición significativa de la formación de los nucleótidos cíclicos, sin afectar al tono contráctil, indica que los AR β_3 localizados en las CE y en la ADV están acoplados a las vías de formación de AMPc y GMPc, pero no participan en la vasodilatación mediada por los AR β . También otros estudios excluyen la participación de los AR β_3 en el control del tono vascular (Briones y cols., 2005) o de la hiperpolarización en A.M.R. (Garland y cols., 2011b).

Resumiendo, la presente Tesis evidencia por primera vez que en A.M.R. los AR β_1 (localizados en las CML y CE) y los AR β_3 (localizados en las CE y ADV) están acoplados al AMPc, pero solo los AR β_1 participan en el control del tono vascular (Imagen 15). A pesar de la controversia que existe acerca del papel del NO (Graves y Poston, 1993; Briones y cols., 2005; Garland y cols., 2011b), nuestros resultados excluyen su implicación en la respuesta relajante de los AR β en A.M.R. El subtipo β_2 , que también está presente en el vaso, parece no jugar un papel relevante en la modulación del tono vascular, pero podría desempeñar otras funciones fisiológicas, como se ha sugerido anteriormente (Garland y cols., 2011b).

2. LOCALIZACIÓN Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN EL EFECTO VASODILATADOR DE LOS SUBTIPOS DE AR β EN AORTA

Como ya se ha señalado en la Revisión Bibliográfica, aunque en aorta la relajación mediada por los AR β se haya descrito de manera muy extensa, existe una situación más compleja respecto a la A.M.R., y hay una mayor controversia acerca de la participación de cada subtipo y su relación con las vías de señalización que implican la formación de los nucleótidos cíclicos. Algunos estudios evidencian que la relajación β adrenérgica se realiza a través de una población mixta de AR β_1/β_2 (Satake y cols., 1996; Chruscinsky y cols., 2001) o completamente a través del subtipo β_2 (Ferro y cols., 2004). Pero otros estudios proponen también la participación funcional de los AR β_3 (Trochu y cols., 1999; Oliver y cols., 2009) y de los AR β atípicos, como el estado de baja afinidad de los AR β_1 (Mallem y cols., 2004, 2005a), o AR β atípicos que coexisten con los subtipos β_1 y β_2 (Brawley y cols., 2000b). Sin embargo, más recientemente estos últimos autores descartan la presencia de los AR β_3 funcionales o de los AR β_1 de baja afinidad (Brahmadevara y cols., 2003, 2004).

Estos estudios emplean condiciones experimentales diferentes entre ellos, que pueden ser la causa de la discrepancia de los resultados. En la presente Tesis, la contribución de los tres subtipos de AR β en la respuesta vasodilatadora y en las vías de señalización de la aorta, se analiza utilizando las mismas herramientas empleadas en A.M.R.

Los resultados obtenidos en los estudios de expresión muestran que en aorta los tres subtipos de AR β se localizan en todas las tunicas vasculares (intima, media y adventicia), pero los AR β_1 mayoritariamente en las CML mientras los AR β_2 en las CE. Sin embargo el subtipo β_3 , además de en las CE y en la ADV, presenta una localización peculiar dentro de la túnica media, ya que no se expresa en las CML, sino a lo largo de las laminas elásticas (LE).

La activación de los AR β_1 , aumenta los niveles de AMPc en el tejido entero pero, contrariamente a lo que ocurre en A.M.R., la vía AC/AMPc/PKA parece no tener un papel importante en la relajación de la aorta. En efecto, el

inhibidor de la AC (SQ22536), que bloquea la acumulación de AMPc, no modifica la relajación inducida por isoprenalina en este vaso, pero sí inhibe significativamente la vasorelajación en A.M.R., como ya se ha comentado. Ensayamos además el efecto de un inhibidor de la PKA (H89) y el hecho de que este compuesto no sea capaz de modificar el efecto relajante de isoprenalina, refuerza la falta de participación de la vía AC/AMPc/PKA en la relajación mediada por los AR β en este lecho vascular. Este comportamiento de los AR β_1 en aorta establece una clara diferencia respecto a la A.M.R., donde la vasodilatación depende de los AR β_1 relacionados con la activación de la AC y la formación de AMPc.

Relajación mediada por los AR β_2 endoteliales (vía del NO/GCs/GMPc)

En aorta de rata, otra vez a diferencia de lo que ocurre en la A.M.R., la respuesta vasodilatadora está mediada principalmente por el subtipo β_2 que, localizado mayoritariamente en las CE, está acoplado a la formación de GMPc. Así, diferentes evidencias sugieren la participación de la vía del NO/GCs/GMPc en la vasodilatación mediada por este subtipo:

(i) salbutamol (agonista selectivo β_2) relaja la aorta con una potencia mayor que la A.M.R. y la relajación inducida por isoprenalina es inhibida solo por el antagonista selectivo de los AR β_2 (ICI118551), pero no por los antagonistas selectivos de los AR β_1 o β_3 (CGP20712A o SR59230A respectivamente);

(ii) isoprenalina y salbutamol aumentan los niveles de GMPc y este aumento es inhibido por ICI118551;

(iii) la liberación de NO es esencial para la activación de GMPc, dado que es completamente inhibida por L-NAME;

(iv) el inhibidor de la GCs (ODQ) y el inhibidor de la NOS (L-NAME), pero no el inhibidor de la AC (SQ22536), inhiben la relajación inducida por isoprenalina;

Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Ferro y cols. (2004) que demuestran la participación del NO en la acción vasodilatadora del AR β_2 . Sin embargo, como se ha descrito en la Revisión Bibliográfica, en aorta de rata la implicación del NO y la participación del endotelio en la relajación inducida por los AR β ha sido un tema controvertido, obteniéndose en algunos casos resultados contradictorios. Algunos autores indican que la relajación depende totalmente (Gray y Marshall, 1992) o parcialmente (Van der Zyppe y cols., 2000; Brawley y cols., 2000a) de la presencia de endotelio, mientras que otros autores demuestran que es independiente del mismo (Moncada y cols., 1991b; Eckly y cols., 1994; Satake y cols., 1996). Esta discrepancia en los estudios se puede deber a las diferencias en las condiciones experimentales utilizadas, como pueden ser el agente precontráctil y/o el nivel de precontracción necesario para evidenciar un efecto relajante tras estimulación de los AR β . En la presente Tesis han sido analizados estos aspectos, que se discuten a continuación.

Influencia del nivel de precontracción sobre la relajación

El agente precontráctil utilizado ha sido la fenilefrina (agonista α_1), a una concentración que produce la máxima respuesta en ambos territorios (aorta 1 μ M y A.M.R. 10 μ M). Como ya describimos en resultados anteriores de nuestro grupo de investigación (Segura, 2010), en aorta desprovista de endotelio o incubada en presencia de L-NAME, se produce un aumento en la potencia y magnitud de la contracción inducida por fenilefrina. Resultados similares se obtienen cuando se realizan los experimentos en presencia de ODQ. Sin embargo, esta potenciación de la actividad contráctil de fenilefrina no se produce en A.M.R.

Al analizar la acción de isoprenalina en presencia de L-NAME y ODQ para demostrar la participación de la vía NO/GCs/GMPc en aorta y dado que, como se acaba de comentar, en este vaso se obtuvo una mayor repuesta contráctil a la fenilefrina, nos planteamos si ese mayor tono precontráctil inicial, y no el bloqueo de la vía NO/GCs/cGMP, podría ser el responsable de la menor respuesta relajante observada para la isoprenalina.

Por ello, como algunos autores suelen realizar en este tipo de estudios, ajustamos el tono precontráctil inicial utilizando diferentes concentraciones de fenilefrina en ausencia o en presencia de L-NAME (1 μM y 0,1 μM , respectivamente) y, en estas condiciones, las curvas de relajación de isoprenalina fueron similares. Por tanto, cuando ajustamos el nivel de precontracción, podríamos postular que el NO no participa en el efecto relajante de isoprenalina.

Sin embargo, para aclarar esta cuestión, realizamos otro protocolo experimental en el que determinamos la capacidad de L-NAME de revertir el efecto relajante de isoprenalina, adicionándolo al finalizar la curva de relajación de este agonista (Esquema 3). Comparamos también la capacidad del L-NAME de revertir el efecto de otros agentes que relajan a través del NO endógenamente liberado por el endotelio (acetilcolina), o el NO añadido de forma exógena (nitroprusiato sódico: un agente donador de NO) (Esquema 3).

Los resultados obtenidos nos confirman la participación exclusiva de la liberación de NO endógeno en la acción relajante de la acetilcolina, ya que se produjo una reversión completa de la respuesta relajante. Sin embargo, el L-NAME no fue capaz de revertir la vasodilatación inducida por nitroprusiato sódico, lo que nos confirma que este agente relaja por un mecanismo independiente de la formación de NO endógeno. Finalmente, por lo que respecta a la relajación inducida por isoprenalina, ésta fue parcialmente revertida por L-NAME, lo que nos indica que los AR β relajan por mecanismos tanto dependientes como independientes de la liberación de NO endógeno.

El conjunto de estos resultados demuestra que, según las condiciones experimentales utilizadas, se pueden obtener conclusiones diferentes respecto a la participación del NO, lo que justificaría la discrepancia de los datos descritos en la literatura. Según nuestro estudio, podemos concluir que el NO sí participa, en parte, en el efecto relajante mediado por la estimulación de los AR β en aorta.

Relajación mediada por los AR β_2 musculares (vía del NO/GCs/GMPc)

Además, se examinó la participación del endotelio analizando el efecto de la isoprenalina y del agonista β_2 salbutamol en aorta desprovista del mismo, obteniéndose también una disminución en la respuesta relajante de ambos agonistas, aunque el desplazamiento en las curvas fue menor que el obtenido cuando los anillos se preincubaban con L-NAME. Estos resultados sugieren que el NO que se libera tras la activación de los AR β_2 tiene en parte un origen endotelial, pero también no endotelial, ya que, como acabamos de señalar, las curvas de relajación de isoprenalina y salbutamol son desplazadas a la derecha por L-NAME en mayor medida que por la eliminación del endotelio. Asimismo, el antagonista selectivo β_2 , ICI118551, fue capaz de desplazar la curva de relajación de isoprenalina en anillos desprovistos de endotelio, pero no en los anillos pretratados con L-NAME. Por tanto, podemos concluir que los AR β_2 localizados en las CML contribuyen a la respuesta relajante a través de la liberación de NO. La participación del NO liberado por las CML, como mecanismo complementario al producido por los AR β_2 endoteliales, está respaldado también por la presencia de ARNm de eNOS en las CML aisladas de la aorta.

Relajación mediada por los AR β_1 musculares de baja afinidad

La participación de los AR β_1 de baja afinidad se puso de manifiesto cuando los experimentos se realizaron en los anillos sin endotelio o en presencia de L-NAME. En estas condiciones el antagonista selectivo β_1 , CGP20712A, fue capaz de inhibir la respuesta relajante de isoprenalina, lo que demuestra la participación del subtipo β_1 localizado a nivel muscular en el efecto relajante. Sin embargo, el perfil farmacológico de este subtipo se corresponde mejor con el estado de baja afinidad del AR β_1 , dado que la afinidad aparente para este antagonista es más baja en aorta (6,45-6,59) que en A.M.R. (7,80). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores, que también sugieren la participación del estado de baja afinidad de los AR β_1 en la vasodilatación de la aorta de rata (Mallem y cols., 2004, 2005a, 2005b).

Relajación mediada por los AR β_3 endoteliales (vía del NO/GCs/GMPc)

En relación con el papel de los AR β_3 en aorta, nuestros resultados confirman y amplían estudios previos que habían ya propuesto su presencia y función en este vaso (Trochu y cols., 1999; Rautureau y cols., 2002). En esta Tesis se ha detectado una mayor expresión del ARNm del AR β_3 respecto a los AR β_1 y β_2 y aunque se ha encontrado su presencia en CE, como también otros autores han descrito (Vanhoutte, 2001; Rautureau y cols., 2002), se encuentra mayoritariamente localizado a lo largo de la LE.

A pesar de la abundante expresión observada para este subtipo, su papel en la vasodilatación no parece ser tan relevante como el del AR β_2 . Su participación funcional solo se detecta con el uso de agonistas selectivos de los AR β_3 (CL316243 y SR58611A), con los que, o no se obtiene el 100% de relajación (CL316243) o se obtienen curvas bifásicas (SR58611A) de las que solo el 30% corresponde a una población de AR β_3 . El uso de L-NAME y de los agonistas selectivos de los AR β_3 , así como del antagonista selectivo (SR59230A), en la acumulación de GMPc y en la relajación mediada por los AR β , demuestra que esta respuesta está acoplada a la vía del NO/GCs/GMPc.

Además, al contrario de los AR β_2 , la vasodilatación inducida por los AR β_3 desaparece en ausencia de endotelio, lo que sugiere que la respuesta relajante es totalmente dependiente del endotelio y del NO de origen endotelial, por lo que se puede excluir la participación de los receptores localizados a lo largo de la LE en la relajación. Se ha descrito que un aumento de GMPc estimula la producción de elastina en fibroblastos de ligamentos (Mecham y cols., 1985), lo que nos lleva a suponer que los AR β_3 presentes en la LE podrían participar, a través del aumento del GMPc, en la producción de elastina. De todas formas, la valoración del hipotético papel de estos receptores sobre la producción de elastina no constituye un objetivo de esta Tesis.

En conjunto, el estudio en aorta indica que la vasodilatación mediada por los AR β se produce mayoritariamente a través del subtipo β_2 , presente tanto en

las CML como en las CE, dependiendo en gran parte de la producción de NO en ambos tipos celulares. Pero además el subtipo β_1 de baja afinidad, presente en las CML, también participa a través de un mecanismo independiente del NO. Por último, el subtipo β_3 , presente en las CE, colabora en menor medida en la respuesta relajante, y lo hace de manera dependiente de la producción de NO endotelial (Imagen 15).

3. PAPEL DE LOS DIFERENTES SUBTIPOS DE AR β EN A.M.R. Y AORTA

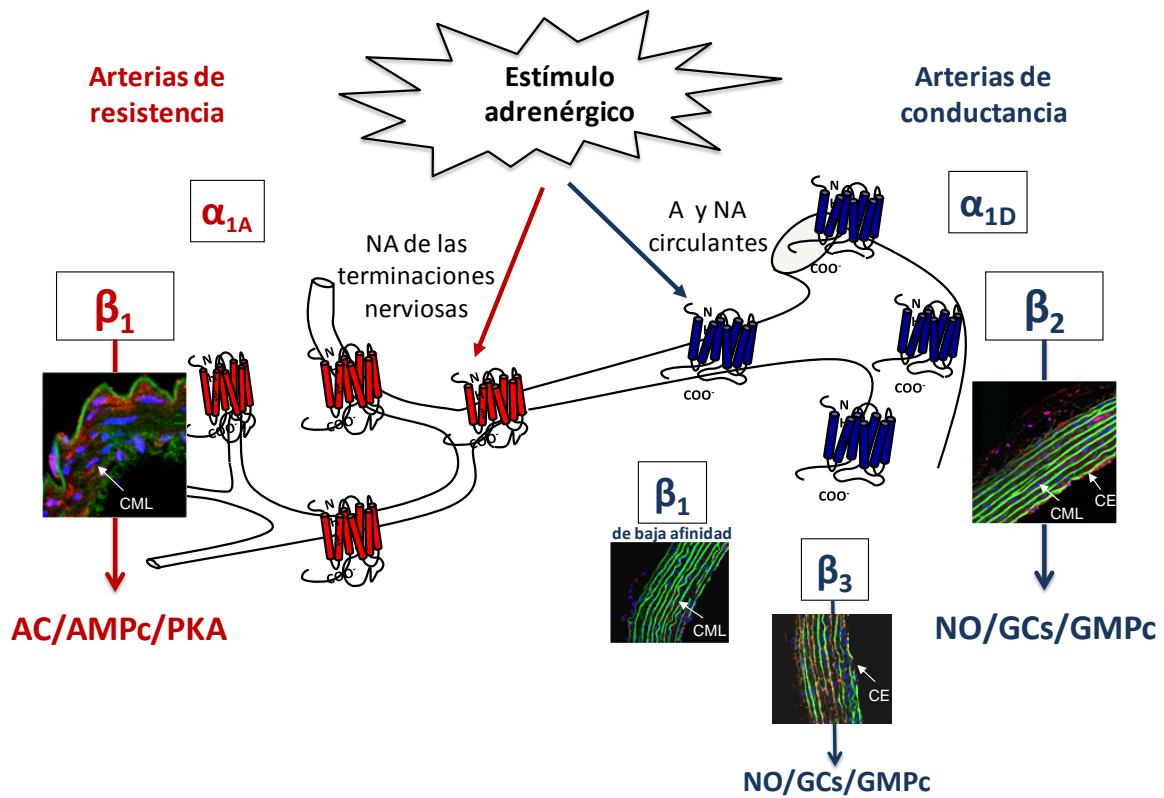
En la Imagen 15 se muestra un esquema de la participación y el posible papel fisiológico de los subtipos de AR β junto con los AR α_1 (Flacco et al., 2013) en ambos territorios vasculares.

Como ya se ha comentado, en la presente Tesis demostramos que los tres subtipos de AR β se expresan en A.M.R. y aorta de rata. Los AR β_1 , localizados en las CML y actuando a través de la vía clásica de la AC/AMPC/PKA, son el subtipo mayoritariamente responsable de la relajación en A.M.R. Los AR β localizados en las CE no participan en la respuesta relajante de este vaso. En cambio, en aorta los AR β_2 y β_3 localizados en las CE, junto con los AR β_2 presentes en las CML, son los subtipos principalmente responsables de la relajación, todos actuando a través de la vía del NO/GCs/GMPc. En aorta, el subtipo β_1 , localizado en las CML, participa también en la relajación, pero no a través de la vía del GMPc, ni probablemente del AMPC. Su actividad se corresponde con el estado de baja afinidad de este receptor y se manifiesta de manera más clara en ausencia de endotelio.

Es interesante observar como los AR β_3 endoteliales se acoplan al GMPc en ambos vasos, pero solo modulan la vasodilatación en aorta, mientras que los AR β_2 no se acoplan al AMPC en ningún vaso, y solo modulan la vasodilatación en aorta, a través de la vía del NO/GCs/GMPc. Por último, los AR β_1 musculares solo se acoplan al AMPC, y no al GMPc, en ambos vasos, pero modulan la vasodilatación principalmente en A.M.R.

Los resultados obtenidos evidencian la función de los AR β endoteliales en el control de la vasodilatación en un vaso de conductancia como la aorta, pero no en un vasos de resistencia como la A.M.R., y resaltan el diferente papel fisiológico que juegan los AR β en el control del tono contráctil de los vasos de conductancia y de resistencia. En un vaso pobremente innervado como la aorta, son los AR β_2 localizados en el endotelio y con una mayor afinidad por la adrenalina circulante (Westfall y Weston, 2007), los receptores que modulan principalmente el tono contráctil y la distribución del flujo sanguíneo. Así las CE son la primera diana de la acción vascular de la adrenalina. A ese respecto, recientemente se ha demostrado que las células endoteliales de aorta son capaces de sintetizar y liberar catecolaminas (Sorriento y cols., 2012). Además los AR β_3 endoteliales y los AR β_1 y β_2 localizados en las CML también participan en la regulación del tono de la aorta. Por el contrario, en los vasos de resistencia altamente innervados, son los AR β_1 localizados en las CML y con una mayor afinidad por la noradrenalina liberada de las terminaciones nerviosas, los receptores que participan en la respuesta vasodilatadora. Estos resultados sugieren también la presencia de una señalización coordinada, a través de diferentes subtipos de AR β localizados en las diferentes capas, en la regulación del tono de los vasos de conductancia pero no de los vasos de resistencia. Dada la extendida utilización clínica de los bloqueantes no selectivos y selectivos de los AR β , estos hallazgos podrían ser de importancia clínica.

Nuestros resultados también evidencian que la respuesta contráctil tras la estimulación de los AR α_1 con fenilefrina se encuentra modulada por el endotelio y el NO en un vaso de conductancia como la aorta, pero no en uno de resistencia como la A.M.R. Así tanto la presencia de ODQ o L-NAME como la ausencia de endotelio produce un aumento en la potencia y el efecto máximo de la fenilefrina en aorta pero no en A.M.R. Este efecto observado en aorta se puede producir bien porque exista una liberación basal de NO o bien porque se active su liberación por el agonista α_1 . Se ha descrito la presencia de AR α_1 en las CE (Vanhoutte, 2001; Daly y cols., 2010; Daly y McGrath, 2011) y diversos autores han demostrado que la contracción causada por la activación del AR α_1



A.M.R.

- Vaso altamente inervado.
- Rol para AR musculares.
- Contracción mediada por AR α_{1A} .
- Relajación mediada por:
- ✓ AR β_1 muscular (vía AC/AMPC/PKA).

AORTA

- Vaso pobremente inervado.
- Rol para AR endoteliales.
- Contracción mediada por AR α_{1D} .
- Relajación mediada por:
- ✓ AR β_2 endotelial (vía NO/GCs/GMPc)
- ✓ AR β_2 muscular y AR β_3 endotelial (vía NO/GCs/GMPc)
- ✓ AR β_1 muscular de baja afinidad (independiente del NO).

Imagen 15. Distribución y tipo de respuesta funcional de los AR α_1 y β en los vasos de resistencia (A.M.R.) y de conductancia (aorta).

A: adrenalina; AMPC: adenosin monofosfato cíclico; A.M.R.: arteria mesentérica de resistencia; CE: célula endotelial; CML: célula muscular lisa; GSc: guanilato ciclase soluble; GMPc: guanosin monofosfato cíclico; NA: noradrenalina; NO: óxido nítrico; PKA: proteína cinasa A.

está modulada por la relajación producida por el NO endotelial (Jones y cols., 1993; Kaneko y Sunano, 1993; Amerini y cols., 1995; Zschauer y cols., 1997; Boer y cols., 1999; Tuttle y Falcone, 2001; Gurdal y cols., 2005). Dado que se ha postulado que es el AR α_{1D} el responsable de la liberación de NO (Filippi y cols., 2001), el diferente comportamiento de los vasos puede deberse al subtipo de AR α_1 implicado en la respuesta contráctil en cada territorio.

Resultados de nuestro grupo de investigación han demostrado la participación mayoritaria del subtipo α_{1D} en la aorta (Gisbert y cols., 2000; Gisbert y cols., 2003; Martí y cols., 2005; Flacco y cols., 2013) y del subtipo α_{1A} en la A.M.R. (Martí y cols., 2005) lo que, como se ha comentado en la Revisión Bibliográfica, determina las características contráctiles del vaso en el que se expresan (respuestas rápidas que desaparecen de forma rápida tras la eliminación del agonista y que permiten un ajuste fino del tono contráctil en A.M.R.; respuestas lentas que desaparecen también de forma lenta tras la eliminación del agonista en aorta que evitan cambios bruscos en el calibre de este vaso) (Ziani y cols., 2002; Flacco y cols., 2013; ver Imagen 4 de la Revisión Bibliográfica). La liberación de NO tras la activación de los AR α_{1D} en aorta contribuiría también a regular el tono contráctil contrarrestando en parte la acción vasoconstrictora del agonista adrenérgico, y evitando de esta forma que se produzcan cambios bruscos en el calibre de los vasos de conductancia que pudieran comprometer el flujo sanguíneo en situaciones de máxima estimulación.

En conclusión estos resultados evidencian una participación del endotelio en la modulación del tono vascular por los AR α_1 y β en un vaso de conductancia pero no en uno de resistencia.

4. AR β Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LAS MAPK EN AORTA

Como ya se ha comentado, evidencias experimentales recientes han puesto de manifiesto que la estimulación de los AR β activa también la vía de las MAPK (ERK1/2 y p38) en diferentes tipos celulares (Evans y cols., 2010), pero se conoce poco sobre la activación de estas vías por parte de los AR β en las células vasculares y en tejido nativo y, especialmente, el impacto que puedan tener sobre la respuesta funcional vascular. En la presente Tesis se ha analizado por un lado el efecto de la activación de los AR β en la fosforilación de la ERK1/2 y p38 en aorta y en cultivos primarios de los dos tipos celulares principales de los vasos, CE y CML, y por otro lado el efecto de las MAPK en la vasodilatación mediada por los AR β en aorta.

En primer lugar se determinó la expresión génica de los subtipos de AR β en los cultivos primarios de CML y de CE obtenidos de aorta, comparándola con la obtenida en tejido intacto. Los resultados obtenidos muestran que en cultivos primarios de CE y CML de aorta se expresa mayoritariamente el subtipo β_2 a diferencia de lo que ocurre en el vaso entero donde se expresan los 3 subtipos.

La pérdida de la expresión del subtipo β_1 en los cultivos primarios de CML, pero no en las células frescas recién aisladas, se ha documentado ya en estudios anteriores de nuestro grupo de investigación, utilizando otros tejidos diferentes de la aorta, como la arteria caudal y el corazón de rata (Perez-Aso, 2009). Resultados similares han sido descritos también para el AR α_{1A} , desapareciendo su expresión en cultivos primarios de las arterias aorta y caudal, lo que no ocurre para el subtipo α_{1D} que mantiene su expresión en CML cultivadas (Perez-Aso, 2009). Este hecho puede deberse a que la funcionalidad de los subtipos de AR β_1 y α_{1A} , pero no de los subtipos β_2 y α_{1D} , esté relacionada, en su entorno fisiológico, con los procesos de señalización en estructuras complejas como es el caso de la señalización neuronal. De hecho, Stassen y cols. (1998) describen una correlación positiva entre la presencia de terminales nerviosas adrenérgicas y los AR α_{1A} . Se ha descrito también la presencia de AR β en terminaciones nerviosas de A.M.R. (Briones y cols., 2005).

Por tanto, el conjunto de estas evidencias indican que la pérdida de la expresión de los AR β_1 y α_{1A} tras el aislamiento de las CML y su posterior cultivo podría estar relacionada con la destrucción de la señalización adrenérgica. De hecho, es interesante resaltar que estos dos subtipos de AR son los principales responsables de la contracción y relajación mediada por la estimulación de los AR α_1 y β en un territorio altamente inervado como la A.M.R., mientras que los subtipos α_{1D} y β_2 , cuya expresión se mantiene en el cultivo, son los mayoritariamente implicados en la contracción y relajación en un vaso con menor inervación como la aorta (presente Tesis, Kenny y cols., 1995; Gisbert y cols., 2000, 2003; Briones y cols, 2005; Marti y cols., 2005; Flacco y cols., 2013).

Por lo que respecta al subtipo β_3 , también se observa una pérdida en la expresión del mismo en el cultivo primario de CE. Sin embargo, en este caso, no se puede excluir que esta pérdida sea debida a la manipulación de las muestras para realizar el aislamiento de las células ya que su expresión en CE frescas, recién aisladas, no se ha podido determinar por razones técnicas (muestra insuficiente para determinar la expresión génica).

Efecto de los AR β sobre la activación de las MAPK

Los resultados obtenidos muestran que la estimulación de los AR β no modifica la fosforilación de ERK1/2 en aorta, pero sí la modifica, y de manera diferencial, en los cultivos primarios de CML y de CE aisladas de aorta. De hecho, isoprenalina muestra un efecto dual, aumentando la fosforilación de ERK1/2 en las CML, y disminuyéndola en las CE. Por otro lado, isoprenalina aumenta la fosforilación de la p38 en aorta y en ambos tipos celulares (CML y CE).

El diferente comportamiento que ejercen los AR β sobre la fosforilación de ERK1/2 en CML y CE podría depender del subtipo de receptor presente en cada tipo celular, dado que se ha descrito un aumento en la fosforilación de ERK1/2 en cardiomiocitos que expresan los AR β_1 y una disminución en cardiomiocitos que expresan los AR β_2 (Zheng y cols., 2004). Pero este no es el caso de nuestro estudio, ya que como hemos comentado, el AR β_2 es el subtipo

predominantemente expresado en ambos tipos celulares y por tanto, el efecto descrito es debido a la activación de los AR β_2 y no de los subtipos β_1 y β_3 que se expresan pobremente en estas células.

Estos resultados sugieren que el diferente impacto de la estimulación de los AR β_2 sobre la actividad de ERK1/2 depende del tipo celular. De hecho, estudios anteriores muestran que la activación de los AR β con isoprenalina induce un aumento en la fosforilación de ERK1/2 en diferentes tipos celulares (para revisión ver: Evans y cols., 2010), como células HEK293 (Shenoy y cols., 2006), astrocitos primarios (Du y cols., 2010) y fibroblastos cardiacos (Kim y cols., 2002) y dérmicos (Pullar y Isseroff, 2006). Sin embargo, otros estudios han evidenciado que la fosforilación de ERK1/2 disminuye en queratinocitos (Pullar y cols., 2003), células epiteliales de la córnea (Ghoghawala y cols., 2008) y CML del detrusor (Klausner y cols., 2009). En el presente trabajo se evidencia por primera vez que este efecto dual se produce en tipos celulares diferentes pero provenientes del mismo tejido.

Por otra parte, la fosforilación de p38 que hemos observado después de la estimulación de los AR β_2 en el tejido y en las células vasculares, concuerda con otros estudios en diferentes tipos celulares que expresan los AR β_2 , como cardiomiocitos (Zheng y cols., 2000; Magne y cols., 2001) linfocitos B (McAlees y Sanders, 2009) y células HEK293 (Gong y cols., 2008), o que expresan los AR β_3 , como adipocitos bovinos (Cao y cols., 2001; Mizuno y cols., 2002) y células CHO-K1 (Sato y cols., 2007).

Se ha comprobado también que los efectos de la isoprenalina sobre las MAPK son debidos a la estimulación de los AR β , ya que son inhibidos por el antagonista de los AR β , propranolol. Es interesante destacar el efecto del propranolol en las CE dónde, no solo revierte la disminución de la fosforilación de la ERK1/2 inducida por isoprenalina, sino que es capaz de aumentar por sí mismo, la fosforilación de ERK1/2. Sin embargo, en las CML, propranolol inhibe el efecto de la isoprenalina sobre la fosforilación de la ERK1/2 y no ejerce ningún efecto por sí mismo. Estos resultados indican de nuevo un efecto

dependiente del tipo celular. Otros autores han descrito que el bloqueo de los AR β_2 aumenta la actividad de ERK1/2 en diferentes líneas celulares, que expresan establemente los AR β_2 (Azzi y cols., 2003; Baker y cols., 2003b), pero también en células epiteliales de la córnea murina (Ghoghawala y cols., 2008), fibroblastos dérmicos y queratinocitos (Pullar y cols., 2012).

En la Imagen 16 se resumen las acciones de la estimulación de los AR β sobre las MAPK en CML y CE. Los resultados muestran por primera vez el efecto dual de los AR β_2 sobre la fosforilación de ERK1/2 en células vasculares aisladas, aumentándola en las CML y disminuyéndola en las CE. Además, el bloqueo de los AR β_2 aumenta la actividad de ERK1/2 solamente en las CE. Por el contrario, la activación de los AR β_2 aumenta la fosforilación de p38 en ambas células vasculares así como en tejido intacto.

El efecto positivo del antagonista de los AR β , propranolol, en la vía de señalización de la ERK1/2, es de especial interés, ya que recientemente se ha evidenciado que algunos agonistas, y entre ellos los que actúan a nivel de los AR β , pueden mostrar selectividad funcional o agonismo sesgado (“biased agonism”) estabilizando distintas conformaciones activas de los receptores que, a su vez, pueden producir diferentes eficiencias de acoplamiento a varios efectores. De esta forma, algunos compuestos que actúan como antagonistas de la señalización de AMPc se comportan en realidad como agonistas sesgados capaces de activar la vía de las MAPK (Drake y cols., 2008; Galandrin y cols., 2008; Evans y cols., 2010; Lutrell y Gesty-Palmer, 2010). Nuestros resultados evidencian este hecho en un entorno nativo, ya que el propranolol se comporta como un antagonista frente a la relajación vascular, la producción de AMPc y/o GMPc y la actividad de p38 tras la estimulación de los AR β en la aorta de rata, mientras que promueve un aumento en la actividad de la ERK1/2 en CE aisladas de la aorta.

Efecto de las MAPK sobre la vasodilatación inducida por los AR β

Otro aspecto analizado ha sido la implicación de las vías de señalización de las MAPK en la acción vasodilatadora mediada por los AR β . Para ello, se ha determinado el efecto de los inhibidores de las MAPK sobre la relajación de isoprenalina.

El análisis del papel de las MAPK sobre la reactividad vascular muestra que la contracción de los anillos de aorta inducida por fenilefrina o U46619 no es modificada por la inhibición de ERK1/2 ni de p38, usando los inhibidores selectivos U0126 y SB203580, respectivamente. Sin embargo, los dos agentes contráctiles producen un aumento en la fosforilación de ambas cinasas, ERK1/2 y p38. La mayoría de los estudios muestran que la ERK1/2 puede desempeñar un papel pro-contráctil en diferentes territorios vasculares, produciéndose, al inhibir su actividad, una disminución en la contracción inducida por diferentes agentes como los agonistas de los AR α_2 , la endotelina, la serotonina o la angiotensina II (Touyz y cols., 1999, 2002; Roberts, 2001, 2004; Bhattacharya y Roberts, 2003; Kwon y cols., 2003, 2004; Kim y cols., 2004; Lee y cols., 2007).

No obstante, respecto a su influencia en la respuesta mediada por los AR α_1 , los resultados descritos en la literatura son divergentes y se ha descrito una reducción en la respuesta contráctil en arteria de útero bovino (Xiao y Zhang, 2002; Xiao y cols., 2004), en arteria carótida de rata (Tsai y Jiang, 2005) y en aorta de ratón (Bhattacharya y cols., 2011), pero no en aorta y A.M.R. de rata (Giachini y cols., 2010). Tampoco se ha descrito un cambio en la contractilidad de U46619 en aorta y vena cava de rata (Thakali y cols., 2007) y vena palmar de porcino (Uhiara y cols., 2009), aunque estos últimos autores describen una ligera disminución de la contracción en arteria coronaria porcina. En nuestras condiciones experimentales, aunque tanto fenilefrina como U46619, activan ERK1/2 y p38, podemos excluir la participación de estas vías de señalización en su efecto contráctil.

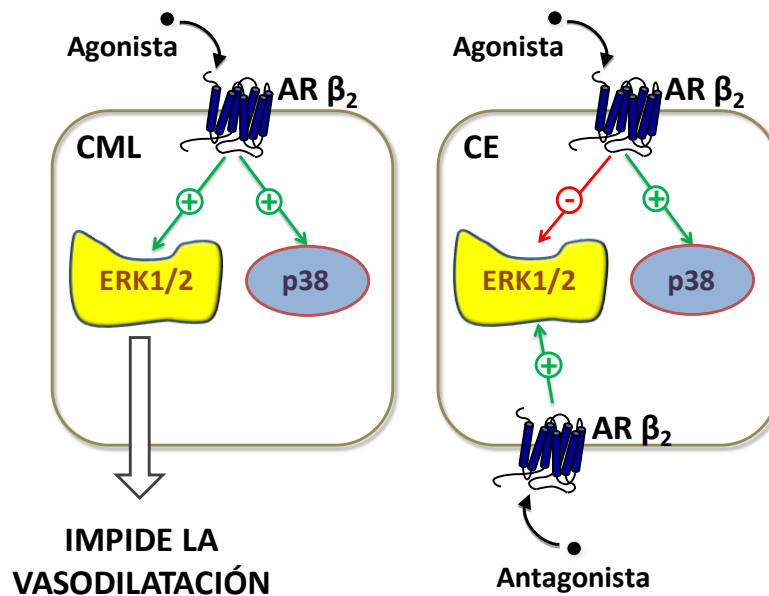


Imagen 16. Efecto de los AR β₂ sobre las MAPK (ERK1/2 y p38) y efecto de ERK1/2 sobre la vasodilatación.

CE: célula endotelial; CML: célula del musculo liso.

Sin embargo, cuando analizamos el efecto de la inhibición de las MAPK sobre la respuesta relajante inducida por los AR β, la inhibición de ERK1/2, pero no de p38, aumenta la relajación de isoprenalina en aorta, indicando que en condiciones fisiológicas ERK1/2 ejerce un efecto pro-contráctil, que se opone específicamente a la relajación inducida por la activación de los AR β. Resultados similares han sido descritos en arterias coronarias y vena palmar porcina (Uhiara y cols., 2009). Estos autores demostraron que el efecto era específico para los AR β₂ ya que no se observó al utilizar agonistas β₁ u otros agentes vasodilatadores como forskolina. Otro trabajo más reciente, describe un efecto similar en bronquiolos periféricos (Lelliott y cols., 2012).

Nuestro estudio muestra además, que este efecto es independiente del endotelio y del NO, dado que no es modificado al eliminar el endotelio o al inhibir la producción de NO con L-NAME. En conjunto, estos resultados sugieren que en las CML de aorta la activación de los AR β₂ promueve la dilatación de la arteria, pero al mismo tiempo activa la vía de la ERK1/2 que al impedir la vasodilatación actúa como un mecanismo de control por retroalimentación

negativa (ver Imagen 16), que podría prevenir una excesiva vasodilatación en vasos de conductancia.

En algunas enfermedades, como hipertensión y diabetes, se ha descrito que existe una disminución en la respuesta vasodilatadora mediada por los AR β (Borkowski y cols., 1992; Harada y cols., 1999; Chen y Doggrell, 2002; Grisk y cols., 2007; Oliver y cols., 2009) y además, en las mismas patologías, se ha descrito un aumento en la actividad de la ERK1/2 en el músculo liso vascular (Touyz y cols., 2002; Kim y cols., 2005; Matsumoto y cols., 2006). Teniendo en cuenta estas evidencias, los datos de nuestro estudio en aorta, que coinciden con los obtenidos por Uhiara y cols. (2009) en otros territorios vasculares, abren la posibilidad de que la disminución en la respuesta a los AR β en estas patologías se deba en parte a un aumento en la actividad de la ERK1/2.

CONCLUSIONS

VI

1. The expression of the three β -adrenoceptor (β -AR) subtypes (β_1 , β_2 and β_3) has been detected in mesenteric resistance artery (MRA) and aorta, although with a different profile of gene expression between vessels and protein localization in the different cell types (endothelial, smooth muscle cells and adventitia).
2. In MRA, despite the presence of the three β -AR subtypes, β_1 -AR, located in smooth muscle cells and acting through the adenylyl cyclase/cAMP pathway, are primarily responsible for vasodilatation. The β -ARs localized in endothelial cells do not participate in the relaxant response in this vessel.
3. In aorta, β -ARs-mediated vasodilatation is driven by endothelial β_2 - and β_3 -ARs, but also by the β_2 -ARs present in smooth muscle cells, and is coupled to the NO/soluble guanylyl cyclase/cGMP pathway. The β_1 -subtype, localized in smooth muscle cells, also contributes to vasodilatation, but not through the cGMP pathway; its activity corresponds to a low-affinity state of this receptor and it becomes more evident in the absence of endothelial β -ARs. These findings suggest a complex and coordinated signalling through different β -ARs subtypes located along different layers in regulating the adrenergic contractile tone of conductance but not resistance vessels.
4. Endothelial β -ARs contribute to vasodilatation in a conductance vessel such as aorta, but not in a resistance artery and could help to understand the different physiological role played by β -AR subtypes in regulating the vascular tone. In MRA, a highly innervated resistance vessel, β_1 -ARs located in smooth muscle cells and having a greater affinity for norepinephrine, which is released by the nerve endings, are mainly involved in the vasodilator response. In contrast, in aorta, a poorly innervated conductance vessel, β_2 -ARs located in the endothelium, being the first target and having a greater affinity for circulating adrenaline, modulate the vessel tone and the blood flow distribution.
5. β_2 -ARs stimulation differentially modulates MAPK (ERK1/2 and p38) activation in smooth muscle and endothelial cells from aorta. β_2 -ARs increase p38 phosphorylation in intact vascular tissue and both cell types,

Conclusions

while it has a dual effect on ERK1/2 phosphorylation, increasing it in smooth muscle cells and decreasing it in endothelial cells. Moreover, β_2 -ARs blockade with propranolol prevents all these changes but, in addition, acts by itself increasing ERK1/2 activity only in endothelial cells, behaving as a biased agonist.

6. Activation of ERK1/2, but not p38, exerts an inhibitory effect on β -AR-mediated vasodilatation in rat aorta, acting as a control feedback mechanism that could prevent an excessive vasodilatation response in conductance vessels.

RESUMEN

VII

El objetivo principal de la presente Tesis ha sido analizar la contribución relativa de los diferentes subtipos de adrenoceptores (AR) β (β_1 , β_2 , β_3) en la vasodilatación en dos lechos vasculares con diferentes características fisiológicas: un vaso de resistencia de pequeño calibre, como la arteria mesentérica de resistencia (A.M.R.), y un vaso de conductancia de calibre mayor, como la aorta, evaluando la implicación de las vías de señalización adenilato ciclasa (AC)/AMPc/PKA y/o NO/guanilato ciclasa soluble (GCs)/GMPc en la acción vasodilatadora mediada por los diferentes subtipos de AR β y determinando su localización en las diferentes células vasculares. Para ello, se ha determinado la expresión génica de los diferentes subtipos de AR β por RT-PCR cuantitativa a tiempo real, y la expresión proteica mediante experimentos de inmunofluorescencia. Además se ha caracterizado farmacológicamente su funcionalidad mediante experimentos de reactividad vascular (baño de órgano convencional y miógrafo) y de determinación de nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPc), utilizando agonistas y antagonistas selectivos de los diferentes subtipos así como inhibidores de las vías de señalización.

Los resultados obtenidos muestran que, a pesar de que los tres subtipos de AR β se expresan en ambos vasos, su participación en la respuesta funcional, así como la vía de señalización utilizada, es diferente según el vaso. Así, en A.M.R. los AR β_1 , localizados en las células de músculo liso (CML) y actuando a través de la vía clásica de señalización de estos receptores, AC/AMPc/PKA, son los principales responsables de la vasodilatación. Sin embargo en aorta la situación es más compleja, y la vasodilatación esta mediada por los AR β_2 y β_3 localizados en el endotelio, pero también por los AR β_2 localizados en las CML, todos ellos acoplados a la vía NO/GCs/GMPc. Además en este vaso se ha evidenciado también la participación del subtipo β_1 de baja afinidad, por un mecanismo independiente del NO.

Estos resultados sugieren la presencia de una señalización coordinada, a través de diferentes subtipos de AR β localizados en las diferentes capas, incluyendo la endotelial, en la regulación del tono de un vaso de conductancia como la aorta pero no de uno de resistencia como la A.M.R. Además, resaltan el diferente papel fisiológico que pueden desempeñar los AR β en el control del

tono contráctil de los dos tipos de vaso. En los vasos de resistencia altamente inervados, como la A.M.R., son los AR β_1 localizados en las CML y con una mayor afinidad por la noradrenalina liberada de las terminaciones nerviosas, los receptores que participan en la respuesta vasodilatadora. Por el contrario, en un vaso pobremente inervado como la aorta, son los AR β_2 localizados en el endotelio y con una mayor afinidad y accesibilidad por la adrenalina circulante, los receptores que modulan principalmente el tono contráctil y la distribución del flujo sanguíneo.

Otro objetivo de la presente Tesis fue estudiar la influencia de la vía de señalización de las MAPK (ERK1/2 y p38) en la vasodilatación mediada por los AR β . Para ello, se analizó el efecto de los AR β sobre la activación de las MAPK en aorta de rata y en cultivos primarios de los principales tipos celulares de los vasos: CML y células endoteliales (CE), para después estudiar el efecto que las MAPK podrían tener en la acción vasodilatadora mediada por los AR β en aorta de rata.

Los resultados obtenidos muestran que la estimulación de los AR β_2 modula la fosforilación de las ERK1/2 y p38 de manera diferencial en las CML y CE de aorta. Así, la activación de los AR β_2 con isoprenalina aumenta la fosforilación de p38 en anillos intactos y en ambas células vasculares, mientras tiene un efecto dual sobre la fosforilación de ERK1/2, aumentándola en las CML y disminuyéndola en las CE. El bloqueo de los AR β_2 con el antagonista propranolol revierte todos estos cambios, pero además induce por sí mismo un aumento de la fosforilación de ERK1/2 en las CE, mostrando lo que se llama selectividad funcional o agonismo sesgado (“biased agonism”).

Finalmente, el análisis del papel de las MAPK sobre la reactividad vascular muestra que ERK1/2, pero no p38, ejerce un efecto inhibitorio sobre la relajación inducida por los AR β , actuando como un mecanismo de control, que podría prevenir una vasodilatación excesiva en los vasos de conductancia como la aorta.

ENGLISH VERSION

VIII

DISTRIBUTION, FUNCTION AND SIGNALLING PATHWAYS OF VASCULAR β -ADRENOCEPTORS

Introduction

β -adrenoceptors (β -ARs) are members of the G protein-coupled receptor (GPCR) family with seven transmembrane regions (see Images 9 and 10, in “*Revisión Bibliográfica*”), which mediate the actions of two catecholamines: the neurotransmitter, Noradrenaline (NA); and the hormone and neurotransmitter, Adrenaline (A). They are currently classified into three subtypes: β_1 , β_2 and β_3 (Alexander et al., 2011; Bond et al., 2013), all of them placed in the vascular system, among other localizations.

For a long time, it was thought that only β_2 -ARs were responsible for catecholamine-mediated vasodilatation (Lands et al., 1967). However, more recent studies have shown that β_2 - and β_3 -ARs can also participate in blood vessel relaxation (Oriowo, 1994; Sooch and Marshall, 1997; Tagaya et al., 1999; Chruscinski et al., 2001; Dessy et al., 2004; Briones et al., 2005; Rozec et al., 2005; Rouget et al., 2006). Although all of them are implicated in the vasodilator response, the role of each subtype varies according to: the species, the vascular bed and the experimental conditions, such as the agent or the level of precontraction (Guimaraes y Moura, 2001).

Activation of β -ARs by its agonists elevates smooth muscle cAMP levels via the stimulatory Gs-protein and adenylyl cyclase (AC). Elevated cAMP subsequently activates cAMP-dependent protein kinase (PKA), which phosphorylates various membrane and/or intracellular proteins that are associated with muscle relaxation (Murray, 1990) (see Image 12, in “*Revisión Bibliográfica*”). This **AC/cAMP/PKA** mechanism is the canonical pathway of β -ARs, which is generally believed to be the key trigger for eliciting β -ARs-mediated relaxation of smooth muscle. Several studies support the involvement of other mechanisms independent of cAMP elevation, such as the endothelial **NO/sGC/cGMP** pathway (Queen and Ferro, 2006; Queen et al., 2006) (see

Image 13, in “*Revisión Bibliográfica*”), and in this regard, the presence of β -ARs in the endothelium was previously confirmed (Vanhoutte, 2001). Nevertheless, there have been conflicting results on the endothelial dependence of the β -ARs-mediated relaxation, due to the variability of the species and the vascular bed; inconsistency was also found even in the same vessel. Thus, β -ARs-mediated relaxation has been described as being completely or partially endothelium-dependent in aorta from rat (Gray and Marshall, 1992; Brawley et al. 2000a; Ferro et al., 2004) and mouse (Akimoto et al., 2002), and as being totally endothelium-independent in rat aorta (Moncada et al. 1991; Eckly et al., 1994; Satake et al., 1996). Conflicting results have also been reported in rat mesenteric resistance artery (MRA), where some authors found that β -ARs-mediated vasodilatation was independent of endothelial NO (Briones et al., 2005), while other authors showed NO-dependent relaxation (Graves and Poston, 1993).

Furthermore, recent studies show that β -ARs also modulate the phosphorylation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in different cells types (for review see: Evans et al., 2010), but little is known about the effect of β -ARs in the activation of these kinases in vascular cells and, more importantly, the impact of these signalling pathways on the functional responses elicited by β -ARs in native vascular tissues.

Several studies show that ERK1/2 and p38 regulate contractile responses in some vessels, since MAPKs inhibition decreases the contractile effect of some agonists such as endothelin-1 (Kim et al., 2004; Lee et al., 2007) or α_2 -ARs agonists (Bhattacharya et al., 2003; Roberts, 2001). More recently, an increase in the relaxant response of β -ARs induced by inhibition of ERK1/2 phosphorylation has been reported in porcine coronary arteries (Uhiara et al., 2009) and peripheral bronchioles (Lelliott et al., 2012).

Purpose

The aim of the present Thesis was to analyse the relative contribution of β_1 -, β_2 - and β_3 -ARs to vasodilatation in conductance (aorta) and resistance vessels (mesenteric resistance artery, MRA) assessing the role of AC/cAMP/PKA and/or NO/sGC/cGMP signalling pathways. The specific objectives were:

- To determine the mRNA and protein expression of each β -AR subtype in the different layers of vascular wall (smooth muscle cells (SMCs), endothelial cells (ECs), adventitia) in MRA and aorta.
- To characterize the AC/cAMP/PKA and/or NO/sGC/cGMP signalling pathways underlying the activation of β -AR subtypes and to evaluate the contribution of these two pathways to β -AR-mediated relaxation in both vessels.
- To establish the relative roles of each β -AR subtype in the relaxant response in MRA and aorta using the same experimental conditions.

In addition, we have analyzed the effect of β -ARs stimulation on ERK1/2 and p38 activation in aorta and in primary cultures of endothelial and smooth muscle cells isolated from aorta. Moreover, we studied the role of ERK1/2 and p38 on the β -ARs-mediated vasodilatation.

Experimental approach

Wistar male rat MRA, aorta, fresh SMCs isolated from aorta or primary cultures of SMCs and ECs isolated from aorta were used.

The mRNA and protein expression of the three β -AR subtypes was analyzed by quantitative RT-PCR and immunohistochemistry, respectively.

The pharmacological characterisation of β -ARs mediated activity was studied by tissue cyclic nucleotide accumulation (cAMP and cGMP), wire myography (MRA) and organ bath (aorta) relaxant experiments, using selective agonists and antagonists of the three β -AR-subtypes. Inhibitors of NO synthesis (L-NAME), AC (SQ22536) and sGC (ODQ) were also tested.

ERK1/2 and p38 phosphorylation was measured by immunoblotting of rat aorta rings and of ECs and SMCs primary cultures isolated from aorta. The influence of ERK1/2 and p38 in the β -ARs mediated vasorelaxation was studied in organ bath experiments (aorta) by using ERK1/2 or p38 inhibitors (U0126 or SB203580, respectively).

Results and Discussion

The present study highlights that although the mRNA and protein expressions of the three β -AR subtypes are present in MRA and aorta, the specific β -AR subtype contribution and signalling pathways involved in the vasodilator response differ between territories. Therefore, these findings suggest a different physiological role played by β -AR signalling in regulating conductance and resistance vessels.

1. β -ARs LOCALIZATION AND SIGNALLING PATHWAY REGULATING VASODILATATION IN MRA

We reveal that in MRA β_1 -ARs are mainly, but not exclusively, localized in the smooth muscle layer, whereas β_2 - and β_3 -ARs are expressed in the endothelium and adventitia (Figure 1). Nevertheless, the location of β_2 -ARs in the adventitial/medial border could suggest its presence either in nerves or in pericytes as previously suggested for β -AR (Briones et al., 2005). Briones et al. (2005) previously described the presence of β -ARs in smooth muscle, endothelial or adventitial cells using the fluorescent ligand BODIPY-TRM-CGP 12177, but it was not possible to identify the specific subtype because this ligand has affinity for both β_1 - and β_2 -ARs (Baker et al., 2003). However we were able to discriminate the localization of each β -AR subtype using selective antibodies.

Despite the presence of the three subtypes in the vessel wall, the vasodilator response appears to be mediated mainly by the β_1 -AR subtype,

localized in the muscular layer, which acts through the classical β -AR pathway (activation of AC and cAMP formation), without the participation of the cGMP pathway. Several evidences support this assumption:

i) isoprenaline and dobutamine (β_1 selective agonist), but not salbutamol (β_2 selective agonist) and CL316243 (β_3 selective agonist), increase the cAMP levels and relax the artery (Figures 3A and 10A);

ii) isoprenaline-induced cAMP accumulation and relaxation are inhibited by propranolol and the selective β_1 -AR antagonist (CGP20712), but not by the selective β_2 - or β_3 -AR antagonist (ICI118551 or SR592310A, respectively) (Figures 4A and 11);

iii) vasodilatation to isoprenaline is inhibited by AC inhibitor SQ22536, but not by sGC inhibitor ODQ (Figures 5B and 5C), which excludes the participation of the cGMP pathway in β_1 -AR-mediated relaxation;

iv) endothelium removal or L-NAME treatment have no effect on isoprenaline induced relaxation (Figures 14B), excluding a major participation of NO in MRA.

The major role of β_1 -AR in controlling the vascular tone of resistance arteries agrees with previous results (Graves and Poston, 1993; Briones et al., 2005; Garland et al., 2011) and reinforces the hypothesis that this mechanism may be disrupted in patients taking β -AR antagonists, as already suggested (Garland et al., 2011). However, the link between β_1 -AR and the signalling pathway in MRA is far from being clear. The present study shows that the accumulation of cAMP, but not of cGMP, is related to β_1 -AR activation. While Graves and Poston (1993) reported in MRA that β_1 -AR stimulation releases NO, more recent studies (Briones et al., 2005; Garland et al., 2011), including the present one, do not support a significant participation of NO and point to cAMP being the predominant signalling pathway linked to β_1 -AR-mediated relaxation.

Even though the β_2 -ARs mRNA expression is similar to that of β_1 -ARs (Figure 1A) and, despite them being located in the endothelial and adventitial

layers, as β_3 -ARs (Figure 1B), the agonists/antagonists profile excludes the participation of β_2 -ARs in nucleotide formation (Figures 3A and 4A) and vasodilatation (Figures 10A and 11) in MRA. Garland et al. (2011) reported in MRA endothelial β_1 - and β_2 -ARs-mediated hyperpolarization, irrespectively of cAMP accumulation and NO formation, which is not essential for vasodilatation. These authors suggest that β -ARs-linked hyperpolarization might initiate spreading dilatation passing along the artery wall via the endothelium. This proposal could help explain not only the presence, but also the function, of β_2 -ARs in the endothelial layer of MRA.

The fact that CL316243 increases the cAMP and cGMP levels (Figure 3A) and that SR59230A causes a significant blockade of nucleotides accumulation (Figure 4A) without affecting the contractile tone (Figures 10A and 11), indicates that adventitial and/or endothelial β_3 -ARs couple to cGMP and cAMP signals with no involvement in β -ARs-mediated vasodilatation. Other studies (Briones et al., 2005; Garland et al., 2011) have also excluded the participation of β_3 -ARs in the control of either the vascular tone or the hyperpolarization response in the MRA. Taken together, these results suggest that the accumulation of cyclic nucleotides induced by β_3 -stimulation plays a functional role other than controlling the vascular tone.

In summary, we show for the first time that β_1 -ARs (located in SMCs and ECs) and β_3 -AR (located in adventitia and ECs) are coupled to cAMP, but only the β_1 -subtype participates in controlling the vascular tone. In spite of the controversy about the role of NO (Graves and Poston, 1993; Briones et al., 2005; Garland et al., 2011), our results exclude its participation in the relaxant response to β -ARs in MRA. The β_2 -subtype, which is also present in the vessel, does not seem to play a relevant role in modulating the vascular tone, but may be involved in different functions, as previously suggested (Garland et al., 2011).

2. β -ARs LOCALIZATION AND SIGNALLING PATHWAYS REGULATING VASODILATATION IN AORTA

A more complex scenario has been found in aorta where β -AR-induced relaxation has been extensively described. However, discrepancy persists in the literature as to the relative contribution of each subtype and their link to nucleotide signalling pathways. Previous reports have evidenced that β -adrenergic relaxation occurs through a mixed participation of β_1/β_2 ARs (Satake et al., 1996) or entirely through the β_2 subtype (Ferro et al., 2004). The functional participation of β_3 -ARs (Trochu et al., 1999; Oliver et al., 2009), atypical β -ARs like the low-affinity state of β_1 -ARs (Mallem et al., 2004, 2005a) or atypical β -ARs that co-exist with the β_1 - and β_2 -subtypes (Brawley et al., 2000b) have also been proposed. More recently however, the latter authors ruled out the presence of functional β_3 -AR or low-affinity β_1 -ARs (Brahmadevara et al., 2003, 2004).

Conflicting results have also been reported regarding the endothelium and NO dependence of aorta vasodilatation. Thus, β -ARs-mediated relaxation has been described as being completely (Gray and Marshall, 1992) or partially (Van der Zyppe et al., 2000; Brawley et al., 2000a; Ferro et al., 2004) endothelium-dependent, and as being totally endothelium-independent (Moncada et al., 1991; Eckly et al., 1994; Satake et al., 1996) in rat aorta. This discrepancy in results could be due to the different experimental conditions, such as the pre-contractile agent, the pre-contraction level (Eckly et al., 1994), the animals age (Van der Zyppe et al., 2000) or the incomplete removal of the endothelium (Gray and Marshall, 1992). As we found that the relaxation elicited by isoprenaline decreased with increasing pre-contraction (Figure 6), we analyzed the influence of the pre-contraction level on β -ARs-mediated relaxation in aorta.

Influence of pre-contraction level on β -ARs-mediated vasodilatation in aorta

In aorta, as previously described (Segura, 2010), phenylephrine-induced contraction is enhanced in either the presence of L-NAME (Figure 6A) or in the absence of the endothelium (Figure 15A), which suggests that the endothelial NO-release plays a modulator role in the vasoconstriction mediated by the α_1 agonist. Similar results are obtained in the presence of the sGC inhibitor ODQ (Figure 6A). However, this enhancement of the contractile activity of phenylephrine does not occur in MRA (Figures 5A and 14A).

When we analyzed the isoprenaline-mediated relaxation in the presence of L-NAME or in the absence of the endothelium, a decrease in the relaxant response was observed in aorta (Figures 6C and 15B) but not in MRA (Figures 5C and 14B). We considered whether the increased pre-contractile initial tone, and not the blocking of NO/sGC/cGMP pathway, could be responsible for the observed lower vasodilatation to isoprenaline. Therefore, we brought the aorta rings to the same initial tension by adjusting the phenylephrine concentration in the absence or presence of L-NAME (Figure 7A) and, in this condition, isoprenaline relaxation curves were similar (Figure 7B). Therefore, when we adjust the level of precontraction, it appears that NO is not involved in the relaxing effect of isoprenaline.

To clarify this issue, we conducted another experimental protocol in which we determined the ability of L-NAME to reverse the relaxing effect of isoprenaline, adding it at the end of the relaxation (see *Esquema 3A*). We also compared the ability of L-NAME to reverse the effects of other agents that relax through the NO endogenously released by the endothelium (acetylcholine), or the exogenous NO (sodium nitroprusside: a NO donor agent) (see *Esquema 3A*). The results confirmed that acetylcholine relaxation is totally dependent of the endogenous NO, as L-NAME caused a complete reversal of the relaxation response (Figure 8). However, L-NAME was not able to reverse the sodium nitroprusside-induced vasodilation (Figure 8), which confirms that this agent relaxes by a mechanism independent of the endogenous NO formation. Finally, the isoprenaline-induced relaxation was partially reversed by L-NAME (Figure 8),

which indicates that β -ARs relax by mechanisms which are in part dependent of the release of endogenous NO.

Taken together, these results demonstrate that, depending on the experimental conditions used, different conclusions regarding the involvement of NO could be postulated, which would justify the discrepancy of the data reported in the literature. We can conclude that NO does participate, in part, on the relaxant effect mediated by stimulation of β -ARs in aorta.

β -ARs localization in aorta

By immunofluorescence labelling, β_1 - and β_2 -ARs appeared in the three layers of the aorta wall, but β_1 - was predominantly expressed in the media while β_2 - in the endothelium. β_3 -ARs were scarcely expressed in ECs and were predominantly detected along elastic lamina (Figure 2D). To confirm the cellular distribution of β -ARs in aorta, mRNA levels were evaluated in arteries with and without endothelium, and in the SMCs freshly isolated from aorta (Figures 2A-2C). As expected, β_1 - and β_2 -ARs were detected in aorta, irrespectively of the presence or absence of endothelium, and in isolated SMCs. However, the β_3 -AR subtype was absent in isolated SMCs, but was expressed in whole aorta with and without endothelium, thus confirming the presence of this subtype in the media layer in a different place to SMCs.

Low affinity state of muscular β_1 -ARs-mediated vasodilatation

The use of selective β -AR agonists and antagonists in aorta shows that the activation of β_1 -ARs, located in SMCs, ECs and adventitial cells, increases the cAMP levels in the whole tissue (Figures 3B and 4B), but, conversely to what occurs in MRA, the AC/cAMP/PKA pathway does not seem to play an essential role in β -ARs-mediated relaxation. In fact, the AC inhibitor (SQ22536), which blocks cAMP accumulation, does not modify the isoprenaline-induced relaxation in aorta (Figure 6B), but significantly inhibits the vasorelaxation in MRA (Figure

5B). We have also tested the effect of a PKA inhibitor, H-89, and the fact that in aorta it was unable to modify the vascular tone (Figure 6B) reinforces the lack of participation of AC/cAMP/PKA on β -AR mediated relaxation. This behaviour displayed by the β_1 -ARs in aorta establishes a clear difference with MRA, where vasodilatation depends on the β_1 -activation linked to cAMP.

Moreover, in either endothelium denuded vessels or the presence of L-NAME, the β -ARs-mediated relaxant response, which is significantly inhibited by CGP20712, is observed (Figures 17A and 17B), and might be attributed to the muscular β_1 -subtype. However, the pharmacological profile of this subtype in aorta better fits a low-affinity state of β_1 -ARs since, as the present results show, the apparent affinity for the β_1 -AR antagonist in aorta (6.45-6.59; Table 8) is lower than that estimated in MRA (7.80; Figure 11B). These results agree with other authors, who have also suggested an implication of the low-affinity state of β_1 -AR in rat aorta vasodilatation (Malleme et al., 2004, 2005a, 2005b).

Endothelial β_2 -ARs-mediated vasodilatation (NO/sGC/cGMP pathway)

Once again, unlike MRA, β_2 -ARs coupled to cGMP in rat aorta. Several lines of evidence suggest the participation of the NO/sGC/cGMP pathway in the vasodilatation mediated by those adrenoceptors:

i) salbutamol (β_2 selective agonist) relaxes the aorta with a greater potency than the MRA, and only the β_2 -AR antagonist (ICI118551) causes a significant blockade of isoprenaline-evoked relaxation (Figure 12C);

ii) isoprenaline and salbutamol increase the cGMP levels (Figure 3B) and this increase is inhibited by ICI118551 (Figure 4B);

iii) release of NO is essential for the promotion of cGMP accumulation since it is completely inhibited by L-NAME (Figure 4B);

iv) the sGC inhibitor (ODQ) and L-NAME, but not the AC inhibitor (SQ22536), inhibit the relaxation induced by isoprenaline (Figures 6B and 6C).

The implication of NO in β_2 -AR-induced relaxation in rat aorta has also been reported by other authors (Ferro et al., 2004).

Muscular β_2 -ARs-mediated vasodilatation (NO/sGC/cGMP pathway)

Two new findings of our study are relevant and suggest that the β_2 -ARs localized in SMCs of aorta contribute to the relaxant response through the NO pathway. The first is that the curves to isoprenaline and salbutamol were right-forward displaced to a greater extent by L-NAME than by endothelium removal (Figures 15B and 15D). The second is that ICI118551 displaces the curve to isoprenaline in the absence of the endothelium (Figure 17A), and fails to modify it in L-NAME-treated rings (Figure 17B). The involvement of NO released by SMCs as a complementary mechanism to that produced by endothelial β_2 -ARs is also supported by the expression of eNOS mRNA found in the isolated aortic SMCs (Figure 16).

Endothelial β_3 -ARs-mediated vasodilatation (NO/sGC/cGMP pathway)

Regarding the role of the β_3 -subtype in aorta, our results confirm and extend previous observations which have already assessed its presence and function in this vessel (Trochu et al., 1999; Rautureau et al., 2002). We detected a more prominent mRNA expression of β_3 in relation to β_1 - and β_2 -AR subtypes (Figure 2A) and, although its presence has been found in ECs, as other authors have described (Vanhoutte, 2001; Rautureau et al., 2002), it's mainly located along the elastic laminae (Figure 2D).

However, despite the abundant expression of this adrenoceptor, its role in relaxation does not seem to be as relevant as the β_2 -subtype. Its functional involvement is detected only with the use of selective β_3 -AR agonists (CL316243 and SR58611A), that didn't reach 100% relaxation (CL316243) or gave biphasic curves (SR58611A) of which only 30% corresponds to a β_3 -ARs population (Figures 10B, 13C and 13D). The use of L-NAME and the selective β_3 -AR agonist

(CL316243), as well as the antagonist (SR59230A), in β -AR-mediated cGMP accumulation and relaxation, demonstrates that this response is mediated through the NO/cGMP pathway (Figures 3B, 4B and 15E). Yet unlike the β_2 -subtype, the vasodilatation induced by β_3 -ARs disappears in denuded rings (Figure 15E), indicating the lack of participation of the receptors present along the elastic laminae in relaxation. The fact that in ligament fibroblasts a rise in cGMP stimulates elastin production (Mecham et al., 1985) lead us to speculate that stimulation of β_3 -ARs present along the elastic lamina may participate in elastin production. However, the assessment of the hypothetical role of these receptors on elastin production is beyond the scope of the present study.

3. ROLE OF β -ARs SUBTYPES REGULATING VASODILATATION IN MRA AND AORTA

Image 15 (in “*Discusión*”) shows the participation and possible physiological role of β -AR subtypes, along with α_1 -ARs (Flacco et al., 2013), in both vascular territories.

In summary, we demonstrate that the three β -AR subtypes are expressed in aorta and MRA. The β_1 -AR, located in SMCs and acting through the canonical AC/cAMP/PKA pathway, is the subtype that is primarily responsible for the vasodilator response in MRA. The β -ARs localized in endothelial cells do not participate in the relaxant response in this vessel. Conversely in aorta, the β_2 - and β_3 -ARs localized in the endothelium, along with the β_2 -AR present in SMCs, play a prominent vasodilator role, all of them coupled to the NO/sGC/cGMP pathway. The β_1 -subtype, localized in SMCs, also contributes to vasodilatation, but not through the cAMP pathway. Its activity corresponds to a low-affinity state of this receptor and it becomes more evident in the absence of endothelial β -ARs. It is interesting to remark that endothelial β_3 -ARs are coupled to cGMP in both vessels, but they only modulate vasodilatation in aorta, whereas the β_2 -ARs uncoupled to cAMP in both arteries only play a vasodilator role through the NO/sGC/cGMP pathway in aorta.

These results indicate a role of endothelial β -ARs in the control of the vasodilatation in a conductance vessel such as aorta, but not in a resistance artery such as MRA and highlight the different physiological role played by β -AR signalling in regulating the adrenergic contractile tone of conductance and resistance vessels. In aorta, a poorly innervated vessel, β_2 -ARs located in the endothelium and having a greater affinity for circulating adrenaline (Westfall and Weston, 2007), modulate the vessel tone and the blood flow distribution. In this context, endothelial cells are the first target for the vascular action of adrenaline. Importantly, recently it has been demonstrated that aortic endothelial cells are able to synthesize and release catecholamines (Sorriento et al., 2012). In addition, the β_2 - and β_1 -ARs located in the SMCs also regulate the aortic tone. In contrast in highly innervated resistance vessels, the β_1 -ARs located in SMCs and having a greater affinity for norepinephrine, which is released by the nerve endings, are those involved in the vasodilator response. These findings also suggest coordinated signalling through different β -AR subtypes located along different layers in regulating tone of conductance but not resistance vessels. Therefore, this complex regulation of β -ARs vasodilatation in conductance vessels guarantees a tighter control of the vascular tone. Given the widespread clinical use of non-subtype and subtype-specific β -blockers, these findings are likely to be clinically relevant.

Our results also show that α_1 -ARs-mediated contraction is modulated by the endothelium and NO in a conductance vessel, but not in a resistance one, as both the presence of ODQ or L-NAME and the absence of endothelium increased phenylephrine contraction in aorta (Figures 6A and 15A) but not in MRA (Figures 5A and 14A). This effect in aorta may occur either because there is a basal release of NO or because the α_1 agonist activates its release. The presence of α_1 -ARs in the EC have been described (Vanhoutte, 2001, Daly et al., 2010; Daly and McGrath, 2011) and several authors have shown that α_1 -ARs-mediated contraction is modulated by endothelial NO relaxation (Jones et al., 1993; Kaneko and Sunano, 1993; Amerini et al., 1995; Zschauer et al., 1997; Boer et al., 1999; Tuttle and Falcone, 2001; Gurdal et al., 2005). Since it has been postulated that α_{1D} -AR is responsible for the NO release (Filippi et al.,

2001), the different behavior between vessels may be due to the α_1 -AR subtype involved in the contractile response.

Previous results of our group have shown a major participation of α_{1A} -ARs in MRA (Marti et al., 2005) and α_{1D} subtype in aorta (Gisbert et al., 2000; Gisbert et al., 2003; Marti et al., 2005, Flacco et al., 2013), which determines the contractile characteristics of each vessel: in MRA α_{1A} -ARs elicit rapid responses that disappear quickly after removal of the agonist and allow fine adjustment of the contractile tone; in aorta α_{1D} -ARs elicit slow responses that slowly disappear after removal of the agonist, avoiding abrupt changes in the caliber of this vessel (Ziani et al., 2002; Flacco et al., 2013; see Image 4 in “*Revisión Bibliográfica*”). In aorta, α_{1D} -ARs-mediated release of NO could help to regulate the contractile tone, counteracting in part the vasoconstrictor action, and avoiding abrupt changes in the diameter of the vessel in situations of maximum stimulation.

Altogether these results evidence a participation of endothelium in adrenergic (α_1 and β -ARs) modulation of vascular tone in conductance but not in resistance vessels.

4. β -ARs AND MAPK SIGNALLING PATHWAY IN AORTA

As already mentioned in the Introduction, recent studies show that β -ARs modulate the phosphorylation of ERK1/2 and p38 MAPKs in different cells types (Evans et al., 2010), but little is known about the β -ARs activation of these pathways in vascular cells and in native tissue or about the impact that it may have on the vascular functional response. In this Thesis, the effect of β -ARs activation on MAPK-phosphorylation in aorta, SMCs and ECs, and the effect of MAPK on β -ARs-mediated vasodilatation in aorta were analyzed.

First, the gene expression of β -AR subtypes in primary cultures of SMCs and ECs obtained from aorta was determined. The results show that β_2 -AR is the main AR-subtype expressed in SMCs (Figure 18B) and ECs (Figure 18C) isolated

from aorta, unlike what happens in the whole intact tissue, where the 3 subtypes are expressed (Figure 18A).

Loss of β_1 subtype expression in SMCs primary cultures (Figure 18B) but not in freshly isolated SMCs (Figure 2C), has been already documented in previous studies of our group, using rat caudal artery and heart (Perez-Aso, 2009). Similar results have also been described for the α_{1A} -ARs, but not for the α_{1D} -ARs, whose expression disappears in SMCs primary cultures of aorta and caudal artery (Perez-Aso, 2009). This may be due to the fact that β_1 - and α_{1A} -ARs, but not β_2 - and α_{1D} -ARs, are associated with signalling complex structures in their physiological environment, such as neuronal signalling. Indeed, Stassen et al. (1998) describe a positive correlation between the presence of the adrenergic nerve terminals and α_{1A} -ARs. The presence of β -ARs in MRA nerve endings has also been described (Briones et al., 2005).

These findings indicate that the β_1 - and α_{1A} -ARs loss of expression after SMCs isolation and culture could be related to the destruction of adrenergic signalling. In fact, it is interesting to note that these two AR subtypes are those mainly responsible for the α_1 - and β -ARs-mediated contraction and relaxation in an highly innervated vessel as MRA, whereas α_{1D} and β_2 subtypes, whose expression is maintained in cultured cells, are mostly involved in the contraction and relaxation in a less innervated vessel as the aorta (present results, Kenny et al., 1995; Gisbert et al., 2000, 2003, Briones et al., 2005, Marti et al., 2005; Flacco et al., 2013).

Regarding the β_3 subtype, we also observed the loss of its expression in the ECs primary culture (Figure 18C). However, in this case, the expression in freshly isolated ECs have not been determined for technical reasons (sample insufficient to determine the gene expression), and it can not be excluded that this loss could be due to the sample handling for cell isolation.

β-ARs effect on MAPK activation

β-ARs stimulation had no effect on ERK1/2-phosphorylation in intact aorta (Figure 19A), but differentially modified it in SMCs and ECs primary cultures. In fact, isoprenaline showed a dual effect, increasing ERK1/2 phosphorylation in SMCs (Figure 19B) and decreasing it in the ECs (Figure 19C). On the other hand, isoprenaline increased p38-phosphorylation in aorta and in both cell types (SMCs and ECs) (Figures 20A-20C; see Image 16 in “*Discusión*”). As expected, the selective inhibitors of ERK1/2 (U0126) and p38 (SB203580) drastically reduced the ERK1/2 and p38 phosphorylation in all tissues: whole intact aorta, SMCs and ECs isolated from aorta (Figures 19D-19F and 20D-20F).

The different effect of isoprenaline on ERK1/2 phosphorylation in SMCs and ECs may depend on the receptor subtype in each cell type, as it has been described an increase in ERK1/2 phosphorylation in cardiomyocytes expressing β₁-ARs and a decrease in cardiomyocytes expressing β₂-ARs (Zheng et al., 2004). But this is not the case, because in our study β₂ is the predominant subtype expressed in both cell types (Figures 18B and 18C), therefore the reported effects are likely due to β₂-ARs activation and not to the poorly expressed β₁- and β₃-subtypes.

It seems that the different β₂-ARs impact on ERK1/2 activity is dependent on the cellular type. In fact, previous studies indicate that β-ARs activation with isoprenaline elicits an increase of ERK1/2 phosphorylation in different cell types (for review see: Evans et al., 2010), like HEK293 cells (Shenoy et al., 2006), primary astrocytes (Du et al., 2010) and cardiac (Kim et al., 2002) and dermal (Pullar and Isseroff, 2006) fibroblasts. However, other studies have shown that ERK1/2 phosphorylation decreases in keratinocytes (Pullar et al., 2003), corneal epithelial cells (Ghoghawala et al., 2008) and detrusor SMC (Klausner et al., 2009). We evidenced for the first time that this dual effect occurs in different cell types isolated from the same tissue.

On the other hand, the p38 phosphorylation that we observed after β_2 -ARs stimulation of vascular intact tissue and cells, is consistent with many other studies using different cell types expressing β_2 -ARs, such as cardiomyocytes (Zheng et al., 2000; Magne et al., 2001), B lymphocytes (McAlees and Sanders, 2009) and HEK293 cells (Gong et al., 2008), or expressing β_3 -ARs, such as bovine adipocytes (Cao et al., 2001; Mizuno et al., 2002) and CHO-K1 cells (Sato et al., 2007).

We also found that isoprenaline effects on MAPK were due to β -ARs stimulation, since they were inhibited by the β -ARs antagonist, propranolol (Figures 19B-19C and 20A-20C). Interestingly, propranolol not only reversed the decrease in isoprenaline-induced ERK1/2-phosphorylation in EC, but it was also able to increase by itself the ERK1/2 phosphorylation (Figure 19C, see Image 16 in "*Discusión*"). However, in SMCs, propranolol inhibited isoprenaline-induced effect but had no effect by itself (Figure 19B). Again, these results indicate a cell type-dependent effect. Other authors have described that the β_2 -AR blockade increases ERK1/2 activity in different cell lines, stably expressing the β_2 -AR (Azzi et al., 2003; Baker et al., 2003b), but also in murine corneal epithelial cells (Ghoghawala et al., 2008), dermal fibroblasts and keratinocytes (Pullar et al., 2012).

The propranolol effect on the ERK1/2 signalling pathway is of special interest, because it has been recently shown that some agonists, such as drugs acting at β -ARs, can exhibit functional selectivity or biased agonism, stabilizing distinct active conformations of the receptor, that in turn display altered coupling efficiency to different effectors (Evans et al., 2010). Thus, some compounds acting as antagonists of cAMP signalling actually behave as biased agonists that are able to activate MAPK pathway (Drake et al., 2008; Galandrin et al., 2008; Evans et al., 2010, Luttrell and Gesty-Palmer, 2010). Our results demonstrate this mechanism in a native environment, where propranolol behaves as an antagonist against the vascular relaxation, cAMP and/or cGMP production and p38 activity in rat aorta, while promoting an increase in the ERK1/2 activity in ECs isolated from the aorta.

MAPK effect on β -ARs-mediated vasodilatation

We also analyzed the involvement of the MAPKs in the regulation of vascular contraction and especially in the modulation of β -ARs-mediated relaxant response, so the effect of MAPK inhibitors on the pre-contraction and the isoprenaline-mediated relaxation was determined.

The phenylephrine- or U46619- induced contraction of aorta rings was not modified by inhibiting either ERK1/2 nor p38 activity, using the selective inhibitors U0126 and SB203580, respectively (Figures 22A-22D). However, phenylephrine and U46619 produced an increase of both kinases phosphorylation (Figures 21A and 21B). Most studies show that ERK1/2 plays a pro-contraction role in different vascular beds, since its inhibition decreases the contraction induced by different agents, such as α_2 -AR agonists, endothelin, serotonin or angiotensin II (Touyz et al., 1999, 2002; Roberts 2001, 2004; Bhattacharya and Roberts, 2003; Kwon et al., 2003, 2004; Kim et al., 2004; Lee et al., 2007).

However, regarding the ERK1/2 influence on the response mediated by the α_1 -AR agonist phenylephrine, the results in the literature are divergent and describes a reduction in the contractile response of bovine uterine artery (Xiao and Zhang, 2002; Xiao et al., 2004), rat carotid artery (Tsai and Jiang, 2005) and mouse aorta (Bhattacharya et al., 2011), but not in rat aorta and MRA (Giachini et al., 2010). Similarly, it has been described no changes in U46619 contractility in rat aorta and vena cava (Thakali et al., 2007) and porcine palmar vein (Uhiara et al., 2009), although the latter authors describe a slight decrease in the contractile response in porcine coronary artery. In our experimental conditions, although both phenylephrine and U46619 activated ERK1/2 and p38 (Figures 21A and 21B), we exclude the MAPK involvement in their contractile effect (Figures 22A-22D). When we analyzed the effect of MAPK on the β -ARs-induced relaxation, inhibition of ERK1/2, but not of p38, enhanced the isoprenaline-mediated relaxation in aorta (Figures 23A and 23C), indicating that under physiological conditions ERK1/2 exerts a pro-contraction effect, which

specifically precludes the β -ARs-induced relaxation (see Image 16 in “*Discusión*”). Similar results have been described in porcine coronary arteries and palmar vein (Uhiara et al., 2009). These authors demonstrated that it was a β_2 -AR specific effect, because it was not observed when using β_1 agonists or other vasodilator agents as forskolin. Another more recent work, described a similar effect on peripheral bronchioles (Lelliott et al., 2012).

Furthermore, our study showed that this effect is endothelium and NO independent, since it was not modified by the endothelial removal (Figure 23B) or the NO inhibition using the NO synthase inhibitor (L-NAME) (Figure 23D). Taken together, these results suggest that in aortic SMCs, β_2 -ARs activation promotes the dilatation of the artery, but at the same time also activates ERK1/2 pathway that prevents vasodilatation, acting as a control feedback mechanism (see Image 16 in “*Discusión*”) that could prevent an excessive vasodilatation response in conductance vessels.

In some diseases, such as hypertension and diabetes, it has been reported that there is a decrease in the vasodilator response mediated by β -ARs (Borkowski et al., 1992; Harada et al., 1999; Doggrell and Chen, 2002; Grisk et al., 2007; Oliver et al., 2009) and also an increase in the ERK1/2 activity in the vascular smooth muscle (Touyz et al., 2002; Kim et al., 2005, Matsumoto et al., 2006). Given this evidence, our results in aorta, which are similar to those obtained by Uhiara et al. (2009) in other vascular territories, open the possibility that the reduced response to β -ARs in these diseases is due in part to an increase in the ERK1/2 activity.

BIBLIOGRAFÍA

IX

- Ahlquist RP (1948) A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol.* 153:586-600.
- Akimoto Y, Horinouchi T, Shibano M, Matsushita M, Yamashita Y, Okamoto T, Yamaki F, Tanaka Y, Koike K (2002) Nitric oxide (NO) primarily accounts for endothelium-dependent component of beta-adrenoceptor-activated smooth muscle relaxation of mouse aorta in response to isoprenaline. *J Smooth Muscle Res.* 38:87-99.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J (1996) Molecular biology of the cell. *Omega eds., Barcelona.*
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357:593-615.
- Alessi D, Cuenda A, Cohen P, Dudley D, Saltiel A (1995) PD98059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 270:27489-27494.
- Alexander SP, Mathie A, Peters JA (2011) Guide to Receptors and Channels (GRAC), 5th edition. *Br J Pharmacol.* 164 Suppl 1:S1-324.
- Altschuld RA, Billman GE (2000) β_2 -adrenoceptors and ventricular fibrillation. *Pharmacol Ther.* 88:1-14.
- Amerini S, Mantelli L, Ledda F (1995) Enhancement of the vasoconstrictor response to KCL by nitric oxide synthesis inhibition: a comparison with noradrenaline. *Pharmacol Res.* 31:175-181.
- Amin AR, Di Cesare PE, Vyas P, Attur M, Tzeng E, Billiar TR, Stuchin SA, Abramson SB (1995) The expression and regulation of nitric oxide synthase in human osteoarthritis-affected chondrocytes: evidence for up-regulated neuronal nitric oxide synthase. *J Exp Med.* 182:2097-2102.
- Angus JA, Cocks TM (1989) Endothelium-Derived Relaxing Factor. *Pharmacol Ther.* 41:303-352.
- Annabi B, Lachambre MP, Plouffe K, Moumdjian R, Beliveau R (2009) Propranolol adrenergic blockade inhibits human brain endothelial cells tubulogenesis and matrix metalloproteinase-9 secretion. *Pharmacol Res.* 60:438-445.
- Arch JR, Ainsworth AT, Cawthorne MA (1984) Atypical β -adrenoceptor on brown adipocytes as target for anti-obesity drugs. *Nature.* 309:163-165.
- Arch JR, Kaumann AJ (1993) β_3 and atypical beta-adrenoceptors. *Med Res Rev.* 13:663-729.
- Arch JR (2004) Do low-affinity states of beta-adrenoceptors have roles in physiology and medicine? *Br J Pharmacol.* 143:517-518.
- Arribas S, Marín J, Ponte A, Balfagón G, Salaices M (1994) Norepinephrine-induced relaxations in rat aorta mediated by endothelial beta adrenoceptors. Impairment by ageing and hypertension. *J Pharmacol Exp Ther.* 270:520-527.

Bibliografía

- Arribas SM, González C, Graham D, Dominiczak AF, McGrath JC (1997a) Cellular changes induced by chronic nitric oxide inhibition in intact rat basilar arteries revealed by confocal microscopy. *J Hypertens.* 15:1685-1693.
- Arribas SM, Hillier C, González C, McGrory S, Dominiczak AF, McGrath JC (1997b) Cellular aspects of vascular remodeling in hypertension revealed by confocal microscopy. *Hypertension.* 30:1455-1464.
- Azzi M, Charest PG, Angers S, Rousseau G, Kohout T, Bouvier M, Piñeyro G (2003) Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:11406-11411.
- Baker JG, Hall IP, Hill SJ (2003a) Agonist actions of "β-blockers" provide evidence for two agonist activation sites or conformations of the human β₁-adrenoceptor. *Mol Pharmacol.* 63:1312-1321.
- Baker JG, Hall IP, Hill SJ (2003b). Agonist and inverse agonist actions of beta-blockers at the human beta 2-adrenoceptor provide evidence for agonist-directed signaling. *Mol Pharmacol.* 64:1357-1369.
- Baker JG, Hall IP, Hill SJ (2003c) Pharmacology and direct visualisation of BODIPY-TMR-CGP: a long-acting fluorescent beta2-adrenoceptor agonist. *Br J Pharmacol.* 139:232-242.
- Baker JG (2005a) Evidence for a Secondary State of the human β₃-Adrenoceptor. *Mol Pharmacol.* 68:1645-1655.
- Baker JG (2005b) The selectivity of β-adrenoceptor antagonists at the human β₁, β₂ and β₃ adrenoceptors. *Br J Pharmacol.* 144:317-322.
- Baker JG (2005c) Site of Action of β-Ligands at Human β₁-Adrenoceptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 313:1163-1171.
- Baker JG (2010) The selectivity of beta-adrenoceptor agonists at human beta1-, beta2- and beta3-adrenoceptors. *Br J Pharmacol.* 160:1048-1061.
- Balakumar P, Kaur T, Singh M (2008) Potential target sites to modulate vascular endothelial dysfunction: current perspectives and future directions. *Toxicology.* 245:49–64.
- Balakumar P, Kathuria S (2012) Submaximal PPARγ activation and endothelial dysfunction: new perspectives for the management of cardiovascular disorders. *Br J Pharmacol.* 166:1981-1992.
- Baldwin JM (1993) The probable arrangement of the helices in G Protein-Coupled Receptors. *EMBO J.* 12:1693-1703.
- Balligand JL, Kelly RA, Marsden PA, Smith TW, Michel T (1993) Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90:347-351.

- Barnes PJ (1995) Beta-adrenergic receptors and their regulation. *Am J Respir Crit Care Med.* 152:838-860.
- Béa ML, Ghaleh B, Giudicelli JF, Berdeaux A (1994) Lack of Importance of NO in Beta-Adrenoceptor-Mediated Relaxation of Large Epicardial Canine Coronary Arteries. *Br J Pharmacol.* 111:981-982.
- Beasley D, Schwartz JH, Brenner BM (1991) Interleukin 1 induces prolonged L-arginine-dependent cyclic guanosine monophosphate and nitrite production in rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 87:602-608.
- Bender AT, Beavo JA (2006) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev.* 58: 488–520.
- Bengtsson T, Cannon B, Nedergaard J (2000) Differential adrenergic regulation of the gene expression of the beta-adrenoceptor subtypes beta1, beta2 and beta3 in brown adipocytes. *Biochem J.* 347:643-651.
- Bevan JA (1979) Some bases of differences in vascular response to sympathetic activity. *Circ Res.* 45:161-71.
- Bhattacharya B, Roberts RE (2003) Enhancement of alpha2-adrenoceptor-mediated vasoconstriction by the thromboxane-mimetic U46619 in the porcine isolated ear artery: role of the ERK-MAP kinase signal transduction cascade. *Br J Pharmacol.* 139:156-162.
- Bhattacharya I, Damjanović M, Dominguez AP, Haas E (2011) Inhibition of activated ERK1/2 and JNKs improves vascular function in mouse aortae in the absence of nitric oxide. *Eur J Pharmacol.* 658:22-27.
- Bianchetti A, Manara L (1990) In vitro inhibition of intestinal motility by phenylethanolaminotetralines; evidence of atypical β -adrenoceptors in rat colon. *Br J Pharmacol.* 100:831-839.
- Bilski AJ, Halliday SE, Fitzgerald JD, Wale JL (1983) The pharmacology of a beta 2-selective adrenoceptor antagonist (ICI 118,551). *J Cardiovasc Pharmacol.* 5:430-437.
- Blatter LA, Wier WG (1994) Nitric oxide decreases $[Ca^{2+}]_i$ in vascular smooth muscle by inhibition of the calcium current. *Cell Calcium.* 15:122-131.
- Blin N, Camoin L, Maigret B, Strosberg AD (1993) Structural and conformational features determining selective signal transduction in the beta 3-adrenergic receptor. *Mol Pharmacol.* 44:1094-1104.
- Boer C, Scheffer GJ, de Lange JJ, Westerhof N, Sipkema P (1999) Alpha-1-adrenoceptor stimulation induces nitric oxide release in rat pulmonary arteries. *J Vasc Res.* 36:79-81.
- Bond RA, Bylund DB, Eikenburg DC, Hieble JP, Hills R, Minneman KP, Parra S (2013) Adrenoceptors: β -adrenoceptors. *IUPHAR (International Union of Basic and*

Bibliografía

Clinical Pharmacology) Disponible en: <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/ObjectDisplayForward?objectId=28> (consultado 12/09/2013).

- Borkowski KR, Gros R, and Schneider H (1992) Vascular beta-adrenoceptor-mediated responses in hypertension and ageing in rats. *J Auton Pharmacol.* 12:389-401.
- Boulanger CM, Heymes C, Benessiano J, Geske RS, Lévy BI, Vanhoutte PM (1998) Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth muscle cells: activation by angiotensin II in hypertension. *Circ Res.* 83:1271-1278.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
- Brahmadevara N, Shaw AM, MacDonald A (2003) Evidence against β_3 -adrenoceptors or low affinity state of β_1 -adrenoceptors mediating relaxation in rat isolated aorta. *Br J Pharmacol.* 138:99-106.
- Brahmadevara N, Shaw AM, MacDonald A (2004) α_1 -Adrenoceptor antagonist properties of CGP 12177A and other β -adrenoceptor ligands: evidence against β_3 - or atypical β -adrenoceptors in rat aorta. *Br J Pharmacol.* 142:781-787.
- Brawley L, Shaw AM, MacDonald A (2000a) Role of endothelium/nitric oxide in atypical beta-adrenoceptor-mediated relaxation in rat isolated aorta. *Eur J Pharmacol.* 398:285-296.
- Brawley L, Shaw AM, MacDonald A (2000b) Beta 1-, beta 2- and atypical beta-adrenoceptor-mediated relaxation in rat isolated aorta. *Br J Pharmacol.* 129:637-644.
- Briones AM, González JM, Somoza B, Giraldo J, Daly CJ, Vila E, González MC, McGrath JC, Arribas SM (2003) Role of elastin in spontaneously hypertensive rat small mesenteric artery remodelling. *J Physiol.* 552:185-195.
- Briones AM, Daly CJ, Jiménez-Altayó F, Martínez-Revelles S, Gonzalez JM, McGrath JC, Vila E (2005) Direct demonstration of β_1 - and evidence against β_2 - and β_3 -adrenoceptors, in smooth muscle cells of rat small mesenteric arteries. *Br J Pharmacol.* 146:679-691.
- Brodde OE, Michel M (1999) Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev.* 51:651-689.
- Brunner H, Cockcroft JR, Deanfield J, Donald A, Ferrannini E, Halcox J, Kiowski W, Luscher TF, Mancina G, Natali A, Oliver JJ, Pessina AC, Rizzoni D, Rossi GP, Salvetti A, Spieker LE, Taddei S, Webb DJ (2005) Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens.* 23:233-246.

- Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Molinoff PB, Ruffolo RR Jr, Trendelenburg U (1994) International Union of Pharmacology Nomenclature of Adrenoceptors. *Pharmacol Rev.* 46:121-136.
- Callaerts-Vegh Z, Evans KL, Dudekula N, Cuba D, Knoll BJ, Callaerts PF, Giles H, Shardonofsky FR, Bond RA (2004) Effects of acute and chronic administration of beta-adrenoceptor ligands on airway function in a murine model of asthma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101:4948-4953.
- Candelore MR, Deng L, Tota L, Guan XM, Amend A, Liu Y, Newbold R, Cascieri MA, Weber AE (1999) Potent and selective human beta(3)-adrenergic receptor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther.* 290:649-655.
- Cao W, Medvedev AV, Daniel KW, Collins S (2001) beta-Adrenergic activation of p38 MAP kinase in adipocytes: cAMP induction of the uncoupling protein 1 (UCP1) gene requires p38 MAP kinase. *J Biol Chem.* 276:27077-27082.
- Cao W, Luttrell LM, Medvedev AV, Pierce KL, Daniel KW, Dixon TM, Lefkowitz RJ, Collins S (2004) p38 Mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. *Mol Cell Biol.* 24:3057-3067.
- Carmeliet P (2003) Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 9:653-660.
- Cavalli A, Lattion AL, Hummler E, Nenniger M, Pedrazzini T, Aubert JF, Michel MC, Yang M, Lembo G, Vecchione C, Mostardini M, Schmidt A, Beerermann F, Cotecchia S (1997) Decreased blood pressure response in mice deficient of the alpha1b-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94:11589-11594.
- Chakraborti S, Chakraborti T, Shaw G (2000) beta-adrenergic mechanisms in cardiac diseases: a perspective. *Cell Signal.* 12:499-513.
- Chaudhry A, MacKenzie RG, Georgic LM, Granneman JG (1994) Differential interaction of beta (1)- and beta (3)-adrenergic receptors with G(i) in rat adipocytes. *Cellular Signalling.* 6:457-465.
- Chen QW, Edvinsson L, Xu CB (2009) Role of ERK/MAPK in endothelin receptor signaling in human aortic smooth muscle cells. *BMC Cell Biol.* 10:52.
- Chen YY, Doggrell SA (2002) Responsiveness, affinity constants and b-adrenoceptor reserves for isoprenaline on aortae from normo-, pre and hypertensive rats. *J Pharm Pharmacol.* 54:515-522.
- Cheung WY (1980) Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science.* 207:19-27.
- Christensen KL, Mulvany MJ (2001) Location of resistance arteries. *J Vasc Res.* 38:1-12.
- Chruscinski A, Brede ME, Meinel L, Lohse MJ, Kobilka BK, Hein L (2001) Differential distribution of beta-adrenergic receptor subtypes in blood vessels of knockout mice lacking beta(1)- or beta(2)- adrenergic receptors. *Mol Pharmacol.* 60:955-962.

Bibliografia

- Ciccarelli M, Cipolletta E, Santulli G, Campanile A, Pumiglia K, Cervero P, Pastore L, Astone D, Trimarco B, Iaccarino G (2007) Endothelial beta2 adrenergic signaling to AKT: role of Gi and SRC. *Cell Signal*. 19:1949-1955.
- Ciccarelli M, Sorriento D, Cipolletta E, Santulli G, Fusco A, Zhou RH, Eckhart AD, Peppel K, Koch WJ, Trimarco B, Iaccarino G (2011) Impaired neoangiogenesis in beta-adrenoceptor gene-deficient mice: restoration by intravascular human beta-adrenoceptor gene transfer and role of NFkappaB and CREB transcription factors. *Br J Pharmacol*. 162:712-721.
- Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth EM, Bromage N, Bunyan J, Erhardt W, Flecknell P, Gregory N, Hackbarth H, Morton D, Warwick C (1996) Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. DGXI of the European Commission. *Lab Anim*. 30:293-316.
- Communal C, Colucci WS, Singh K (2000) p38 Mitogen-activated protein kinase pathway protects adult rat ventricular myocytes against β -adrenergic receptor-stimulated apoptosis. Evidence for Gi-dependent activation. *J Biol Chem*. 275:19395-19400.
- Cotecchia S (2010) The alpha1-adrenergic receptors: diversity of signaling networks and regulation. *J Recept Signal Transduct. Res*. 30:410-419.
- Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ (1997) Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature*. 390:88-91.
- Dale HH (1906) On some physiological actions of ergot. *J Physiol*. 34:163-206.
- Daly CJ, Deighan C, McGee A, Mennie D, Ali Z, McBride M, McGrath JC (2002) A knockout approach indicates a minor vasoconstrictor role for vascular alpha1B-adrenoceptors in mouse. *Physiol Genomics*. 9:85-91.
- Daly CJ, Ross RA, Whyte J, Henstridge CM, Irving AJ, McGrath JC (2010) Fluorescent ligand binding reveals heterogeneous distribution of adrenoceptors and 'cannabinoid-like' receptors in small arteries. *Br J Pharmacol*. 15):787-796.
- Daly CJ, McGrath JC (2011) Previously unsuspected widespread cellular and tissue distribution of β -adrenoceptors and its relevance to drug action. *Trends Pharmacol Sci*. 32:219-226.
- Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J*. 351:95-105.
- Dejana E, Corada M, Lampugnani MG (1995) Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB J*. 9:910-918.
- De Ponti F, Cosentino M, Costa A, Giran M, Gibelli G, D'Angelo L, Frigo G, Crema A (1995a) Inhibitory effects of SR 58611A on canine colonic motility: evidence for a role of β_3 -adrenoceptors. *Br J Pharmacol*. 114:1447-1453.

- De Ponti F, Gibelli G, Crema F, Lecchini S (1995b) Functional evidence for the presence of β_3 -adrenoceptor in the guinea pig common bile duct and colon. *Pharmacol.* 51:288-297.
- De Ponti F, Gibelli G, Croci T, Arcidiaco M, Crema F, Manara L. (1996) Functional evidence of atypical β_3 -adrenoceptors in the human colon using the β_3 -selective adrenoceptor antagonist, SR 59230A. *Br J Pharmacol.* 11:1374-1376.
- De Ponti F, Modini C, Gibelli G, Crema F, Frigo G (1999) Atypical beta-adrenoceptors mediating relaxation in the human colon: functional evidence for beta3-rather than beta4-adrenoceptors. *Pharmacol Res.* 39:345-348.
- Desjardins F, Balligand JL (2006) Nitric oxide-dependent endothelial function and cardiovascular disease. *Acta Clin Belg.* 61:326-334.
- Dessy C, Kim I, Sougnez CL, Laporte R, Morgan KG (1998) A role for MAP kinase in differentiated smooth muscle contraction evoked by alpha-adrenoceptor stimulation. *Am J Physiol.* 275:1081-1086.
- Dessy C, Moniotte S, Ghisdal P, Havaux X, Noirhomme P, Balligand JL (2004) Endothelial β_3 -adrenoceptors mediate vasorelaxation of human coronary microarteries through nitric oxide and endothelium-dependent hyperpolarization. *Circulation.* 110:948-954
- Dessy C, Saliez J, Ghisdal P, Daneau G, Lobysheva II, Frerart F, Belge C, Jnaoui K, Noirhomme P, Feron O, Balligand JL (2005) Endothelial beta3-adrenoreceptors mediate nitric oxide-dependent vasorelaxation of coronary microvessels in response to the third-generation beta-blocker nebivolol. *Circulation.* 112:1198-1205.
- Dixon RA, Kobilka BK, Strader DJ, Benovic JL, Dohlman HG, Frielle T, Bolanowski MA, Bennett CD, Rands E, Diehl RE, Munford RA, Slater EE, Signal IS, Caron MG, Lefkowitz RJ, Strader CD (1986) Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature.* 321:75-79.
- Docherty JR (2010) Subtypes of functional alpha1-adrenoceptor. *Cell Mol Life Sci.* 67:405-417.
- Dohlman AG, Caron MG, Deblasi A, Frielle T, Lefkowitz RJ (1990) Role of extracellular disulfide-bonded cysteines in the ligand binding function of the β adrenergic receptor. *Biochemistry.* 29:2335-2342.
- Donoso MV, Steiner M, Huidobro-Toro JP (1997) BIBP 3226, suramin and prazosin identify neuropeptide Y, adenosine 5'-triphosphate and noradrenaline as sympathetic cotransmitters in the rat arterial mesenteric bed. *J Pharmacol Exp Ther.* 282:691-698.
- Drake MT, Violin JD, Whalen EJ, Wisler JW, Shenoy SK, Lefkowitz RJ (2008) β -arrestin-biased agonism at the β_2 -adrenergic receptor. *J Biol Chem.* 283:5669-76.

Bibliografía

- Du T, Li B, Li H, Li M, Hertz L, Peng L (2010) Signaling pathways of isoproterenol-induced ERK1/2 phosphorylation in primary cultures of astrocytes are concentration-dependent. *J Neurochem.* 115:1007-1023.
- Eckly AE, Stoclet JC, Lugnier C (1994) Isoprenaline induces endothelium-independent relaxation and accumulation of cyclic nucleotides in the rat aorta. *Eur J Pharmacol.* 271:237-240.
- Eissa NT, Strauss AJ, Haggerty CM, Choo EK, Chu SC, Moss J (1996) Alternative splicing of human inducible nitric-oxide synthase mRNA tissue-specific regulation and induction by cytokines. *J Biol Chem.* 271:27184-27187.
- Emorine LJ, Marullo S, Briand-Sutren MM, Pate G, Tate K, Delavier-Klutchko C, Strosberg AD (1989) Molecular characterization of the human β_3 -adrenergic receptor. *Science.* 245:1118-1121.
- Enero MA, Langer SZ, Rothlin RP, Stefano FJ (1972) Role of the alpha-adrenoceptor in regulating noradrenaline overflow by nerve stimulation. *Br J Pharmacol.* 44:672-688.
- Evans BA, Papaioannou M, Hamilton S, Summers RJ (1999) Alternative splicing generates two isoforms of the beta3-adrenoceptor which are differentially expressed in mouse tissues. *Br J Pharmacol.* 127:1525-31.
- Evans BA, Sato M, Sarwar M, Hutchinson DS, Summers RJ (2010) Ligand-directed signalling at β -adrenoceptors. *Br J Pharmacol.* 159:1022-1038.
- Farrell AJ, Blake DR (1996) Nitric oxide. *Ann Rheum Dis.* 55:7-20.
- Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA, Trzaskos JM (1998) Identification of a novel inhibitor of mitogenactivated protein kinase kinase. *J Biol Chem.* 273:18623-18632.
- Félétou M, Vanhoutte PM (2006) Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26:1215-1225.
- Félétou M, Huang Y, Vanhoutte PM (2011) Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br J Pharmacol.* 164:894-912.
- Ferro A, Queen L R, Priest R M, Xu B, Ritter J M, Poston L, Ward J P (1999) Activation of Nitric Oxide Synthase by β_2 -Adrenoceptors in Human Umbilical Vein Endothelium in Vitro. *Br J Pharmacol.* 126:1872-1880.
- Ferro A, Coash M, Yamamoto T, Rob J, Ji Y, Queen L (2004) Nitric Oxide-Dependent β_2 -Adrenergic Dilatation of Rat Aorta Is Mediated Through Activation of Both Protein Kinase A and Akt. *Br J Pharmacol.* 143:397-403.
- Figueroa XF, Poblete I, Fernández R, Pedemonte C, Cortés V, Huidobro-Toro JP (2009) NO production and eNOS phosphorylation induced by adrenaline through the activation of β -adrenoceptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 297:134-143.

- Filippi S, Parenti A, Donnini S, Granger H J, Fazzini A, Ledda F (2001) Alpha(1D)-adrenoceptors cause endothelium-dependent vasodilatation in the rat mesenteric vascular bed. *J Pharmacol Exp Ther.* 296:869-875.
- Flacco N, Parés J, Serna E, Segura V, Vicente D, Perez-Aso M, Noguera MA, Ivorra MD, McGrath JC, D'Ocon P (2013) α_{1D} -Adrenoceptors are responsible for the high sensitivity and the slow time-course of noradrenaline-mediated contraction in conductance arteries. *Pharmacology Research & Perspectives.* 1:1-14, DOI: 10.1002/prp2.1.
- Folkman J (2006) Angiogenesis. *Annu Rev Med.* 57:1-18.
- Förstermann U, Sessa WC (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 33:829-837.
- Frielle T, Collins S, Daniel KW, Caron MG, Lefkowitz RJ, Kobilka BK (1987) Cloning of the cDNA for the human beta-1-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84:7920-7924.
- Furchgott RF (1972) The classification of adrenoceptors (adrenergic receptors). An evaluation from the standpoint of receptor theory. In: Blaschko H, Muscholl E (eds). *Handbook of Experimental Pharmacology.* Springer Verlag: Berlin, pp. 283–335.
- Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 288:373-376.
- Furness JB, Marshall JM (1974) Correlation of the directly observed responses of mesenteric vessels of the rat to nerve stimulation and noradrenaline with the distribution of adrenergic nerves. *J Physiol.* 239:75-88.
- Fuxe K, Sedvall G (1965) The distribution of adrenergic nerve fibres to the blood vessels in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand.* 64:75-86.
- Galandrin S, Bouvier M (2006) Distinct signaling profiles of beta1 and beta2 adrenergic receptor ligands toward adenylyl cyclase and mitogen-activated protein kinase reveals the pluridimensionality of efficacy. *Mol Pharmacol.* 70:1575-1584.
- Galandrin S, Oligny-Longpré G, Bonin H, Ogawa K, Galés C, Bouvier M (2008) Conformational rearrangements and signaling cascades involved in ligand-biased mitogen-activated protein kinase signaling through the beta1-adrenergic receptor. *Mol Pharmacol.* 74:162-72.
- Galitzky J, Langin D, Montrastue JL, Lafontan M, Berlan M (1998) On the presence of a putative fourth β -adrenoceptor in human adipose tissue. *Trends Pharmacol Sci.* 19:164-165.
- Gallagher TF, Adams JL, Boehm JC, Kassis S, Gorycki PD, Webb EF, Hall R, Sorenson M, Lee JC, Ayrton A, Griswold DE (1997) Pyrimidinylimidazole inhibitors of CSBP/P38 kinase demonstrating decreased inhibition of hepatic cytochrome P450 enzymes. *Bioorg Med Chem Let.* 5:49-64.

Bibliografía

- Garcia-Sainz JA, Vazquez-Prado J, Del Carmen-Medina L (2000) Alpha 1-adrenoceptors: function and phosphorylation. *Eur J Pharmacol.* 389:1-12.
- Garland CJ, Weston AH (2011) The vascular endothelium: still amazing us 30 years on. *Br J Pharmacol.* 164:837-838.
- Garland CJ, Hiley CR, Dora KA (2011a) EDHF: spreading the influence of the endothelium. *Br J Pharmacol.* 164:839-852.
- Garland CJ, Yarova PL, Jiménez-Altayó F, Dora KA (2011b) Vascular hyperpolarization to β -adrenoceptor agonists evokes spreading dilatation in rat isolated mesenteric arteries. *Br J Pharmacol.* 164:913-921.
- Lands AM, Arnold A, McAuliff, JP, Luduena FP, Brown TG (1967) Differentiation of receptor systems activated by simpatomimetic amines. *Nature.* 214:597-598.
- Lands C, Tavernier G, Charpentier F, Langin D, Le Marec H (1996) Functional beta (3)-adrenoceptor in the human heart. *J Clin Invest.* 98:556-562.
- Gauthier C, Tavernier G, Charpentier F, Langin D, Le Marec H (1996) Functional beta3-adrenoceptor in the human heart. *J Clin Invest.* 98:556-562.
- Gauthier C, Langin D, Balligand JL (2000) β_3 -adrenoceptors in the cardiovascular system. *Trends Pharmacol Sci.* 21:426-431.
- Gauthier C, Sèze-Goismier C, Rozec B (2007) Beta 3-adrenoceptors in the cardiovascular system. *Clin Hemorheol Microcirc.* 37:193-204.
- Gauthier C, Rozec B, Manoury B, Balligand JL (2011) Beta-3 adrenoceptors as new therapeutic targets for cardiovascular pathologies. *Curr Heart Fail Rep.* 8:184-192.
- Ghoghawala SY, Mannis MJ, Pullar CE, Rosenblatt MI, Isseroff RR (2008) Beta2-adrenergic receptor signaling mediates corneal epithelial wound repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 49:1857-1863.
- Ghosh DK, Stuehr DJ (1995) Macrophage NO synthase: characterization of isolated oxygenase and reductase domains reveals a head-to-head subunit interaction. *Biochemistry.* 34:801-807.
- Giachini FR, Sullivan JC, Lima VV, Carneiro FS, Fortes ZB, Pollock DM, Carvalho MH, Webb RC, Tostes RC (2010) Extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation, via downregulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1, mediates sex differences in desoxycorticosterone acetate-salt hypertension vascular reactivity. *Hypertension.* 55:172-9.
- Gille E, Lemoine H, Ehle B, Kaumann AJ (1985) The affinity of (-)-propranolol for beta 1- and beta 2-adrenoceptors of human heart. Differential antagonism of the positive inotropic effects and adenylate cyclase stimulation by (-)-noradrenaline and (-)-adrenaline. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 331:60-70.

- Gisbert R, Noguera MA, Ivorra MD, D'Ocon P (2000) Functional evidence of a constitutively active population of alpha(1D)-Adrenoceptors in rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther.* 295:810-817.
- Gisbert R, Ziani K, Miquel R, Noguera MA, Ivorra MD, Anselmi E, D'Ocon P (2002) Pathological role of a constitutively active population of alpha(1D)-adrenoceptors in arteries of spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 135:206-216.
- Gisbert R, Madrero Y, Sabino V, Noguera MA, Ivorra MD, D'Ocon P (2003) Functional characterization of alpha 1-adrenoceptor subtypes in vascular tissues using different experimental approaches: a comparative study. *Br J Pharmacol.* 138:359-368.
- Goetz RM, Thatte HS, Prabhakar P, Cho MR, Michel T, Golan DE (1999) Estradiol induces the calcium-dependent translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:2788-2793.
- Gong K, Li Z, Xu M, Du J, Lv Z, Zhang Y (2008) A novel protein kinase A-independent, β -arrestin-1-dependent signaling pathway for p38 mitogen-activated protein kinase activation by β_2 -adrenergic receptors. *J Biol Chem.* 283:29028-29036.
- Gosink EC, Forsberg EJ (1993) Effects of ATP and bradykinin on endothelial cell Ca²⁺ homeostasis and formation of cGMP and prostacyclin *Am J Physiol.* 265:C1620-1629.
- Granneman JG (1992) Effects of agonist exposure on the coupling of beta 1 and beta 3 adrenergic receptors to adenylyl cyclase in isolated adipocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 261:638-642.
- Granneman JG, Lahners KN (1994) Analysis of human and rodent β_3 -adrenergic receptor messenger ribonucleic acids. *Endocrinology.* 135:1025-1031.
- Granneman JG (2001) The putative beta-4-adrenergic receptor is a novel state of the beta-1-adrenergic receptor. *Ann J Physiol Endocrinol Metab.* 280:199-202.
- Graves J, Poston L (1993) β -adrenoceptor agonist mediated relaxation of rat isolated resistance arteries: a role for the endothelium and nitric oxide. *Br J Pharmacol.* 108:631-637.
- Gray DW, Marshall I (1992) Novel Signal Transduction Pathway Mediating Endothelium-Dependent Beta-Adrenoceptor Vasorelaxation in Rat Thoracic Aorta. *Br J Pharmacol.* 107:684-690.
- Grisk O, Frauendorf T, Schlüter T, Klötting I, Kuttler B, Krebs A, Lüdemann J, Rettig R (2007) Impaired coronary function in Wistar Ottawa Karlsburg W rats – a new model of the metabolic syndrome. *Pflugers Arch.* 454:1011-1021.
- Gross R, Chorasyczewski J, Meek MD, Benovic JL, Ferguson SS, Feldman RD (2000) G-protein-coupled receptor kinase activity in hypertension: increased vascular

Bibliografia

- and lymphocyte G-protein receptor kinase-2 protein expression. *Hypertension*. 35:38-42.
- Gudermann T, Nurnberg B, Schultz G (1995) Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 1. G-protein-coupled receptors: structure and function. *J Mol Med*. 73:51-63.
- Guimaraes S, Moura D (2001) Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol Rev* 53:319-356.
- Guo FH, De Raeve HR, Rice TW, Stuehr DJ, Thunnissen FB, Erzurum SC (1995) Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92:7809-7813.
- Gurdal H, Can A, Ugur M (2005) The role of nitric oxide synthase in reduced vasocontractile responsiveness induced by prolonged alpha1-adrenergic receptor stimulation in rat thoracica. *Br J Pharmacol*. 145:203-210.
- Gutterman DD (1999) Adventitia-dependent influences on vascular function. *Am J Physiol*. 277:1265-1272.
- Hajighasemi F, Hajighasemi S (2009) Effect of propranolol on angiogenic factors in human hematopoietic cell lines in vitro. *Iran Biomed J*. 13:223-228.
- Harada K, Ohmori M, Kitoh Y, Sugimoto K, Fujimura A (1999) Impaired beta-adrenoceptor mediated venodilation in patients with diabetes mellitus. *Br J Clin Pharmacol*. 47:427-431.
- Hasseldine AR, Harper EA, Black JW (2003) Cardiac-specific overexpression of human beta2 adrenoceptors in mice exposes coupling to both Gs and Gi proteins. *Br J Pharmacol*. 138:1358-1366.
- Hathaway DR, Konicki MV, Coolican SA (1985) Phosphorylation of myosin light chain kinase from vascular smooth muscle by cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. *J Mol Cell Cardiol*. 17:841-850.
- Hebert TE, Moffett S, Morello JP, Loisel TP, Bichet DG, Barret C, Bouvier M (1996) A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J Biol Chem*. 271:16384-19263.
- Hein L (2006) Adrenoceptors and signal transduction in neurons. *Cell Tissue Res*. 326:541-551.
- Heinrich TA, da Silva RS, Miranda KM, Switzer CH, Wink DA, Fukuto JM (2013) Biological nitric oxide signalling: chemistry and terminology. *Br J Pharmacol*. 169:1417-29.
- Hilgers RH, Webb RC (2005) Molecular aspects of arterial smooth muscle contraction: focus on Rho. *Exp Biol Med (Maywood)* 230:829-835.

- Hirst GD, Edwards FR (1989) Sympathetic neuroeffector transmission in arteries and arterioles. *Physiol Rev.* 69:546-604.
- Hoffmann C, Leitz MR, Oberdorf-Maass S, Lohse MJ, Klotz KN (2004) Comparative pharmacology of human beta-adrenergic receptor subtypes-characterization of stably transfected receptors in CHO cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 369:151-159.
- Hollenga C, Zaagsma J (1989) Direct evidence for the atypical nature of functional beta-adrenoceptors in rat adipocytes. *Br J Pharmacol.* 98:1420-1424.
- Hussain MB, Marshall I (1997) Characterization of alpha1-adrenoceptor subtypes mediating contractions to phenylephrine in rat thoracic aorta, mesenteric artery and pulmonary artery. *Br. J. Pharmacol.* 122:849-858.
- Hutchinson DS, Evans BA, Summers RJ (2001) beta(1)-Adrenoceptors compensate for beta(3)-adrenoceptors in ileum from beta(3)-adrenoceptor knock-out mice. *Br J Pharmacol.* 132:433-442.
- Hutchinson DS, Bengtsson T, Evans BA, Summers RJ (2002) Mouse beta 3a- and beta 3b-adrenoceptors expressed in Chinese hamster ovary cells display identical pharmacology but utilize distinct signalling pathways. *Br J Pharmacol.* 135:1903-1914.
- Hutchinson DS, Sato M, Evans BA, Christopoulos A, Summers RJ (2005) Evidence for pleiotropic signaling at the mouse beta3-adrenoceptor revealed by SR59230A [3-(2-Ethylphenoxy)-1-[(1S)-1,2,3,4-tetrahydronaph-1-ylamino]-2S-2-propanol oxalate]. *J Pharmacol Exp Ther.* 312:1064-1074.
- Iaccarino G, Ciccarelli M, Sorriento D, Galasso G, Campanile A, Santulli G, Cipolletta E, Cerullo V, Cimini V, Altobelli GG, Piscione F, Priante O, Pastore L, Chiariello M, Salvatore F, Koch WJ, Trimarco B (2005) Ischemic neoangiogenesis enhanced by β_2 -adrenergic receptor overexpression. *Circulation.* 97:1182-1189.
- Ignarro LJ, Kadowitz PJ (1985) The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 25:171-191.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84:9265-9269.
- Isogaya M, Sugimoto Y, Tanimura R, Tanaka R, Kikkawa H, Nagao T, Kurose H (1999) Binding pockets of the beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors for subtype-selective agonists. *Mol Pharmacol.* 56:875-885.
- Issbrucker K, Marti HH, Hippenstiel S, Springmann G, Voswinckel R, Gaumann A, Breier G, Drexler HC, Suttrop N, Clauss M (2003) p38 MAP kinase--a molecular switch between VEGF-induced angiogenesis and vascular hyperpermeability. *Faseb J.* 17:262-264.

Bibliografia

- James SL (1998) Nitric oxide in health and disease. *Parasitol Today*. 14:504.
- Ji Y, Chen S, Li K, Xiao X, Zheng S, Xu T (2013) The role of β -adrenergic receptor signaling in the proliferation of hemangioma-derived endothelial cells. *Cell Div*. 8:1.
- Jiménez-Altayó F, Giraldo J, McGrath JC, Vila E (2003) Enhanced noradrenergic transmission in the spontaneously hypertensive rat anococcygeus muscle. *Br J Pharmacol*. 140:773-779.
- Jindal S, Singh M, Balakumar P (2008) Effect of bis (maltolato) oxovanadium (BMOV) in uric acid and sodium arsenite-induced vascular endothelial dysfunction in rats. *Int J Cardiol*. 128:383–391.
- Johnson M (1998) The β -Adrenoceptor. *Am J Respir Crit Care Med*. 158:146-153.
- Johnson GL, Lapadat R (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*. 298:1911-1912.
- Jones CJ, DeFily DV, Patterson JL, Chilian WM (1993) Endothelium-dependent relaxation competes with alpha 1- and alpha 2-adrenergic constriction in the canine epicardial coronary microcirculation. *Circulation*. 87:1264-1274.
- Joseph SS, Lynham JA, Colledge WH, Kaumann AJ (2004) Binding of (-)-[3H]-CGP12177 at two sites in recombinant human beta 1-adrenoceptors and interaction with beta-blockers. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 369:525-532.
- Kaiser RA, Bueno OF, Lips DJ, Doevendans PA, Jones F, Kimball TF, Molkentin JD (2004) Targeted inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase antagonizes cardiac injury and cell death following ischemia–reperfusion *in vivo*. *J Biol Chem*. 279:15524-15530.
- Kaneko K, Sunano S (1993) Involvement of alpha-adrenoceptors in the endothelium-dependent depression of noradrenaline-induced contraction in rat aorta. *Eur J Pharmacol*. 240:195-200.
- Kanner J, Harel S, Granit R (1991) Nitric oxide as an antioxidant. *Arch Biochem Biophys*. 289:130-136.
- Kantachuesiri S, Fleming S, Peters J, Peters B, Brooker G, Lammie AG, McGrath I, Kotelevtsev Y, Mullins JJ (2001) Controlled hypertension, a transgenic toggle switch reveals differential mechanisms underlying vascular disease. *J Biol Chem*. 276:36727-36733.
- Kaumann AJ, Molenaar P (1996) Differences between the third cardiac β -adrenoceptor and the colonic β_3 -adrenoceptor in the rat. *Br J Pharmacol*. 118:2085-2098.
- Kaumann AJ, Molenaar P (1997) Modulation of human cardiac function through 4 β -adrenoceptor populations. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 355:667-681.

- Kaumann AJ, Preitner F, Sarsero D, Molenaar P, Revelli JP, Giacobino JP (1998) (-)-CGP 12177 causes cardiostimulation and binds to cardiac putative beta 4-adrenoceptors in both wild-type and beta 3-adrenoceptor knockout mice. *Mol Pharmacol* 53:670-675.
- Kaumann AJ, Engelhardt S, Molenaar P, Lohse M (2000) (-)-CGP 12177 evoked cardiostimulation is abolished in double β_1/β_2 -adrenoceptor (AR) Knockout mice. *Proc Austral Soc Clin Exp Pharmacol Toxicol.* 7:70.
- Kaumann AJ, Engelhardt S, Hein L, Molenaar P, Lohse M (2001) Abolition of (-) CGP 12177 evoked cardiostimulation in double β_1/β_2 -adrenoceptor (AR) Knockout mice. Obligatory role of β_1 -adrenoceptor for putative β_4 -adrenoceptor pharmacology. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 363:87-93.
- Kaur T, Goel RK, Balakumar P (2010) Effect of rosiglitazone in sodium arsenite-induced experimental vascular endothelial dysfunction. *Arch Pharmacol Res.* 33:611–618.
- Kenny BA, Chalmers DH, Philpott PC, Naylor AM (1995) Characterization of an alpha 1D-adrenoceptor mediating the contractile response of rat aorta to noradrenaline. *Br J Pharmacol.* 115:981-986.
- Kim B, Kim J, Bae KM, Cho SI, Kwon SC, Jung JY, Park JC, Ahn HY (2004) p38 Mitogen-activated protein kinase contributes to the diminished aortic contraction by endothelin-1 in DOCA-salt hypertensive rats. *Hypertension.* 43:1086-1091.
- Kim J, Eckhart AD, Eguchi S, Koch WJ (2002) β -Adrenergic receptor-mediated DNA synthesis in cardiac fibroblasts is dependent on transactivation of the epidermal growth factor receptor and subsequent activation of extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem.* 277:32116-32123.
- Kim J, Lee YR, Lee CH, Choi WH, Lee CK, Kim J, Bae YM, Cho S, Kim B (2005) Mitogen-activated protein kinase activity contributes to elevated basal tone in aortic smooth muscle from hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 514:209-215.
- Kim J, Lee CK, Park HJ, Kim HJ, So HH, Lee KS, Lee HM, Roh HY, Choi WS, Park TK, Kim B (2006) Epidermal growth factor induces vasoconstriction through the phosphatidylinositol 3-kinase-mediated mitogen-activated protein kinase pathway in hypertensive rats. *J Pharmacol Sci.* 101:135–143.
- Kim JE, Kang YJ, Lee KY, Choi HC (2009) Isoproterenol inhibits angiotensin II-stimulated proliferation and reactive oxygen species production in vascular smooth muscle cells through heme oxygenase-1. *Biol Pharm Bull.* 32:1047-1052.
- Klausner AP, Rourke KF, Miner AS, Ratz PH (2009) Potentiation of carbachol-induced detrusor smooth muscle contractions by beta-adrenoceptor activation. *Eur J Pharmacol.* 606:191-198.
- Koike K, Yamashita Y, Horinouchi T, Yamaki F, Tanaka Y (2004) cAMP-independent mechanism is significantly involved in beta2-adrenoceptor-mediated tracheal relaxation. *Eur J Pharmacol.* 492:65-70.

Bibliografia

- Kompa AR, Summers RJ (2000) Desensitization and resensitization of β_1 - and putative β_4 - adrenoceptor mediated response occur in parallel in a rat model of cardiac failure. *Mol Pharmacol*. 57:252-258.
- Konkar AA, Vansal SS, Shams G, Fraundorfer PF, Zheng WP, Nikulin VI, De Los Angeles J, Fertel RH, Miller DD, Feller DR (1999) Beta-adrenoceptor subtype activities of trimetoquinol derivatives: biochemical studies on human beta-adrenoceptors expressed in chinese hamster ovary cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 291:875-883.
- Konkar AA, Zhu Z, Grameman JG (2000) Aryloxypropanolamine and catecholamine ligand interactions with the β_1 -adrenergic receptor: evidence for interaction with distinct conformations of β_1 -adrenergic receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 294:923-932.
- Kozłowska H, Szymaska U, Schlicker E, Malinowska B (2003) Atypical beta-adrenoceptors, different from beta 3-adrenoceptors and probably from the low-affinity state of beta 1-adrenoceptors, relax the rat isolated mesenteric artery. *Br J Pharmacol*. 140:3-12.
- Krief S, Lonquist F, Raimbaut S, Baude B, Arner P, Strosberg AD, Ricquier D, Emorine LJ (1993) Tissue distribution of β_3 -adrenergic receptor mRNA in man. *J Clin Invest*. 91:344-49.
- Krishna M, Narang H (2008) The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell Mol Life Sci*. 65:3525-3544.
- Kwon S, Lee WJ, Fang LH, Kim B, Ahn HY (2003) Mitogen-activated protein kinases partially regulate endothelin-1-induced contractions through a myosin light chain phosphorylation-independent pathway. *J Vet Med Sci*. 65:225-230.
- Kwon S, Fang LH, Kim B, Ha TS, Lee SJ, Ahn HY (2004) p38 Mitogen-activated protein kinase regulates vasoconstriction in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Sci*. 95:267-272.
- Lachnit WG, Tran AM, Clarke DE, Ford AP (1997) Pharmacological characterization of an alpha 1A-adrenoceptor mediating contractile responses to noradrenaline in isolated caudal artery of rat. *Br. J. Pharmacol*. 120:819-826.
- Lagaud G, Davies KP, Venkateswarlu K, Christ GJ (2002) The physiology, pathophysiology and therapeutic potential of gap junctions in smooth muscle. *Curr Drug Targets*. 3:427-440.
- Lamy S, Lachambre MP, Lord-Dufour S, Beliveau R (2010) Propranolol suppresses angiogenesis in vitro: Inhibition of proliferation, migration, and differentiation of endothelial cells. *Vascul Pharmacol*. 53:200-208.
- Lands AM, Arnold A, McAuliff JP, Luduena FP, Brown TG (1967) Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature*. 214:597-598.
- Langer SZ (1974) Presynaptic regulation of catecholamine release. *Biochem Pharmacol*. 23:1793-1800.

- Lavoie C, Hebert TE (2003) Pharmacological characterization of putative β_1 - β_2 -adrenergic receptor heterodimers. *Can J Physiol Pharmacol.* 81:186-195.
- Leblais V, Pourageaud F, Ivorra MD, Guibert C, Marthan R, Muller B (2004) Role of alpha-adrenergic receptors in the effect of the beta-adrenergic receptor ligands, CGP 12177, bupranolol, and SR 59230A, on the contraction of rat intrapulmonary artery. *J Pharmacol Exp Ther.* 309:137-145.
- Lee HM, Won KJ, Kim J, Park HJ, Kim HJ, Roh HY, Lee SH, Lee CK, Kim B (2007) Endothelin-1 induces contraction via a Syk-mediated p38 mitogen-activated protein kinase pathway in rat aortic smooth muscle. *J Pharmacol Sci.* 103:427-433.
- Lefkowitz RJ (2004) Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 25:413-422.
- Lelliott A, Nikkar-Esfahani A, Offer J, Orchard P, Roberts RE (2012) The role of extracellular-signal regulate kinase (ERK) in the regulation of airway tone in porcine isolated peripheral bronchioles. *Eur J Pharmacol.* 674:407-414.
- Lemoine H, Kaumann AJ (1991) Regional differences of beta 1- and beta 2-adrenoceptor-mediated functions in feline heart. A beta 2-adrenoceptor-mediated positive inotropic effect possibly unrelated to cyclic AMP. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 344:56-69.
- Levick JR (2003) An introduction to cardiovascular physiology. *Arnold eds., London.*
- Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG (1998) Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res.* 74:49-139.
- Lewis CJ, Gong H, Brown MJ, Harding SE (2004) Overexpression of beta 1-adrenoceptors in adult rat ventricular myocytes enhances CGP 12177A cardiostimulation: implications for 'putative' beta 4-adrenoceptor pharmacology. *Br J Pharmacol.* 141:813-824.
- Li F, De Godoy M, Rattan S (2004) Role of adenylate and guanylate cyclases in beta1-, beta2-, and beta3-adrenoceptor-mediated relaxation of internal anal sphincter smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* 308:1111-1120.
- Li H, Förstermann U (2000) Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol.* 190:244-254.
- Li H, Poulos TL (2005) Structure-function studies on nitric oxide synthases. *J Inorg Biochem.* 99:293-305.
- Liggett SB, Freedman NJ, Schwinn DA, Lefkowitz RJ (1993) Structural basis for receptor subtypespecific regulation revealed by a chimeric beta 3/beta 2-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90:3665-3669.
- Lincoln TM (1989) Cyclic GMP and mechanisms of vasodilation. *Pharmacol Ther.* 41:479-502.

Bibliografía

- Liu VW, Huang PL (2008) Cardiovascular roles of nitric oxide: a review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice. *Cardiovasc Res.* 77:19-29.
- Liu YH, Carretero OA, Cingolani OH, Liao TD, Sun Y, Xu J, Li LY, Pagano PJ, Yang JJ, Yang XP (2005) Role of inducible nitric oxide synthase in cardiac function and remodeling in mice with heart failure due to myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 289:2616-2623.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
- Luttrell LM, Gesty-Palmer D (2010) Beyond desensitization: Physiological relevance of arrestin-dependent signaling. *Pharmacol Rev.* 62:305-330.
- MacDonald A, McLean M, MacAulay L, Shaw AM (1999) Effects of propranolol and L-NAME on beta-adrenoceptor-mediated relaxation in rat carotid artery. *J Auton Pharmacol.* 19:145-149.
- MacDonald PS, Dubbin PN, Dusting GJ (1987) Beta-Adrenoceptors on Endothelial Cells Do Not Influence Release of Relaxing Factor in Dog Coronary Arteries. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 14:525-534.
- Magne S, Couchie D, Pecker F, Pavoine C (2001) β_2 -Adrenergic receptor agonists increase intracellular free Ca^{+2} concentration cycling in ventricular cardiomyocytes through p38 and p42/44 MAPK-mediated cytosolic phospholipase A_2 activation. *J Biol Chem.* 276:39539-39548.
- Mallem MY, Toumaniantz G, Serpillon S, Gautier F, Gogny M, Desfontis JC, Gauthier C (2004) Impairment of the low-affinity state beta1-adrenoceptor-induced relaxation in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 143:599-605.
- Mallem MY, Reculeau O, Le Coz O, Gogny M, Desfontis JC (2005a) Low-affinity state beta1-adrenoceptor-induced vasodilation in SHR. *Peptides.* 26:1463-1467.
- Mallem MY, Holopherne D, Reculeau O, Le Coz O, Desfontis JC, Gogny M (2005b) Beta-adrenoceptor-mediated vascular relaxation in spontaneously hypertensive rats. *Auton Neurosci.* 118:61-67.
- Manara L, Croci T, Landi M (1995) Beta (3)-adrenoceptors and intestinal motility. *Fundam Clin Pharmacol.* 9:332-342.
- Manara L, Badone D, Baroni M, Boccardi G, Cecchi R, Croci T, Giudice A, Guzzi U, Landi M, Le Fur G (1996) Functional identification of rat atypical beta-adrenoceptors by the first beta 3-selective antagonists, aryloxypropanolaminotetralins. *Br J Pharmacol.* 117:435-442.
- Marín J, Rodríguez-Martínez MA (1997) Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. *Pharmacol Ther.* 75:111-134.

- Marín J, Balfagón G (1998) Effect of clenbuterol on non-endothelial nitric oxide release in rat mesenteric arteries and the involvement of beta-adrenoceptors. *Br J Pharmacol.* 124:473-478.
- Martí D, Miquel R, Ziani K, Gisbert R, Ivorra MD, Anselmi E, Moreno L, Villagrasa V, Baretino D, D'Ocon P (2005). Correlation between mRNA levels and functional role of alpha1-adrenoceptor subtypes in arteries: evidence of alpha1L as a functional isoform of the alpha1A-adrenoceptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 289:1923–H1932.
- Matsumoto T, Turesson I, Book M, Gerwins P, Claesson-Welsh L (2002) p38 MAP kinase negatively regulates endothelial cell survival, proliferation, and differentiation in FGF-2-stimulated angiogenesis. *J Cell Biol.* 156:149-160.
- Matsumoto T, Kobayashi T, Kamata K (2006) Mechanisms underlying lysophosphatidylcholine-induced potentiation of vascular contractions in the Otsuka Long–Evans Tokushima (OLETF) rat aorta. *Br J Pharmacol.* 149:931–941.
- Matsushita M, Horinouchi T, Tanaka Y, Tsuru H, Koike K (2003) Characterization of beta 3-adrenoceptor-mediated relaxation in rat abdominal aorta smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* 482:235-244.
- May LT, Hill SJ (2008) ERK Phosphorylation: Spatial and Temporal Regulation by G Protein-Coupled Receptors. *Int J Biochem Cell Biol.* 40:2013-2017.
- McAlees JW, Sanders VM (2009) Hematopoietic protein tyrosine phosphatase mediates β_2 -adrenergic receptor-induced regulation of p38 mitogen-activated protein kinase in B lymphocytes. *Mol Cell Biol.* 29:675-686.
- McGrath JC, Deighan C, Briones AM, Shafaroudi MM, McBride M, Adler J, Arribas SM, Vila E, Daly CJ (2005) New aspects of vascular remodelling: the involvement of all vascular cell types. *Exp Physiol.* 90:469-475.
- McLaughlin DP, MacDonald A (1990) Evidence for the existence of 'atypical' β -adrenoceptors (β_3 -adrenoceptors) mediating relaxation in the rat distal colon in vitro. *Br J Pharmacol.* 101:569-574.
- McMillan K, Masters BS (1995) Prokaryotic expression of the heme- and flavin-binding domains of rat neuronal nitric oxide synthase as distinct polypeptides: identification of the heme-binding proximal thiolate ligand as cysteine-415. *Biochemistry.* 34:3686-3693.
- Mecham RP, Levy BD, Morris SL, Madaras JG, Wreen DS (1985) Increased cyclic GMP levels lead to stimulation of elastin production in ligament fibroblasts that is reversed by cyclic AMP. *J Biol Chem.* 260:3255-3258.
- Mehta JL, Chen LY, Kone BC, Mehta P, Turner P (1995) Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. *J Lab Clin Med.* 125:370-377.

Bibliografia

- Mehta RC, Salazar-Bookaman MM, Fertel RH, De Los Angeles J, Nikulin VI, Fraundorfer PF, Miller DD, Feller DR (2000) Biochemical and functional characterization of 1-benzyl substituted trimetoquinol affinity analogs on rat and human beta-adrenoceptors. *Biochem Pharmacol.* 59:517-529.
- Mersmann HJ (2002) Beta-Adrenergic receptor modulation of adipocyte metabolism and growth *J Anim Sci.* 80:E24-E29.
- Methven L, McBride M, Wallace GA, McGrath JC (2009a) The alpha 1B/D-adrenoceptor knockout mouse permits isolation of the vascular alpha 1A-adrenoceptor and elucidates its relationship to the other subtypes. *Br J Pharmacol.* 158:209–224.
- Methven L, Simpson PC, McGrath JC (2009b) Alpha1A/B-knockout mice explain the native alpha1D-adrenoceptor's role in vasoconstriction and show that its location is independent of the other alpha1-subtypes. *Br J Pharmacol.* 158:1663–1675.
- Michiels C (2003) Endothelial cell functions. *J Cell Physiol.* 196:430-443.
- Miller JW, Hu ZW, Okazaki M, Fujinaga M, Hoffman BB (1996) Expression of alpha 1 adrenergic receptor subtype mRNAs in the rat cardiovascular system with aging. *Mech. Ageing Dev.* 87:75-89.
- Mizuno K, Kanda Y, Kuroki Y, Nishio M, Watanabe Y (2002) Stimulation of beta(3)-adrenoceptors causes phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase via a stimulatory G protein-dependent pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Br J Pharmacol.* 135:951-960.
- Molenaar P, Summers RJ (1987) Characterization of beta-1 and beta-2 adrenoceptors in guinea pig atrium: functional and receptor binding studies. *J Pharmacol Exp Ther.* 241:1041-1047.
- Molenaar P (2003) The 'state' of beta-adrenoceptors. *Br J Pharmacol.* 140:1-2.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991a) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 43:109-142.
- Moncada S, Rees DD, Schulz R, Palmer RM (1991b) Development and mechanism of a specific supersensitivity to nitrovasodilators after inhibition of vascular nitric oxide synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88:2166-2170.
- Moncada S (1997) Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. *Ann N Y Acad Sci.* 811:60-67.
- Morioka N, Tanabe H, Inoue A, Dohi T, Nakata Y (2009) Noradrenaline reduces the ATP-stimulated phosphorylation of p38 MAP kinase via β -adrenergic receptors-cAMP-protein kinase A dependent mechanism in cultured rat spinal microglia. *Neurochem Int.* 55:226-234.

- Mulvany MJ, Halpern W (1977) Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res.* 41:19-26
- Murray KJ (1990) Cyclic AMP and mechanisms of vasodilation. *Pharmacol Ther* 47:329-345.
- Naseem KM (2005) The role of nitric oxide in cardiovascular disease. *Mol Aspects Med.* 26:33–65.
- Nemoto S, Xiang J, Huang S, Lin A (1998) Induction of apoptosis by SB202190 through inhibition of p38beta mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 273:16415-16420.
- Nevzorova J, Bengtsson T, Evans BA, Summers RJ (2002) Characterization of the beta-adrenoceptor subtype involved in mediation of glucose transport in L6 cells. *Br J Pharmacol.* 137:9-18.
- Nikulin VI, Rakov IM, De Los Angeles JE, Mehta RC, Boyd LY, Feller DR, Miller DD (2006) 1-Benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-6,7-diols as novel affinity and photoaffinity probes for beta-adrenoceptor subtypes. *Bioorg Med Chem.* 14:1684-1697.
- Nishida K, Yamaguchi O, Hirotani S, Hikoso S, Higuchi Y, Watanabe T, Takeda T, Osuka S, Morita T, Kondoh G, Uno Y, Kashiwase K, Taniike M, Nakai A, Matsumura Y, Miyazaki J, Sudo T, Hongo K, Kusakari Y, Kurihara S, Chien KR, Takeda J, Hori M, Otsu KT (2004) p38alpha mitogen-activated protein kinase plays a critical role in cardiomyocyte survival but not in cardiac hypertrophic growth in response to pressure overload. *Mol Cell Biol.* 24:10611-10620.
- Nisoli E, Tonello C, Landi M, Carruba MO (1996) Functional studies of the first selective beta 3-adrenergic receptor antagonist SR 59230A in rat brown adipocytes. *Mol Pharmacol.* 49:7-14.
- O'Donnell SR, Wanstall JC (1984) β -1 and β -2 adrenoceptor-mediated responses in preparations of pulmonary artery and aorta from young and aged rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 228:733–738.
- Ohanian J, Cunliffe P, Ceppi E, Alder A, Heerkens E, Ohanian V (2001) Activation of p38 mitogen-activated protein kinases by endothelin and noradrenaline in small arteries, regulation by calcium influx and tyrosine kinases, and their role in contraction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21:1921-1927.
- Oliver E, Marti D, Monto F, Flacco N, Moreno L, Baretino D, Ivorra MD, D'Ocon P (2009) The impact of alpha1-adrenoceptors up-regulation accompanied by the impairment of beta-adrenergic vasodilatation in hypertension. *J Pharmacol Exp Ther.* 328:982-990.
- Oriowo MA (1994) Atypical β -adrenoceptors in the rat isolated common carotid artery. *Br J Pharmacol.* 113:699–702.

Bibliografía

- Oriowo MA (1995) Different atypical β -adrenoceptors mediate isoprenaline-induced relaxation in vascular and non-vascular smooth muscles. *Life Sci.* 56:269- 275.
- Osadchii OE, Woodiwiss AJ, Norton GR (2006) Contractile responses to selective phosphodiesterase inhibitors following chronic betaadrenoreceptor activation. *Pflugers Arch.* 452:155-163.
- Palmer RM, Ashton DS, Moncada S (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 333:664-666.
- Papadaki M, Tilton RG, Eskin SG, McIntire LV (1998) Nitric oxide production by cultured human aortic smooth muscle cells: stimulation by fluid flow. *Am J Physiol.* 274:616-626.
- Papapetropoulos A, Desai KM, Rudic RD, Mayer B, Zhang R, Ruiz-Torres MP, García-Cardeña G, Madri JA, Sessa WC (1997a) Nitric oxide synthase inhibitors attenuate transforming-growth-factor-beta 1-stimulated capillary organization in vitro. *Am J Pathol.* 150:1835-1844.
- Papapetropoulos A, García-Cardeña G, Madri JA, Sessa WC (1997b) Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest.* 100:3131-3139.
- Papapetropoulos A, Rudic RD, Sessa WC (1999) Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res.* 43:509-520.
- Park PS, Palczewski K (2005) Diversifying the repertoire of G-protein-coupled receptors through oligomerization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102:8793-8794.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 22:153-183.
- Perez-Aso M (2009) Caracterización de la señalización intracelular tras la activación de receptores adrenérgicos. *Tesis doctoral. Universidad de Valencia.*
- Philipp M, Hein L (2004) Adrenergic receptor knockout mice: distinct functions of 9 receptor subtypes. *Pharmacol. Ther.* 101:65–74.
- Piasek MT, Guarino RD, Smith MS, Soltis EE, Saussy DL Jr, Perez DM (1995) The specific contribution of the novel alpha-1D adrenoceptor to the contraction of vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* 275:1583–1589.
- Piasek MT, Hrometz SL, Edelman SE, Guarino RD, Hadley RW, Brown RD (1997) Immunocytochemical localization of the alpha-1B adrenergic receptor and the contribution of this and the other subtypes to vascular smooth muscle contraction: analysis with selective ligands and antisense oligonucleotides. *J Pharmacol Exp Ther.* 283:854-868.

- Popp BD, Hutchinson DS, Evans BA, Summers RJ (2004) Stereoselectivity for interactions of agonists and antagonists at mouse, rat and human beta3-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol.* 484:323-331.
- Portillo MP, Rocandio AM, Garcia-Calonge MA, Diaz E, Campo E, Martinez-Blazquez C, Errasti J, DelBarrio AS (1995) Lipolytic effects of beta1, beta2 and beta3-adrenergic agonists in isolated human fat cells from omental and retroperitoneal adipose tissues. *Rev Esp Fisiol.* 51:193-200.
- Pullar CE, Chen J, Isseroff RR (2003) PP2A activation by beta2-adrenergic receptor agonists: novel regulatory mechanism of keratinocyte migration. *J Biol Chem.* 278:22555-22562.
- Pullar CE, Isseroff RR (2006) The beta 2-adrenergic receptor activates pro-migratory and pro-proliferative pathways in dermal fibroblasts via divergent mechanisms. *J Cell Sci.* 119:592-602.
- Pullar CE, Le Provost GS, O'Leary AP, Evans SE, Baier BS, Isseroff RR (2012) β 2AR antagonists and β 2AR gene deletion both promote skin wound repair processes. *J Invest Dermatol.* 132:2076-2084.
- Queen LR, Ferro A (2006) β -adrenergic receptors and nitric oxide generation in the cardiovascular system. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 63:1070-1083.
- Queen LR, Ji Y, Xu B, Young L, Yao K, Wyatt AW, Rowlands DJ, Siow RC, Mann GE, Ferro A (2006) Mechanisms underlying beta2-adrenoceptor-mediated nitric oxide generation by human umbilical vein endothelial cells. *J Physiol.* 576:585-594.
- Rafikov R, Fonseca FV, Kumar S, Pardo D, Darragh C, Elms S, Fulton D, Black SM (2011) eNOS activation and NO function: structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity. *J Endocrinol.* 210:271-284.
- Raingeaud J, Whitmarsh AJ, Barrett T, Derijard B, Davis RJ (1996) MKK3 and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol.* 16:1247-1255.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G (2012) Rang y Dale's Pharmacology. *Churchill Livingstone. London.*
- Rasmussen SG, DeVree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, Kobilka TS, Thian FS, Chae PS, Pardon E, Calinski D, et al. (2011) Crystal Structure of the β ₂Adrenergic Receptor-Gs protein complex. *Nature* 477: 549–555.
- Rautureau Y, Toumaniantz G, Serpillon S, Jourdon P, Trochu JN, Gauthier C (2002) β ₃-adrenoceptor in rat aorta: molecular and biochemical characterization and signalling pathway. *Br J Pharmacol.* 137:153–161.
- Rembold CM (1992) Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. *Hypertension.* 20:129-137.

Bibliografia

- Richards MK, Marletta MA (1994) Characterization of neuronal nitric oxide synthase and a C415H mutant, purified from a baculovirus overexpression system. *Biochemistry*. 33:14723-14732.
- Ristori C, Filippi L, Dal Monte M, Martini D, Cammalleri M, Fortunato P, la Marca G, Fiorini P, Bagnoli P (2011) Role of the adrenergic system in a mouse model of oxygen-induced retinopathy: antiangiogenic effects of beta-adrenoreceptor blockade. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 52:155-170.
- Roberts RE (2001) Role of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signal transduction cascade in α_2 -adrenoceptor-mediated vasoconstriction in porcine palmar lateral vein. *Br J Pharmacol*. 133:859-866.
- Roberts RE (2004) The role of Rho kinase and extracellular regulated kinase-mitogen-activated protein kinase in alpha2-adrenoceptor-mediated vasoconstriction in the porcine palmar lateral vein. *J Pharmacol Exp Ther*. 311:742-747.
- Roberts SJ, Papaioannou M, Evans BA, Summers RJ (1997) Functional and molecular evidence for beta 1-, beta 2-, and beta 3-adrenoceptors in human colon. *Br J Pharmacol*. 120:1527-1535.
- Roberts SJ, Papaioannou M, Evans BA, Summers RJ (1999) Characterization of β -adrenocceptor mediated smooth muscle relaxation and detection of mRNA for β_{1-} , β_{2-} and β_{3-} adrenoceptors in rat ileum. *Br J Pharmacol*. 127:949-961.
- Rockman HA, Koch WJ, Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature*. 415:206-212.
- Rohrer DK, Chruscinski A, Schauble EH, Bernstein D, Kobilka BK (1999) Cardiovascular and metabolic alterations in mice lacking both beta1- and beta2-adrenergic receptors. *J Biol Chem*. 274:16701-16708.
- Romana-Souza B, Nascimento AP, Monte-Alto-Costa A (2009) Propranolol improves cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol*. 611: 77-84.
- Rouget C, Barthez O, Goirand F, Leroy MJ, Breuiller-Fouché M, Rakotoniaina Z, Guérard P, Morcillo EJ, Advenier C, Sagot P, Cabrol D, Dumas M, Bardou M (2006) Stimulation of the ADRB3 adrenergic receptor induces relaxation of human placental arteries: influence of preeclampsia. *Biol Reprod*. 74:209-216.
- Roux PP, Blenis J (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*. 68:32-44.
- Rozec B, Serpillon S, Toumaniantz G, Seze C, Rautureau Y, Baron O, Noireaud J, Gauthier C (2005) Characterization of beta3-adrenoceptors in human internal mammary artery and putative involvement in coronary artery bypass management. *J Am Coll Cardiol*. 46:351-359.

- Rozec B, Gauthier C (2006) β_3 -Adrenoceptors in the cardiovascular system: Putative roles in human pathologies. *Pharmacol Ther.* 111:652-656.
- Rozec B, Quang TT, Noireaud J, Gauthier C (2006) Mixed beta3-adrenoceptor agonist and alpha1-adrenoceptor antagonist properties of nebivolol in rat thoracic aorta. *Br J Pharmacol.* 147:699-706.
- Rudner XL, Berkowitz DE, Booth JV, Funk BL, Cozart KL, D'Amico EB, El-Moalem H, Page SO, Richardson CD, Winters B, Marucci L, Schwinn DA (1999) Subtype specific regulation of human vascular alpha(1)-adrenergic receptors by vessel bed and age. *Circulation.* 100:2336-2343.
- Sánchez-Ferrer CF, Marín J (1990) Endothelium-derived contractile factors. *Gen Pharmacol.* 21:589-603.
- Sanz-Rosa D (2011) Los receptores β adrenérgicos en la enfermedad cardiovascular. *Hipertens riesgo vasc.* 28:55-62.
- Sase K, Michel T (1995) Expression of constitutive endothelial nitric oxide synthase in human blood platelets. *Life Sci.* 57:2049-2055.
- Sastre E, Márquez-Rodas I, Blanco-Rivero J, Balfagón G (2010) Perivascular innervation of the superior mesenteric artery: pathophysiological implications. *Rev Neurol.* 50:727-737.
- Satake N, Shibata M, Shibata S (1996) The inhibitory effects of iberiotoxin and 4-aminopyridine on the relaxation induced by β_1 - and β_2 -adrenoceptor activation in rat aortic rings. *Br J Pharmacol.* 119: 505-510.
- Sato M, Horinouchi T, Hutchinson DS, Evans BA, Summers RJ (2007) Ligand-directed signaling at the beta3-adrenoceptor produced by 3-(2-Ethylphenoxy)-1-[(1S)-1,2,3,4-tetrahydronaph-1-ylamino]-2S-2-propanol oxalate (SR59230A) relative to receptor agonists. *Mol Pharmacol.* 72:1359-1368.
- Sato M, Hutchinson DS, Evans BA, Summers RJ (2008) The β_3 -adrenoceptor agonist 4-[[[(hexylamino) carbonyl]amino]-N-[4-[2-[[[(2S)-2-hydroxy-3-(4-hydroxyphenoxy) propyl] amino]ethyl] -phenyl] -benzenesulfonamide (L755507) and antagonist (S)-N-[4-[2-[[[3-[3-(acetamido methyl) phenoxy] -2-hydroxypropyl] amino]-ethyl] phenyl] benzene sulfonamide (L748337) activate different signaling pathways in Chinese hamster ovary-K1 cells stably expressing the human β_3 -adrenoceptor. *Mol Pharmacol.* 74:1417-1428.
- Schild HO (1947) pA, a new scale for the measurement of drug antagonism. *Br J Pharmacol Chemother.* 2:189-206.
- Schnittler HJ (1998) Structural and functional aspects of intercellular junctions in vascular endothelium. *Basic Res Cardiol.* 93:30-39.
- Schwarz PM, Kleinert H, Forstermann U (1999) Potential functional significance of brain-type and muscle-type nitric oxide synthase I expressed in adventitia and media of rat aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19:2584-2590.

Bibliografía

- Scotland RS, Chauhan S, Davis C, De Felipe C, Hunt S, Kabir J, Kotsonis P, Oh U, Ahluwalia A (2004) Vanilloid receptor TRPV1, sensory C-fibers, and vascular autoregulation: a novel mechanism involved in myogenic constriction. *Circ Res.* 95:1027-1034.
- Segura V (2010) Diferencias en la localización subcelular y los mecanismos moduladores de la actividad de los adrenoceptores alfa1 y beta. *Tesis doctoral. Universidad de Valencia.*
- Shafiei M, Mahmoudian M (1999) Atypical beta-adrenoceptors of rat thoracic aorta. *Gen Pharmacol.* 32:557-562.
- Shen YT, Cervoni P, Claus T, Vatner SF (1996) Differences in beta 3-adrenergic receptor cardiovascular regulation in conscious primates, rats and dogs. *J Pharmacol Exp Ther.* 278:1435-1443.
- Shenoy SK, Drake MT, Nelson CD, Houtz DA, Xiao K, Madabushi S, Reiter E, Premont RT, Lichtarge O, Lefkowitz RJ (2006) beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *J Biol Chem.* 281:1261-1273.
- Sommerville LE, Hartshorne DJ (1986) Intracellular calcium and smooth muscle contraction. *Cell Calcium.* 7:353-364.
- Sooch S, Marshall I (1997) Atypical β -adrenoceptors in the rat vasculature. *Ann NY Acad Sci.* 812:211-212.
- Sorriento D, Santulli G, Del Giudice C, Anastasio A, Trimarco B, Iaccarino G (2012) Endothelial cells are able to synthesize and release catecholamines both in vitro and in vivo. *Hypertension.* 60:129-36.
- Stassen FR, Maas RG, Schiffers PM, Janssen GM, De Mey JG (1998) A positive and reversible relationship between adrenergic nerves and alpha-1A adrenoceptors in rat arteries. *J Pharmacol Exp Ther.* 284:399-405.
- Storch CH, Hoeger PH (2010) Propranolol for infantile haemangiomas: insights into the molecular mechanisms of action. *Br J Dermatol.* 163:269-274.
- Strosberg AD (1993) Structure, function and regulation of adrenergic receptors. *Protein Sci.* 12:1198-1209.
- Strosberg AD (1997a) Association of β_3 -adrenoceptor polymorphism with obesity and diabetes: current status. *Trends Pharmacol Sci.* 18:449-454.
- Strosberg AD (1997b) Structure and function of the β_3 -adrenergic receptor. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 37:421-450.
- Strosberg AD, Gerhart CC, Gross J, Jockers R, Pietri-Rouxel F (1998) Reply on the putative existence of a fourth β -adrenoceptor: proof is still missing. *Trends Pharmacol Sci.* 19:165-166.

- Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF (1991) Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88:7773-7777.
- Sumpio BE, Riley JT, Dardik A (2002) Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol*. 34:1508-1512.
- Szabó C, Papapetropoulos A (2011) Hydrogen sulphide and angiogenesis: mechanisms and applications. *Br J Pharmacol*. 164:853-865.
- Taddei S, Ghiadoni L, Virdis A, Versari D, Salvetti A (2003) Mechanisms of endothelial dysfunction: clinical significance and preventive non-pharmacological therapeutic strategies. *Curr Pharm Des*. 9:2385-2402.
- Tagaya E, Tamaoki J, Takemura H, Isono K, Nagai A (1999) Atypical adrenoceptor-mediated relaxation of canine pulmonary artery through a cyclic adenosine monophosphate-dependent pathway. *Lungs*. 177:321-332.
- Takahashi H, Yoshida T, Nishimura M, Nakanishi T, Kondo M, Yoshimura M (1992) Beta-3 adrenergic agonist, BRL-26830A, and alpha/beta blocker, arotinolol, markedly increase regional blood flow in the brown adipose tissue in anesthetized rats. *Jpn Circ J*. 56:936-942.
- Taki N, Tanaka T, Zhang L, Suzuki F, Israilova M, Taniguchi T, Hiraizumi-Hiraoka Y, Shinozuka K, Kunitomo M, Muramatsu I (2004) Alpha-1D adrenoceptors are involved in reserpine-induced supersensitivity of rat tail artery. *Br J Pharmacol*. 142:647-656.
- Tamaoki J, Tagaya E, Isono K, Nagai A (1998) Atypical adrenoceptor-mediated relaxation of canine pulmonary artery through a cAMP-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 248:722-727.
- Tan S, Curtis-Prior PB (1983) Characterization of the beta-adrenoceptor of the adipose cell of the rat. *Int J Obesity*. 7:409-414.
- Tanaka Y, Yamashit Y, Yamaki F, Horionuchi T, Shigenobu K, Koike K (2003) MaxiK channel mediates β_2 -adrenoceptor-activated relaxation to isoprenaline through cAMP-dependent and independent mechanisms in guinea pig tracheal smooth muscle. *J Smooth Muscle Res*. 39:205-219.
- Tanaka Y, Horinouchi T, Koike K (2005) New insights into β -adrenoceptors in smooth muscle: distribution of receptor subtypes and molecular mechanisms triggering muscle relaxation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 32:503-514.
- Tanaka T, Zhang L, Suzuki F, Muramatsu I (2004) Alpha-1 adrenoceptors: evaluation of receptor subtype-binding kinetics in intact arterial tissues and comparison with membrane binding. *Br J Pharmacol*. 141:468-476.
- Tanoue A, Koshimizu TA, Shibata K, Nasa Y, Takeo S, Tsujimoto G (2003) Insights into alpha1 adrenoceptor function in health and disease from transgenic animal studies. *Trends Endocrinol Metab*. 14:107-113.

Bibliografia

- Telò P, Lostaglio S, Dejana E (1997) Structure of intercellular junctions in the endothelium. *Therapie*. 52:395-398.
- Tenhunen O, Soini Y, Ilves M, Rysa J, Tuukkanen J, Serpi R (2006) p38 Kinase rescues failing myocardium after myocardial infarction: evidence for angiogenic and anti-apoptotic mechanisms. *FASEB J*. 20:1907-1909.
- Testa R, Destefani C, Guarneri L, Poggesi E, Simonazzi I, Taddei C, Leonardi A (1995) The alpha 1D-adrenoceptor subtype is involved in the noradrenaline-induced contractions of rat aorta. *Life Sci*. 57:L159-L163.
- Thakali K, Davenport L, Fink GD, Watts SW (2007) Cyclooxygenase, p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), extracellular signal-regulated kinase MAPK, Rho kinase, and Src mediate hydrogen peroxide-induced contraction of rat thoracic aorta and vena cava. *J Pharmacol Exp Ther*. 320:236-243.
- Torrens C, Brawley L, Itoh S, Poston L, Hanson MA (2002) Atypical β -adrenoceptor-mediated vasodilation in rat isolated small mesenteric arteries. *Br J Pharmacol*. 135:59.
- Touyz RM, El Mabrouk M, He G, Wu XH, Schiffrin EL (1999) Mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase inhibition attenuates angiotensin II-mediated signaling and contraction in spontaneously hypertensive rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 84:505-515.
- Touyz RM, Deschepper C, Park JB, He G, Chen X, Neves MFT, Virdis A, Schiffrin EL (2002) Inhibition of mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase improves endothelial function and attenuates Ang-II induced contractility of mesenteric resistance arteries from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 20:1127-1134.
- Trochu JN, Leblais V, Rautureau Y, Beverelli F, Le Marec H, Berdeaux A, Gauthier C (1999) Beta 3-Adrenoceptor stimulation induces vasorelaxation mediated essentially by endothelium-derived nitric oxide in rat thoracic aorta. *Br J Pharmacol*. 128:69-76.
- Tsai MH, Jiang MJ (2005) Extracellular signal-regulated kinase1/2 in contraction of vascular smooth muscle. *Life Sci*. 76:877-888.
- Tsang MY, Rabkin SW (2009) p38 MAPK is activated by norepinephrine and serves a cardioprotective role while epinephrine induces p38 MAPK dephosphorylation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 36:12-19.
- Tsuru H (1999) The diversity of autonomic innervation in the vascular system. *Autonomic Nervous System*. 36:119-125
- Tsuru H, Tanimitsu N, Hirai T (2002) Role of perivascular sympathetic nerves and regional differences in the features of sympathetic innervation of the vascular system. *Jpn J Pharmacol*. 88:9-13.

- Tuttle JL, Falcone JC (2001) Nitric Oxide release during alpha1-adrenoceptor-mediated constriction of arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 281:H873-H881.
- Uberti MA, Hall RA, Minneman KP (2003) Subtype-specific dimerization of alpha 1-adrenoceptors: effects on receptor expression and pharmacological properties. *Mol Pharmacol.* 64:1379-1390.
- Uhiara CO, Alexander SPH, Roberts RE (2009) Effect of inhibition of extracellular signal-regulated kinase on relaxations to β -adrenoceptor agonists in porcine isolated blood vessel. *Br J Pharmacol.* 158:1713-1719.
- Vallance P, Collier J, Moncada S. (1989) Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet.* 2:997-1000.
- Van der Zyp A, Kang KB, Majewski H (2000) Age-related involvement of the endothelium in beta-adrenoceptor-mediated relaxation of rat aorta. *Eur J Pharmacol.* 397:129-138.
- Vanhoutte PM, Miller VM (1989) Alpha 2-adrenoceptors and Endothelium-Derived Relaxing Factor. *Am J Med.* 87:1S-5S.
- Vanhoutte PM (2001) Endothelial adrenoceptors. *J Cardiovasc Pharmacol.* 38:796-808.
- Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EH, Feletou M (2009) Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf).* 196:193-222.
- Versari D, Daghini E, Viridis A, Ghiadoni L, Taddei S (2009) Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension. *Br J Pharmacol.* 157:527-536.
- Viard P, Macrez N, Coussin F, Morel JL, Mironneau J (2000) Beta-3 adrenergic stimulation of L-type Ca(2+) channels in rat portal vein myocytes. *Br J Pharmacol.* 129:1497-1505.
- Villalobos-Molina R, Ibarra M (1996) Alpha 1-adrenoceptors mediating contraction in arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats are of the alpha 1D or alpha 1A subtypes. *Eur J Pharmacol.* 298:257-263.
- Villalobos-Molina R, Lopez-Guerrero JJ, Ibarra M (1999) Functional evidence of alpha1Adrenoceptors in the vasculature of young and adult spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 126:1534-1536.
- Warne T, Serrano-Vega MJ, Baker JG, Moukhametzianov R, Edwards PC, Henderson R, Leslie AG, Tate CG, Schertler GF (2008) Structure of a β_1 -adrenergic G protein-coupled receptor. *Nature* 454: 486–491.
- Warne T, Moukhametzianov R, Baker JG, Nehmé R, Edwards PC, Leslie AG, Schertler GF, Tate CG (2011) The structural basis for agonist and partial agonist action on a $\beta(1)$ -adrenergic receptor. *Nature.* 469:241-244.
- Webb RC (2003) Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ.* 27:201-206.

Bibliografia

- Welch G, Loscalzo J (1994) Nitric oxide and the cardiovascular system. *J Card Surg.* 9:361-371.
- Werstiuk ES, Lee RM (2000) Vascular beta-adrenoceptor function in hypertension and in ageing. *Can J Physiol Pharmacol.* 78:433-452.
- Westfall TC, Weston AH (2007) Neurotransmission: the autonomic and somatic motor nervous systems. In: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL (eds). *Goodman Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics.* 11th ed. McGraw-Hill: New York, NY.
- Widder J, Behr T, Fraccarollo D, Hu K, Galuppo P, Tas P, Angermannb CE, Ertla G, Bauersachs J (2004) Vascular endothelial dysfunction and superoxide anion production in heart failure are p38 MAP kinase-dependent. *Cardiovasc Res.* 63:161-167.
- Williams B, Poulter NR, Brown MJ, Davis M, McInnes GT, Potter JF, Sever PS, Thom SM (2004) British Hypertension Society guidelines for hypertension management. *Br Med J.* 328:634-640.
- Xiao D, Zhang L (2002) ERK MAP kinases regulate smooth muscle contraction in ovine uterine artery: effect of pregnancy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 282:292-300.
- Xiao D, Pearce WJ, Longo LD, Zhang L (2004) ERK-mediated uterine artery contraction: role of thick and thin filament regulatory pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 286:1615-1622.
- Xiao RP, Ji X, Lakatta EG (1995) Functional coupling of beta-2-adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. *Mol Pharmacol.* 47:322-329.
- Xiao RP, Avdomin P, Zhou YY, Chen HP, Akhter SA, Eschenhagen T, Lefkowitz RJ, Koch WJ, Lakatta EG (1999) Coupling of beta 2-adrenoceptor to Gi proteins and its physiological relevance in murine cardiac myocytes. *Circ Res.* 88:43-52.
- Xiao RP, Zhu W, Zhen M, Cao C, Zhang Y, Lakatta EG, Han Q (2006) Subtype-specific α_1 - and β -adrenoceptor signaling in the heart. *Trends Pharmacol Sciences.* 27:330-337.
- Xu B, Li J, Gao L, Ferro A (2000) Nitric Oxide-Dependent Vasodilatation of Rabbit Femoral Artery by Beta(2)-Adrenergic Stimulation or Cyclic AMP Elevation in Vivo. *Br J Pharmacol.* 129:969-974.
- Xu J, Zou MH (2009) Molecular insights and therapeutic targets for diabetic endothelial dysfunction. *Circulation.* 120:1266-1286.
- Yamamoto Y, Mori A, Koike K (1998) Beta-adrenoceptors in the detrusor of guinea pig bladder. *J Smooth Muscle Res.* 34:233-242.

- Yamauchi J, Nagao M, Kaziro Y, Itoh H (1997) Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by signaling through G protein-coupled receptors. Involvement of G_{βγ} and Gαq/11 subunits. *J Biol Chem.* 272:27771-27777.
- Yue TL, Wang C, Gu JL, Ma XL, Kumar S, Lee JC, Feuerstein GZ, Thomas H, Maleeff B, Ohlstein EH (2000) Inhibition of extracellular signal-regulated kinase enhances ischemia/reoxygenation-induced apoptosis in cultured cardiac myocytes and exaggerates reperfusion injury in isolated perfused heart. *Circ Res.* 86:692-699.
- Zachary I (2003) VEGF signalling: Integration and multi-tasking in endothelial cell biology. *Biochem Soc Trans.* 31:1171-1177.
- Zamah AM, Delahunty M, Luttrell LM, Lefkowitz RJ (2002) Protein kinase A-mediated phosphorylation of the beta 2-adrenergic receptor regulates its coupling to Gs and Gi. Demonstration in a reconstituted system. *J Biol Chem.* 277:31249-31256.
- Zheng M, Zhang SJ, Zhu WZ, Ziman B, Kobilka BK, Xiao RP (2000) β₂-Adrenergic receptor-induced p38 MAPK activation is mediated by protein kinase A rather than by Gi or Gβγ in adult mouse cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 275:40635-40640.
- Zheng M, Hou R, Han Q, Xiao RP (2004) Different regulation of ERK1/2 activation by β-adrenergic receptor subtypes in adult mouse cardiomyocytes. *Heart Lung Circ.* 13:179-183.
- Zheng M, Zhu W, Han Q, Xiao RP (2005) Emerging concepts and therapeutic implications of β-adrenergic receptor subtype signaling. *Pharmacol Ther.* 108:257-268.
- Zhong H, Minneman KP (1999) Alpha1-adrenoceptor subtypes. *Eur. J. Pharmacol.* 375:261-276.
- Zhu WZ, Zheng M, Koch WJ, Lefkowitz RJ, Kobilka BK, Xiao RP (2001) Dual modulation of cell survival and cell death by β₂-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci.* 98:1607-1612.
- Zhu WZ, Chakir K, Zhang S, Yang D, Lavoie C, Bouvier M, Hébert TE, Lakatta EG, Cheng H, Xiao RP (2005) Heterodimerization of beta1- and beta2-adrenergic receptor subtypes optimizes beta-adrenergic modulation of cardiac contractility. *Circ Res.* 97:244-251.
- Ziani K, Gisbert R, Noguera MA, Ivorra MD, D'Ocon P (2002) Modulatory role of a constitutively active population of alpha(1D)-adrenoceptors in conductance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 282:475-481.
- Zschauer AO, Sielczak MW, Smith DA, Wanner A (1997) Norepinephrine-induced contraction of isolated rabbit bronchial artery: role of alpha 1- and alpha 2-adrenoceptor activation. *J Appl Physiol.* 82:1918-1925.