



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
BCA. DE CIÈNCIES EDUARD BOSCA

DATA: 12/7/2010

SIGNATURA:  
TD-FARM

Nº ITEM: 121860889

UNIVERSIDAD DE VALENCIA      FACULTAD DE FARMACIA

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de  
la fecha, acordó otorgar, a esta Tesis doctoral de  
D. ...EDUARDO OLIVER PEREZ.....  
la calificación de EXCELLENT CUM LAUDE  
Valencia, a 6 de Julio.....de 2010

El Secretario.

El Presidente,

*J. A. Miguel*



*Antonio Loma*







VNIVERSITATIS VALÈNCIAE

FACULTAT DE FARMÀCIA  
DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA

**Diferencias, en función del género, en la  
expresión y funcionalidad de  
Adrenoceptores y GRKs en patología  
cardiovascular**

Tesis Doctoral presentada por:

**Eduardo Oliver Pérez**

Valencia, Febrero de 2010

UMI Number: U603093

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U603093

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.  
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against  
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC  
789 East Eisenhower Parkway  
P.O. Box 1346  
Ann Arbor, MI 48106-1346





VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAT DE FARMÀCIA  
DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA

*Dña. Pilar D'Ocon Navaza, Catedrática de Farmacología de la Universitat de València,*

**CERTIFICA:**

Que la memoria titulada: *"Diferencias, en función del género, en la expresión y funcionalidad de adrenoceptores y GRKs en patología cardiovascular"*, realizada por el Ldo. en Farmacia **D. Eduardo Oliver Pérez**, ha sido llevada a cabo en el Departamento de Farmacología, bajo mi dirección y asesoramiento.

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

Valencia, a 22 de Febrero de 2010

*Dña. Pilar D'Ocon Navaza*





*« Les conceptions les plus hardies, les spéculations les plus légitimes, ne prennent un corps et une âme que le jour où elles sont consacrées par l'observation et l'expérience »*

(LOUIS PASTEUR, 1871)



**D**icen que es de bien nacidos el ser agradecidos, y de esta filosofía nace en toda tesis las letras que a continuación se escriben, fruto del sentir profundo de un joven becario que comienza su vuelo en solitario. No quiero hacer de esta parte una sección estricta que siga el protocolo marcado, sino algo agradable de escribir y sobre todo de leer y apreciar por todos aquellos que gusten.

Desde bien pequeño cuentan mis padres que, ante la pregunta de ¿qué quieres ser de mayor?, siempre respondía sin dudarlo - yo quiero ser "inventor de cosas que curen" -, lo que por entonces no sabía era lo larga y dura que resultaría la carrera que hoy llega a su primera meta, y que tan sólo es el comienzo de una formación necesaria para dedicarse al inquietante mundo de la investigación. Sin duda, el apoyo de mis padres, Amparo y Javier, durante toda mi vida ha sido crucial para poder llegar a este momento, y por eso es necesario agradecerles a ellos en primer lugar su apoyo, su comprensión y su respeto hacia todas y cada una de mis decisiones. Gracias por hacer de mí la persona que hoy soy.

No puedo ni debo olvidarme de alguien sin cuya participación nada de esto habría sido posible, Pilar, mi directora de tesis. Aún recuerdo aquellos meses finales de la licenciatura cuando en mi mente rondaban las dudas, que no eran pocas, y recuerdo todo el apoyo que de ella recibí para lanzarme a la piscina del mundo de la investigación, animándome a entrar y acogiéndome con gran interés en su grupo de investigación. No hay palabras para agradecer todo lo que has hecho por mí, como persona y como futuro investigador. Así mismo quiero agradecer a Loles y Marian el apoyo recibido en los momentos en los que lo he necesitado. También tengo que agradecer a Domingo su entera disponibilidad, sus consejos y su enorme participación en todo este proyecto.

Estos años, no han sido fáciles, ha sido un duro y difícil camino que he realizado muy acompañado por todos aquellos que han pasado en algún momento por el laboratorio, no puedo acordarme de todos los que han pasado, ni puedo extenderme en todas las personas que aprecio, y sé que sabréis entenderlo, pero sí debo acordarme de aquellos que me han acompañado muy de cerca. En primer lugar, Miguel, porque ya son casi once años caminado hacia un mismo lugar, juntos pero no revueltos, años muy felices llenos de experiencias inolvidables y que han hecho de nosotros lo que somos. Fermín, que ha sido mi inseparable compañero de mesa, de alegrías y tristezas, nunca olvidaré todos esos momentos. Javier, porque gente como tú es necesario tenerla como amigo, desde el primer día que entré supe que de aquí saldría una gran amistad. A Jose Miguel porque en él se unen ciencia y diversión, Diana por su sinceridad y compañerismo, Vanessa por ser como sólo tú sabes serlo, Nicla por ser tan buena, Mariado por esas largas y agradables terapias, Victoria por ser tan natural, Isabel A. (Andu) porque mira que me he metido contigo, aunque sabes que siempre de corazón, Nuria por tu apoyo sobre todo en los momentos duros, a Marieta, Lidia, María, Isabel G., Rosa, Aitana, Marta, Elisa, Juanfran, Nuria C., Jorge, Rita, Ana B., Teresa, Lara, Inma, Ana O., Zeng, Noureddine, Isabel B., Esperanza, a todos, un millón de gracias, todos los momentos vividos quedan grabados en mi memoria de donde espero nunca escapen. También quiero acordarme de Dani, de quién aprendí y de quién continué el camino que un día empezó. Al equipo de secretaría al completo, en especial, a Mamen por su ayuda impagable y por las agradables tertulias, a Irene por las risas, a Carlos y Raquel que siempre que se lo he pedido me han ayudado. A los profesores del departamento, en especial a Miguel Payá porque de él aprendí el arte de ser docente, a M<sup>a</sup> Carmen Montesinos por sus interminables conversaciones, sus consejos y sobre todo por su interés en ayudarme a tirar hacia delante en los momentos difíciles, a M<sup>a</sup> Carmen Terencio por estar disponible siempre que he necesitado oír palabras de ánimo, a Isabel Guillén por sus consejos que tanto he podido

*aplicar en mi día a día como investigador, a todo el Departamento, gracias por acogerme de una forma tan especial. A los compañeros de la APU de Glasgow, Ian, Laura, Craig y Claire, thanks a lot to be so kind and make me feel at home, thanks to Joyce, my third hand, to let me know that "If it was easy someone else would have done it by now". A mis compañeros de carrera, porque también son parte importante de este recorrido, a Raúl, Ángel, Diego, Yassine, Maite, Susana, Javi F., Aracil, David, Ana A., Ana G., Sandra, Cristina, Ana P., Raquel y muy en especial a Jose y a Soti, con los que he tenido el placer de compartir, muchos de estos años de carrera y tesis juntos, llenos de humor absurdo, buenos momentos, y grandes experiencias.*

*Como bien he dicho antes, el apoyo de mis padres ha sido crucial, pero no sólo puedo parar ahí, a mi familia, que siempre ha estado ahí, debo dedicarle estas palabras. A mi yaya, Fina, por ese apoyo, por esa fuerza que me trasmite, porque siempre me has querido y has sufrido por mí y conmigo, por todas esas velas que tanto me han ayudado, gracias. A mi yayo Miguel, a mi abuelo Pepe y a mi abuela Carmen, porque estén donde estén, se que estarán orgullosos de su nieto, nunca os olvidaré. A mis tíos, Fina, Andrés, Pepe, M<sup>a</sup> Dolores y M<sup>a</sup> Carmen, por confiar tantísimo en mí, y en especial a Pepe por sus grandes consejos lingüísticos, propios del gran periodista que es. A mis primos David, Nuria y María, por su apoyo, también a Luis y Laura, pero en especial a David, por ser no sólo mi primo, sino mi hermano y un amigo inseparable durante tantos años de vida juntos. Además, tengo que incluir en esta sección a mis amigos, parte de mi "familia" cotidiana, uno de los pilares más importantes de mi vida, sin los cuales todo se desmoronaría. Mención muy especial merecen Víctor, Sergio, Alejandro y Héctor, porque sé que siempre estarán ahí, en la alegría y en las penas, para lo bueno y para lo malo, porque sin ellos la vida sería muy aburrida, porque todos los momentos que hemos vivido, y los consejos que hemos compartido bañados con un buen ron, son parte de mi genoma, gracias por quererme y confiar en mí, gracias por ser como sois y demostrarme siempre lo orgulloso que estáis de nuestra amistad. A Jose Alberto, Rafa, Tere, Toni, Sara, y los otros "Mc's" porque pasasteis de ser compañeros de trabajo a ser amigos para siempre. A los "mates" de Glasgow que hicieron que esos seis meses fueran uno de los recuerdos más felices de mi vida, en especial a Edouard, Davide, Andrés, y Ana que se convirtieron en mi familia "glaswegian". A los Erasmus, en especial a Marco, Simone, Nikoletta, Chrissoula, Lars, Franciele, Karime, Antoine, por ser parte importante de mi vida, y porque "Rouen est par tout".*

*Por último, y no por eso lo menos importante, quiero dar las gracias a la persona que más me ha acompañado en este último año de mi vida, y que espero me acompañe durante muchos más, a Bego "...por aguantar mis malos ratos y manías...", gracias niña.*

*A todos los que me dejo, gracias.*

**Eduardo**  
*Burjassot, Mayo de 2010*

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

**PROYECTOS:**

- ✓ "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 (PI070509)**.
- ✓ "Función, distribución y formas de expresión de los subtipos de adrenoceptores beta a nivel vascular: implicaciones terapéuticas"  
Financiado por **CICYT (SAF 2007-62120)**.
- ✓ "Intervención de los adrenoceptores  $\alpha_{1D}$  constitutivamente activos en la hipertensión: estudio en linfocitos humanos y en modelos animales de hipertensión".  
Financiado por **Generalitat Valenciana (ACOMP/2007/182)**.
- ✓ "Factores de riesgo cardiovascular en la mujer hipertensa y su incidencia en la expresión de los adrenoceptores  $\alpha_1$  y  $\beta_2$  en linfocitos circulantes".  
Financiado por **Escuela Valenciana de Estudios para la Salud (CS2005-100)**.
- ✓ "Intervención de los Adrenoceptores  $\alpha_{1D}$  constitutivamente activos en la hipertensión: estudio en linfocitos humanos y en modelos animales de hipertensión".  
Financiado por **CICYT (SAF 2004-01541)**.

**BECAS:**

- ✓ Beca pre-doctoral del programa nacional de Formación del Profesorado Universitario (FPU)  
**Ministerio de Educación y Ciencia (AP-2004-3536)**.

Gran parte de los resultados obtenidos han sido utilizados para su publicación:

**OLIVER E, ROVIRA E, MONTO F, VALLDECABRES C, JULVE R, MUEDRA V, RUIZ N, BARETTINO D, Y D'OCÓN P (2010)** "β-Adrenoceptor and GRK3 expression in human lymphocytes is related to blood pressure and urinary albumin excretion". *Journal of Hypertension*. 28(6):1281-1289

**AGUERO J, ALMENAR L, D'OCÓN P, OLIVER E, MONTO F, RUEDA J, VICENTE D, MARTINEZ-DOLZ L, Y SALVADOR A (2009)** "Myocardial and peripheral lymphocytic transcriptomic dissociation of β-adrenoceptors and G protein-coupled receptor kinases in heart transplantation". *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 28:1166-1171.

**OLIVER E, MARTI D, MONTO F, FLACCO N, MORENO L, BARETTINO D, IVORRA MD, Y D'OCÓN P (2009)** "The impact of α<sub>1</sub>-adrenoceptors up-regulation accompanied by the impairment of β-adrenergic vasodilatation in hypertension". *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 328:982-990.

## ABREVIATURAS

<b>5-MU</b>	6-((3-(4-(2-Methoxyphenyl)-1-piperazinyl)propyl)amino)-1,3,5-trimethyl-2,4(1H,3H)-pyrimidinedione o (5-metil-urapidilo)
<b>7TM</b>	Receptores de 7 dominios transmembrana
<b>A</b>	Adrenalina
<b>AC</b>	Adenilato ciclasa
<b>ACC</b>	<i>American College of Cardiology</i>
<b>Ach</b>	Acetilcolina
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ADN complementario del ARN
<b>AHA</b>	<i>American Heart Association</i>
<b>ALLHAT</b>	<i>Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Attack Trial</i>
<b>AMPc</b>	Adenosin monofosfato cíclico
<b>ANOVA</b>	Análisis de la varianza
<b>AR</b>	Adrenoceptor o Receptor Adrenérgico
<b>ARAI (ARBs)</b>	Antagonistas de los Receptores para Angiotensina-II ( <i>Angiotensin-II receptor blockers</i> )
<b>ARN (RNA)</b>	Ácido ribonucleico ( <i>Ribonucleic acid</i> )
<b>ARNm (mRNA)</b>	ARN mensajero ( <i>messenger RNA</i> )
<b>ATP</b>	Adenosin 5'-trifosfato
<b>βARK</b>	Quinasa de los Adrenoceptores-β
<b>BMY 7378</b>	8-(2-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil]-etil)-8-azaspiro [4,5]decane-7,9-dione dihidrocloruro
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	Calcio
<b>CaM</b>	Calmodulina
<b>CaMKII</b>	Proteína quinasa II dependiente de la calcio-calmodulina
<b>CEC</b>	Cloretilclonidina
<b>CE<sub>50</sub></b>	Concentración molar del agonista necesaria para producir el 50% del efecto máximo
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentración molar del antagonista necesaria para producir una inhibición del 50% de la respuesta
<b>Ct</b>	Ciclo umbral ( <i>threshold cycle</i> )
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>ECL</b>	Sustrato aumentador de la quimioluminiscencia
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>e.e.m. (S.E.M.)</b>	Error estándar de la media ( <i>Standard error of the mean</i> )
<b>E<sub>max</sub></b>	Efecto máximo

<b>ERK</b>	Quinasa de respuesta exógena
<b>EUA (UAE)</b>	Excreción urinaria de albúmina ( <i>Urinary albumin excretion</i> )
<b>FC</b>	Frecuencia cardiaca ( <i>Heart rate</i> )
<b>FE</b>	Fenilefrina
<b>FEVI</b>	Fración de eyección del Ventrículo izquierdo
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
<b>GC</b>	Guanilato ciclasa
<b>GDP</b>	Difosfato de guanosina
<b>GMPC</b>	Guanosin monofosfato cíclico
<b>GPCR</b>	Receptor acoplado a proteína G ( <i>G Protein-coupled receptor</i> )
<b>GTP</b>	Trifosfato de guanosina
<b>GRK</b>	Quinasa de los GPCR ( <i>GPCR kinase</i> )
<b>HCA</b>	Hipertensión clínica aislada ( <i>Isolated office hypertension</i> )
<b>HEPES</b>	Acido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il] etanosulfónico
<b>HT</b>	Hipertensión ( <i>Hypertension</i> )
<b>HTA</b>	Hipertensión Arterial
<b>HT-Tr</b>	Hipertensión tratada ( <i>Treated hypertension</i> )
<b>IC</b>	Insuficiencia Cardiaca ( <i>Heart Failure</i> )
<b>IECA (ACEIs)</b>	Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina ( <i>Angiotensin converter enzyme inhibitors</i> )
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IMC</b>	Índice de masa corporal ( <i>Body mass index</i> )
<b>INE</b>	Instituto Nacional de Estadística
<b>IP<sub>3</sub></b>	1,4,5-trifosfato de inositol
<b>IP<sub>3</sub>R</b>	Receptor de IP <sub>3</sub>
<b>ISHLT</b>	<i>International Society for Heart and Lung Transplantation</i>
<b>ISO</b>	Isoprenalina
<b>KO</b>	<i>Knock-out</i>
<b>L-NAME</b>	N <sup>6</sup> -nitro-L-arginina metil éster
<b>LNHR</b>	Rata hipertensa por tratamiento crónico con L-NAME
<b>M-MLV RT</b>	Transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney
<b>MAPA</b>	Monitorización ambulatoria de la presión arterial
<b>MAPK</b>	Proteína quinasa activada por mitógeno
<b>MLCK</b>	Quinasa de la cadena ligera de miosina
<b>MLCP</b>	Fosfatasa de la cadena ligera de miosina
<b>NA</b>	Noradrenalina
<b>NO</b>	Oxido nítrico
<b>NOS</b>	Sintasa de oxido nítrico
<b>NYHA</b>	<i>New York Heart Association</i>
<b>OMS (WHO)</b>	Organización Mundial de la Salud ( <i>World Health Organization</i> )
<b>P</b>	Coefficiente de <i>Pearson</i>
<b>PA</b>	Presión arterial ( <i>Blood pressure</i> )

<b>PAS</b>	Presión arterial sistólica ( <i>Systolic blood pressure</i> )
<b>PAD</b>	Presión arterial diastólica ( <i>Diastolic blood pressure</i> )
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>PBL</b>	Linfocitos de sangre periférica
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PBS-T</b>	PBS con Tween20
<b>pCE<sub>50</sub></b>	-logaritmo de la CE <sub>50</sub>
<b>pCI<sub>50</sub></b>	-logaritmo de la CI <sub>50</sub>
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>pD<sub>2</sub></b>	Potencia del Agonista
<b>PI3K</b>	Fosfoinositol 3-quinasa
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Fosfatidil inositol 4,5-bifosfato
<b>PKA</b>	Proteín quinasa dependiente de AMPc
<b>PKC</b>	Proteín quinasa C
<b>PKG</b>	Proteín quinasa dependiente de GMPc
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>PVDF</b>	Fluoruro de polivinildieno
<b>RGS</b>	Proteínas reguladoras de la señalización de proteínas G
<b>RT</b>	Transcripción reversa
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>SHR</b>	Rata espontáneamente hipertensa
<b>SR 58611A</b>	Etil{(7S)-7-[(2R)-2-(3-clorofenil)-2-hidroxietilamino]-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-iloxi} acetato hidroclorado
<b>TC</b>	Trasplante cardíaco ( <i>Cardiac transplantation</i> )
<b>VTDVI</b>	Volumen telediastólico del ventrículo izquierdo
<b>WB4101</b>	2-(2,6-dimethoxyphenoxy)-N-[(8-phenyl-7,10-dioxabicyclo[4.4.0]deca-1,3,5-trien-9-yl)methyl]ethanamine
<b>WKY</b>	Wistar Kyoto



# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>11</b>
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>15</b>
1 Receptores Adrenérgicos .....	15
1.1 Perspectiva histórica y Clasificación.....	17
1.2 Adrenoceptores $\alpha_1$ .....	24
1.2.1 Vías de señalización de los ARs- $\alpha_1$ .....	24
1.2.2 Distribución tisular y Papel fisiológico de los ARs- $\alpha_1$ .....	28
1.3 Adrenoceptores $\beta$ .....	32
1.3.1 Vías de señalización de los ARs- $\beta$ .....	33
1.3.2 Distribución tisular y Papel fisiológico de los ARs- $\beta$ .....	37
1.4 Regulación de los Receptores Adrenérgicos: las GRKs.....	40
1.4.1 Mecanismo de regulación mediado por las GRKs .....	44
1.4.2 Clasificación, Distribución tisular y Papel fisiológico de las GRKs .....	46
1.4.3 Los Adrenoceptores como sustrato específico de las GRKs.....	50
2 Receptores Adrenérgicos y GRKs en patología cardiovascular.....	54
2.1 Hipertensión Arterial .....	56
2.1.1 Definición y Etiología .....	57
2.1.2 Clasificación .....	61
2.1.3 Relación de los ARs y las GRKs con la Hipertensión Arterial .....	64
2.2 Insuficiencia Cardiaca .....	73
2.2.1 Definición y Etiología .....	73
2.2.2 Clasificación .....	79
2.2.3 Relación de los ARs y las GRKs con la Insuficiencia Cardiaca .....	82
2.3 Adrenoceptores y GRKs en linfocitos como biomarcadores en patología cardiovascular .....	89
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>95</b>

<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>99</b>
1 Modelos animales de Hipertensión.....	99
1.1 Animales de experimentación.....	99
1.1.1 Ratas Espontáneamente Hipertensas (SHR).....	99
1.1.2 Ratas hipertensas por tratamiento con L-NAME (LNHR).....	100
1.2 Medida de constantes hemodinámicas en la cola del animal consciente.....	100
1.3 Sacrificio y obtención de muestras.....	101
1.3.1 Sacrificio.....	101
1.3.2 Extracción de sangre y Aislamiento de linfocitos circulantes.....	101
1.3.3 Extracción de tejidos.....	102
2 Selección de pacientes.....	103
2.1 Población del estudio y Criterios de Inclusión.....	103
2.2 Obtención de muestras biológicas (Linfocitos).....	104
3 Cuantificación de la expresión Génica.....	106
3.1 Extracción de ARN total.....	106
3.2 Cuantificación y Análisis cualitativo de la integridad del ARN obtenido.....	107
3.3 Transcripción Reversa (RT).....	108
3.4 PCR a tiempo Real.....	109
3.5 Análisis de los resultados.....	111
4 Cuantificación de la expresión Proteica.....	112
4.1 Extracción de Proteínas totales.....	112
4.2 Determinación del contenido proteico.....	112
4.3 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Docecil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE) y Western Blot.....	113
4.4 Análisis de los resultados.....	114
5 Estudio funcional de contractilidad.....	115
5.1 Preparación del Tejido y Montaje.....	115
5.2 Descripción del Protocolo Experimental.....	116
5.2.1 Determinación funcional de la presencia de endotelio.....	116
5.2.2 Curvas concentración-respuesta de contracción por un Agonista selectivo de los ARs- $\alpha_1$ : Fenilefrina.....	116
5.2.3 Curvas concentración-respuesta de inhibición de la contracción por Antagonistas selectivos de los ARs- $\alpha_1$ .....	116

5.2.4	Curvas concentración-respuesta de relajación por agonistas selectivos de los ARs- $\beta$ .....	117
5.2.5	Análisis de la cinética de recuperación del tono basal.....	118
5.3	Análisis de los Resultados .....	118
6	Análisis estadístico de los resultados.....	119

## **RESULTADOS.....123**

1	Adrenoceptores y GRKs en Modelos Animales de Hipertensión Arterial.....	123
1.1	Constantes hemodinámicas.....	123
1.2	Análisis de la expresión génica de ARs y GRKs en diferentes tejidos de rata.....	125
1.2.1	Aorta torácica.....	125
1.2.2	Ventrículo Izquierdo .....	130
1.2.3	Riñón.....	134
1.2.4	Linfocitos circulantes.....	138
1.3	Análisis de la expresión proteica de ARs y GRKs en Aorta de rata.....	139
1.4	Análisis del papel funcional de ARs y GRKs en Aorta de rata.....	142
1.4.1	Cambios con la edad.....	142
1.4.2	Cambios en ratas jóvenes Pre-hipertensas.....	143
1.4.3	Cambios en ratas adultas genéticamente Hipertensas .....	146
1.4.4	Cambios en ratas Hipertensas por tratamiento con L-NAME.....	150
2	Adrenoceptores y GRKs en la Enfermedad Cardiovascular Humana .....	153
2.1	Características de la población estudiada.....	153
2.1.1	Características demográficas y antropométricas.....	153
2.1.2	Características Clínicas.....	154
2.2	Análisis de la expresión de ARs y GRKs en Linfocitos humanos.....	159
2.2.1	Grupo Control.....	159
2.2.2	Cambios en la Expresión de ARs y GRKs en función del género .....	160
2.2.3	Cambios en la Expresión de ARs y GRKs en Patologías Cardiovasculares.....	161
2.3	Correlaciones con variables propias de los pacientes .....	165
2.3.1	Variables Demográficas y Antropométricas.....	165
2.3.2	Variables Hemodinámicas y Eco-cardiográficas.....	166
2.3.3	Variables Bioquímicas .....	169
2.3.4	Influencia del tiempo post-trasplante.....	175
2.4	Correlaciones entre ARs y GRKs .....	177

<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>183</b>
1 Diferencias en la expresión de ARs y GRKs en función de los tejidos analizados.....	183
2 Diferencias en la expresión y funcionalidad de ARs y GRKs con la Edad: la maduración .....	188
3 Expresión de ARs y GRKs en linfocitos humanos y riesgo cardiovascular .....	194
4 Diferencias en la expresión y funcionalidad de ARs y GRKs con la Hipertensión .....	197
4.1 Cambios observados en aorta de rata hipertensa.....	199
4.2 Cambios observados en corazón y riñón de rata hipertensa .....	204
4.3 Cambios observados en linfocitos circulantes .....	208
5 Diferencias en la expresión y funcionalidad de ARs y GRKs en la Insuficiencia cardiaca .....	218
5.1 Pacientes con insuficiencia cardiaca en fase terminal .....	218
5.2 Pacientes sometidos a trasplante cardiaco.....	220
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>227</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>233</b>
<b>ENGLISH VERSION .....</b>	<b>237</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>283</b>

# I NTRODUCCIÓN



## INTRODUCCIÓN

La implicación del sistema adrenérgico en la génesis y/o mantenimiento de diversas e importantes enfermedades cardiovasculares es una evidencia constatada (Guimaraes y Moura, 2001). En éste punto, el estudio de los receptores adrenérgicos, encargados de recibir las señales de las catecolaminas endógenas (Adrenalina y Noradrenalina), neurotransmisores propios de éste sistema, y dianas terapéuticas importantes en enfermedades cardiovasculares, será un pilar importante para un mejor entendimiento de los mecanismos que conducen a dichas patologías.

En la presente tesis doctoral, se hace hincapié en los aspectos fisiopatológicos que acompañan a los receptores adrenérgicos, también conocidos como Adrenoceptores (ARs), y sus mecanismos reguladores, en dos tipos de enfermedades cardiovasculares, la hipertensión arterial, y la insuficiencia cardiaca, realizando un estudio genético, proteico y funcional de los tres subtipos diferentes de ARs- $\alpha_1$  ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ , y  $\alpha_{1D}$ ), los tres subtipos de ARs- $\beta$  ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ , y  $\beta_3$ ), y tres quinasas de los receptores acoplados a proteína G (GRK2, GRK3 y GRK5).

Analizaremos si los cambios funcionales observados en modelos animales de hipertensión son debidos a cambios en la expresión génica y/o proteica, y si estos, a su vez, preceden al estado hipertensivo, siendo parte del mecanismo de génesis de la enfermedad o por el contrario tan sólo una consecuencia de los cambios estructurales característicos de esta. Analizaremos por otro lado, en linfocitos circulantes de pacientes con diferentes patologías cardiovasculares, si los cambios observados en la expresión génica de los ARs y las GRKs, reflejan cambios sucedidos en otros territorios del organismo.

A lo largo de la presente Tesis Doctoral, haremos una revisión bibliográfica con recorrido histórico por el descubrimiento y la clasificación de los ARs, describiremos sus principales vías de activación, la multitud de respuestas fisiológicas que median en los diferentes órganos en los que se encuentran presentes, sus mecanismos reguladores, y lo que hasta la fecha se sabe sobre su implicación en la hipertensión y la insuficiencia cardiaca, así como su relación como biomarcador en el linfocito circulante. Explicaremos la metodología que hemos seguido para tratar de alcanzar los objetivos del presente trabajo. Comentaremos los resultados obtenidos, para finalmente discutir las implicaciones de las "Diferencias, en función del género, en la expresión y funcionalidad de Adrenoceptores y GRKs en patología cardiovascular".



# **R** REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

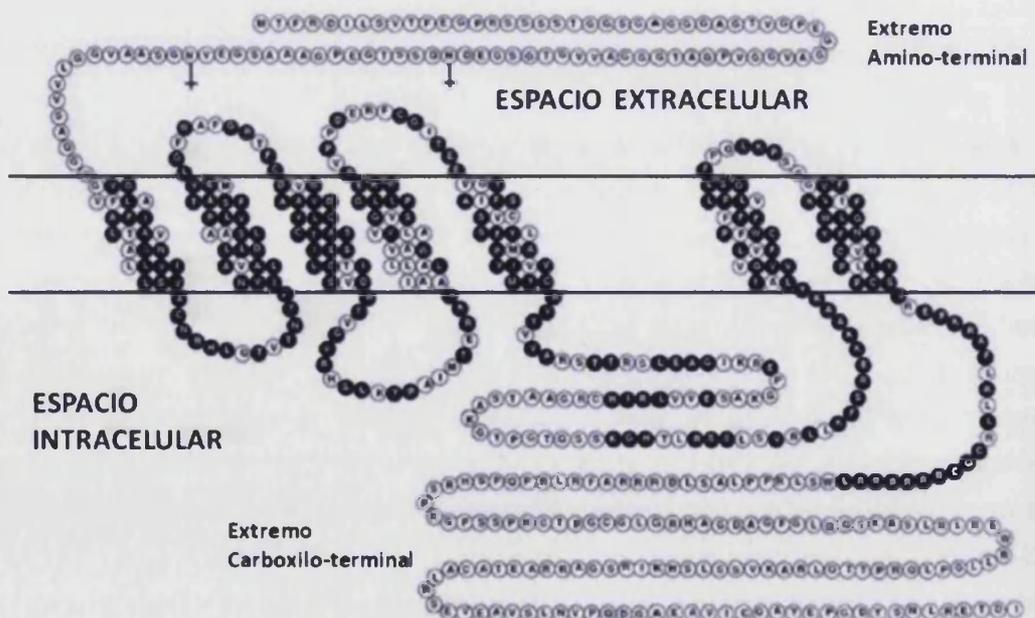
En la presente revisión haremos un recorrido histórico sobre los receptores adrenérgicos, que nos acercará a su clasificación, a sus principales vías de señalización, a su principal mecanismo regulador, conoceremos sus principales localizaciones y funciones a lo largo del sistema cardiovascular, y para terminar nos centraremos en lo que se conoce hasta hoy del importante papel que juegan, tanto los Adrenoceptores como las quinasas que los regulan, en dos de las patologías cardiovasculares que más muertes causan al año: la Hipertensión arterial y la Insuficiencia cardíaca.

### 1 RECEPTORES ADRENÉRGICOS

Los Receptores Adrenérgicos o Adrenoceptores (ARs), son proteínas pertenecientes a la más versátil y ampliamente distribuida familia de receptores de membrana, la familia de los receptores de siete dominios transmembrana (7TM) compuesta por más de 800 genes, también conocidos por su característica principal como receptores acoplados a proteína G (GPCRs), cuyos miembros son las dianas más frecuentes de la terapéutica actual. Estos receptores, aunque relacionados desde el punto de vista estructural, presentan ciertas diferencias que hacen que controlen diversos procesos fisiológicos mediante la activación de vías de señalización que llevan a la síntesis o descarga de numerosos y variados segundos mensajeros. A través de estos sistemas transductores de señales bioquímicas median las acciones, tanto centrales como periféricas, de las principales catecolaminas endógenas: el neurotransmisor Noradrenalina (NA), y la hormona y neurotransmisor Adrenalina (A). Ambas catecolaminas juegan un papel importante en el control de procesos fisiológicos tales como la presión arterial, la frecuencia cardíaca, la fuerza de contracción cardíaca o la reactividad de las vías aéreas, además de otros procesos metabólicos y del sistema nervioso central. Así pues los receptores adrenérgicos, por ser los encargados de transmitir la señal de estas catecolaminas, están directamente implicados en estos procesos fisiológicos y, por lo tanto, en las patologías relacionadas con los mismos, por lo que se han convertido a lo largo de su historia en diana terapéutica de enfermedades cardiovasculares tan importantes como la hipertensión arterial (HTA) o la Insuficiencia cardíaca, en enfermedades respiratorias como el asma, y otras patologías no menos importantes como la hipertrofia prostática

benigna, la congestión nasal, la obesidad, o el dolor entre muchas otras (Guimaraes y Moura, 2001; Pierce y cols., 2002; Lefkowitz, 2004).

Todos los ARs son proteínas cuya estructura consiste en una cadena polipeptídica de entre 400 a 572 aminoácidos según el subtipo o la especie en la que se estudie, cuyo extremo N-terminal está localizado en la parte extracelular y el extremo C-terminal se encuentra en el citosol, donde juega un papel primordial en el acoplamiento con la proteína G y por tanto en la transducción de la señal (ver Imagen 1). Comprenden dos requerimientos básicos gracias a los cuales estas proteínas pueden ser clasificadas como GPCRs. El primero: se componen de siete regiones, o dominios transmembrana, de entre 20 a 35 aminoácidos cada una, en conformación  $\alpha$ -helicoidal, de carácter hidrofóbico para que se dispongan insertadas a través de la membrana plasmática y conectadas entre sí por lazos intracelulares y extracelulares hidrófilos, alternándose tres lazos extracelulares con regiones específicas para la unión con el agonista, y tres lazos intracelulares, uno de ellos, el tercer lazo, más largo y que presenta los lugares de unión con las proteínas G. El segundo requisito imprescindible para su clasificación dentro de la superfamilia de los GPCRs es, precisamente, su capacidad para acoplarse a la proteína G, lo que confiere al receptor la habilidad de transmitir las señales recibidas por las catecolaminas (Fredriksson y cols., 2003).



**Imagen 1. Modelo de receptor de la familia de los GPCRs con 7 dominios transmembrana.** Imagen modificada del modelo de estructura y secuencia aminoacídica diseñado para el AR- $\alpha_{1A}$  por Lomasney y cols., 1991.

## 1.1 PERSPECTIVA HISTÓRICA Y CLASIFICACIÓN

Hace más de un siglo desde el descubrimiento de los adrenoceptores. Todo empezó cuando el Profesor John Newport Langley y su entonces alumno y posterior premio nobel, Sir Henry H. Dale, trabajando en conjunto, definieron la idea de una "sustancia receptora" en células reactivas (Piascik y cols., 1996; Lefkowitz, 2004). Mientras tanto, el también premio nobel Paul Erhlich, acuñaba el término "receptor" dentro del contexto de la inmunología, aunque realmente fuese Langley el primero en desarrollar un concepto de receptor relacionado con la interacción con fármacos (Maehle, 2004). Langley abrió las puertas hacia estas deducciones gracias a sus experimentos de fisiología y farmacología clásica en los que usaba extractos de glándulas suprarrenales, conteniendo adrenalina, sobre preparaciones de músculo liso aislado (Langley, 1901). El concepto de "sustancia receptora" fue definido por primera vez en su trabajo sobre la influencia de la nicotina y el curare sobre el músculo estriado entre otros tejidos (Langley, 1905). Posteriormente, el trabajo de Dale en el que se observaba los efectos antagónicos de la ergotoxina sobre la contracción inducida por adrenalina (Dale, 1906), sentó en ese momento las bases para el estudio de los receptores adrenérgicos (además de muscarínicos y nicotínicos). Con estos trabajos se establecieron las bases de la interacción fármaco-receptor, que durante más de medio siglo desarrollarían los gigantes de la farmacología actual, los cuales, aplicando la ley de acción de masas y usando los modelos matemáticos basados en las cinéticas enzimáticas, propusieron un modelo de análisis para cuantificar la acción de los fármacos, desarrollando el modelo clásico de dosis-respuesta, la "Teoría ocupacional" (Gaddum, 1926; Clark, 1937), para más tarde desarrollar las nociones de afinidad y actividad intrínseca o eficacia de los fármacos (Ariens, 1954; Stephenson, 1956; Furchgott, 1964, 1967; Furchgott y Bursztyn, 1967).

Por otra parte, durante ese periodo comenzaban a observarse numerosas evidencias de que quizás no había una sola "sustancia receptora" o receptor, y tal vez era necesario una separación y una clasificación más detallada de los que hoy se conocen como receptores adrenérgicos. Fue Ahlquist en 1948 quién observó dos vías diferenciadas en la capacidad de diversos agonistas simpaticomiméticos (Adrenalina (A), Noradrenalina (NA) e Isoprenalina (ISO), entre otros) de producir respuestas farmacológicas según el órgano sobre el que se estudiasen, proponiendo en ese momento la división de los adrenoceptores en dos, los ARs- $\alpha$  (asociados a la mayoría de funciones "excitatorias" como por ejemplo la vasoconstricción) y los ARs- $\beta$  (asociados a la mayoría de funciones "inhibitorias", entre ellas la vasodilatación, y una "excitatoria", la estimulación del miocardio). Añadiéndose a las observaciones de Dale

(1906) que diferenciaba entre aquellos cuyo efecto estimulador era inhibido por la ergotoxina y aquellos cuyo efecto inhibitor no era desplazado.

Los experimentos de Ahlquist fueron duramente criticados por otros autores que opinaban que la diferencia en el rango de potencias podía deberse al uso de tejidos de animales de diferentes especies. Uno de sus mayores críticos, Lands (1952), confirmó estos experimentos comparando las potencias relativas de A, NA e ISO sobre diferentes órganos del mismo animal. Quedaba así aceptada una primera subclasificación basada en la cuantificación farmacológica de agonistas con diferentes rangos de potencia. Los AR- $\alpha$  quedaban clasificados como aquellos receptores capaces de provocar una respuesta contráctil en músculo liso, contracción del útero, de los uréteres, contracción de la membrana nictitante, dilatación de la pupila e inhibición del tono del intestino, respondiendo a los agonistas según el siguiente orden de potencias: A > NA > ISO; mientras que los AR- $\beta$ , serían clasificados como aquellos receptores capaces de provocar una respuesta relajante en músculo liso vascular y uterino, y estimulante en músculo cardíaco (inotropismo positivo), respondiendo a los agonistas según el siguiente orden de potencias: ISO > A > NA.

Poco después, Brown y Gillespie se dieron cuenta en 1955 que los antagonistas de los ARs- $\alpha$ , Fenoxibenzamina y Fentolamina, aumentaban el flujo de NA tras la estimulación nerviosa, surgiendo la hipótesis de que podría haber un tipo de AR- $\alpha$  pre-sináptico que modularía la liberación del neurotransmisor a la sinapsis, además del ya considerado AR- $\alpha$  post-sináptico, responsable de las respuestas en los tejidos. Casi 20 años se tardará en resolver esta hipótesis.

En 1967 el propio Lands y sus colaboradores, basándose en experimentos similares a aquellos de 1952, proponen la división de los AR- $\beta$  en dos subtipos diferentes según los rangos de potencias para los agonistas observados. El subtipo denominado AR- $\beta_1$ , mayoritario en corazón y tejido adiposo, era igual de sensible a los estímulos de NA y A, mientras que el subtipo denominado AR- $\beta_2$ , responsable de la relajación vascular, de la relajación del músculo uterino, y de las vías aéreas, era menos sensible a los estímulos de ambas catecolaminas, siendo la A aproximadamente 10 veces más potente que la NA. El posterior descubrimiento de agonistas selectivos para los receptores  $\beta_2$ , como el salbutamol y la terbutalina, y de antagonistas selectivos para los receptores  $\beta_1$ , como atenolol, metoprolol y practolol entre otros, avalarían esta teoría, aceptándose así la clasificación propuesta (Bylund y cols., 1994).

Casi paralelamente, a principios de los años 70, comienzan a ser evidentes las diferencias en las propiedades farmacológicas entre los AR- $\alpha$  pre- y post-sinápticos. Por una parte, se propuso una clasificación basada en los diferentes rangos de potencias obtenidos para agonistas selectivos como clonidina y oximetazolina por un lado, capaces de activar de manera selectiva los receptores pre-sinápticos (inhibidores de la liberación de NA) y por otro lado fenilefrina, más selectivo por los receptores post-sinápticos (Starke y cols., 1974), además de estudios con los antagonistas fenoxibenzamina y prazosín, mucho más potentes en el bloqueo de los receptores post-sinápticos (Dubocovich y Langer, 1974) y yohimbina, capaz de bloquear preferentemente los receptores pre-sinápticos (Starke y cols., 1975a, 1975b). Por otra parte, observando estas diferencias evidentes, se propuso una división de los AR- $\alpha$  basada en principios anatómicos, sugiriendo denominar a los receptores pre-sinápticos como AR- $\alpha_2$ , y a los receptores post-sinápticos como AR- $\alpha_1$  (Langer, 1974). Más tarde los AR- $\alpha_2$ , supuestamente pre-sinápticos, fueron descubiertos en células efectoras de la musculatura lisa vascular sorprendiendo su capacidad de generar una respuesta vasoconstrictora propia de los ARs post-sinápticos, evidenciando la presencia de los ARs- $\alpha_2$  tanto en una parte como en otra (Docherty y McGrath, 1980). En consecuencia, tan sólo pudo ser aceptada una clasificación farmacológica y funcional, basada en los rangos de potencias para los diversos agonistas y antagonistas estudiados, así como en el tipo de respuesta mediada por cada subtipo (Berthelsen y Pettinger, 1977). Finalmente con el tiempo, la identificación de nuevos agonistas y antagonistas más potentes y altamente selectivos por uno u otro subtipo, ha hecho que ésta sub-clasificación, basada en conceptos farmacológicos, siendo una clasificación más precisa, perdure frente a la clasificación basada en conceptos anatómicos (Ruffolo y cols., 1991).

Con el desarrollo de nuevas herramientas farmacológicas, la aparición de nuevas técnicas de estudio de la interacción fármaco-receptor, como los ensayos con radioligandos a mediados de los años 80, la situación se complicó con nuevas subdivisiones a añadir a las hasta ahora existentes y la aparición de nuevos subtipos que tarde o temprano serían aceptados o apartados. El más reciente y rápido desarrollo de la biología molecular supuso una revolución en la clasificación de los adrenoceptores, corroborando la existencia de más subtipos de los inicialmente descritos, clonados y caracterizados farmacológicamente. La aplicación de estas técnicas demostró también que aquellos tejidos que se creían puros en una población, presentaban poblaciones mixtas de receptores cuya distribución podía variar dependiendo de la especie estudiada. La obtención de genes recombinantes de los diferentes subtipos de receptores adrenérgicos, las técnicas de hibridación *in situ* mediante sondas de ARNm, o la transfección de ADNc en células de mamíferos,

permitieron la caracterización de poblaciones puras de cada subtipo de receptor y por lo tanto tuvieron un gran impacto en la clasificación de estos (Bylund y cols., 1994), tal y como veremos.

Así pues, aunque hasta ahora habíamos visto como históricamente los adrenoceptores habían sido clasificados en dos grandes subtipos, ARs- $\alpha$  y - $\beta$ , se llegó a la conclusión de que quizás fuese más correcto clasificarlos en tres grupos, AR- $\alpha_1$ , - $\alpha_2$ , y - $\beta$  (ver Imagen 2), basándose en tres líneas de evidencias tanto farmacológicas como moleculares: la primera, las diferentes afinidades de fármacos selectivos por cada subtipo; la segunda, las respuestas de segundos mensajeros diferentes para cada uno de los tres subtipos; y por último, las diferencias entre las secuencias aminoacídicas que son más consistentes si pensamos en tres subtipos mayoritarios (Bylund y cols., 1994).

Con el paso de los años fueron apareciendo nuevos subtipos. Las primeras evidencias de la heterogeneidad funcional de los ARs- $\alpha_1$ , se basaron en diferencias en las afinidades de distintos agonistas y antagonistas, la complejidad de las curvas dosis-respuesta muchas veces bifásicas y las diferencias en la respuesta contráctil. Fue en 1982, cuando el profesor John C. McGrath, postuló por primera vez la posible existencia de dos subtipos diferenciados para los ARs- $\alpha_1$ , confirmándose esta hipótesis años más tarde gracias a los trabajos de varios autores que compararon afinidades para los antagonistas selectivos WB4101 y 5-Metilurapidil (5-MU) entre otros (Morrow y Creese, 1986; Gross y cols., 1988), así como las diferencias en la sensibilidad frente al agente alquilante cloretilclonidina (CEC) (Johnson y Minneman, 1987; Han y cols., 1987), proponiendo la división de los ARs- $\alpha_1$ , en dos subtipos,  $\alpha_{1A}$  (alta afinidad por 5-MU y WB4101, y baja sensibilidad a la CEC) y  $\alpha_{1B}$  (Alta sensibilidad a CEC y baja afinidad por 5-MU y WB4101). Fue por esta época cuando se empezaron a elucidar los mecanismos de señalización intracelular que transmitían las señales recibidas por los ARs- $\alpha_1$  para la contracción del músculo liso a través de la formación de 1,4,5-trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>) y la liberación de Ca<sup>2+</sup>, que también sirvió para confirmar la subdivisión de los ARs- $\alpha_1$  (Minneman, 1988), observándose ciertas diferencias entre los subtipos que mencionaremos en sucesivos apartados.

Cuando todo parecía estar más claro, a finales de los 80 varios grupos pensaron que la división de los ARs- $\alpha_1$  en dos grupos debía hacerse basándose en la afinidad por el prazosín, siendo los  $\alpha_{1H}$  aquellos con alta afinidad y los  $\alpha_{1L}$  los de baja afinidad (Flavahan y Vanhoutte, 1986; Muramatsu y cols., 1990). Era necesaria una caracterización a nivel molecular que aclarase tal controversia, y puesto que las técnicas de la época lo permitían, comenzó la carrera por conseguir clonar y

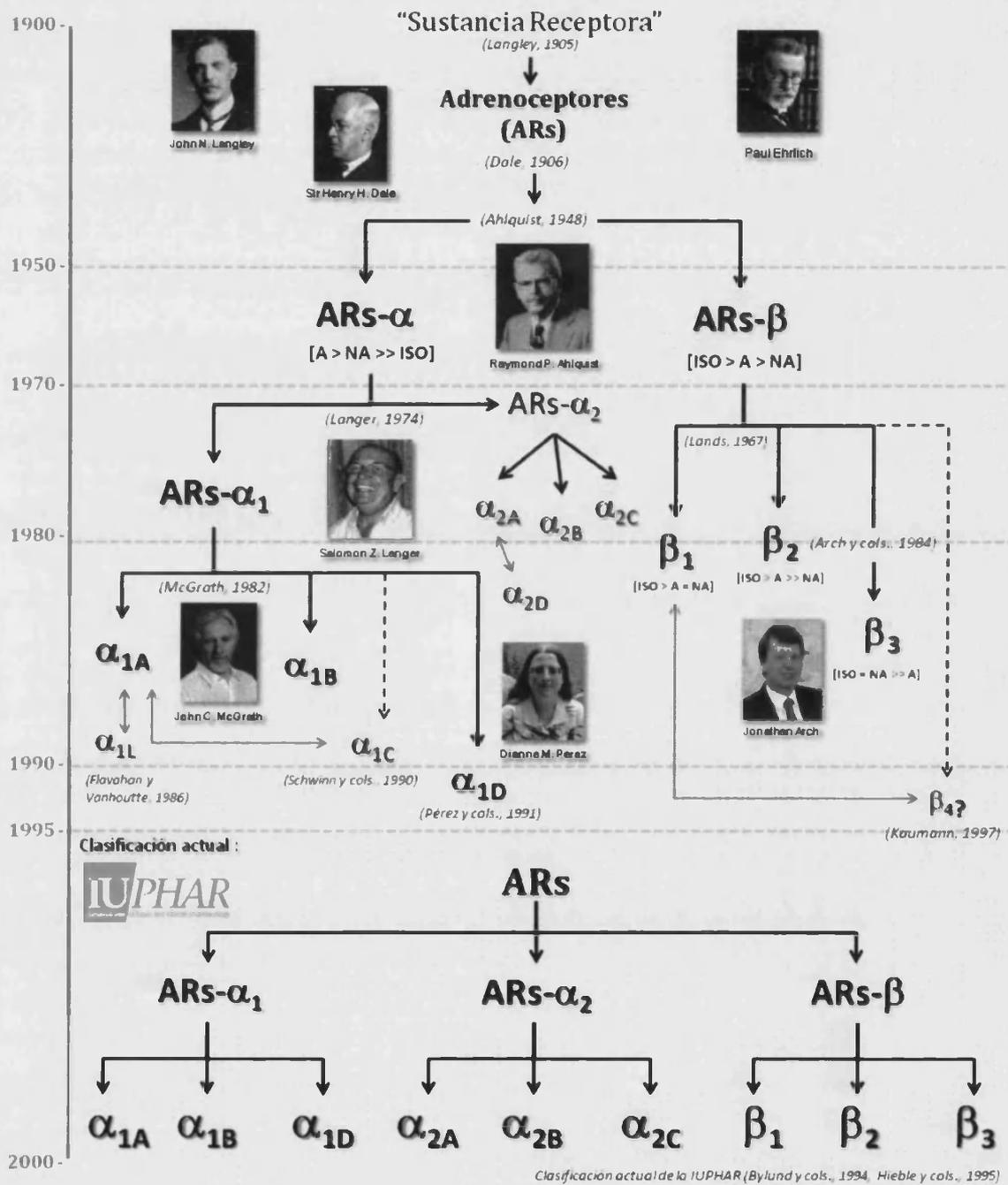
caracterizar los subtipos. El primer AR clonado presentó el perfil farmacológico para el AR- $\alpha_{1B}$  nativo (Cotecchia y cols., 1988). El segundo AR que se clonó tenía las afinidades por agonistas y antagonistas que se esperaba para el AR- $\alpha_{1A}$  pero con cierta sensibilidad a la CEC y además no se pudieron encontrar niveles de expresión de ARNm en tejidos en los que estaba descrito farmacológicamente, todo apuntaba a que se trataba de un nuevo subtipo, el cual fue denominado  $\alpha_{1C}$  (Schwinn y cols., 1990; 1991). El tercero en ser clonado fue designado AR- $\alpha_{1A}$  basándose en la baja sensibilidad a CEC y en la alta afinidad a WB4101 (Lomasney y cols., 1991). Al mismo tiempo se clonó un subtipo idéntico que mostraba un perfil de afinidades diferentes a las de AR- $\alpha_{1A}$  (Pérez y cols., 1991), a éste receptor aparentemente distinto, se le denominó AR- $\alpha_{1D}$ . Con el paso del tiempo, numerosos autores fueron mostrando resultados claros de afinidades de una serie extensa de agonistas y antagonistas selectivos sugiriendo que el AR recombinante denominado  $\alpha_{1C}$ , no era otro sino el AR- $\alpha_{1A}$  nativo (Ford y cols., 1994), comprobándose que otras pequeñas diferencias en las afinidades observadas o en la localización tisular, se habían debido a las distintas condiciones experimentales, desechándose definitivamente la designación de  $\alpha_{1C}$  (Hieble y cols., 1995). Con el tiempo fueron apareciendo numerosos agonistas y antagonistas selectivos para los subtipos descritos que fueron afianzando los resultados anteriores. Quedó así demostrada la presencia de diferentes subtipos de ARs- $\alpha_1$ , nativos y recombinantes, de los cuales en la actualidad se aceptan los tres subtipos que han sido descritos tanto a nivel farmacológico como a nivel molecular:  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ , y  $\alpha_{1D}$  (Hieble y cols., 1995). Además han sido descritas 4 isoformas para el AR- $\alpha_{1A}$ , sin aparentes diferencias funcionales (Hirasawa y cols., 1995; Chang y cols., 1998). En cuanto a los subtipos propuestos como de alta y baja afinidad por el prazosín, quedó demostrado que el subtipo nombrado  $\alpha_{1H}$  correspondía a los 3 subtipos descritos, los cuales poseían alta afinidad por prazosín (Muramatsu y cols., 1995; Ford y cols., 1996), quedando el subtipo  $\alpha_{1L}$  pendiente de confirmar. En la actualidad aún no ha sido posible clonar el gen para este subtipo y los últimos avances muestran una clara relación entre este subtipo y el AR- $\alpha_{1A}$ , confirmando la teoría que demostraba que el subtipo  $\alpha_{1L}$  era una isoforma funcional de baja afinidad del AR- $\alpha_{1A}$  (Ford y cols., 1997; Daniels y cols., 1999; Martí y cols., 2005; Muramatsu y cols., 2008).

Paralelamente a estos acontecimientos fueron apareciendo nuevas evidencias basadas en las propiedades farmacológicas en diferentes tejidos que apuntaban a diferentes subtipos para el AR- $\alpha_2$  (Kawahara y Bylund, 1985; Neylon y Summers, 1985; Bylund, 1988). En base a estos estudios fueron clonados 3 de los 4 subtipos que habían sido detectados por poseer características farmacológicas diferentes (Kobilka

y cols., 1987; Regan y cols., 1988; Weinshank y cols., 1990; Lanier y cols., 1991). La clasificación propuesta en la actualidad los dividió en  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  y  $\alpha_{2C}$ , siendo considerado el subtipo  $\alpha_{2D}$  una variante ortóloga de rata/ratón para el AR- $\alpha_{2A}$  humano (Bylund y cols., 1994; Docherty, 1998).

En este mismo periodo, 20 años después de su primera clasificación, los ARs- $\beta_1$  y  $\beta_2$  fueron clonados después de muchas dificultades debidas a las peculiares características de sus genes (Dixon y cols., 1986; Frielle y cols., 1987). Por otro lado, comenzaba a ser aparente que no todas las respuestas mediadas por los ARs- $\beta$  podían clasificarse en uno u otro subtipo sugiriendo la posibilidad de la existencia de más subtipos. Muy pronto fue identificado un tercer subtipo en células del tejido adiposo marrón de rata, con muchas similitudes pero con muchas otras diferencias a los ya existentes (Arch y cols., 1984). Este subtipo de AR, insensible a los antagonistas más comúnmente usados, fue referido como "AR- $\beta$  atípico" hasta que con la identificación de agonistas selectivos (Bond y Clark, 1988), y con la clonación y caracterización molecular del subtipo humano (Emorine y cols., 1989), pasó definitivamente a denominarse AR- $\beta_3$ . La clasificación aceptada en la actualidad considera los tres subtipos identificados tanto farmacológicamente como molecularmente:  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$  (Bylund y cols., 1994). Aún así han ido apareciendo numerosas evidencias de la existencia de un cuarto subtipo, el AR- $\beta_4$  en tejido cardiaco (Kaumann, 1997; Kaumann y Molenaar, 1997), sin embargo este subtipo nunca ha podido ser clonado, quedando pendientes las pruebas definitivas para aceptar su existencia (Storsbeger y cols., 1998), y parece bastante claro hoy en día que este receptor podría ser un estado conformacional de baja afinidad descrito para el AR- $\beta_1$  (Molenaar y Parsonage, 2005; Brodde y cols., 2006). Las investigaciones en el campo de los ARs- $\beta$  han seguido avanzando describiéndose dos isoformas del subtipo  $\beta_3$  (Evans y cols., 1999) y más recientemente se ha conseguido cristalizar y analizar a nivel estructural el AR- $\beta_2$  (Cherezov y cols., 2007; Rasmussen y cols., 2007) que ha sido el primer receptor de 7TM para neurotransmisores cristalizado, seguido por el AR- $\beta_1$  (Warne y cols., 2008).

Finalmente, una vez fueron aclaradas todas las confusiones, quedó firmemente aceptada la clasificación usada a día de hoy que consta de 9 subtipos diferentes de ARs (ver Imagen 2) (Bylund y cols., 1994; Hieble y cols., 1995; García-Sáinz y cols., 1999; Michelotti y cols., 2000). De ahora en adelante nos centraremos en los 6 subtipos objeto de nuestro estudio en la presente tesis doctoral, los AR- $\alpha_1$  ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ , y  $\alpha_{1D}$ ) y los AR- $\beta$  ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$ ).



**Imagen 2. Clasificación histórica y actual de los Receptores Adrenérgicos (ARs).** Entre paréntesis las referencias que marcaron las primeras evidencias sobre la existencia de un determinado AR y/o la división en diferentes subtipos.

## 1.2 ADRENOCEPTORES $\alpha_1$

Los ARs- $\alpha_1$  son los GPCRs encargados de recibir los estímulos de A y NA, siendo los principales responsables de la regulación de los procesos fisiológicos que controlan estas catecolaminas tales como la contracción vascular, la fuerza de contracción del corazón, o la hipertrofia celular, por lo tanto están directamente implicados en la regulación de la presión arterial (PA), del flujo sanguíneo, el inotropismo cardiaco, o la hipertrofia cardiaca entre otros, siendo las dianas terapéuticas de enfermedades tan frecuentes como la hipertensión arterial (Michelotti y cols., 2000; Hein y Michel, 2007).

Los tres subtipos descritos:  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ , y  $\alpha_{1D}$ , se encuentran acoplados a la proteína  $G_{q/11}$ , por lo que inician los procesos fisiológicos a través de la activación de la fosfolipasa C (PLC). Además estos receptores se encuentran en mayor o menor medida acoplados a otros sistemas de señalización intracelular como el de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), importante vía implicada en los procesos de regulación de la expresión de genes, síntesis de proteínas y control del ciclo celular (Piascik y Pérez, 2001)

Por otro lado, la distribución de cada subtipo a lo largo del organismo varía, por lo que un subtipo u otro estará más o menos implicado en la contracción vascular y por lo tanto en el control de la PA, o en uno u otro proceso fisiológico o patológico, dependiendo del territorio que se trate (Piascik y Pérez, 2001). Así pues, el conocimiento exacto de las diferencias en las funciones de los subtipos de ARs- $\alpha_1$  estará relacionado con las diferencias entre características tales como la distribución tisular, la eficiencia de acoplamiento a la proteína G, las vías de señalización capaces de activar y los sistemas de regulación propios de los receptores (Tanoue y cols., 2003). El estudio de estas características nos servirá para entender mejor el papel fisiológico de estos ARs cuya alteración podría conducir al desequilibrio fisiológico que conduce a la enfermedad cardiovascular.

### 1.2.1 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LOS ARS- $\alpha_1$

Como ya hemos indicado, los tres subtipos de ARs- $\alpha_1$ , son receptores de 7TM acoplados a proteínas G, que median las señales enviadas por las catecolaminas endógenas A y NA. Las proteínas G son proteínas heterotriméricas, formadas por tres sub-unidades ( $\alpha\beta\gamma$ ), capaces de fijar moléculas de GDP. Cuando las catecolaminas, agonistas endógenos de los ARs, interaccionan con los aminoácidos que forman el

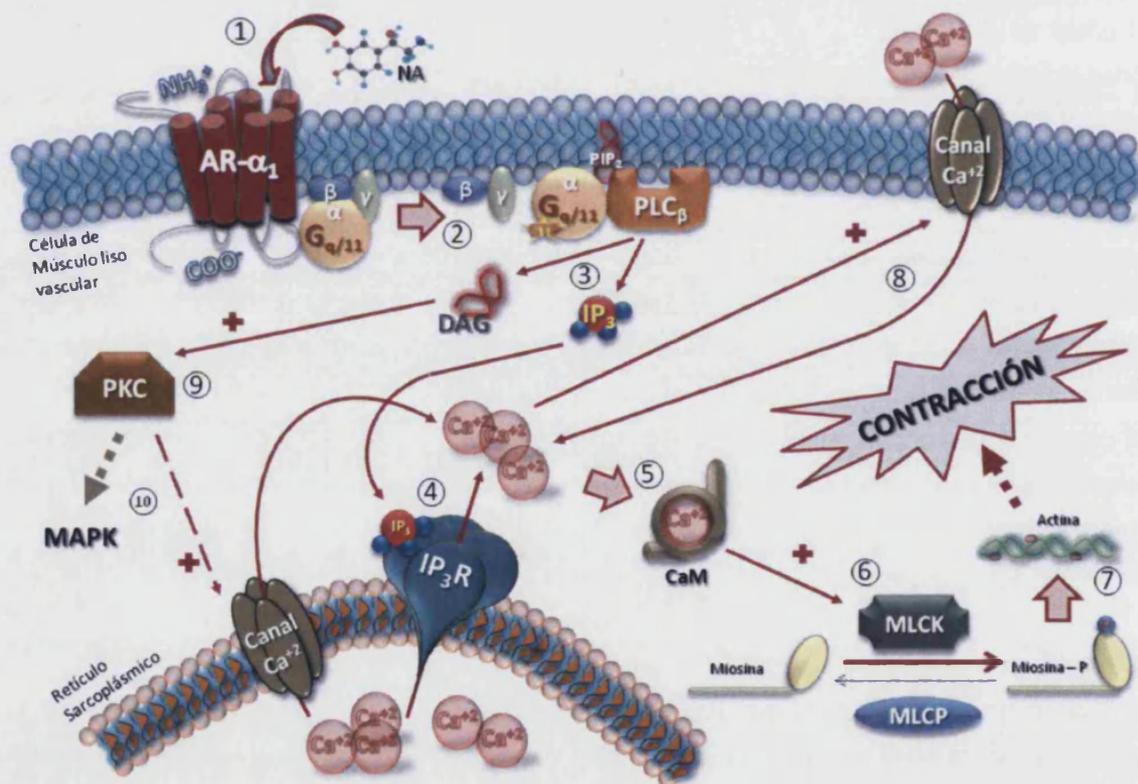
punto de unión fármaco-receptor, se produce un cambio conformacional en el receptor que induce su interacción con la sub-unidad  $\alpha$  de la proteína G, catalizando el paso de una molécula de GDP hacia una molécula de GTP, produciéndose la disociación del complejo  $\alpha\beta\gamma$ , quedando por separado las sub-unidades  $G\beta\gamma$  por un lado y la subunidad  $G\alpha$ -GTP por otro, siendo así capaces de activar los sistemas efectores correspondientes (Valdizán y Pazos, 2003; Hubbard y Hepler, 2006).

El sistema efector al cual es capaz de unirse la subunidad  $G\alpha$ -GTP de la familia de proteínas  $G_{q/11}$  es la isoforma  $\beta$  de la PLC (Wu y cols., 1992). Con la activación de la  $PLC_{\beta}$  se produce el inicio de la hidrólisis de los fosfolípidos de membrana, el fosfatidil inositol 4,5-bifosfato ( $PIP_2$ ) es hidrolizado dando 1,4,5-trifosfato de inositol ( $IP_3$ ) y diacilglicerol (DAG) (Fain y Garcia-Sáinz., 1980; Berridge, 1983). Una vez sintetizado, el  $IP_3$ , es capaz de difundir desde la proximidad de la membrana celular hasta el retículo endoplásmico o sarcoplásmico, donde se une a sus receptores específicos ( $IP_3R$ ). Estos receptores forman un canal que se abrirá tras su activación por  $IP_3$ , controlando así la salida de  $Ca^{+2}$  situado en el interior del retículo y aumentando la concentración de  $Ca^{+2}$  en el espacio intracelular (Streb y cols., 1983). Además este incremento de  $Ca^{+2}$  intracelular es capaz de activar la entrada del catión desde el espacio extracelular a través de los canales de  $Ca^{+2}$  dependientes de voltaje (Putney, 1986). Por otra parte, el DAG sintetizado por la  $PLC_{\beta}$  a partir de  $PIP_2$ , producirá la estimulación de la proteína quinasa C (PKC) (Nishizuka, 1984), la cual será capaz de fosforilar distintos substratos que van a regular tanto el  $Ca^{+2}$ , a través de la apertura de canales (Burt y cols., 1998), como la transcripción de distintos genes, entre ellos el de proteínas tan importantes en la contracción como la actina, a través de la vía de las MAPK (Kim y cols., 2008).

Por lo tanto, en última instancia la activación de los ARs- $\alpha_1$  se caracteriza por el aumento y la movilización del  $Ca^{+2}$  intracelular. Este aumento favorecerá la unión de cuatro moléculas del catión a la proteína Calmodulina (CaM), de forma que ésta será capaz de activar la quinasa de las cadenas ligeras de miosina (MLCK) encargada de la fosforilación de la miosina, necesaria para la interacción Actina-Miosina, produciéndose el deslizamiento de los filamentos de miosina a lo largo de la actina, proceso fundamental en la generación de fuerza y acortamiento del músculo liso y por lo tanto responsable de la contracción vascular (Rembold, 1992) (Ver Imagen 3).

Además a lo largo de los años también han aparecido evidencias de la activación de muchas otras vías de señalización ( $G_i$ ,  $G_o$ ,  $G_s$ ,  $G_{12/13}$ , incluso  $G_h$ ) por parte de los ARs- $\alpha_1$ , así como la activación de otros sistemas efectores ( $PLA_2$ , PLD, aumento de AMPc, activación de canales de  $Ca^{+2}$ , de intercambiadores de  $Na^+$ - $H^+$  y  $Na^+$ - $Ca^{+2}$ , y

activación/inhibición de canales de  $K^+$ ), mostrándose numerosos segundos mensajeros implicados en la señalización mediada por estos receptores, vías que en muchos casos faltaría por determinar cuál es su relación directa con las respuestas observadas, y muchas de las cuales podrían ser activadas, inhibidas o permanecer inalteradas dependiendo del tipo celular o del subtipo específico de  $AR-\alpha_1$  del que se trate. Por otro lado también se ha comprobado la activación de la vía de las MAPK y la transcripción de genes a través de ERK o p38, entre otros, tras la activación de los receptores, dependiendo del subtipo que entre en juego, algo que se ha relacionado con los fenómenos de hipertrofia y remodelado tisular (Graham y cols., 1996; Hawrylyshyn y cols., 2004; Hein y Michel, 2007).



**Imagen 3. Vía de señalización intracelular que conduce a la contracción vascular mediada por los ARs- $\alpha_1$ .** 1) Unión agonista-receptor y acoplamiento con la proteína  $G_{q/11}$ ; 2) Desacoplamiento de la subunidad  $G\alpha$ -GTP y activación de la  $PLC\beta$ ; 3) Hidrólisis de  $PIP_2$  dando  $IP_3$  y DAG; 4) Activación del Receptor de  $IP_3$  y salida de  $Ca^{+2}$  del retículo; 5) Unión del  $Ca^{+2}$  a la Calmodulina; 6) activación de la MLCK y fosforilación de la Miosina; 7) Unión de Miosina-P con Actina y contracción; 8) Entrada capacitativa de  $Ca^{+2}$  extracelular; 9) Activación de PKC por DAG; 10) Activación de la vía de las MAPK y regulación del  $Ca^{+2}$ .

El resultado final de la activación de cada subtipo en un determinado tejido dependerá de la proporción de ese determinado subtipo, de la eficacia del acoplamiento de este receptor a la vía de señalización y sobre todo de la vía de señalización acoplada en esa localización específica. Cada subtipo muestra diferencias significativas en la generación de señal. Se ha comprobado que tras la estimulación por un mismo agonista cada receptor responde en grado diferente a la formación de  $IP_3$  ( $\alpha_{1A} > \alpha_{1B} \geq \alpha_{1D}$ ) y al aumento de  $Ca^{+2}$  ( $\alpha_{1A} > \alpha_{1B} > \alpha_{1D}$ ) (Theroux y cols., 1996).

Otro factor importante relacionado con la respuesta, es el fenómeno de la actividad constitutiva. Según este fenómeno algunos receptores como por ejemplo el subtipo  $\alpha_{1D}$  en el campo de los ARs (Noguera y cols., 1993; García-Saín y Torres-Padilla, 1999; Gisbert y cols., 2000), no siguen el “modelo del complejo ternario” utilizado durante años para describir la interacción agonista – receptor – proteína G (De Lean y cols., 1980), sino que se encuentran activos en ausencia de agonista, es decir, poseen actividad intrínseca o espontánea. Estos descubrimientos obligaron a cambiar el modelo clásico por otro modelo que contemplara esta posibilidad. El nuevo modelo fue denominado “modelo alostérico del complejo ternario” (Samama y cols., 1993) y describía al receptor en situación de equilibrio entre dos estados uno activo (acoplado a proteína G) y otro inactivo.

Estas diferencias observadas en el acoplamiento a la señal unido al fenómeno de actividad constitutiva, pueden influir en el tipo de respuesta y por lo tanto en el rol fisiológico de cada subtipo. Por ejemplo, se sabe que la cinética de contracción que proporciona la activación del subtipo  $\alpha_{1A}$  (el mejor acoplado) es rápida, mientras que para el subtipo  $\alpha_{1D}$  (el peor acoplado) la contracción se produce de forma lenta y mantenida en el tiempo, diferencias que, si tenemos en cuenta la distribución tisular del AR, también influirán en el control del flujo sanguíneo y/o la irrigación de diferentes órganos (Gisbert y cols., 2000, 2003a; Ziani y cols., 2002), incluso pudiendo estar relacionados con la génesis y/o mantenimiento de patologías tales como la hipertensión arterial, debido al mantenimiento sostenido de la señal incluso en ausencia de agonista y unido a la recuperación lenta del tono basal (Villalobos-Molina y Ibarra, 1999; Gisbert y cols., 2002).

Por otro lado, el acoplamiento a la vía de las MAPK entre otras, también influirá en la función final del receptor, por ejemplo se ha comprobado que los subtipos  $\alpha_{1A}$  y  $\alpha_{1B}$  cardíaco, además de sus funciones propias en el corazón, están implicados en la hipertrofia cardíaca y en el desarrollo y respuesta adaptativa del corazón (O’Connell y cols., 2003).

### 1.2.2 DISTRIBUCIÓN TISULAR Y PAPEL FISIOLÓGICO DE LOS ARS- $\alpha_1$

Como hemos mencionado, la respuesta final de cada subtipo dependerá de muchos factores, entre ellos su localización a lo largo del organismo. La familia de los GPCRs es la familia de receptores más ampliamente distribuida por todo el organismo, y el grupo de ARS- $\alpha_1$  hace honor a su familia, encontrándose ampliamente distribuidos por gran cantidad de tejidos y órganos, en distinta proporción y con diferentes funciones (ver Imagen 4).

Muchos trabajos han encontrado ARNm y proteína para los tres subtipos de ARS- $\alpha_1$  en arterias de rata (Piascik y cols., 1995, 1997; Guarino y cols., 1996) y humanas (Rudner y cols., 1999), siendo diferente la proporción de cada subtipo según el territorio y según las necesidades. Por ejemplo, el subtipo  $\alpha_{1A}$  media la contracción de las arterias caudal, renal y mesentérica distal (Piascik y cols., 1995; Hrometz y cols., 1999; Gisbert y cols., 2003b), y de los tramos más alejados del árbol arterial donde la regulación del tono basal debe ser rápida garantizando un ajuste rápido del calibre del vaso y por lo tanto controlando la irrigación del tejido según sus necesidades (Gisbert y cols., 2003b). Por otro lado el subtipo  $\alpha_{1D}$  se encuentra expresado sobre todo en la aorta, y las arterias femorales, iliacas y mesentérica proximales (Piascik y cols., 1995; Hrometz y cols., 1999; Gisbert y cols., 2000), vasos de conductancia en los que el papel de este subtipo es muy importante ya que evita cambios bruscos en el calibre de los vasos controlando el mantenimiento del flujo sanguíneo en unos niveles estables (Ziani y cols., 2002). Mientras que para el subtipo  $\alpha_{1B}$ , también expresado en todos los vasos pero en proporción menor a los otros subtipos (Marti y cols., 2005), hay poca evidencia de su papel exacto en la contracción vascular, pero sí que parece estar implicado de alguna manera en ella (Cavalli y cols., 1997; Daly y cols., 2002).

Si bien originalmente se pensaba que en los vasos en los que estaban expresados los tres subtipos, sólo un subtipo mediaba la contracción mientras que se desconocía la función de los subtipos que no la mediaban, hoy en día gracias a estudios con ratones knockout (KO) (Cavalli y cols., 1997; Tanoue y cols., 2002a; Rokosh y Simpson, 2002), ha quedado claro que los tres subtipos están implicados en la contracción vascular, siendo los subtipos  $\alpha_{1A}$  y  $\alpha_{1D}$  los más implicados y el subtipo  $\alpha_{1B}$  el que contribuye en menor proporción (Daly y cols., 2002), incluso se ha llegado a proponer un papel crítico de éste último subtipo que regularía el tono vascular, como mediador de los estímulos simpáticos baroreflexos en la sinapsis neuromuscular (Townsend y cols., 2004), algo que aún hoy en día no está del todo bien definido.

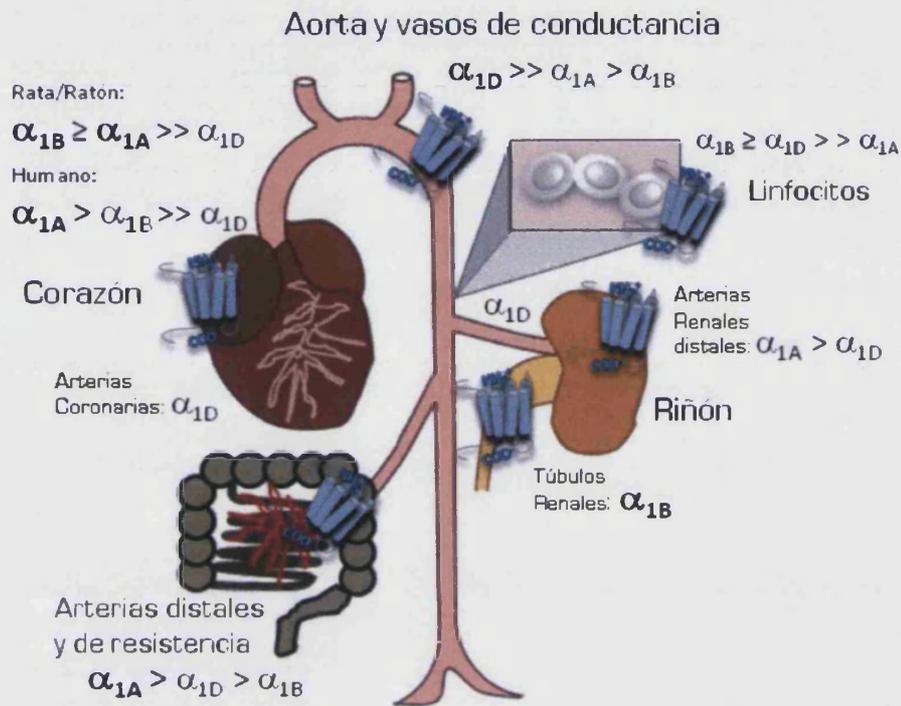
Además de en los vasos, también podemos encontrar los tres subtipos en el corazón, donde al parecer los subtipos mayoritarios en rata o ratón serían  $\alpha_{1B} \geq \alpha_{1A}$  (Price y cols., 1994; Faure y cols., 1995, Graham y cols., 1996), con ciertas diferencias con respecto al corazón humano, donde el subtipo  $\alpha_{1A}$  destaca como mayoritario (Graham y cols., 1996; Jensen y cols., 2009b), pero al parecer con niveles similares en todas las partes o cámaras del corazón (Wolf y cols., 1998). Los modelos con ratones KO mencionados también han aportado información sobre el papel de los subtipos en la regulación de la función y remodelados cardíacos. Se sabe que los subtipos  $\alpha_{1A}$  y  $\alpha_{1B}$  están implicados en la contractilidad cardíaca, y son responsables del desarrollo del corazón y del remodelado adaptativo o la hipertrofia cardíaca (O'Connell y cols., 2003; Philipp y Hein, 2004); mientras que el subtipo minoritario, el  $\alpha_{1D}$ , parece estar relacionado con la contractilidad de las coronarias (Chalothorn y cols., 2003), ya que además ha sido descrito como subtipo principal en estos vasos y ejerce un efecto compensatorio ante la falta de los subtipos mayoritarios (Turnbull y cols., 2003; Jensen y cols., 2009a). En la actualidad está clara la contribución de los tres subtipos en el control de la presión arterial, su implicación en los cambios a largo plazo en la morfología y función cardíaca, y probablemente también en el remodelado a nivel vascular, claramente relacionados con patologías cardiovasculares como la Hipertensión o la Insuficiencia Cardíaca (Hague y cols, 2003; Koshimizu y cols, 2003; Philipp y Hein, 2004).

En el riñón también se han descrito los ARs, siendo mayoritario el subtipo  $\alpha_{1B} \geq \alpha_{1A}$  según su localización (Gopalakrishanan y cols., 1993; Graham y cols., 1996), pero su rol funcional no parece estar claro aún. Al parecer tanto  $\alpha_{1A}$ , en mayor grado, como  $\alpha_{1D}$  controlarían la contracción de las arterias renales, distales y proximales respectivamente, regulando el flujo sanguíneo del riñón (Elhawary y cols., 1992; Villalobos-Molina y cols., 1997). Por otro lado, es sabido que una estimulación simpática prolongada en el riñón aumenta la reabsorción de agua y de  $\text{Na}^+$  (efecto antidiurético), y es capaz de producir hipertensión (Yoshida y Satoh, 1991). Numerosos estudios indican que los ARs- $\alpha_1$  aumentan la retención de  $\text{Na}^+$  (Osborn y cols., 1983; Elhawary y cols., 1992; Sattar y Johns, 1995) y al parecer sería el subtipo  $\alpha_{1B}$  quien mediaría este proceso en las células del túbulo distal (Elhawary y Pang, 1994), de forma especialmente marcada durante el desarrollo de la hipertensión, contribuyendo al inicio de la enfermedad mientras que su mantenimiento podría depender de otro grupo de ARs, los  $\alpha_2$  (Gesek, 1999).

También han sido descritos los ARs- $\alpha_1$  en muchos otros tejidos: en conductos deferentes, siendo los subtipos predominantes  $\alpha_{1A}$  y  $\alpha_{1D}$  (Ohmura y cols., 1992; Moriyama y cols., 1997), en próstata (Marshall y cols., 1995) y músculo de la vejiga

urinaria con proporción similar (Malloy y cols., 1998; Michelotti y cols., 2000), en hígado, donde parece que el subtipo  $\alpha_{1B}$  estaría implicado entre otras funciones en el metabolismo glucídico (Cotecchia y cols., 2002), en cortex cerebral, hipocampo, glándulas pituitaria y salivaria, pulmón y bazo, con diferentes proporciones (Price y cols., 1994; Graham y cols., 1996), estando implicados en numerosas funciones fisiológicas y enfermedades asociadas. Se encuentran distribuidos a lo largo del sistema nervioso central, pero el rol específico de cada subtipo aún no está muy claro debido a la falta de agonistas selectivos que atraviesen la barrera hemato-encefálica; aún así se sabe que los ARs- $\alpha_1$  están implicados en el control de funciones como la actividad motora, el movimiento fino, y al parecer estudios con animales transgénicos y KO relacionan el subtipo  $\alpha_{1B}$  con la neurodegeneración, disfunción locomotriz, incluso implicado en la estimulación locomotora y efectos gratificantes de varias drogas de abuso, así como en la capacidad exploratoria y la modulación de la memoria (Zuscik y cols, 2001; Stone y cols, 2001; Drouin y cols, 2002).

Por otro lado algunos, aunque muy pocos, autores han descrito la presencia de los ARs- $\alpha_1$  en células del sistema inmune como linfocitos y/o monocitos periféricos circulantes, encontrando una mínima expresión de los subtipos  $\alpha_{1B} \geq \alpha_{1D}$ , mientras que el subtipo  $\alpha_{1A}$  sería el de menor presencia (Ricci y cols., 1999; Tayebati y cols., 2000), otros autores no han podido detectarlos atribuyéndose esta falta de ARs- $\alpha_1$ , al parecer, a las condiciones de reposo funcional de la actividad propia del linfocito (Roupe van der Voort y cols., 1999). En cualquier caso, también se ha visto que la activación de linfocitos puede modificar la expresión de diferentes receptores. Concretamente ha sido estudiado como en linfocitos y monocitos se induce la expresión de los AR- $\alpha_1$  al ser estimulados con sustancias como el lipopolisacárido, la fitohemaglutinina, la dexametasona o con agonistas de los AR- $\beta_2$ , observándose un aumento en la expresión de dos subtipos, los AR- $\alpha_{1B}$  y  $\alpha_{1D}$  (Roupe van der Voort y col. 1999, 2000). Dentro de la discrepancia existente en el campo, parece que la única nota en común entre aquellos que de una manera u otra han detectado la presencia de los ARs- $\alpha_1$  en estas células es, que el subtipo minoritario e incluso a veces indetectable, parece ser el AR- $\alpha_{1A}$ , aunque todo esto dependería de las condiciones del paciente o incluso de la célula. A pesar de todo, aún no está muy claro el papel exacto de los ARs- $\alpha_1$  en la regulación/activación de la célula inmune (Kavelaars, 2002), pero sí que se ha sugerido la posibilidad de usarlos como bio-marcador o modelo humano de enfermedades cardiovasculares entre otras, ya que podría reflejar cambios en estos receptores en el organismo (Ricci y cols., 1999; Tayebati y cols., 2000). En el apartado 2.3 de la presente tesis, se abordará el tema con mayor profundidad.



**Imagen 4. Distribución de los ARS- $\alpha_1$  a lo largo del sistema cardiovascular.**

Es importante remarcar que muchos de los avances en este campo han sido obtenidos gracias a la generación de ratones KO para los distintos subtipos, avances para los que convendría tener en cuenta que la falta de un determinado receptor puede ser compensada por otros mecanismos (Rohrer y Kobilka, 1998), por lo que puede resultar peligroso asumir que la única diferencia entre un ratón KO y su respectivo control, es simplemente la falta de un gen (Guimaraes y Moura, 2001). Además también hay que decir que no siempre se han encontrado correlaciones entre los niveles de ARNm y la proteína detectada o la funcionalidad (García-Sáinz y cols., 1999; Guimaraes y Moura, 2001).

### 1.3 ADRENOCEPTORES $\beta$

Los ARs- $\beta$  son GPCRs encargados de mediar las respuestas cardiovasculares frente a la NA liberada de las terminaciones nerviosas y la A circulante. Estas respuestas llevan a procesos tan importantes como los de relajación del músculo liso vascular, la relajación de las vías aéreas, la contractilidad y el control del ritmo cardiaco y hasta el metabolismo lipídico y de la glucosa. Así pues, este grupo de ARs estará implicado en el control de la PA, del flujo sanguíneo, en el cronotropismo e inotropismo cardiaco y por lo tanto en el control de la frecuencia cardiaca (FC), coinvirtiéndose así, al igual que los ARs- $\alpha_1$ , en importantes dianas terapéuticas en enfermedades cardiovasculares como la hipertensión arterial, arritmias cardiacas o la insuficiencia cardiaca, incluso en enfermedades respiratorias como el asma, o en la obesidad entre otras (Guimaraes y Moura, 2001).

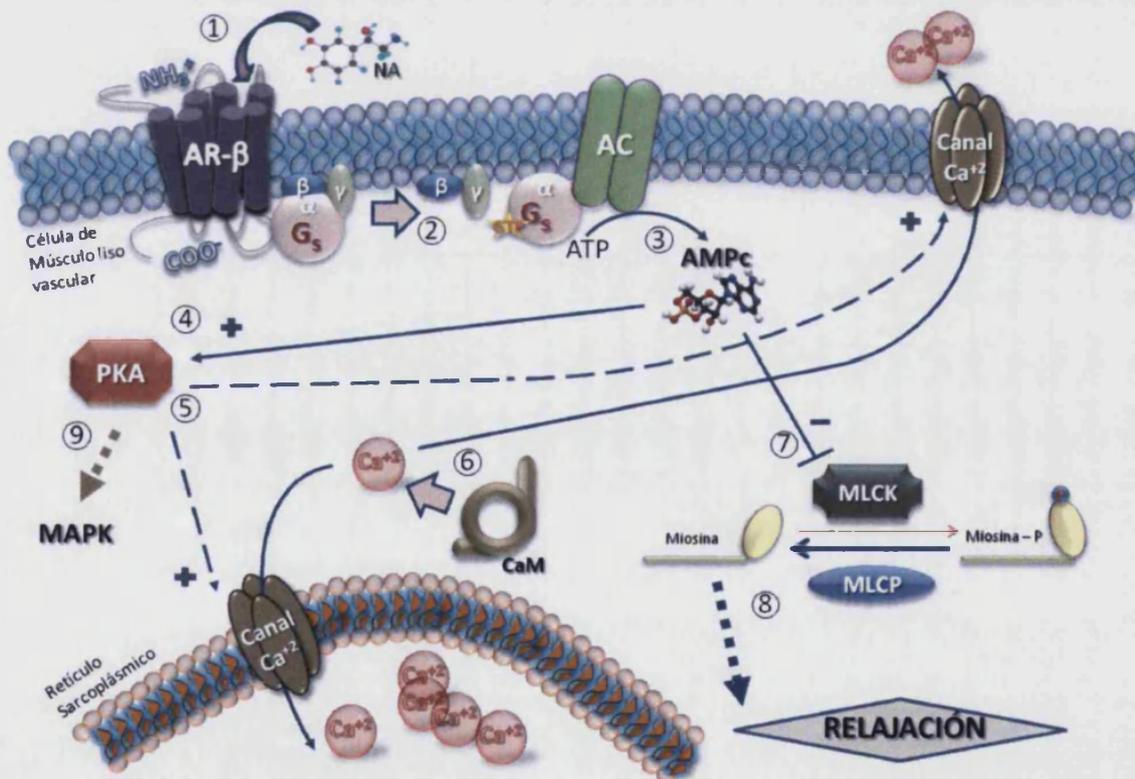
Los tres subtipos descritos:  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ , y  $\beta_3$ , se encuentran acoplados a la proteína  $G_s$ , por lo que inician los procesos fisiológicos a través de la activación de la Adenilato ciclasa (AC) y acumulación de su segundo mensajero, el adenosin-monofosfato cíclico (AMPc), seguido de la activación de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) que es capaz de fosforilar otras proteínas involucradas en la contracción-relajación muscular, en la regulación metabólica, en el control del crecimiento tisular, o capaces de inducir la muerte o la supervivencia celular. Además estos receptores se encuentran, según el subtipo y/o localización, o según el tiempo de estimulación por el agonista, acoplados a otras proteínas G como la proteína  $G_i$ , que media el efecto opuesto a la  $G_s$ , a través de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) resultando en procesos de cardioprotección, o de apoptosis mediada por la vía de la proteína quinasa II dependiente de  $Ca^{2+}$ -calmodulina (CaMKII). Así un subtipo, en un momento determinado, puede ser cardioprotector y otro puede estimular la hipertrofia cardiaca o la apoptosis, según la vía a la que se acoplen y por lo tanto muy importante en la génesis o evolución de enfermedades como la insuficiencia cardiaca (Xiao y cols., 2004, 2006).

En éste caso la distribución de cada subtipo a lo largo del organismo también varía, por lo que un subtipo u otro podría estar más o menos implicado en uno u otro proceso fisiológico o patológico, dependiendo del territorio que se trate, por ejemplo los ARs- $\beta$  periféricos más abundantes (AR- $\beta_2$ ) controlan la relajación vascular, y por otro lado el subtipo más abundante en el corazón (AR- $\beta_1$ ) media la contracción y el ritmo cardiaco, mientras que el subtipo minoritario, más abundante en tejido adiposo (AR- $\beta_3$ ) está implicado en el control de la lipólisis. Pero a su vez pueden mediar otros efectos adicionales o efectos similares en un mismo tejido, también dependiendo del

tiempo de estimulación por el agonista que marcará el acoplamiento a una u otra proteína G, además de los múltiples procesos de regulación a los que estos receptores se someten tras la estimulación por agonistas, que también dependerán de la sensibilidad de cada subtipo frente a estos (Guimaraes y Moura, 2001).

### 1.3.1 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LOS ARS- $\beta$

Como ya hemos indicado, al igual que los anteriores, los tres subtipos de ARS- $\beta$ , son receptores de 7TM acoplados a proteínas G, que median las señales enviadas por las catecolaminas endógenas A y NA. En este caso, su principal vía de señalización, la vía clásica, comienza gracias al acoplamiento con la proteína  $G_s$ .



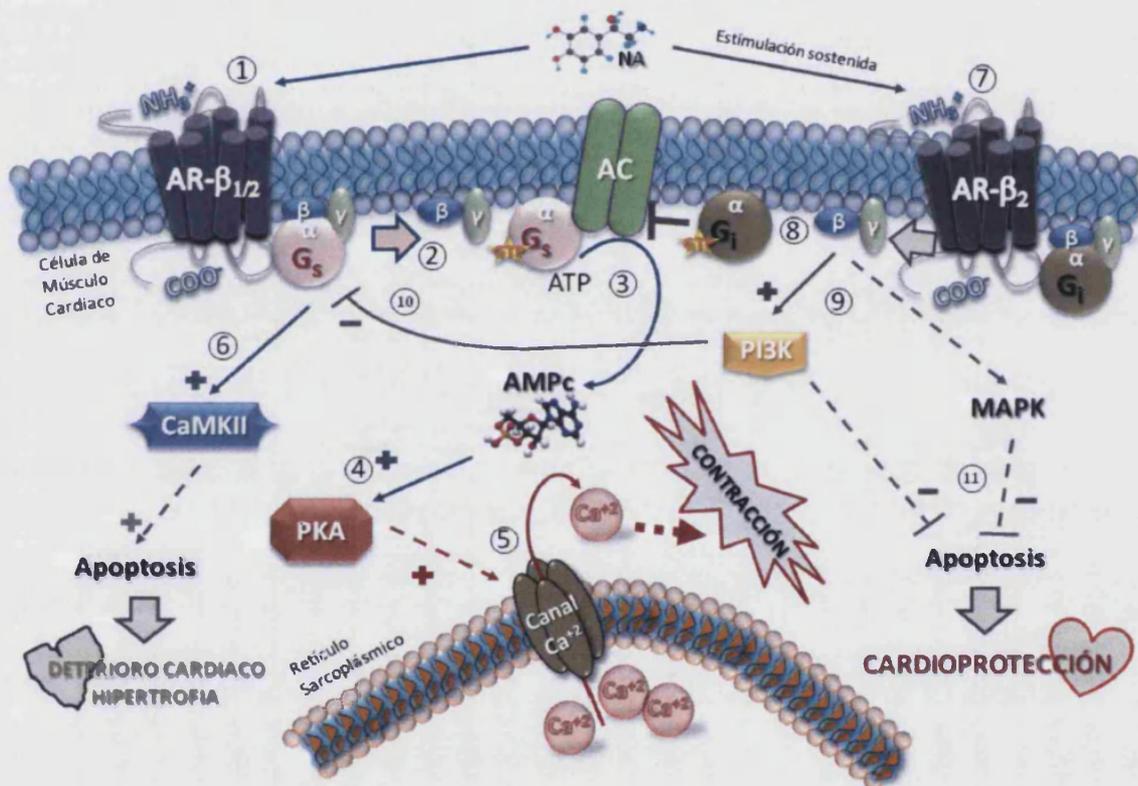
**Imagen 5. Vía de señalización intracelular que conduce a la relajación vascular mediada por los ARS- $\beta$ .** 1) Unión agonista-receptor y acoplamiento con la proteína  $G_s$ ; 2) Desacoplamiento de la subunidad  $G\alpha$ -GTP y activación de la AC; 3) Síntesis de AMPc; 4) Activación de la PKA; 5) Salida de  $Ca^{+2}$  del espacio intracelular y entrada al retículo; 6) Separación del  $Ca^{+2}$  de la Calmodulina; 7) Inhibición de la MLCK; 8) Defosforilación de la Miosina-P y Relajación; 9) Activación de la vía de las MAPK.

En células del músculo liso vascular, cuando la subunidad  $G_s\alpha$  se disocia, se activa la vía clásica descrita para los ARs- $\beta$  que cursa con la activación de la AC, generación de AMPc y activación de la PKA que fosforila proteínas asociadas a la relajación vascular. Además el AMPc es capaz de inhibir la liberación de  $Ca^{+2}$  de los depósitos intracelulares, reduce la entrada de  $Ca^{+2}$  del exterior celular, y estimula la recaptación intracelular de  $Ca^{+2}$ , con lo que la concentración del catión en el espacio intracelular bajará, impidiéndose la unión a la calmodulina y así, impidiendo la activación de los mecanismos de contracción, favoreciéndose la relajación vascular (Rembold, 1992; Johnson, 1998) (ver Imagen 5). Además hay numerosos mecanismos independientes de AMPc que también conducen a la vasorelajación, pero aún queda por determinar su relevancia fisiológica (Tanaka y cols., 2005).

En el músculo cardiaco, tras la activación de los ARs- $\beta_1$  y - $\beta_2$ , se producen fenómenos más complejos. Por un lado, disocia la subunidad  $G_s\alpha$  que activa la enzima AC generándose AMPc con la consiguiente activación de la PKA que fosforilará, entre otras proteínas, los canales de  $Ca^{+2}$ , induciendo con ello la liberación del catión del sarcolema favoreciendo así los procesos que conducen a la contracción muscular (Bristow y cols., 1989). También es sabido que éstos receptores son capaces de acoplarse a segundos mensajeros (PKA/Fosfolambam) encargados de fosforilar proteínas que conducen al efecto contrario, bajada del  $Ca^{+2}$  intracelular e incluso inhibición de la unión de proteínas como la troponina necesarias para la contracción, y por lo tanto relajación muscular (Molenaar y cols., 2000).

Además, se ha demostrado que en corazón el AR- $\beta_2$  tiene otros efectos debido a un acoplamiento dual. Tras una estimulación sostenida por el agonista este subtipo se acopla a la proteína  $G_i$  que posee carácter inhibitorio sobre la AC (Xiao y cols., 1995; Daaka y cols., 1997a; Kilts y cols., 2000), y más recientemente se ha demostrado la relación que existe entre esta activación de la proteína  $G_i$  mediada por AR- $\beta_2$  y otras vías de señalización como la vía PI3K/Akt y la vía de las MAPK (ERK1/2 y p38), de efecto antiapoptótico y por tanto cardioprotector (Communal y cols., 1999, 2000; Chesley y cols., 2000; Zhu y cols., 2001; Xiao y cols., 2004, 2006), pudiendo incluso estar directamente acoplado al factor regulador del intercambio  $Na^+/H^+$  (Hall y cols., 1998). Por otro lado, el aumento de  $Ca^{+2}$  intracelular que conduce a la contracción del músculo cardiaco mediado por el AR- $\beta_1$  a través de la vía de la proteína  $G_s$ , también favorecerá a largo plazo la activación de la vía apoptótica de la CaMKII, favoreciéndose el deterioro del corazón (Zhu y cols., 2001, 2003; Wang y cols., 2004), mientras que por otro lado esta vía de la CaMKII, independiente de la activación de PKA, está implicada en el desarrollo del corazón y por lo tanto en la hipertrofia o desarrollo inadecuado (Morisco y cols., 2001). En condiciones normales,

el subtipo  $\beta_1$  se encuentra exclusivamente acoplado a la vía de la proteína  $G_s$ , mientras que el subtipo  $\beta_2$  activa ambas vías ( $G_s$  y  $G_i$ ), siendo este acoplamiento un punto importante en la regulación de la actividad del receptor, ya que además la vía  $G_i/PI3K$  inhibe la respuesta mediada por  $G_s$ , controlando los efectos inotrópicos del mismo (Chesley y cols., 2000) (ver Imagen 6).



**Imagen 6. Vía de señalización intracelular que conduce a la contracción cardíaca mediada por los ARs- $\beta$ .** 1) Unión agonista-receptor y acoplamiento con la proteína  $G_s$ ; 2) Desacoplamiento de la subunidad  $G\alpha$ -GTP y activación de la AC; 3) Síntesis de AMPc; 4) Activación de la PKA; 5) Salida de  $Ca^{2+}$  del retículo sarcoplásmico y contracción del músculo cardíaco; 6) Activación de la vía CaMKII a partir de la  $G_s$  tras estimulación sostenida del AR- $\beta_1$  y activación de la apoptosis con deterioro cardíaco; 7) Estimulación sostenida del AR- $\beta_2$  y acoplamiento a la proteína  $G_i$ ; 8) Inhibición de la AC; 9) Activación de la vía de PI3K y de las MAPK; 10) Inhibición de la proteína  $G_s$ ; 11) Inhibición de la apoptosis y efecto cardioprotector.

Se requiere una consideración aparte para hablar de los ARs- $\beta_3$ . Estos ARs son activados por las catecolaminas a altas concentraciones, mucho mayores que para los otros subtipos, sugiriendo que podrían activarse en situaciones en las que el tono simpático sea alto (Gauthier y cols., 2007). Estos receptores, como los otros subtipos,

también median relajación del músculo liso acoplándose a la vía clásica  $G_s$ /AMPc/PKA, pero al parecer podrían estar activando otros mecanismos a través de otras vías (Tanaka y cols., 2005; Gauthier y cols., 2007). El tipo de respuesta también variará con respecto a su localización e incluso dependiendo de la especie estudiada, así en muchos vasos produce vasorelajación por aumento del AMPc intracelular en las células del músculo liso vascular (Tamaoki y cols., 1998), mientras que en otros como por ejemplo, la aorta torácica de rata, se produce vasorelajación dependiente de la vía del óxido nítrico (NO), por estar localizado principalmente en el endotelio, que es capaz de activar la enzima guanilato ciclasa (GC) soluble que producirá guanosin monofosfato cíclico (GMPc), este nucleótido activaría la proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG) que reduce la concentración de  $Ca^{+2}$  intracelular e inhibe proteínas contráctiles, provocando la relajación en células musculares (Trochu y cols., 1999; Rautureau y cols., 2002; Rozec y Gauthier, 2006).

En el corazón, la estimulación selectiva de este subtipo  $\beta_3$  provoca inotropismo negativo como válvula de escape ante un estímulo adrenérgico intenso, pero todos los mecanismos por los que se produce aún están por aclarar (Gauthier y cols., 1996, 2007). Al parecer, este fenómeno podría deberse a su acoplamiento exclusivo con la proteína  $G_{i/o}$ , que no cursa esta vez con inhibición de la AC, sino con la estimulación de la vía del NO/GMPc/PKG, probablemente tras la activación de la NO sintasa endotelial (eNOS) (Gauthier y cols., 1998; Sterin-Borda y cols., 2006), presente también en cardiomiocitos (Schulz y cols., 2006), pero también se ha sugerido la posibilidad de la activación de otras vías que ejercen efectos protectores frente a los efectos cardiotóxicos inducidos por las catecolaminas (Gauthier y cols., 2007).

No obstante, de acuerdo con el calibre de los vasos, se ha sugerido que los otros subtipos de ARs- $\beta$ , además del ya mencionado  $\beta_3$ , también podrían estar provocando relajación vascular vía NO (NO/GMPc/PKG) en grandes vasos, probablemente por su presencia en las células endoteliales, mientras que en arterias pequeñas la relajación vascular sería NO-independiente (AC/AMPc/PKA) al localizarse en células del músculo liso (Priest y cols., 1997; Ferro y cols., 1999; Trochu y cols., 1999; Guimaraes y Moura, 2001; Vanhoutte, 2001).

### 1.3.2 DISTRIBUCIÓN TISULAR Y PAPEL FISIOLÓGICO DE LOS ARS- $\beta$

Los ARs- $\beta$  al igual que los  $\alpha_1$  se encuentran ampliamente distribuidos a lo largo del organismo. Desde su descubrimiento, se clasificaron los subtipos según sus efectos en diferentes órganos siendo el subtipo  $\beta_1$  el responsable de la contracción del corazón, y el subtipo  $\beta_2$  el responsable de la relajación del músculo liso vascular, de las vías aéreas y del músculo uterino (Lands y cols., 1957). Conforme se fueron ampliando los conocimientos y con el uso de nuevas técnicas más específicas, se fue descubriendo que los tres subtipos de ARs- $\beta$  se encontraban expresados en numerosos tejidos y órganos (ver Imagen 7), incluso tal y como acabamos de ver con funciones diferentes y a veces opuestas.

Si bien tradicionalmente se describió que el responsable de la relajación del músculo liso era el AR- $\beta_2$ , hoy en día se sabe de la presencia de los tres subtipos, pero por lo general sigue siendo este subtipo el mayoritario, aunque esto varía según territorios. Por ejemplo, se sabe que en grandes vasos de conductancia como la aorta, las arterias mesentérica, esplénica y pulmonar entre otras, el mayoritario es el subtipo  $\beta_2$ , al menos a nivel funcional, y por lo tanto responsable de la vasodilatación, y del control del flujo sanguíneo, mientras que en vasos pequeños como las arterias coronarias (Begonha y cols., 1995) y las arterias mesentéricas de resistencia quién predomina es el  $\beta_1$  y por lo tanto el principal implicado en la vasorelajación en estos tejidos (Briones y cols., 2005). Por otro lado también se ha descrito el subtipo  $\beta_3$  en células del músculo liso vascular (Tamaoki y cols., 1998) siendo su efecto muy bajo, pero sobre todo en el endotelio, cuyo efecto vasodilatador viene mediado por la producción de NO (Trochu y cols., 1999).

En cuanto a la distribución en el corazón, también se encuentran presentes los tres subtipos, siendo el de mayor porcentaje el subtipo  $\beta_1$  (70-80%) frente a  $\beta_2$  (20-30%) (Brodde, 1991) y el minoritario con diferencia el  $\beta_3$ . El subtipo  $\beta_1$  sería el principal responsable de la contracción muscular del corazón y del control del ritmo cardiaco, por lo tanto muy importante en el control de la FC y del gasto cardiaco, mientras que el subtipo  $\beta_2$  estaría implicado en menor medida en la contracción debido a que se encuentra inicialmente secuestrado en las caveolas (Rybin y cols., 2000). Ambos subtipos mayoritarios  $\beta_1$  y  $\beta_2$  aumentan la fuerza de contracción, pero también están implicados en la aceleración de la relajación en el corazón, tanto a nivel auricular como ventricular (Molenaar y cols., 2007). Además, tal y como hemos visto, una estimulación sostenida del AR- $\beta_1$  cardiaco provocaría deterioro del corazón por estimular la apoptosis (efecto nocivo), mientras que el estímulo sostenido del subtipo  $\beta_2$  facilita el cambio de vía, activándose los efectos cardioprotectores (efecto

beneficioso), por lo que la estimulación sostenida o no de ambos receptores, o la proporción o densidad de cada subtipo, estarán muy implicadas en el remodelado del corazón, o en el deterioro progresivo descrito en enfermedades como la insuficiencia cardiaca, y muy importante a la hora de establecer una terapia combinada frente a esta enfermedad (Xiao y cols., 2004, 2006). El subtipo minoritario en corazón, el  $\beta_3$ , produce inotropismo negativo posiblemente como válvula de escape ante un estímulo adrenérgico intenso, pero su efecto no está aún del todo claro, aunque también parece estar implicado en patologías cardiovasculares como la insuficiencia cardiaca o la hipertensión (Gauthier y cols., 1996, 2006).

En riñón el subtipo predominante es el  $\beta_1 > \beta_2$ . Al parecer el subtipo  $\beta_2$  se encontraría en las terminaciones nerviosas recibiendo los estímulos simpáticos asociados con los vasos que irrigan el riñón, produciendo vasodilatación, en los grandes vasos renales y de manera muy minoritaria en los túbulos, mientras que el  $\beta_1$  es el mayoritario en estructuras como el glomérulo y los túbulos distales (Summers y Kuhar, 1983; Lakhani y cols., 1994). Se ha visto que los agonistas  $\beta$  inhiben la excreción de  $K^+$ , estimulan la reabsorción de fluidos, y/o favorecen la reabsorción de NaCl según sea su localización en los túbulos o en el asa de Henle entre otras zonas (Garg, 1992). Además también es sabido que la estimulación  $\beta_1$  produce un aumento de la liberación de renina y por lo tanto de la formación de angiotensina II lo que se añadirá al efecto de aumento de reabsorción tubular (Osborn y cols., 1981), la falta de los receptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$  reduce significativamente la liberación de renina, y el receptor  $\beta_3$  minoritario no tendría efectos marcados (Kim y cols., 2007).

En linfocitos, la presencia de los ARs- $\beta$ , lleva mucho tiempo siendo estudiada desde que se describieran por primera vez (William y cols., 1976). El subtipo mayoritario es el  $\beta_2$  (Loveland y cols., 1981), así pues también ha sido el más estudiado, siendo en parte responsable de la regulación en la producción de citocinas, o de la proliferación y diferenciación celular, y se ha comprobado su participación en la progresión de enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide o la esclerosis múltiple (Kohm y Sanders, 2001; Sanders y Straub, 2002). Incluso se ha llegado a sugerir que el AR- $\beta_2$  pudiera ser la conexión entre el sistema nervioso y el sistema inmune (Kin y Sanders, 2006). Por otro lado, en órganos con alta densidad de ARs- $\beta$  como pulmones y corazón, se ha visto como cambios en la expresión del AR- $\beta_2$  observados tras estimulación crónica por catecolaminas son cualitativamente similares a los cambios observados en linfocitos (Aarons y Molinoff, 1982). Incluso se ha observado una correlación en la densidad de los ARs- $\beta$  entre miocardio y linfocitos, proponiendo los linfocitos como herramienta para monitorizar los posibles cambios inducidos por la administración de fármacos o por enfermedades en órganos

de difícil acceso, con el objetivo de mejorar la efectividad de los tratamientos (Brodde y cols., 1986). Además, se han visto cambios en la expresión de los ARs en linfocitos en enfermedades cardiovasculares como la hipertensión arterial (Brodde y cols., 1985; Parfyonova y cols., 1988) y la insuficiencia cardiaca entre otras (Iaccarino y cols., 2005; Yu y cols., 2007). Recientemente se ha descrito el subtipo  $\beta_3$  como minoritario en linfocitos circulantes, siendo la distribución de los tres subtipos  $\beta_2 > \beta_1 > \beta_3$  (Yu y cols., 2007).

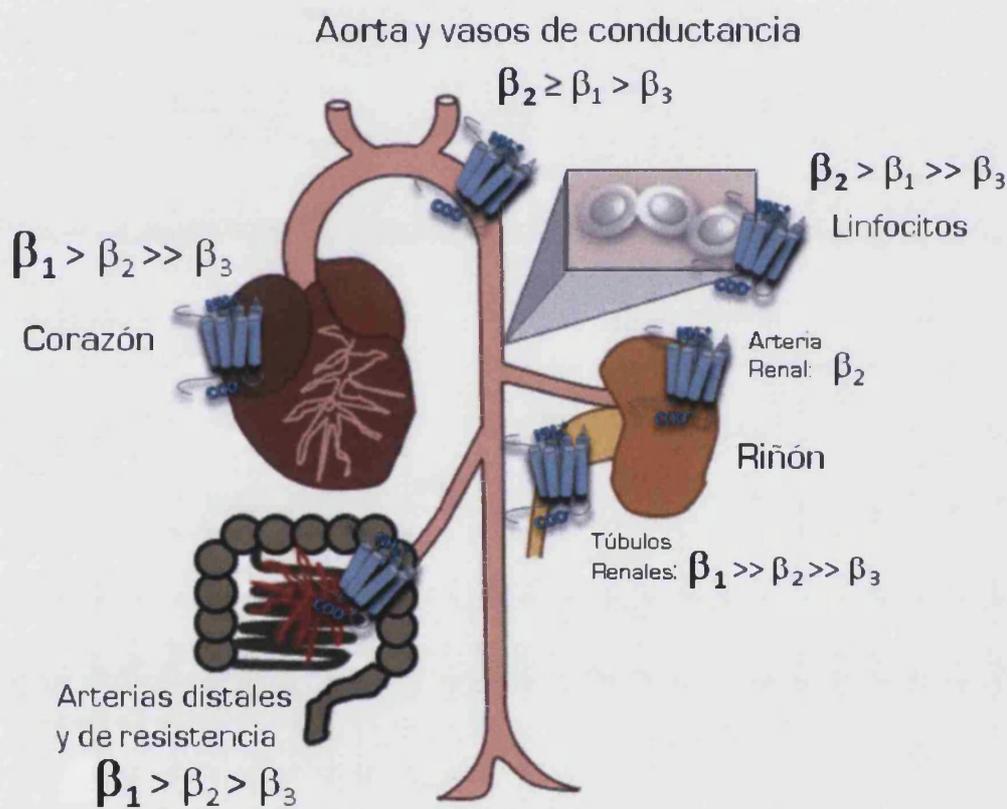


Imagen 7. Distribución de los ARs- $\beta$  a lo largo del sistema cardiovascular.

También han sido descritos en otros tejidos. Los ARs- $\beta$  juegan un papel importantísimo en el pulmón ya que se encuentran expresados en el epitelio de las vías aéreas, principalmente el AR- $\beta_2$ , mayoritario en los pulmones, que es el responsable de la relajación de la musculatura lisa de los mismos (Nijkamp y cols., 1992; Abraham y cols., 2003) y por lo tanto está muy implicado en enfermedades

pulmonares obstructivas, siendo una diana terapéutica muy utilizada en enfermedades como el asma (Waldeck, 2002). El subtipo  $\beta_1$  se encuentra en menor proporción en este tejido (Minneman y cols., 1979). El subtipo  $\beta_2$  también es el mayoritario y por lo tanto el responsable de la relajación del músculo liso del útero, por lo que sus agonistas selectivos son usados en la prevención del parto prematuro (Tanaka y cols., 2005). También se localizan en otros tejidos como el esófago donde predomina el  $\beta_1$  (Horinouchi y cols., 2003), el músculo liso del tracto gastrointestinal donde el  $\beta_3$  regula la motilidad (Anthony y cols., 1998) y el tejido adiposo donde el mismo subtipo  $\beta_3$  también parece ser el mayor implicado en la lipólisis y la termogénesis (Arch y cols., 1984). Median la relajación del músculo liso de la vejiga urinaria (el más importante es el subtipo  $\beta_3$ ), la uretra (donde predomina el  $\beta_2$ ) y la próstata donde parece que predomina  $\beta_3$  dependiendo de especies (Michel y Vrydag, 2006). En diferentes partes del cerebro también han sido localizados, siendo  $\beta_1$  mayoritario en partes como el hipocampo o el cortex, y  $\beta_2$  únicamente en el cerebelo (Minneman y cols., 1979), siendo minoritario el subtipo  $\beta_3$  (Rodríguez y cols., 1995), participando todos ellos en mayor o menor medida en los cambios de comportamiento relacionado con el estrés, la ansiedad o la depresión entre otros trastornos mentales (Gorman y Dunn, 1993; Ramos y Arnsten, 2007). Por último también podemos encontrarlos en el músculo esquelético, donde el subtipo mayoritario  $\beta_2$  es responsable de la hipertrofia muscular vía PI3K/Akt (Lynch y Ryall, 2008).

## 1.4 REGULACIÓN DE LOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS: LAS GRKS

Toda la complejidad en la señalización mediada por los ARs, así como el resto de GPCRs, que acabamos de ver, precisa de la existencia de sistemas de regulación que limiten y adapten la actividad de estos receptores a las necesidades fisiológicas de la célula y/o del organismo. Así pues, se han descrito diversos mecanismos que actúan a nivel del receptor, de las proteínas G o de los efectores celulares como finalizadores o atenuadores de la señal iniciada por el agonista y que implican el desarrollo de fenómenos también conocidos como desensibilización, internalización y reciclaje o resensibilización de los receptores. Estos procesos incluso pueden ser responsables del acoplamiento de los receptores desensibilizados a otras vías de señalización (Mayor y Penela, 2003).

En definitiva, hay múltiples mecanismos que controlan la señal y la densidad de los GPCRs, participando en el apagado o desensibilización del receptor tras la unión del agonista y la activación del mismo. Muchos receptores son fosforilados por proteínas quinasas impidiendo su acoplamiento a las proteínas G, esta fase inicial de la desensibilización ocurre rápidamente en cuestión de segundos o minutos desde la interacción con el agonista (Bouvier y cols., 1988). Los receptores fosforilados son secuestrados de la superficie celular o internalizados por proteínas específicas en una segunda etapa más tardía (necesita varios minutos e incluso horas), siendo desde ese momento inaccesibles para los ligandos (Oakley y cols., 1999). En algunos casos esta internalización será irreversible y conlleva la degradación del receptor, y por lo tanto una reducción en el número total de receptores presentes en la célula, es el proceso conocido como regulación a la baja o disminución regulada (del inglés *down-regulation*), y su recuperación es muy lenta ya que requiere la síntesis de nuevos receptores (Hadcock y Malbon, 1988). En muchos otros casos, la mayoría de ellos, el receptor secuestrado es devuelto a la superficie celular (Pippig y cols., 1995; Oakley y cols., 1999). Estos tres tipos de eventos que han sido nombrados como: fosforilación, internalización, y degradación/reciclaje, están involucrados en el proceso de desensibilización de los receptores, y se encuentran regulados por numerosos tipos de señales y proteínas reguladoras que dependerán del tipo de receptor o de su localización en un órgano determinado (Bünemann y cols., 1999; Ferguson, 2001).

La desensibilización de los receptores puede ser de dos tipos: Homóloga o Heteróloga. La *desensibilización homóloga* es aquella estrictamente dependiente del agonista, capaz de desensibilizar únicamente a aquellos receptores que hayan sido previamente activados por él (Lohse y cols., 1989). Por otro lado, la *desensibilización heteróloga* es aquella que se debe a la activación de otros receptores independientemente de que el receptor desensibilizado haya sido previamente activado o no, o lo que es lo mismo, es una desensibilización en ausencia de agonista y que, además, es independiente al resto de procesos y donde no interviene la internalización del receptor (Lohse y cols., 1990). En ambos casos la fosforilación del receptor es un paso clave y necesario llevado a cabo por dos tipos de quinasas: las quinasas dependientes de segundos mensajeros (PKC y PKA) en el caso de la regulación *heteróloga*, y por quinasas específicas, las quinasas de los GPCRs, más comúnmente conocidas como GRKs, en el caso de la regulación *homóloga*, todas ellas capaces de fosforilar residuos de serina y treonina del tercer lazo intracelular y del extremo C-terminal del receptor (Benovic y cols., 1986; Lohse y cols., 1989, 1990; Lefkowitz, 1993).

En la *desensibilización homóloga*, la fosforilación del receptor mediada por las GRKs es esencial aunque no es suficiente, es necesaria la unión de unas proteínas llamadas  $\beta$ -arrestinas que se encargarán, junto a otras proteínas de la maquinaria endocítica de la célula como la clatrina, de secuestrar al receptor activado unido a su agonista, internalizándolo en vesículas, y facilitando así el desacoplamiento físico del receptor con la proteína G, lo cual es un paso necesario para su total desensibilización (Benovic y cols., 1987a; Lohse y cols., 1992; Pippig y cols., 1995; Zhang y cols., 1996).

En la mayoría de los casos la activación de los receptores, conduce a su internalización, reversible o no, en compartimentos intracelulares específicos, siendo la fosforilación por GRK y la posterior unión de la  $\beta$ -arrestina factores determinantes (Mayor y cols., 1998). Sin embargo no todos los GPCRs experimentan este proceso de forma similar, sugiriendo la existencia de múltiples mecanismos de endocitosis: dependientes de vesículas recubiertas de clatrina, internalización a través de caveolas, a través de vesículas incipientes, o dependientes de ubiquitinación (Ferguson, 2001; Pierce y cols., 2002). El destino de los receptores internalizados también es diverso, por un lado los receptores pueden ir a endosomas tempranos, repletos de fosfatasa que reciclan al receptor dejándolo listo para su vuelta a la membrana e inmediato acoplamiento a la proteína G, o pueden ir a lisosomas, donde se producirá la degradación definitiva del receptor (Ferguson, 2001; Tsao y von Zastrow, 2001). Al parecer la ubiquitinación del receptor unido a la  $\beta$ -arrestina es un paso necesario para la degradación del receptor (Shenoy y cols., 2001).

La resensibilización de los receptores es un proceso clave para mantener la capacidad de señalización tras periodos de estimulación. Así pues la internalización de los receptores hacia endosomas enriquecidos en fosfatasa, que actúan sobre los residuos de serina/treonina fosforilados, es uno de los principales mecanismos (Pitcher y cols., 1995). En el caso de aquellos receptores degradados en los lisosomas, la resensibilización se produciría bien mediante la síntesis de nuevos receptores, algo bastante más lento, o bien mediante la movilización a la membrana de reservorios que almacenan receptores (Ferguson, 2001).

Además de participar en los procesos de desensibilización, internalización y reciclaje, la interacción de  $\beta$ -arrestinas con el receptor también activa otras vías de señalización intracelular. La endocitosis de los GPCRs a través de  $\beta$ -arrestina favorece la activación de la vía de las MAPK, siendo necesaria la internalización mediante las vesículas endocíticas de clatrina (Daaka y cols., 1998). Las  $\beta$ -arrestinas actuarán como adaptadores que reclutan y organizan complejos de proteínas señalizadoras (Ras/ERK/MEK/JNK/c-Src) que conducen al inicio de la cascada de las

MAPK (Lutrell y cols., 1999; Pierce y cols., 2002). Las diferencias en el proceso de internalización y/o en el tráfico celular de los receptores determinarán las distintas vías de activación de MAPK y, por lo tanto las consecuencias de la activación de cada receptor (Ferguson, 2001).

Además de todos los procesos comentados, también hay otros mecanismos de regulación de los GPCRs, que contribuyen a suavizar las señales de los receptores ante una estimulación continuada. Un ejemplo son las proteínas reguladoras de la señalización de proteínas G (RGS), que son una familia de proteínas con actividad GTPasa, de modo que aceleran la hidrólisis del GTP unido a la subunidad  $G\alpha$  de la proteína G activada, provocando rápidamente la desactivación del sistema una vez cesado el estímulo, o suavizando la señal ante un estímulo persistente (De Vries y cols., 2000; Pierce y cols., 2002). Las proteínas RGS juegan un papel en la regulación fisiológica y los cambios fisiopatológicos del sistema cardiovascular, pero es difícil asegurar con detalle su papel exacto debido a la gran cantidad de variantes existentes capaces de controlar multitud de funciones y gran variedad de receptores (Hendriks-Balk y cols., 2008).

Las últimas investigaciones en el campo de la regulación de los receptores sugieren que quizás la desensibilización no sólo dependa del tiempo de estimulación por el agonista, o de la concentración de éste que se emplee, sino también del tipo de agonista que pueda inducir cambios conformacionales de un tipo u otro y que conlleve la desensibilización por la vía de las quinasas de segundo mensajero o por la vía de las GRKs, o incluso por una combinación de ambas, pero todo esto aún está muy poco estudiado (Kelly y cols., 2008).

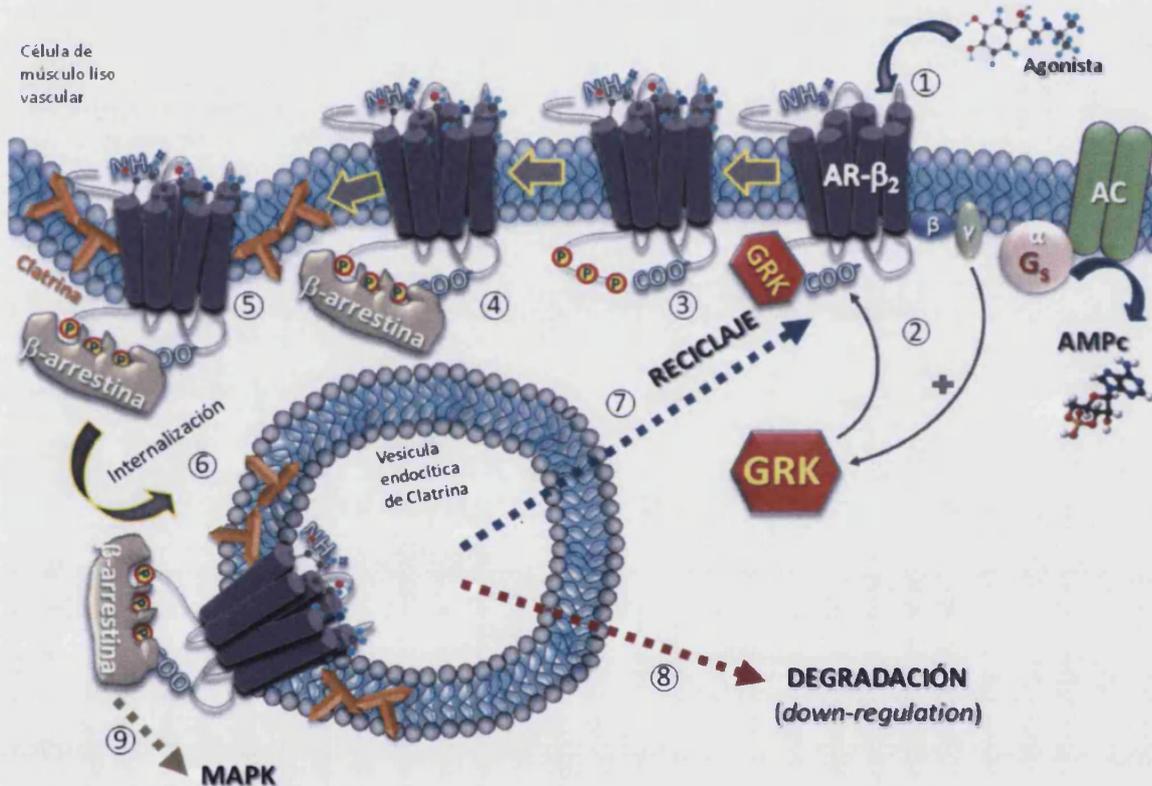
Los procesos de regulación de los receptores estarán pues asociados a numerosos procesos fisiológicos, tantos como regulen los propios receptores, así como asociados a las condiciones patológicas relacionadas con dichos procesos, de ahí la importancia fisiológica de las GRKs (Bünemann y cols., 1999). Por lo tanto, el conocimiento preciso de los mecanismos de regulación de los ARs será un punto muy importante para el total entendimiento de los procesos fisiológicos y patológicos en los que participan. Seguidamente ahondaremos en los mecanismos de regulación homóloga mediada por las GRKs, objeto de estudio en la presente tesis doctoral.

### 1.4.1 MECANISMO DE REGULACIÓN MEDIADO POR LAS GRKS

La vía de desensibilización mediada por GRKs fue descubierta por primera vez para el receptor de rodopsina (Weller y cols., 1974), sin embargo, para explicar el mecanismo exacto de la regulación de los ARs mediado por las GRKs, se utiliza el modelo más estudiado y conocido, el proceso de desensibilización *homóloga* del AR- $\beta_2$  mediado principalmente por la enzima anteriormente denominada quinasa 1 del receptor adrenérgico- $\beta$  ( $\beta$ ARK1), actualmente conocida como GRK2 (Benovic y cols., 1986; Bünemann y cols., 1999) (ver Imagen 8).

Todo comienza con la unión del agonista al receptor. Como ya hemos mencionado, esta unión provoca un cambio conformacional que induce al acoplamiento con la proteína G (Samama y cols., 1993), separándose las subunidades  $G\alpha$  por un lado encargada de activar la vía de señalización, y la subunidad  $G\beta\gamma$  que ayuda a atraer a la GRK a la membrana (Pitcher y cols., 1992; Koch y cols., 1993; Daaka y cols., 1997b), donde fosforilará al receptor, y en este caso concreto lo fosforilará en su dominio C-terminal (Fredericks y cols., 1996; Diviani y cols., 1997). Otros receptores son fosforilados en su tercer dominio intracelular (Bünemann y cols., 1999). La traslocación a la membrana de la GRK también estará favorecida por la presencia de  $PIP_2$  y otros lípidos, aunque el papel exacto de estos aún está por aclarar (Pitcher y cols., 1998). Seguidamente las ya mencionadas  $\beta$ -arrestinas se unirán a los grupos fosforilados del receptor provocando la finalización de la señal gracias al desacoplamiento físico del receptor y la proteína G (Sterne-Marr y Benovic, 1995; Ferguson y cols., 1996; Goodman y cols., 1996). Las  $\beta$ -arrestinas tienen dominios de unión a clatrina, facilitando que el receptor se dirija hacia vesículas recubiertas de esta proteína de la maquinaria endocítica (Lin y cols., 1997). En ese momento otra proteína llamada dinamina es capaz de cerrar las vesículas facilitando la endocitosis (Zhang y cols., 1996). La internalización del receptor es requisito imprescindible para su resensibilización ya que el entorno ácido del endosoma favorecerá un cambio conformacional en el receptor que permitirá la desfosforilación mediada por fosfatasa de la familia 2A (Pitcher y cols., 1995; Krueger y cols., 1997). Seguidamente, el receptor resensibilizado es devuelto a la membrana plasmática después de la retirada del agonista, listo para volver a actuar, paso necesario para que la célula pueda recibir nuevas señales (Tsao y cols., 2001). Alternativamente, el receptor puede ser degradado en lisosomas donde se produce una proteólisis del receptor (*down-regulation*), siendo necesaria la síntesis de nuevas proteínas para el restablecimiento de sus funciones, algo que llevaría mucho más tiempo que la vía de resensibilización que acabamos de mencionar (Danner y Lohse, 1997; Gagnon y cols., 1998; Kallal y cols., 1998; Tsao y cols., 2001; Tsao y von Zastrow, 2001). Además, tal y

como hemos comentado con anterioridad, la internalización del receptor es un paso fundamental para la activación de otras vías alternativas como la señalización a través de las MAPK, que regulan el ciclo celular, y la síntesis o degradación de proteínas, entre ellas los propios receptores (Daaka y cols., 1998; Lutrell y cols., 1999; Ferguson, 2001; Pierce y cols., 2002).



**Imagen 8. Mecanismo de regulación de los ARs-β mediado por GRKs/β-arrestinas.** 1) Unión agonista-receptor y acoplamiento con la proteína G<sub>s</sub>; 2) Desacoplamiento de la subunidad Gα-GTP, activación de la GRK y traslocación a la membrana; 3) Fosforilación del receptor; 4) Unión de la β-arrestina al receptor; 5) Inicio de la endocitosis en vesículas recubiertas por Clatrina; 6) Internalización del receptor; 7) Re-sensibilización y reciclaje del receptor a la membrana plasmática; 8) Degradación del receptor (*Down-regulation*); 9) Activación de la vía de las MAPK.

Además de su regulación por la subunidad Gβγ (sobre todo GRK2/3) (Pitcher y cols., 1992) o por la simple presencia del receptor activado por el agonista, las GRKs pueden ser reguladas por otros mecanismos. No está del todo claro aún pero al parecer la presencia de PIP<sub>2</sub> en la membrana ayuda a dirigir las GRKs hacia esta, y su presencia parece necesaria para la función de las GRKs (Penn y cols., 2000). Otro

mecanismo de regulación sería mediante la fosforilación por otras quinasas como la PKC o la PKA, muchas veces con efectos opuestos según el subtipo de GRK del que se trate. Así pues, por ejemplo, por un lado tenemos que la fosforilación mediada por PKC activa a la GRK2 mientras que GRK5 es inhibida (Pitcher y cols., 1998), por otro lado la fosforilación mediada por PKA favorece la unión de GRK2 con la subunidad G $\beta$  $\gamma$  (Cong y cols., 2001). La unión de Ca<sup>2+</sup>-CaM inhibe ambas quinasas aunque de forma más sensible a la GRK5, mientras que GRK2 necesita concentraciones mucho más elevadas. De esta manera cuando en una célula haya una activación simultánea de múltiples GPCRs o ARs de diferentes familias, el balance neto de la activación de PKC y Ca<sup>2+</sup>-CaM (por ejemplo, la vía de activación de los ARs- $\alpha_1$ ), beneficiará preferentemente la actividad de GRK2 y por lo tanto la desensibilización de aquellos receptores que sean substrato preferente por esta enzima (por ejemplo, los AR- $\beta$ ) (Penn y cols., 2000).

Muchas otras proteínas como caveolina, clatrina, miembros de la familia de las Raf quinasas, de las MAPK, ERK, c-Src, Akt, PI3K también modulan la actividad de las GRKs de un modo u otro (Penn y cols., 2000; Penela y cols., 2006; Ribas y cols., 2007). Otros factores como la subunidad G $\alpha$ q promueven la transcripción de la GRK2, o por el lado contrario citocinas proinflamatorias como la IL-1 $\beta$ , FNT- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , inhiben su transcripción (Ramos-Ruiz y cols., 2000). También hay proteínas que regulan su degradación en proteosomas, como la unión a  $\beta$ -arrestina, o la fosforilación mediada por c-Src o MAPK (Penela y cols., 1998; Elorza y cols., 2003). En definitiva, la complejidad funcional que supone las interacciones de las GRKs con otras proteínas indican un rol centralizado de estas quinasas en la regulación de numerosas vías de señalización intracelular (Penela y cols., 2006), además de estar relacionadas con los cambios en la expresión y funcionalidad de las GRKs que se han visto alteradas en numerosas patologías cardiovasculares o del sistema inmune entre muchas otras (Ribas y cols., 2007).

#### **1.4.2 CLASIFICACIÓN, DISTRIBUCIÓN TISULAR Y PAPEL FISIOLÓGICO DE LAS GRKS**

Las GRKs son enzimas que pertenecen a la familia de proteínas quinasas capaces de fosforilar residuos de serina y treonina bien en el extremo C-terminal o bien en el tercer lazo intracelular, según el receptor sobre el que actúen, reconociendo de forma específica los GPCRs activados por la unión de su agonista. Todas ellas comparten semejanzas estructurales: su peso molecular esta en torno a

60-80 kDa, todas poseen un dominio catalítico central muy conservado dentro de la familia de proteínas quinasas de serina/treonina de ~270 aminoácidos, que se encuentra flanqueado por un extremo N-terminal de ~185 aminoácidos, importante para el reconocimiento del receptor y el anclaje a la membrana celular, así como para el reconocimiento de la subunidad G $\beta\gamma$ , en el caso de GRK2, que permite su direccionamiento a la membrana (Eichmann y cols., 2003), así como otros dominios de regulación (Ribas y cols., 2007). Por otro lado, el dominio catalítico se encuentra flanqueado por un extremo C-terminal de longitud variable según subtipos (~105-230 aminoácidos), que contribuye a la localización sub-celular y a la traslocación dependiente de agonista, favoreciendo la interacción con lípidos y otras proteínas, conteniendo un dominio homólogo de pleckstrina (PH) con puntos de unión a PIP<sub>2</sub> y a la subunidad G $\beta\gamma$  (Touhara y cols., 1995), con diferencias según el subtipo de GRK, ya que en este dominio poseen pocas o ninguna homología en su secuencia (Penela y cols., 2003; Ribas y cols., 2007).

Dentro de esta familia, hasta la fecha han sido clonados un total de siete genes que codifican para siete GRKs diferentes pero que comparten algunas de las características mencionadas anteriormente, y que en definitiva son diferentes quinasas con propiedades reguladoras específicas. Así pues basándose en las diferencias estructurales y funcionales, los miembros de la familia de las GRKs se han separado en tres subfamilias: 1) La subfamilia de las quinasas de rodopsina, donde se encuentran GRK1 y GRK7, también denominadas GRKs visuales por estar presentes de manera específica en células de la retina; 2) la subfamilia de las quinasas de los ARs- $\beta$ , compuesta por GRK2 y GRK3; 3) la subfamilia GRK4 a la que además de esta también pertenecen GRK5 y GRK6 (Metayé y cols., 2005; Ribas y cols., 2007).

La especificidad de cada quinasa sobre un determinado GPCR ha sido estudiada numerosas veces usando modelos *in vitro*, cultivos celulares, o ratones transgénicos (modelos KO y modelos de sobreexpresión), modelos que representan métodos sofisticados para demostrar los roles individuales de cada GRK en varias vías de señalización de los receptores o en diferentes procesos vitales, que también dependerán de su localización en el organismo que, tal y como veremos a continuación, unas veces se expresaran de manera específica en un tejido (GRK1 y GRK7 en retina, y GRK4 en testículos), mientras que otras veces se encontrarán repartidas de manera general por todo el organismo aunque sus niveles y funciones fisiológicas dependerán del tipo de tejido y de célula (Metayé y cols., 2005).

La primera quinasa de la que se tuvo conciencia fue la GRK1, inicialmente llamada quinasa de rodopsina ya que era capaz de fosforilar a esta proteína siempre y cuando hubiera sido previamente activada por la luz (Palczewski y cols., 1988). Esta quinasa ha sido detectada sobre todo en células específicas de la retina (conos y bastones) y en la glándula pineal (Somers y Klein, 1984). El rol de la GRK1 en la desensibilización de la rodopsina tras la estimulación por luz ha sido confirmado en varios estudios con animales transgénicos (Chen y cols., 1995; Lyubarsky y cols., 2000). Dentro de esta misma familia se encuentra la última quinasa clonada hasta el momento, la GRK7 (Weiss y cols., 1998), también localizada en la retina, que en humanos se encuentra exclusivamente en conos y también cataliza la fosforilación de rodopsina dependiente de la activación por luz al igual que la GRK1, con roles diferenciados dependiendo de las especies (Weiss y cols., 2001).

Dentro de la sub-familia de las quinasas de los ARs- $\beta$  tenemos las dos quinasas que más se han estudiado por su papel regulador mayoritario sobre estos receptores: la GRK2, anteriormente nombrada como la quinasa 1 de los ARs- $\beta$  ( $\beta$ ARK1) (Benovic y cols., 1986, 1987b) y la GRK3 anteriormente llamada  $\beta$ ARK2 (Benovic y cols., 1991). Ambas quinasas se encuentran expresadas a lo largo de todo el organismo en multitud de órganos y tejidos diferentes, sobre todo en aquellos en los que los ARs- $\beta$  juegan un papel importante, pero también son responsables de la regulación de la inmensa mayoría de receptores (Premont y Gainetdinov, 2007). Numerosos estudios han probado el rol de la GRK2 en el control de funciones cardiovasculares como la contracción y el desarrollo cardiaco, o la regulación de la presión arterial. Estudios en ratones KO para la GRK2, han demostrado que esta quinasa juega un importante rol en el desarrollo embrionario y la función cardiaca ya que la total supresión del gen supone la muerte del ratón durante la gestación, presentando graves malformaciones cardíacas (Jaber y cols., 1996), mientras que los ratones heterocigotos GRK2+/- se desarrollan normalmente pero presentan un aumento de la contracción ventricular tras estimulación con agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, indicando que la contractilidad miocárdica puede ser modulada por los niveles de GRK2 (Rockman y cols., 1998a). Varios estudios con ratones transgénicos han demostrado que la sobreexpresión miocárdica de GRK2 atenúa la respuesta contráctil mediada por la estimulación de ARs- $\beta$  y angiotensina II (Koch y cols., 1995). Mientras que en células de músculo liso vascular, la sobreexpresión de GRK2 produce un aumento en el tono basal al reducir la vasodilatación  $\beta$ -adrenérgica (Eckhart y cols., 2002). Por otro lado se ha comprobado tanto la presencia de esta quinasa en células del sistema inmune como los linfocitos (Chuang y cols., 1992), como su implicación en la regulación de receptores de quimiocinas, viendo como una bajada en la expresión de GRK2 induce

la quimiotaxis y la respuesta celular en linfocitos mediada por estos receptores (Vroon y cols., 2004a).

Por lo que respecta a la GRK3, el análisis del ARNm en tejidos humanos revela una moderada expresión de GRK3 en pulmón, corazón y adipocitos, y también niveles altos en leucocitos (Parruti y cols., 1993). En este caso la total supresión del gen no impide que los ratones KO homocigotos se desarrollen con normalidad, no es una proteína vital, aunque por otro lado muestra un claro papel en la regulación de la contracción de las vías aéreas ya que se observa una broncoconstricción exagerada en respuesta a la estimulación del receptor muscarínico y, además, implicada en la regulación de receptores que controlan la función cardíaca ya que se puede ver un mayor incremento de la frecuencia cardíaca tras la hipotensión inducida por nitroprusiato (Walker y cols., 1999). De manera sorprendente, la sobreexpresión de la GRK3 en miocardio no reveló ningún cambio en la señalización normal del corazón mediada por los ARs- $\beta$  (Iaccarino y cols., 1998a).

Dentro de la tercera y última sub-familia tenemos la GRK4, la única identificada con 4 isoformas, expresada en su mayoría en testículos y cerebro, aunque también se han encontrado isoformas en miometrio y túbulos renales proximales (Premont y cols., 1996; Felder y cols., 2002). Ratones transgénicos que sobreexpresan GRK4 muestran una alteración en los efectos natriuréticos y diuréticos del receptor dopaminérgico D1 lo que sugiere un mecanismo de regulación de la GRK4 sobre este receptor que podría estar relacionado con la incapacidad del riñón para excretar sodio en la hipertensión (Felder y cols., 2002; Zeng y cols., 2008).

Otra quinasa importante en la regulación cardiovascular, dentro de esta tercera sub-familia es la GRK5, muy abundante sobre todo en el corazón por lo que se le supone un papel fundamental en la regulación de la contractilidad cardíaca, además de estar expresada en el pulmón pero también en varios tejidos como músculo esquelético y riñón en menor proporción (Kunapuli y Benovic, 1993). Unido a estas suposiciones, se ha visto que la sobreexpresión selectiva de GRK5 en corazón de ratones transgénicos provocaba una mayor desensibilización de los ARs- $\beta$ , y por lo tanto una bajada de sus funciones fisiológicas, comprobándose la implicación de esta quinasa en la regulación de la función cardíaca (Rockman y cols., 1996). Por otro lado parece que la GRK5 está implicada en la regulación cardiopulmonar a través de receptores muscarínicos M<sub>2</sub> (Walker y cols., 2004), y su sobreexpresión produce aumento de la presión arterial en ratones macho probablemente por su efecto desensibilizador de la dilatación mediada por el AR- $\beta_2$  y sobre el AR- $\beta_1$  facilitando su acoplamiento con la proteína Gi (Keys y cols., 2005).

Por último, también perteneciente a la tercera sub-familia tenemos la GRK6, que en cultivo celular se ha visto implicada en la desensibilización de numerosos GPCRs como los receptores para la hormona folículo estimulante, tromboxano A<sub>2</sub>, muscarínicos M<sub>3</sub> entre otros (Metayé y cols., 2005), así como de los ARs- $\beta$  en músculo liso uterino donde ni GRK2 ni GRK5 tuvieron efectos (Simon y cols., 2003). Sobre todo se ha comprobado mediante ratones KO la implicación de esta quinasa en la regulación de la quimiotaxis en linfocitos T y neutrófilos (Kavelaars y cols., 2003; Vroon y cols., 2004b). Además, la falta de esta quinasa en ratones KO, provoca un aumento en la sensibilidad ante efectos locomotrices de psicoestimulantes tales como cocaína y anfetamina, dos drogas relacionadas con la transmisión dopaminérgica (Gainetdinov y cols., 2003).

Todas estas quinasas no sólo controlan o regulan numerosos procesos fisiológicos sino que también han sido relacionadas con varias enfermedades como la degeneración de la retina (GRK1), enfermedades cardiovasculares como la hipertensión y la insuficiencia cardíaca (GRK2, GRK3 y GRK5), enfermedades de carácter autoinmune como la artritis reumatoide y la esclerosis múltiple, adicción a los opiáceos, diferentes tipos de cáncer, desordenes psiquiátricos, o sobrecarga del ventrículo izquierdo entre muchos otros desórdenes (Penela y cols., 2003; Metayé y cols., 2005; Premont y Gainetdinov, 2007; Harris y cols., 2008).

Como hemos visto, varios autores han mostrado que GRK2, GRK3 y GRK5 están claramente expresados en corazón humano sano, mientras que GRK4, GRK6 y GRK7 son apenas detectables o están ausentes (Metayé y cols., 2005; Penela y cols., 2006). Por otra parte, en líneas generales, GRK2 parece ser esencial en la regulación de multitud de respuestas cardiovasculares, mientras que tanto GRK3 como GRK5 están implicadas en la desensibilización de varios GPCRs relacionados con la regulación del sistema cardiovascular (Hendriks-Balk y cols., 2008). Motivos por los cuales en la presente tesis doctoral nos centraremos en el estudio de las tres quinasas más implicadas en el control de la funcionalidad y la enfermedad a nivel cardiovascular: GRK2, GRK3 y GRK5.

### **1.4.3 LOS ADRENOCEPTORES COMO SUSTRATO ESPECÍFICO DE LAS GRKS**

Los primeros métodos para identificar a través de qué GRK concreta se producía la desensibilización homóloga de un receptor determinado fueron ensayos de fosforilación en los que se emplearon quinasas y receptores purificados, y posteriormente reconstituidos en vesículas fosfolipídicas. La falta de otros elementos

importantes en la maquinaria de desensibilización de la célula indicaba la necesidad de otros métodos, tales como células transfectadas con receptores o con quinasas mutadas con actividad parcialmente inhibida, o células tratadas con anticuerpos, péptidos o ARNm antisentido inhibidores de la quinasa, o incluso células capaces de sobreexpresar una determinada quinasa de modo que la mayor fosforilación del receptor concreto, inducida por un agonista específico, se sobreentendía que era debido a esa quinasa sobreexpresada, pero esto también podría deberse a las quinasas endógenas. Mucha de la información que hoy en día se conoce sobre las GRKs proviene de estudios con ratones transgénicos que sobreexpresan o son KO para una quinasa determinada, estudios que han confirmado resultados previos o incluso han aportado sorpresas interesantes. Saber qué GRK determinada regula cada receptor dependerá, no sólo de que subtipo de GRK se exprese en esa determinada célula o tejido, sino también de la proporción absoluta o relativa de cada una (Pitcher y cols., 1998).

Todos estos experimentos han aportado a lo largo de los años numerosas evidencias de la actividad específica de cada GRK sobre un determinado receptor, en nuestro caso nos centraremos en los ARs de interés en la presente tesis doctoral: los ARs- $\alpha_1$  y - $\beta$ .

Por lo que respecta a los ARs- $\alpha_1$ , los mecanismos por los que se produce la internalización y por lo tanto la desensibilización del receptor, son diferentes según el subtipo que se analice. Se han observado diferencias en la localización y el tráfico celular de los diferentes subtipos de tal modo que podría afectar a los mecanismos de desensibilización de los ARs. Los ARs- $\alpha_{1A}$  se han localizado tanto en membrana como en compartimentos intracelulares, mientras que los ARs- $\alpha_{1B}$  han sido encontrados preferentemente en la membrana plasmática (Hirasawa y cols., 1997; Hrometz y cols., 1999; McCune y cols., 2000), por otro lado el subtipo  $\alpha_{1D}$  permanecería localizado en compartimentos intracelulares, posiblemente debido a la actividad constitutiva, característica de este subtipo que los otros dos no poseen. Al asumir una conformación activa en ausencia de agonista, se encontraría continuamente internalizado de manera independiente de  $\beta$ -arrestinas, saliendo a la superficie, si es el caso, únicamente tras el estímulo por parte del agonista (McCune y cols., 2000; Chalothorn y cols., 2002). En cuanto al subtipo  $\alpha_{1A}$  se comprobó que sufría procesos de internalización y reciclaje constitutivo de manera independiente a la activación del receptor, posiblemente como mecanismo para disponer siempre de receptores sensibilizados (Morris y cols., 2004), aunque esto podría depender de  $\beta$ -arrestina (Pediani y cols., 2005).

Todos estos resultados parecían indicar que el único subtipo que seguía el prototipo de GPCR, localizado en la membrana y sobre el que podrían actuar las GRKs tras estimulación por agonista, era el  $\alpha_{1B}$  (Chalothorn y cols., 2002). Sobre esta línea de trabajo, ya se había demostrado "*in vitro*" la modulación del AR- $\alpha_{1B}$  por GRK2 y GRK3 tras la estimulación por agonista (Diviani y cols., 1996), pero a pesar de estos resultados, otros trabajos comprobarían que la sobreexpresión miocárdica de GRK2 no producía efectos relevantes sobre la función del AR- $\alpha_{1B}$  cardíaco, mientras que con la sobreexpresión de GRK3 en el corazón se observó que estos ARs eran desensibilizados por esta quinasa (Eckhart y cols., 2000). Esta sobreexpresión de GRK3 no afectó a la respuesta  $\beta$ -adrenérgica, en contraste con los resultados obtenidos en cultivos celulares (Freedman y cols., 1995; Oppermann y cols., 1996). Recientemente se ha comprobado que tras la inhibición de la GRK3 cardíaca se producía un aumento de la presión arterial debido a un aumento de la salida de sangre del corazón que podría deberse a la hiperactividad del AR- $\alpha_{1B}$  cardíaco (Vinge y cols., 2008). Además, también se ha visto que la sobreexpresión de GRK5 atenúa parcialmente los efectos inducidos por el AR- $\alpha_{1B}$  en corazón (Rockman y cols., 1996).

En cuanto a la regulación específica de los ARs- $\beta$  por determinadas GRKs, poco más se puede añadir, ha quedado claro que la segunda sub-familia de quinasas denominadas de los ARs- $\beta$  compuesta por GRK2 y GRK3 regulan estos receptores, además de muchos otros. Desde el descubrimiento de la GRK2 (Benovic y cols., 1986, 1987a, 1987b) o de la GRK3 (Benovic y cols., 1991) hasta la fecha, el mecanismo de regulación más estudiado de los GPCRs ha sido el que implica a estas quinasas en la desensibilización de los ARs- $\beta$  (Pitcher y cols., 1998; Bünemann y cols., 1999; Ferguson, 2001). También se ha visto como GRK5 es capaz de regular a estos receptores (Kunapuli y cols., 1994). Así pues en numerosos estudios se ha comprobado como sobre todo la GRK2, además de las ya mencionadas GRK3 y GRK5, eran capaces de fosforilar y desensibilizar, en mayor o menor grado, tanto el subtipo  $\beta_1$  (Freedman y cols., 1995; Rockman y cols., 1998a; Vinge y cols., 2007) como el subtipo  $\beta_2$  (Lohse y cols., 1989, 1990; Pei y cols., 1994; Benovic, 2002) dependiendo del tejido, del órgano, o incluso del tipo celular donde se localicen, y según las variaciones en la proporción de una u otra GRK.

No ocurre lo mismo para el subtipo  $\beta_3$  que parece ser resistente a la desensibilización. Este subtipo no posee en su estructura suficientes puntos de fosforilación por lo que no puede ser regulado por las principales quinasas que fosforilan receptores, entre ellas las GRKs, de manera que este receptor 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- $\beta_3$  o incluso de la PKC activada por otras vías, siendo ambas quinasas capaces de fosforilar factores de transcripción necesarios para la expresión del AR, tras largas exposiciones al agonista (Bengtsson y cols., 2000).

En lo sucesivo, centraremos la revisión en el papel de los seis subtipos de ARs elegidos para el estudio en la presente tesis doctoral ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ , y  $\beta_3$ ) y las tres GRKs diferentes (GRK2, GRK3 y GRK5) en la génesis y/o mantenimiento de dos patologías cardiovasculares tan importantes como la Hipertensión y la Insuficiencia cardiaca.



## 2 RECEPTORES ADRENÉRGICOS Y GRKS EN PATOLOGÍA CARDIOVASCULAR

Según publica la Organización Mundial de la Salud (OMS) en su página web (<http://www.who.int>), las enfermedades cardiovasculares son responsables de al menos un tercio del total de las muertes globales, o lo que es lo mismo, son la principal causa de muerte en todo el mundo. Cada año mueren más personas por enfermedades cardiovasculares que por cualquier otra causa, de hecho se calcula que en 2005 murieron debido a ella 17,5 millones de personas en todo el mundo, lo cual representa un 30% de todas las muertes registradas, y tan sólo en España ese mismo año murieron por esta causa más de 126.000 personas, un 33% del total de las muertes registradas en 2005, seguido de cerca por el cáncer y el resto de enfermedades y accidentes. Según el Instituto Nacional de Estadística (INE), los datos recientemente calculados para un total de 386.324 muertes durante el año 2008 (ver Imagen 9), fueron muy similares a años anteriores.

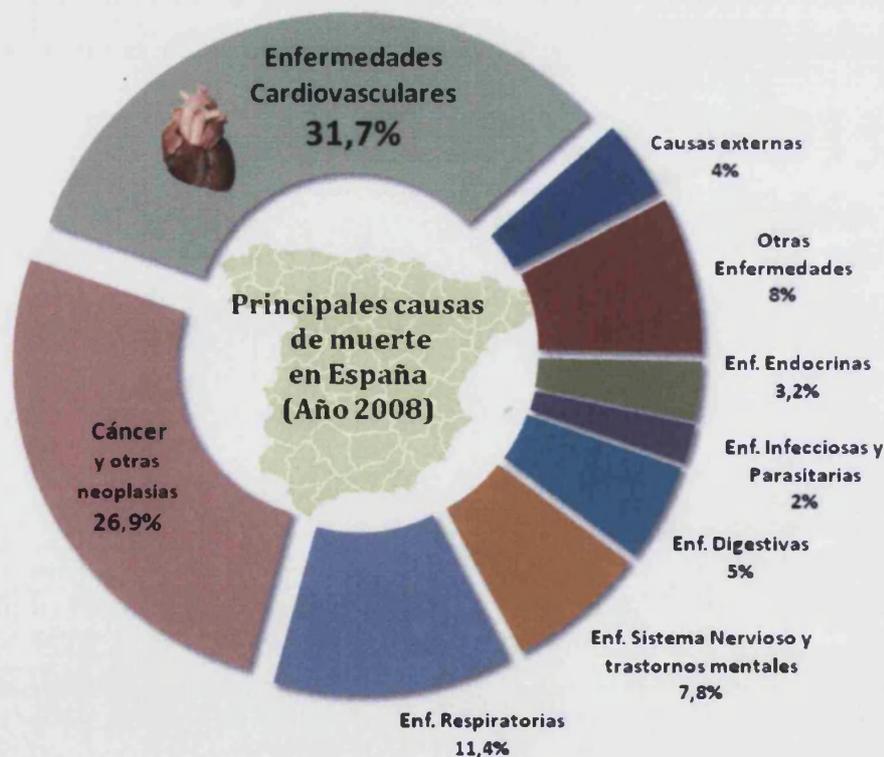


Imagen 9. Principales causas de muerte en España durante el año 2008. Gráfica realizada utilizando los datos publicados por el INE (<http://www.ine.es>) en 2010.

Por otro lado, un problema tan extendido como las cifras elevadas de presión arterial ha sido clasificado por la OMS en su informe anual sobre la salud en el mundo (WHO, 2002), como segundo factor de riesgo de enfermedades crónicas y por tanto de morbilidad y muerte a nivel global, tercero en España por detrás del alcohol y la obesidad, todos ellos capaces de desembocar o de agravar la enfermedad cardiovascular. Se estima que enfermedades como la hipertensión causan alrededor de 7,1 millones de muertes anuales, ya que esta enfermedad es el principal punto de partida para el desarrollo de accidentes cerebrovasculares, enfermedades isquémicas, fallo renal o insuficiencia cardíaca (Whitworth, 2003). Se ha comprobado que la hipertensión es el factor de riesgo más común para el desarrollo de la insuficiencia cardíaca congestiva, antecedendo a esta enfermedad en aproximadamente el 90% de los casos, además de otros factores asociados como el infarto de miocardio, la hipertrofia del ventrículo izquierdo, o la diabetes entre otros (Levy y cols., 1996). En la actualidad tan sólo en Europa hay 15 millones de personas diagnosticadas de insuficiencia cardíaca, una enfermedad que afecta al 20% de la población mayor de 75 años en países desarrollados, de los cuales la mitad mueren antes de 4 años (Dickstein y cols., 2008).

De estos datos se desprende la importancia del conocimiento de estas enfermedades. Un mejor conocimiento de la etiología proporcionará una mejor herramienta a la hora de buscar dianas terapéuticas más efectivas. De hecho, el correcto control de las cifras de presión arterial reduce el riesgo de sufrir otras enfermedades cardiovasculares tales como infartos de miocardio o derrames cerebrales, además de prevenir su desarrollo y por lo tanto es capaz de aumentar la expectativa de vida (Whitworth, 2003).

Los ARs, como transmisores principales de las señales emitidas por el sistema adrenérgico, están relacionados como hemos visto anteriormente, con el control de los procesos de contracción/relajación vascular, con el intercambio de fluidos a nivel renal, y por lo tanto, implicados en la regulación de la presión arterial y en consecuencia implicados de alguna manera en la hipertensión. Son responsables también del control de la fuerza y del ritmo de contracción del corazón, estando además implicados en los fenómenos de hipertrofia y remodelado cardiovascular. De hecho, entre las más antiguas terapias contra las enfermedades cardiovasculares, los ligandos de los receptores de las catecolaminas son los más importantes, siendo los  $\alpha_1$ - y  $\beta$ -bloqueantes los más usados desde hace mucho, aunque a pesar de esto su mecanismo de acción aún es desconocido, además de otros fármacos antihipertensivos con mecanismos de acción mixto  $\alpha/\beta$ -bloqueantes como el

carvedilol, que además también son terapia de otras enfermedades como la insuficiencia cardiaca (Leonardi y cols., 2000).

Los ARs estarán implicados en las enfermedades cardiovasculares, unas veces como consecuencia de las alteraciones sufridas en los tejidos y otras participando en la génesis de la propia enfermedad e incluso siendo la causa primaria de esta (Guimaraes y Moura, 2001). Un estudio en profundidad de la implicación de los ARs, y los mecanismos encargados de la regulación de la señal adrenérgica, en la génesis y/o mantenimiento de enfermedades cardiovasculares, puede ayudar al mejor entendimiento de las mismas, lo que supondría mejores oportunidades para el abordaje terapéutico con el fin de prevenir, tratar o impedir el avance, reduciendo así el porcentaje de mortalidad asociado. En este punto nos hemos planteado estudiar la relación de los ARs y las quinasas que los regulan, las GRKs, en dos enfermedades cardiovasculares: la Hipertensión arterial y la Insuficiencia cardiaca.

## 2.1 HIPERTENSIÓN ARTERIAL

Es muy importante que la presión arterial (PA) se mantenga a un nivel adecuado capaz de permitir el buen funcionamiento del cerebro, una correcta presión de perfusión renal y una perfusión suficiente de las arterias coronarias, procesos fundamentales para la supervivencia del individuo. Las dos fuerzas fisiológicas que determinan la PA son: 1) el gasto cardíaco, que es la cantidad de sangre que impulsa el corazón y depende del volumen sistólico del ventrículo izquierdo y de la frecuencia cardíaca, estando influenciado por el retorno venoso, la estimulación simpática y vagal, y la fuerza del miocardio; 2) las resistencias periféricas, que es la suma de la resistencia vascular al flujo de sangre y que depende, sobre todo, del diámetro interior del vaso, y por lo tanto de los fenómenos de vasoconstricción/relajación, o lo que es lo mismo, del tono basal regulado entre muchos otros factores por el sistema adrenérgico (Botey y Revert, 1996).

El correcto equilibrio entre estas fuerzas responsables de la regulación de la PA hará posible que estas cifras se mantengan en los niveles adecuados para el buen funcionamiento del organismo, y por lo tanto un desequilibrio de alguno o varios de estos mecanismos provocaría niveles inadecuados que, mantenidos en el tiempo, conducirían a un estado patológico, la Hipertensión arterial (HTA).

### 2.1.1 DEFINICIÓN Y ETIOLOGÍA

La HTA podría definirse como la elevación crónica y anormal de los niveles de presión arterial sistólica (PAS) y/o diastólica (PAD), sin embargo, desde un punto de vista epidemiológico, estos niveles de presión arterial (PA) que definen la enfermedad no están del todo bien establecidos. Esta enfermedad cardiovascular, tiene un origen multigénico que se caracteriza por la disfunción de los mecanismos vasculares, cardiogénicos, renales, neurogénicos y endocrinos, encargados de regular la PA, que conduce a la elevación crónica de las cifras de tensión arterial por encima de los límites considerados normales (Kaplan, 2005).

Entre los múltiples sistemas de control, cuatro son los que desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la PA entre unos límites adecuados: los barorreceptores arteriales, el metabolismo hidrosalino, el sistema renina-angiotensina y la autorregulación vascular. Todos estos mecanismos participan en la regulación de la presión arterial, tanto en la normotensión como en la hipertensión (Botey y Revert, 1996). Los niveles absolutos de PA varían con muchos factores y además varían mucho a lo largo del día (los valores nocturnos son 10-20% más bajos que los diurnos); varía con la edad, ya que el riñón pierde su capacidad para eliminar correctamente la sal; con el sexo, en las mujeres aumenta la prevalencia con la menopausia (Hunt y cols., 1986); con la raza, las personas de raza negra desarrollan un mecanismo muy eficiente de retener sal, existiendo una mayor prevalencia de HTA en este grupo (Chiam y cols., 2002; Zhu y cols., 2003); la PA aumenta con el ejercicio físico o psíquico y la carga emocional, el estrés provoca una estimulación del sistema nervioso simpático (Light y cols., 1983; Siegrist y cols., 1992); la digestión, o la alimentación también están relacionadas con la HTA, debido al consumo de sal (Oparil y cols., 1988) o proteínas, de alcohol, cafeína y tabaco, así como la ingesta de algunos iones, como  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ , o por enfermedades como la obesidad, todos estos factores contribuyen al aumento de las cifras de PA y/o al mantenimiento de la HTA.

La mayor importancia de esta enfermedad viene dada por el riesgo de enfermedad cardiovascular asociado, el cual es controlable a medida que se consigue bajar los niveles de presión arterial. Tanto la PAS como la PAD muestran una relación con la insuficiencia cardíaca, la arteriopatía periférica y la nefropatía terminal (Criqui y cols., 1992; Levy y cols., 1996; Kannel, 1996; Klag y cols., 1996), y por lo tanto la HTA ha de considerarse como un factor de riesgo cardiovascular muy importante, lo cual, unido a la alta prevalencia de la enfermedad en la población (aproximadamente  $\frac{1}{4}$  de la población adulta, en países desarrollados, del año 2000) (Kearney y cols.,

2005), la coloca como primera causa de muerte en el mundo según un informe de la OMS (Ezzati y cols., 2002).

La causa exacta que conduce a la elevación de las cifras de PA se desconoce en la mayoría de los casos (un 90% de los pacientes aquejados de HTA, lo que supone aproximadamente el 15% de la población mundial). En estos casos, se produce una alteración funcional o generalizada que se define como *Hipertensión esencial*. Debido a este desconocimiento en la causa que la origina, la HT esencial se trata de forma inespecífica, lo que produce un gran número de efectos colaterales menores que va acompañado de un incumplimiento terapéutico elevado. En la mayoría de los pacientes con esta enfermedad se ha visto una tendencia hereditaria, y por lo tanto un componente genético importante (Hunt y cols., 1986; Williams y cols., 1992).

La HT esencial es la que presenta una patogenia más complicada. Sin duda la dificultad fundamental para descubrir los mecanismos responsables de la hipertensión en estos pacientes se atribuye a la variedad de sistemas implicados en la regulación de la PA (adrenérgico, periféricos o centrales, renales, hormonales y vasculares) y a la complejidad de las interacciones entre estos sistemas (Williams, 2003). Se han descrito distintas alteraciones en los pacientes con hipertensión esencial, a menudo señaladas como la causa o las causas primarias de la HTA, aunque hoy por hoy, aún no queda claro si estas alteraciones son primarias o secundarias, expresiones variables de un único proceso patológico o reflejo de distintas entidades independientes, por lo que la hipertensión esencial probablemente sería debida a distintas causas (Williams, 2003). De entre esas posibles causas de la HTA esencial, se ha descrito un incremento en la actividad o en la respuesta del sistema nervioso simpático y de las hormonas vasoconstrictoras (Goldstein, 1983; de Champlain, 1990; Wilson, 1991). En la fisiopatología de la HT esencial también se ha implicado al sistema nervioso adrenérgico, el cual provocaría aumentos intermitentes de la presión arterial que traerían como consecuencia incrementos del gasto cardíaco por aumento de la contractilidad miocárdica y de la frecuencia cardíaca por un lado, y por otro modificaciones estructurales de la pared arteriolar que aumentarían las resistencias vasculares, tanto renales como sistémicas, favoreciendo la progresión y mantenimiento de la enfermedad. Esta sobreactividad simpática podría ser el estímulo inicial para que se produjera un aumento de la PA, lo que conduciría a alteraciones en los vasos de resistencia suficientes para mantener esta presión elevada (Folkow, 1982).

En la HT esencial severa se pueden observar algunas características como la PA media y la resistencia vascular periférica que se encuentran aumentadas entre un 40-60%, por otro lado el gasto cardiaco es prácticamente normal, y en fases tardías o más graves de la enfermedad, el flujo renal está disminuido a la mitad. Además de esto, la resistencia al flujo está aumentada entre 2-4 veces, pero a pesar de todo la tasa de filtración se mantiene debido a la elevada PA que favorece el filtrado. Por ultimo, lo más importante de todo es que los riñones no son capaces de excretar cantidades adecuadas de sal y agua, posiblemente por problemas en la vasculatura renal, a menos que la PA esté elevada, de tal modo que la reducción artificial a niveles normales produciría una anuria casi total hasta que la persona recuperase los niveles elevados de PA (Guyton y Hall, 1996).

En otros casos, la minoría de ellos, la enfermedad se produce por una alteración específica de un órgano que es responsable de la regulación de la PA, y en este caso se denomina *Hipertensión secundaria*. La prevalencia de la hipertensión secundaria es de entre 1-15% de todos los pacientes hipertensos (Botey y Revert, 1996). La hipertensión secundaria puede tener varias etiologías (Guyton y Hall, 1996; Williams, 2003), las causas más frecuentes son:

- HTA por *disfunciones renales* que tienen como consecuencia una alteración del control de  $\text{Na}^+$  y líquidos en el riñón dando lugar a una expansión de volumen, o bien es debida a una alteración en la secreción renal de sustancias vasoactivas, que da lugar a una alteración local o general del tono arteriolar. También puede ser debida a enfermedades del parénquima, a la retención primaria de  $\text{Na}^+$ , a problemas vasculorrenales como la constricción de la arteria renal en la HTA de Goldblatt, a tumores secretores de renina, o a la aparición de zonas isquémicas o enfermas en los riñones, que dan lugar a una disminución del flujo o a una disminución del filtrado glomerular.
- HTA por *disfunciones endocrinas* como la hiperfunción corticoadrenal, el síndrome de Cushing, el hiperaldosteronismo, la hiperplasia suprarrenal, el feocromocitoma, y otros tumores afines, la acromegalia, y otras alteraciones. En este bloque se encuentra la HTA juvenil como consecuencia de una biosíntesis, metabolismo o acción genéticamente alterados de las hormonas esteroídicas.

- HTA *iatrogénica*, por causas exógenas como el consumo de medicamentos que contengan anticonceptivos orales, glucocorticoides, mineralcorticoides, antidepresivos tricíclicos, fármacos simpaticomiméticos, ciclosporina, inhibidores de la monoaminoxidasa, e incluso alimentos con tiramina.
- HTA por *causas neurógenas* por estimulación del sistema nervioso simpático o por sección de los nervios barorreceptores, también se incluye el síndrome diencefálico, la disautonomía familiar, la polineuritis (porfiria, saturnismo) y la hipertensión intracraneal, diversas causas de origen psicógeno, encefalitis, tumores cerebrales y otras disfunciones del sistema nervioso.
- Otras causas son la HTA por *coartación de la aorta* que da lugar a HTA en la parte superior del cuerpo, o la HTA *inducida en el embarazo* por engrosamiento de las membranas glomerulares, pero también puede darse HTA por causas diversas tales como grandes quemados, abuso del alcohol y otras intoxicaciones.

Del total de enfermos con HTA, casi el 30% sufre complicaciones como la aterosclerosis y más del 50% mostrará lesiones de los órganos relacionados con la hipertensión. En el corazón se producen lesiones tales como cardiomegalia o hipertrofia del ventrículo izquierdo por la sobrecarga de trabajo que sufre el corazón ante el incremento de la PA sistémica, algo que conduce al deterioro de ésta cámara produciéndose una dilatación que acaba desembocando en una insuficiencia cardíaca congestiva, mientras que por otro lado el aumento de las necesidades de oxígeno debido a la hipertrofia miocárdica puede favorecer, junto a otros factores, la aparición de anginas de pecho o infartos de miocardio (Williams, 2003). Los vasos también sufren el impacto de la hipertensión mediante cambios adaptativos (funcionales y estructurales) y cambios patológicos. Al igual que ocurría con el miocardio, debido a la sobrecarga y a la vasoconstricción se produce hipertrofia vascular en todas las capas del vaso, con el único fin de aumentar los límites de autorregulación y mantener constante el flujo sanguíneo a pesar de que se produzcan cambios en la PA, siendo en un principio, y siempre y cuando se mantengan niveles elevados de PA, un efecto beneficioso, ocurriendo los mayores problemas en bajadas bruscas de PA que pueden ocasionar problemas de insuficiencia cerebral. Además, a medida que agrava la enfermedad van apareciendo una serie de efectos degenerativos de la vasculatura, unidos a la aparición de placas de ateroma que acaban produciendo problemas de trombosis, aneurismas, estenosis o incluso disección aórtica que comprometen seriamente la vida del paciente (Botey y Revert, 1996).

Otras lesiones comunes en la HTA son las retinopatías, las disfunciones del sistema nervioso central, los accidentes cerebrovasculares entre los que se encuentran isquemias por embolia o trombosis, y hemorragias cerebrales, o los problemas renales tales como insuficiencia renal o nefrosclerosis. En vista de las consecuencias parece que cualquier tipo de HTA, por leve que sea, si no se trata correctamente, se convierte en una enfermedad progresiva y letal, de hecho la mayor parte de muertes debidas a hipertensión son consecuencia de infartos de miocardio o insuficiencia cardíaca congestiva (Williams, 2003).

Todos los estudios coinciden en que tanto PAS como PAD aumenta de forma progresiva con la edad en ambos sexos. En el paso de edades jóvenes hacia edades más adultas (25-65 años) la incidencia de la HTA aumenta un 5% cada 10 años, tanto en hombre como en mujeres de raza blanca, siendo el doble en personas de raza negra, estabilizándose a partir de los 65 años (probablemente por el aumento de la mortalidad de este grupo de pacientes). Se han observado porcentajes similares para hombre y mujeres, excepto para mujeres adultas a partir de los 50 años en las que la prevalencia es superior, coincidiendo con la aparición de la menopausia (Botey y Revert, 1996; Kaplan, 2005).

### 2.1.2 CLASIFICACIÓN

Desde un punto de vista clínico, la HTA debería definirse como aquellos niveles de PA a partir de los cuales la instauración de un tratamiento produce beneficio y reduce el riesgo, es decir, reduce la morbimortalidad relacionada (Evans y Rose, 1971). La relación inversa entre el riesgo cardiovascular y los niveles de PA hace que tanto la definición como la clasificación de la HTA se realice asignando unos niveles de corte arbitrarios, en función de la evaluación del riesgo, que a su vez simplifica los abordajes diagnósticos y terapéuticos de la práctica diaria (Mancia y cols., 2007). La clasificación más reciente propuesta por el "Grupo de trabajo para el manejo de la HTA" (Sociedad Europea de Hipertensión y Sociedad Europea de Cardiología) en su guía publicada en 2007, se detalla en la Tabla I, y clasifica los niveles de PA en 7 niveles diferentes, 4 de ellos definidos como HTA, según los valores medios de PAS y PAD determinados para un paciente en un mínimo de tres medidas separadas entre ellas por al menos una semana, debiendo cumplir uno de los dos valores o ambos para ser encuadrado en una categoría u otra.

Esta clasificación recoge la clasificación propuesta en la guía de 2003 aunque con varias salvedades, así pues se propone que, cuando las cifras de PAS y PAD de un paciente encajen en diferentes categorías, se aplicará la categoría más alta para cuantificar el riesgo cardiovascular y tomar decisiones sobre el tratamiento; también se propone que la hipertensión sistólica aislada debe graduarse con respecto a los mismos grados que para la hipertensión sistólica-diastólica; y por último, considerar flexible el umbral de HTA basándose en el grado y perfil del riesgo cardiovascular total (Mancia y cols., 2007).

**Tabla I.** Definiciones y clasificación de las cifras de presión arterial (PA) (mmHg).

Categoría	PAS	PAD
Óptima	< 120	< 80
Normal	120-129	80-84
En el límite alto de la normalidad	130-139	85-89
HTA de grado 1 (Leve)	140-159	90-99
HTA de grado 2 (Moderada)	160-179	100-109
HTA de grado 3 (Grave)	≥ 180	≥ 110
Hipertensión sistólica aislada	≥ 140	< 90

*PAS indica presión arterial sistólica, PAD indica presión arterial diastólica, HTA indica Hipertensión arterial. La Hipertensión sistólica aislada debe graduarse (1, 2, 3) con respecto a los valores de PAS, siempre que los valores de PAD sean < 90 mmHg. Tabla extraída y modificada de la "Guía para el manejo de la HTA" (Mancia y cols., 2007).*

Para el correcto diagnóstico y clasificación de un paciente en una categoría determinada de HTA, es importante tener en cuenta ciertas recomendaciones a seguir para la medida de los valores de PA. La PA se caracteriza por variaciones espontáneas importantes durante el día, así como entre días, meses y estaciones (Mancia y cols., 1983; Sega y cols., 1998; Modesti y cols., 2006), por lo que se deben realizar varias determinaciones durante un periodo largo de tiempo, sobre todo cuando la PA tan sólo se encuentre ligeramente elevada, incluso de varios meses, para definir la PA "habitual" del paciente de una forma lo más exacta posible, mientras que en pacientes con valores muy pronunciados, datos de lesión orgánica relacionada o un elevado riesgo cardiovascular los periodos pueden ser más breves (Mancia y cols., 2007). La PA puede ser medida en el consultorio (PA clínica), en el domicilio por el propio paciente (PA domiciliaria), o de forma automática durante 24h (PA ambulatoria), esta última más exacta y mejor correlacionada con lesiones orgánicas y con el riesgo cardiovascular, siempre siguiendo las recomendaciones específicas de la Sociedad

Europea de Hipertensión (O'Brien y cols., 2003). Los umbrales de PA establecidos para definir la HTA serán diferentes según el momento del día o el método de medida usado, de hecho, los valores de PA ambulatoria y domiciliaria suelen ser inferiores a los del consultorio, tal y como se muestra en la Tabla II.

**Tabla II.** Umbrales de PA (mmHg) para definir la HTA con diferentes tipos de determinaciones.

Determinación	PAS	PAD
En el consultorio	140	90
Durante 24h (ambulatoria)	125-130	80
Diurna	130-135	85
Nocturna	120	70
Domiciliaria	130-135	85

*PAS indica presión arterial sistólica, PAD indica presión arterial diastólica. Tabla extraída y modificada de la "Guía para el manejo de la HTA" (Mancia y cols., 2007).*

Es importante tener en cuenta que aproximadamente entre un 15-20% de los pacientes diagnosticados de HTA de grado 1, diagnosticados gracias a los valores tomados en la consulta del médico, tienen valores de PA ambulatoria <135/85 mmHg, denominando a éste fenómeno Hipertensión de bata blanca o Hipertensión clínica aislada, y también debe asociarse a un determinado riesgo cardiovascular, si bien menor que en otros tipos de HTA, pero asociada a una alta prevalencia de lesiones orgánicas asociadas (Mancia y cols., 2006; Kotchen, 2008). Este tipo de HTA suele ser más común en mujeres con HTA de grado 1 (leve), a edades más avanzadas, en no fumadores, en la HTA de inicio reciente y cuando se obtiene un número limitado de determinaciones en consultorio, con valores  $\geq 140/90$  mmHg en al menos 3 ocasiones (O'Brien y cols., 2003). También es posible encontrar el fenómeno inverso con una prevalencia similar, es decir, pacientes cuya PA en el consultorio se encuentra en niveles normales pero que cuando se mide la PA ambulatoria o domiciliaria se encuentra por encima de los umbrales y se denomina HTA ambulatoria aislada o enmascarada. Son pacientes con un riesgo cardiovascular y metabólico asociado, y una prevalencia de lesiones orgánicas mayores (Mancia y cols., 2007).

Con frecuencia existen antecedentes familiares de HTA en los pacientes hipertensos, lo que indica que la herencia contribuye a la patogenia de este trastorno. En los seres humanos se han identificado varias mutaciones en genes que codifican

los principales sistemas de control de la PA, entre ellos el sistema adrenérgico tal y como veremos a continuación, aunque aún no está clara su función exacta en la patogenia de la hipertensión esencial (Mancia y cols., 2007; Kotchen, 2008).

### *2.1.3 RELACIÓN DE LOS ARS Y LAS GRKS CON LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL*

El sistema nervioso autónomo mantiene la homeostasis cardiovascular, mediante el control de la PA, la regulación del volumen, y las señales de los quimiorreceptores. Los reflejos adrenérgicos modulan la presión sanguínea a corto plazo, mientras que la función adrenérgica, conjuntamente con factores hormonales y otros relacionados con el volumen, contribuyen a la regulación a largo plazo de la PA. Las principales catecolaminas del sistema adrenérgico, NA y A, juegan un papel muy importante en la regulación cardiovascular. La NA es sintetizada y almacenada en las neuronas, liberada en las terminaciones sinápticas cercanas a los vasos, mientras que A es sintetizada y liberada al torrente sanguíneo por las glándulas suprarrenales (Kotchen, 2008). Los ARs, por ser los receptores que transmiten las señales de estas catecolaminas, estarán íntimamente relacionados con la regulación del sistema cardiovascular, tal y como hemos visto anteriormente, y en este caso concreto, relacionados con la regulación de la PA, y por lo tanto implicados en mayor o menor medida en la génesis y/o mantenimiento de la HTA, ya que de ellos y de su regulación dependen los mecanismos que llevan al equilibrio entre los procesos de vasoconstricción/vasodilatación.

Como hemos mencionado anteriormente, los ARs- $\alpha_1$  están localizados principalmente en las células del músculo liso vascular y son los responsables de la vasoconstricción, tras ser activados por las catecolaminas. Por otro lado, la activación de los ARs- $\beta_1$  del miocardio estimula el ritmo y la fuerza de la contracción cardíaca, y en consecuencia aumenta el gasto cardíaco o volumen de sangre que el corazón expulsa a la circulación, y además, la activación de este AR también estimula la liberación de renina en el riñón, estimulándose la retención de líquidos, ambos mecanismos encaminados a aumentar la PA. Por último, la activación de los ARs- $\beta_2$  por la adrenalina circulante provoca la relajación del músculo liso vascular y por lo tanto una vasodilatación. También hay que tener en cuenta que, las concentraciones circulantes de catecolaminas pueden afectar al número de receptores adrenérgicos en diversos tejidos. De hecho, tal y como vimos anteriormente, la regulación a la baja de los receptores puede ser una consecuencia de los niveles altos de catecolaminas, mediante la regulación que ejercen las GRKs/ $\beta$ -arrestinas, fenómeno que explica la disminución de la capacidad de respuesta, o taquiflaxia, a las catecolaminas. Por el

contrario, con una reducción crónica de los neurotransmisores, los receptores adrenérgicos pueden aumentar en número, o ser regulados al alza, lo que resulta en una mayor sensibilidad a los neurotransmisores. La administración crónica de agentes que bloquean los receptores adrenérgicos puede dar lugar a la regulación al alza, y la retirada de estos fármacos puede producir una condición temporal de hipersensibilidad a los estímulos simpáticos. Los fármacos que bloquean el sistema nervioso simpático son potentes agentes antihipertensivos, lo que indica que el sistema nervioso simpático juega un papel importante en el mantenimiento de las cifras elevadas de PA, quedando por comprobar si dicho papel es o no parte de la causa de la enfermedad (Kotchen, 2008).

Numerosos estudios en la fisiopatología de la hipertensión han demostrado alteraciones en la función de los ARs debido a alteraciones en la densidad o en las vías de señalización intracelular, en concreto en varios tejidos de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y en particular en el corazón, los vasos sanguíneos y el riñón, tejidos que juegan un papel muy importante en la regulación de la PA (Takata y Kato, 1996). Sobre esta línea de trabajo, muchos autores han sugerido que uno de los factores responsables de la HTA podría ser el aumento de la reactividad vascular que se observa en diferentes modelos de esta enfermedad frente a la estimulación de los ARs- $\alpha_1$  (Takata y Kato, 1996; Villalobos-Molina e Ibarra, 1999; Gisbert y cols., 2002; Miquel y cols., 2005). Hay muchos datos que hablan del posible papel de los ARs- $\alpha_1$  en el desarrollo o el mantenimiento del estado hipertensivo (Guimaraes y Moura, 2001; Tanoue y cols., 2003). Los resultados difieren según los modelos utilizados, el territorio vascular estudiado o los agonistas y las técnicas empleadas en ese momento. Así pues, varios autores han encontrado que la contracción inducida por NA en aorta de ratas SHR es mayor cuando la comparamos con sus respectivos controles (WKY) (Brown y cols., 1994; Chitale y cols., 2001; Gisbert y cols., 2002; Miquel y cols., 2005), mientras que por el contrario, otros investigadores han descrito una disminución en la respuesta contráctil frente a dicha catecolamina (Holck, 1988; Vila y cols., 1993), incluso hay estudios que ponen en evidencia la ausencia de cambios (Xu y cols., 1998). En vasos mesentéricos se ha descrito un aumento en la sensibilidad a la NA en SHR respecto a WKY (Mulvany y Nyborg, 1980; Gisbert y cols., 2002; Miquel y cols., 2005) y en vasos de resistencia de ratas SHR jóvenes también se ha detectado un aumento en la vasoconstricción mediada por los ARs- $\alpha_1$  debida a un aumento de la inervación simpática que da lugar a una mayor liberación de NA, a una hiperactividad en estos vasos y a un aumento en la sensibilidad a los agonistas (Head, 1989; Kong y cols., 1991; Gisbert y cols., 2002; Miquel y cols., 2005). Algunos estudios en humanos hipertensos han detectado un incremento en la vasoconstricción mediada por el AR- $\alpha_1$  (Folkow, 1990; Brodde y Michel, 1992; Li y cols., 2007). Sin

embargo, otros autores indican que la sensibilidad a agentes vasoconstrictores permanece inalterada en arterias mesentéricas de estos pacientes (Falloon y Heagerty, 1994; Hutri-Kähönén y cols., 1999).

Se sabe que existe una proporción relativa de cada uno de los subtipos de ARs- $\alpha_1$  a nivel vascular, por lo que los cambios en la sensibilidad a los agonistas podrían deberse a cambios en este aspecto, de hecho se ha visto que esta proporción está alterada en ratas SHR de 12 meses, en las que la expresión de AR- $\alpha_{1D}$  en aorta se encuentra aumentada, a expensas de una disminución en la proporción de los subtipos  $\alpha_{1A}$  y  $\alpha_{1B}$ , al menos a nivel de ARNm (Xu y cols., 1998). Otros autores también han sugerido la participación de este subtipo en la HTA, en estudios "in vivo" (Villalobos-Molina y cols., 1999; Gisbert y cols., 2002) e "in vitro" (Villalobos-Molina e Ibarra, 1996, 1999; Ibarra y cols., 2000). En los vasos de resistencia de ratas SHR jóvenes (prehipertensas) y adultas (hipertensas) se ha encontrado una alta densidad del AR- $\alpha_{1D}$  (Stassen y cols., 1997; Xu y cols., 1998; Villalobos-Molina y cols., 1999). El hecho de que el AR- $\alpha_{1D}$  posea actividad constitutiva ha servido de hipótesis de trabajo a la hora de estudiar el rol fisiopatológico de este subtipo en la génesis y/o mantenimiento de la HTA, y se ha observado un aumento funcional de este subtipo capaz de provocar un aumento sostenido del tono contráctil ligado a la aparición del estado hipertensivo en ratas adultas, a causa de un incremento en la población de receptores constitutivamente activos (Gisbert y cols., 2002; Miquel y cols., 2005). Otro dato a favor del rol de este subtipo en el desarrollo y/o mantenimiento de la HTA es que los ratones KO para el AR- $\alpha_{1D}$  son menos susceptibles de desarrollar la enfermedad en el modelo de hipertensión por aumento de la ingesta de sal tras nefrectomía parcial (Tanoue y cols., 2002b).

El aumento de las catecolaminas no solo está relacionado con el aumento en el tono contráctil sino también con el remodelado vascular, ya que se ha observado tanto en ratas como en humanos que la continua estimulación de los ARs- $\alpha_1$  favorece el crecimiento y proliferación celular en músculo liso de aorta (Chen y cols., 1995; Hu y cols., 1996; Xin y cols., 1997), y además a nivel del corazón está implicada en la hipertrofia cardiaca (Simpson, 1983; Milano y cols., 1994a). Por otro lado, se ha visto que los ARs- $\alpha_1$  están relacionados en mayor o menor medida no sólo con los cambios propios del desarrollo sino también con los cambios adaptativos que ocurren en la HTA en respuesta al aumento de la PA, como se ha sugerido para el subtipo  $\alpha_{1D}$  en células del músculo liso vascular (Xin y cols., 1997), o para los subtipos  $\alpha_{1A}$  y  $\alpha_{1B}$  en el crecimiento del corazón (O'Connell y cols., 2003) donde al parecer la hipertrofia asociada a la sobrecarga de presión se debería en mayor medida al subtipo  $\alpha_{1B}$  (Woodcock y cols., 2008), mientras que el subtipo  $\alpha_{1A}$  podría tener efectos

beneficiosos o cardioprotectores frente a este fenómeno (Du y cols., 2004). Algo que, si tenemos en cuenta que el subtipo mayoritario en el corazón humano es el  $\alpha_{1A}$  (Price y cols., 1994), explicaría los efectos adversos del tratamiento crónico con antagonistas no selectivos de los ARs- $\alpha_1$  durante la hipertensión, según indicaba el "Ensayo clínico sobre el tratamiento con Antihipertensivos e Hipolipemiantes para la prevención de Infartos" (*Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Attack Trial, ALLHAT*) en el año 2000.

Siguiendo con el corazón, los resultados encontrados también son algo contradictorios. Algunos estudios demuestran en ratas pre-hipertensas un aumento en la densidad para los ARs- $\alpha_1$  (Hanna y Khairallah, 1986; Watanabe y cols., 1991) otros sin embargo dicen que no está alterada (Blumenthal y cols., 1982; Yamada y cols., 1984). Cuando se estudia la rata con su estado hipertensivo desarrollado, también podemos encontrar estudios que hablan de un aumento de densidad (Hanna y Khairallah, 1986; Limas y Limas, 1987; Matsumori y cols., 1989), estudios que no encuentran cambios (Blumenthal y cols., 1982; Hicks y cols., 1983; Mertens y cols., 1991) y estudios que encuentran una disminución (Yamada y cols., 1984; Bohm y cols., 1988; Michel y cols., 1989). Sin embargo en ninguno de los estudios se han apreciado cambios en la afinidad por estos receptores a nivel cardiaco. El efecto inotrópico positivo de estos receptores sobre el corazón es ligeramente mayor en ratas pre-hipertensas (Bohm y cols., 1986) y menor en SHR (Kunos y cols., 1978; Mertens y cols., 1992) comparando con sus respectivos controles.

Durante los inicios de la HTA, en ratas SHR jóvenes de entre 4 y 7 semanas, se ha visto una reducción significativa de la excreción de  $\text{Na}^+$  (Beierwaltes y cols., 1982), algo que se normaliza en animales adultos ya hipertensos (Gesek, 1999), al igual que ocurre en el ser humano (Hall y cols., 1990). Por otro lado a nivel renal, es sabido que el subtipo  $\alpha_{1B}$  media la reabsorción tubular de  $\text{Na}^+$  y agua (Elhawary y Pang, 1994), y también es sabido que en fases iniciales de la hipertensión, este subtipo es sobreexpresado a nivel proteico en células del túbulo distal de ratas jóvenes SHR o pre-hipertensas de 6 semanas, coincidiendo con un aumento de reabsorción inducida por fenilefrina, por lo que se deduce que el AR- $\alpha_{1B}$  estará actuando sobre la reabsorción tubular de una forma más marcada, algo que no ocurre una vez establecido el estado hipertensivo ya que los niveles de este subtipo se normalizan (Gesek, 1999). Basándose en estas observaciones se ha propuesto éste mecanismo como el inicio de la enfermedad, mientras que el mantenimiento dependería más los ARs- $\alpha_2$  (Gesek, 1999). Algunos autores afirman que esa sobreexpresión inicial podría tener un origen genético, ya que el aumento se produce anterior a la enfermedad (Takata y Kato, 1996), y por otra parte varios estudios parecen indicar que el inicio de

la HTA podría estar en el riñón, al menos en modelos animales (Bianchi y cols., 1973; Rettig y cols., 1989; Takata y Kato, 1996), y que las diferencias observadas en la natriuresis en pacientes con hipertensión esencial podría ser la causa y no la consecuencia de la enfermedad (Hall y cols., 1990).

Por lo que respecta a los ARs- $\beta$ , muchos estudios realizados en corazón muestran que no hay cambios de densidad en los receptores en estadios previos o pre-hipertensos (Blumenthal y cols., 1982; Yamada y cols., 1984; Michel y cols., 1987; Castellano y cols., 1993), sin embargo en ratas SHR ya hipertensas encontramos controversia en los resultados ya que unos estudios muestran un descenso en la densidad (Yamada y cols., 1984; Limas y Limas, 1987; Bohm y cols., 1988; Castellano y cols., 1993), otros ven que no cambian (Blumenthal y cols., 1982; Michel y cols., 1987; Ohsuzu y cols., 1992) o incluso hay quién observa un aumento (Maie y cols., 1991). La discrepancia en los resultados probablemente se deba a los diferentes métodos usados en cada estudio. La menor densidad de los AR- $\beta$  encontrada en corazón de rata SHR está asociada con el aumento de la PA, ya que esta bajada no se detecta en ratas jóvenes pre-hipertensas. Casi ninguno de los estudios vieron diferencias de afinidad para los ARs- $\beta$  entre SHR y sus controles WKY. La pérdida de densidad  $\beta$  en corazón ha sido relacionada con una pérdida proporcional para el subtipo  $\beta_1$ , incluso a nivel de ARNm, sin cambios observados para el  $\beta_2$  (Yamada y cols., 1984; De Champlain, 1990; Castellano y cols., 1993). Esta bajada del subtipo  $\beta_1$  estaría relacionada con una regulación a la baja inducida por el continuo estímulo de NA (Head y cols., 1985) y contribuiría a atenuar el efecto inotrópico positivo sobre el corazón (Kunos y cols., 1978; Yamada y cols., 1984; Bohm y cols., 1988), jugando un papel compensador ante la elevada PA.

A nivel vascular, por un lado se ha detectado una disminución en la densidad de los ARs- $\beta$  (Bruschi y cols., 1984; De Champlain, 1990), pero también otros autores han comprobado que no se producen cambios, en aorta de SHR de 16 semanas (Borkowski y cols., 1992), o incluso hay estudios que han observado un aumento en células de músculo liso de ratas jóvenes y en aortas de ratas adultas hipertensas de 18 semanas (Kwan y Lee, 1990; Asano y cols., 1991; Grammas y cols., 1994), encontrándose valores similares para la afinidad por los receptores, sugiriendo estos mismos autores, la posibilidad de que el aumento  $\beta_2$  esté relacionado con el crecimiento o con la hipertrofia vascular de estados más avanzados de HTA, mientras que la regulación a la baja explicaría el deterioro de la vasodilatación  $\beta$ -adrenérgica (Asano y cols., 1991; Borkowski y cols., 1992). En cuanto al subtipo  $\beta_3$  se ha visto en ratas SHR de 12 semanas una regulación al alza, aunque este aumento en la expresión no se asoció con un aumento en la vasorelajación mediada por dicho subtipo (Mallem

y cols., 2004). Lo que sí que está muy aceptado es que la vasorelajación mediada por los ARs- $\beta$ , y más en general las funciones fisiológicas mediadas por estos receptores a otros niveles (Inotropismo y cronotropismo positivo), se encuentran deterioradas en vasos y corazones de ratas hipertensas SHR, especialmente en fases tardías de la enfermedad, probablemente debido a una desensibilización de los mismos (Feldman, 1987). Un estudio reciente en pacientes hipertensos a los que se les ha realizado una derivación coronaria muestra una regulación a la baja para el ARNm del AR- $\beta_2$  en explantes de dichas arterias (Dungan y cols., 2009).

En cuanto al riñón unos han observado un aumento de densidad, pero otros no han visto cambios tanto en ratas pre-hipertensas como en hipertensas (Yamada y cols., 1982; Michel y cols., 1993). El aumento sistémico de NA también está asociado al aumento de la actividad de NA en la microcirculación del riñón, con el fin de favorecer el flujo renal y tratar de hacer frente a daños iniciales, donde la activación de los ARs- $\beta_1$  es responsable de la liberación de renina (Keeton y Campbell, 1980; Osborn y cols., 1981). Otros autores han visto que ante una activación aguda de los ARs- $\beta$ , la respuesta de renina está mucho más aumentada en ratas SHR (Porter, 1992). Además la densidad del subtipo  $\beta_1$  en riñón, se encuentra aumentada en todas las edades (Michel y cols., 1987). También se ha relacionado el aumento de densidad para los ARs- $\beta$  con las disfunciones en los mecanismos de reabsorción tubular de  $\text{Na}^+$  y agua (Arendshorst y Beierwaltes, 1979) y se ha demostrado una correlación con aumentos en la PAS en animales hipertensos, sugiriendo que el aumento del número de ARs- $\beta$  en el riñón acompaña la elevación de la PA (Michel y cols., 1989).

El deterioro de la respuesta  $\beta$ -adrenérgica no se explica necesariamente con una regulación a la baja del receptor en las ratas hipertensas SHR, ya que como acabamos de ver, muchos trabajos han encontrado cambios tanto al alza como a la baja en la densidad de los ARs- $\beta$  en SHR comparando con sus controles WKY. Habrá que tener en cuenta cambios en los mecanismos de transducción de las señales y de regulación de las mismas, y en este aspecto la mayoría de los trabajos han demostrado un descenso importante en la actividad de la enzima AC en las ratas hipertensas, sobre todo a nivel cardiovascular (Takata y Kato, 1996). En humanos también se ha descrito un descenso generalizado de la respuesta  $\beta$ -adrenérgica en la hipertensión (Michel y cols., 1990) relacionado con una regulación a la baja, con una alteración de los niveles de proteína G o con un deterioro de la vía de señalización (Feldman, 1987, 1990, 1995; Fujimoto y cols., 1987; Asano y cols., 1988).

El deterioro de la vasodilatación mediada por los ARs- $\beta$  juega un papel importante en el desarrollo y/o mantenimiento de la HTA y en este deterioro de la respuesta  $\beta$ -adrenérgica juegan un papel clave las GRKs, ya que estas enzimas fosforilan a los receptores activados iniciando el proceso de desensibilización de la señal, tal y como hemos mencionado en anteriores apartados. Las primeras evidencias de la implicación de la GRK2 en el deterioro  $\beta$ -adrenérgico durante la HTA, se obtuvieron en linfocitos de pacientes hipertensos, en los que tanto la actividad como la expresión proteica de esta quinasa se encontraban aumentadas, sugiriendo la posibilidad de que estos cambios reflejen aquello que podría estar pasando en el sistema vascular del paciente hipertenso (Gros y cols., 1997; Feldman y Gros, 1998). No se encontraron diferencias en cuanto a los niveles de ARNm, pero la expresión proteica de la GRK2 se correlacionaba de forma directa con la PA, los aumentos en la proteína están relacionados con los aumentos en la PA, sugiriendo que este aumento en la proteína podría ser un importante factor para el deterioro de la vasodilatación  $\beta$ -adrenérgica característica de la HTA (Gros y cols., 1999). Más tarde estas hipótesis se evaluaron en modelos animales de hipertensión, observándose un aumento en proteína y actividad de la GRK2, tanto en linfocitos como en aortas de ratas hipertensas (Gros y cols., 2000), y en modelos transgénicos donde la sobreexpresión de GRK2 a nivel vascular producía HTA, hipertrofia vascular y cardiaca (Eckhart y cols., 2002), llegando a sugerir la posibilidad de estar ante uno de los mecanismos causantes de la enfermedad (Feldman, 2002; Feldman y Gros, 2006). Recientemente, en un grupo de americanos de raza negra, se han observado niveles de ARNm elevados para la GRK2 en linfocitos circulantes de pacientes con  $PA \geq 130\text{mmHg}$ . En este mismo trabajo también se observa que el aumento de expresión de esta quinasa está acompañado por el aumento en la concentración de NA en sangre. Por lo tanto, de estos resultados se deduce una relación directa entre los niveles de ARNm de GRK2 con las catecolaminas circulantes, y no tanto, una relación directa con la HTA, tal y como afirmaban sus autores (Cohn y cols., 2009). Además en un modelo de hipertensión portal, algo diferente pero que aporta gran información sobre el comportamiento de la quinasa en células endoteliales, se ha relacionado un aumento en la actividad de GRK2 con una inhibición de la actividad de la sintasa endotelial del NO (eNOS), favoreciéndose la hipertensión por deterioro de la relajación mediada por NO (Liu y cols., 2005).

Otra quinasa relacionada con la HTA, aunque con menor evidencia, ha sido la GRK5, para la que se observaron niveles elevados, tanto de ARNm como de proteína, en el modelo de hipertensión inducido por NA y por Angiotensina II (Ishizaka y cols., 1997). Aunque los estudios anteriores no encontraron diferencias ni en la expresión ni en la actividad de esta quinasa, se ha visto en modelos transgénicos que la

sobreexpresión a nivel vascular eleva las cifras de PA, induciendo HTA a través del deterioro  $\beta_2$ , pero sobre todo facilitando el acoplamiento del AR- $\beta_1$  a la vía de la proteína  $G_i$  que provoca vasoconstricción por inhibición de la AC en animales macho, sin observarse hipertrofia de ningún tejido cardiovascular (Keys y cols., 2005). Por último, el rol de la GRK3 a nivel vascular es prácticamente inapreciable y se necesitan más estudios que aclaren su papel en relación con la regulación de receptores mediadores de la vasoconstricción (Harris y cols., 2008).

A nivel del corazón y referente a esta patología, también se relaciona el deterioro de la señal del AR- $\beta_1$  con la hipertrofia cardiaca que se produce como consecuencia de la sobrecarga de presión tras periodos prolongados de HTA en modelos animales (Bohm y cols., 1992; Castellano y cols., 1993), y se ha comprobado que este deterioro está relacionado con un aumento en la actividad y la expresión proteica de GRK2 (Choi y cols., 1997), y esto es debido a una hiper-estimulación simpática crónica de los ARs- $\beta$  cardiacos (Iaccarino y cols., 1999), ya que además, el tratamiento con un  $\beta$ -bloqueante como Atenolol previene el aumento de la GRK2 (Iaccarino y cols., 2001). Se ha sugerido que la regulación al alza de la GRK2 en corazón podría jugar un papel determinante en la transición del corazón hipertrofiado al corazón insuficiente (Anderson y cols., 1999). También se ha visto que la inhibición de la GRK3 a nivel cardiaco origina hipertensión por aumento del gasto cardiaco asociado a un aumento de la actividad del AR- $\alpha_{1B}$ , responsable de la fuerza de contracción del corazón (Vinge y cols., 2008). El estudio de las GRKs en el corazón se ha centrado sobre todo en la Insuficiencia cardiaca tal y como veremos en próximos apartados.

A nivel renal, se ha visto una relación entre la GRK2 y los canales epiteliales intercambiadores de  $Na^+$  de los túbulos distales de la nefrona, de modo que un aumento en la actividad de la quinasa supondría un aumento del intercambio de iones (Dinudom y cols., 2004), reabsorción de  $Na^+$  y líquidos, fenómeno relacionado con la hipertensión (Lifton y cols., 2001). Otra quinasa que está probablemente implicada en la hipertensión, a nivel renal, es la GRK4 a través de la desensibilización de los receptores de dopamina renales, y en consecuencia a través de la disminución de la natriuresis (Felder y cols., 2002).

Hay que tener en cuenta que el *polimorfismo genético* en los ARs y las GRKs puede contribuir a agudizar las diferencias en la respuesta a los agonistas de pacientes hipertensos respecto a los normotensos, y puede estar más o menos relacionado con la enfermedad. En concreto, para los ARs- $\alpha_1$  se ha visto, que el subtipo  $\alpha_{1B}$  tiene dos formas polimórficas, pero estos polimorfismos no están

relacionados con el aumento de la PA en pacientes con HT esencial (Buscher y cols., 1999), además de la variante Arg492Cys para el subtipo  $\alpha_{1A}$  que se asocia probablemente a diferencias étnicas en la reactividad vascular pero no con la hipertensión esencial (Xie y cols., 1999). De los muchos polimorfismos observados para los ARs- $\beta$  tan sólo unos pocos se relacionan con la HTA, mientras que los otros afectan en mayor o menor medida a la respuesta frente al tratamiento (Brodde, 2008; Leineweber y Heusch, 2009). Se han sugerido diferentes mutaciones de los ARs- $\beta$  que están relacionadas con la HTA, al menos tres polimorfismos de los ARs- $\beta_1$  o dos de los ARs- $\beta_2$ , que en unos estudios se han relacionado con la enfermedad pero en otros se han descartado, generando gran controversia en el campo (Brodde, 2008). Algunos ejemplos de polimorfismos relacionados con la HTA son las mutaciones Trp64Arg para el subtipo  $\beta_3$ , asociada normalmente con cifras elevadas de PA (Tonolo y cols., 1999), o la variante Gln27 del AR- $\beta_2$ , con carácter inductor de la regulación a la baja para este receptor (Green y cols., 1994) y asociada a niveles altos de PAD (Binder y cols., 2006), y también el polimorfismo Arg389Gly del  $\beta_1$  asociado con un alto riesgo de hipertrofia cardíaca durante la HTA (Fu y cols., 2008). En cuanto a las GRKs aún no se ha relacionado directamente con la HTA ningún polimorfismo, si bien se han descrito polimorfismos como la variante Leu41 de la GRK5 asociada a un aumento del deterioro de la señal del AR- $\beta_2$  (Wang y cols., 2008).

En definitiva, todo apunta a que el desequilibrio entre los procesos de contracción y relajación vascular responsables del aumento de la PA durante la HTA, podría venir de la mano de un aumento en la funcionalidad de los ARs- $\alpha_1$  acompañado de un deterioro de la vasodilatación  $\beta$ -adrenérgica por una desensibilización excesiva por parte de las GRKs. Queda por aclarar si este mecanismo es derivado o no de cambios genéticos, y en qué modo pueden llegar a ser consecuencia de las cifras elevadas de PA o, como proponen algunos, ante uno de los mecanismos causantes de la enfermedad. En el desarrollo de la presente tesis doctoral trataremos de responder a estas y otras cuestiones.

## 2.2 INSUFICIENCIA CARDIACA

El corazón es el principal órgano del sistema circulatorio, la máquina encargada de bombear la sangre y por lo tanto de proporcionar oxígeno a todo el organismo, liberándolo al mismo tiempo de los productos de desecho (anhídrido carbónico). En concreto, esta función supone recoger la sangre del organismo, pobre en oxígeno, y bombearla hacia los pulmones, donde se oxigena y libera el CO<sub>2</sub>; seguidamente el corazón conduce esta sangre rica en oxígeno hacia todos los tejidos del organismo para satisfacer sus necesidades metabólicas. La correcta oxigenación de los órganos es vital para el individuo y de ahí la importancia del correcto funcionamiento del corazón. Cuando aparece una reducción de la capacidad del corazón para mantener un rendimiento eficaz, nos encontramos ante un problema que compromete seriamente la vida del paciente, éste problema se conoce con el nombre de Insuficiencia Cardíaca (IC).

### 2.2.1 DEFINICIÓN Y ETIOLOGÍA

El término Insuficiencia Cardíaca (IC) significa simplemente una incapacidad del corazón para bombear la suficiente cantidad de sangre como para satisfacer las necesidades del organismo, pudiendo manifestarse por una disminución del gasto cardíaco y/o por un estancamiento de sangre en las venas situadas debajo del hemicardio (Guyton y Hall, 1996). Cuando el gasto cardíaco disminuye en exceso, el corazón no es capaz de satisfacer las necesidades metabólicas del organismo, apareciendo en consecuencia síntomas de fatiga, debilidad y signos de mala perfusión tisular como oliguria, palidez cutánea y confusión entre otros (Betriu, 1996).

Cuando la función de bomba del corazón se halla deprimida su *causa subyacente* suele ser un déficit de la contractilidad del miocardio, el cual puede ser debido a varias situaciones: a una afectación directa del músculo cardíaco, como sucede en las miocardiopatías o debido a una isquemia que inhabilita una determinada zona del corazón; puede ser debida también a una sobrecarga impuesta al corazón, como consecuencia de una lesión valvular o, como vemos en el apartado anterior, consecuencia de la elevada carga de trabajo que sufre el corazón ante una hipertensión arterial; en otras ocasiones, la dificultad consiste en una restricción del llenado ventricular, como ocurre en las pericarditis o en ciertas arritmias rápidas; en todos estos casos y aún con una afectación importante de la capacidad contráctil del corazón, los mecanismos de compensación son, por lo general, capaces de mantener un gasto cardíaco normal, al menos en reposo (Betriu, 1996).

Por lo tanto, en cuanto se produce una bajada drástica del gasto cardiaco debido al deterioro del corazón, se ponen en marcha numerosos mecanismos reflejos encaminados a compensar la función deteriorada. Por un lado, el aumento del volumen residual a consecuencia de la disminución de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI), la contracción venosa, y la retención de líquidos, elevan el volumen telediastólico de este ventrículo (VTDVI), resultando un aumento de la precarga que conduce al restablecimiento del gasto cardiaco, cuyo precio a pagar son varios de los síntomas de la enfermedad como disnea o edema pulmonar entre otros. También es importante el aumento de la masa muscular o hipertrofia ventricular que es otro de los mecanismos que se establecen frente a una sobrecarga de presión mantenida (como ocurría en estadios tardíos en la HTA). Cuando la sobrecarga es por volumen y no por presión, se produce la elongación de las fibras que conduce a la dilatación del corazón (Betriu, 1996).

Sin duda, entre estos mecanismos reflejos de compensación, destaca la estimulación simpática, capaz de estimular al corazón en pocos segundos y de forma muy intensa. Esta estimulación tiene dos consecuencias principales, la primera sobre el corazón que tiende a aumentar la contractilidad y acelerar la FC, fortaleciendo la musculatura dañada, aunque aún funcional, y estimulando la zona de miocardio funcional o no dañada, de modo que, gracias a la estimulación simpática, el corazón se convierte en una poderosa bomba, a menudo más funcional aún. La segunda consecuencia de la estimulación simpática es sobre los vasos, provocando un aumento del retorno venoso al elevar el tono vascular, lo que trae como consecuencia un incremento de la presión de llenado, y un aumento del volumen de sangre que el corazón recibe, por lo tanto un aumento de la presión intraauricular. Además el aumento de sangre que recibe el corazón y el aumento de la presión están favorecidos también por el aumento de la volemia debido a la retención de líquidos estimulada por el sistema renina-angiotensina-aldosterona. Todos estos factores ayudan a que el corazón bombee mayor volumen sanguíneo, y en consecuencia intentan que esa IC inicial quede compensada. Si la lesión es muy grave, ni el sistema simpático ni la retención de líquidos serán capaces de hacer que el corazón bombee la sangre necesaria (Guyton y Hall, 1996).

Cuando el corazón es incapaz de garantizar un gasto cardiaco adecuado en reposo, el aumento de las resistencias periféricas ayuda a la distribución sanguínea preferentemente a los órganos vitales como el cerebro y el propio corazón, y esto también puede tener como consecuencia la aparición de síntomas por falta de irrigación tisular como frialdad, cianosis, fatiga y debilidad (Betriu, 1996). Por otro lado se siguen reteniendo líquidos, debido al deterioro de la función renal por falta de

sangre, se producen cada vez más edemas, y en consecuencia aumento de la presión de llenado, de la presión auricular derecha, hasta que finalmente el corazón se distiende tanto y está tan edematoso que no es capaz de bombear ni siquiera cantidades moderadas de sangre, fracasando por completo y llegando a un estado que lleva finalmente a la muerte del paciente (Guyton y Hall, 1996). Las causas más frecuentes de deterioro funcional son el daño o la pérdida de músculo cardíaco, la isquemia aguda o crónica, el aumento de las resistencias vasculares con HTA o el desarrollo de taquiarritmias como la fibrilación auricular (Dickstein y cols., 2008).

La anomalía cardíaca o causa subyacente de la enfermedad, puede existir durante muchos años sin que existan síntomas clínicos gracias a estos mecanismos compensatorios (cardiopatía compensada o IC compensada), pero desgraciadamente estos mecanismos tienen un límite, esto ocurrirá cuando un determinado proceso agudo sea capaz de provocar una sobrecarga adicional que deteriore la función de un corazón, ya de por sí deteriorado por haber estado sometido a una sobrecarga crónica, llegando al punto en el que los mecanismos de compensación no sean capaces de mantener la función cardíaca compensada, desencadenándose en ese mismo momento la descompensación característica de la IC (Braunwald, 2003).

Al valorar a los pacientes con IC es muy importante identificar la *causa desencadenante* de la enfermedad. Estas causas son trastornos agudos que, en ausencia de una causa subyacente, no suelen provocar *per se* una IC, pero el hecho de detectar la causa desencadenante puede ser crucial y vital para el paciente. Las causas desencadenantes de IC más frecuentes son: Infecciones, ya que la fiebre, la taquicardia, la hipoxemia y el aumento de las necesidades metabólicas de los tejidos infectados pueden sobrecargar el miocardio dañado; Anemia, ya que en este caso las necesidades de oxígeno tisulares sólo podrían satisfacerse aumentando el gasto cardíaco, y un corazón dañado no puede soportar estos aumentos; Tirotoxicosis y Embarazo, ya que en ambos casos también se produce un aumento elevado del gasto cardíaco; Arritmias, una de las causas más frecuentes, ya que se suele reducir el tiempo de llenado ventricular en taquicardias, en algunos casos se disocian los mecanismos de contracción auricular y ventricular deteriorando aún más la función cardíaca, y en el caso de bradicardias disminuye mucho el gasto cardíaco; Miocarditis reumática vírica, otras formas de miocarditis, y también la Endocarditis infecciosa, por las mismas razones que cualquier infección además del deterioro que se añade al ser el propio corazón el órgano infectado; los excesos físicos, dietéticos, líquidos, ambientales y emocionales pueden sobre estimular al corazón de manera excesiva; la hipertensión, porque la elevación de las cifras de PA sobrecarga al corazón, pero también cuando se interrumpe bruscamente el tratamiento antihipertensivo, ya que

puede originarse una descompensación cardiaca; el Infarto de miocardio es capaz de deteriorar aún más la función cardiaca; y por último, la Embolia pulmonar, que puede elevar la PA pulmonar y deteriorar aún más la función ventricular (Braunwald, 2003). Sin lugar a dudas, y sobre todo en países industrializados, la enfermedad coronaria, tanto en hombre como mujeres, es la causa predominante de la IC siendo responsable del 60-75% de los casos de esta enfermedad, mientras que la enfermedad valvular la causa un 10%, al igual que las miocarditis. La HTA es la causa desencadenante del 75% de los casos de IC, que unido a la enfermedad coronaria y a otros factores de riesgo como la diabetes, aumentan considerablemente el riesgo de padecer la enfermedad (Dickstein y cols., 2008; Mann, 2008).

En definitiva, la IC es un síndrome en el que los pacientes presentan determinados síntomas como: falta de aire en reposo o durante el ejercicio, fatiga, cansancio, inflamación de tobillos; signos de retención de líquidos, como congestión pulmonar o hinchazón de tobillos, edema periférico, otros como taquicardia, taquipnea, estertores pulmonares, derrame pleural, elevación de la presión yugular venosa, hepatomegalia; y evidencia objetiva de una alteración cardiaca estructural o funcional en reposo, caracterizada por la presencia de cardiomegalia, tercer sonido, soplos cardiacos, anomalías electrocardiográficas, o concentraciones elevadas de péptidos natriuréticos; síntomas y signos que se usan para su diagnóstico y clasificación, además de para controlar los efectos del tratamiento (Dickstein y cols., 2008).

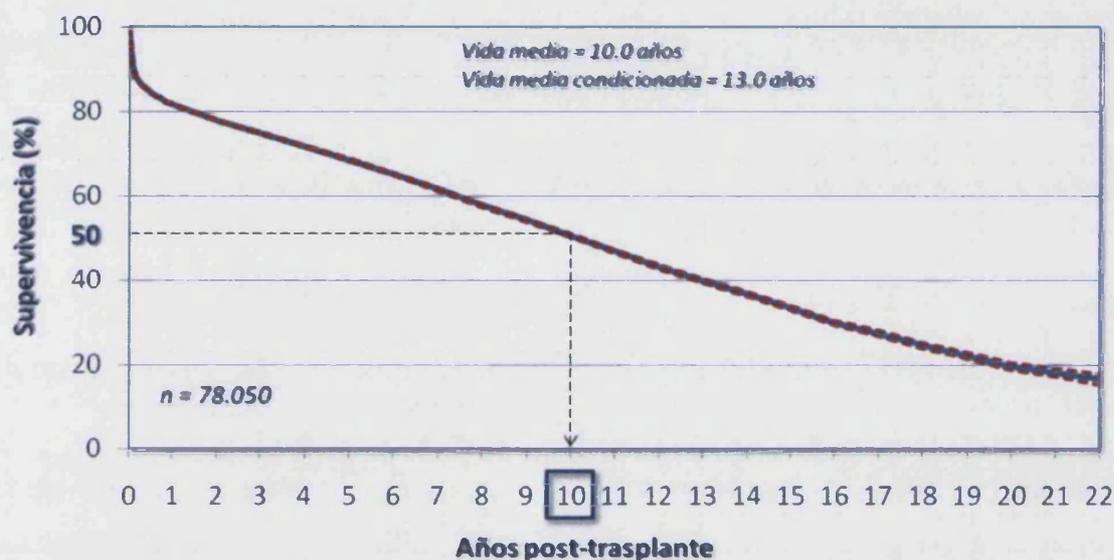
Además, hay que tener en cuenta que la IC es un problema mundial creciente, con más de 20 millones de personas afectadas y una prevalencia global del 2% de la población adulta en países desarrollados, que sigue un patrón exponencial que aumenta con la edad, y afecta entre el 6-10% de las personas mayores de 65 años, aumentando drásticamente para alcanzar valores de hasta el 20% en pacientes de 70-80 años. En los grupos más jóvenes, la prevalencia es mucho mayor en los hombres que en las mujeres, ya que este tipo de enfermedades aparece en edades más tempranas en los hombres, aún así, aunque la incidencia relativa de IC es menor en mujeres que en hombres, las mujeres constituyen al menos la mitad de los casos de IC debido a su mayor esperanza de vida, y en grupos adultos la prevalencia es similar en ambos sexos (Dickstein y cols., 2008; Mann, 2008). Aunque algunos pueden vivir muchos años, lo cierto es que más del 50% de los pacientes que sufren IC fallece a los 5 años de su diagnóstico o reingresa durante el primero (Stewart y cols., 2001).

El tratamiento de la enfermedad pasa por el autocontrol del paciente, es decir, medidas a tomar por el paciente que estarán destinadas a mantener la estabilidad física, evitar comportamientos que empeoren la enfermedad y detectar de forma precoz cualquier síntoma de empeoramiento, medidas que pueden tener un impacto significativo en los síntomas, la capacidad funcional, el bienestar, la morbilidad y el pronóstico (Jaarsma y cols., 2003). Además, y muy importante, el tratamiento farmacológico que estará encaminado de forma general a reducir la morbimortalidad y prolongar la vida del paciente, pero también a reducir al máximo los síntomas excesivamente limitantes, y para esto también será necesario el tratamiento de enfermedades con comorbilidad como HTA y diabetes, entre otras (Dickstein y cols., 2008).

En estadios muy avanzados de la enfermedad o formas muy graves, puede que el tratamiento no sea efectivo, en estos casos podemos encontrar dos opciones, por un lado el cuidado paliativo del enfermo que ayude al paciente a pasar con el menor sufrimiento posible los últimos días de su vida, y por otro lado, cuando el paciente es relativamente joven y sin otras complicaciones serias añadidas, la elección es el trasplante ortotópico (aloinjerto) de corazón de personas donantes fallecidas. Con este criterio se someten a trasplante de corazón pacientes con una enfermedad cardíaca terminal, es decir, pacientes con muy baja probabilidad de supervivencia en 6-12 meses, pero con altas probabilidades de sobrevivir y llevar una vida activa tras el trasplante, y que no sufran otras enfermedades generales graves (enfermedades cerebrovasculares o vasculares periféricas, diabetes, obesidad, cáncer, o infecciones crónicas) (Schroeder, 2003; Hunt, 2008). La supervivencia al cabo de los años tras el trasplante es muy elevada, llegando a alcanzar el 85% en el primer año y el 70% al quinto post-trasplante, siendo el riesgo de morir más elevado durante el primer año y menor conforme avanza el tiempo (Taylor y cols., 2005). El tratamiento inmunosupresor y el control del rechazo es muy importante para el éxito del trasplante, hay que evitar que se produzca una respuesta inmune caracterizada por infiltración perivascular de linfocitos T citotóxicos, que migran al miocardio y producen necrosis celular, o las infecciones propiciadas por la inmunodepresión. Estos corazones trasplantados permanecen inicialmente sin inervación (en algunos pacientes se produce una reinervación parcial de forma tardía), de modo que son el nódulo sinusal y la administración de fármacos cronotrópicos los que controlen la FC. Además el ejercicio moderado, es capaz de liberar catecolaminas al torrente circulatorio que mejoran la función cardíaca gracias a sus efectos inotrópicos y cronotrópicos positivos, aumentando el gasto cardíaco hasta un 70% de lo esperado para la edad del paciente, cifra más que suficiente para una vida normal (Schroeder, 2003; Hunt, 2008). En el último informe realizado por la Sociedad Internacional para

el trasplante de Corazón y Pulmón (*International Society for Heart and Lung Transplantation, ISHLT*), se presenta información sobre cerca de 85.000 trasplantes de corazón llevados a cabo en todo el mundo, que añadiendo aquellos realizados en centros no registrados supondría algo más de 5.000 por año. La edad media de estos pacientes ronda los 50 años de edad, siendo en su mayoría hombres, prácticamente todos aquejados de cardiomiopatía o enfermedad de las arterias coronarias. La vida media de estos pacientes es de más de 10 años, tras haberles realizado el aloinjerto, en prácticamente todos los grupos de edad, reduciéndose a 7-8 años en pacientes que se sometieron a esta intervención en edades más avanzadas (65-70 años), lo que supone un aumento considerable de la expectativa de vida en pacientes que se encontraban inicialmente en una alta probabilidad de fallecer en un periodo no superior al año, incluso se estima que un 20% de estos pacientes permanecerán vivos hasta 20 años después (ver Imagen 10). La principal causa de muerte durante el primer mes es el fallo del injerto (41%), durante el primer año el problema principal son las infecciones (30%), 5 años después la principal causa de muerte de estos pacientes son las enfermedades coronarias junto con el fallo tardío del injerto probablemente debido a la enfermedad coronaria (32%). Sin embargo, aquellos pacientes que sobreviven tras 10 años desde el trasplante tienen complicaciones añadidas, el 97% padecen HTA, algunos de ellos con insuficiencia renal severa (14%), el 93% hiperlipidemias, 39% diabetes y 52% enfermedades coronarias, pero a pesar de todo el trasplante de corazón supone una buena elección en pacientes con una IC en fase terminal, aumentado considerablemente tanto su expectativa como su calidad de vida (Taylor y cols., 2009).

En el contexto español, según los datos del "XIX informe oficial de la Sección de IC, Trasplante Cardíaco y otras alternativas terapéuticas de la Sociedad Española de Cardiología", el número total de trasplantes entre los años 1984-2007 fue de 5.482, a una media de 300 trasplantes anuales en los últimos 10 años. El perfil clínico medio del paciente que se trasplantó fue el de un varón de 52 años de edad, diagnosticado de cardiopatía isquémica no revascularizable o miocardiopatía dilatada idiopática con depresión grave de la función ventricular y situación funcional avanzada, al que se implantó un corazón de 37 años procedente de un donante fallecido por traumatismo craneal o hemorragia cerebral y con un tiempo de espera de 103 días. El tiempo medio de supervivencia ha ido incrementándose con los años de forma similar a la observada en el ámbito internacional (ver Imagen 10). La supervivencia obtenida en España con el trasplante cardíaco, sobre todo en los últimos años, sitúa al trasplante como el mejor tratamiento ante cardiopatías terminales en situación funcional avanzada y sin otras opciones médicas o quirúrgicas establecidas (Almenar-Bonet, 2008).



**Imagen 10.** Curva de supervivencia de Kaplan-Meier para pacientes adultos y pediátricos trasplantados de corazón entre Enero de 1982 y Junio de 2007. Siendo "Vida media" el número de años para que el 50% de los pacientes trasplantados permanezca vivo y "Vida media condicionada" el número de años para que el 50% de los pacientes que han sobrevivido al primer año post-trasplante siga vivo. Gráfica extraída y modificada del 26º Informe de la ISHT sobre trasplante de corazón en adultos (Taylor y cols., 2009).

### 2.2.2 CLASIFICACIÓN

Por lo general, en la descripción de los pacientes con IC se utilizan numerosos términos y expresiones complementarias. Basándonos en el tipo de presentación clínica, podemos distinguir de forma clara tres tipos: la *IC de nueva aparición* (refiriéndose a la primera aparición, al primer episodio agudo o subagudo), la *IC transitoria* (durante un periodo limitado, aunque pueda estar indicado el tratamiento a largo plazo, también denominada recurrente o episódica) y la *IC crónica* (es la IC también conocida como persistente, estable, empeorada o descompensada), en este caso, el empeoramiento de la IC conocido con el término de descompensación es, en el 80% de los casos, la forma más frecuente de IC que requiere hospitalización (Dickstein y cols., 2008). Como hemos visto anteriormente también se refiere a la IC como dos tipos: *IC compensada*, en la que hay una lesión del corazón, pero el gasto cardiaco se mantiene en condiciones normales gracias a los mecanismos compensatorios, o *IC descompensada* cuando ni el sistema simpático ni la retención de

líquidos es capaz de mantener el gasto cardiaco elevado, haciéndose muy evidentes los signos y síntomas de la enfermedad.

También se ha comentado la posibilidad de dividir la IC en *sistólica* y *diastólica*, sin embargo esta división resulta algo arbitraria, ya que se basa en el cálculo de la FEVI y no hay consenso para definir los límites de este parámetro. Sólo en algunos casos la FEVI se encuentra conservada ( $\geq 40$ -50%), pero en la mayoría de pacientes se observa una clara evidencia de disfunción en ambos sentidos, tanto a nivel de la función sistólica como diastólica, en reposo y durante el ejercicio, por lo tanto, la IC diastólica y la sistólica, no deben considerarse entidades separadas (Brutsaert y De Keulenaer, 2006). La IC diastólica se ha descrito también como IC con la fracción de eyección o función sistólica conservada o normal (Dickstein y cols., 2008).

Otros términos utilizados para clasificar la IC más antiguos son los de IC *posterior* o *anterior* relacionados con la perfusión tisular y el aumento de la presión auricular izquierda. El término de *IC derecha*, se utiliza para aquella IC que presenta congestión venosa sistémica y que cursa con edema en los tobillos, o el término de *IC izquierda* si presenta congestión venosa pulmonar cursando con edema pulmonar. Por otro lado se usa el término de *IC de gasto elevado* para referirse a estados que cursan con signos y síntomas similares a la IC sin que la enfermedad cardíaca sea la afección principal (anemias, infecciones sistémicas y otras enfermedades) y son reversibles con el tratamiento, por lo que no debería ser considerada como una IC propiamente dicha, más bien considerada como IC secundaria a trastornos circulatorios de gasto elevado (Dickstein y cols., 2008). La *IC de gasto bajo* o *Shock Cardiogénico* ocurre después de una crisis aguda o después de periodos muy prolongados de deterioro progresivo, se refiere a un estado en el que el corazón es incapaz de bombear ni tan siquiera la cantidad mínima de flujo sanguíneo para mantener el cuerpo con vida, todos los tejidos comienzan a sufrir y a deteriorarse, incluido el propio corazón, llevando muchas veces a la muerte del paciente en cuestión de horas o días (Guyton y Hall, 1996).

Generalmente se utilizan dos clasificaciones para definir la gravedad de la IC (ver Tabla III). Una de ellas, la más empleada, se basa en los síntomas y en la capacidad de realizar ejercicio o de poder soportar una actividad física más o menos normal, esta clasificación funcional es la clasificación que propone la Asociación del Corazón de Nueva York (*New York Heart Association, NYHA*) (*The criteria committee of the NYHA, 1994*), muy útil en la práctica clínica y utilizada de forma rutinaria en la mayoría de los ensayos clínicos de distribución aleatoria. La segunda clasificación describe distintos grados de IC basados en cambios estructurales o daños sufridos en

el músculo cardiaco y sus síntomas asociados. Esta clasificación estructural es la clasificación propuesta de forma conjunta por el Colegio Americano de Cardiología (*American College of Cardiology, ACC*) por un lado y por la Asociación Americana del Corazón (*American Heart Association, AHA*) por otro (Hunt y cols., 2005).

**Tabla III.** Clasificación de la Insuficiencia cardiaca según anomalías estructurales (ACC/AHA) o según sintomatología funcional (NYHA).

Clasificación estructural (ACC/AHA)		Clasificación funcional (NYHA)	
Estadio	Estructura/daño del músculo cardiaco	Clase	Síntomas/actividad física
<b>A</b>	Con alto riesgo de IC. Anomalía estructural o funcional no identificada; sin signos ni síntomas.	<b>I</b>	Sin limitación de la actividad física; el ejercicio normal no causa alteraciones.
<b>B</b>	Enfermedad cardiaca estructural desarrollada claramente en relación con la IC, pero sin signos ni síntomas.	<b>II</b>	Ligera limitación de la actividad física, sin síntomas en reposo; la actividad física normal causa fatiga, palpitaciones o disnea.
<b>C</b>	IC sintomática asociada a enfermedad estructural subyacente.	<b>III</b>	Acusada limitación de la actividad física, sin síntomas en reposo; cualquier actividad física provoca aparición de los síntomas.
<b>D</b>	Enfermedad cardiaca estructural avanzada y síntomas acusados de IC en reposo a pesar del tratamiento médico máximo.	<b>IV</b>	Incapacidad de realizar actividad física; los síntomas están presentes incluso en reposo y aumentan con cualquier actividad física.

IC indica Insuficiencia Cardiaca, ACC indica American College of Cardiology, AHA indica American Heart Association, NYHA indica New York Heart Association. Tabla extraída y modificada de la "Guía de práctica clínica para el diagnóstico y tratamiento de la IC aguda y crónica" (Dickstein y cols., 2008).

La clasificación estructural, de más reciente creación que la funcional de la NYHA, fue creada únicamente con el objetivo de complementar la clasificación existente con datos estructurales, mucho más objetivos que la valoración de los síntomas, y no con el propósito de reemplazar una por otra, siendo de gran utilidad el uso de ambas. Por lo general los pacientes irán avanzando estadios según la clasificación estructural, ya que el daño estructural persiste o empeora de forma progresiva, mientras que la sintomatología puede mejorar con el tratamiento y la capacidad de realizar actividad física puede estar influida por otras enfermedades, variando en ese caso la clase NYHA en la que se encuadra al paciente. Todos los pacientes aquejados de IC declarada se encuentran en los estadios C y D. Los pacientes incluidos en el estadio A son pacientes con elevado riesgo de padecer la enfermedad, recomendándose el tratamiento de las enfermedades asociadas que aumentan el riesgo tales como HTA, aterosclerosis, y obesidad entre otros, al igual que para pacientes con IC compensada o sin sintomatología asociada (estadio B).

Cuando el deterioro es muy avanzado (estadio D) y los síntomas no remiten con el tratamiento, se recomiendan según el paciente, tratamientos paliativos o el trasplante cardiaco (Hunt y cols., 2005). Según los datos del Registro Nacional de Trasplante de Corazón, la mayoría de los pacientes sometidos a esta intervención se encontraban clasificados dentro de la Clase IV de la NYHA (Almenar-Bonet, 2008).

De una forma más sencilla se utiliza el término «IC leve» para los pacientes que pueden realizar una actividad física normal sin limitaciones a causa de la disnea o de la fatiga, «IC grave» para los pacientes muy sintomáticos que requieren frecuente atención médica, e «IC moderada» para el resto de pacientes (Dickstein y cols., 2008).

La identificación de signos y síntomas a tiempo, así como de los factores de riesgo asociados, será fundamental para un diagnóstico precoz, una correcta clasificación del paciente y por lo tanto para la prevención y el tratamiento, que en definitiva será el responsable de mejorar la calidad y aumentar la expectativa de vida del paciente.

### 2.2.3 RELACIÓN DE LOS ARS Y LAS GRKS CON LA INSUFICIENCIA CARDIACA

Tal y como hemos mencionado anteriormente, en la IC compensada, la estimulación simpática, y por lo tanto el sistema adrenérgico, juegan un papel muy importante en la compensación del gasto cardiaco, tanto a nivel del corazón como vascular, con el fin de restablecer la función deteriorada (Guyton y Hall, 1996), pero también juegan un papel importante en el desarrollo y la progresión de la enfermedad, por lo tanto los ARs- $\alpha_1$  y  $-\beta$ , además de las GRKs, estarán implicados en mayor o menor medida.

Los ARs- $\beta$  han sido los más estudiados en esta enfermedad. Se ha demostrado en numerosas ocasiones que el sistema  $\beta$ -adrenérgico juega un papel clave en la regulación de la función cardiaca, tal y como hemos visto en anteriores apartados, y además se sabe que está involucrado en la patogénesis de la Insuficiencia cardiaca (Port y Bristow, 2001; Feldman y cols., 2008), de ahí que el uso de fármacos  $\beta$ -bloqueantes constituya una parte importante en la terapia contra la enfermedad (Satwani y cols., 2004). Por un lado, se sabe que la estimulación de los ARs- $\beta$  cardiacos supone un aumento de la contractilidad del corazón, necesario para compensar la insuficiencia cardiaca pero que no se puede sostener durante un periodo muy prolongado, ya que acaba desembocando en una regulación a la baja, un aumento de la apoptosis y un remodelado cardiaco inadecuado (Lee y cols., 2008).

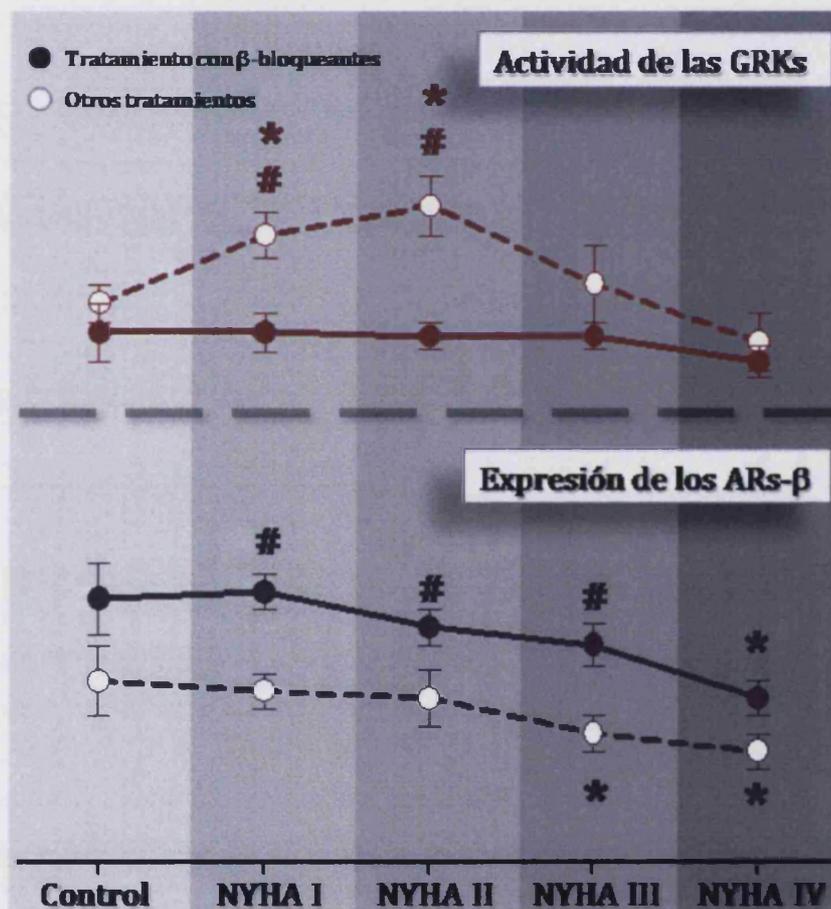
Apoyando estos resultados se ha comprobado cómo, en ratones transgénicos con una sobreexpresión del AR- $\beta_1$ , más sensibles a las catecolaminas, y con una elevada función cardíaca, muchos de estos ratones adultos, con el paso del tiempo, acababan desarrollando IC que venía acompañada de hipertrofia ventricular, deterioro celular y fibrosis, cosa que no ocurría en el grupo control, sugiriéndose propiedades proapoptóticas a largo plazo para este subtipo (Engelhardt y cols., 1999), probablemente porque tras la estimulación continuada de este subtipo  $\beta_1$  se activa la vía de la CaMKII, cuyo predominio cursa con apoptosis y remodelado inadecuado que conduce al desarrollo y progresión de la IC (Zhang y cols., 2003). En cuanto al modelo en el que se sobreexpresaba el AR- $\beta_2$ , también se pudo observar un aumento de la función cardíaca pero sin cambios estructurales del corazón (Milano y cols., 1994b), y además algunos estudios vieron como la sobreexpresión moderada del subtipo servía para restaurar la función y la morfología cardíaca deterioradas (Dorn y cols., 1999), aunque otros estudios observaron que una sobreexpresión excesiva de este subtipo sí que estaba relacionado con una hipertrofia cardíaca y una IC a medida que el animal envejecía concluyendo con la muerte de los ratones por una cardiomiopatía dilatada extrema (Du y cols., 2000; Liggett y cols., 2000; Schwarz y cols., 2003). Por lo que respecta al subtipo  $\beta_3$  cuyo efecto en corazón es contrapuesto al de los otros subtipos (inotropismo negativo), la sobreexpresión mostró una disminución de la función cardíaca y del crecimiento del corazón (Kohout y cols., 2001). Durante la IC la expresión de dicho subtipo se encontró ligeramente incrementada, contribuyendo probablemente al deterioro de la función cardíaca gracias al efecto inotrópico negativo de este receptor (Moniotte y cols., 2001; Morimoto y cols., 2004).

Con el progreso de la IC crónica continua el aumento de la estimulación simpática del corazón y se produce una bajada de densidad de los ARs- $\beta$  acompañado de una desensibilización de la vía (Bristow y cols., 1982). Este aumento crónico de la exposición a los agonistas o catecolaminas endógenas está relacionado con un descenso progresivo en la densidad y el ARNm, concretamente del AR- $\beta_1$  (Engelhardt y cols., 1996), quizás como mecanismo protector para evitar los efectos proapoptóticos de este subtipo (Xiao y cols., 2004), mientras que la densidad del subtipo  $\beta_2$  aumenta según empeoran las condiciones del paciente (Bristow y cols., 1990), quizás como intento de incrementar o mejorar la funcionalidad del corazón, o de proteger favoreciendo el efecto anti-apoptótico (Xiao y cols., 2004). De forma general, ambos subtipos se encuentran desensibilizados, es decir, se encuentran desacoplados de la vía clásica de la proteína  $G_s/AC$ , produciéndose finalmente un deterioro maligno de la función cardíaca. En este caso la vía de la proteína  $G_i$  parece estar aumentada, teniendo como consecuencia por un lado una disminución añadida de la respuesta funcional  $\beta$ -adrenérgica, además de disminuir la respuesta de muchos otros

receptores acoplados a la misma vía de la proteína  $G_s$  (por inhibición de la AC), pero por otro lado parece que este cambio podría estar produciéndose como mecanismo protector del corazón insuficiente, ya que además este aumento de la vía de la proteína  $G_i$ , hace que la estimulación del AR- $\beta_2$ , que a su vez se encuentra sobreexpresado, resulte cardioprotectora debido al efecto anti-apoptótico de dicha vía (Xiao y cols., 2004; Brodde, 2007). Según el estado del paciente se sabe que conforme aumenta la gravedad de la enfermedad se produce un descenso más marcado en la densidad y actividad de los ARs- $\beta$  en el corazón de pacientes con IC, siendo este descenso más marcado en la fase final o más grave de la enfermedad (Engelhardt y cols., 1996; Leineweber y cols., 2005). También se sabe que el tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes, de primera o segunda generación (como metoprolol o bisoprolol, selectivos  $\beta_1$ ), provoca un aumento de densidad, probablemente del AR- $\beta_1$ , para llegar a niveles incluso superiores a los controles, excepto en el estadio final (Clase IV de la NHYA) donde no es capaz de revertir la pérdida masiva de ARs (ver Imagen 11), coincidiendo con un aumento muy marcado de los niveles de NA plasmática (Brodde, 1990; Gilbert y cols., 1996; Leineweber y cols., 2005). Todos estos descubrimientos sugieren la posibilidad de combinar una terapia con bloqueantes selectivos de los ARs- $\beta_1$  (para evitar los efectos pro-apoptóticos debidos de la sobreestimulación de este subtipo), junto con agonistas selectivos  $\beta_2$  (para estimular los efectos cardioprotectores relacionados con la proteína  $G_i$ ), además de poner de relieve la importancia de ambos receptores en la IC (Xiao y cols., 2006).

La implicación de las GRKs en la regulación de la función del corazón en la insuficiencia cardiaca parece clara. Dichas quinasas son las principales responsables de la desensibilización (o desacoplamiento a la vía de la AC) y de la regulación a la baja de los ARs- $\beta$  tras ese largo periodo de activación neuro-hormonal característico de la IC, contribuyendo de forma clara a la reducción de la actividad y la expresión de los mismos, sobre todo del subtipo  $\beta_1$ , y por lo tanto contribuyendo a la reducción del gasto cardiaco, favoreciendo así el desarrollo y la progresión de la enfermedad. De hecho, se sabe que la GRK2, la primera quinasas identificada, y la más estudiada en corazón, y la GRK5, también muy abundante en corazón, juegan un papel clave en la IC, la hipertrofia y el infarto de miocardio (Lohse y cols., 2003; Dorn y cols., 2009). Como hemos mencionado, la estimulación  $\beta$ -adrenérgica supone un aumento en la frecuencia cardiaca y la eyección ventricular, ambos imprescindibles para el aumento del gasto cardiaco necesario para compensar la disminución que se produce durante la insuficiencia, algo que termina por provocar la desensibilización de los receptores mediada por ambas quinasas, GRK2 y GRK5 (Pitcher y cols., 1998). Numerosos estudios han sugerido la importancia de GRK2 en la IC, así pues en esta línea, se ha comprobado un aumento de la actividad GRK durante la IC relacionado con una

regulación al alza tanto a nivel de ARNm como de proteína para la GRK2 en corazón (Bristow y cols., 1990; Unguener y cols., 1993, 1994), y además se ha visto como este aumento precede al desarrollo de la enfermedad, pudiendo representar un marcador temprano de la disfunción cardiaca (Anderson y cols., 1999; Cho y cols., 1999). Se sabe también que el aumento de actividad de esta quinasa se correlaciona con la disminución en la actividad  $\beta$ -adrenérgica en muestras de corazón humano insuficiente (Iaccarino y cols., 2005).



**Imagen 11. Efecto del tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes en la Actividad de las GRKs y la Densidad de los ARs- $\beta$  según la evolución de la Insuficiencia Cardíaca.** La línea continua representa el grupo que recibe tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes y la línea discontinua representa el grupo que recibe otros tratamientos. \*  $P < 0.05$  vs. grupo control; #  $P < 0.05$  vs. grupo con otros tratamientos. Gráficas extraídas y modificadas de Leineweber y cols., 2005.

Se sabe que la infusión crónica de Isoprenalina, agonista  $\beta$ -adrenérgico, induce hipertrofia cardíaca acompañada de una marcada desensibilización de los ARs- $\beta$  y un aumento de ARNm y proteína de la GRK2, mientras que de forma opuesta, la infusión con  $\beta$ -bloqueantes provoca un descenso de los niveles de GRK2 (Iaccarino y cols., 1998b). En modelos de ratones transgénicos que sobreexpresan la GRK2 a nivel del corazón, se ha observado un deterioro marcado del efecto inotrópico de la Isoprenalina (Koch y cols., 1995). Por otro lado se ha visto una mejora de la función cardíaca en estudios en los que esta quinasa se ha inhibido de forma selectiva en corazón, además de favorecer el rescate del corazón insuficiente en modelos genéticos de IC animal (Rockman y cols., 1998b; Freeman y cols., 2001; Harding y cols., 2001). Esta inhibición selectiva incluso previene la IC en ratones con infarto de miocardio (White y cols., 2000). También se ha visto que la delección del gen de la GRK2 antes del infarto de miocardio induce un aumento de la respuesta  $\beta$ -adrenérgica posterior a este infarto y protege contra el remodelado y contra la IC, mejorando la función ventricular y por tanto prolongando la vida de los animales (Raake y cols., 2008). Por otro lado, la inhibición específica de la GRK2 a nivel de la glándula suprarrenal tiene como consecuencia una mejora de la función cardíaca tras el infarto de miocardio por inhibir la secreción de catecolaminas circulantes, reduciéndose así el efecto cardiotóxico que puede tener una hiperestimulación catecolaminérgica cronicada (Lymperopoulos y cols., 2007).

Por último, se ha visto que la actividad de la GRK2 en muestras de corazón insuficiente aumenta conforme avanza la gravedad de la enfermedad en estadios leves o iniciales de la enfermedad (clases I-II de la NHYA), pero baja hasta niveles controles en estadios más graves o avanzados (clases III-IV de la NHYA), además se ha observado también que el tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes a largo plazo hace que disminuya la actividad de GRK2 de forma significativa en aquellos pacientes en los que la actividad estaba elevada, es decir excepto en aquellos que se encontraban en estadios muy avanzados de la enfermedad (ver Imagen 11), contribuyendo al efecto beneficioso de estos fármacos en el tratamiento de la IC (Leineweber y cols., 2005). De forma opuesta, en linfocitos circulantes de pacientes con IC se ha visto que la actividad de esta quinasa aumentaba a medida que el deterioro del corazón era mayor de forma progresiva e incluso en pacientes de clase IV (Iaccarino y cols., 2005), esta discrepancia podría deberse a cambios en el AR- $\beta_2$ , mayoritario en linfocitos, que a su vez es el que mejor se ha visto que refleja los cambios en el organismo (Michel y cols., 1986; Brodde y cols., 1989), pero esto es tan sólo una hipótesis y las razones exactas aún estarían por confirmar (Brodde y cols., 2006). De forma general, todos estos experimentos sugieren que quizás la inhibición selectiva de esta quinasa en un determinado tejido podría considerarse una estrategia terapéutica contra la

enfermedad, sugiriendo además la importancia de la GRK2 en el desarrollo y progreso de la IC.

En cuanto a la GRK5 algunos estudios han encontrado una sobreexpresión en corazones de animales insuficientes, sobre todo en fases terminales cuando los niveles de GRK2 bajan (Ping y cols., 1997; Vinge y cols., 2001), pero su implicación parece ser algo diferente. Esta quinasa juega un papel importante en la activación de la señal independiente de proteína G para el AR- $\beta_1$ , o lo que es lo mismo, facilita la activación de ERK promoviendo un efecto anti-apoptótico y por lo tanto cardioprotector (Noma y cols., 2007). Además, estudios genéticos han sugerido que esta quinasa podría modificar la respuesta frente a la terapia con  $\beta$ -bloqueantes tradicionales en la IC (Dorn y cols., 2009). En animales transgénicos que sobreexpresan esta quinasa se ha visto un deterioro de las respuestas de los ARs- $\beta_1$  y - $\alpha_{1B}$  (Rockman y cols., 1996), pero su papel regulador en condiciones fisiológicas normales e incluso en la IC no está del todo claro. Si hablamos de la GRK3, parece que esta quinasa no se ha encontrado alterada ni en modelos animales ni en modelos humanos de IC (Ungerer y cols., 1994; Brodde y cols., 2006).

Por lo que respecta a los ARs- $\alpha_1$ , minoritarios a nivel de corazón (10% del total), se sabe que ejercen un efecto inotrópico pero que es muy minoritario frente al efecto  $\beta$ -adrenérgico y en cuanto a su relación con la IC ha sido poco estudiada (Brodde y cols., 2006). Por un lado unos autores han descrito un aumento en la densidad de estos ARs (Steinfath y cols., 1992a; Hwang y cols., 1996), pero otros no han encontrado cambios (Böhm y cols., 1988; Bristow y cols., 1988), además no se han observado cambios en el acoplamiento a la vía de la proteína  $G_q$ /PLC (Pönicke y cols., 1998; Bristow, 1993), en cualquier caso estos receptores seguían mediando su ligero efecto inotrópico positivo. Sí que se sabe que, como comentábamos anteriormente, la estimulación  $\alpha_1$  a nivel del corazón produce hipertrofia cardíaca (O'Connell y cols., 2003), al menos en modelos animales, como cambio adaptativo frente al aumento de PA, algo que podría conducir al deterioro del corazón. Al parecer el subtipo  $\alpha_{1B}$  estaría más implicado en el remodelado inadecuado del corazón previo al desarrollo de la IC, mientras que por otro lado se ha comprobado que la estimulación selectiva del subtipo  $\alpha_{1A}$  podría resultar beneficiosa para el corazón por sus efectos cardioprotectores asociados a la vía de la ERK (Huang y cols., 2007; Woodcock y cols., 2008). Faltaría por observar hasta que punto estos resultados se reproducen en el corazón humano, y si un cambio en la distribución de los subtipos estaría o no implicado en la patología. En esta línea de trabajo, recientemente se ha observado que ni el AR- $\alpha_{1A}$  ni el AR- $\alpha_{1B}$  se encuentran regulados a la baja en el corazón insuficiente, a diferencia de lo que ocurre para el AR- $\beta_1$ . Tan solo se observó

una tendencia al alza no significativa para el subtipo  $\alpha_{1A}$  que podría indicar un intento o un inicio de la posible respuesta cardioprotectora descrita para este subtipo (Jensen y cols., 2009b).

Pocos estudios hablan de la relación entre los ARs y las GRKs en el corazón trasplantado. El corazón trasplantado es un corazón que se encuentra inicialmente denervado, algo que conlleva una pérdida de los mecanismos de recaptación neuronal y por lo tanto supone una supersensibilidad a las catecolaminas que se evidencia tras la administración exógena de agonistas  $\beta$ -adrenérgicos (Yusuf y cols., 1987; Gilbert y cols., 1989). Se sabe que la denervación inicial de un corazón trasplantado podría inducir una mayor sensibilización de los ARs- $\beta$ , aunque no está del todo claro, sí que parece que tanto el número como la funcionalidad de los ARs se normaliza, y este hecho podría estar relacionado con la re-inervación (Brodde y cols., 1991; Brodde, 1994). Aunque se ha visto que con el tiempo post-trasplante la densidad global de los ARs- $\beta$  no varía, por lo que respecta a la densidad de los diferentes subtipos parece que se produce una redistribución, caracterizada por una disminución del subtipo  $\beta_1$  acompañada de un incremento del  $\beta_2$  (Brodde y cols., 1991; Steinfath y cols., 1992b; Farrukh y cols., 1993). Esta disminución a largo plazo de la densidad del subtipo  $\beta_1$  en el corazón trasplantado podría deberse al tratamiento crónico con Ciclosporina A al que estos pacientes son sometidos (Brodde y cols., 1995). Por otra parte los cambios en los ARs también se han relacionado con el fallo agudo del injerto, observándose una pérdida de densidad de los ARs- $\beta$  y de la actividad AC en corazones con un rechazo severo (Chester y cols., 1995; Szabó y cols., 2002). Por lo que respecta a los ARs- $\alpha_1$ , únicamente se ha observado que en pacientes trasplantados se produce una reducción en la sensibilidad ante el estímulo con agonistas  $\alpha_1$ -adrenérgicos (Borow y cols., 1989). Nada se sabe hasta el momento sobre las GRKs en el corazón trasplantado, si bien sí que se ha descrito un deterioro en la actividad de la AC (Denniss y cols., 1989; Reithmann y cols., 1996) probablemente debido a la actividad desensibilizadora de estas quinasas.

Numerosos estudios han investigado la posible asociación de *polimorfismos genéticos* de los ARs y las enfermedades cardiovasculares. Se han visto varios polimorfismos para el subtipo  $\beta_1$  pero no se ha comprobado su relación directa con la IC, aunque probablemente, afecten a la respuesta frente al tratamiento o a la progresión de la enfermedad (Brodde, 2008). En relación a esto, se ha visto que la variante Arg389 de este subtipo confiere a los pacientes mayor probabilidad de sobrevivir y mejor respuesta al tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes (Liggett y cols., 2006), y la variante Gly49 confiere mejor resistencia al estrés, mejor función diastólica y una FC menor en pacientes trasplantados (Scharin y cols., 2007). En relación al subtipo  $\beta_2$ ,

la variante Ile164 está relacionada con un peor pronóstico en la evolución de la IC, pero esta variante está muy poco extendida en la población y su papel exacto es cuestionable (Liggett y cols., 1998). En cuanto a las GRKs, de momento no se ha encontrado ningún polimorfismo para la GRK2, sin embargo, se han encontrado 4 variantes para la GRK5, y una de ellas, la variante Leu41, confiere a los pacientes un cierto carácter cardioprotector frente a la excesiva estimulación adrenérgica del corazón durante la Insuficiencia cardiaca (Liggett y cols., 2008).

En resumen, tras la intensa estimulación adrenérgica que sufre el corazón insuficiente, en primera instancia como respuesta del organismo tratando de compensar la bajada del gasto cardiaco propia de la IC, se produce un deterioro del tejido, debido principalmente a los efectos pro-apoptóticos del AR- $\beta_1$  (vía CaMKII), y un deterioro de la función cardiaca debido a la desensibilización y posterior regulación a la baja de este AR. Se observa un aumento en la expresión y actividad de la GRK2 que será responsable de la desensibilización  $\beta$ -adrenérgica, algo que parece ser uno de los mecanismos que conducen al progresivo deterioro del corazón y al avance de la enfermedad.

### 2.3 ADRENOCEPTORES Y GRKS EN LINFOCITOS COMO BIOMARCADORES EN PATOLOGÍA CARDIOVASCULAR

La predicción del riesgo cardiovascular es uno de los principales retos de la medicina moderna. La búsqueda de nuevos biomarcadores se basa en la búsqueda de nuevas proteínas que desempeñen un papel clave en el desarrollo de la enfermedad. Estas proteínas suelen tener una variabilidad baja y debe ser posible analizarlas mediante técnicas estandarizadas. El uso de varios biomarcadores puede proporcionar mayor información sobre el grado de enfermedad del paciente, sobre su pronóstico o sobre la respuesta al tratamiento, además de ser, probablemente, la llave para la prevención de la enfermedad cardiovascular en un futuro no muy lejano (Martín-Ventura y cols., 2009). En esta línea, el uso de los linfocitos para el estudio de proteínas como biomarcadores de la enfermedad cardiovascular, ha sido ampliamente utilizado por ser un tipo de muestra biológica fácil y cómoda de obtener.

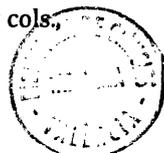
Por otro lado, tal y como hemos mencionado con anterioridad, se sabe de la presencia de los ARs- $\alpha_1$  y - $\beta$ , así como de las GRKs en células del sistema inmune donde han sido protagonistas tanto por regular algunas de las funciones más características de este sistema como por estar implicados en patologías de carácter

autoinmune. Algunos autores han sugerido en relación a los ARs presentes en células del sistema inmune, más concretamente al subtipo mayoritario, que el AR- $\beta_2$  podría ser la posible conexión existente entre dicho sistema y el sistema nervioso simpático (Kin y Sanders, 2006). Pero sobre todo, la presencia de los ARs y las GRKs en células del sistema inmune como los linfocitos, ha abierto la posibilidad de usarlos como biomarcador reflejo de la función cardiovascular en determinadas patologías, entre ellas la HTA y la IC, tal y como explicaremos a continuación.

Desde principios de los años 80, se empezó a utilizar la expresión de los ARs- $\beta$  en linfocitos como marcador o reflejo de lo que podría estar ocurriendo en el corazón o en el sistema vascular. Se observaron cambios en la densidad de estos receptores frente al tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes en pacientes, suponiendo que esos cambios eran un reflejo directo de lo que ocurría en corazón en respuesta al tratamiento con este tipo de antagonistas (Aarons y cols., 1980). Un ejemplo sería el tratamiento crónico con Propranolol, con el que se pudo observar un aumento de densidad de ARs- $\beta$  que ocurría tanto en linfocitos como en corazón y pulmón de animales tratados (Aarons y Molinoff, 1982), algo que parecía ser consistente con la hipótesis de que los cambios en la expresión de los linfocitos circulantes podrían actuar como reflejo de los cambios producidos en otros tejidos del organismo, al menos frente al tratamiento. También se intentó demostrar que los posibles cambios sistémicos que se podían dar en las enfermedades se reflejaban de alguna manera en los linfocitos. En esta línea, se observó un aumento en la densidad y la respuesta del subtipo  $\beta_2$  en linfocitos de pacientes hipertensos, reflejando el aumento de la actividad simpática que puede contribuir al aumento de la PA (Brodde y cols., 1985), aunque se ha comentado la posibilidad de que, debido a discrepancias y a otras evidencias, los cambios observados en estos pacientes puedan ser tan sólo una consecuencia de las cifras elevadas de PA y no un marcador de la enfermedad como se había propuesto, y que además, podría no correlacionarse con la propia actividad de estos receptores (Michel y cols., 1990). Poco después, se vio una relación directa entre la densidad de los ARs- $\beta$  encontrada en linfocitos circulantes y las muestras de tejido miocárdico de la aurícula derecha, obtenidas de pacientes sometidos a una derivación coronaria (Brodde y cols., 1986). En concreto, se observó que el subtipo  $\beta_2$  en linfocitos, el subtipo mayoritario en estas células, reflejaba los cambios observados en el corazón humano (Michel y cols., 1986; Brodde y cols., 1989). Siguiendo en esta línea se observó como en pacientes con IC se producía una disminución de la densidad de los ARs- $\beta$  a medida que progresaba la enfermedad, tanto en corazón como en linfocitos, y además el tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes hacía recuperar esa pérdida en ambas muestras (Sbirrazzuoli y Lapalus, 1989). Por otra parte, en linfocitos de pacientes con HT esencial se observó una disminución de la actividad  $\beta$ -adrenérgica, que podría

estar reflejando el deterioro de esta respuesta a nivel vascular (Feldman, 1987). También se observó, tras estimulación adrenérgica, una disminución de la actividad AC presente en linfocitos procedentes de pacientes en fases avanzadas de la enfermedad, sugiriendo un deterioro de la señal que, además, era restaurada tras el tratamiento crónico del paciente con antagonistas selectivos del AR- $\beta_1$ , tal y como ocurría en muestras de corazón insuficiente (Werner y cols., 2001). Por último se ha encontrado disminuida la expresión de los ARs- $\beta_1$  y  $\beta_2$  en linfocitos de pacientes insuficientes, mientras que no se han encontrado cambios en el AR- $\beta_3$ , muy minoritario en linfocitos, asociados a la IC (Yu y cols., 2007).

Unos años más tarde se comprobó que este deterioro de la actividad  $\beta$ -adrenérgica era debido al aumento en la expresión y la actividad de una de las quinasas que regulan a estos receptores, la GRK2, aumento que se correlacionaba con un aumento en muestras de miocardio, reflejándose en el linfocito lo que ocurría en el corazón de los pacientes insuficientes, y que además era más marcado cuanto peor se encontraba la función cardiaca (FEVI <45%), proponiendo firmemente el uso de esta quinasa como biomarcador de la IC (Iaccarino y cols., 2005). Años antes ya se había sugerido el uso de la GRK2 linfocitaria como biomarcador de enfermedades cardiovasculares, más concretamente en la HTA, donde se observó que el aumento en la expresión y actividad de esta quinasa que se observaba en linfocitos de pacientes hipertensos, se correlacionaba con el deterioro de la señal  $\beta$ -adrenérgica previamente descrito (Gros y cols., 1997), y con los cambios observados en territorios vasculares de diferentes modelos animales de hipertensión (Gros y cols., 2000). En linfocitos de pacientes con sobrecarga del ventrículo izquierdo se han visto incrementos en los niveles de ARNm y proteína para la GRK2, GRK3 y GRK5, acompañados de una disminución de los niveles para el AR- $\beta_2$ , resultados que estaban directamente relacionados con un aumento en la gravedad de la enfermedad (Dzimiri y cols., 2002). Corroborando estos trabajos se observó por un lado que la infusión crónica con agonistas  $\beta$ -adrenérgicos inducía aumentos en los niveles de ARNm de GRK2 y GRK5 (Oyama y cols., 2005), mientras que por otro lado, la bomba de ayuda mecánica ventricular en pacientes insuficientes en fase terminal inducía un aumento de la actividad  $\beta$ -adrenérgica acompañado de una disminución en los niveles de GRK2, mientras que GRK5 permanecía invariable (Hata y cols., 2006). En ambos casos los cambios se observaron tanto en corazón como en linfocitos circulantes. Recientemente se ha observado una asociación directa del incremento en la expresión y actividad de GRK2, pero no de GRK5, con las cifras de PA en linfocitos de pacientes afroamericanos con HTA, relacionado todo con un aumento en la concentración plasmática de NA, y evidenciando así la relación entre el aumento de la actividad simpática a nivel sistémico y la actividad de esta quinasa en el linfocito (Cohn y cols.,



2009). También se han observado cambios en la expresión linfocitaria de estas y otras GRKs relacionados con otras enfermedades del sistema inmune como artritis reumatoide, tanto en modelos humanos como animales (Premont y Gainetdinov, 2007).

Los ARs- $\alpha_1$ , los menos expresados en linfocitos han sido muy poco estudiados como biomarcadores. Si que se ha visto, que los subtipos  $\alpha_{1B}$  y  $\alpha_{1D}$ , al parecer ausentes en el grupo de pacientes control, se encuentran sobreexpresados en leucocitos de pacientes con Artritis reumatoide juvenil (Heijnen y cols., 1996). Otros autores han demostrado la presencia de los tres subtipos a nivel de ARNm y de proteína, siendo el mayoritario el subtipo  $\alpha_{1B}$ , y el minoritario el  $\alpha_{1A}$ , sugiriendo el uso de los tres subtipos expresados en linfocitos como biomarcador de enfermedades cardiovasculares en las que estos receptores juegan un papel clave en el desarrollo y/o mantenimiento de las mismas (Ricci y cols., 1999; Tayebati y cols., 2000). De hecho, los mismos autores un año más tarde comprobaron como los cambios que veían en los ARs- $\alpha_1$  en aortas de ratas adultas SHR, se correspondían con los cambios observados en linfocitos de las mismas ratas, al menos en cuanto a la densidad medida por ensayos con radioligandos, mientras que en sujetos con HTA esencial no se encontraron diferencias significativas en los diferentes grupos de pacientes estudiados con respecto a sus controles (Veglio y cols., 2001).

Todos estos trabajos apoyan las hipótesis que sugiere el uso de los linfocitos circulantes del paciente, como reflejo de lo que podría estar pasando en otros tejidos de difícil acceso, y así poder evaluar, de forma sencilla y prácticamente inocua para el paciente, la evolución clínica de la enfermedad o la respuesta frente al tratamiento. En la presente tesis doctoral utilizaremos el linfocito como herramienta principal de trabajo para evaluar el papel de los ARs y las GRKs en la patología cardiovascular.

# O BJETIVOS



## OBJETIVOS

Una vez demostrada la importante implicación de un modo u otro, de los ARs y las GRKs en las patologías cardiovasculares, nos hemos planteado los siguientes objetivos para la realización de la presente tesis doctoral:

- Analizar si existen diferencias en la expresión y/o funcionalidad de los ARs- $\alpha_1$  y - $\beta$ , y la GRK2, GRK3 y GRK5 en un modelo animal de hipertensión de origen genético (ratas espontáneamente hipertensas; SHR), en órganos implicados en la génesis y/o mantenimiento de la enfermedad, y ver si estos cambios son reflejados o no en linfocitos circulantes.
- Analizar si dichos cambios se reproducen en otros modelos animales de hipertensión, como la hipertensión inducida por inhibición de la producción de Oxido Nítrico (NO) en ratas, mediante tratamiento crónico con L-NAME (LNHR), a fin de elucidar cuál es el grado de implicación que tiene cada AR o cada GRK en el desarrollo de la enfermedad.
- Analizar, con una perspectiva de género, si existen diferencias en la expresión de los ARs y GRKs en linfocitos humanos de pacientes hipertensos, correlacionando dichos cambios con las variables clínicas propias de la enfermedad.
- Analizar si existen cambios en la expresión de ARs y GRKs en linfocitos de pacientes con Insuficiencia cardiaca o pacientes trasplantados de corazón, correlacionando dichos cambios con las variables clínicas propias de ambos grupos de pacientes.



# M MATERIAL Y MÉTODOS



# MATERIAL Y MÉTODOS

Los métodos empleados en la presente tesis comprenden desde el análisis cuantitativo de los niveles de ARNm o expresión génica, análisis de la expresión proteica por inmunodetección, hasta estudios funcionales de actividad de seis subtipos diferentes de ARs:  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ , y tres tipos de quinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRK2, GRK3 y GRK5), tanto en modelos animales como en pacientes con diferentes patologías cardiovasculares.

## 1 MODELOS ANIMALES DE HIPERTENSIÓN

Se han empleado dos modelos diferentes de Hipertensión animal, un modelo de hipertensión genética, como es el caso de las ratas espontáneamente hipertensas (SHR), y un modelo de hipertensión inducida por tratamiento crónico con L-NAME, inhibidor de la producción de óxido nítrico (ratas LNHR).

### 1.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

El cuidado y 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 en la Comunidad Valenciana. Los protocolos realizados han sido aprobados por el Comité Ético de la Universidad de Valencia.

Todas las ratas fueron estabuladas hasta su sacrificio, siguiendo ciclos de luz-oscuridad de 12 horas a una temperatura ambiental de 22°C y 60% de humedad; con alimentación artificial y agua de bebida *ad libitum*.

#### 1.1.1 RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS (SHR)

Las ratas espontáneamente hipertensas (SHR) son un modelo de hipertensión arterial animal ampliamente utilizado desde que en 1963, Okamoto y Aoki, desarrollasen una línea genética de ratas hipertensas partiendo de ratas macho de la cepa Wistar-Kyoto que, de manera espontánea, habían desarrollado hipertensión arterial, y cruzándolas con hembras de la misma cepa que previamente habían seleccionado con cifras elevadas de presión arterial; de modo que generación tras

generación estas ratas desarrollarían la enfermedad de manera espontánea a la edad adulta, siendo un modelo tan útil como extendido para el estudio de la enfermedad.

Para nuestro estudio se han empleado ratas SHR macho suministradas por Harlan Interfauna Ibérica (Barcelona) y de dos grupos de edades diferentes, ratas jóvenes de 6 semanas de edad (peso medio aproximado de 200 g), en un estadio previo en el que aún no han desarrollado hipertensión, y ratas adultas de 16 semanas de edad (peso medio entre 250-325 g) que muestran cifras elevadas de presión arterial con respecto a sus controles, las ratas Wistar-Kyoto (WKY) o Normotensas.

### **1.1.2 RATAS HIPERTENSAS POR TRATAMIENTO CON L-NAME (LNHR)**

El L-NAME (N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina metil éster) es un inhibidor de la sintasa del óxido nítrico (NOS), encargada de la síntesis del NO un importante agente vasodilatador. En éste modelo de hipertensión animal, la enfermedad aparece inducida por la falta de producción de NO, tras el tratamiento con dosis de 80mg/kg-día del inhibidor, administrado en el agua de bebida durante 4 semanas (Ribeiro y cols., 1992; Linardi y cols., 2004). Para la dosificación del L-NAME se tuvo en cuenta el aumento en el peso medio de los animales así como la ingesta de líquido.

Para el desarrollo de este modelo de hipertensión, se partió de ratas Wistar criadas y proporcionadas por el servicio de producción animal de la Universidad de Valencia. Las ratas Wistar tenían 12 semanas de edad y un peso medio aproximado entre 250-300g en la fecha de inicio del tratamiento, de modo que una vez transcurridas las 4 semanas de tratamiento habrían alcanzado la edad adulta de 16 semanas y, por lo tanto, edad similar al modelo SHR.

## **1.2 MEDIDA DE CONSTANTES HEMODINÁMICAS EN LA COLA DEL ANIMAL CONSCIENTE**

En ambos modelos animales, la presión arterial sistólica (PAS) y la frecuencia cardiaca (FC), fueron determinadas semanalmente para habituar al animal, y el día anterior al sacrificio de los animales, se tomó el valor definitivo utilizando el método no-invasivo de medida pletismográfica en cola de la rata consciente, debidamente inmovilizada y mantenida durante el tiempo de medida a 37°C para facilitar el registro, usando para tal efecto un pletismómetro modelo NIPREM 645 de Cibertec (Barcelona). Para cada animal se tuvo en cuenta la media de 10-15 medidas de ambas constantes: PAS (mmHg) y FC (latidos/min).

## 1.3 SACRIFICIO Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS

### 1.3.1 SACRIFICIO

El sacrificio de los animales se realizó por decapitación y posterior exanguinación, previa anestesia, usando el anestésico inhalatorio volátil Isoflurano, 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).

### 1.3.2 EXTRACCIÓN DE SANGRE Y AISLAMIENTO DE LINFOCITOS CIRCULANTES

Cuando fue necesaria la extracción de muestra sanguínea, ésta se realizó por punción intracardiaca con el animal anestesiado, sobreviniendo la muerte del animal por hipovolemia tras extraer el volumen necesario de trabajo (10 ml de sangre).

Las muestras de sangre fueron recogidas en tubos especialmente diseñados, conteniendo una concentración final del anticoagulante EDTA al 0,2%, con el fin de mantener la muestra en condiciones óptimas para posterior aislamiento de los linfocitos circulantes.

Partiendo de muestras de 10 ml de sangre de rata, se procedió a la separación de células sanguíneas por gradiente de densidad usando el reactivo de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) para aislamiento de linfocitos circulantes, basado en el método publicado por Boyum en 1964, y mejorado por Thorsby y Bratlie en 1970, para la obtención rápida y purificada de linfocitos libres de endotoxinas. La sangre recogida fue diluida al 50% en suero fisiológico estéril previamente atemperado a temperatura ambiente, homogenizando suavemente para evitar la lisis celular. En otro tubo se añadió un volumen de Ficoll similar al volumen de sangre extraído, sobre éste volumen se añadió la sangre diluida poco a poco para evitar el mezclado de las fases. Seguidamente se realizó una centrifugación a T<sup>a</sup> entre 18-20°C, a 1.800rpm durante 35 minutos, sin freno y sin aceleración, en una centrífuga Eppendorf 5804R (Rotor A-4-44). En ésta etapa se produce una separación de fases quedando en la fase superior el plasma sanguíneo, un anillo intermedio donde se situarán los linfocitos y plaquetas, seguido de una fase donde quedarán restos del reactivo Ficoll-paque y un pellet conteniendo granulocitos y eritrocitos. Se eliminó el plasma con pipetas Pasteur y se recogió en un tubo aparte el anillo blanco donde se encuentran los linfocitos con cuidado de no recoger restos de otras fases. El volumen obtenido se diluyó en suero fisiológico estéril a una dilución 1/3 y se sometió a centrifugación a 1.500rpm durante 15 minutos a T<sup>a</sup> entre 18-20°C, para eliminar restos de Ficoll que pudieran

quedar. Se eliminó el sobrenadante y el pellet obtenido, conteniendo los linfocitos, fue inmediatamente congelado en nitrógeno líquido, y almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior uso para extracción de ARN.

### 1.3.3 EXTRACCIÓN DE TEJIDOS

Una vez sacrificado el animal, todos los tejidos objeto de estudio fueron aislados y extraídos del animal, rápida y cuidadosamente, tal y como se detalla a continuación:

- a) *Aorta torácica*: se realizó una toracotomía y se separaron los pulmones y el corazón visualizándose el segmento de la arteria, la cual se extrajo disecándola cuidadosamente desde el cayado aórtico hasta el diafragma. El trozo extraído se depositó en una placa Petri conteniendo solución nutritiva de Krebs o suero fisiológico estéril y se liberó del tejido adiposo, cuidadosamente y con la mayor rapidez posible para evitar degradación del ARN y/o de las proteínas, dejando así la pared arterial desnuda. Cuando fue necesario, el tejido se introdujo en líquido nutritivo de Krebs para su uso en estudios funcionales.
- b) *Ventrículo izquierdo*: una vez realizada la toracotomía y localizado el corazón, se extrajo con ayuda de unas pinzas y tijeras, seccionando la arteria pulmonar y aorta, y las venas pulmonar y cava, y en suero fisiológico estéril, se limpió inmediatamente de cualquier resto de sangre. El corazón fue secado y pesado para su posterior análisis. Seguidamente se separaron las aurículas derecha e izquierda y localizada la cámara correspondiente al ventrículo izquierdo, que fue cuidadosamente separado del ventrículo derecho y de la pared interventricular.
- c) *Riñón*: se realizó una laparotomía y una vez abierto el abdomen del animal, el paquete intestinal se desplazó hacia un lateral, dejando visible el riñón izquierdo, que se encuentra protegido por la grasa peritoneal y unido a la aorta mediante la arteria renal. Se realizó una nefrectomía radical unilateral seccionando arteria y vena para extraer el riñón que se disecó y se limpió de cualquier resto de tejido adiposo.

Los tejidos que se destinaron para los experimentos de extracción de ARN y/o proteínas, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesado.

## 2 SELECCIÓN DE PACIENTES

La selección de los pacientes a incluir en el estudio fue realizada por el Dr. Eduardo Rovira de la Unidad de Hipertensión del Servicio de Medicina Interna del Hospital de La Ribera (Alzira, Valencia) y por el Dr. Luis Almenar de la Unidad de Insuficiencia Cardíaca y Trasplante del Servicio de Cardiología del Hospital Universitario "La Fe" (Valencia). Los protocolos utilizados han sido aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica de la Universidad de Valencia así como por los correspondientes comités del Hospital "La Ribera" (Alzira, Valencia) y del Hospital Universitario "La Fe" (Valencia), obteniendo en cada caso el consentimiento informado del paciente.

### 2.1 POBLACIÓN DEL ESTUDIO Y CRITERIOS DE INCLUSIÓN

La población total del estudio consistió en 72 sujetos de diferentes sexos (46 hombres y 26 mujeres) de rango de edad comprendido entre los 16 y los 68 años en el momento del estudio. Fueron agrupados según su patología cardiovascular, siendo la distribución de los grupos la siguiente: 10 voluntarios sanos (grupo **Control**); 6 pacientes con hipertensión clínica aislada (**HCA**), 15 pacientes con hipertensión (**HT**), 10 pacientes hipertensos tratados (**HT-Tr**), 14 pacientes con insuficiencia cardíaca en fase terminal (**IC**), y 17 pacientes sometidos a trasplante cardíaco (**TC**).

A todos los sujetos se les determinaron variables antropométricas, hemodinámicas y perfiles bioquímicos en suero. Los voluntarios sanos o grupo control fueron sujetos normotensos, sin ningún tipo de enfermedad cardiovascular diagnosticada y con un perfil bioquímico dentro de la normalidad.

Del bloque de pacientes con HTA, tanto los pacientes con hipertensión como los pacientes con hipertensión clínica aislada no habían tomado previamente ninguna terapia antihipertensiva. Los pacientes hipertensos tratados, recibían tratamiento con Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina (**IECA**) o Antagonistas de los Receptores para Angiotensina-II (**ARAI**) como mínimo desde el mes previo a la toma de muestras. A todos estos pacientes, incluidos los voluntarios sanos (grupo control), se les midió la presión arterial en consulta y se realizó una monitorización ambulatoria de la presión arterial (**MAPA**) durante 24 horas, con un monitor oscilométrico (Spacelabs 90202 o 90207), diferenciando periodos de día y noche. Se clasificaron como pacientes con hipertensión clínica aislada aquellos cuya presión

arterial en consulta fue elevada y su MAPA fue normal, mientras que los pacientes diagnosticados con hipertensión fueron aquellos cuya presión arterial en consulta y su MAPA fue elevada. Fueron excluidos del estudio los pacientes con enfermedades cardiovasculares y/o renales. Todos los procedimientos se realizaron siguiendo las recomendaciones de la *British Hypertension Society* (Williams y cols., 2004).

En el grupo de pacientes insuficientes se incluyeron pacientes en situación funcional avanzada con deterioro grave de la contractilidad miocárdica, Clase IV en la escala NYHA de evaluación de la Insuficiencia cardiaca (*The criteria committee of the NYHA, 1994*), recibiendo terapia para tratamiento de la enfermedad (diuréticos,  $\beta$ -bloqueantes, IECAs o fármacos inótrópos dependiendo de su estado hemodinámico). Se han excluido pacientes con enfermedades concomitantes graves que contraindiquen la realización del trasplante cardíaco. En cuanto a los pacientes trasplantados se incluyeron pacientes en un rango de 14 a 471 días tras el trasplante que recibieron tratamiento inmunosupresor en diferente grado según el tiempo transcurrido desde el trasplante, y poseían un corazón funcionalmente normal según los datos clínicos evaluados en su momento; se excluyeron los pacientes inestables desde el punto de vista clínico, depresión en la función ventricular valorada mediante ecocardiografía, o biopsia con algún grado de rechazo en la muestra anatomopatológica. En ambos grupos se obtuvieron datos clínicos procedentes del estudio ecocardiográfico (grosor de paredes, diámetros ventriculares y función biventricular) con menos de 24 horas de diferencia con respecto a la toma de muestras, y un registro hemodinámico (presiones del ventrículo y aurícula derecha) que se realizó en ese mismo momento previo a la toma de muestra.

## 2.2 OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS (LINFOCITOS)

Las muestras de sangre necesarias para la analítica y el aislamiento de linfocitos circulantes, fueron obtenidas la mañana posterior a la monitorización en el caso de los pacientes de los grupos del bloque de pacientes con HTA (grupo control, HCA, HT y HT-Tr), momentos antes del trasplante para los pacientes insuficientes (grupo IC), y en un rango de días diferentes tras el trasplante coincidiendo con la evaluación del injerto para los pacientes trasplantados (grupo TC). Para el aislamiento de linfocitos se utilizaron 10 ml de sangre previamente recogidos en un tubo estandarizado de recogida, conteniendo EDTA como anticoagulante.

Las muestras de sangre de los pacientes pertenecientes a los grupos con diferentes grados de Hipertensión, se procesaron en los laboratorios del Área de diagnóstico biológico del Hospital de La Ribera. Los linfocitos fueron aislados usando el reactivo Lymphoprep™, reactivo estéril y libre de endotoxinas diseñado para el aislamiento puro de linfocitos por gradiente de densidad, basado en métodos anteriores (Boyum, 1964; Thorsby y Bratlie, 1970), y siguiendo las condiciones indicadas por el fabricante (Axis-Shield). Las muestras pertenecientes a los pacientes de los grupos de IC y TC fueron procesadas en la Unidad de Insuficiencia Cardíaca y Trasplante del Hospital Universitario "La Fe" (Valencia) usando el reactivo Ficoll-paque Plus (GE Healthcare). En ambos casos se emplearon condiciones similares a las descritas en el apartado 1.3.2 de esta sección.

Los pellets de linfocitos fueron inmediatamente congelados, almacenados y transportados a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta nuestro laboratorio, conservándolas a esta misma  $T^{\text{a}}$  hasta el momento de ser procesados.

### 3 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

El análisis cuantitativo de la expresión génica de los seis diferentes subtipos de ARs estudiados así como de las tres GRKs que los regulan se realizó mediante RT-PCR a tiempo real, tal y como se describe a continuación.

#### 3.1 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL

El protocolo de extracción de ARN total basado en el método publicado por Chomczynski y Sacchi en 1987, variará ligeramente según el tipo de muestra. Las muestras de tejidos de rata (Aorta torácica, Ventrículo Izquierdo, y Riñón) precisan de un triturado previo que se detalla a continuación. En cualquier caso y en todo momento, los experimentos se realizaron en condiciones apropiadas libres de RNasas.

Durante el triturado de los tejidos, las muestras se mantuvieron congeladas con nitrógeno líquido para evitar su degradación. Se enfrió el mortero previamente con nitrógeno líquido para mantener siempre temperaturas de congelación. A continuación, se introdujeron una a una las muestras en el mortero y se procedió a su triturado total, convirtiendo los tejidos en un homogenizado pulverulento. La muestra se añadió a un tubo conteniendo 1 ml de reactivo de aislamiento *Tripure Isolation Reagent* (Roche Applied Science), tampón de lisis a 4°C (mezcla monofásica de fenol y tiocianato de guanidina). Sobre el pellet de linfocitos congelado, se añadió el mismo volumen de reactivo. La mezcla se homogenizó siguiendo 3 ciclos de 15 segundos de agitación a temperatura ambiente en vortex y se procedió al aislamiento del ARN total.

Con el fin de eliminar restos de tejido y/o restos celulares no lisados, a partir del homogenizado de las muestras con el reactivo de lisis descrito en el apartado anterior, se realizó una primera centrifugación a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C, quedándonos con el sobrenadante que deberá permanecer a Tª ambiente durante 5 minutos. Pasado ese tiempo se añadió a la muestra un volumen de 200 µl de Cloroformo por cada ml de reactivo *Tripure*, mezclando la muestra intensamente durante 15 segundos en vortex y dejando 10 minutos a Tª ambiente para que las fases se separen, en este punto el ARN se disolverá en la fase acuosa y quedará en la parte superior. Para facilitar la separación y precipitación del ADN genómico, se realizó una segunda centrifugación a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C. Se recogió la fase

superior acuosa que contenía el ARN total y se añadió un volumen de 500 µl de Isopropanol, se mezcló suavemente, éste reactivo facilita la precipitación de los ácidos nucleicos que se producirá dejando la mezcla en reposo durante 10 minutos a T<sup>a</sup> ambiente, transcurrido el tiempo, se realizó una tercera centrifugación a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C, obteniendo un pellet de ARN total. Descartamos el sobrenadante y lavamos el pellet con 1 ml de Etanol diluido al 70% en agua tratada con DEPC (dietil pirocarbonato), para recoger el pellet lavado, realizamos una última centrifugación a 8.000 g durante 5 minutos a 4°C. Finalmente, se descartó el sobrenadante, quedándonos con el pellet que se sometió a secado bajo la luz de un flexo el tiempo necesario. Para terminar, el pellet es resuspendido y disuelto en el volumen mínimo necesario de agua tratada con DEPC e inmediatamente cuantificado y almacenado a -80°C hasta su uso posterior.

### 3.2 CUANTIFICACIÓN Y ANÁLISIS CUALITATIVO DE LA INTEGRIDAD DEL ARN OBTENIDO

Una vez disuelto el pellet de ARN total, y antes de congelarlo, procedemos a su cuantificación. Para ello, preparamos 500 µl a una dilución 1/250, que mediremos en un espectrofotómetro *Biophotometer*® de Eppendorf, que mide la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 260 nm y 280 nm. Sabiendo que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 40 µg de ARN, y aplicando el factor de dilución, calculamos la concentración µM de la muestra. Además el valor de la razón 260/280 nos da un valor aproximado de la pureza de la muestra que debe estar entre 1,6-2.

Con el fin de analizar la integridad del ARN extraído, se someten las muestras a una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0,9% teñido con Bromuro de Etidio (0,5 µg/ml). Se cargó en el pocillo 1 µg de ARN en tampón de carga 6X (Fermentas Life Sciences), conteniendo 10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,03% de azul de bromofenol, 0,03% xileno cianol, 60% glicerol, 60 mM EDTA. La electroforesis se llevó a cabo durante 30 minutos a 100V en tampón TAE (40 mM de Tris-Acetato y 1 mM de EDTA). Transcurrido ese periodo, el gel fue observado y evaluado mediante un transiluminador que al emitir a una longitud de onda de 260 nm, el ARN es capaz de absorber dicha emisión y transferirla al bromuro de etidio, siendo este capaz de emitir en la región visible a 590 nm y por tanto haciendo visible al ojo humano las bandas pertenecientes al ARN.

Debido al avance de las tecnologías, posteriormente la cuantificación y el análisis se mejoró utilizando el sistema automático *Experion™* (Bio-Rad) basado en la tecnología *Lab-on-a-Chip* de separación, detección y análisis mediante electroforesis microfluídica, que además de permitir usar menor cantidad de ARN, unificando cuantificación y análisis de la calidad, nos proporcionó mayor precisión y sensibilidad. Así pues, el análisis de la calidad y la cuantificación de gran parte de las muestras usadas, se realizó usando el kit de sensibilidad estándar para análisis de ARN total (Bio-Rad). Los chips fueron cargados siguiendo las condiciones del fabricante, tal y como se detalla a continuación. El gel fue filtrado a 1.500 g durante 10 min, transcurrido ese periodo, se preparó el gel teñido con el fluorocromo específico de ARN proporcionado en el kit, éste gel teñido se hizo pasar por los micro-canales del chip gracias a un sistema de llenado por aire comprimido. Seguidamente, 1 µl de cada muestra de ARN total se desnaturalizó a 70°C durante 2 minutos y pasado ese tiempo, se cargó en cada uno de los pocillos conteniendo tampón de carga. Las muestras se separaron a través del gel microfluídico gracias a la aplicación de un determinado voltaje en cada pocillo, y mediante excitación por laser del colorante fluorescente se visualizaron las bandas de ARN. El chip se analizó gracias al soporte *Experion™ System V2.1* (Bio-Rad). El programa informático nos dio los valores de concentración (ng/ml) por muestra, así como el valor de cociente de área entre los picos de ARN ribosomales (razón 28S/18S) representativo de la calidad de la muestra (valores próximos a 2), visualizando el resultado gracias a un electroferograma y un gel virtual.

### 3.3 TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT)

Para la reacción de Transcripción Reversa o Retrotranscripción (RT) de los ARN de las muestras de tejido y linfocitos de ratas WKY/SHR, se emplearon 2 µg de ARN que junto con el cebador oligo(dT<sub>16</sub>) (250 ng) fueron precalentados en agua-DEPC a 70°C y luego enfriados en hielo. La reacción de transcripción reversa para la síntesis de ADNc contiene 50mM Tris-HCl (pH 8,3), 75mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT (Ditiotreitol), 40 U del inhibidor de ribonucleasas RNAsin® (Promega Corp., Madison USA), 2mM 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 RNase H minus) (Promega Corp. Madison, USA), con un volumen final de 25 µl. La reacción transcurrió a 42°C durante 60 minutos. Para las muestras de linfocitos Humanos procedentes de pacientes de los grupos con HTA, se usó la enzima M-MLV RT (Promega Corp. Madison, USA).

En el transcurso de la elaboración de los experimentos de la presente tesis doctoral, se introdujeron variaciones con el único fin de mejorar el rendimiento y la fiabilidad de los experimentos. Así pues, la reacción de transcripción reversa para la síntesis de ADNc de las muestras procedentes de ratas tratadas con L-NAME y sus respectivos controles (Ratas Wistar), así como las muestras de linfocitos procedentes de pacientes de los grupos de IC y TC, se realizaron utilizando una enzima de alta sensibilidad que permitía partir de cantidades inferiores de ARN total (0,1-1 µg). Así pues tras incubar el ARN total con el cebador oligo(dT<sub>16</sub>) (250 ng) en agua-DEPC a 70°C y luego enfriados en hielo, se llevó a cabo la reacción de transcripción reversa conteniendo tampón de reacción ImProm-II™, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM de cada deoxinucleósido trifosfato, 20 U del inhibidor de ribonucleasas recombinante RNAsin® (Promega Corp. Madison, USA), y 1 µl de Transcriptasa reversa ImProm-II™ (Promega Corp. Madison, USA) con un volumen final de 20 µl. Se realizó un primer ciclo de hibridación a 25°C durante 5 min, y seguidamente, la reacción de extensión transcurrió a 42°C durante 60 minutos. Transcurrido este periodo, la enzima fue inactivada incubando a 70°C durante 15 min.

En todos los casos, una vez finalizadas las reacciones, el ADNc sintetizado se almacenó a -20°C hasta su posterior uso.

### 3.4 PCR A TIEMPO REAL

La cuantificación de la expresión génica, se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real, actualmente el método más sensible y preciso para la detección de niveles de ARNm, permitiendo la cuantificación de estos niveles a través del empleo de compuestos con propiedades fluorescentes, en nuestro caso, sondas Taqman®.

Así pues, los ARNm codificantes para cada uno de los diferentes subtipos de AR- $\alpha_1$  ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ), AR- $\beta$  ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ), quinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRK2, GRK3 y GRK5) y para *GAPDH* como control interno, se cuantificaron mediante Taqman® RT-PCR a tiempo real usando un termociclador *GeneAmp 5700 sequence-detection system* para las muestras procedentes de ratas WKY/SHR y humanos (grupos Control, HCA, HT y HT-Tr), y un termociclador *GeneAmp 7500 Fast system* para las muestras procedentes de ratas tratadas con L-NAME y sus respectivos controles, además de para las otras muestras procedentes de humanos (grupos Control, IC y TC). Diluciones 1/10 de la reacción de la transcripción reversa previa, se

analizaron por duplicado mediante ensayos Taqman® de expresión génica (*Taqman® Gene Expression Assays*, Applied Biosystems), consistentes en una mezcla 20X de cebadores y sonda Taqman® MGB (*minor groove binder*; ligando de unión al surco menor del ADN) marcada con el fluorocromo 6-FAM™ en el extremo 5' de la sonda y un *quencher* (o apantallador) no fluorescente en el extremo 3', diseñados para la detección y cuantificación de secuencias génicas específicas por RT-PCR a tiempo real de dos pasos. Las referencias y datos de interés correspondientes a los diez ensayos Taqman® de expresión génica utilizados se muestran en la tabla IV.

**Tabla IV.** Ensayos Taqman® de expresión génica utilizados.

Ensayos para muestras de rata			
Nombre del Gen (Símbolo)	Secuencia de ref. (NCBI)	Id. Ensayo	Longitud del amplicon
GAPDH (Gapdh)	NM_017008.3	Rn99999916_s1	87 pb
$\alpha_{1A}$ -AR (Adra1a)	NM_017191.2	Rn00567876_m1	67 pb
$\alpha_{1B}$ -AR (Adra1b)	NM_016991.2	Rn01471343_m1	125 pb
$\alpha_{1D}$ -AR (Adra1d)	NM_024483.1	Rn00577931_m1	51 pb
$\beta_1$ -AR (Adrb1)	NM_012701.1	Rn00824536_s1	65 pb
$\beta_2$ -AR (Adrb2)	NM_012492.2	Rn00560650_s1	61 pb
$\beta_3$ -AR (Adrb3)	NM_013108.1	Rn00565393_m1	58 pb
GRK2 (Adrbk1)	NM_012776.1	Rn00562822_m1	82 pb
GRK3 (Adrbk2)	NM_012897.2	Rn00563688_m1	128 pb
GRK5 (Grk5)	NM_030829.1	Rn00578086_m1	83 pb
Ensayos para muestras humanas			
Nombre del Gen (Símbolo)	Secuencia de ref. (NCBI)	Id. Ensayo	Longitud del amplicon
GAPDH (GAPDH)	NM_002046.3	Hs99999905_m1	122 pb
$\alpha_{1A}$ -AR (ADRA1A) Isof.3	NM_033302.2	Hs00169124_m1	112 pb
Isof.2	NM_033303.3		
Isof.4	NM_033304.2		
Isof.1	NM_000680.2		
$\alpha_{1B}$ -AR (ADRA1B)	NM_000679.3	Hs00171263_m1	61 pb
$\alpha_{1D}$ -AR (ADRA1D)	NM_000678.3	Hs00169865_m1	68 pb
$\beta_1$ -AR (ADRB1)	NM_000684.2	Hs00265096_s1	79 pb
$\beta_2$ -AR (ADRB2)	NM_000024.4	Hs00240532_s1	65 pb
$\beta_3$ -AR (ADRB3)	NM_000025.1	Hs00609046_m1	65 pb
GRK2 (ADRBK1)	NM_001619.3	Hs00176395_m1	65 pb
GRK3 (ADRBK2)	NM_005160.3	Hs00178266_m1	93 pb
GRK5 (GRK5)	NM_005308.2	Hs00178389_m1	85 pb

Datos proporcionados por Applied Biosystems (USA).

Los ensayos Taqman® de expresión génica están optimizados para alcanzar gran sensibilidad y especificidad en condiciones universales de termociclado, garantizando su reproducibilidad. Las sondas, siempre que fue posible, se diseñaron para hibridar en la unión exon-exon y así mejorar la especificidad de hibridación y

evitar la contaminación por ADN genómico (Taqman® Gene Expresión Assays protocol, Applied Biosystems, US). Las reacciones se ajustaron a un volumen de 25  $\mu$ l con *Taqman® Universal Master Mix (AmpliTaq Gold® DNA Polymerase; Applied Biosystems, US)*, incluyendo 5  $\mu$ l de la dilución de la reacción de transcripción reversa y 1,2  $\mu$ l de la mezcla 20X de sonda (250 nM) y cebadores (900 nM) (*Taqman® Gene Expresión Assays*). 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.

### 3.5 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Los valores del ciclo umbral ("*threshold cycle*", Ct) obtenidos para cada gen en cada reacción se calcularon mediante el programa informático *GeneAmp 5700 sequence-detection-system* o utilizando el programa *7500 Fast sequence-detection-system* (Applied Biosystems, US), según el termociclador usado. Los valores Ct fueron normalizados usando como gen de referencia el *GAPDH*, siendo  $\Delta$ Ct la diferencia entre Ct del gen estudiado y el de referencia (*GAPDH*). El valor  $\Delta$ Ct se transformó matemáticamente mediante la expresión  $2^{-\Delta$ Ct}, directamente proporcional al número inicial de copias de cada gen (Livak y Schmittgen, 2001). Una atención especial requieren los resultados obtenidos para las ratas SHR de 16 semanas de edad en las que los niveles de ARNm para *GAPDH* se encuentran significativamente elevados con respecto a su control. En éste caso particular, los niveles de expresión se transformaron también mediante la expresión  $2^{-\Delta$ Ct}, normalizando con respecto a la media de los valores de Ct obtenidos para cada gen en el grupo de animales control (WKY), posibilidad planteada en la literatura (Livak y Schmittgen, 2001).

En el caso de las muestras humanas, los resultados se procesaron de dos formas diferentes. Para la comparativa de expresión entre diferentes patologías, los valores de  $\Delta$ Ct obtenidos para cada paciente fueron normalizados con la media del valor de  $\Delta$ Ct obtenido para el grupo de voluntarios sanos, expresados según el modelo matemático de cuantificación relativa que usa la expresión  $2^{-\Delta\Delta$ Ct} (Pfaffl, 2001), mientras que para el análisis de regresión lineal se emplearon los resultados normalizados tan sólo con el gen de referencia utilizando la expresión  $2^{-\Delta$ Ct, tal y como se explicaba anteriormente (Livak y Schmittgen, 2001).

## 4 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA

El análisis de la expresión proteica de los seis diferentes subtipos de ARs estudiados así como de la GRK2, se realizó mediante Western Blot y posterior análisis densitométrico, tal y como se describe a continuación.

### 4.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Las muestras de Aorta torácica de rata, congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , fueron trituradas siguiendo el protocolo que se detalla en el apartado 3.1 de esta sección. La porción de tejido pulverizado empleado se añadió a un tubo conteniendo tampón de lisis (50mM HEPES (Acido 2-[4-(2-hidroxiethyl)piperazin-1-il] etanosulfónico) pH=7,5, 150mM NaCl, 10% Glicerol, 1,5mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,1% SDS (Docecil Sulfato de Sodio), 100mM NaF, 1% Triton X-100, 1% Deoxicolato sódico) acompañado de una mezcla comercial de inhibidores de proteasas (Complete®, Roche Applied Science) y homogenizado con un sonicador (Microson™ ultrasonic cell disruptor) en 3 ciclos de 3 pulsos manteniendo la muestra en hielo en todo momento. El homogenizado fue centrifugado a 16.100 g (velocidad máxima) durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante obtenido, que fue alicuotado y guardado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , contiene las proteínas solubles totales.

### 4.2 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO PROTEICO

La concentración de proteínas se determinó mediante el método Bradford (1976), utilizando como patrón la albúmina de suero bovino (Sigma). Para éste protocolo se diluyeron los extractos de proteínas totales, con el reactivo colorimétrico de Bradford (Colorante Azul Brillante de Coomassie G-250) (Bio-Rad), reactivo que reacciona con las proteínas dando coloración. Tras la mezcla se procedió a la lectura del color emitido a una longitud de onda de 595 nm para cada una de las muestras por duplicado, usando para tal efecto un lector de placas Multiskan EX (Lab Systems Inc.). Extrapolando los valores de absorbancia en la recta patrón obtenida, obtuvimos los valores de concentración de proteínas en la muestra.

### 4.3 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON DOCECIL SULFATO DE SODIO (SDS-PAGE) Y WESTERN BLOT

Tanto la SDS-PAGE como el Western Blot se realizaron siguiendo métodos estándar. Los geles de poliacrilamida se prepararon usando una solución mixta de acrilamida/bis-acrilamida al 40% (Bio-Rad). El gel de separación de proteínas se preparó en todos los casos a una concentración del 10% de acrilamida, en tampón Tris-HCl 375 mM a pH 8.8, y 0,1% de SDS; mientras que el gel de concentración de proteínas se preparó a una concentración del 3% de acrilamida, en tampón Tris-HCl 125 mM a pH 6.8, y 0,1% de SDS. Para catalizar la reacción de polimerización se usó persulfato de amonio (Bio-Rad), y N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (Bio-Rad).

Cantidades similares de proteínas (50 µg para GRK2 y 150 µg para el resto) contenidas en el extracto de proteínas totales, fueron desnaturalizadas siguiendo las condiciones del método publicado por Laemmli en 1970, desnaturalización a 95°C durante 5 min en tampón de muestra conteniendo 60 mM de Tris-HCl a pH 6.8, 10% de glicerol v/v, 2% SDS, 5% β-mercaptoetanol v/v y 0,01% de azul de bromofenol. De forma paralela, y para determinar el peso molecular de los péptidos detectados, se cargo en el gel el marcador de pesos moleculares *Precision Plus Protein Standard-Kaleidoscope* (Bio-Rad).

La electroforesis se realizó en tampón de electroforesis Tris-Glicina-SDS (25 mM de Tris a pH 8.3, 192 mM de glicina, y 0,1% de SDS) a un voltaje constante de 115 V durante 2 h. Transcurrido ese tiempo, las proteínas separadas, se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinildieno (PVDF) durante 2 h a 4°C a un amperaje constante de 375 mA (transferencia líquida) en tampón de transferencia Tris-Glicina-Metanol (25 mM de Tris a pH 8.3, 192 mM de glicina, y 20% de Metanol). En ambos casos, se usó un *Mini-Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell system* (Bio-Rad).

Las membranas se bloquearon con leche desnatada en polvo al 6 % en tampón fosfato salino (Roche) con 0,1% Tween20 (Bio-Rad) (PBS-T-Leche) durante 1 h a temperatura ambiente y en continua agitación. Se lavaron con PBS-T y se incubaron a 4°C durante toda la noche con los anticuerpos policlonales de cabra diluidos en PBS-T-Leche frente a cada uno de los ARs y GRKs estudiadas. Las diluciones y los anticuerpos primarios empleados se detallan en la tabla V. Se realizaron tres lavados con PBS-T de 15 min en agitación y se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa apropiados en cada caso (ver tabla V), en solución PBS-T-Leche durante 50 min a temperatura ambiente. Para evitar restos de anticuerpo no unido, las membranas se lavaron intensamente con PBS-T antes de su revelado.

Como control de carga se utilizaron los anticuerpos policlonales de conejo frente a Actina.

**Tabla V.** Anticuerpos utilizados en los estudios de expresión proteica.

Proteína	Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario
Actina	Ac.policlonal de conejo (A 2066; Sigma)	1:2000	Anti-rabbit IgG (GE Healthcare);1:3000
$\alpha_{1A}$ -AR	Ac.policlonal de cabra (sc-1477; Sta. Cruz)	1:100	Anti-goat IgG (Jackson IR); 1:2500
$\alpha_{1B}$ -AR	Ac.policlonal de cabra (sc-1476; Sta. Cruz)	1:100	Anti-goat IgG (Jackson IR); 1:2500
$\alpha_{1D}$ -AR	Ac.policlonal de cabra (sc-1475; Sta. Cruz)	1:250	Anti-goat IgG (Jackson IR); 1:2500
$\beta_1$ -AR	Ac.policlonal de conejo (sc-568; Sta. Cruz)	1:100	Anti-rabbit IgG (GE Healthcare);1:2500
$\beta_2$ -AR	Ac.policlonal de conejo (sc-9042;Sta.Cruz)	1:500	Anti-rabbit IgG (GE Healthcare);1:2500
$\beta_3$ -AR	Ac.policlonal de cabra (sc-1472; Sta.Cruz)	1:250	Anti-goat IgG (Jackson IR); 1:2500
GRK2	Ac.policlonal de conejo (sc-562; Sta. Cruz)	1:250	Anti-rabbit IgG (GE Healthcare);1:2500

Datos obtenidos de las compañías Santa Cruz Biotechnology, Sigma-Aldrich, General Electric Healthcare o Jackson Immuno Research, según la procedencia del anticuerpo.

Con el fin de seleccionar la banda específica, se utilizaron péptidos de bloqueo frente a cada anticuerpo primario, todos ellos proporcionados por Santa Cruz Biotechnology. Se pre-incubó cada anticuerpo con su péptido de bloqueo correspondiente en exceso (proporción 1:4) en un volumen final de 500  $\mu$ l de PBS, durante 2 horas a T<sup>a</sup> ambiente y en constante agitación. Pasado ese periodo, se hicieron las diluciones correspondientes en PBS-T-Leche y se continuó el protocolo de incubación de las membranas tal y como se detalla en el párrafo anterior. En estas condiciones, los anticuerpos primarios no serán capaces de unirse a la proteína en la membrana, impidiéndose de esta manera la visualización de la banda específica. Las bandas fueron detectadas mediante incubación con reactivo ECL<sup>®</sup> Western blotting (Amersham GE Healthcare, UK).

#### 4.4 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Las imágenes de quimioluminiscencia fueron capturadas inmediatamente mediante un *Autochemi<sup>TM</sup> Bioimaging System* usando el soporte informático de captura *Labworks 4.6* (Ultra-Violet Products Ltd. Cambridge, UK), gracias al cual también se realizó el análisis densitométrico mediante densitometría óptica de las bandas correspondientes a cada una de las proteínas estudiadas, normalizando con respecto a la densidad óptica obtenida para el control de carga Actina, y expresando los resultados como unidades arbitrarias de proteína inmunodetectable.

## 5 ESTUDIO FUNCIONAL DE CONTRACTILIDAD

Con el fin de determinar posibles cambios en la actividad de los adrenoceptores estudiados, se diseñaron estudios funcionales de contractilidad y relajación vascular en aorta torácica de ratas SHR y ratas hipertensas por tratamiento con L-NAME, comparando con sus respectivos controles y siguiendo los protocolos que se detallan a continuación.

### 5.1 PREPARACIÓN DEL TEJIDO Y MONTAJE

Las aortas de rata se obtuvieron tras toracotomía y disección aórtica (tal y como se indica en el apartado 1.3.3 de esta sección). Manteniendo la aorta en solución salina de Krebs, esta se dividió en 4-5 anillos de aproximadamente 5 mm para su posterior montaje en baño de órganos. Previamente, cuando fue requerido se eliminó el endotelio del vaso mediante el uso de una cánula de calibre apropiado. Cada uno de los anillos se introdujo en un baño de órganos conteniendo 10 ml de solución fisiológica de Krebs (118 mM de NaCl, 4,75 mM de KCl, 1,8 mM de CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1,2 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM de NaHCO<sub>3</sub> y 11 mM de Glucosa). El baño se mantuvo en todo momento a 37°C de temperatura y con aporte constante de carbógeno (mezcla del 95% de O<sub>2</sub>/5% de CO<sub>2</sub>). Atravesando el lumen de cada anillo, se introdujeron finos alambres de acero inoxidable mediante los cuales la preparación se fijó, por un lado al baño y por otro, se conectó a un transductor isométrico de fuerza-desplazamiento tipo Grass FT03, acoplado a un sistema de adquisición de datos (PowerLab/8SP; ADInstruments), y registrando los cambios de tensión isométrica gracias al soporte informático Chart v5.0.2 (ADInstruments).

Antes de comenzar el protocolo experimental, las preparaciones se sometieron a una tensión basal de 1 g durante 60-90 minutos, cambiando el líquido nutritivo cada 20-30 min y ajustando la tensión de las preparaciones hasta obtener una línea basal estable. Transcurrido ese tiempo, la vitalidad de todas las preparaciones fue comprobada adicionando al baño una solución nutritiva despolarizante obtenida de la sustitución equimolecular de NaCl por KCl a una concentración de 80 mM.

## 5.2 DESCRIPCIÓN DEL PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Los protocolos experimentales se realizaron siguiendo las bases publicadas anteriormente por nuestro grupo de investigación (Gisbert y cols., 2003b).

### 5.2.1 DETERMINACIÓN FUNCIONAL DE LA PRESENCIA DE ENDOTELIO

Después del periodo de estabilización, se indujo una contracción sostenida en respuesta a una concentración de  $10^{-6}$  M de Fenilefrina (FE) (Sigma), agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico no-selectivo, en todas las preparaciones, y tras 10 minutos se añadió una concentración de  $10^{-4}$  M de Acetilcolina (ACh) (Sigma). Las preparaciones se consideraron con endotelio intacto cuando la relajación de ACh alcanzó entre un 60-90% (Furchgott, 1984). Se consideraron anillos sin endotelio aquellos en los que la relajación de ACh fue menor del 20%. Seguidamente los procedimientos explicados a continuación, se realizaron después de lavar y una vez alcanzado el tono basal.

### 5.2.2 CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA DE CONTRACCIÓN POR UN AGONISTA SELECTIVO DE LOS ARS- $\alpha_1$ : FENILEFRINA

Con el fin de determinar la potencia de FE ( $pCE_{50}$ ), en cada modelo estudiado, así como la respuesta máxima que ésta es capaz de inducir ( $E_{max}$ ), se realizaron curvas concentración-respuesta (CCR), añadiendo concentraciones acumulativas crecientes del agonista ( $10^{-9}$  a  $10^{-5}$  M) cada 5 minutos y hasta alcanzar el máximo de respuesta contráctil, tal y como se muestra en la Imagen 12A.

### 5.2.3 CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA DE INHIBICIÓN DE LA CONTRACCIÓN POR ANTAGONISTAS SELECTIVOS DE LOS ARS- $\alpha_1$

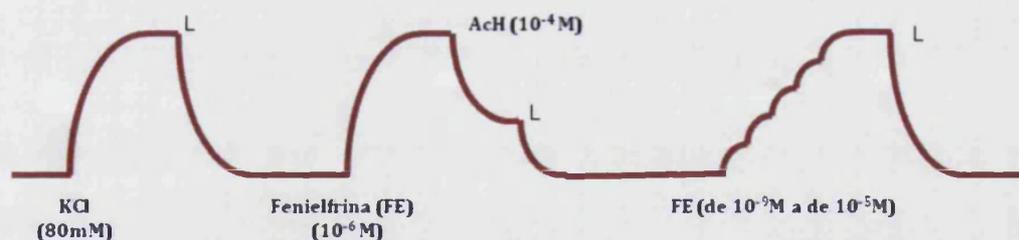
Las curvas concentración-respuesta de inhibición de la contracción, se realizaron sobre una meseta de contracción inducida tras adicionar al baño una concentración  $10^{-6}$  M de FE. Sobre ésta meseta de contracción, se adicionaron concentraciones acumulativas ( $10^{-10}$  a  $10^{-4}$  M en ambos casos) de diferentes antagonistas selectivos  $\alpha_1$  cada 10 minutos hasta alcanzar, en algunos casos, el 100 % de inhibición de la respuesta. Los antagonistas empleados para este protocolo fueron, el 5-Metilurapidil (5-MU; 6-((3-(4-(2-Methoxyphenyl)-1-piperazinyl)propyl)amino)-1,3,5-trimethyl-2,4(1H,3H)-pyrimidinedione) (antagonista selectivo  $\alpha_{1A}$ ) y el BMY 7378 (8-(2-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil]-etil)-8-azaspiro [4,5]decane-7,9-dione dihidrocloruro) (antagonista selectivo  $\alpha_{1D}$ ). La finalidad de estos experimentos fue calcular la potencia de los diferentes antagonistas dependiendo del estado hipertenso

o normotenso del animal, para tratar de comprender el grado de implicación de cada subtipo, en la génesis o mantenimiento de la enfermedad. El protocolo se detalla en la Imagen 12B.

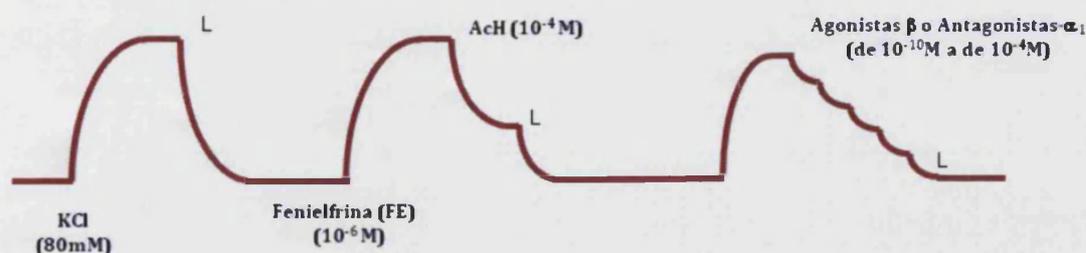
#### 5.2.4 CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA DE RELAJACIÓN POR AGONISTAS SELECTIVOS DE LOS ARS- $\beta$

Las curvas concentración-respuesta de relajación, se realizaron sobre una meseta de contracción inducida tras adicionar al baño una concentración  $10^{-6}$  M de FE. Sobre ésta meseta de contracción, se adicionaron concentraciones acumulativas ( $10^{-10}$  a  $10^{-4}$  M en ambos casos) de diferentes agonistas selectivos  $\beta$  cada 10 minutos hasta alcanzar, en algunos casos, el 100 % de relajación. Los agonistas empleados para este protocolo fueron, la Isoprenalina (agonista selectivo  $\beta_1/\beta_2$ ) y el SR 58611A (Etil{(7S)-7-[(2R)-2-(3-clorofenil)-2-hidroxiethylamino]-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-iloxi} acetato hidrociorado; agonista selectivo  $\beta_3$ ) o el Salbutamol (agonista selectivo  $\beta_2$ ). El protocolo se detalla en la Imagen 12B.

##### A) Protocolo de realización de CCR de contracción



##### B) Protocolo de realización de CCR de relajación



**Imagen 12. Protocolos de realización de Curvas-Concentración Respuesta (CCR).** Protocolo empleado para las CCR de contracción por FE (A) y de relajación por agonistas  $\beta$ -adrenérgicos (Isoprenalina, SR58611A, y Salbutamol) o antagonistas de los ARs- $\alpha_1$  (5-metilurapidil y BMY 7378) (B). "L" indica el momento en el que se realiza el lavado o recambio de solución de Krebs.

### **5.2.5 ANÁLISIS DE LA CINÉTICA DE RECUPERACIÓN DEL TONO BASAL.**

Para el análisis de las cinéticas de relajación después de eliminar el agonista del baño (recuperación del tono basal), se realizó un total de 3 lavados repetidos en los primeros 30 segundos y dos lavados más cada 5 minutos. Finalizado el experimento se midió el tiempo necesario para recuperar el tono basal desde los primeros lavados hasta alcanzar un tono estable.

## **5.3 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS**

Para expresar los resultados obtenidos con las curvas concentración-respuesta de contracción y de relajación de los compuestos empleados, se porcentuaron las respuestas producidas tras añadir las diferentes concentraciones con respecto a la respuesta máxima de cada compuesto, a la que se le atribuyó en cada caso el valor de 100%. Una vez obtenidos los porcentajes de respuesta, se calculan mediante regresión no-lineal (Graph Pad Software; San Diego, California, U.S.A), los parámetros característicos:  $E_{max}$ ,  $pCE_{50}$  (-Logaritmo de la concentración de agonista capaz de producir el 50 % del efecto máximo),  $pCI_{50}$  (-Logaritmo de la concentración de antagonista capaz de inhibir el 50 % del efecto máximo). En el caso de que el ajuste de la curva sea significativo para dos sitios de unión se obtienen  $pEC_{50}(1)$  y  $pEC_{50}(2)$ , una para cada sitio de unión de alta y baja potencia respectivamente. También se calcula el porcentaje de receptores que hay en cada sitio de afinidad.

## 6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Los resultados se representan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (e.e.m.) para las  $n$  determinaciones obtenidas de diferentes muestras. El análisis estadístico incluye un análisis de varianza (ANOVA) para la comparación de medias múltiples (test de *Dunnett*) y el test *t de Student* para muestras independientes (Graph Pad Software). Las diferencias fueron consideradas significativas cuando  $P < 0,05$ .

Para determinar si existen correlaciones entre variables analizadas, utilizamos el análisis de regresión lineal y se evaluó el coeficiente de correlación de *Pearson* (Graph Pad Software) que nos informa acerca de la existencia o no de relación lineal (si  $P < 0,05$ ), de la intensidad de la correlación (según el valor absoluto del coeficiente de *Pearson* entre 0 y 1) y de su sentido (relación inversa entre variables, si el signo es negativo, o directa, si es positivo).



# R RESULTADOS



## RESULTADOS

Los resultados de la presente tesis tratan de responder dos puntos claves: 1) si en dos enfermedades cardiovasculares, la HTA y la IC, se producen cambios en la expresión génica de los ARs- $\alpha_1$  y  $-\beta$ , y las GRKs, asociados a cambios en su rol funcional, que además acompañen a dichas patologías, pudiendo ser causa o consecuencia de las mismas; 2) si los linfocitos circulantes reflejan lo que pueda estar ocurriendo en tejidos de difícil acceso del sistema cardiovascular (vasos, corazón y riñón), relacionados con dichas patologías; todo ello intentando, siempre que fue posible establecer una diferenciación en función de género. Seguidamente mostraremos los resultados obtenidos en dos modelos animales de HTA, y en modelos humanos de HTA e IC en varios estadios de cada enfermedad.

### 1 ADRENOCEPTORES Y GRKS EN MODELOS ANIMALES DE HIPERTENSIÓN ARTERIAL

#### 1.1 CONSTANTES HEMODINÁMICAS

El día del sacrificio de los animales se evalúan las constantes hemodinámicas de los diferentes grupos: Presión Arterial Sistólica (PAS) y Frecuencia cardiaca (FC). Además, los animales se pesan, y una vez extraído el corazón, este también se pesa para calcular la razón peso corazón/peso corporal. Los valores obtenidos se muestran en la tabla VI.

**Tabla VI.** Constantes hemodinámicas en ratas, jóvenes y adultas.

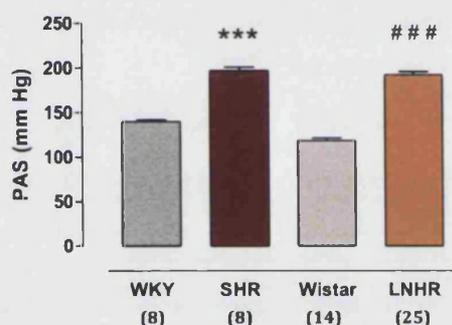
	Jóvenes (6 semanas)		Adultos (16 semanas)		Wistar (16 semanas)	
	WKY	SHR	WKY	SHR	Wistar	LNHR
Número de animales (n)	5	6	8	15	14	25
PAS (mmHg)	120 $\pm$ 3	129 $\pm$ 12	140 $\pm$ 2	197 $\pm$ 4***	119 $\pm$ 3	192 $\pm$ 3***
FC (latidos/min)	274 $\pm$ 28	292 $\pm$ 69	311 $\pm$ 10	374 $\pm$ 7***	376 $\pm$ 12	373 $\pm$ 11
Peso corporal (g)	185 $\pm$ 6	198 $\pm$ 7	246 $\pm$ 9	318 $\pm$ 6***	355 $\pm$ 9	330 $\pm$ 5*
Ratio corazón/rata (mg/g)	3,5 $\pm$ 0,1	4,1 $\pm$ 0,1*	3,3 $\pm$ 0,1	3,9 $\pm$ 0,1***	2,70 $\pm$ 0,05	3,15 $\pm$ 0,1***

PAS indica presión arterial sistólica, FC indica frecuencia cardiaca. Los valores se determinaron 24 h antes del sacrificio de los animales, y son expresados como la media  $\pm$  e.e.m. de n = 5-25 animales. Siendo \* P<0,05, \*\*\* P < 0,001 vs. respectivo control WKY o Wistar, según test de t de Student.

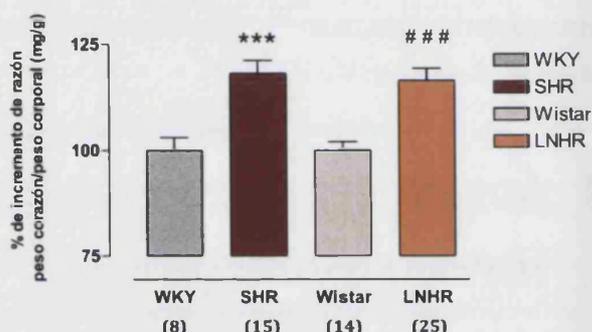


No se observaron diferencias en el grupo de ratas WKY y SHR jóvenes (6 semanas). Para los animales adultos (16 semanas), se observa un cambio significativo en los valores de PAS en los grupos de animales hipertensos (SHR y LNHR), evidenciando el estado hipertensivo de ambos. También se han observado diferencias significativas en la razón peso corazón/peso corporal (mg/g) que evalúa la hipertrofia cardiaca, evento característico de la HTA.

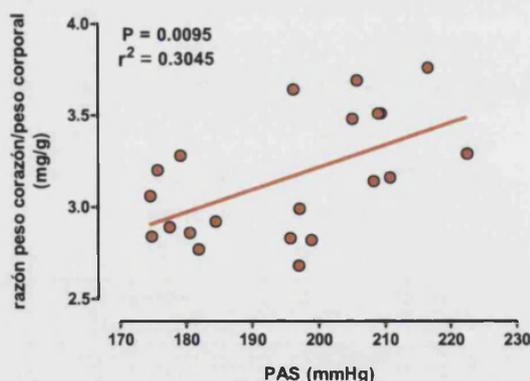
### A) Presión Arterial Sistólica



### B) Hipertrofia cardiaca



### C) Correlación entre la razón peso corazón/peso corporal y la PAS en ratas LNHR



**Figura 1.** Análisis comparativo de las constantes hemodinámicas entre los diferentes modelos de hipertensión animal (A y B) y Regresión lineal entre los niveles de PAS e hipertrofia cardiaca en ratas LNHR (C). Valores expresados como la media de mmHg (PAS) (A) y % de incremento de mg/g (razón peso corazón/peso corporal) (B)  $\pm$  e.e.m. de  $n = 8-25$  animales según grupos indicado entre paréntesis en la gráfica. Siendo \*\*\*  $P < 0,001$  vs. Wistar, ###  $P < 0,001$  vs. WKY, según test  $t$  de Student. (C) Valores expresados como mg/g. La línea continua representa la correlación significativa.

Durante las cuatro semanas que dura el tratamiento con L-NAME, se produce un incremento progresivo de la presión arterial que conduce al estado hipertensivo del animal, alcanzando cifras similares al modelo SHR. Si comparamos las cifras de PAS y el porcentaje de incremento en la razón peso corazón/peso corporal con respecto al grupo control, en el día de sacrificio de los animales (ver Figura 1A y 1B), vemos como tanto en el modelo de rata genéticamente hipertensa (SHR) como en el modelo inducido por L-NAME (LNHR) se consiguen cifras similares, igualándose así las condiciones del estado hipertensivo en ambos grupos de ratas hipertensas.

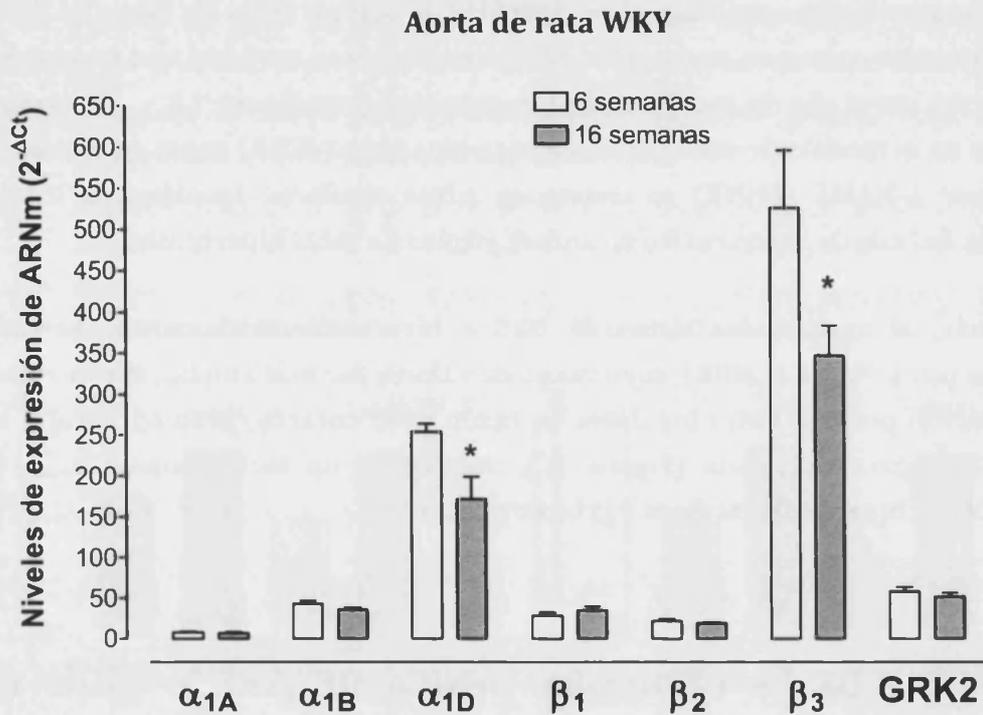
Además, al analizar los datos de PAS e hipertrofia cardiaca en las ratas hipertensas por L-NAME (LNHR), cuyo rango de valores fue más amplio, encontramos una correlación positiva entre los datos de razón peso corazón/peso corporal y los datos de PAS para cada rata (Figura 1C), sugiriendo un factor común entre el desarrollo de la hipertrofia cardiaca y la hipertensión

## 1.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE ARS Y GRKS EN DIFERENTES TEJIDOS DE RATA

### 1.2.1 AORTA TORÁCICA

#### 1.2.1.1 Cambios con la Edad en grupos control

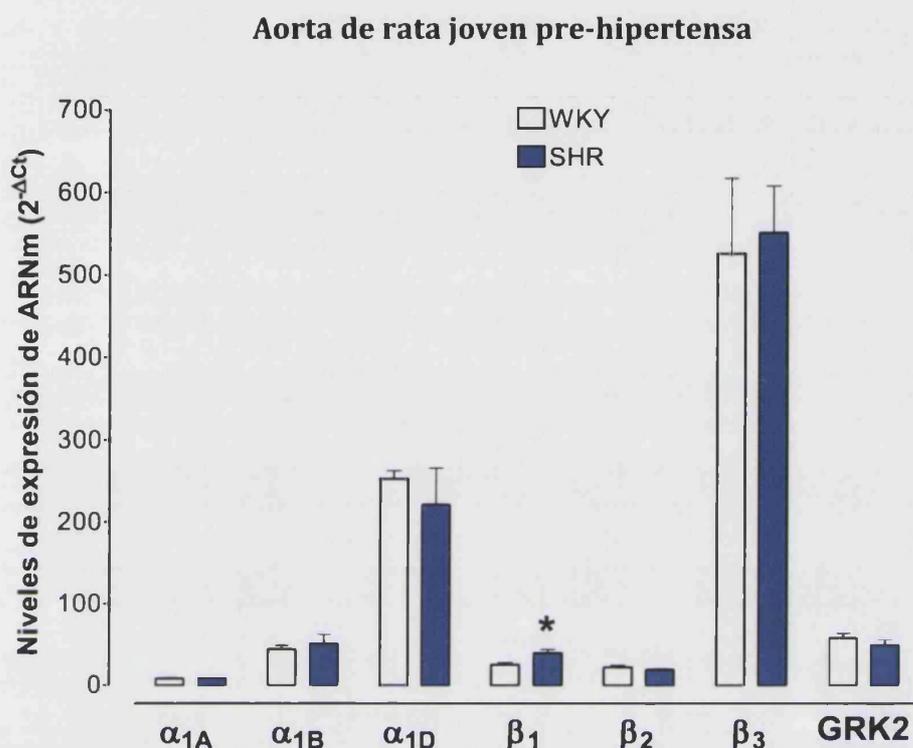
El ARNm para los AR- $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$ , y para la GRK2 estuvo presente, aunque en diferentes proporciones, en aortas de ratas WKY jóvenes y adultas, además de en aortas de ratas Wistar adultas. En todas las muestras de aorta, los niveles de expresión mayoritarios correspondieron a los ARs- $\alpha_{1D}$  y  $\beta_3$ . Según la edad, comparamos aortas de ratas WKY de 6 y 16 semanas, y tan sólo se observó una disminución significativa de ambos subtipos mayoritarios  $\alpha_{1D}$  y  $\beta_3$  en ratas adultas de 16 semanas de edad comparando con las ratas jóvenes de 6 semanas (Figura 2).



**Figura 2.** Niveles de expresión de ARs y GRK2 en Aorta de rata WKY joven y adulta. Valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia y expresados como la media de  $2^{-\Delta Ct} \pm e.e.m$  de  $n = 4-6$  animales diferentes. Siendo \*  $P < 0,05$  vs. WKY, según test de  $t$  de Student.

### 1.2.1.2 Cambios en ratas jóvenes Pre-hipertensas

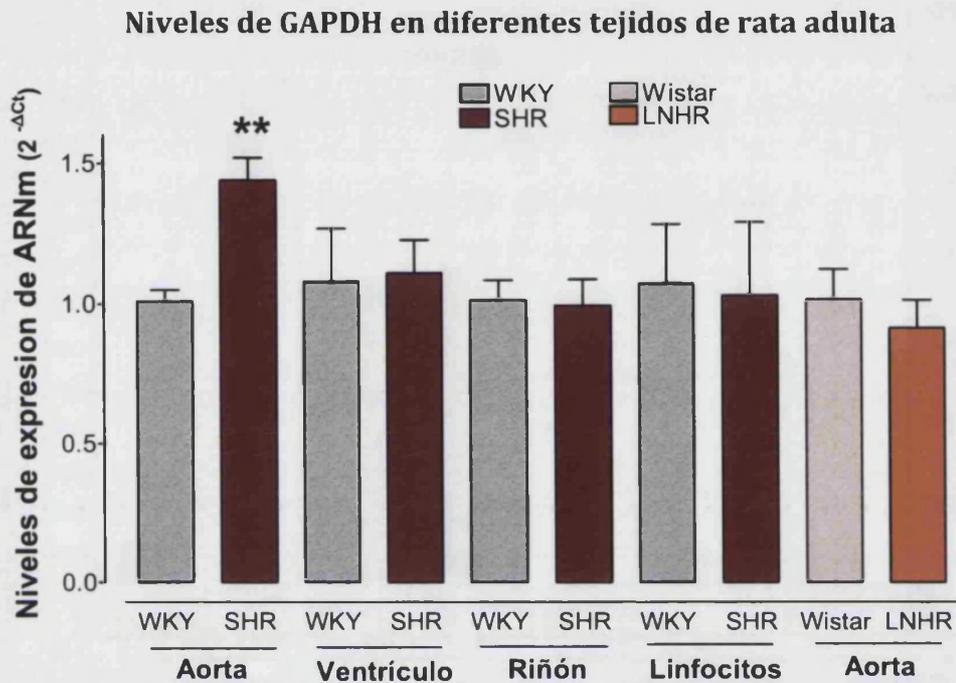
La Figura 3 nos muestra como los niveles de ARNm para los tres subtipos de ARs- $\alpha_1$  testados eran similares entre ambos grupos de ratas jóvenes. Tan sólo se observó un incremento significativo de los niveles de ARNm del subtipo  $\beta_1$  ( $P < 0,05$ ) en ratas SHR pre-hipertensas de 6 semanas comparando con sus respectivos controles WKY (Figura 3). No se observaron cambios significativos en los niveles de ARNm de la GRK2.



**Figura 3.** Niveles de expresión de ARs y GRK2 en Aorta de rata joven pre-hipertensa (SHR) frente a su control (WKY). Valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia y expresados como la media de  $2^{-\Delta Ct} \pm e.e.m$  de  $n = 4-6$  animales diferentes. Siendo  $* P < 0,05$  vs. WKY, según test de *t* de Student.

### 1.2.1.3 Cambios en ratas adultas Hipertensas

En este caso podemos diferenciar dos grupos de animales, las pertenecientes al grupo de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) o con Hipertensión genética y sus respectivos controles WKY en primer lugar, y las pertenecientes al grupo de ratas hipertensas por tratamiento crónico con L-NAME (LNHR) o con Hipertensión inducida y sus respectivos controles Wistar en segundo lugar. Al analizar los resultados obtenidos en ratas adultas hipertensas nos encontramos con un problema, los niveles de expresión de GAPDH (gen de referencia usado para normalizar los resultados) fueron significativamente superiores en aorta de rata adulta SHR en comparación con su control WKY ( $P < 0,01$ ), algo que tan solo ocurría en este caso concreto y no se reproducía en otros tejidos de ratas adultas hipertensas estudiados, tal y como podemos ver en la Figura 4.

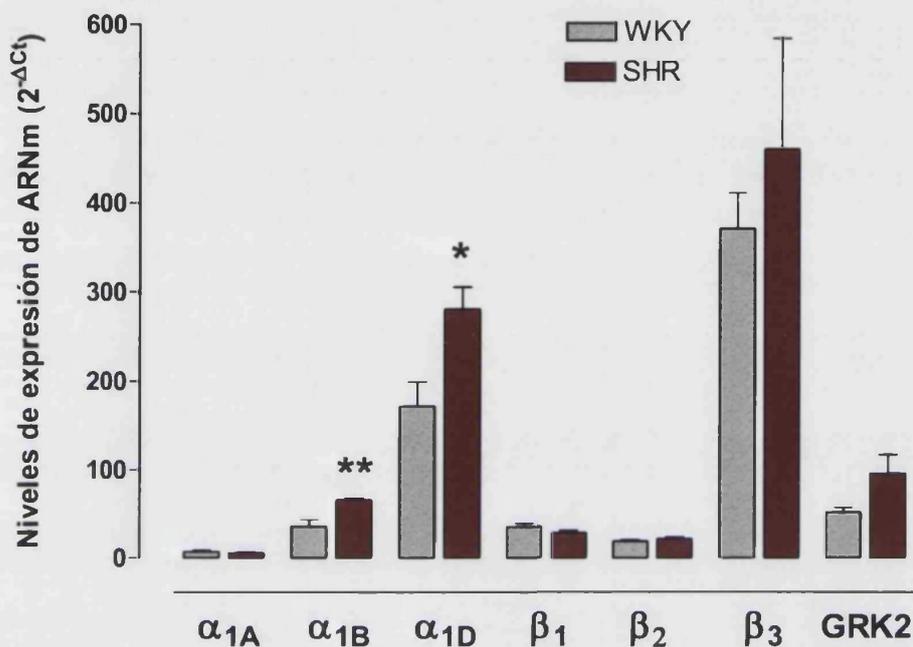


**Figura 4. Niveles de expresión de ARNm de GAPDH en tejidos de rata adulta hipertensa.** Valores normalizados usando el valor medio de expresión de GAPDH en rata WKY/Wistar y expresados como la media de  $2^{-\Delta Ct} \pm e.e.m$  de  $n = 4 - 6$  animales diferentes. Siendo  $** P < 0,01$  vs. WKY/Wistar, según test de t de Student.

Para evitar un sesgo en los resultados relacionados con los cambios en los genes objeto de estudio, los valores no se normalizaron respecto a los niveles de GAPDH. Excepcionalmente, en este caso, se utilizaron los niveles de expresión de cada gen en ratas WKY como referencia, encontrando un aumento generalizado para los 6 subtipos de ARs y la GRK2 en la aorta de rata SHR respecto a su control WKY (Figura 5B). Si representamos los valores previamente normalizados respecto al gen de referencia GAPDH, tal y como podíamos prever, no se observan los mismos cambios, en este caso únicamente se observa un incremento significativo para los subtipos  $\alpha_{1B}$  y  $\alpha_{1D}$  (Figura 5A).

## Aorta de rata adulta genéticamente hipertensa

A)



B)

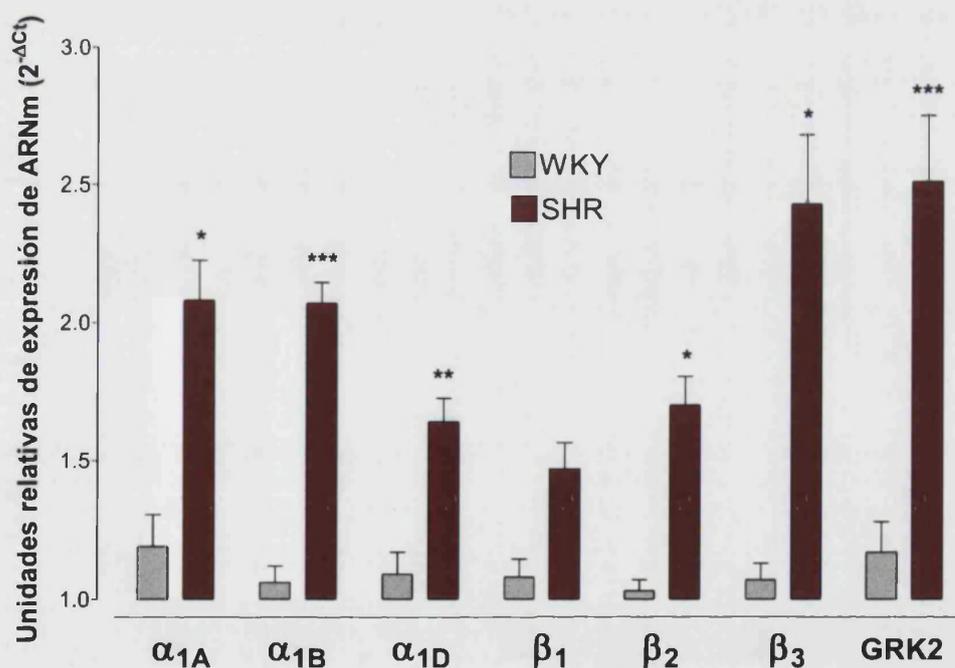
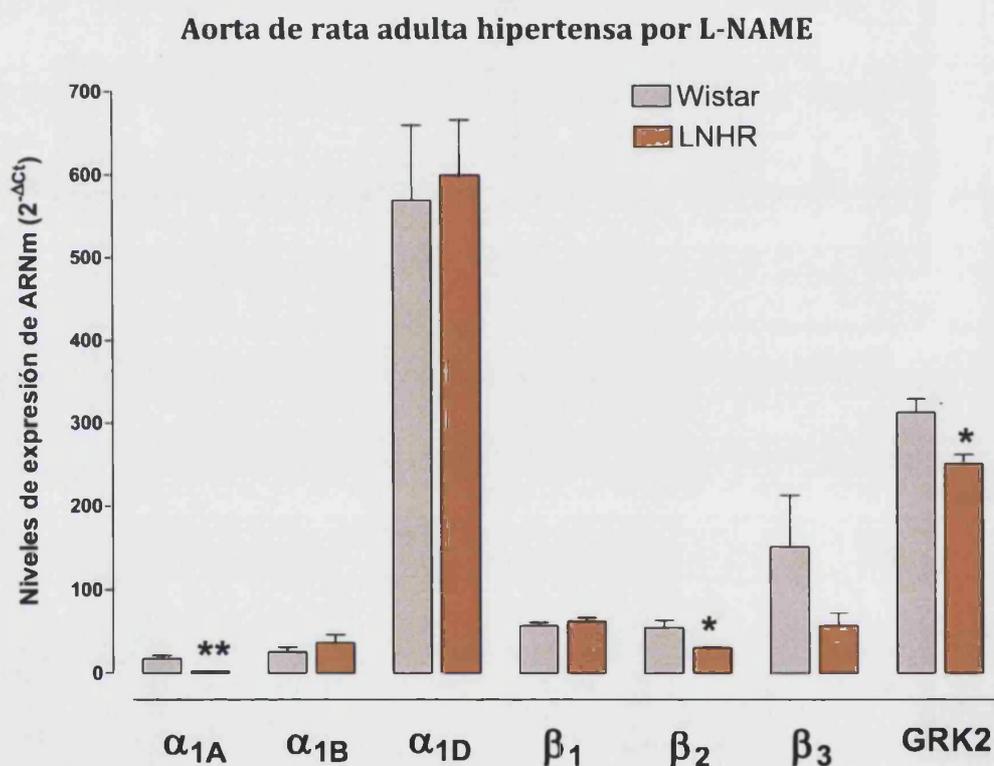


Figura 5. Niveles de expresión de ARs y GRK2 en Aorta de rata adulta hipertensa (SHR) frente a su control (WKY). En la gráfica superior (A), valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia, en la gráfica inferior (B), valores normalizados usando el valor medio de expresión de GAPDH en rata WKY. En ambos casos, valores expresados como la media de  $2^{-\Delta Ct} \pm e.e.m$  de  $n = 4 - 6$  animales diferentes. Siendo \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  vs. WKY, según test de t de Student.

En el grupo de ratas hipertensas LNHR los cambios observados fueron diferentes a los observados en ratas genéticamente hipertensas. La Figura 6 nos muestra tan sólo una disminución significativa en los niveles de ARNm de los subtipos  $\alpha_{1A}$  y  $\beta_2$ , acompañada de una disminución significativa de los niveles de ARNm de la GRK2. Se observa una tendencia a disminuir para el subtipo  $\beta_3$ , que no llega a ser significativa debido a la gran variabilidad obtenida en el análisis de expresión de dicho subtipo. No se observaron diferencias entre los resultados si estos eran normalizados siguiendo los mismos criterios que el modelo anterior, usando como valor de referencia los niveles de expresión del grupo control (resultados no mostrados).



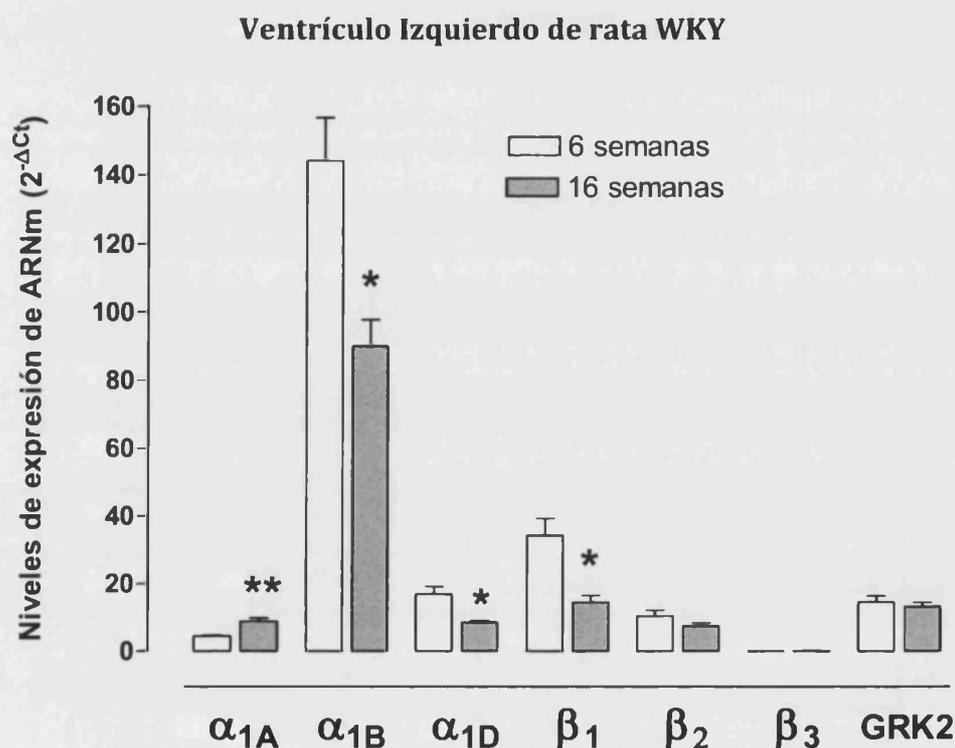
**Figura 6.** Niveles de expresión de ARs y GRK2 en Aorta de rata adulta hipertensa por tratamiento con L-NAME (LNHR) frente a su control (Wistar). Valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia y expresados como la media de  $2^{-\Delta C_t} \pm e.e.m$  de  $n = 3-5$  animales diferentes. Siendo \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  vs. WKY según el test de t de Student.

## 1.2.2 VENTRÍCULO IZQUIERDO

### 1.2.2.1 Cambios con la Edad

El ARNm para los AR- $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$ , y la GRK2 estuvo presente, en Ventrículo izquierdo de ratas WKY jóvenes y adultas, si bien en diferentes proporciones. Podemos observar que el subtipo mayoritario en este tejido es el AR-

$\alpha_{1B}$ , seguido del subtipo  $\beta_1$ . El subtipo  $\beta_3$  fue el minoritario con diferencia y en muchos de los casos analizados fue indetectable. Con la edad únicamente se observó un aumento en los niveles de expresión del AR- $\alpha_{1A}$  ( $P < 0,01$ ), en el resto de subtipos se observó una disminución casi generalizada de los ARs que fue significativa ( $P < 0,05$ ) para los ARs- $\alpha_{1B}$ , - $\alpha_{1D}$  y - $\beta_1$  (Figura 7).



**Figura 7. Niveles de expresión de ARs y GRK2 en Ventrículo Izquierdo de rata WKY joven y adulta.** Valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia y expresados como la media de  $2^{-\Delta Ct} \pm e.e.m$  de  $n = 4-6$  animales diferentes. Siendo \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  vs. 6 semanas según el test de *t* de Student.

### 1.2.2.2 Cambios en ratas jóvenes Pre-hipertensas

La Figura 8 nos muestra como tan solo se observó una disminución significativa del subtipo  $\alpha_{1D}$  en el ventrículo izquierdo de ratas jóvenes pre-hipertensas ( $P < 0,05$ ), mientras que para el resto de genes analizados no se observaron cambios de ningún tipo.

### 1.2.2.3 Cambios en ratas adultas Hipertensas

Cuando analizamos los niveles de ARNm en el ventrículo de rata adulta hipertensa (SHR) vemos como se mantiene significativo ( $P < 0,05$ ) el mismo cambio que se observaba en la rata pre-hipertensa, una disminución en la expresión génica del subtipo  $\alpha_{1D}$  (Figura 9).

### Ventrículo Izquierdo de rata joven pre-hipertensa

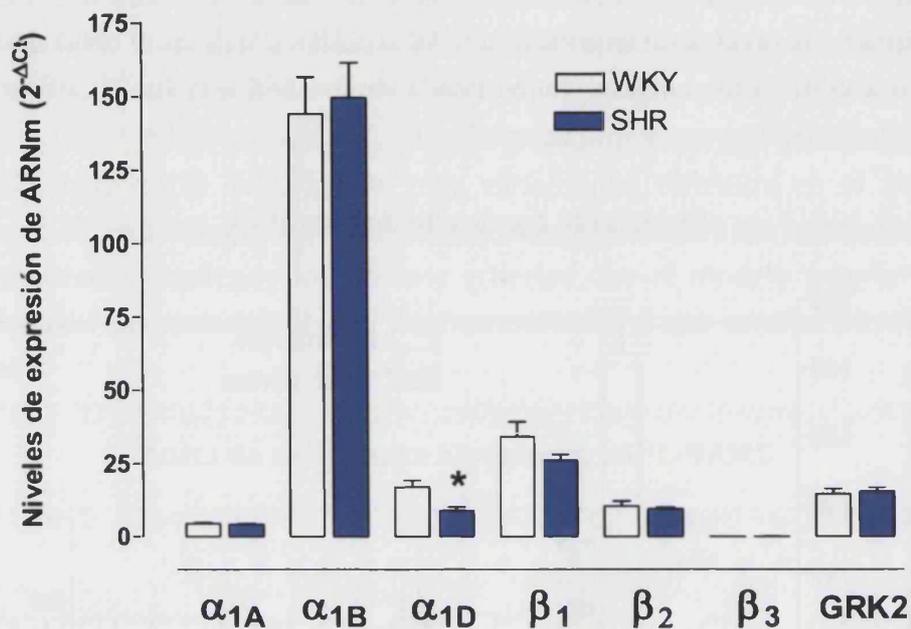


Figura 8. Niveles de expresión de ARs y GRK2 en Ventrículo Izquierdo de rata joven pre-hipertensa (SHR) frente a su control (WKY). Valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia y expresados como la media de  $2^{-\Delta Ct} \pm e.e.m$  de  $n = 4-6$  animales diferentes. Siendo  $* P < 0,05$  vs. WKY según test de t de Student.

### Ventrículo Izquierdo de rata adulta genéticamente hipertensa

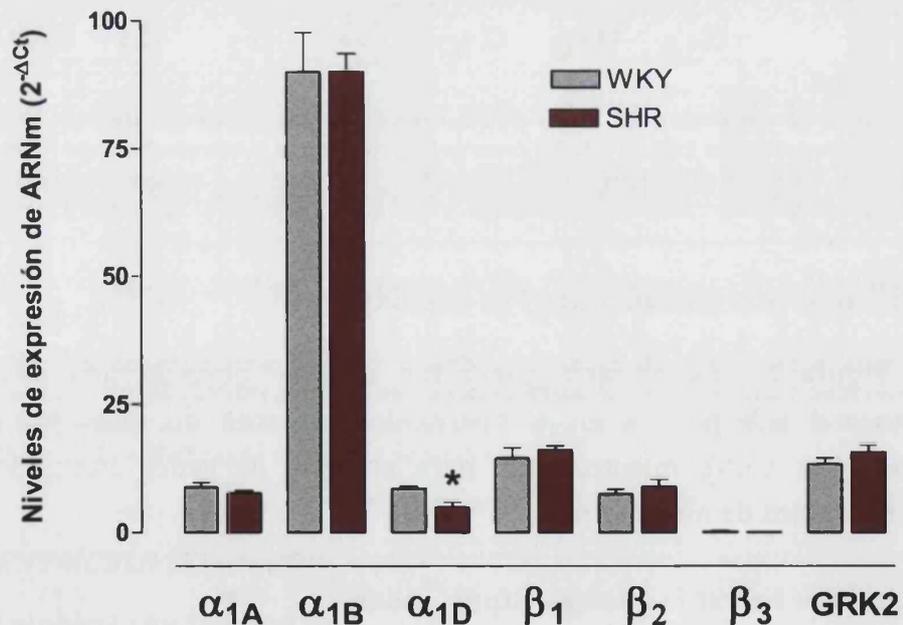


Figura 9. Niveles de expresión de ARs y GRK2 en Ventrículo Izquierdo de rata adulta hipertensa (SHR) frente a su control (WKY). Valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia y expresados como la media de  $2^{-\Delta Ct} \pm e.e.m$  de  $n = 4-6$  animales diferentes. Siendo  $* P < 0,05$  vs. WKY según test de t de Student.

En este tejido en el grupo de ratas LNHR vemos como se observan un mayor número de cambios en los niveles de ARNm al comparar con el grupo control de ratas Wistar. Como podemos ver en la Figura 10, un cambio es semejante a lo que ocurría en ratas SHR como es la disminución de los niveles de ARNm para el subtipo  $\alpha_{1D}$ , mientras que para los ARs- $\beta$  se produce un aumento que afecta a los subtipos mayoritarios  $\beta_1$  y  $\beta_2$  pero no al  $\beta_3$ , acompañado de un aumento en la expresión génica de la quinasa que contrala ambos ARs, la GRK2.

### Ventrículo Izquierdo de rata adulta hipertensa por L-NAME

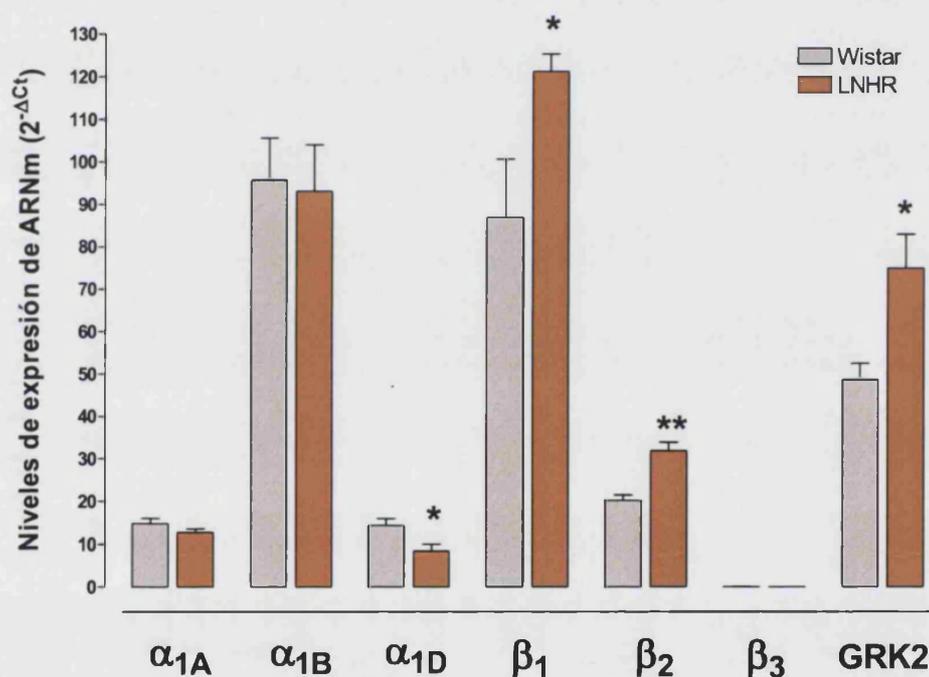
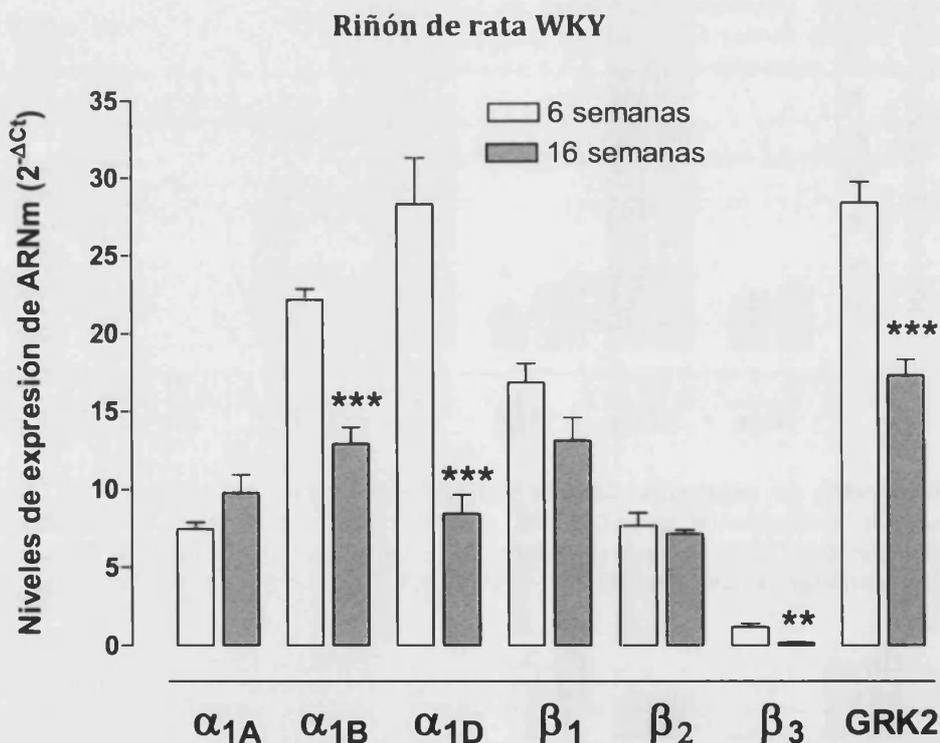


Figura 10. Niveles de expresión de ARs y GRK2 en Ventrículo Izquierdo de rata adulta hipertensa por tratamiento con L-NAME (LNHR) frente a su control (Wistar). Valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia y expresados como la media de  $2^{-\Delta Ct} \pm e.e.m$  de  $n = 3-5$  animales diferentes. Siendo \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  vs. WKY según el test de t de Student.

### 1.2.3 RIÑÓN

#### 1.2.3.1 Cambios con la Edad en grupos control

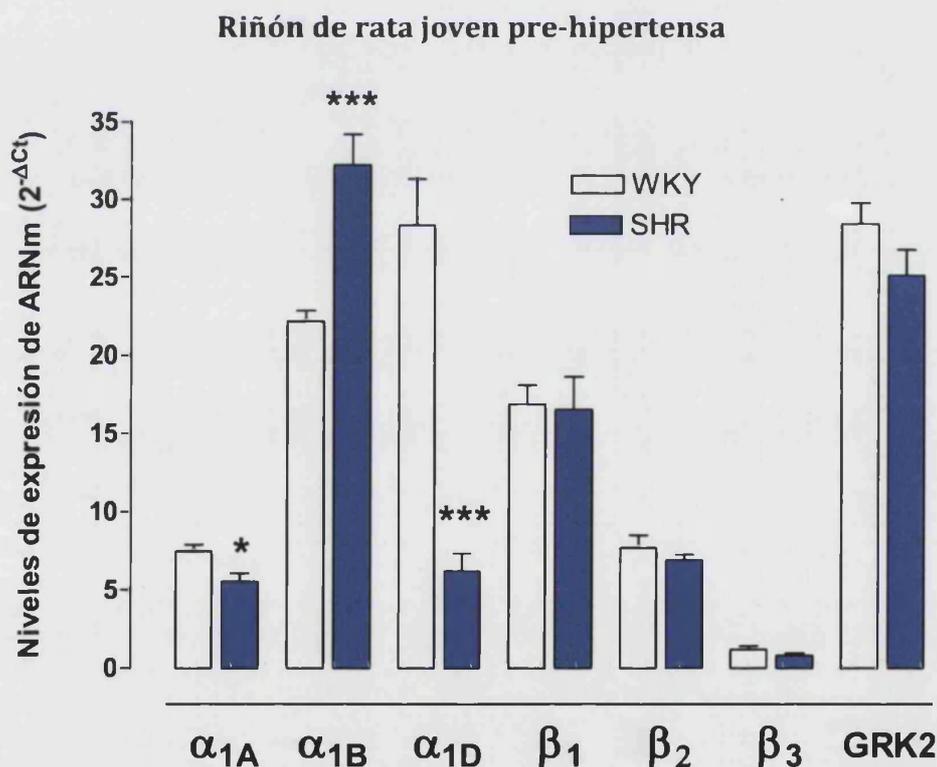
En la Figura 11 podemos ver como el ARNm para los 6 subtipos de ARs estudiados y la GRK2 se encuentra presente en Riñón de ratas WKY de todas las edades, aunque se podría decir que este tejido es el que menor proporción de ARs presenta si comparamos con los tejidos anteriores. Las proporciones relativas de cada subtipo son diferentes y cambian con la edad. Así pues, los cambios observados en la expresión de los ARs en riñón de rata WKY con la edad fueron muy marcados, viéndose una disminución muy significativa ( $P < 0,001$ ) en los niveles de ARNm de los subtipos  $\alpha_{1B}$  y  $\alpha_{1D}$ , y de GRK2, y una disminución un poco menos marcada ( $P < 0,01$ ) para el subtipo minoritario, el AR- $\beta_3$ . Cabe destacar que el subtipo mayoritario en las ratas jóvenes es el AR- $\alpha_{1D}$  seguido de  $\alpha_{1B}$  y  $\beta_1$ , mientras que en ratas adultas el AR- $\alpha_{1D}$  deja de ser mayoritario para serlo tanto el subtipo  $\beta_1$  como el AR- $\alpha_{1B}$  en niveles similares (Figura 11).



**Figura 11.** Niveles de expresión de ARs y GRK2 en Riñón de rata WKY joven y adulta. Valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia y expresados como la media de  $2^{-\Delta Ct} \pm e.e.m$  de  $n = 4-6$  animales diferentes. Siendo \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  vs. 6 semanas según el test de *t* de Student.

### 1.2.3.2 Cambios en ratas jóvenes Pre-hipertensas

A continuación se muestran los cambios que se observan en el riñón de ratas jóvenes pre-hipertensas. Podemos ver como se producen dos cambios drásticos que cambian la proporción relativa entre los subtipos, un aumento muy marcado del AR- $\alpha_{1B}$ , acompañado de una disminución también muy importante en los niveles de ARNm del subtipo  $\alpha_{1D}$ , hecho que hace que dicho subtipo que era mayoritario en ratas jóvenes WKY deje de serlo en ratas pre-hipertensas, donde el subtipo mayoritario pasa a ser el  $\alpha_{1B}$  tal y como observamos en la Figura 12. También se observa una disminución significativa pero menos marcada ( $P < 0,05$ ) para el AR- $\alpha_{1A}$  en ratas jóvenes pre-hipertensas con respecto a sus controles WKY.



**Figura 12.** Niveles de expresión de ARs y GRK2 en Riñón de rata joven pre-hipertensa (SHR) frente a su control (WKY). Valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia y expresados como la media de  $2^{-\Delta Ct} \pm e.e.m$  de  $n = 4-6$  animales diferentes. Siendo \*  $P < 0,05$ , \*\*\*  $P < 0,001$  vs. WKY según el test de  $t$  de Student.

### 1.2.3.3 Cambios en ratas adultas Hipertensas

Una vez desarrollada la hipertensión en ratas SHR observamos como los cambios anteriormente descritos para las ratas pre-hipertensas se mantienen, disminución de  $\alpha_{1D}$ , y aumento de  $\alpha_{1B}$ , eso sí de forma menos marcada que en estadios menos avanzados de la enfermedad (Figura 13).

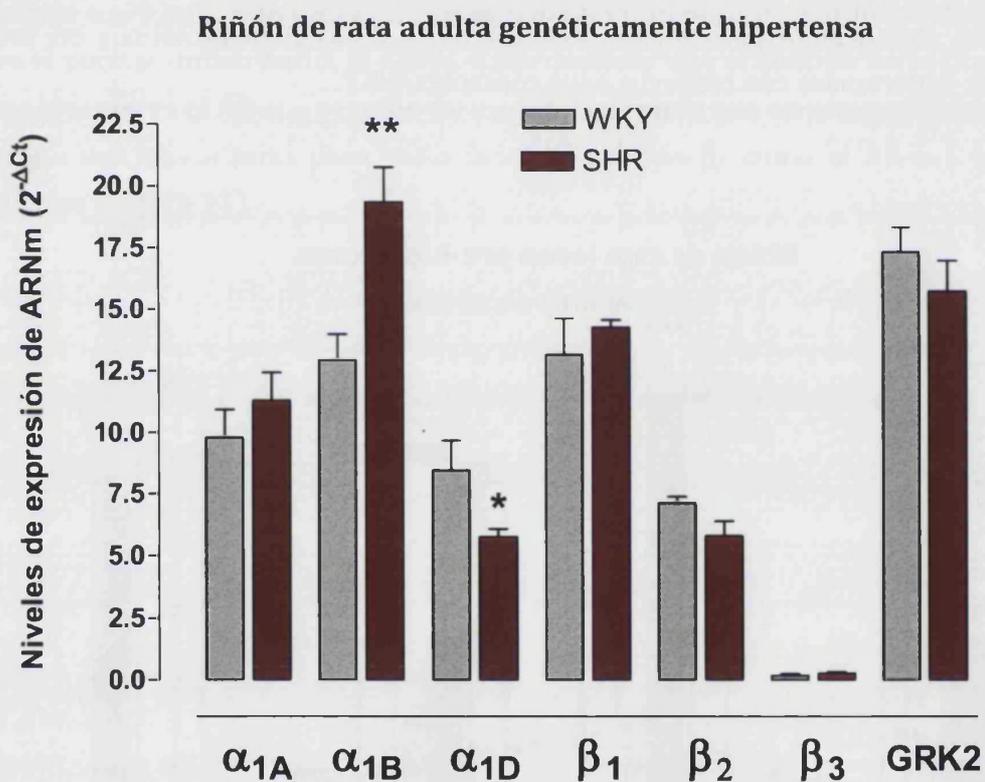


Figura 13. Niveles de expresión de ARs y GRK2 en Ventriculo Izquierdo de rata adulta hipertensa (SHR) frente a su control (WKY). Valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia y expresados como la media de  $2^{-\Delta Ct} \pm e.e.m$  de  $n = 4-6$  animales diferentes. Siendo \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  vs. WKY según el test de  $t$  de Student.

En el grupo de ratas LNHR vemos cambios en los niveles de ARNm al comparar con el grupo control de ratas Wistar Figura 14. Se observa una disminución de los niveles de ARNm para el subtipo  $\alpha_{1A}$  y un aumento en los niveles del subtipo  $\alpha_{1B}$ , al igual que ocurría en el modelo anterior SHR. A diferencia, se observa un aumento significativo del subtipo  $\alpha_{1D}$ , cambio opuesto a lo que se observaba en ratas SHR (Figura 13). En cuanto a los ARs- $\beta$ , se produce un aumento significativo que afecta a los subtipos mayoritarios  $\beta_1$  y  $\beta_2$  pero no al  $\beta_3$ , cosa que no ocurría en ratas SHR, acompañado de un aumento en la expresión génica de la quinasa que contrala ambos ARs, la GRK2, cambio opuesto a la disminución que se observaba en riñón de rata SHR.

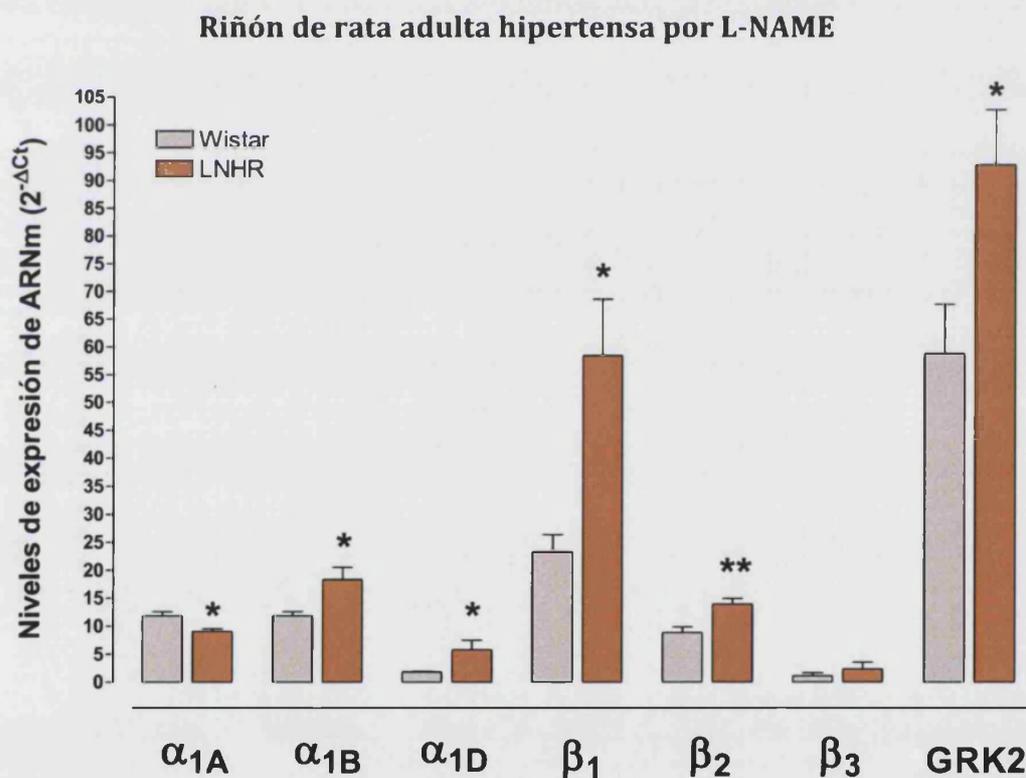


Figura 14. Niveles de expresión de ARs y GRK2 en Riñón de rata adulta hipertensa por tratamiento con L-NAME (LNHR) frente a su control (Wistar). Valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia y expresados como la media de  $2^{-\Delta Ct} \pm e.e.m$  de  $n = 3-5$  animales diferentes. Siendo \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  vs. WKY según el test de t de Student.

## 1.2.4 LINFOCITOS CIRCULANTES

### 1.2.4.1 Cambios en ratas adultas Hipertensas

A continuación, hemos analizado los niveles de expresión de ARNm para los ARs y para tres GRKs, las GRK2, GRK3 y GRK5, en linfocitos circulantes de ratas adultas hipertensas (SHR). No se consiguió detectar niveles suficientes de ARNm para los ARs- $\alpha_1$ , ni tampoco para el subtipo  $\beta_3$ . De los dos ARs detectados, el subtipo  $\beta_2$  fue el mayoritario, mientras que entre las tres GRKs la mayoritaria fue GRK2. Tal y como podemos ver en la Figura 15, se observa una disminución muy significativa ( $P < 0,001$ ) en los niveles de ARNm del subtipo  $\beta_1$ . No se observaron cambios significativos en ninguna de las tres quinasas analizadas.

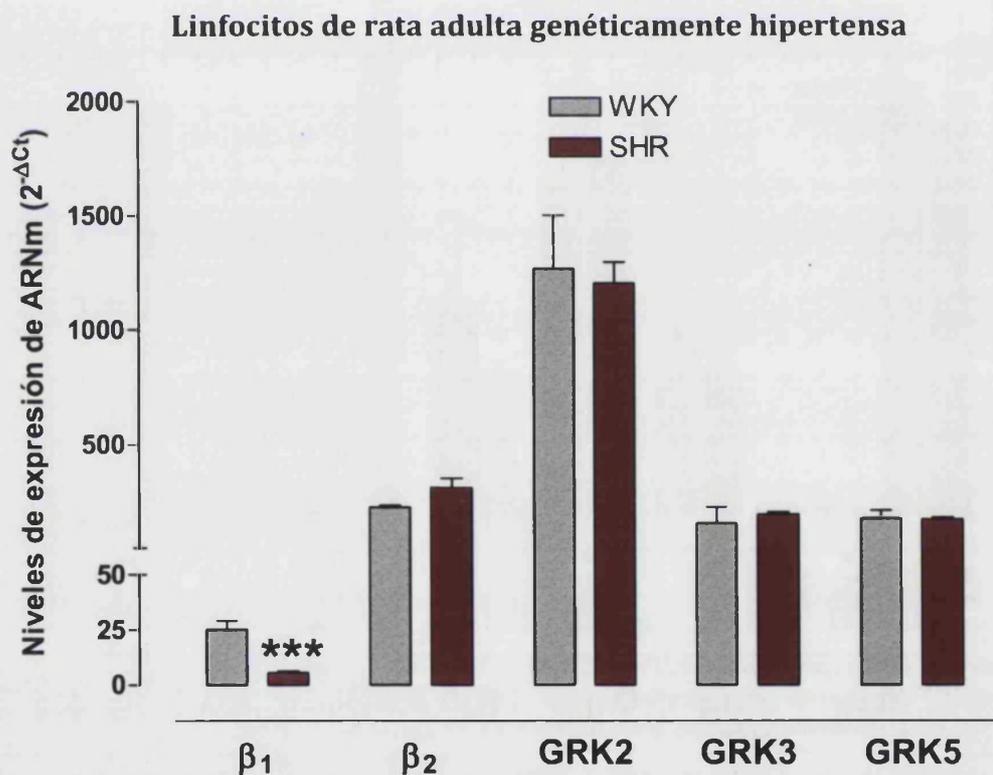
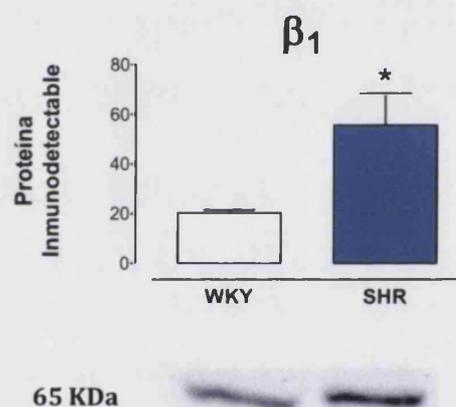


Figura 15. Niveles de expresión de ARs y GRK2 en Linfocitos circulantes de rata adulta hipertensa (SHR) frente a su control (WKY). Valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia y expresados como la media de  $2^{-\Delta Ct} \pm e.e.m$  de  $n = 3-6$  animales diferentes. Siendo \*\*\*  $P < 0,001$  vs. WKY según el test de  $t$  de Student.

### 1.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE ARS Y GRKS EN AORTA DE RATA

Con el fin de comprobar si los cambios observados en la expresión génica de los ARs y la GRK2 se corresponden con cambios en la expresión proteica en Aorta de rata, hemos realizado experimentos de Western Blot y análisis densitométrico de las bandas. Observamos en primer lugar como el incremento mostrado en los niveles de ARNm para el subtipo  $\beta_1$  en aorta de rata pre-hipertensa (Figura 3), se acompaña de un aumento en los niveles inmunodetectables de la proteína correspondiente (Figura 16).

#### Aorta de rata joven pre-hipertensa

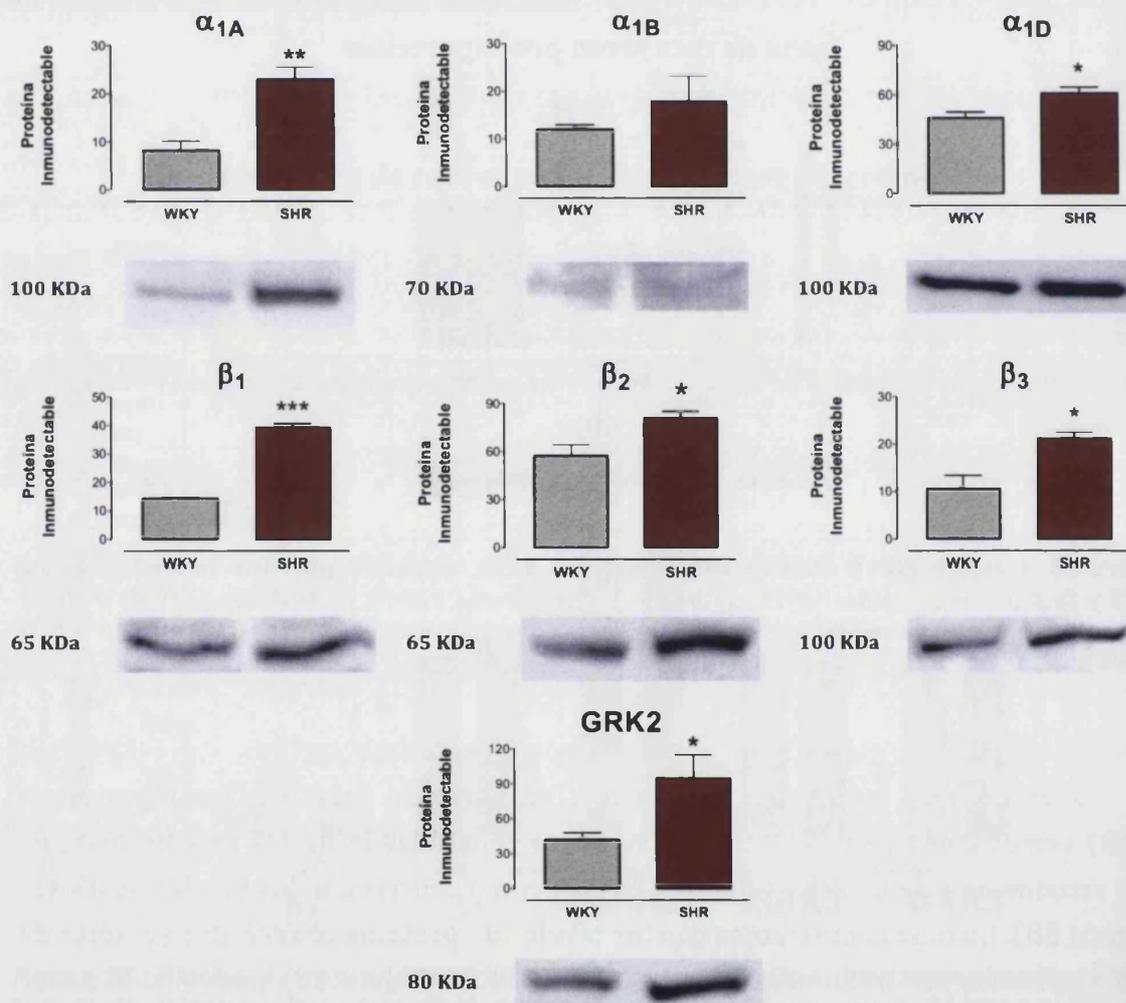


**Figura 16.** Western Blot y Análisis densitométrico de la expresión proteica en aorta de rata WKY y SHR joven. Imágenes representativas de 3 experimentos. Valores normalizados usando  $\beta$ -Actina como control de carga, expresados como el ratio de proteína inmunodetectable ( $n=3$ ). Siendo \*  $P < 0,05$  vs. WKY.

Si analizamos los niveles de proteína en aorta de ratas adultas hipertensas (SHR) vemos como se produce un incremento generalizado de los seis subtipos de ARs estudiados y de la GRK2 (Figura 17), tal y como ocurriría con los niveles de ARNm (Figura 5B). Cuando comparamos con los niveles de proteína observados en aorta de rata hipertensa por tratamiento con L-NAME (LNHR) (Figura 18), podemos destacar tres aspectos importantes: 1) los cambios observados en aorta de rata LNHR son diferentes a los observados en ratas SHR (Figura 15) al igual que ocurriría cuando comparábamos los niveles de ARNm; 2) la disminución en la expresión génica observada para el subtipo  $\alpha_{1A}$  y para la GRK2 (Figura 6) se corresponde con una disminución en los niveles de proteína cuando comparamos LNHR con su control Wistar; 3) encontramos cambios a nivel de proteína que no se corresponden con los

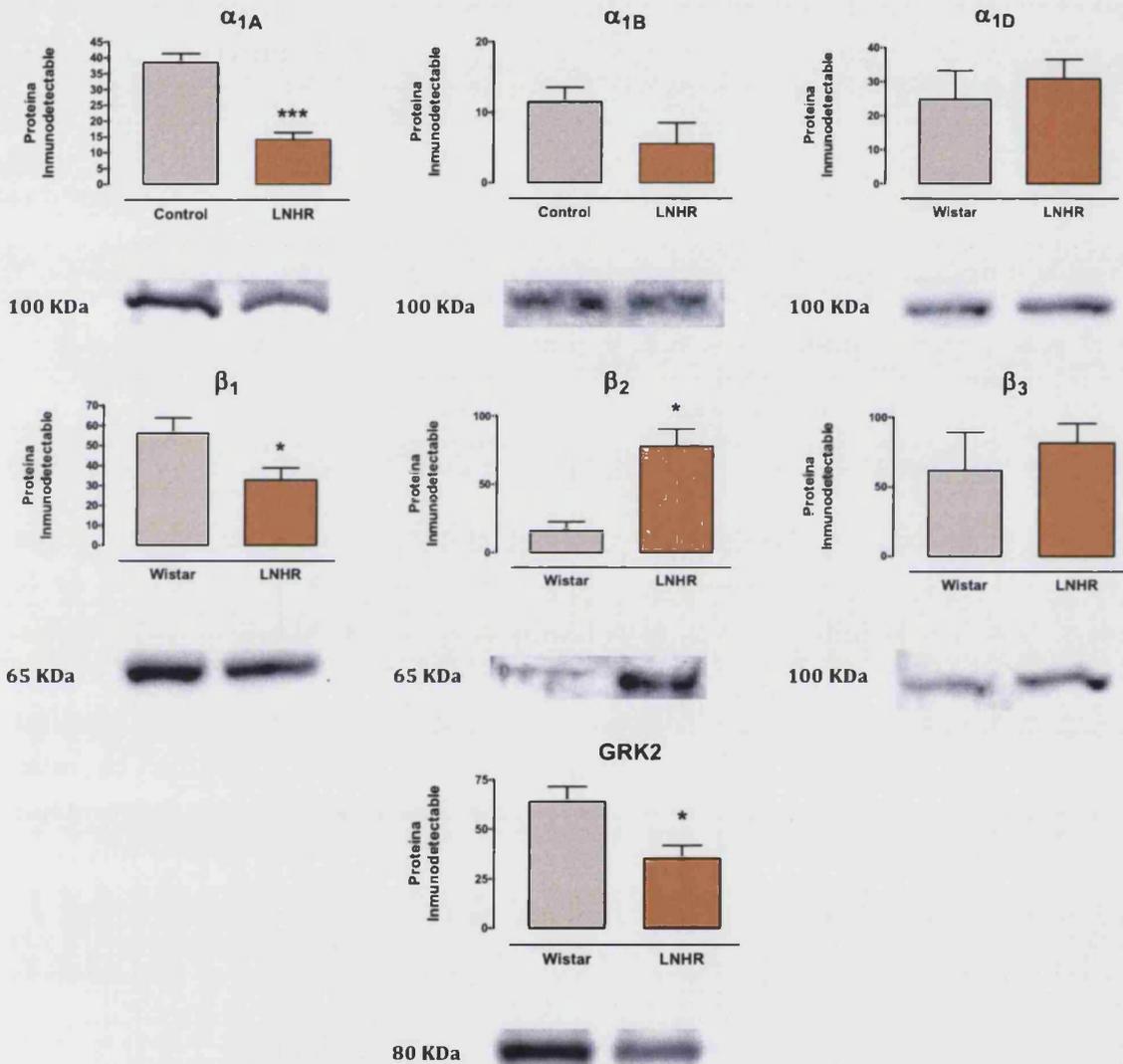
cambios observados en la expresión génica, tales como un incremento en la expresión proteica del subtipo  $\beta_2$  opuesto a lo que ocurría con el ARNm (disminución) y una disminución en los niveles de proteína del subtipo  $\beta_1$  cuando los niveles de ARNm permanecían invariables (Figura 6), sugiriendo algún tipo de regulación post-transcripcional para ambos subtipos.

### Expresión proteica en Aorta de rata adulta genéticamente hipertensa



**Figura 17.** Western Blot y Análisis densitométrico de la expresión proteica en aorta de rata WKY y SHR adulta. Imágenes representativas de 3 experimentos. Valores normalizados usando  $\beta$ -Actina como control de carga, expresados como el ratio de proteína inmunodetectable ( $n=3$ ). Siendo \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  vs. WKY, según el test de t de Student.

## Expresión proteica en Aorta de rata adulta hipertensa por tratamiento con L-NAME



**Figura 18.** Western Blot y Análisis densitométrico de la expresión proteica en aorta de rata Wistar y LNHR adulta. Imágenes representativas de 3 experimentos. Valores normalizados usando  $\beta$ -Actina como control de carga, expresados como el ratio de proteína inmunodetectable ( $n=3$ ). Siendo \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  vs. Wistar, según el test de *t* de Student.

## 1.4 ANÁLISIS DEL PAPEL FUNCIONAL DE ARS Y GRKS EN AORTA DE RATA

Con el objetivo de determinar las consecuencias funcionales de los cambios en la expresión de los ARs y la GRK2 en aorta de ratas WKY y SHR, tanto jóvenes como adultas, así como en aorta de ratas Wistar y LNHR adultas, hemos realizado curvas concentración-respuesta de contracción con FE, agonista  $\alpha_1$  no selectivo; o de relajación tanto con antagonistas selectivos de los AR- $\alpha_1$  como con diferentes agonistas  $\beta$ -adrenérgicos.

### 1.4.1 CAMBIOS CON LA EDAD

#### 1.4.1.1 Evaluación de la actividad $\alpha_1$ -adrenérgica

Se han observado mínimos cambios con la edad al comparar la respuesta frente a los agentes vasoconstrictores KCl y FE (agonista  $\alpha_1$  no selectivo). Tal y como muestra la Tabla VII, únicamente se aprecia una disminución significativa de la potencia de FE, que podría estar indicando una menor actividad del subtipo  $\alpha_{1D}$ , coincidiendo con la bajada en los niveles de ARNm descrita en apartados anteriores. Los porcentajes medios de contracción alcanzados con ambos agentes vasoconstrictores, no fueron significativamente diferentes, alcanzándose en ratas adultas cifras próximas al 100% de contracción en relación a los porcentajes alcanzados en ratas jóvenes.

**Tabla VII.** Parámetros obtenidos de las curvas concentración-respuesta de contracción por FE y la respuesta contráctil máxima obtenida con la solución despolarizante (80 mM KCl) en aorta aislada de rata WKY joven y adulta.

		Ratas WKY	
		Jóvenes	Adultas
KCl	$E_{max}$	7,03 $\pm$ 1,18	8,26 $\pm$ 0,33
Fenilefrina	$E_{max}$	7,47 $\pm$ 1,09	7,99 $\pm$ 0,58
	pCE <sub>50</sub>	8,38 $\pm$ 0,34	7,70 $\pm$ 0,08*

Valores expresados como la media  $\pm$  e.e.m. de  $n = 4 - 8$  animales. Siendo  $E_{max}$  la máxima respuesta contráctil expresada como mN, pCE<sub>50</sub> el  $-\log$  [Fenilefrina] (M) necesaria para producir el 50% de la respuesta máxima, \*  $P < 0,05$  vs. Jóvenes.

### 1.4.1.2 Evaluación de la actividad $\beta$ -adrenérgica

Para seguir con la evaluación de la actividad  $\beta$ -adrenérgica, evaluamos la respuesta frente a dos agentes vasorelajantes, los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos Isoprenalina (no discrimina entre  $\beta_1$  y  $\beta_2$ ) y SR58611A (agonista selectivo  $\beta_3$ ). Ambos agonistas relajan de manera concentración-dependiente la contracción sostenida que produce la FE. Isoprenalina muestra una elevada potencia en ratas adultas WKY frente a las ratas jóvenes (Tabla VIII). Las curvas de relajación para el SR58611A fueron bifásicas y discriminaban dos poblaciones de AR- $\beta$  de elevada y baja potencia (Tabla VIII), indicando el rol funcional de una población mixta de AR- $\beta_3$  y  $\beta_1/\beta_2$  en la aorta de rata, de forma similar tanto en ratas WKY jóvenes como adultas.

**Tabla VIII.** Parámetros obtenidos de las curvas concentración-respuesta de relajación por agonistas de los AR- $\beta$  Isoprenalina y SR58611A en aorta de rata WKY joven y adulta previamente contraída con FE.

		Ratas WKY	
		Jóvenes	Adultas
Isoprenalina	pCE <sub>50</sub>	7,32 ± 0,03	7,41 ± 0,02*
	E <sub>max</sub> (%)	100	96,3 ± 2,1
SR58611A	pCE <sub>50</sub> (1)	7,45 ± 0,10	8,41 ± 0,06***
	pCE <sub>50</sub> (2)	4,61 ± 0,05	4,63 ± 0,05
	% (1)	27,4 ± 1,5	35,4 ± 0,9***
	E <sub>max</sub> (%)	75,5 ± 8,5	70,3 ± 3,8

Valores expresados como la media ± e.e.m. de n = 4 - 8 animales. Siendo la pCE<sub>50</sub> el -log [agonista] (M) necesaria para producir el 50% de la respuesta relajante máxima; la pCE<sub>50</sub> (1) y pCE<sub>50</sub> (2) representan la potencia del agonista testado en cada subpoblación de receptores cuando la curva ajustada a dos sitios de unión fue estadísticamente significativa; % (1) es la fracción de receptores correspondientes al sitio de alta potencia; \*P < 0,05; \*\*\* P < 0,001 vs. WKY.

## 1.4.2 CAMBIOS EN RATAS JÓVENES PRE-HIPERTENSAS

### 1.4.2.1 Evaluación de la actividad $\alpha_1$ -adrenérgica

Lo primero que evaluamos fue la respuesta frente a dos agentes vasoconstrictores, el KCl y la FE (agonista  $\alpha_1$  no selectivo). La respuesta contráctil máxima de la aorta de rata frente a ambos agentes se encontró disminuida en ratas jóvenes pre-hipertensas (Tabla IX), corroborando resultados previos de nuestro grupo de investigación en aorta pero no en otros vasos (Gisbert y cols., 2002). El

porcentaje medio de contracción alcanzado con KCl fue de un 77,7% del máximo alcanzado con el grupo control y para la FE se alcanzó tan sólo un 58,0%, evidenciando ambos parámetros el deterioro en la maquinaria contráctil de la aorta de rata joven SHR o pre-hipertensa. Tal y como era de esperar, y de acuerdo con los niveles de expresión para los ARs- $\alpha_1$  que no indicaron ningún cambio significativo (Figura 3), la pCE<sub>50</sub> de FE permaneció invariable en ratas jóvenes SHR frente a sus controles WKY (Tabla IX).

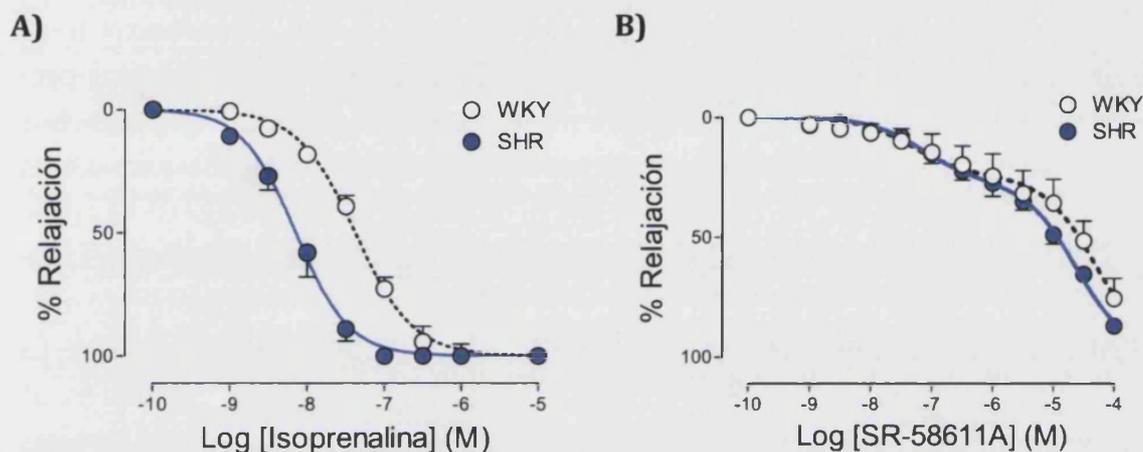
**Tabla IX.** Parámetros obtenidos de las curvas concentración-respuesta de contracción por FE y la respuesta contráctil máxima obtenida con la solución despolarizante (80 mM KCl) en aorta aislada de rata WKY y SHR joven.

		Jóvenes (6 semanas)	
		WKY	SHR
KCl	E <sub>max</sub>	7,03 ± 1,18	5,46 ± 0,66
Fenilefrina	E <sub>max</sub>	7,47 ± 1,09	4,33 ± 0,40*
	pCE <sub>50</sub>	8,38 ± 0,34	8,42 ± 0,17

Valores expresados como la media ± e.e.m. de n = 4- 8 animales. Siendo E<sub>max</sub> la máxima respuesta contráctil expresada como mN, pCE<sub>50</sub> el -log [Fenilefrina] (M) necesaria para producir el 50% de la respuesta máxima, \* P < 0,05 vs. WKY.

#### 1.4.2.2 Evaluación de la actividad $\beta$ -adrenérgica

Seguidamente, con el fin de evaluar si el aumento en la expresión tanto génica como proteica del AR- $\beta_1$  se traducía en cambios funcionales en la aorta de rata joven pre-hipertensa, evaluamos la respuesta frente a dos agentes vasorelajantes, los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos Isoprenalina (no discrimina entre  $\beta_1$  y  $\beta_2$ ) y SR58611A (agonista selectivo  $\beta_3$ ). Ambos agonistas relajan de manera concentración-dependiente la contracción sostenida que produce la FE. Isoprenalina muestra una elevada potencia en ratas jóvenes pre-hipertensas SHR frente a sus controles (Tabla X, Figura 19A). Las curvas de relajación para el SR58611A fueron bifásicas y discriminaban dos poblaciones de AR- $\beta$  de elevada y baja potencia (Tabla X, Figura 19B), indicando el rol funcional de una población mixta de AR- $\beta_3$  y  $\beta_1/\beta_2$  en la aorta de rata, de forma similar tanto en WKY como en SHR jóvenes.



**Figura 19.** Curvas acumulativas concentración-respuesta de relajación por agonistas selectivos  $\beta$ -adrenérgicos: Isoprenalina (A) y SR58611A (B) en aorta contraída por Fenilefrina. Los experimentos se llevaron a cabo en aortas aisladas de ratas jóvenes SHR y WKY. Valores expresados como la media  $\pm$  e.e.m. de  $n = 4 - 8$  experimentos.

**Tabla X.** Parámetros obtenidos de las curvas concentración-respuesta de relajación por agonistas de los AR- $\beta$  Isoprenalina y SR58611A en aorta de rata WKY y SHR joven previamente contraída con FE.

		Jóvenes (6 semanas)	
		WKY	SHR
Isoprenalina	$pCE_{50}$	$7,32 \pm 0,03$	$8,08 \pm 0,03^{***}$
	$E_{max}$ (%)	100	100
SR58611A	$pCE_{50}$ (1)	$7,45 \pm 0,10$	$7,26 \pm 0,09$
	$pCE_{50}$ (2)	$4,61 \pm 0,05$	$4,79 \pm 0,04$
	% (1)	$27,4 \pm 1,5$	$26,8 \pm 1,4$
	$E_{max}$ (%)	$75,5 \pm 8,5$	$87,7 \pm 2,5$

Valores expresados como la media  $\pm$  e.e.m. de  $n = 4 - 8$  animales. Siendo la  $pCE_{50}$  el  $-\log$  [agonista] (M) necesaria para producir el 50% de la respuesta relajante máxima; la  $pCE_{50}$  (1) y  $pCE_{50}$  (2) representan la potencia del agonista testado en cada subpoblación de receptores cuando la curva ajustada a dos sitios de unión fue estadísticamente significativa; % (1) es la fracción de receptores correspondientes al sitio de alta potencia; \*\*\*  $P < 0,001$  vs. WKY.

### 1.4.3 CAMBIOS EN RATAS ADULTAS GENÉTICAMENTE HIPERTENSAS

#### 1.4.3.1 Evaluación de la actividad $\alpha_1$ -adrenérgica

Al evaluar la respuesta frente a los mismos agentes vasoconstrictores anteriormente mencionados, encontramos al igual que en el caso de las ratas prehipertensas, una disminución significativa en la respuesta máxima frente a ambos (Tabla XI). El porcentaje medio de contracción para KCl en aorta de rata adulta hipertensa (SHR) fue del 70,7% del máximo de contracción observado en el grupo control y para FE del 55,6%, muy parecido a lo que ocurría en ratas jóvenes. Sin embargo, en animales adultos, la  $pCE_{50}$  de FE sí que fue significativamente más elevada en ratas hipertensas (SHR) frente a las WKY (Tabla XI y Figura 20A). La diferencia en la potencia de la FE va acompañada de una recuperación del tono basal, después de eliminar el agonista del medio, significativamente más lenta para las ratas SHR frente a las WKY (Figura 20B), que no se observó después de eliminar del medio la solución despolarizante de KCl (resultados no mostrados).

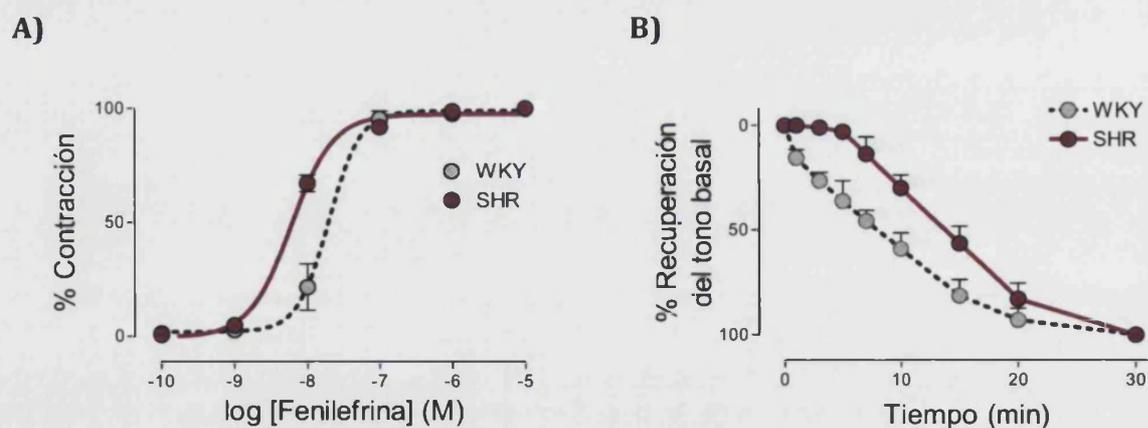


Figura 20. (A) Curvas acumulativas concentración-respuesta de contracción por Fenilefrina. (B) Tiempo de recuperación del tono basal desde la respuesta contráctil máxima después de eliminar el agonista del medio. Los experimentos se llevaron a cabo en aortas aisladas de ratas adultas SHR y WKY. Valores expresados como la media  $\pm$  e.e.m. de  $n = 4 - 8$  experimentos.

**Tabla XI.** Parámetros obtenidos de las curvas concentración-respuesta de contracción por FE y la respuesta contráctil máxima obtenida con la solución despolarizante (80 mM KCl) en aorta aislada de rata WKY y SHR adulta.

Adultas (16 semanas)			
		WKY	SHR
KCl	$E_{max}$	8,26 ± 0,33	5,84 ± 0,62*
Fenilefrina	$E_{max}$	7,99 ± 0,58	4,44 ± 0,67**
	$pCI_{50}$	7,70 ± 0,08	8,22 ± 0,02***

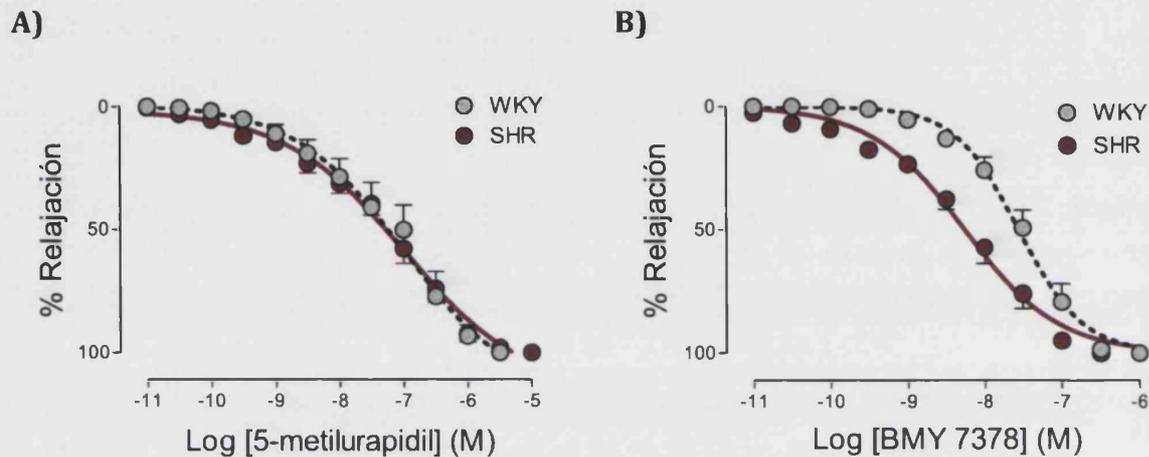
Valores expresados como la media ± e.e.m. de n = 4- 8 animales. Siendo  $E_{max}$  la máxima respuesta contráctil expresada como mN,  $pCI_{50}$  el  $-\log$  [Fenilefrina] (M) necesaria para producir el 50% de la respuesta máxima, \* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001 vs. WKY.

Con el fin de evaluar la participación de cada uno de los subtipos de ARs- $\alpha_1$  en la contracción de la aorta de rata hipertensa se utilizaron antagonistas selectivos de los AR- $\alpha_1$ , 5-MU (selectivo  $\alpha_{1A}$ ) y BMY 7378 (selectivo  $\alpha_{1D}$ ). Ambos antagonistas inhiben de forma concentración-dependiente, la contracción sostenida provocada por la FE en la aorta. Tal y como se muestra en la Tabla XII y en la Figura 21, se observa un aumento significativo en la potencia ( $pCI_{50}$ ) del BMY 7378, antagonista selectivo  $\alpha_{1D}$ , en aortas de animales adultos SHR frente WKY confirmando un mayor rol funcional para éste subtipo previamente descrito en aortas de rata adulta hipertensa pero no en ratas jóvenes (resultados previos, Gisbert y cols., 2002). Sin embargo, no se observó un cambio parecido con el 5-MU, antagonista selectivo  $\alpha_{1A}$  (Tabla XII y Figura 21).

**Tabla XII.** Parámetros obtenidos de las curvas concentración-respuesta de relajación por antagonistas selectivos  $\alpha_1$  (5-Metilurapidil y BMY 7378) en aorta de rata WKY y SHR adulta.

Adultas (16 semanas)			
		WKY	SHR
5-Metilurapidil	$pCI_{50}$	6,81 ± 0,22	7,05 ± 0,12
	$E_{max}$ (%)	100	100
BMY 7378	$pCI_{50}$	7,55 ± 0,03	8,26 ± 0,06***
	$E_{max}$ (%)	100	100

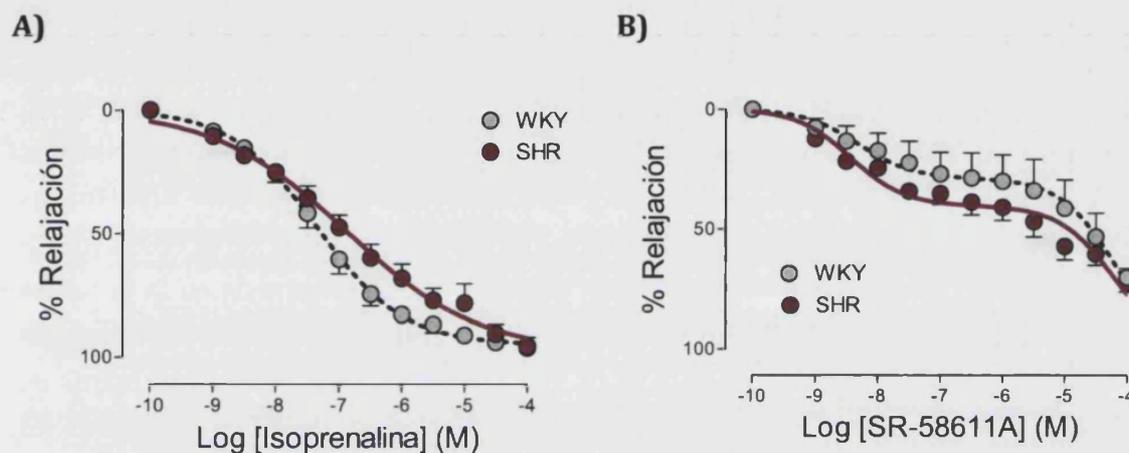
Valores expresados como la media ± e.e.m. de n = 4 - 8 animales. Siendo la  $pCI_{50}$  el  $-\log$  [antagonista] (M) necesaria para inhibir el 50% de la respuesta contráctil máxima; \*\*\* P < 0,001 vs. WKY.



**Figura 21.** Curvas acumulativas concentración-respuesta de relajación por antagonistas selectivos  $\alpha_1$ -adrenérgicos: 5-Metilurapidil (A) y BMY 7378 (B) en aorta contraída por Fenilefrina. Los experimentos se llevaron a cabo en aortas aisladas de ratas adultas SHR y WKY. Valores expresados como la media  $\pm$  e.e.m. de  $n = 4 - 8$  experimentos.

#### 1.4.3.2 Evaluación de la actividad $\beta$ -adrenérgica

Para evaluar la repercusión de los cambios observados tanto a nivel de ARNm como de proteína, realizamos curvas concentración-respuesta con diferentes agonistas  $\beta$ -adrenérgicos. Al igual que para las ratas jóvenes, Isoprenalina (agonista  $\beta_1/\beta_2$ ) y SR58611A (agonista  $\beta_3$ ) relajan de manera concentración-dependiente la contracción sostenida que produce la FE. En este caso, Isoprenalina muestra una potencia menor en los animales SHR comparando con sus controles WKY (Tabla XIII, Figura 22A). Las curvas de relajación para el SR58611A, agonista selectivo  $\beta_3$ , también fueron bifásicas y discriminaban dos poblaciones de AR- $\beta$  de elevada y baja potencia (Tabla XIII, Figura 22B), indicando el rol funcional de una población mixta de AR- $\beta_3$  y  $\beta_1/\beta_2$  en la aorta de rata adulta, al igual que ocurría en rata joven, con la diferencia de que en la aorta de ratas adultas hipertensas, se encontró un aumento significativo de la fracción de alta potencia para el SR58611A, sugiriendo un elevado rol funcional para el subtipo  $\beta_3$  en este grupo de animales (Tabla XIII).



**Figura 22.** Curvas acumulativas concentración-respuesta de relajación por agonistas selectivos  $\beta$ -adrenérgicos: Isoprenalina (A) y SR58611A (B) en aorta contraída por Fenilefrina. Los experimentos se llevaron a cabo en aortas aisladas de ratas adultas SHR y WKY. Valores expresados como la media  $\pm$  e.e.m. de  $n = 4 - 8$  experimentos.

**Tabla XIII.** Parámetros obtenidos de las curvas concentración-respuesta de relajación por agonistas de los AR- $\beta$  (Isoprenalina y SR58611A) en aorta de rata WKY y SHR adulta previamente contraída con FE.

		Adultas (16 semanas)	
		WKY	SHR
Isoprenalina	$pCE_{50}$	$7,41 \pm 0,02$	$7,03 \pm 0,07^{**}$
	$E_{max}$ (%)	$96,3 \pm 2,1$	$95,5 \pm 3,4$
SR58611A	$pCE_{50}$ (1)	$8,41 \pm 0,06$	$8,61 \pm 0,06$
	$pCE_{50}$ (2)	$4,63 \pm 0,05$	$5,08 \pm 0,07$
	% (1)	$35,4 \pm 0,9$	$50,1 \pm 1,4^{***}$
	$E_{max}$ (%)	$70,3 \pm 3,8$	$72,7 \pm 3,6$

Valores expresados como la media  $\pm$  e.e.m. de  $n = 4 - 8$  animales. Siendo la  $pCE_{50}$  el  $-\log$  [agonista] (M) necesaria para producir el 50% de la respuesta relajante máxima; la  $pCE_{50}$  (1) y  $pCE_{50}$  (2) representan la potencia del agonista testado en cada subpoblación de receptores cuando la curva ajustada a dos sitios de unión fue estadísticamente significativa; % (1) es la fracción de receptores correspondientes al sitio de alta potencia;  $** P < 0,01$ ,  $*** P < 0,001$  vs. WKY.

#### 1.4.4 CAMBIOS EN RATAS HIPERTENSAS POR TRATAMIENTO CON L-NAME

##### 1.4.4.1 Evaluación de la actividad $\alpha_1$ -adrenérgica

Al evaluar la respuesta contráctil máxima de la aorta de rata Wistar frente a FE y frente a KCl, vemos como en ratas adultas LNHR la respuesta contráctil se encuentra disminuida (Tabla XIV), siendo esta vez el porcentaje de contracción para KCl del 84,5 % y para FE del 67,1 %, evidenciando el deterioro de la maquinaria contráctil de la aorta, resultados similares a los obtenidos en ratas espontáneamente hipertensas (SHR). En este caso, la  $pCE_{50}$  de FE fue significativamente menor en ratas LNHR frente a las Wistar del grupo control (Tabla XIV y Figura 23A). La diferencia en la potencia de la FE no está acompañada de cambios en la recuperación del tono basal, después de eliminar el agonista del medio (Figura 23B). Tampoco se observaron cambios después de eliminar del medio la solución despolarizante de KCl (resultados no mostrados).

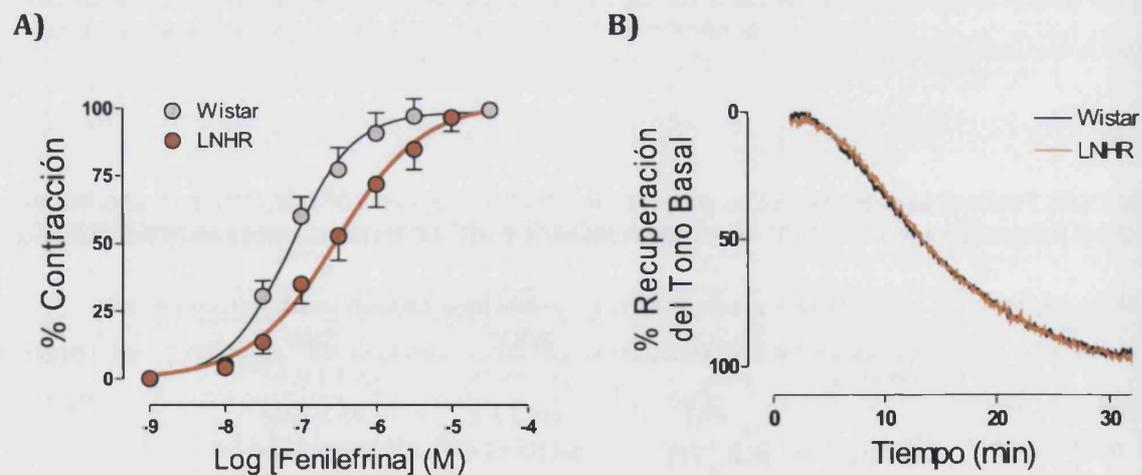


Figura 23. (A) Curvas acumulativas concentración-respuesta de contracción por Fenilefrina. (B) Tiempo de recuperación del tono basal desde la respuesta contráctil máxima después de eliminar el agonista del medio. Los experimentos se llevaron a cabo en aortas aisladas de ratas adultas hipertensas (LNHR) y sus controles (Wistar). Valores expresados como la media  $\pm$  e.e.m. de  $n = 17-19$  experimentos.

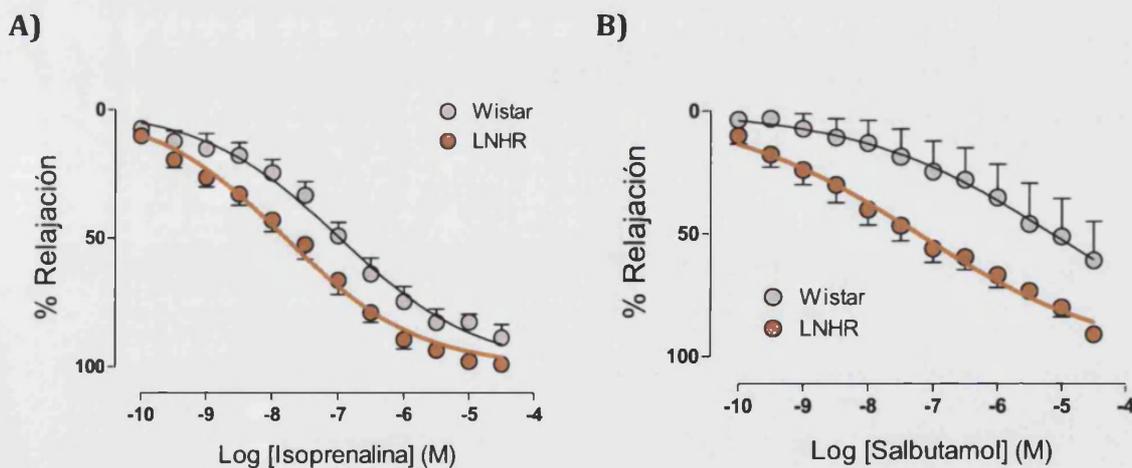
**Tabla XIV.** Parámetros obtenidos de las curvas concentración-respuesta de contracción por FE y la respuesta contráctil máxima obtenida con la solución despolarizante (80 mM KCl) en aorta aislada de ratas Wistar control y tratadas con L-NAME (LNHR) adultas.

		Ratas Wistar Adultas	
		Wistar	LNHR
KCl	$E_{max}$	$7,47 \pm 0,31$	$6,31 \pm 0,31^*$
Fenilefrina	$E_{max}$	$7,02 \pm 0,26$	$4,71 \pm 0,31^{**}$
	$pCE_{50}$	$7,13 \pm 0,08$	$6,52 \pm 0,17^{***}$

Valores expresados como la media  $\pm$  e.e.m. de  $n = 17-19$  animales.  $E_{max}$  es la máxima respuesta contráctil expresada como mN de contracción,  $pCE_{50}$  el  $-\log [Fenilefrina] (M)$  necesaria para producir el 50% de la respuesta máxima, \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  vs. respectivos controles Wistar.

#### 1.4.4.2 Evaluación de la actividad $\beta$ -adrenérgica

Para evaluar la actividad  $\beta$ -adrenérgica en ratas adultas hipertensas por tratamiento crónico con L-NAME, hemos utilizado los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos Isoprenalina ( $\beta_1/\beta_2$ ) y Salbutamol (agonista selectivo  $\beta_2$ ). Ambos agonistas relajan de manera concentración-dependiente la contracción sostenida que produce la FE. Tanto Isoprenalina como el agonista selectivo  $\beta_2$ , Salbutamol, muestran una elevada potencia en ratas adultas hipertensas LNHR comparando con sus controles Wistar (Tabla XV; Figuras 24A y 24B).



**Figura 24.** Curvas acumulativas concentración-respuesta de relajación por agonistas selectivos  $\beta$ -adrenérgicos: Isoprenalina (A) y Salbutamol (B) en aorta contraída por Fenilefrina. Los experimentos se llevaron a cabo en aortas aisladas de ratas adultas, LNHR y sus controles (Wistar). Valores expresados como la media  $\pm$  e.e.m. de  $n = 4 - 7$  experimentos.

**Tabla XV.** Parámetros obtenidos de las curvas concentración-respuesta de relajación por agonistas de los AR- $\beta$  Isoprenalina y Salbutamol en aorta de rata Wistar y LNHR previamente contraída con FE.

		Ratas Wistar adultas	
		Wistar	LNHR
Isoprenalina	$E_{\max}$ (%)	77,9 $\pm$ 4,1	99,1 $\pm$ 0,9**
	$pCE_{50}$	6,98 $\pm$ 0,09	7,80 $\pm$ 0,07***
Salbutamol	$E_{\max}$ (%)	48,2 $\pm$ 8,3	89,9 $\pm$ 1,9**
	$pCE_{50}$	5,16 $\pm$ 0,33	7,24 $\pm$ 0,10***

Valores expresados como la media  $\pm$  e.e.m. de n = 17 - 18 animales.  $pCE_{50}$  es el  $-\log$  [agonista] (M) necesaria para producir el 50% de la respuesta relajante máxima; \*\*\* P < 0,001 vs. control Wistar.

## 2 ADRENOCEPTORES Y GRKS EN LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR HUMANA

### 2.1 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA

#### 2.1.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS Y ANTROPOMÉTRICAS

Un total de 72 individuos fueron incluidos en el presente estudio. La edad media de la población total incluida fue de  $48 \pm 2$  años con un rango de edades comprendidas entre los 16 y los 67 años. Los datos antropométricos relativos al peso (Kg), talla (cm), y al Índice de masa corporal (IMC,  $\text{Kg}/\text{m}^2$ ) se representan en la Tabla XVI. Del total de los individuos incluidos en el estudio, 46 fueron hombres y 26 mujeres. El número de individuos mujeres fue menor debido a la menor incidencia de insuficiencia cardiaca en fase terminal y trasplante cardiaco en la mujer en dicho rango de edades. Tal y como se puede observar en la Tabla XVI, la distribución de los grupos fue semejante, difiriendo únicamente en talla y peso, siendo ligeramente inferiores para las mujeres, tal y como era de esperar entre un grupo de hombres y mujeres de un mismo rango de edad.

**Tabla XVI.** Características demográficas y antropométricas medias de toda la población incluida en el estudio en función de género.

	Hombres	Mujeres	Población Total
Edad (años)	$48 \pm 2$	$47 \pm 3$	$48 \pm 2$
[Rango de Edad]	[16 - 64]	[17- 67]	[16 - 67]
Individuos (n)	46	26	72
Peso (Kg)	$79,6 \pm 2,0$	$68,0 \pm 3,3^{**}$	$76,0 \pm 1,7$
Talla (cm)	$171 \pm 1$	$161 \pm 2^{***}$	$168 \pm 1$
IMC ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	$27,3 \pm 0,7$	$26,3 \pm 1,5$	$27,0 \pm 0,6$

Los valores se expresaron como la media  $\pm$  e.e.m de  $n = 26-46$  pacientes incluidos en el estudio. Siendo  $** P < 0,01$ ,  $*** P < 0,001$  vs. Hombres según el test de  $t$  de Student de variables independientes. IMC indica el Índice de Masa Corporal.

La población total incluida se distribuyó en 6 grupos diferentes según la patología cardiovascular diagnosticada. El primer grupo denominado grupo control se compuso de 10 voluntarios sanos sin ninguna patología cardiovascular asociada. Los 3 siguientes grupos se incluyen dentro del estudio sobre la HTA, siendo un grupo de pacientes con hipertensión clínica aislada, un grupo de pacientes con HTA, y un tercer grupo de pacientes con HTA recibiendo tratamiento con IECAs o ARAII. Los dos grupos restantes se incluyen en el estudio sobre la IC, siendo el primero de ellos un

grupo de pacientes aquejados de IC en fase terminal, y por ultimo un grupo de pacientes sometidos a trasplante cardiaco tras haber padecido una IC no recuperable. Las características antropométricas y demográficas de los diferentes grupos se compararon usando el test de medias múltiples de *Dunnnett* que mostró únicamente una diferencia significativa en la edad de los pacientes hipertensos que recibían tratamiento. Todas las características: edad, rango de edades, número de individuos hombre y mujer, peso, talla e IMC se muestran en la Tabla XVII.

**Tabla XVII.** Características demográficas y antropométricas de la población según grupos de patología cardiovascular estudiados.

	Control	Hipertensión Clínica Aislada	Hipertensión	Hipertensión tratada	Insuficiencia Cardiaca	Trasplante Cardiaco
Edad (años)	41 ± 5	43 ± 8	46 ± 3	59 ± 2*	49 ± 5	47 ± 4
[Rango de Edad]	[23 - 64]	[24 - 63]	[31 - 60]	[52 - 67]	[17 - 63]	[16 - 63]
Hombre/Mujer (n)	7 /3 (10)	2/3 (5)	8/7 (15)	4/6 (10)	11/3 (14)	13/4 (17)
Peso (Kg)	80,7 ± 5,8	82,2 ± 4,0	81,3 ± 4	79,7 ± 5,6	74,8 ± 3,9	67,5 ± 3,2
Talla (cm)	172 ± 2	161 ± 4	171 ± 2	163 ± 3	167 ± 2	168 ± 2
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27,5 ± 1,3	30,1 ± 1,8	27,7 ± 1,0	28,4 ± 1,3	26,8 ± 1,5	24,1 ± 0,8

Los valores se expresaron como la media ± e.e.m de n= 5 - 17, según grupos, de un total de 72 pacientes incluidos en el estudio. Siendo \* P < 0,05 vs. grupo control según el test de *Dunnnett* de comparación múltiple. IMC indica el Índice de Masa Corporal.

## 2.1.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Para facilitar el análisis de las características clínicas de los pacientes hemos separado los seis grupos en tres bloques diferenciados: pacientes con HTA, pacientes con IC y pacientes sometidos a trasplante cardiaco. Cada bloque con diferentes variables analizadas según nos proporcionaron las unidades de hipertensión o de Insuficiencia cardíaca y trasplante.

### 2.1.2.1 Población con Hipertensión arterial

Las principales variables clínicas (hemodinámicas y bioquímicas) analizadas y factores de riesgo cardiovascular de cada grupo se presentan en la Tabla XVIII.

**Tabla XVIII.** Características hemodinámicas, y bioquímicas de la población de pacientes con HTA de los diferentes grupos estudiados.

	Control	Hipertensión Clínica Aislada	Hipertensión	Hipertensión tratada
PA en el consultorio (mmHg)				
Sistólica	123 ± 2	151 ± 7***	145 ± 2***	136 ± 4**
Diastólica	76 ± 1	90 ± 6**	92 ± 2***	85 ± 3*
PA de 24 h (mmHg)				
Sistólica	122 ± 3	128 ± 3	131 ± 2*	129 ± 4
Diastólica	76 ± 3	80 ± 2	83 ± 1*	79 ± 2
PA diurna (mmHg)				
Sistólica	125 ± 4	133 ± 3	136 ± 3*	135 ± 4
Diastólica	79 ± 3	84 ± 1	87 ± 2*	83 ± 2
PA nocturna (mmHg)				
Sistólica	113 ± 3	113 ± 6	118 ± 2	115 ± 3
Diastólica	69 ± 2	69 ± 4	72 ± 1	67 ± 3
Frecuencia cardiaca (l/min)				
24 h	75 ± 3	74 ± 2	75 ± 3	75 ± 3
diurna	78 ± 3	78 ± 2	79 ± 3	80 ± 3
nocturna	70 ± 4	64 ± 2	66 ± 3	69 ± 3
Colesterol total (mg/dL)	204 ± 9	200 ± 15	216 ± 12	205 ± 11
Colesterol HDL (mg/dL)	58,0 ± 4,8	52,8 ± 5,4	55,2 ± 2,9	56,4 ± 6,1
Colesterol LDL (mg/dL)	115 ± 4	104 ± 9	138 ± 9	135 ± 10
Triglicéridos (mg/dL)	125 ± 21	128 ± 27	114 ± 15	163 ± 33
Insulina (μU/mL)	18,3 ± 5,6	22,0 ± 4,6	12,2 ± 0,8	14,0 ± 2,9
Glucemia (mg/dl)	100 ± 3	104 ± 6	97 ± 2	118 ± 10
Hemoglobina (g/L)	14,4 ± 0,2	14,8 ± 0,5	15,0 ± 0,43	14,0 ± 0,34
HbA1c (%)	5,47 ± 0,12	5,87 ± 0,23	5,83 ± 0,09	6,93 ± 0,42**
Adrenalina (pg/mL)	52,9 ± 7,7	50,0 ± 7,5	32,5 ± 3,8*	38,0 ± 4,7
Noradrenalina (pg/mL)	396 ± 78	304 ± 41	481 ± 103	469 ± 73
Dopamina (pg/mL)	30,7 ± 6,9	31,7 ± 7,8	32,6 ± 2,7	24,2 ± 3,9
Aldosterona (pg/mL)	96,7 ± 7,7	151,3 ± 42,9	85,5 ± 10,1	96,0 ± 28,0
Homocisteína (nmol/mL)	7,15 ± 0,55	6,97 ± 0,72	8,20 ± 1,00	11,00 ± 1,29
EUA (mg/24 h)	5,57 ± 1,19	50 ± 45	64 ± 35	86 ± 39
Creatinina (mg/dL)	0,89 ± 0,04	0,77 ± 0,07	0,82 ± 0,04	0,82 ± 0,05
ACr (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	123 ± 14	117 ± 13	118 ± 12	128 ± 16

PA indica presión arterial; HDL, lipoproteína de alta densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; HbA1c, hemoglobina glicosilada; EUA, excreción urinaria de albumina, ACr, aclaramiento de creatinina. Los valores se expresaron como la media ± e.e.m de n = 40, Siendo \* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001 vs. grupo control.

Tal y como era de esperar, se observaron cambios significativos en los valores de presión arterial en los tres grupos de pacientes hipertensos frente a los voluntarios sanos. Lo mismo ocurre cuando se observa la excreción urinaria de albúmina en cada grupo. Además, no hay diferencias relevantes entre grupos en términos de frecuencia cardíaca, perfil lipídico, niveles de glucosa en ayunas y otras variables bioquímicas, confirmando así la ausencia de otras patologías o alteraciones que puedan actuar como factores de confusión.

Es interesante destacar que la población de estudio es relativamente joven, y que los pacientes se encuentran en una fase inicial del estado hipertensivo (en el límite de la normalidad o hipertensión leve grado 1), en el que aún no se han dado aumentos significativos en los niveles de catecolaminas circulantes (noradrenalina, adrenalina o dopamina). De hecho, incluso se llega a observar de forma significativa un ligero descenso en los niveles de adrenalina en el grupo de pacientes hipertensos.

#### **2.1.2.2 Población con Insuficiencia cardíaca y Trasplante cardíaco**

La población objeto de estudio se distribuyó en dos grupos: pacientes con insuficiencia cardíaca (IC), en fase terminal o clase IV según la clasificación de la NHYA (n=14), y pacientes que tras padecer una IC en fase terminal fueron sometidos a trasplante cardíaco (n=17), tomándose las muestras en un periodo comprendido entre los 14 y los 471 días post-trasplante. Las principales variables clínicas (hemodinámicas, y eco-cardiográficas) analizadas, y los tratamientos, farmacológicos o no, de cada grupo de pacientes, se presentan en las Tablas XIX y XX, respectivamente.

**Tabla XIX.** Características clínicas de la población de pacientes con Insuficiencia cardiaca.

<b>Etiología y enfermedades asociadas</b>	<b>n (%)</b>
Etiología de la Insuficiencia cardiaca:	
- Cardiopatía Isquémica	1 (7)
- Miocardiopatía dilatada idiopática	7 (50)
- Otros	6 (43)
Hipertensión arterial	3 (21)
Diabetes mellitus	2 (14)
Fibrilación auricular crónica	4 (29)
<b>VARIABLES ECO-CARDIOGRÁFICAS</b>	
Diámetro tele-Diastólico del Ventrículo izq., DTDVI (mm)	67,4 ± 3,5
Diámetro tele-Sistólico del Ventrículo izq., DTSVI (mm)	57,4 ± 3,9
Fracción de eyección del Ventrículo izq., FEVI (%)	20,3 ± 3,0
Diámetro de la Aurícula izquierda (mm)	50,8 ± 2,5
Insuficiencia mitral moderada o grave (n (%))	6 (43)
<b>VARIABLES HEMODINÁMICAS</b>	
Gasto cardiaco, GC (l/min)	3,9 ± 0,6
Presión capilar pulmonar, PCP (mmHg)	26 ± 2
Resistencia vascular pulmonar, RVP (U. Wood)	3,3 ± 0,4
Presión media pulmonar, PMP (mmHg)	38 ± 4
<b>VARIABLES BIOQUÍMICAS</b>	
Bilirrubina (mg/dl)	1,2 ± 0,1
GOT (U/l)	44,9 ± 6,8
GPT (U/l)	52,8 ± 10,7
NT-proBNP (pg/ml [P25-P75])	7349 [2853-30657]
<b>TRATAMIENTO</b>	
<b>Tratamiento farmacológico</b>	
- Carvedilol	6 (43)
- IECAs o ARAII	9 (64)
- Digoxina	3 (21)
- Espironolactona	10 (71)
- Dobutamina	4 (29)
<b>Tratamiento no farmacológico</b>	
- Desfibrilador automático implantable	3 (21)
- Resincronización o Marcapasos biventricular	2 (14)

Los valores de las variables eco-cardiográficas y hemodinámicas se expresaron como la media ± e.e.m de un total de n= 14 pacientes incluidos en el estudio. NT-proBNP, precursor amino terminal del péptido natriurético tipo B; GOT, transaminasa glutámico oxalacética; GPT, transaminasa glutámico pirúvica.

**Tabla XX.** Características clínicas de la población de pacientes con Trasplante cardiaco.

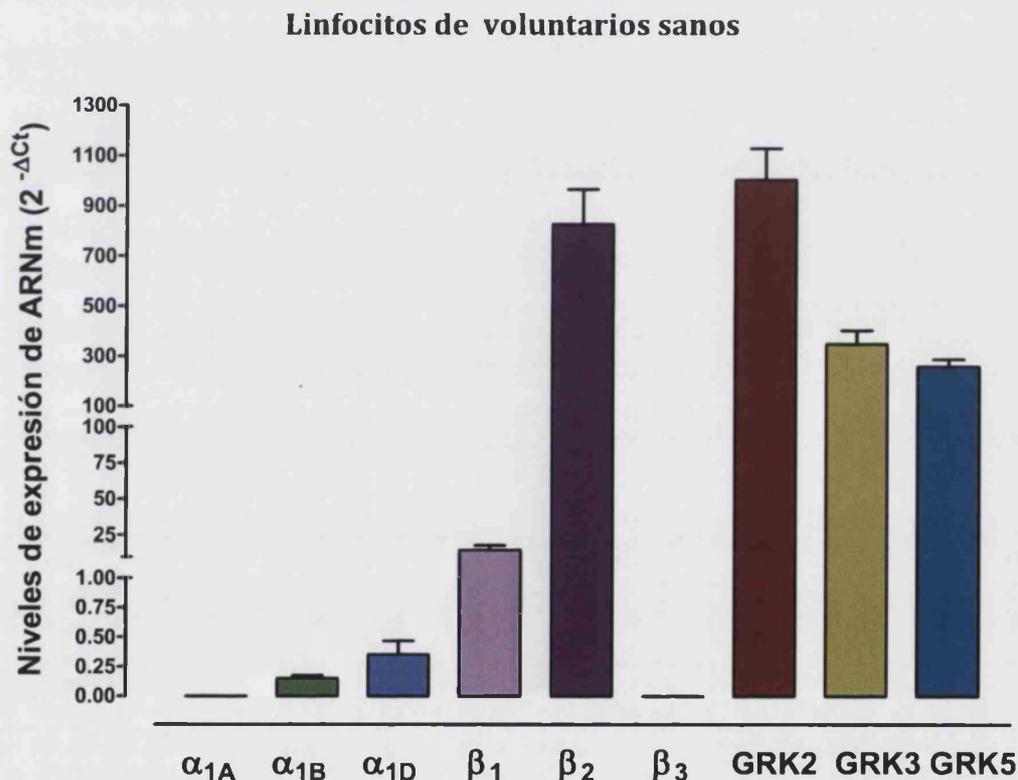
<b>Etiología y enfermedades asociadas</b>	<b>n (%)</b>
Hipertensión arterial	4 (24)
Diabetes mellitus	1 (6)
<b>VARIABLES ECO-CARDIOGRÁFICAS</b>	
Diámetro tele-Diastólico del Ventrículo izq., DTDVI (mm)	43,8 ± 1,3
Diámetro tele-Sistólico del Ventrículo izq., DTSVI (mm)	26,4 ± 1,2
Fracción de eyección del Ventrículo izq., FEVI (>50%)	17 (100)
Fracción de eyección del Ventrículo dcho., FEVD (>50%)	17 (100)
<b>VARIABLES HEMODINÁMICAS</b>	
Presión tele-sistólica del Ventrículo dcho., PTSVD (mmHg)	35 ± 2
Presión tele-diastólica del Ventrículo dcho., PTDVD (mmHg)	9 ± 1
Presión de la Aurícula dcha. (mmHg)	8 ± 1
Gasto cardiaco, GC (l/min)	3,2 ± 0,4
Presión capilar pulmonar, PCP (mmHg)	28 ± 2
Resistencia vascular pulmonar, RVP (U. Wood)	2,5 ± 0,5
Presión media pulmonar, PMP (mmHg)	35 ± 2
Frecuencia cardiaca, FC (l/min)	98 ± 1
<b>TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO</b>	
<b>Tratamiento Inmuno-modulador</b>	
- Ciclosporina A	10 (59)
- Micofenolato Mofetilo	17 (100)
- Tacrólimus	7 (41)
- Everólimus	2 (12)
- Rapamicina	1 (6)
- Esteroides	17 (100)

*Los valores de las variables eco-cardiográficas y hemodinámicas se expresaron como la media ± e.e.m de un total de n= 17 pacientes incluidos en el estudio.*

## 2.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ARs Y GRKs EN LINFOCITOS HUMANOS

### 2.2.1 GRUPO CONTROL

Para determinar los niveles de ARNm para los 6 subtipos de ARs y las tres quinasas (GRK2, GRK3 y GRK5) en linfocitos humanos circulantes obtenidos de voluntarios sanos, realizamos un análisis cuantitativo mediante RT-PCR usando la expresión de la GAPDH como gen de referencia. Los valores para los 9 genes, expresados como  $2^{-\Delta Ct}$ , están representados en la Figura 25.



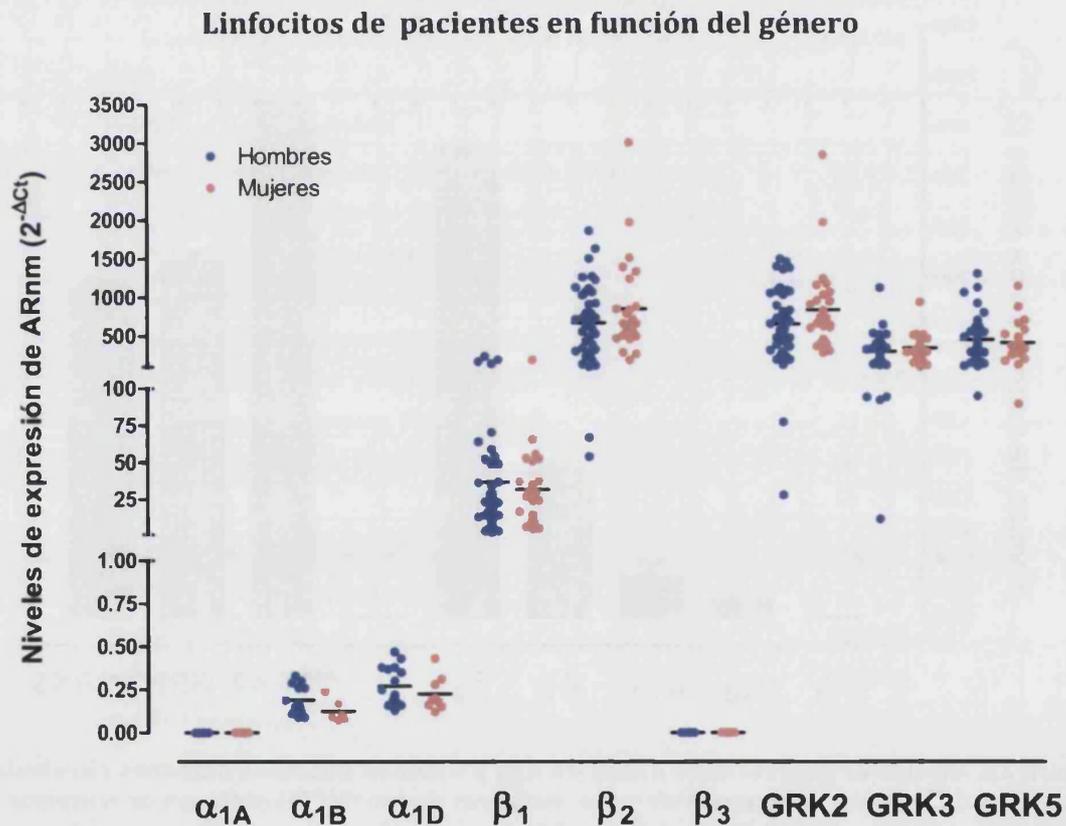
**Figura 25.** Niveles de expresión de ARNm de ARs y GRKs en linfocitos humanos circulantes obtenidos de voluntarios sanos. Valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia y expresados como la media de  $2^{-\Delta Ct} \pm e.e.m$  de  $n = 7-10$ .

Entre los 6 subtipos de ARs, el nivel máximo de expresión corresponde al  $\beta_2$ , seguido del  $\beta_1$ . Dentro de los ARs- $\alpha_1$ , claramente minoritarios, se detectó el subtipo  $\alpha_{1D}$  en mayor o igual proporción que  $\alpha_{1B}$ . Por último los subtipos  $-\alpha_{1A}$  y  $-\beta_3$  fueron prácticamente indetectables. En el caso de las GRKs, la más abundante fue la GRK2,

seguida de GRK3 y GRK5, ambas expresadas en niveles similares en linfocitos humanos. No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión entre hombres y mujeres (datos no mostrados).

### 2.2.2 CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE ARS Y GRKS EN FUNCIÓN DEL GÉNERO

El primer análisis que realizamos fue una comparativa en función del género, de los niveles de expresión génica de los ARs y las GRKs en el linfocito circulante de pacientes con patología cardiovascular y voluntarios sanos. Como se puede observar en la figura 26, no se observan cambios significativos que dependan del género.



**Figura 26.** Niveles de expresión de ARNm de ARs y GRKs en linfocitos humanos circulantes obtenidos de voluntarios sanos y pacientes con patología cardiovascular. Valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia y expresados como  $2^{-\Delta Ct}$  para los  $n = 71$  pacientes estudiados. (•) Hombres, (◻) Mujeres.

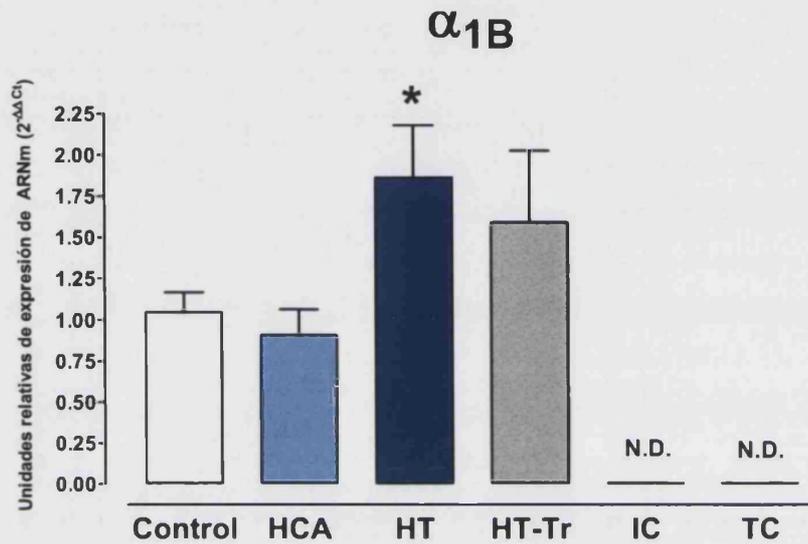
### 2.2.3 CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE ARS Y GRKS EN PATOLOGÍAS CARDIOVASCULARES

Hemos realizado un análisis comparativo de los niveles de expresión de ARNm de cada gen (excepto los subtipos  $\alpha_{1A}$  y  $\beta_3$ , prácticamente indetectables) en los 5 grupos de pacientes. Los resultados fueron normalizados según los valores del gen de referencia GAPDH y a su vez, referidos al grupo control para ser expresados como  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Dependiendo de la patología cardiovascular o del grado de la misma, se han observado pequeñas variaciones significativas. Así pues, según nos muestra la Figura 27A, vemos un aumento significativo en los niveles de expresión del AR- $\alpha_{1B}$  en pacientes hipertensos. No se observaron cambios significativos para el AR- $\alpha_{1D}$  (Figura 27B). Los niveles de ARNm para los ARs- $\alpha_1$  no fueron determinados en pacientes con IC y TC por problemas metodológicos.

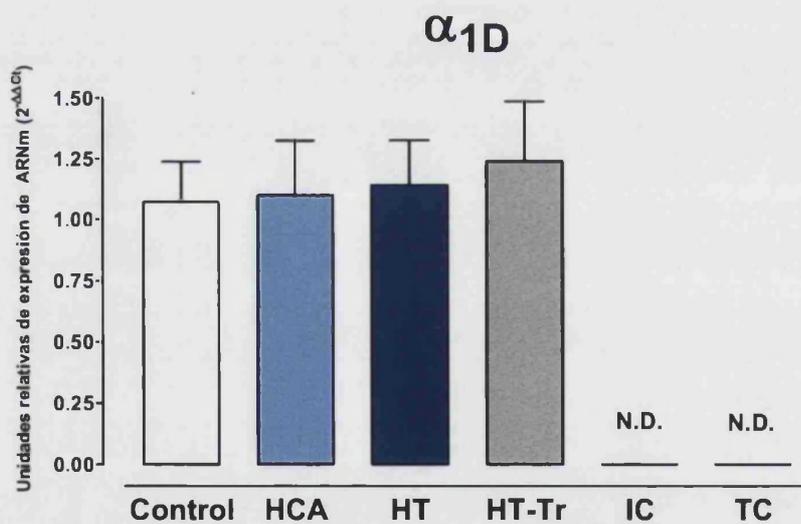
Al analizar los ARs- $\beta$  (Figura 28) vemos como se evidencia un leve aumento no significativo en los niveles de ARNm del subtipo  $\beta_1$  en pacientes con HCA, aumento que se hace significativo en pacientes con HTA desarrollada y que deja de serlo tras el tratamiento, pero que se dispara en pacientes con IC, mientras que después del trasplante continua incrementado con respecto al grupo control, pero se encuentra disminuido con respecto al grupo de pacientes insuficientes (Figura 28A). En cuanto al subtipo  $\beta_2$  únicamente observamos un aumento muy significativo ( $P < 0,001$ ) en el grupo de pacientes trasplantados (Figura 28B)

Por lo que respecta al análisis de las GRKs (Figura 29), vemos como para la GRK2 se observa una disminución muy marcada en los niveles de ARNm en el grupo de pacientes con IC respecto al grupo control, mientras que en los pacientes trasplantados sigue observándose una disminución, aunque menor, respecto al grupo control (Figura 29A). No se observaron cambios significativos para la GRK3, tan solo una tendencia no significativa a la baja en pacientes con HTA (Figura 29B). En cuanto a los niveles de ARNm de GRK5 se observa una tendencia no significativa al alza en pacientes con HTA. Esta regulación al alza se observa de forma significativa en pacientes con IC y se mantiene en pacientes trasplantados (Figura 29C).

A)

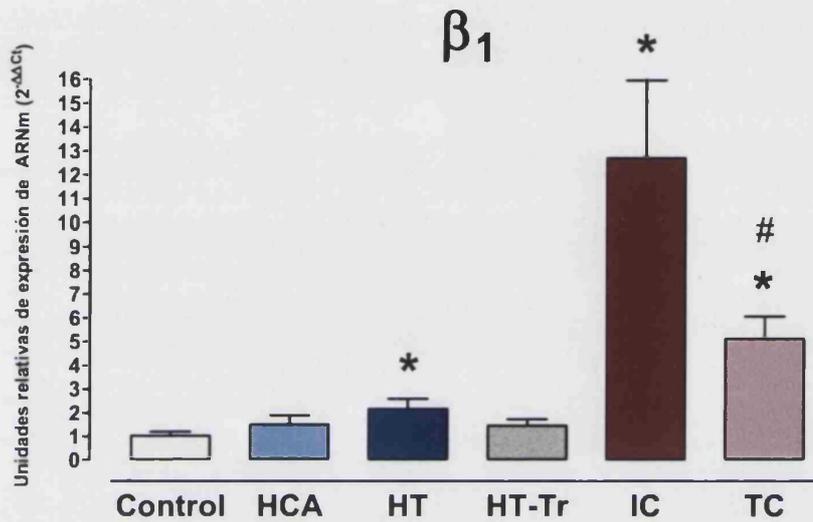


B)

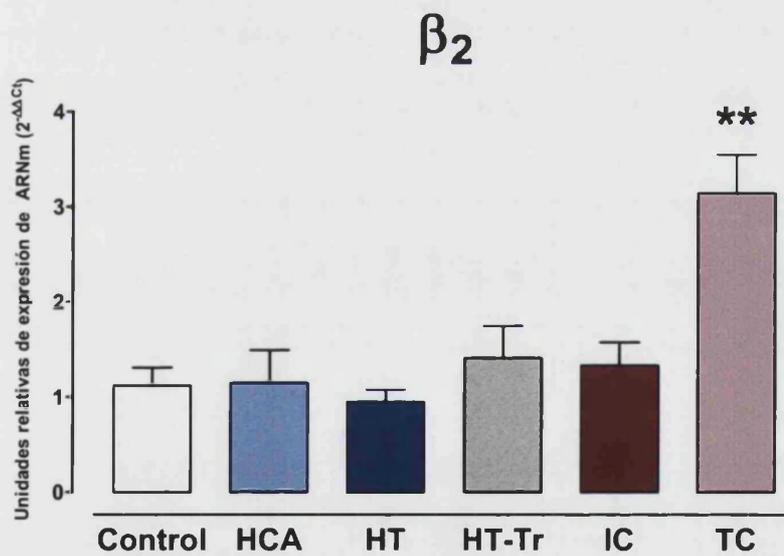


**Figura 27.** Análisis comparativo de los niveles de expresión de ARNm del AR- $\alpha_{1B}$  (A) y AR- $\alpha_{1D}$  (B) en linfocitos humanos circulantes según la patología cardiovascular. Valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia y comparados con el grupo control (voluntarios sanos o controles) expresados como la media de  $2^{-\Delta\Delta C_t} \pm e.e.m$  de  $n = 5-17$  dependiendo de cada grupo. N.D. no determinado, \*  $P < 0,05$  vs. grupo control según el test de  $t$  de Student para variables independientes.

A)

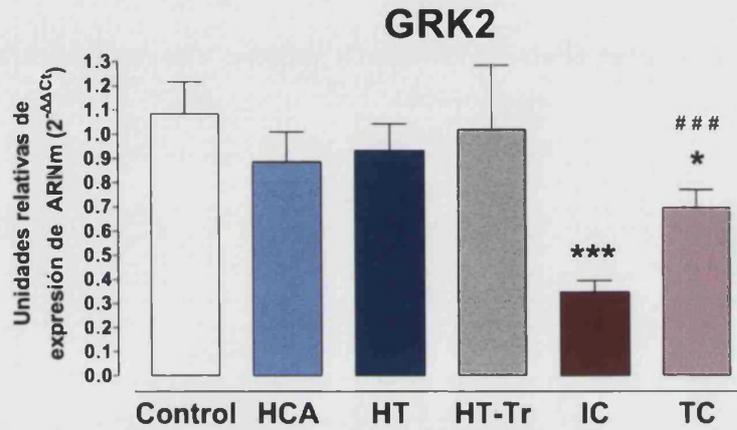


B)

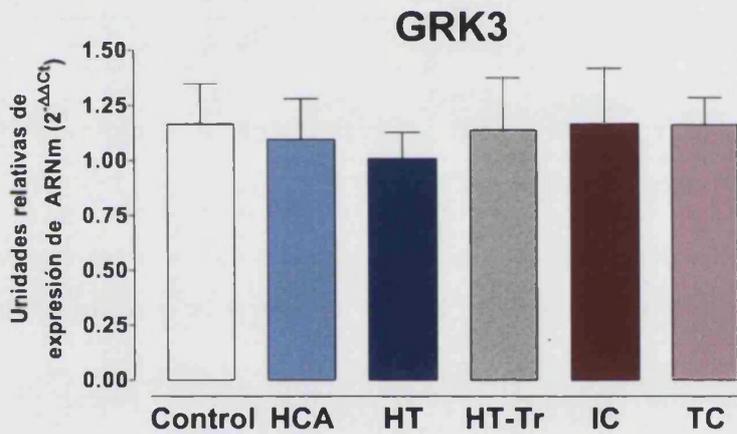


**Figura 28.** Análisis comparativo de los niveles de expresión de ARNm del AR- $\beta_1$  (A) y AR- $\beta_2$  (B) en linfocitos humanos circulantes según la patología cardiovascular. Valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia y comparados con el grupo control (voluntarios sanos o controles) expresados como la media de  $2^{-\Delta\Delta C_t} \pm e.e.m$  de  $n = 5-17$  dependiendo de cada grupo. Siendo \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  vs. grupo control, #  $P < 0,05$  vs. IC, según el test de  $t$  de Student para variables independientes.

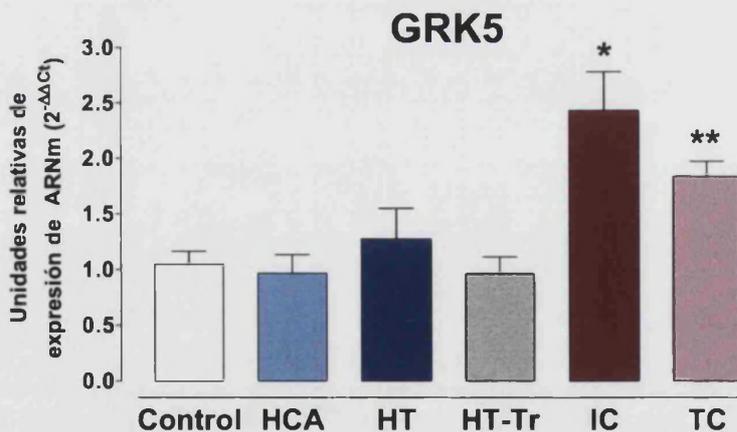
A)



B)



C)



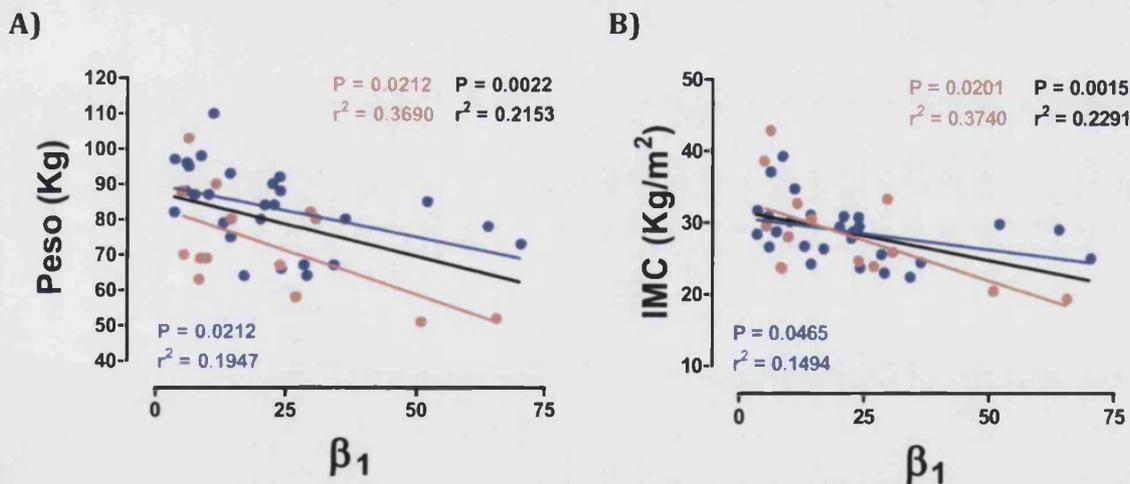
**Figura 29.** Análisis comparativo de los niveles de expresión de ARNm del GRK2 (A), GRK3 (B) y GRK5 (C) en linfocitos humanos circulantes según la patología cardiovascular. Valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia y comparados con el grupo control (voluntarios sanos o controles) expresados como la media de  $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm e.e.m$  de  $n = 5-17$  dependiendo de cada grupo. Siendo \*  $P < 0,05$ , \*\*\*  $P < 0,001$  vs. grupo control, ###  $P < 0,001$  vs. IC, según el test de t de Student para variables independientes.

## 2.3 CORRELACIONES CON VARIABLES PROPIAS DE LOS PACIENTES

Para estudiar el significado clínico de las variaciones en los niveles de expresión encontrados para los ARs y las GRKs, se realizaron análisis de regresión lineal entre los niveles de expresión de los genes estudiados en los linfocitos de los pacientes y las diferentes variables demográficas, antropométricas y clínicas analizadas en cada grupo de pacientes que se muestran en las tablas XVII-XX.

### 2.3.1 VARIABLES DEMOGRÁFICAS Y ANTROPOMÉTRICAS

Se analizaron las posibles correlaciones entre los niveles de expresión de ARNm de los cuatro ARs mayoritarios y las tres GRKs de cada individuo (población total) con sus respectivas variables demográficas y antropométricas. De todos los análisis realizados tan sólo se observaron correlaciones significativas, aunque de forma inversa, al comparar niveles de expresión del subtipo  $\beta_1$  con el peso del individuo (Kg), y en consecuencia, con el IMC (Kg/m<sup>2</sup>). En ambos casos se observa una correlación significativa con pendiente negativa e independiente del género (Figura 30).

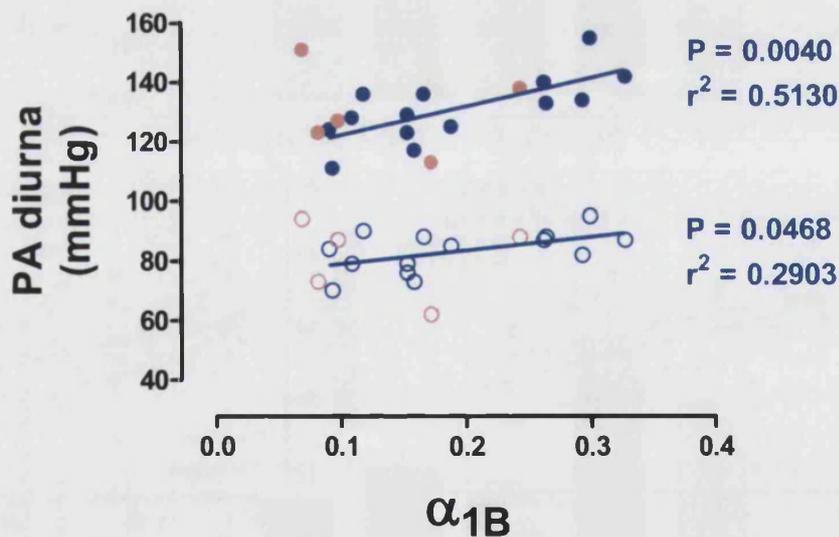


**Figura 30.** Regresión lineal entre los niveles de expresión de ARNm del AR- $\beta_1$  en linfocitos humanos frente al Peso (A) y frente a los valores de Índice de masa corporal (IMC) (B). Valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia y expresados como  $2^{-\Delta Ct}$  para los  $n = 14 - 41$  pacientes estudiados. (•) Hombres, (■) Mujeres, línea negra (toda la población), línea continua (correlaciones significativas).

### 2.3.2 VARIABLES HEMODINÁMICAS Y ECO-CARDIOGRÁFICAS

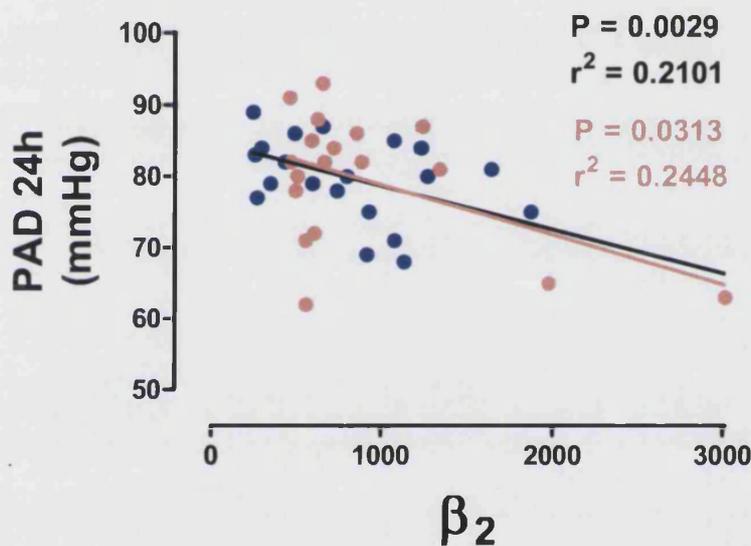
Del total de variables hemodinámicas y eco-cardiográficas analizadas (mostradas todas ellas en las tablas XVII, XIX y XX), tan sólo haremos mención de aquellas en las que dio significativo el análisis de regresión lineal con los niveles de expresión de ARNm de alguno de los cuatro ARs mayoritarios o de las tres GRKs.

Para empezar, en los diferentes grupos de pacientes con HTA además del grupo control, observamos correlaciones significativas entre varios genes, la PA y la FC. La PA diurna, de forma más marcada para la PAS que para la PAD, correlaciona de forma positiva con los niveles de expresión del AR- $\alpha_{1B}$  en hombres (n=14) y en el total de la población (n=19) (Figura 31), y en consecuencia también se observa correlación positiva con la PAS de 24 horas (datos no mostrados). No ocurre lo mismo en mujeres probablemente por el escaso número de muestras disponibles (n=5).



**Figura 31.** Regresión lineal entre los niveles de expresión de ARNm en linfocitos humanos del AR- $\alpha_{1B}$  frente a los valores de Presión Arterial (PA) diurna. Valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia y expresados como  $2^{-\Delta C_t}$  para los n = 19 pacientes estudiados. (●) Hombres, (○) Mujeres, línea continua (correlaciones significativas). Los valores superiores de cada gráfica representan la PAS (círculos sólidos) y los inferiores la PAD (círculos vacíos).

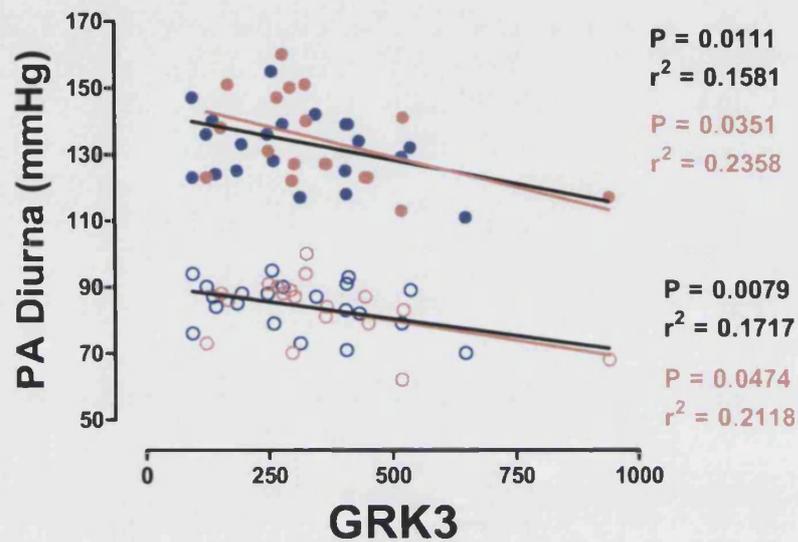
De forma significativa pero de manera inversa correlaciona la PAD de 24 horas con los niveles de expresión del AR- $\beta_2$  (Figura 32), que se produce cuando analizamos el conjunto total de la población (n=40) pero también en el grupo de mujeres (n=19). También se observa la misma correlación positiva y significativa con los valores de PAS diurna (datos no mostrados).



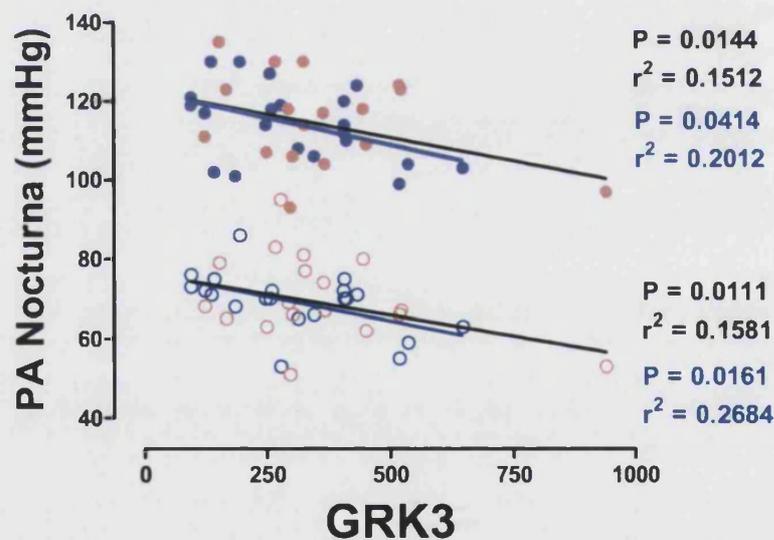
**Figura 32. Regresión lineal entre los niveles de expresión de ARNm en linfocitos humanos del AR- $\beta_2$  frente a los valores de Presión Arterial Diastólica (PAD) de 24h.** Valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia y expresados como  $2^{-\Delta Ct}$  para los n = 40 pacientes estudiados. (•) Hombres, (•) Mujeres, línea negra (toda la población), línea continua (correlaciones significativas).

Si continuamos analizando los valores de PA, comprobamos como con la GRK3, aparecen correlaciones significativas y de forma inversa entre los valores tanto de PAS como de PAD diurna y nocturna (Figura 33). En consecuencia también se observa la misma correlación con los valores de PA de 24 horas (valores no mostrados). Se observan correlaciones en el total de la población (n=40), además de en el grupo de las mujeres para la PA diurna (n=19) y en el grupo de los hombres para la PA nocturna (n=21).

A)

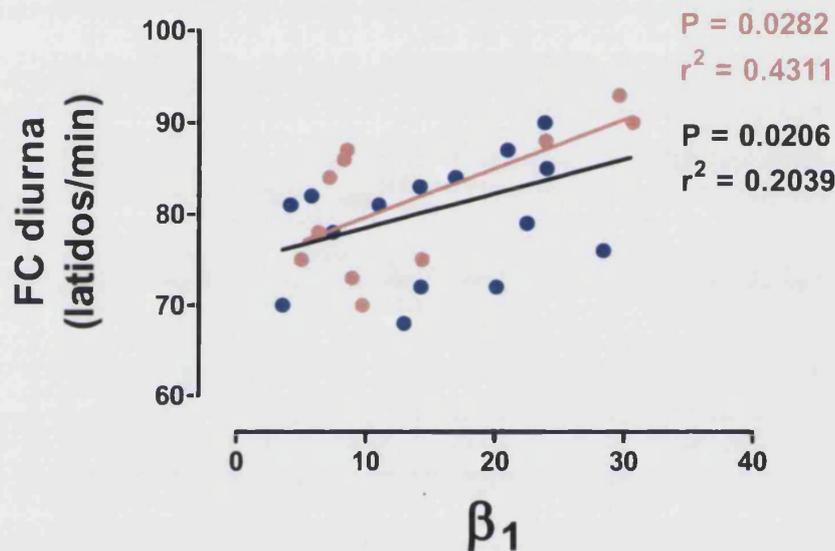


B)



**Figura 33.** Regresión lineal entre los niveles de expresión de ARNm de GRK3 en linfocitos humanos frente a los valores de Presión Arterial (PA) Sistólica y Diastólica diurna (A) y nocturna (B). Valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia y expresados como  $2^{-\Delta Ct}$  para los  $n = 40$  pacientes estudiados. (●) Hombres, (●) Mujeres, línea negra (toda la población), línea continua (correlaciones significativas). Los valores superiores de cada gráfica representan la PAS (círculos sólidos) y los inferiores la PAD (círculos vacíos).

Otra variable hemodinámica con la que hemos encontrado correlaciones significativas dentro del grupo de pacientes con HTA, es la Frecuencia Cardíaca (FC). En este caso también se observan diferencias dependientes de género. Se observa una correlación significativa entre los niveles de expresión de ARNm del AR- $\beta_1$  y la FC diurna en mujeres (n=11), pero también en el total de la población (n=26) (Figura 34).

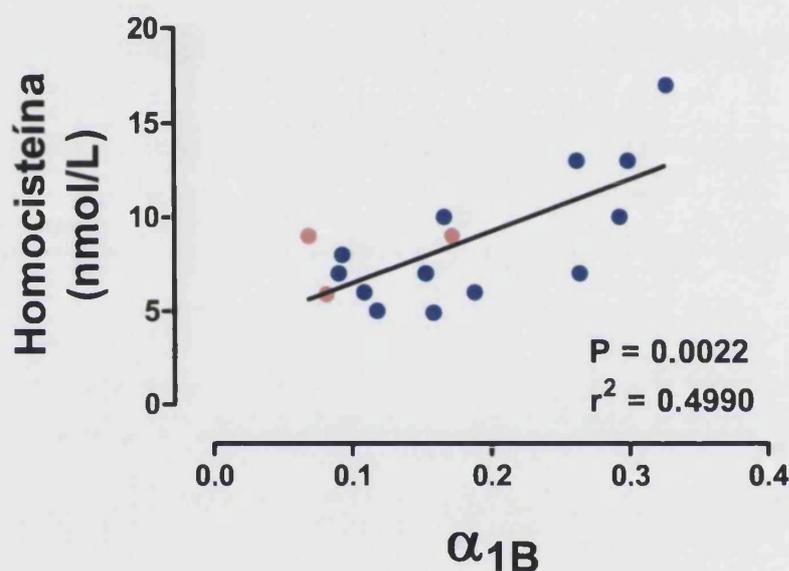


**Figura 34.** Regresión lineal entre los niveles de expresión de ARNm del AR- $\beta_1$  frente a los valores de Frecuencia Cardíaca (FC) diurna en linfocitos humanos. Valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia y expresados como  $2^{-\Delta Ct}$  para los n = 26 pacientes estudiados. (•) Hombres, (•) Mujeres, línea negra (toda la población), línea continua (correlaciones significativas).

### 2.3.3 VARIABLES BIOQUÍMICAS

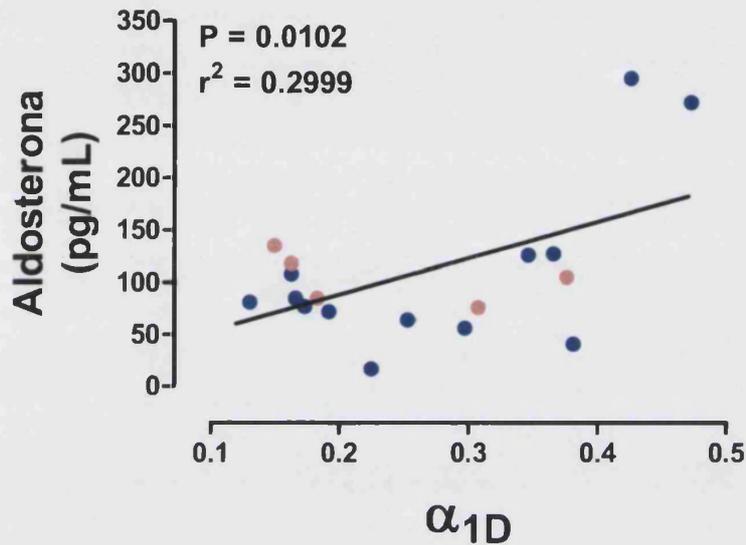
Se analizaron multitud de variables bioquímicas que evalúan el estado general del paciente y/o el riesgo cardiovascular (todas ellas mostradas en las tablas XVIII, XIX y XX). Seguidamente haremos mención a aquellas correlaciones entre niveles de ARNm y variables bioquímicas que dieron significativas según el test de regresión lineal de *Pearson*.

La primera correlación significativa que podemos observar en la Figura 35, ocurre entre los niveles de expresión del AR- $\alpha_{1B}$  y la Homocisteína plasmática (importante marcador del riesgo cardiovascular medida en pacientes con algún tipo de HTA). Dicha correlación que inicialmente se observa en hombres y en el total de la población, no se observa en mujeres probablemente debido al escaso número de muestras con ambos datos determinados.



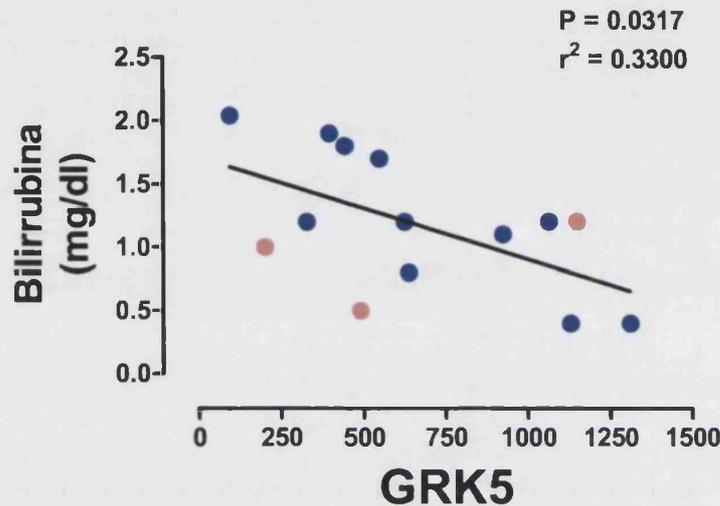
**Figura 35. Regresión lineal entre los niveles de expresión de ARNm del AR- $\alpha_{1B}$  en linfocitos humanos frente a los valores de Homocisteína plasmática.** Valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia y expresados como  $2^{-\Delta C_t}$  para los  $n = 16$  pacientes estudiados. (●) Hombres, (●) Mujeres, línea negra (correlación significativa de toda la población).

Si analizamos los valores de Aldosterona plasmática (marcador importante de la función renal medida en pacientes con HTA), vemos una correlación significativa que se produce en hombres ( $n=13$ ) y en el total de la población ( $n=19$ ) (Figura 36), no ocurre lo mismo en mujeres que, pese al bajo número de muestras ( $n=6$ ), parece seguir una tendencia opuesta, si bien dichas muestras se encuentran enmarcadas dentro de la correlación al analizar el total de la población.



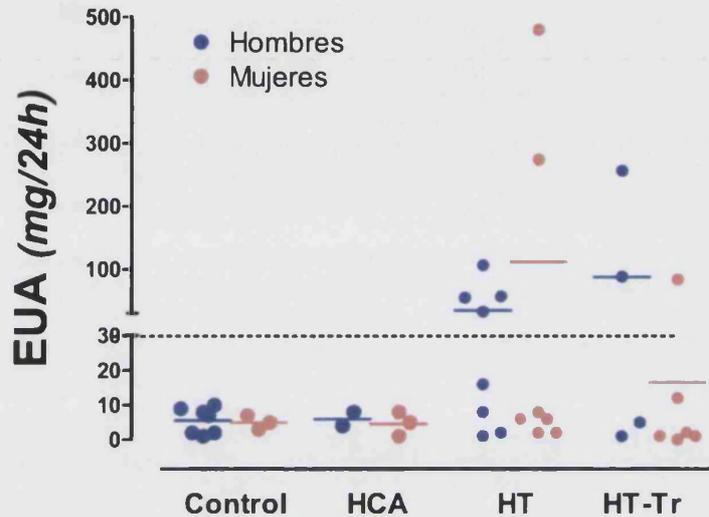
**Figura 36. Regresión lineal entre los niveles de expresión de ARNm del AR- $\alpha_{1D}$  en linfocitos humanos frente a los valores de Aldosterona plasmática.** Valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia y expresados como  $2^{-\Delta Ct}$  para los  $n = 19$  pacientes estudiados. (●) Hombres, (●) Mujeres, línea negra (correlación significativa de toda la población).

Por lo que respecta a pacientes del grupo de IC, podemos observar una sola correlación significativa que se da al analizar los niveles de expresión de GRK5 con los niveles plasmáticos de Bilirrubina (marcador de la función hepática). Se trata de una correlación inversa que se observa en el total de la población (Figura 37). No se ha podido hacer diferenciación en función del género debido a que no disponemos de un número de muestras de mujeres lo suficientemente elevado ( $n=3$ ) para sacar conclusiones de estos resultados.



**Figura 37. Regresión lineal entre los niveles de expresión de ARNm de la GRK5 en linfocitos humanos de pacientes con Insuficiencia Cardíaca frente a los valores de Bilirrubina plasmática.** Valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia y expresados como  $2^{-\Delta Ct}$  para los  $n = 14$  pacientes estudiados. (•) Hombres, (◦) Mujeres, línea negra (toda la población), línea continua (correlaciones significativas).

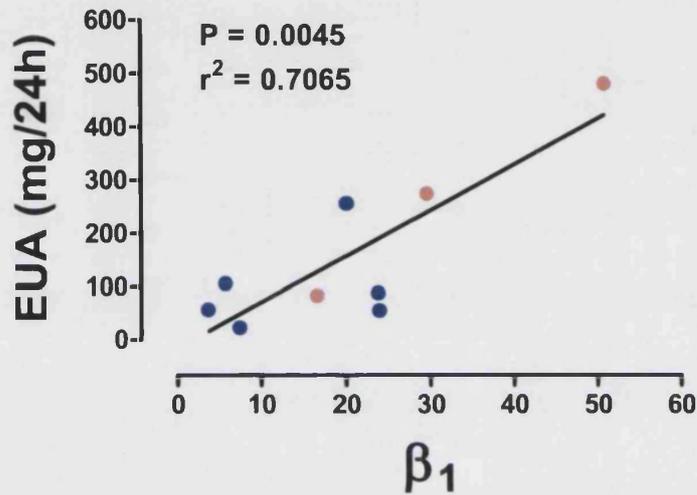
La última variable bioquímica analizada fue la excreción urinaria de albúmina (EUA), importante marcador de la función renal determinada en la orina de pacientes con HTA. Los valores de EUA fueron analizados de dos maneras. Primeramente, los pacientes fueron categorizados en dos grupos separados entre normoalbuminúricos y microalbuminúricos. Una vez la EUA fue determinada, los pacientes con microalbuminuria (EUA 30-300 mg/24h) fueron identificados tanto en el grupo de pacientes hipertensos ( $n = 6$ ) como en el grupo de pacientes hipertensos con tratamiento antihipertensivo ( $n = 3$ ). Las determinaciones individualizadas de dicho parámetro, sin diferencias significativas en función del género, se representan en la Figura 38.



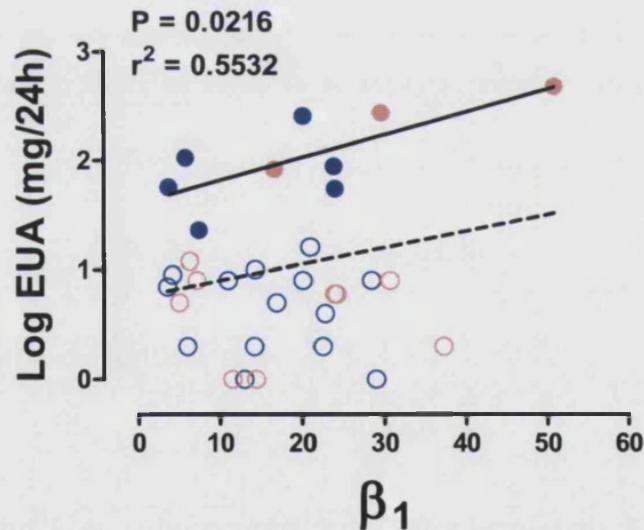
**Figura 38. Análisis comparativo de los niveles de excreción urinaria de albúmina (EUA)** entre sujetos sanos voluntarios (controles), pacientes con hipertensión clínica aislada, pacientes hipertensos, y pacientes hipertensos tratados con IECAs o ARAII. La Microalbuminuria fue definida como valores de EUA entre 30-300 mg/24h (valores por encima de la línea de puntos). (•) Hombres, (•) Mujeres.

Seguidamente se emplearon tanto los valores absolutos de EUA como la transformación logarítmica de dicha variable, en variable continua (Log EUA). El análisis de regresión lineal entre la expresión de genes y los valores de EUA, nos muestra que no existe correlación significativa para el total de la población (Figura 39B), mientras que en el grupo de pacientes microalbuminúricos sí aparece una correlación significativa entre los niveles de expresión del  $AR-\beta_1$  y la excreción urinaria de albúmina, que debido al escaso número de muestras, sólo pudo observarse en el total de la población microalbuminúrica, no pudiendo diferenciar entre población de hombres y mujeres, tanto con valores absolutos de EUA como con los valores después de la transformación logarítmica (Figura 39A y 39B, respectivamente).

A)



B)

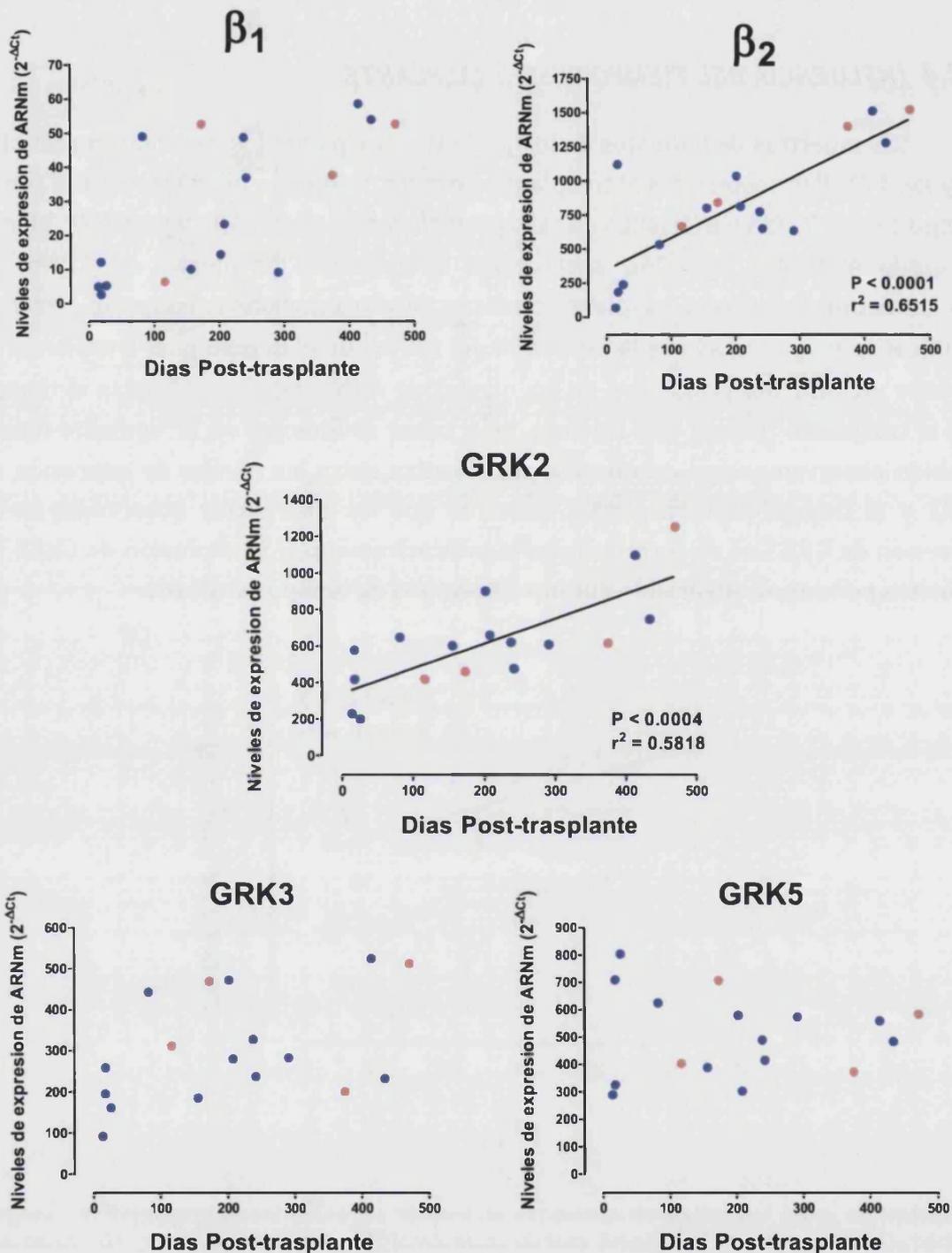


**Figura 39. Regresión lineal entre los niveles de expresión de ARNm del AR- $\beta_1$  en linfocitos humanos de pacientes normo- y microalbuminúricos frente a los valores de Excreción Urinaria de Albúmina (EUA) (A) y su transformación logarítmica, LogEUA (B).** Valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia y expresados como  $2^{-\Delta Ct}$  para los  $n = 9-32$  pacientes estudiados. (•) Hombres, (▪) Mujeres, línea negra (toda la población), línea continua (correlaciones significativas). En la gráfica (A) se representan los valores de EUA los pacientes microalbuminúricos. En la gráfica (B), se representan los valores de LogEUA en pacientes microalbuminúricos (círculo relleno) y normoalbuminúricos (círculo vacío). La línea discontinua representa el análisis del total de población de normo- y microalbuminúricos (correlación no significativa).

#### *2.3.4 INFLUENCIA DEL TIEMPO POST-TRASPLANTE*

Las muestras de linfocitos de los pacientes trasplantados se tomaron entre los 14 y los 471 días posteriores al trasplante cardiaco. Con el fin de comprobar si con el tiempo se producían variaciones en la expresión génica de los ARs y las GRKs, hemos analizado mediante regresión lineal cómo evolucionan los niveles de ARNm en función del tiempo tras el trasplante cardiaco. Observamos una correlación directa y significativa muy marcada en la expresión del AR- $\beta_2$  con el tiempo post-trasplante. Se produce un aumento progresivo en los niveles de ARNm conforme avanza el tiempo tras el trasplante (Figura 40). Además, tal y como se muestra en la siguiente figura, también observamos una correlación significativa entre los niveles de expresión de GRK2 y el tiempo post-trasplante, mientras que las diferencias observadas en la expresión de GRK3 no se correlacionan significativamente y la expresión de GRK5 en linfocitos permanece invariable durante el periodo de tiempo estudiado.





**Figura 40. Regresión lineal entre los niveles de expresión de ARNm de los AR- $\beta$  y la GRKs en linfocitos humanos de pacientes trasplantados de corazón frente al tiempo post-trasplantes. Valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia y expresados como  $2^{-\Delta Ct}$  para los  $n = 17$  pacientes estudiados. La línea continua representa las correlaciones. (•) Hombres, (•) Mujeres.**

## 2.4 CORRELACIONES ENTRE ARS Y GRKS

Hemos utilizado un análisis de regresión lineal para analizar la existencia de correlaciones entre los ARs y las GRKs que regulan su actividad en linfocitos humanos. Estas correlaciones han sido analizadas en el global de la población y haciendo diferenciación entre sexos.

Al analizar las correlaciones entre los ARs- $\beta$  y las GRKs, se encontraron correlaciones significativas ( $P < 0,001$ ) entre los niveles de expresión de ARNm del AR- $\beta_2$  con los niveles de expresión de las GRK2 y GRK3 tanto en hombres como en mujeres (Figura 42B). No se observó correlación con la expresión de la GRK5. Cuando analizamos el AR- $\beta_1$ , observamos una correlación significativa con GRK3 y GRK5 (Figura 42A), únicamente al analizar la población total sin diferenciar entre sexos (indicado en la figura mediante una línea continua de color negro).

Por lo que respecta al análisis de las correlaciones entre los niveles de ARNm de los ARs- $\alpha_1$  y las tres GRKs, en ningún caso se encontraron correlaciones significativas (Figura 41). Cabe destacar el menor número de muestras para el análisis de los ARs- $\alpha_1$  debido a que dichos ARs no fueron detectados en un gran número de muestras por problemas metodológicos.

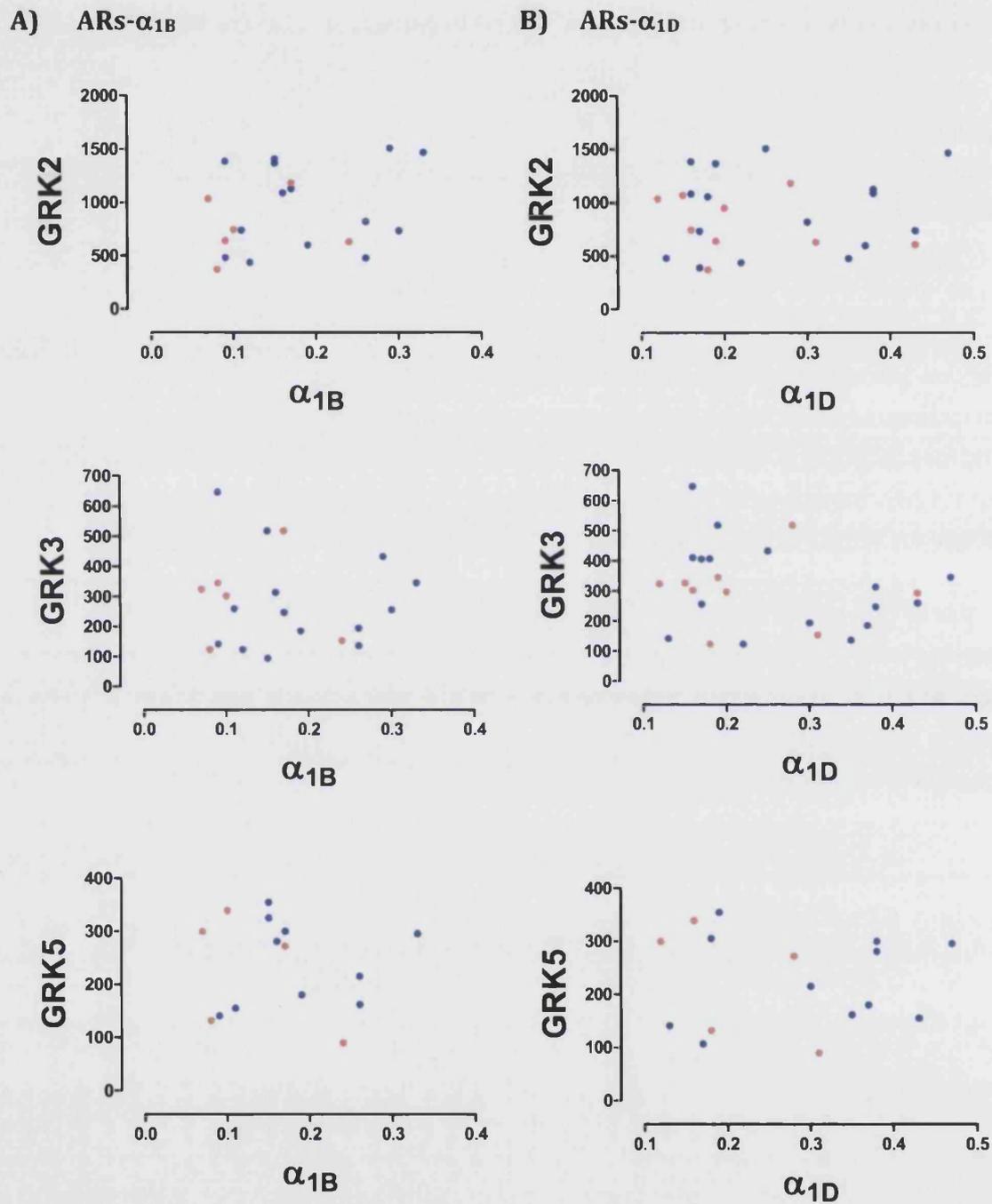


Figura 41. Regresión lineal entre los niveles de expresión de ARNm de ARs frente a las GRKs en linfocitos humanos circulantes: A) AR- $\alpha_{1B}$  vs. GRKs; B) AR- $\alpha_{1D}$  vs. GRKs. Valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia y expresados como  $2^{-\Delta Ct}$  para los  $n = 15-25$  pacientes estudiados. (•) Hombres, (◻) Mujeres.

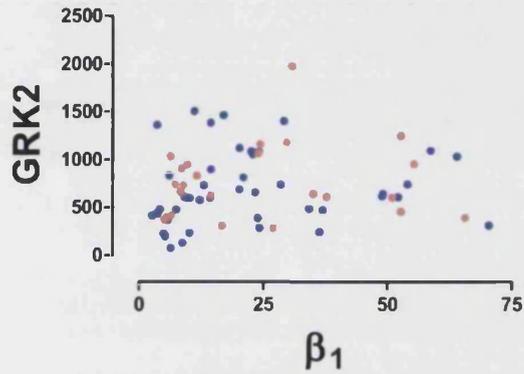
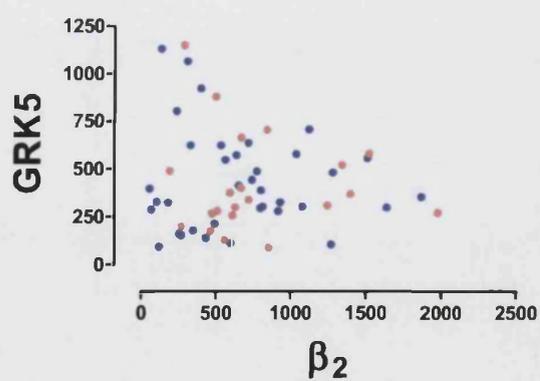
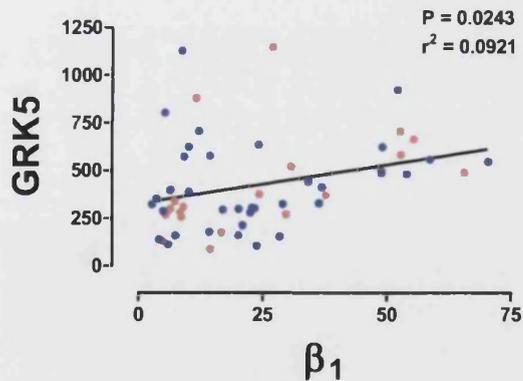
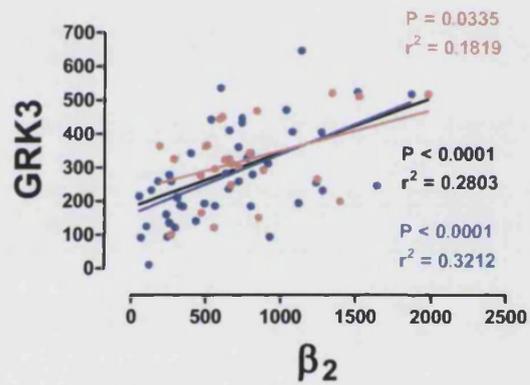
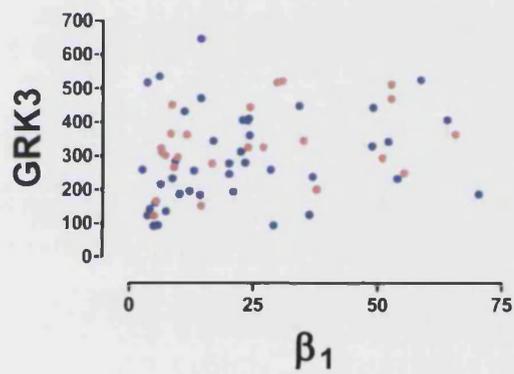
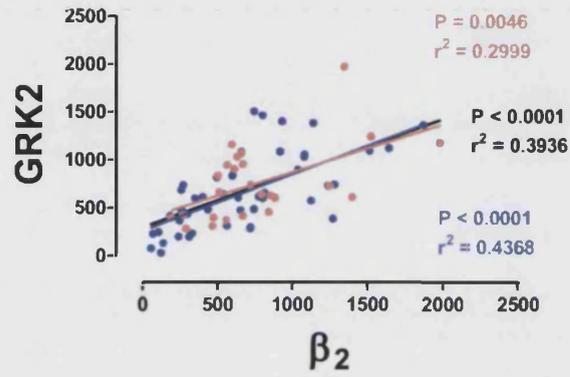
A) ARs- $\beta_1$ B) ARs- $\beta_2$ 

Figura 42. Regresión lineal entre los niveles de expresión de ARNm de ARs frente a las GRKs en linfocitos humanos circulantes: A) AR- $\beta_1$  vs. GRKs; B) AR- $\beta_2$  vs. GRKs. Valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia y expresados como  $2^{-\Delta Ct}$  para los  $n = 55-70$  pacientes estudiados. (•) Hombres, (◐) Mujeres, línea negra (toda la población), línea continua (correlaciones significativas).



# D

---

## DISCUSIÓN



## DISCUSIÓN

### 1 DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN DE ARS Y GRKS EN FUNCIÓN DE LOS TEJIDOS ANALIZADOS

Como primer paso para estudiar los cambios en la expresión y funcionalidad de los ARs- $\alpha_1$  y - $\beta$  en las distintas patologías cardiovasculares, analizamos la expresión de los seis subtipos de ARs y las tres quinasas mayoritariamente expresadas a nivel cardiovascular en distintos tejidos y células implicados en la homeostasis cardiovascular: corazón, riñón, vasos y linfocitos.

El primer aspecto a destacar es que en todos los territorios analizados detectamos la presencia de ARNm de todos los genes en mayor o menor proporción. Así pues, en aorta de rata presomina la expresión del AR- $\alpha_{1D}$  que se corresponde con el papel protagonista que dicho subtipo ejerce en la respuesta contráctil adrenérgica en este territorio (Gisbert y cols., 2000; Marti y cols., 2005). También son de señalar los resultados inesperados obtenidos para los ARs- $\beta$ , ya que en este caso el subtipo mayoritario según los niveles de ARNm sería el AR- $\beta_3$ , seguido del subtipo  $\beta_1$  y  $\beta_2$  muy cercano a este último. Aunque hasta ahora no se había realizado una determinación cuantitativa de los niveles de ARNm de los diferentes subtipos de ARs- $\beta$  en aorta de rata, estos resultados parecen contrastar con los estudios clásicos que atribuyen al subtipo  $\beta_2$  el protagonismo en la vasodilatación  $\beta$ -adrenérgica (Guimaraes y Moura, 2001) y estarían mas en concordancia con estudios recientes que evidencian la participación de los ARs- $\beta_1$  (Chruscinski y cols., 2001) y - $\beta_3$  en aorta de rata (Trochu y cols., 1999; Rautureau y cols., 2002). Sin embargo, hay que señalar que la mayor expresión del subtipo  $\beta_3$  en este vaso no implica que sea este subtipo el que mayoritariamente se exprese en las células musculares y, en este sentido, resultados obtenidos en nuestro laboratorio, indican que no es el subtipo  $\beta_3$  el que predominantemente se expresa en las células musculares aisladas de aorta, sino el  $\beta_1$  (Pérez-Aso, 2010), por lo que sería interesante determinar en qué tipo celular de este vaso se expresa el AR- $\beta_3$  en mayor proporción y cuál puede ser su papel.

En cuanto a los niveles de ARNm observados en el ventrículo izquierdo de rata, vemos como para los ARs- $\alpha_1$  el subtipo mayoritario con diferencia, tal y como estaba descrito en estudios anteriores (Graham y cols., 1996), es el AR- $\alpha_{1B}$ . Por lo que respecta a los ARs- $\beta$ , como era de esperar según su implicación en la funcionalidad

cardíaca, el subtipo mayoritariamente expresado a nivel de ARNm es el  $\beta_1$  (entre el 66-83%, según grupos de ratas), seguido del AR- $\beta_2$  (17-33%) y por último el subtipo  $\beta_3$  es prácticamente indetectable (0,7-0,1%), coincidiendo con estudios previos que describían una proporción similar entre subtipos: del 70-80% para  $\beta_1$  frente al 20-30% del  $\beta_2$  (Brodde, 1991) siendo  $\beta_3$  el minoritario (Gauthier y cols., 1996).

En el riñón también hemos detectado la presencia de ARNm para todos los genes estudiados. En ratas adultas el subtipo mayoritario dentro de los AR- $\alpha_1$ , es el  $\alpha_{1B}$  seguido muy de cerca por los otros dos subtipos  $\alpha_{1A}$  y  $\alpha_{1D}$ , tal y como se describe en la literatura (Graham y cols., 1996). Si bien el papel fisiológico de cada subtipo parece no estar del todo claro, todo indica que el subtipo mayoritario en este caso ( $\alpha_{1B}$ ) se encontraría a nivel de los túbulos renales controlando la retención de  $\text{Na}^+$  y por lo tanto favoreciendo la retención de líquidos (Elhawary y Pang, 1994), mientras que los otros dos subtipos ( $\alpha_{1A}$  y  $\alpha_{1D}$ ) controlarían el tono de las arterias renales distal y proximal respectivamente (Elhawary y cols., 1992; Villalobos-Molina y cols., 1997). En cuanto a los ARs- $\beta$ , encontramos como subtipo mayoritario el  $\beta_1$ , lo cual coincide con la literatura que habla de un rol funcional mayoritario para este subtipo, relacionado con la liberación de renina (Osborn y cols., 1981; Lakhani y cols., 1994), seguido de  $\beta_2$ , relacionado en menor medida con la liberación de renina pero sobre todo con la relajación de la arteria renal, y también en este tejido es minoritaria la expresión del subtipo  $\beta_3$ , sin efectos marcados a nivel renal (Kim y cols., 2007).

Por otro lado, nos propusimos estudiar la expresión de los ARs y las GRKs en linfocitos circulantes de ratas adultas, pero sobre todo en el ser humano. Existen pocos estudios que traten sobre la importancia de los AR- $\alpha_1$  en linfocitos y éstos resultan controvertidos. Por ejemplo, mientras unos autores niegan la existencia de estos receptores en linfocitos de sangre periférica (Casale y cols., 1984; Rouppe van der Voort y cols., 1999; Heijnen y cols., 1996), otros la afirman (Ricci y cols., 1999; Tayebati y cols., 2000), lo que podría depender del método utilizado para su detección. Con respecto a los ARs- $\beta$ , su presencia en linfocitos está más estudiada y la mayoría de autores asumen como subtipo mayoritario el  $\beta_2$  (Tayebati y cols., 2000; Veglio y cols., 2001; Kin y Sanders, 2006; Yu y cols., 2007). En la presente tesis doctoral hemos trabajado con linfocitos circulantes de ratas adultas y linfocitos humanos para intentar determinar, en este tipo celular, la presencia o no de ARNm de los diferentes ARs y las GRKs, y la abundancia relativa de sus subtipos. En ambos modelos vemos una distribución similar con alguna peculiaridad. Los resultados obtenidos usando *real time* RT-PCR demuestran la co-existencia de los tres subtipos de ARs- $\beta$  ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ , y  $\beta_3$ ) en linfocitos humanos y confirman trabajos previos empleando

métodos semi-cuantitativos (Yu y cols., 2007). El mayor nivel de expresión correspondió al subtipo  $\beta_2$ , seguido del  $\beta_1$ , y muy de lejos, en niveles prácticamente indetectables el AR- $\beta_3$ . En los linfocitos de rata WKY no se encontraron niveles detectables de ARNm para el subtipo  $\beta_3$ , y la distribución de los otros dos subtipos fue similar a la de los linfocitos humanos, siendo también el AR- $\beta_2$  el subtipo mayoritario (Loveland y cols., 1981). Aclarando el papel funcional del AR mayoritariamente expresado, se ha descrito al AR- $\beta_2$  como posible nexo de unión entre el sistema inmune y el sistema nervioso, estando además implicado en la producción de citocinas, la proliferación y la diferenciación celular (Kohm y Sanders, 2001; Kin y Sanders, 2006).

En cuanto a los ARs- $\alpha$ , no llegamos a detectar ARNm para ninguno de los subtipos en linfocitos circulantes de rata WKY adulta, mientras que si se detectaron, aunque en una proporción muy baja, en los linfocitos humanos. En este caso el subtipo mayoritariamente expresado fue el  $\alpha_{1D}$  seguido muy de cerca por el subtipo  $\alpha_{1B}$ , y por último en niveles prácticamente indetectables el subtipo  $\alpha_{1A}$ , coincidiendo con algunos de los autores que eran capaces de detectarlos (Ricci y cols., 1999; Tayebati y cols., 2000). Si bien cabe destacar que tan sólo detectamos la presencia de los ARs- $\alpha_1$  en un grupo determinado de pacientes, no habiéndose podido detectar el ARNm para los otros pacientes por problemas técnicos directamente relacionados con el bajo nivel de expresión de estos ARs en linfocitos. En general, la participación de los ARs- $\alpha_1$  en la regulación/activación de la célula inmune aún no está del todo definida (Kavelaars, 2002).

Se ha descrito la GRK2, por su implicación en la regulación de receptores de quimiocinas en el linfocito, como uno de los factores reguladores de la quimiotaxis y la respuesta celular (Vroon y cols., 2004a; Premont y cols., 2007). Nosotros hemos encontrado ARNm en linfocitos no solamente de la GRK2, quinasa mayoritaria, sino también de GRK3 y GRK5, aunque en niveles inferiores, tal y como ha sido previamente descrito (Dzimiri y cols., 2002; Iaccarino y cols., 2005; Hata y cols., 2006). Estudios futuros deberán aclarar el papel, dentro de la regulación propia del linfocito, de las otras dos quinasas (GRK3 y GRK5) presentes en estas células del sistema inmune.

Las tres GRKs comparten ciertas características pero son enzimas diferentes con funciones y propiedades reguladoras específicas (Oppermann y cols., 1996; Bünemann y cols., 1999; Penela y cols., 2006). Mientras que el papel de GRK2 en la regulación de los ARs- $\beta$  ha sido muy estudiado, la especificidad de las otras isoformas de GRKs para los diferentes GPCRs humanos, aún no está del todo clara. Trabajos

anteriores, realizados en ratones modificados genéticamente, revelaron que la sobre-expresión selectiva de GRK2 y GRK5 en miocardio producía un deterioro de la respuesta contráctil mediada por los ARs- $\beta$ , mientras que la sobre-expresión cardiaca de GRK3 se caracterizaba por una actividad normal para el mismo receptor (Vinge y cols., 2008). Estos resultados pueden interpretarse como una desensibilización específica del AR- $\beta$  cardiaco (principalmente del subtipo  $\beta_1$ ) mediada por GRK2 y GRK5, pero no por GRK3. Por otro lado, se ha sugerido que GRK3 y GRK5 podrían estar regulando la actividad del AR- $\alpha_{1B}$  cardiaco (Rockman y cols., 1996; Eckhart y cols., 2000; Vinge y cols., 2008), aunque por el momento existe bastante controversia en el campo, lo que abre la puerta a futuras investigaciones respecto a la especificidad de una determinada quinasa sobre un determinado receptor y en un determinado tipo celular. Definir la especificidad de cada una de las GRKs en la regulación de la multitud de GPCRs existentes, dependiendo del tejido o tipo celular que se trate, será determinante para conocer las vías que puedan estar alteradas en cada uno de esos tejidos y en determinadas patologías.

Para tratar de hacer una nueva aproximación experimental al problema y analizar la posible especificidad entre cada una de las GRKs y los ARs- $\alpha_1$  y - $\beta$  humanos, hemos realizado un análisis de la existencia o no de una correlación entre los niveles de expresión de un determinado receptor y cada una de las tres GRKs estudiadas, suponiendo que la existencia de una correlación significativa entre la expresión de dos genes (una GRK y un AR) implicaría un sistema de regulación común y nos indicaría, de una forma indirecta, la existencia de una actividad específica de la quinasa sobre el receptor.

Con esta aproximación experimental, hemos encontrado correlaciones estadísticamente significativas entre los niveles de ARNm del AR- $\beta_1$  con la GRK5, y del AR- $\beta_2$  con las GRK2 y GRK3, que podrían estar en relación con la especificidad de estas GRKs por cada uno de los ARs en linfocitos. La correlación tan significativa que hemos encontrado entre el AR- $\beta_2$  y las dos GRKs anteriormente denominadas  $\beta$ ARKs (GRK2 y GRK3), pone en evidencia una vez más la regulación que, a través de ambas quinasas, sufre este AR, y que desde su descubrimiento ha venido usándose como modelo para explicar el mecanismo de acción de estas quinasas (Benovic y cols., 1987, 1991; Bünemann y cols., 1999). Por otro lado, la falta de una correlación entre GRK2 y GRK3 con el AR- $\beta_1$  podría indicar que no son estas quinasas, sino la GRK5 quién lo regula, coincidiendo con autores que habían encontrado que esta quinasa era capaz de fosforilar al AR- $\beta_1$  (Freedman y cols., 1995; Rockman y cols., 1996; Eckhart y cols., 2000; Vinge y cols., 2008). No se encontraron correlaciones significativas entre los niveles de ARNm de ninguno de los ARs- $\alpha_1$  con ninguna de las tres GRKs

analizadas, por lo que, al menos en linfocitos humanos, parece no existir una interacción que relacione una de las quinasas con alguno de los ARs- $\alpha_1$ .

La existencia de una correlación entre la expresión de un determinado receptor y una GRK pone de manifiesto, además, que los cambios en la expresión génica en determinados ARs, muy probablemente, están asociados a cambios en la expresión génica de sus correspondientes GRKs, haciendo necesario el análisis conjunto de ambos ARs y GRKs siempre que se quiera estudiar la consecuencia de esos posibles cambios en relación con ciertas patologías. Hasta ahora, existen numerosas publicaciones en las que se analizan los cambios en la expresión y funcionalidad de una determinada GRK, como ocurre con la GRK2, sin analizar si esos mismos cambios se reproducen en la expresión del receptor sobre el que se supone que actúa. Esto puede llevar a conclusiones poco precisas acerca de la trascendencia funcional del cambio y a falsas interpretaciones al respecto. Es necesaria una lectura cuidadosa de los resultados siempre que el análisis sea realizado de manera aislada, para una determinada GRK, sin ir acompañado del correspondiente análisis del receptor sobre el cual, dicha quinasas, suponemos que ejerce su acción.

En resumen, hemos detectado ARNm para los 6 subtipos de ARs estudiados y para la GRK2 en los tres tejidos de rata analizados, siendo diferentes las proporciones. Coincidiendo con la literatura, hemos observado como la expresión mayoritaria en aorta corresponde al subtipo  $\alpha_{1D}$ , principal responsable de la contracción de dicha arteria de conductancia. Sorprende la importante expresión del subtipo  $\beta_3$  mayoritario entre los ARs, cuyo rol funcional no está del todo claro. En el ventrículo izquierdo encontramos como ARs mayoritarios a los subtipos  $\alpha_{1B}$  y  $\beta_1$ , ambos responsables de la fuerza y el ritmo de contracción cardiaca. Mientras que en riñón, ambos ARs- $\alpha_{1B}$  y  $\alpha_{1D}$  encargados de controlar procesos de filtración y del control del flujo renal respectivamente, acompañados del AR- $\beta_1$  responsable del control de procesos de filtración y de la secreción de renina, serán los ARs mayoritarios en este tejido. Por otro lado, en linfocitos de rata se ha detectado ARNm para el subtipo  $\beta_1$  y sobre todo, y en mayor proporción, para el subtipo  $\beta_2$ , así como para las tres GRKs analizadas (GRK2, GRK3 y GRK5) siendo GRK2 la mayoritaria. Por último, en linfocitos circulantes de voluntarios sanos, hemos detectado ARNm para los 6 ARs estudiados, si bien, los niveles tan bajos para los ARs- $\alpha_{1A}$  y  $-\beta_3$ , nos obligaron a su exclusión de los análisis comparativos que se describen más adelante. Se detectó como AR mayoritario el subtipo  $\beta_2$ , al igual que ocurría en ratas, con una proporción semejante entre las diferentes GRKs analizadas. Hemos encontrado una correlación significativa entre la expresión del AR- $\beta_1$  y la GRK5, y del AR- $\beta_2$  y las GRK2 y GRK3, lo que puede significar que un mismo sistema regulador actúa sobre esos genes, y

sustenta la idea de que estas correlaciones pueden ser un indicador indirecto de la especificidad o preferencia de cada una de las GRKs por cada uno de los ARs en linfocitos humanos, poniendo de manifiesto la necesidad de realizar un análisis conjunto de ARs y GRKs, siempre que se pretenda dar una interpretación funcional a los cambios en la expresión de los mismos en diferentes territorios y/o patologías.

## 2 DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN Y FUNCIONALIDAD DE ARS Y GRKS CON LA EDAD: LA MADURACIÓN

Está bien descrito que con la edad se producen cambios importantes tanto a nivel estructural como funcional en multitud de órganos y que estos cambios conllevan, entre otras, alteraciones en la respuesta cardiovascular y renal, pero el origen exacto de los cambios aún está por aclarar (Docherty, 1990). Numerosos estudios hablan de cambios con la edad en relación a los ARs y las GRKs, aunque con diferencias importantes en los resultados, probablemente debidas a diferencias en las edades de los animales, diferencias entre especies o incluso entre cepas, diferencias en los tejidos estudiados, y hasta diferencias en las técnicas de análisis utilizadas. En líneas generales se puede decir que se observa una disminución de la actividad adrenérgica que progresa con la edad, y es especialmente manifiesta en edades avanzadas (Docherty, 1990).

En el presente estudio, hemos comparado la expresión de los 6 ARs estudiados y la GRK2 en Aorta, Ventrículo izquierdo y Riñón de ratas WKY de 6 semanas y 16 semanas de edad. En las ratas, podemos definir dos procesos diferenciados, el proceso de maduración que comprende el periodo de crecimiento desde las primeras semanas de vida, considerando a la rata como joven inmadura (6-8 semanas), hasta que las ratas se consideran adultas (desde 12-24 semanas hasta los 12 meses), de ahí en adelante comenzaría el siguiente proceso, el de envejecimiento, considerándose anciana una rata de 24 meses de vida (Docherty, 1990). Estos límites varían mínimamente según las cepas de ratas utilizadas. Las ratas WKY se utilizan como control de las SHR, ratas que generan hipertensión de forma espontánea a partir de la semana 12 y ya tienen una hipertensión bien establecida en la semana 16 (Yamamori, 1984), así pues en nuestro caso la rata WKY se considera joven o inmadura a las 6 semanas de edad, mientras que la rata de 16 semanas ya es considerada adulta. Por tanto, es importante destacar que los cambios con la edad que observamos en nuestro estudio y que vamos a comentar para el grupo control de ratas WKY, corresponden a

cambios propios del proceso de maduración del animal al pasar de un estado inmaduro de 6 semanas, hasta un estado adulto de 16 semanas de edad.

En nuestro grupo de ratas WKY, observamos como con la edad, se produce un descenso significativo de la expresión del AR- $\alpha_{1D}$  en aorta torácica de ratas adultas de 16 semanas con respecto a las ratas jóvenes inmaduras de 6 semanas. La menor expresión de éste subtipo, mayoritario en aorta de rata, y por tanto responsable principal de la contracción de esta arteria (Gisbert y cols., 2000; Marti y cols., 2005), podría ser responsable de la menor potencia observada en nuestros estudios funcionales para la Fenilefrina, agonista selectivo de los ARs  $\alpha_1$ , [pCE<sub>50</sub> (6sem) = 8,38 ± 0,34 vs pCE<sub>50</sub> (16sem) = 7,70 ± 0,08\*] y que coincide con la menor potencia de la NA encontrada por otros autores en ratas adultas, asociada también a una menor señal intracelular de Ca<sup>+2</sup> e IP<sub>3</sub> (Gurdal y cols., 1995).

Por lo que respecta a la actividad vascular de los ARs- $\beta$  con la edad, parece que con el envejecimiento aparece un deterioro progresivo de la dilatación  $\beta$ -adrenérgica, que se verá mucho más marcado en edades muy avanzadas (72 semanas), pero no se observa en el proceso de maduración en edades más tempranas (20 semanas) (O'Donnell y Wanstall, 1984). En este aspecto, nuestros experimentos indican una disminución significativa en la expresión del AR- $\beta_3$  durante el proceso de maduración, que no se traduce en un incremento significativo de la potencia de la Isoprenalina, agonista con una menor afinidad por este subtipo respecto a los otros dos, ni en una disminución de la potencia del SR58611A, agonista selectivo del AR- $\beta_3$ . Por el contrario, si analizamos las curvas concentración-respuesta de relajación para el SR58611A encontramos una potencia significativamente mayor de este agonista lo que nos indica que la disminución en la expresión del AR- $\beta_3$  no tiene consecuencias negativas en su función vasodilatadora sino por el contrario, la aorta de rata adulta es más sensible a la acción vasodilatadora mediada por AR- $\beta_3$ . Para interpretar estos resultados, aparentemente contradictorios, debemos recordar que, como comentamos anteriormente, el subtipo  $\beta_3$ , mayoritariamente expresado en aorta de rata, se encuentra en muy pequeña proporción en las células del músculo liso vascular aisladas de esta arteria (Pérez-Aso, 2010), por lo que la disminución en la expresión que observamos en este caso, podría producirse en otros tipos celulares, con una implicación indirecta en el control del tono vascular, y por ello tendría una trascendencia funcional paradójica en la respuesta vasodilatadora  $\beta$ -adrenérgica de la aorta.

Por nuestra parte, no se observan cambios significativos en la expresión de GRK2, ya que, coincidiendo con otros autores, el cambio debería de iniciarse en edades más avanzadas (Gaballa y cols., 2000; Schutzer y cols., 2001). Unido a esto, el deterioro de la actividad  $\beta$ -adrenérgica tampoco se ha observado hasta edades más avanzadas (Baloglu y cols., 2007).

Si nos centramos en otro tejido como es el corazón, los resultados son diferentes. Al parecer un fenómeno aceptado es el hecho de que en el ser humano, se produce un aumento de las catecolaminas plasmáticas de alrededor del 10-15% por cada 10 años de crecimiento (Brodde y Leineweber, 2004), probablemente por un deterioro de los mecanismos de recaptación y por una disminución de los receptores post-sinápticos (Docherty, 2002) y este aumento va acompañado de un descenso de la actividad  $\beta$ -adrenérgica en el corazón conforme aumenta la edad (Abrass y cols., 1982), aunque no está del todo claro si este descenso se debe a cambios en la densidad proteica de los ARs- $\beta$  (se ha descrito que sube, baja o permanece invariable), pero, parece claro el deterioro del acoplamiento a la proteína  $G_s$  (Brodde y Leineweber, 2004), y por lo tanto el deterioro en la actividad del receptor.

En nuestro caso, los resultados indican que existe un descenso significativo en los niveles de ARNm para el AR- $\beta_1$  en ventrículo izquierdo de ratas adultas de 16 semanas, coincidiendo con estudios tanto en humanos como en ratas en los que se observaba una disminución en la densidad proteica, mientras que el subtipo  $\beta_2$  permanecía invariable y probablemente desacoplado de la proteína  $G_s$  sobre todo en edades muy avanzadas (White y cols., 1994; Cerbai y cols., 1995; Dobson y cols., 2003; Li y cols., 2009). El subtipo  $\beta_3$  es prácticamente indetectable en el ventrículo izquierdo de ratas WKY de 6 o 16 semanas de edad. Este cambio observado para el AR  $\beta_1$  podría ser específico del corazón, pues no se observa en aorta y, aunque en riñón los niveles de expresión son ligeramente menores en ratas adultas, el cambio no llega a ser significativo. Apoyando esta especificidad cardíaca en la disminución del AR- $\beta_1$  con la edad están también los resultados obtenidos con linfocitos humanos en el presente trabajo y en corazón humano en otro trabajo realizado en nuestro laboratorio. Cuando analizamos los niveles de expresión del AR- $\beta_1$  en linfocitos circulantes, vemos que no existe una correlación con la edad del paciente mientras que si existe una correlación inversa y estadísticamente significativa entre la expresión de AR  $\beta_1$  en el ventrículo izquierdo humano y la edad del paciente. En este caso, y aunque trabajamos con ventrículos procedentes de corazones explantados de pacientes con insuficiencia cardíaca en fase terminal, que han sufrido cambios importantes en la expresión de ARs- $\beta_1$  debido a la patología (Bistrow y cols., 1982; Bistrow, 1993; Engelhardt y cols., 1996; Daaka y cols., 1997; Zhu y cols., 2001;

Leineweber y cols., 2005) se observa como la expresión de este AR disminuye también con la edad (resultados no publicados).

A pesar de esta disminución en la expresión génica del AR- $\beta_1$ , no se observan diferencias significativas en la FC entre nuestras ratas jóvenes y adultas por lo que parece que el organismo tendría, al menos en edades tempranas, la capacidad de compensar esta pérdida. En este sentido, parece que la GRK2 no jugaría un papel importante en la regulación de la respuesta cardíaca  $\beta_1$ -adrenérgica que se produce con la maduración, ya que ni su actividad ni su expresión varían con la edad en el ventrículo izquierdo de ratas WKY de 6 y 16 semanas (en nuestro caso) ni según otros autores en edades más avanzadas (Xiao y cols., 1998; Leineweber y cols., 2003).

Por lo que respecta a los ARs- $\alpha_1$  a nivel cardíaco se sabe poco sobre cambios asociados a la edad, y lo poco que se sabe es, en algunos casos, contradictorio (Brodde y Leineweber, 2004). Por un lado se ha hablado de un aumento del ARNm de los subtipos  $\alpha_{1A}$  y  $\alpha_{1B}$ , mientras que se habla de un descenso de los niveles para el subtipo  $\alpha_{1D}$ , aunque de estos cambios ninguno de ellos fue significativo, y fueron estudiados en ratas a partir de las 16 semanas de edad y comparando con ratas senescentes en edades muy avanzadas (25 meses de edad) (Miller y cols., 1996). Por otro lado otros autores han observado un descenso de los niveles de los ARs- $\alpha_{1A}$  y  $\alpha_{1D}$ , permaneciendo invariable la expresión del subtipo  $\alpha_{1B}$  (Cao y Li, 2009). A pesar de las discordancias respecto a los subtipos  $\alpha_{1A}$  y  $\alpha_{1B}$ , que en nuestro caso aumenta y disminuye respectivamente con la edad, todos los estudios previos observan un descenso en la expresión del subtipo minoritario  $\alpha_{1D}$ , lo que coincide también con nuestros resultados. Este subtipo  $\alpha_{1D}$ , responsable de la contracción de la aorta y la arteria coronaria (Gisbert y cols., 2000; Ziani y cols., 2003; Chalothorn y cols., 2003; Jensen y cols., 2009a), y presente también en los cardiomiocitos aislados (resultados de nuestro laboratorio) aunque minoritario respecto al  $\alpha_{1B}$ , vemos que disminuye con la maduración en todos los territorios estudiados (aorta, corazón y riñón), a diferencia de los otros subtipos que sufren cambios específicos o no cambian. Con nuestros resultados, no podemos concluir el significado fisiológico de esta disminución generalizada en la expresión del subtipo  $\alpha_{1D}$  con la maduración, pero sería interesante analizar, en futuros trabajos, su trascendencia. En corazón, al igual que ocurre en riñón y a diferencia de la aorta, disminuye la expresión del subtipo  $\alpha_{1B}$ , el subtipo  $\alpha_1$  mayoritario, lo que va acompañado de un aumento en los niveles de  $\alpha_{1A}$ , también presente en ventrículo izquierdo aunque en menor proporción (Jensen y cols., 2009a). Al parecer este subtipo  $\alpha_{1A}$  podría tener efectos cardioprotectores, tal y como sugieren varios autores, e intervenir en el proceso de maduración fisiológica del corazón (O'Connell y cols., 2003; Du y cols., 2004; Huang y cols., 2007; Woodcok y

cols., 2008). Quedaría por determinar la trascendencia fisiológica de los cambios en la expresión del subtipo  $\alpha_{1B}$ .

Poco se sabe sobre el efecto de los ARs en el riñón y sobre los cambios que en este se producen con la edad, mucho menos en edades tempranas. Lo que sí que parece es que con la edad, la densidad de los ARs- $\alpha_1$  baja, sobre todo en edades avanzadas, paralelamente a la bajada de la actividad vascular a nivel renal (Passmore y cols., 2005). Otros autores han visto, aunque de forma no significativa, un descenso de la expresión del AR- $\beta_1$  en riñón de ratas senescentes comparado con ratas jóvenes de 8 semanas de edad (Fraeyman y cols., 2000). No se sabe nada sobre el papel de la GRK2 en riñón y en cuanto a sus cambios con la edad únicamente se ha observado un ligero aumento en la expresión en ratas de 44 semanas, más evidente en hembras (Passmore y cols., 2005). Con la edad, se producen cambios en el sistema renina-angiotensina, que suelen ser moderados en edades tempranas (Thompson y cols., 2000). Se sabe que la concentración plasmática de renina permanece constante durante el proceso de maduración y comienza a bajar en edades avanzadas (envejecimiento), e incluso se ha visto una bajada de la actividad de renina en ratas senescentes (Corman y Michel, 1986; Jover y cols., 1993). Por otro lado se ha visto que el AR- $\beta_1$  está implicado en la liberación de renina (Osborn y cols., 1981). En esta línea, en ratas WKY de 16 semanas hemos visto un pequeño descenso, aunque no significativo, de los niveles de ARNm del AR- $\beta_1$ , algo que coincide con niveles normales de renina en esta edad. Si que hemos observado niveles significativamente menores del ARNm para el AR- $\beta_3$ , receptor minoritario y cuya función no está del todo clara en el riñón (Kim y cols., 2007), por lo que futuros estudios deberán aclarar su papel a nivel renal. Es interesante señalar que en aorta también observábamos esta disminución que podría ser generalizada, aunque no tenemos la certeza al no poder determinarla en ventrículo izquierdo, donde la expresión del AR- $\beta_3$  es demasiado baja para poder hacer un análisis comparativo fiable.

Por lo que se refiere a la GRK2, en nuestras ratas adultas, aunque jóvenes si comparamos con las analizadas en la literatura, hemos observado una disminución de los niveles de ARNm, pero este aspecto así como el papel de la GRK2 a nivel renal, deberá ser estudiado con más detenimiento. Se ha descrito la posible participación de la GRK2 en la regulación de los canales epiteliales intercambiadores de  $\text{Na}^+$  de los túbulos distales, de modo que un aumento en la actividad de GRK2 estaría relacionado con una mayor reabsorción de este electrolito (Dinudom y cols., 2004). Según nuestros resultados, la menor expresión de la GRK2 observada en ratas de 16 semanas se traduciría en una menor reabsorción de  $\text{Na}^+$  y por tanto, en un aumento

de su excreción, aumento que se sabe que se produce en las primeras etapas del crecimiento (Boer y cols., 2005).

Por otro lado se ha comentado también la relación entre el AR- $\alpha_{1B}$  y la regulación de los procesos de reabsorción tubular de Na<sup>+</sup> (Guillery y cols., 1994; Elhawary y Pang, 1994), aunque las evidencias no son muchas. Según nuestros resultados, en los que se observa una menor expresión del subtipo  $\alpha_{1B}$  podemos suponer que en ratas de 16 semanas la excreción de Na<sup>+</sup> sea mayor que a las 6 semanas en parte al menos, por una menor actividad del subtipo  $\alpha_{1B}$ .

Por otro lado, al igual que ocurría en los otros tejidos estudiados, se observa en este caso una disminución muy marcada en la expresión del ARNm del subtipo  $\alpha_{1D}$ , uno de los responsables de la contracción de la arteria renal (Villalobos-Molina y cols., 1997), coincidiendo esta bajada con la menor actividad vascular a nivel renal comentada anteriormente (Passmore y cols., 2005). Como consecuencia de este descenso en la expresión del subtipo  $\alpha_{1D}$ , cabe destacar un cambio en las proporciones relativas de los diferentes subtipos de ARs- $\alpha_1$ , ya que en ratas jóvenes el subtipo mayoritario era el AR- $\alpha_{1D}$  mientras que en ratas adultas encontramos como mayoritario al subtipo  $\alpha_{1B}$ . La repercusión funcional de este cambio abre las puertas hacia el estudio en profundidad del papel fisiológico de los ARs- $\alpha_1$  en el proceso de maduración del riñón.

No se estudiaron los cambios relativos a la edad en linfocitos circulantes de ratas WKY por la dificultad para obtener una muestra significativa en el grupo de ratas jóvenes. En linfocitos circulantes de voluntarios sanos y pacientes con diferentes patologías, como ya comentamos, no se encontró ningún tipo de relación entre los niveles de expresión de los diferentes genes analizados (ARs y GRKs) y los cambios en la edad de los sujetos.

En conclusión, hemos visto como en el proceso de maduración comprendido entre las 6 y las 16 semanas de vida de la rata WKY, se produce una disminución generalizada de la expresión y actividad del subtipo  $\alpha_{1D}$ , responsable de la contracción de arterias principales como la aorta, las arterias coronarias o la arteria renal, coincidiendo con la menor reactividad vascular que acompaña al incremento de edad. Hemos observado también una disminución en la expresión del AR- $\alpha_{1B}$  en ventrículo izquierdo y riñón, tejidos en los que este subtipo es mayoritario. La menor expresión del AR- $\alpha_{1B}$  y de la GRK2 observadas en riñón podrían estar asociadas a la menor reabsorción de Na<sup>+</sup> que se produce con la maduración de dicho órgano. Se ha visto también un aumento significativo en la expresión del subtipo  $\alpha_{1A}$  en ventrículo

izquierdo que podría estar relacionado con las propiedades cardioprotectoras que se atribuyen a dicho subtipo o por su relación directa con el proceso de crecimiento fisiológico del corazón.

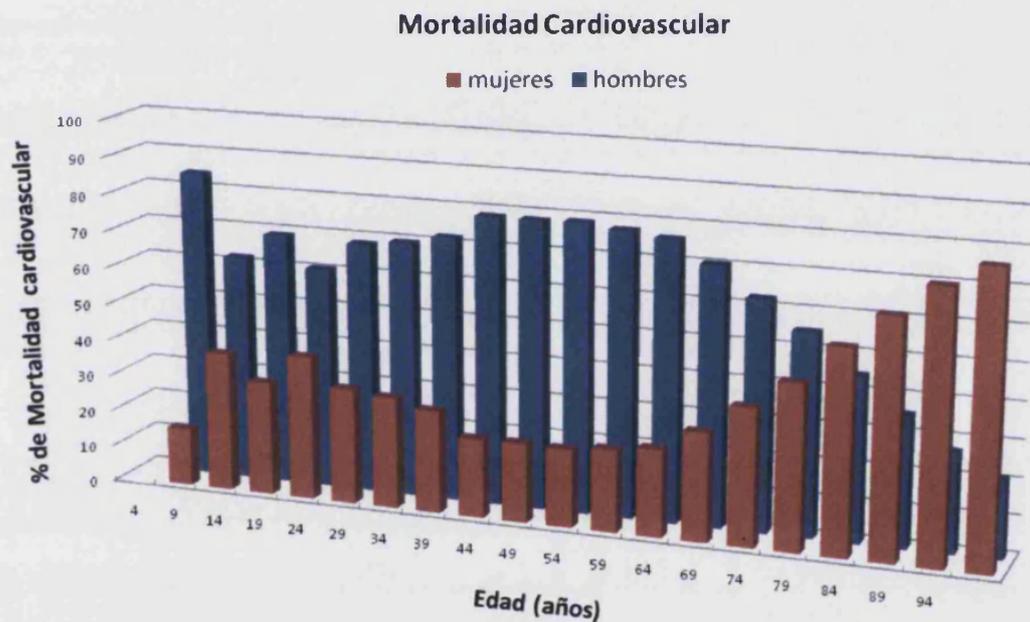
### 3 EXPRESIÓN DE ARs Y GRKs EN LINFOCITOS HUMANOS Y RIESGO CARDIOVASCULAR

En el grupo de pacientes incluidos en el presente trabajo con diferentes patologías cardiovasculares, hemos cuantificado la expresión génica de ARs y GRKs en linfocitos circulantes a fin de analizar si se producen cambios en dicha expresión en función de la patología, si estos cambios se correlacionan con las variables clínicas que determinan la patología y si en función de estos cambios, se puede considerar el linfocito como un biomarcador fácilmente accesible para el seguimiento clínico del paciente. Pero además de analizar los datos obtenidos con esta perspectiva, trataremos de ver, en el conjunto de la población estudiada, si existe alguna relación entre los niveles de ARNm para los seis ARs y las GRKs en linfocitos y el riesgo cardiovascular.

Según se ha comentado en la Revisión Bibliográfica de la presente Tesis Doctoral, las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en todo el mundo. En España, y según datos de defunciones del INE, de un total de 386.324 personas fallecidas en el año 2008, la principal causa de muerte fueron los problemas cardiovasculares (31,7% de los fallecidos) seguida de los tumores (26,9%) y los problemas respiratorios (11,4%). Si este análisis lo hacemos en función de la edad y el género, podemos representar la siguiente gráfica (Imagen 13).

En ella observamos como la mortalidad a causa de problemas cardiovasculares durante el 2008 sigue una distribución muy diferente en función del género y de la edad ya que, hasta los 79 años, el porcentaje de fallecimientos fue superior en el grupo de hombres pero, a partir de los 80 años la relación se invierte. Esta observación, que se reproduce con pequeñas diferencias en años anteriores indica que existe un riesgo cardiovascular diferente en función del género y de la edad por lo que estas características diferenciales entre hombres y mujeres hacen que, el cálculo del riesgo se realice con una perspectiva de género (véanse tablas SCORE o REGICOR, entre otras; Graham y cols., 2007).

En conjunto, si consideramos los distintos factores de riesgo cardiovascular, sabemos que la edad es el principal factor, pero la hipertensión es la segunda causa en importancia. Por otra parte, la obesidad, junto con la intolerancia a la glucosa, diabetes y las alteraciones del perfil lipídico, conforman un grupo de factores determinantes en la aparición de problemas cardiovasculares tanto en hombres como en mujeres.



**Imagen 13. Análisis de los porcentajes de muerte cardiovascular en función de la edad y el género.** Gráfica realizada utilizando los datos publicados por el INE (<http://www.ine.es>) en 2010.

A la vista de estas evidencias clínicas, nos planteamos, en primer lugar, realizar un análisis de la expresión de los ARs y las GRKs relacionándolo con los factores implicados en el riesgo cardiovascular como el género, la edad, el IMC, los parámetros determinantes de diabetes o intolerancia a la glucosa, y la dislipemia. En el apartado siguiente abordaremos de forma más extensa el análisis de la hipertensión.

Si consideramos el género de los pacientes incluidos en el estudio, vemos que no se encontraron diferencias significativas en la expresión de los ARs y las GRKs entre hombres y mujeres en el total de la población. Tal como muestra la Figura 26, página 160), existe una variabilidad grande en la expresión génica, pero esta variabilidad se reproduce en el grupo de hombres y en el de mujeres por lo que no parece ser el género un factor determinante de la misma. Por ello, podemos concluir, que, de una

forma general, el sexo no condiciona una diferente expresión génica de los ARs y las GRKs en los linfocitos circulantes, por lo que los cambios observados van a venir determinados por otros factores. Esta observación no excluye que existan cambios en función del género en algún órgano o tejido concreto, pero se trataría de cambios específicos y no generalizables a todos los territorios.

Por lo que respecta a la edad, ninguno de los genes cuantificados cambia en función de la edad en linfocitos, ya que no se ha observado una correlación significativa entre la edad de los pacientes y la expresión de ARs y GRKs en estas células. Sin embargo, tal como hemos comentado anteriormente, si hemos observado una correlación inversa entre la edad y la expresión de ARs- $\beta_1$  en ventrículo izquierdo humano (resultados obtenidos en nuestro laboratorio) lo que indica que, por una parte, el linfocito no reflejaría los cambios que se producen en el corazón, al menos en este caso, y por otra, que la falta de correlación entre la edad y la expresión en linfocitos no excluye la existencia de una correlación a otro nivel, como es el caso del ventrículo izquierdo, que pueda tener una mayor trascendencia en la homeostasis cardiovascular.

Es interesante destacar que, independientemente de la edad de los pacientes, del género o de las patologías asociadas, si que se encontró una correlación inversa muy significativa entre los niveles de expresión de ARNm del AR- $\beta_1$  y el peso, y en consecuencia, también el IMC de los pacientes incluidos en el estudio. Ésta correlación se observó tanto en hombres como en mujeres, de manera que cuanto mayor es el peso o el IMC, menores son los niveles de ARNm del AR- $\beta_1$  que se detectan en los linfocitos circulantes. La existencia de una correlación inversa entre la expresión génica de ARs- $\beta_1$ , en linfocitos circulantes y el IMC añade nuevos datos que confirman el papel de los ARs- $\beta_1$  en el control de la lipólisis y la termogénesis (Lafontan y Berlan, 1993). Es bien conocido el papel de las catecolaminas en el control de la grasa corporal a través de los ARs- $\beta_1$ , y - $\beta_3$ , que se expresan en los adipocitos (Ohshiro y cols., 2008). En humanos, el agonista  $\beta_1$ -selectivo dobutamina, produce un incremento significativo de la lipólisis y la termogénesis que es bloqueado por el antagonista  $\beta_1$ -selectivo atenolol (Schiffelers y cols., 1999). Un aumento en la actividad del AR- $\beta_1$  se ha relacionado con el aumento de la lipólisis en pacientes obesos sometidos a dietas hipocalóricas (Barbe y cols., 1997), con la pérdida de peso en pacientes con cáncer (Hyltander y cols., 2000), y con una inhibición de la secreción de leptina (Scriba y cols., 2000). A esto hay que añadir la relación encontrada entre ciertos polimorfismos del subtipo  $\beta_1$  y el aumento en el IMC observado durante un periodo de 15 años (Linne y cols., 2005) y el hecho de que la sobreexpresión de los ARs  $\beta_1$ , en adipocitos confiere resistencia a la obesidad (Soloveva y cols., 1997). Si

tenemos en cuenta que los linfocitos circulantes podrían estar reflejando situaciones que ocurran en el resto del organismo, nuestros resultados claramente relacionan un aumento en la expresión génica del AR- $\beta_1$ , con una pérdida de peso corporal. Probablemente como consecuencia de este aumento de expresión del subtipo  $\beta_1$ , se produzca un aumento de actividad que, en células del tejido adiposo, podría estar induciendo la lipólisis y por lo tanto la pérdida de peso asociada. Estos resultados abren las puertas a futuros estudios sobre el papel del AR- $\beta_1$  en la obesidad y su tratamiento. El hecho de que el ARNm de los ARs- $\beta_3$  no se haya detectado en cantidades significativas en los linfocitos circulantes no nos ha permitido realizar un análisis similar con este subtipo que también tiene un papel importante en la regulación de la lipólisis y la termogénesis (Arch y cols., 1984).

No encontramos correlaciones significativas entre la expresión génica de los ARs y las GRKs en linfocitos humanos circulantes y las variables determinantes de diabetes o intolerancia a la glucosa (hemoglobina glicosilada, glucemia) o de dislipemia (niveles de colesterol total, LDL, HDL, triglicéridos) por lo que no podemos establecer una relación entre ninguno de estos factores de riesgo cardiovascular y la expresión de ARs y GRKs en linfocitos.

## 4 DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN Y FUNCIONALIDAD DE ARS Y GRKS CON LA HIPERTENSIÓN

Tal como comentamos anteriormente, la hipertensión es uno de los principales factores de riesgo cardiovascular y está bien establecida la relación entre cifras elevadas de presión arterial y aparición de accidentes cardiovasculares. Aunque existen evidencias que relacionan la hipertensión esencial con un incremento del tono simpático, no se conoce bien la causa implicada en este incremento que no está necesariamente asociado a un aumento en las catecolaminas circulantes. Mas bien, el aumento de la resistencia vascular producido por este tono adrenérgico elevado podría ser la resultante de un desequilibrio entre los mecanismos vasoconstrictores y vasodilatadores relacionados con cambios en la expresión y/o funcionalidad de los ARs- $\alpha_1$  que median la vasoconstricción y los ARs- $\beta$  que median la vasodilatación, aunque también puede atribuirse este desequilibrio a cambios en las GRKs, las quinasas reguladoras de los ARs (Feldman y Gros, 2006; Penela y cols., 2006).

Tanto en los modelos de hipertensión animal como en la humana se ha observado una alteración generalizada de la vasodilatación mediada por los ARs- $\beta$  (Borkowski y cols., 1992). Esta alteración se ha relacionado con un aumento en la actividad de las GRKs, en concreto, la GRK2, que favorece el desacoplamiento del AR- $\beta$  de su correspondiente proteína G (Feldman y Gros, 2006). Sin embargo, no se ha evaluado en estos trabajos la posibilidad de que cambios en la expresión de los ARs- $\beta_1$ , - $\beta_2$  y - $\beta_3$  también puedan estar implicados en el proceso.

Por otra parte, los ARs- $\alpha_1$  también juegan un papel fundamental en el control de la presión arterial a través de su actividad vasoconstrictora (Piascik y cols., 1995; Noguera y cols., 1996; Villalobos-Molina e Ibarra, 1996; Hrometz y cols., 1999; Gisbert y cols., 2000, 2003a). Es de destacar que uno de los cambios responsables del aumento en la resistencia vascular característico de la hipertensión es precisamente un mayor papel funcional del AR- $\alpha_{1D}$  (Villalobos-Molina y cols., 1999; Gisbert y cols., 2002; Tanoue y cols., 2002a, 2002b; Ziani y cols., 2002; D'Ocon, 2003; Lyssand y cols., 2008), pero el mecanismo responsable de este aumento no ha sido elucidado.

Para analizar estas cuestiones, hemos estudiado los cambios en la expresión y funcionalidad de los ARs y la GRKs relacionados con la hipertensión en dos modelos animales además de un modelo de hipertensión humana con el fin de evaluar que cambios preceden y cuáles acompañan o no a la enfermedad, cuáles de ellos pueden ser responsables de la génesis y/o mantenimiento de la hipertensión y cuáles consecuencia de la misma, en qué medida estos cambios observados en ratas hipertensas se observan en el ser humano y de qué modo la expresión génica linfocitaria de estos genes puede reflejar o no la actividad de los ARs y las GRKs a lo largo del organismo, en relación o no con esta patología. En el caso de la hipertensión humana, el estudio incluye hombres y mujeres por lo que se analizarán los resultados en función del género.

Comenzaremos comentando los resultados obtenidos en los modelos animales de hipertensión. En este caso, elegimos como diana de nuestro estudio las ratas espontáneamente hipertensas (SHR) por ser una cepa de ratas bien caracterizada por reproducir la hipertensión esencial humana, pero, además, utilizamos ratas hipertensas por disfunción endotelial, un modelo de hipertensión diferente, cuyo origen es la inhibición crónica de la síntesis de NO, pero que, desde el punto de vista hemodinámico, reproduce las alteraciones observadas en las ratas SHR y en la hipertensión esencial humana como son las cifras elevadas de PA y la hipertrofia cardiaca, entre otras. De estos animales, utilizamos la aorta, el ventrículo izquierdo y el riñón, por ser tres de los órganos y tejidos implicados de forma directa en esta

enfermedad, así como los linfocitos circulantes ya que en estas células hemos realizado también el estudio en pacientes hipertensos.

#### 4.1 CAMBIOS OBSERVADOS EN AORTA DE RATA HIPERTENSA

En aorta de ratas SHR jóvenes, que aún no manifiestan la hipertensión, el único cambio observado fue un aumento en la expresión y en la funcionalidad del AR- $\beta_1$ . Este cambio, precede por tanto al estado hipertensivo y podría estar implicado en el desarrollo de la hipertensión. Cuando comparamos las ratas SHR adultas, que ya manifiestan la hipertensión, con sus correspondientes controles normotensos (WKY), encontramos un aumento generalizado en la expresión (ARNm y proteína) de los 6 ARs y la GRK2. Resultados que, en parte, ya habían sido descritos previamente por otros autores que habían observado un aumento en la expresión de ARNm para los ARs- $\alpha_{1D}$  (Godínez-Hernández y cols., 2006) y - $\beta_3$  en aorta de ratas SHR (Mallem y cols., 2005).

La elevada expresión proteica de la GRK2 encontrada en aorta de rata hipertensa, confirma las evidencias encontradas en estudios previos tanto en aorta como en linfocitos de rata (Gros y cols., 2000) o en linfocitos de pacientes hipertensos (Gros y cols., 1999). Sin embargo, a pesar del aumento en la expresión proteica observado previamente en aorta, en nuestros linfocitos de rata SHR adulta, vemos como el ARNm de GRK2 no cambia, así como tampoco ninguna de las otras GRKs analizadas, aunque la proteína podría estar aumentada y probablemente su actividad también, tal y como indicaban estos mismos autores (Gros y cols., 2000), los cuales no estudiaron la expresión génica de dichas enzimas.

El aumento en la expresión proteica de la GRK2 observado en ratas adultas hipertensas, no se observó en las ratas jóvenes pre-hipertensas. Por lo tanto, este aumento podría ser un cambio adaptativo debido al aumento de la expresión de los ARs y/o al aumento de la PAS. Esta última posibilidad no se sustenta si tenemos en cuenta que, en ratones transgénicos con sobre-expresión selectiva de la GRK2 en células de músculo liso vascular, se observaba un aumento de las cifras de PAS, sugiriendo una relación causal entre el aumento de la expresión de la quinasa y el desarrollo de la hipertensión (Eckhart y cols., 2002).

*¿Qué consecuencias hemodinámicas tienen estos cambios?* La anomalía hemodinámica básica de la hipertensión es el incremento de la resistencia vascular. Por lo tanto, un aumento en los mecanismos vasoconstrictores, debido a una mayor

expresión y funcionalidad de los ARs- $\alpha_1$ , justificaría este incremento de la resistencia vascular. Sin embargo, el incremento vascular de la funcionalidad  $\alpha_1$  podría ser contrarrestado por el aumento en la expresión de los ARs- $\beta$ , mediadores de la vasodilatación. Además, la elevada expresión de GRK2 y el deterioro del acoplamiento AR-proteína G asociado a ésta podrían tener importantes implicaciones funcionales.

Se ha propuesto que la GRK2 podría ser el factor responsable de la disminución de la señal  $\beta$ -adrenérgica durante la hipertensión (Feldman y Gros, 2006; Penela y cols., 2006). No obstante, el AR- $\beta_3$  es resistente a la desensibilización homóloga mediada por GRK2 (Rozec y Gauthier, 2006). De acuerdo con esto, el incremento en la expresión del AR- $\beta_1$ , observado en aortas de ratas pre-hipertensas, justificaría la mayor potencia relajante de Isoprenalina observada en los estudios funcionales. En aortas de ratas adultas hipertensas, la situación sería más compleja: la mayor expresión de los ARs- $\beta_1$  y - $\beta_2$ , que favorecería la vasodilatación adrenérgica, podría estar contrarrestada por la elevación paralela de la GRK2; sin embargo, el AR- $\beta_3$  resiste a la desensibilización mediada por GRK2 por lo que, en estas condiciones, el rol funcional de este subtipo podría estar aumentado con respecto a los otros dos. Nuestros estudios funcionales confirman esta propuesta, ya que, en aorta de ratas adultas hipertensas, la menor potencia de Isoprenalina (agonista con baja afinidad por el subtipo  $\beta_3$  (Strosberg, 1997)), y la mayor potencia del SR58611A (agonista selectivo  $\beta_3$ ), junto con el incremento en el porcentaje de sitios de alta afinidad para dicho agonista, sugieren un aumento del rol funcional del subtipo  $\beta_3$  en la hipertensión. Desde un punto de vista fisiopatológico, debido a que el AR- $\beta_3$  tan sólo puede ser estimulado por dosis elevadas de catecolaminas (Strosberg, 1997), el predominio funcional de este subtipo en aorta de animales hipertensos determina un deterioro de los mecanismos vasodilatadores mediados por los ARs- $\beta$  ya que tan solo serían desencadenados por un estímulo adrenérgico muy elevado.

Del mismo modo, los distintos subtipos de ARs- $\alpha_1$  también muestran diferencias en sus patrones de fosforilación e internalización por las GRKs: el AR- $\alpha_{1B}$  (Chalothorn y cols., 2002) sufre una rápida e intensa desensibilización (Diviani y cols., 1996; García-Sainz y cols., 2000); el subtipo  $\alpha_{1A}$  muestra un continuo reciclado entre la membrana y el citosol que es independiente de la interacción con agonistas unas veces, pero otras veces se muestra dependiente y por lo tanto dependiente también de la fosforilación y desensibilización previa por GRK2 (Morris y cols., 2004; Pediani y cols., 2005); y finalmente, el subtipo  $\alpha_{1D}$  que se encuentra localizado en el espacio intracelular (McCune y cols., 2000; Hague y cols., 2004) y que tiene mayor afinidad por los agonistas (Minneman y cols., 1994; Marti y cols., 2005), no muestra una

internalización dependiente de agonista (McCune y cols., 2000) y permanece activo incluso cuando el agonista ha desaparecido (Gisbert y cols., 2000, 2002, 2003a). De acuerdo con estas evidencias previas, el subtipo  $\alpha_{1D}$  no parece ser tan sensible a la regulación mediada por GRKs como podrían serlo los subtipos  $\alpha_{1A}$  y  $\alpha_{1B}$ , y por lo tanto, un aumento en la expresión de GRK2 podría no tener ninguna relevancia funcional en la actividad del AR- $\alpha_{1D}$ . De este modo, debemos esperar un aumento en la funcionalidad de este AR en aortas de ratas SHR hipertensas, a pesar del incremento en la expresión de GRK2. Si consideramos que  $\alpha_{1D}$  regula directamente la PA mediante la vasoconstricción (Tanoue y cols., 2002a, 2002b; Lyssand y cols., 2008), la elevada funcionalidad de este subtipo en arterias de animales hipertensos podría contribuir en gran medida al aumento en la PA observada en las ratas SHR adultas.

Los presentes resultados unidos a observaciones previas de nuestro grupo de investigación tanto en aorta como en arterias mesentéricas principal y de resistencia (Gisbert y cols., 2002) confirman esta propuesta. La elevada potencia que muestra tan sólo el BMY7378, antagonista selectivo  $\alpha_{1D}$ , y no el 5-MU, antagonista selectivo  $\alpha_{1A}$ , indica un aumento en el papel vasoconstrictor del AR- $\alpha_{1D}$  en aorta de ratas SHR hipertensas. La elevada funcionalidad de dicho subtipo tendría como consecuencia hemodinámica un aumento en la potencia de fenilefrina en la aorta, debido a la elevada afinidad del subtipo  $\alpha_{1D}$  por el agonista (Minneman y cols., 1994; Marti y cols., 2005), lo que implica que los vasos de animales hipertensos serían más sensibles al estímulo adrenérgico contráctil. Pero además, la mayor funcionalidad del subtipo  $\alpha_{1D}$  también tendría consecuencias en la cinética de la respuesta vasoconstrictora. Tal y como confirman nuestros resultados y los resultados previos de nuestro grupo de investigación, realizados no sólo en aortas sino también en la arteria mesentérica principal y en las arterias mesentéricas de resistencia, cuando aumenta la funcionalidad del subtipo  $\alpha_{1D}$  se observa una recuperación más lenta del tono basal una vez eliminado el agonista del medio. Esto es debido a las características peculiares de este subtipo, capaz de permanecer activo incluso cuando el estímulo ya ha desaparecido (Gisbert y cols., 2002, 2003a; Ziani y cols., 2002). Por lo tanto, las consecuencias de un aumento en la funcionalidad de los ARs- $\alpha_{1D}$ , serían una elevada sensibilidad al estímulo  $\alpha_1$ -adrenérgico, unido a una recuperación del tono basal más lenta o prolongada una vez eliminado dicho estímulo, lo que podría determinar el aumento del tono vascular adrenérgico observado durante la hipertensión. Esto es especialmente relevante si consideramos que, tal y como sucede en aorta, un aumento similar en el papel funcional del AR- $\alpha_{1D}$  fue observado en arterias mesentéricas de resistencia de ratas SHR y el tratamiento con captopril, era capaz de prevenir dicho aumento (Gisbert y cols., 2002).

En resumen, nuestros resultados en aorta torácica de rata, muestran claramente como un aumento en la expresión del AR- $\beta_1$  precede al estado hipertensivo mientras que un aumento en la expresión de los tres subtipos de ARs- $\alpha_1$  y los tres subtipos de ARs- $\beta$ , acompañado de un aumento en la expresión de la GRK2, ocurre en la aorta una vez ha aparecido el estado hipertensivo. La elevada expresión de GRK2 deteriora los mecanismos vasodilatadores mediados por los ARs- $\beta_1$  y - $\beta_2$  y contrarresta los mecanismos vasoconstrictores mediados por  $\alpha_{1A}$  y  $\alpha_{1B}$ . Sin embargo, este aumento no afecta de forma directa ni a la respuesta vasodilatadora mediada por el AR- $\beta_3$  ni a la respuesta vasoconstrictora mediada por el AR- $\alpha_{1D}$ , los dos subtipos mayoritarios en aorta de rata. Por lo tanto, el papel funcional de estos subtipos será más evidente. Debido a que el AR- $\beta_3$  es el menos sensible y el AR- $\alpha_{1D}$  el más sensible al estímulo adrenérgico, las consecuencias hemodinámicas de estos cambios serán dos: 1) un desequilibrio entre la sensibilidad ante el estímulo adrenérgico vasoconstrictor, el cual se encuentra aumentado, y vasodilatador, que se encuentra disminuido en los vasos de animales hipertensos; y 2) una cinética lenta de desaparición de la respuesta contráctil cuando el estímulo adrenérgico desaparece, debido al incremento en el papel del subtipo  $\alpha_{1D}$ . Estos resultados añaden nuevas perspectivas para el manejo terapéutico de la enfermedad, sugiriendo que ni los antagonistas  $\alpha_1$  no selectivos para un subtipo determinado, ni los antagonistas  $\beta_1$  o  $\beta_1/\beta_2$  selectivos, serían la mejor opción para el tratamiento de la hipertensión.

Los cambios observados podrían ser los responsables del elevado tono vasoconstrictor adrenérgico característico de la hipertensión, pero nos planteamos nuevas cuestiones respecto a su implicación en la génesis y mantenimiento de la hipertensión o si dichos cambios observados en la expresión y funcionalidad de los ARs y la GRK2, eran una consecuencia bien de las cifras elevadas de PA o incluso del daño vascular propios de la hipertensión

Para responder a esta cuestión, trabajamos con otro modelo de hipertensión animal, la hipertensión inducida por tratamiento crónico con L-NAME (LNHR), en el que se consigue un estado hipertensivo similar al de las ratas SHR tras la inhibición durante 4 semanas de la producción de NO, elevándose así las cifras de PA por falta de la modulación ejercida por este metabolito (Gardiner y cols., 1990; Ribeiro y cols., 1992). Como podemos observar, los valores correspondientes a PAS y a la razón peso corazón/peso corporal que mide la hipertrofia cardiaca, ambos obtenidos en el día del sacrificio de los animales, son similares tanto en el modelo genético de rata SHR, como en el modelo de hipertensión inducida (rata LNHR), igualando así, en el modelo de LNHR, las condiciones que tenía el modelo de hipertensión genética anteriormente estudiado. Al igualar los estados hipertensivos, podemos asumir que cualquier

cambio encontrado, coincidente o no, en el modelo de hipertensión inducida, será consecuencia directa, bien del aumento de las cifras de presión arterial o del deterioro vascular propios de la hipertensión, o bien serán cambios producidos como respuesta ante la inhibición crónica de la producción de NO; mientras que aquellos cambios que únicamente se observen en el modelo genético de hipertensión, estarán probablemente, más relacionados con los mecanismos causantes de la enfermedad.

Estudios previos habían visto que ni los ARs- $\alpha_1$  ni los ARs- $\beta$  vasculares o cardiacos parecían implicados en la hipertensión inducida por inhibición de la producción de NO (Pucci y cols., 1992; Manning y cols., 1993; Bank y cols., 1994), e incluso se había observado una bajada compensatoria de la vasoconstricción  $\alpha$ -adrenérgica entre otros mecanismos (Aleixandre y cols., 2001; López y cols., 2004). En nuestro caso, en aorta torácica de rata LNHR hemos observado una regulación a la baja de la expresión génica de los ARs- $\alpha_{1A}$  y - $\beta_2$ , y de la GRK2. Estos cambios a nivel de ARNm se correlacionan con cambios en la expresión proteica únicamente para el AR- $\alpha_{1A}$  y para la GRK2. No ocurre lo mismo en el caso del AR- $\beta_2$ , porque a pesar de observar una disminución en la expresión génica, encontramos niveles mayores de proteína lo que sugiere la existencia de una regulación post-transcripcional. En esta línea también hemos observado una disminución significativa de la expresión proteica del AR- $\beta_1$  sin cambios previos a nivel de ARNm. Los cambios en la expresión proteica fueron evidenciados con pruebas funcionales en las que pudimos observar dos fenómenos, por un lado una disminución en la potencia de fenilefrina, agonista selectivo  $\alpha_1$ -adrenérgico, que indica una disminución de la capacidad contráctil de la aorta, probablemente debido a la regulación a la baja que sufre el AR- $\alpha_{1A}$ ; acompañado de un aumento en la potencia de los agonistas Isoprenalina (agonista  $\beta_1/\beta_2$ ) y Salbutamol (agonista selectivo  $\beta_2$ ), indicando un aumento en la actividad  $\beta$ -adrenérgica vascular que podría deberse al aumento en la expresión proteica del AR- $\beta_2$ , unido a la disminución de la GRK2, principal quinasa encargada de la desensibilización de la señal  $\beta$ -adrenérgica (Bünemann y cols., 1999). Por otro lado se ha relacionado la actividad GRK2 con la inhibición de la eNOS en un modelo de hipertensión portal (Liu y cols., 2005). Nuestros resultados sugieren una relación entre ambas enzimas tal y como proponían estos autores y la disminución en la expresión de la GRK2 podría ser un mecanismo compensador para mejorar la producción de NO previamente inhibida por el L-NAME. En este mismo sentido podría interpretarse el aumento en la funcionalidad del AR- $\beta_2$ , relacionado con la actividad descrita a nivel endotelial para este subtipo (Gray y Marshall, 1992; Ferro y cols., 1999), y que podría suponer una forma de compensar la falta de la actividad vasodilatadora mediada por NO en este modelo de hipertensión.

Tal y como se había observado por otros autores, la administración prolongada de dosis elevadas de L-NAME, equiparable a nuestro tratamiento, producía además de hipertensión (que también se observa tras la administración de dosis inferiores), un deterioro generalizado de la respuesta contráctil vascular (Aleixandre y cols., 2001; López y cols., 2004). En nuestro caso, observamos una menor capacidad contráctil de la aorta procedente de ratas hipertensas, bien las tratadas con L-NAME como las SHR, que muestran una contracción máxima de menor magnitud independientemente del agente contráctil utilizado. Por ello, podemos suponer que el deterioro observado es una consecuencia de la hipertensión.

Por todo lo anteriormente expuesto, podemos resumir los principales resultados a nivel vascular indicando que, ante la falta de vasodilatación mediada por NO, característica de éste modelo de hipertensión inducida, el organismo trataría de compensarlo de tres maneras: 1) tratando de disminuir la contracción  $\alpha_1$ -adrenérgica; 2) tratando de aumentar los mecanismos relacionados con la vasodilatación  $\beta$ -adrenérgica, disminuyendo la expresión de la quinasa GRK2, en un intento por favorecer los procesos de vasodilatación al evitar la desensibilización de los ARs- $\beta$ ; y 3) tratando de restablecer la producción de NO al disminuir la inhibición de la eNOS que GRK2 podría estar ejerciendo en arterias. Todo apunta a un intento de mecanismo compensatorio que trataría de recuperar el equilibrio perdido por la falta de NO, poniendo en evidencia una vez más la enorme importancia del NO en la regulación de la homeostasis vascular (Vallance y cols., 1989; Moncada y cols., 1991; Moncada y Higgs, 2006).

## 4.2 CAMBIOS OBSERVADOS EN CORAZÓN Y RIÑÓN DE RATA HIPERTENSA

Cuando analizamos los cambios que se producen en la expresión de ARs y GRKs en corazón y riñón, encontramos que no siguen un patrón semejante entre ellos ni semejante a los que observamos en aorta luego el cambio que se produce en la hipertensión no es generalizado en todos los órganos o tejidos implicados en la homeostasis cardiovascular, sino específico de cada uno de ellos.

En las ratas SHR pre-hipertensas se observa en ventrículo izquierdo un único cambio significativo en la expresión de los ARs, una disminución en los niveles de ARNm del subtipo  $\alpha_{1D}$  que comienza en edades tempranas y que se mantiene en ratas adultas SHR de 16 semanas. Este cambio se observa también en riñón de ratas de 6

semanas y, al igual que ocurre en corazón, persiste cuando la rata ya se encuentra en estado hipertensivo por lo que podría estar implicado en la génesis de la hipertensión e incluso en su desarrollo y mantenimiento. Sin embargo, en el riñón de la rata pre-hipertensa, además de la disminución del subtipo  $\alpha_{1D}$  encontramos un aumento del subtipo  $\alpha_{1B}$  y una disminución del subtipo  $\alpha_{1A}$ .

Tal y como hemos mencionado anteriormente, parece que el subtipo  $\alpha_{1D}$  ejerce su principal papel regulador en el corazón controlando la contracción de la arteria coronaria (Chalothorn y cols., 2003; Jensen y cols., 2009a), aunque nuestros resultados en cardiomiocitos aislados demuestran también su presencia en este tipo celular (Pérez-Aso, 2010), pero se desconoce la implicación funcional de este cambio en el cardiomiocito. Una de las posibles consecuencias funcionales de la disminución en la expresión de este subtipo en las muestras de ventrículo izquierdo podría ser la mayor irrigación cardíaca del corazón. No se han observado cambios significativos en el resto de ARs estudiados, coincidiendo con la mayoría de estudios que no han apreciado cambios funcionales en la hipertensión (Takata y Kato, 1996). En lo que respecta a la GRK2 únicamente se ha observado un ligero aumento no significativo que podría estar relacionado con el inicio del deterioro  $\beta$ -adrenérgico del corazón que se observa en corazones hipertrofiados por la continua sobrecarga sufrida a causa del aumento de la PA (Bohm y cols., 1992; Castellano y cols., 1993; Choi y cols., 1997). Este aumento de la expresión y la actividad de GRK2, está relacionado, en estadios más avanzados de la enfermedad, con la transición del corazón hipertrofiado por sobrecarga de PA hacia el corazón insuficiente (Andreson y cols., 1999).

En lo que se refiere al riñón, un órgano tradicionalmente estudiado por su importante implicación en el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión arterial, vemos que el abanico de cambios observados en las ratas pre-hipertensas es mayor. Se sabe que en edades tempranas, previas al desarrollo de la enfermedad, se produce una disminución de la excreción de  $\text{Na}^+$  debido al aumento de los procesos de reabsorción tubular. Se ha visto que este aumento está mediado en parte por la estimulación del AR- $\alpha_{1B}$  en ratas SHR jóvenes o pre-hipertensas, proponiéndose este mecanismo como el inicio de la enfermedad (Michel y cols., 1989a, 1989b; Elhawary y Pang, 1994; Gesek, 1999). Nuestros resultados, en los que observamos precisamente un aumento en la expresión de este subtipo en riñón, pero no en otros tejidos, corroborarían esta hipótesis. Por otro lado algunos autores han demostrado un aumento en la densidad proteica de los ARs- $\alpha_1$  en riñones de ratas SHR de diferentes edades (Takata y Kato, 1996). Coincidiendo con ellos, observamos un aumento significativo en los niveles de ARNm del subtipo mayoritario a nivel renal, acompañado por una disminución de los subtipos minoritarios,  $\alpha_{1D}$  y  $\alpha_{1A}$ , subtipos

que controlan la contracción de las arterias renales (Elhawary y cols., 1992; Villalobos-Molina y cols., 1997). Podemos interpretar estos cambios como una respuesta protectora del riñón, facilitando de este modo el flujo renal. La disminución de las resistencias vasculares renales que sería la consecuencia funcional del cambio, favorecería una menor presión de filtrado que aumentaría la retención de electrolitos, mediada por el subtipo  $\alpha_{1B}$  e implicada en el aumento sistémico de la PA. El papel exacto de los ARs- $\alpha_{1A}$  y - $\alpha_{1D}$  a nivel renal en la génesis o mantenimiento de la hipertensión está por aclarar. No se han observado otros cambios previos a la enfermedad, coincidiendo con la mayor parte de la literatura (Takata y Kato, 1996).

De la misma manera que se proponía al AR- $\alpha_{1B}$  como responsable del inicio de la hipertensión (Michel y cols., 1989a, 1989b; Elhawary y Pang, 1994; Gesek, 1999), los mismos autores proponen que el mantenimiento de la enfermedad, en edades más avanzadas, sería función del AR- $\alpha_2$ , normalizándose así la actividad del subtipo  $\alpha_{1B}$  (Gesek, 1999). En nuestro caso, en ratas adultas hipertensas de 16 semanas aún seguimos encontrado niveles elevados de ARNm del subtipo  $\alpha_{1B}$ . Lo mismo ocurre con el subtipo  $\alpha_{1D}$  que sigue disminuido en la rata adulta, mientras que el ARNm del subtipo  $\alpha_{1A}$  se encuentra en niveles similares respecto a los niveles observados en la rata WKY de su misma edad. No se han observado cambios significativos en la expresión de los diferentes subtipos de ARs- $\beta$  y la GRK2 en riñones de ratas SHR adultas, coincidiendo con trabajos que apuntan que no hay cambios a nivel de expresión (Takata y Kato, 1996) pero tampoco a nivel funcional (Michel y cols., 1993).

*¿Se reproducen estos cambios en el otro modelo de hipertensión?* En el ventrículo izquierdo de rata LNHR observamos varios cambios respecto a sus controles Wistar pero sólo la disminución de la expresión génica del subtipo  $\alpha_{1D}$  reproduce lo observado en ratas SHR, apoyando la hipótesis lanzada anteriormente en la que proponíamos que, teniendo en cuenta que este subtipo es el responsable de la contracción de la arteria coronaria (Chalothorn y cols., 2003; Jensen y cols., 2009a), aunque también se encuentra presente en el cardiomiocito (Pérez-Aso, 2010), dicha bajada podría establecerse como mecanismo protector del corazón facilitando, entre otras cosas, su irrigación.

Otros cambios observados en el ventrículo izquierdo fueron los aumentos significativos en la expresión de los ARs- $\beta_1$  y - $\beta_2$ , y de la quinasa GRK2 que no se han descrito hasta el momento y de los que desconocemos su trascendencia funcional aunque podrían estar relacionados con la hipertrofia cardiaca (Bohm y cols., 1992; Castellano y cols., 1993; Eckhart y cols., 2002) por distintos mecanismos: por un lado la activación del AR- $\beta_1$  facilitaría la vía de la CaMKII implicada en el desarrollo

inadecuado del corazón (Morisco y cols., 2001); por otro lado una estimulación mayor de la vía promovería el aumento de actividad GRK2, que como hemos visto está directamente relacionada con la hipertrofia y con el deterioro de la función cardíaca (Choi y cols., 1997; Eckhart y cols., 2002). Además, se podría estar favoreciendo el acoplamiento del AR- $\beta_2$  a la vía de la proteína  $G_{i/o}/NO/GMPc$ , al igual que ocurre en arterias (Mallem y cols., 2005), y por lo tanto provocando como consecuencia la activación de la vía de las MAPK que favorecería el crecimiento del corazón (Xiao y cols., 2004, 2006).

La hipertrofia cardíaca descrita en este modelo acompaña al aumento de PA, o lo que es lo mismo, cuanto mayores cifras de PA arterial se alcancen tras tratamiento crónico con L-NAME, mayor será la hipertrofia cardíaca (Arnal y cols., 1993; Pechanova y cols., 1997), tal y como ocurre en nuestro caso (Figura 1C, página 124).

Algunos autores sugieren que dicha hipertrofia vendría a su vez acompañada de una mayor actividad de renina plasmática (Arnal y cols., 1993), pero no se conocen los mecanismos concretos. En este sentido, en el riñón, observamos un aumento en la expresión de ARs- $\beta_1$  y - $\beta_2$  y de GRK2 similar al que aparece en ventrículo izquierdo. Se sabe que los ARs- $\beta_1$  y - $\beta_2$ , pero no el - $\beta_3$ , están implicados en la liberación de renina (Kim y cols., 2007). Por lo tanto el aumento observado en la expresión del ARNm para ambos ARs podría estar relacionado con una mayor liberación de renina (Zanchi y cols., 1993), en parte responsable de la hipertensión generada en la rata LNHR, tal y como indica la reducción parcial de las cifras de PA tras el tratamiento con inhibidores del sistema Renina-Angiotensina (Ribeiro y cols., 1992; Pechanova y cols., 1997; Takemoto y cols., 1997). El aumento de renina podría ser responsable de la hipertrofia cardíaca, si tenemos en cuenta que, como hemos comentado, una mayor actividad plasmática de renina se asocia a este fenómeno en dicho modelo (Arnal y cols., 1993) y que tras el tratamiento con IECAs, como el Captopril, se observa una regresión de la hipertrofia que no está relacionado ni con la recuperación de los niveles de NO ni con el aumento del GMPc en este modelo de hipertensión (Takemoto y cols., 1997; Bernatova y cols., 1999, 2000).

El aumento de la expresión de GRK2 a nivel renal podría estar relacionado con una mayor reabsorción de  $Na^+$  y por lo tanto una menor tasa de filtración, característica de este modelo de hipertensión (Ribeiro y cols., 1992; Dinudom y cols., 2004).

Por otra parte, al igual que ocurría en ratas SHR, vemos en riñón de ratas LNHR un aumento significativo de los niveles de ARNm del AR- $\alpha_{1B}$ , algo que estaría en

concordancia con los trabajos que aseguran que dicho subtipo tiene un papel importante en el inicio de la hipertensión (Michel y cols., 1989a, 1989b; Gesek, 1999) y explicaría también la menor tasa de filtración glomerular observada en este modelo (Ribeiro y cols., 1992; Baylis y cols., 1992), que podría estar en concordancia con los estudios que establecen una relación del AR- $\alpha_{1B}$  con los procesos de reabsorción de electrolitos (Elhawary y Pang, 1994).

Y, a diferencia del riñón de ratas SHR, se observa en las LNHR un aumento en la expresión del subtipo  $\alpha_{1D}$ , principal responsable de la regulación de la contracción de la arteria renal (Villalobos-Molina y cols., 1997), algo que coincidiría con resultados previos que indican un menor flujo renal y un aumento en las resistencias vasculares renales, debido a una mayor contracción de la vasculatura renal en ratas LNHR (Ribeiro y cols., 1992; Baylis y cols., 1992).

De modo que, la inhibición de la producción de NO tendría como consecuencia entre otras, la sobre-expresión del AR- $\beta_1$  renal, responsable de un aumento en la secreción de renina plasmática que además de favorecer la hipertensión por retención de electrolitos y líquidos, también sería responsable de los cambios estructurales típicos como la hipertrofia cardiaca. El aumento de GRK2 podría ir acompañando al aumento del AR- $\beta_2$ , ya que esta enzima es su principal reguladora. En este aspecto el aumento de la expresión de GRK2 también podría estar relacionado, al igual que ocurría para el AR- $\alpha_{1B}$ , con una mayor reabsorción de  $\text{Na}^+$  y por lo tanto una menor tasa de filtración, característico de este modelo de hipertensión (Ribeiro y cols., 1992; Dinudom y cols., 2004).

### 4.3 CAMBIOS OBSERVADOS EN LINFOCITOS CIRCULANTES

Habiendo analizado los cambios en la expresión y funcionalidad de los ARs y la GRK2 en vasos corazón y riñón, en dos modelos animales de hipertensión, nos planteamos extrapolar estos resultados a la hipertensión humana. Para ello, necesitábamos analizar la expresión de estos mismos genes en una muestra accesible y poco cruenta por lo que, como hemos comentado en el apartado de Revisión Bibliográfica, seleccionamos los linfocitos circulantes, por haber sido descritos como biomarcadores de otros tejidos como corazón y vasos (Michel y cols., 1986; Feldman, 1987; Brodde y cols., 1989; Ricci y cols., 1999; Gros y cols., 1997, 2000; Tayebati y cols., 2000; Veglio y cols., 2001; Dzimiry y cols., 2002; Oyama y cols., 2005; Hata y cols., 2006; Cohn y cols., 2009). Planteamos nuestro estudio trabajando con linfocitos

de ratas hipertensas SHR y también con linfocitos humanos, procedentes de pacientes control o hipertensos.

Con el objetivo de ver si los cambios observados en los diferentes tejidos de ratas adultas hipertensas SHR se reflejaban en los linfocitos circulantes, tal y como sugieren muchos autores (Brodde y cols., 1986; Dzimiri y cols., 2002; Yu y cols., 2007), hemos analizado los niveles de ARNm para los ARs- $\beta_1$  y - $\beta_2$ , además de para las tres GRKs (GRK2, GRK3 y GRK5) detectadas en este tipo celular. No fue posible detectar el AR- $\beta_3$ , ni ninguno de los subtipos de ARs- $\alpha_1$  en linfocitos de rata, aunque si los encontramos muy poco expresados, en linfocitos humanos, donde  $\alpha_{1A}$  y  $\beta_3$  fueron prácticamente indetectables.

Nunca hasta ahora se habían estudiado cambios en la expresión de los ARs- $\beta$  en linfocitos de rata SHR con la hipertensión. Nosotros no hemos observado cambios importantes salvo una disminución en la expresión del subtipo  $\beta_1$ . Nuestros resultados no coinciden con estudios previos que muestran un incremento en la densidad del AR- $\beta$  en linfocitos, con la salvedad de que estos estudios fueron realizados en humanos (Brodde y cols., 1985b; Parfyonova y cols., 1988; Bono y cols., 1995; Yu y cols., 2007). Por otro lado, como ya hemos mencionado, otros autores habían encontrado un deterioro en la actividad  $\beta$ -adrenérgica que atribuyen únicamente a un aumento en la expresión proteica y en la actividad de la GRK2, tanto en linfocitos de ratas (Gros y cols., 2000) como de pacientes hipertensos (Gros y cols., 1999), pero no determinan si hay cambio en la expresión de los ARs- $\beta$ . Es de señalar que, a pesar de la mayor expresión proteica de GRK2, estos autores no encontraron cambios en su expresión génica. Nuestros resultados concuerdan en este aspecto y no muestran ningún cambio significativo en los niveles de ARNm de las tres GRKs en linfocitos de rata SHR adulta, pero tampoco en los pacientes hipertensos (tratados o no). El resultado final sería que la funcionalidad  $\beta$ -adrenérgica del linfocito durante la hipertensión podría estar deteriorada por el aumento en la expresión y actividad de la GRK2, del mismo modo que describíamos en aorta de rata adulta SHR, y también por la disminución en la expresión de los ARs- $\beta_1$  tal y cómo nuestros resultados ponen de manifiesto.

El papel exacto de cada subtipo de ARs- $\beta$  en el linfocito, y su relación con la actividad propia de la célula durante la hipertensión deberá ser analizado a fondo en futuros trabajos pero, nuestros resultados indican que los cambios que se producen en linfocitos de ratas SHR no reflejan los cambios observados en los otros territorios estudiados luego son propios del linfocito y contradicen trabajos anteriores en los que encuentran cambios semejantes en corazón o aorta y linfocitos (Gros y cols.,

2000; Oyama y cols., 2005). Para tratar de explicar esta contradicción debemos considerar un posible sesgo en los resultados que vendría determinado por diferencias a otros niveles como por ejemplo, en el nivel de catecolaminas circulantes. Cuando se produce un aumento en las catecolaminas circulantes, la mayor activación adrenérgica que producen puede dar lugar a un incremento en la actividad de los mecanismos moduladores, como la mayor expresión de las GRKs encargadas de la internalización de los ARs. En este caso, si podríamos encontrar un aumento generalizado en la expresión proteica y en la actividad de las GRKs y encontraríamos cambios paralelos en linfocitos y otros órganos o tejidos, pudiendo considerar al linfocito como un biomarcador de estos cambios (Attramadal, 2009). Pero en otras ocasiones, un determinado estado patológico puede generar un cambio puntual en un órgano, que puede no estar reflejado en los linfocitos. Pensamos que esto ocurre en los animales SHR de 16 semanas, que ya manifiestan cifras elevadas de hipertensión arterial e hipertrofia cardiaca pero que, dada la reciente aparición de los signos característicos de la patología, todavía no manifiestan unos mecanismos generales en todos los órganos o tejidos involucrados en la homeostasis cardiovascular. En este caso, vemos que aparecen cambios específicos en la expresión de ARs y GRK2 en cada territorio, y solo cuando la progresión de la enfermedad condujera a una elevación en las catecolaminas circulantes, o a otros mecanismos compensadores generales, esperaríamos encontrar correlación de los cambios entre los tejidos y los linfocitos.

Con esta perspectiva, analizamos los cambios en la expresión de ARs y GRKs en linfocitos humanos procedentes de pacientes con diferentes grados de hipertensión además de muestras obtenidas de voluntarios sanos. Como hemos comentado anteriormente el subtipo mayoritario en linfocitos humanos es el AR- $\beta_2$ , seguido de cerca por el subtipo  $\beta_1$ , y de lejos por los ARs- $\alpha_{1B}$  y - $\alpha_{1D}$ , que se expresan en proporción similar.

*¿Qué cambios se observan en la expresión génica linfocitaria durante la hipertensión en el ser humano?* Nuestros resultados indican que aparece un pequeño aumento no significativo en los niveles de ARNm del AR- $\beta_1$  en linfocitos de pacientes con hipertensión clínica aislada, y un aumento más marcado y significativo en aquellos pacientes con hipertensión. Cabe destacar que este aumento fue atenuado en pacientes hipertensos que recibían tratamiento con IECAS o ARAII, sugiriendo que la inhibición del sistema renina-angiotensina, de una forma directa o indirecta, regularía la expresión del AR- $\beta_1$ .

No se observó un cambio estadísticamente significativo en los niveles de ARNm del AR- $\beta_2$  en el grupo de pacientes hipertensos, lo que contrasta con estudios previos

que muestran un incremento en la densidad de dicho subtipo (Brodde y cols., 1985; Parfyonova y cols., 1988; Bono y cols., 1995). Esta aparente discrepancia respecto a los resultados humanos podría deberse al hecho de que algunos autores asumían que el AR- $\beta_2$  era el único subtipo presente en linfocitos y usaban radioligandos no selectivos para cuantificar dichos receptores, por lo que en sus resultados observan un aumento de AR- $\beta$  que interpretan como correspondiente al subtipo  $\beta_2$ , pero que nosotros, que hemos diferenciado entre ambos subtipos, vemos que corresponde al  $\beta_1$ .

Relacionado también con los cambios observados en riñón de rata pre-hipertensa, en linfocitos de pacientes hipertensos hemos observado un aumento significativo de los niveles de ARNm del AR- $\alpha_{1B}$ , que podría reflejar cambios generales a otros niveles como riñón o vasos. Este aspecto no lo hemos podido comprobar en linfocitos de rata por no detectar el ARNm del AR- $\alpha_{1B}$  en cantidad suficiente para su valoración comparativa.

Por otra parte, un aumento en la expresión proteica de GRK2 en linfocitos, que no está relacionada con un incremento de los niveles de ARNm para esta quinasa, ha sido descrito en modelos humanos de hipertensión (Gros y cols., 1999). Nuestros resultados confirman esta observación, ya que no hemos encontrado cambios significativos en los niveles de ARNm de GRK2 en linfocitos de pacientes hipertensos. En cuanto a los niveles de ARNm de las otras GRKs estudiadas, no encontramos ningún cambio significativo, tan sólo un ligero descenso en los niveles de GRK3 acompañado de un aumento, no significativo, de los niveles de ARNm de GRK5, ambos observados en el grupo de pacientes hipertensos. Dado que los sujetos incluidos en nuestro estudio se encontraban clasificados como hipertensos de grado 1 (leve), será necesario realizar más estudios para analizar si estos ligeros cambios se convierten o no en cambios más pronunciados, en pacientes con hipertensión esencial grave.

Como hemos comentado anteriormente, en determinadas circunstancias, las alteraciones en los niveles de ARNm de los ARs- $\alpha_1$  y - $\beta$  en linfocitos circulantes podrían estar reflejando los mismos cambios en los niveles de ARNm en corazón y vasos de pacientes hipertensos y el linfocito podría ser utilizado como un biomarcador de estos cambios (Brodde y cols., 1986; Ricci y cols., 1999; Tayebati y cols., 2000; Dzimiri y cols., 2002; Yu y cols., 2007). De ser así, las variables clínicas características del estado hipertensivo y dependientes de la expresión de los ARs en corazón, vasos y riñón, deberían estar relacionadas con los niveles de ARNm observados en los linfocitos de nuestra población en estudio. Basándonos en esta premisa, hemos analizado la posible correlación entre la expresión de los ARs en

linfocitos y las diferentes variables clínicas determinadas en cada paciente. Las características de los pacientes incluidos en el presente trabajo permiten su evaluación, ya que todos fueron relativamente jóvenes, mostraban valores normales de los parámetros bioquímicos determinados y no sufrían patologías concomitantes, lo que nos permite descartar factores de confusión. Además, se encuentran en un estadio de la hipertensión en el que todavía no se ha producido un aumento en las catecolaminas circulantes, tal como se observa en la Tabla XVIII, por lo que las correlaciones que observemos no vendrán determinadas por los cambios que este aumento podría producir en los pacientes.

Un aspecto importante a considerar al establecer la correlación entre los niveles de ARNm para los ARs y las variables clínicas es el género. La mujer al igual que el hombre con la edad experimenta un aumento significativo de las cifras medias de la presión arterial, y por ello, también aumenta el número de mujeres con hipertensión arterial. Sin embargo, hasta la quinta década de la vida y correspondiendo con el inicio de la menopausia, la prevalencia de hipertensión arterial es significativamente menor en la mujer que en el varón. Esta relación se invierte a partir de dicho momento encontrando mayor prevalencia de HTA en la mujer que en el hombre a partir de los 50 años. Vemos como, en esta evolución, también se observa un esquema similar al que encontrábamos al analizar la mortalidad cardiovascular en función de la edad y el género, luego podría ser la diferente epidemiología de la hipertensión la que marque la distinta sensibilidad de hombres y mujeres al riesgo cardiovascular. Por ello, nos ha parecido interesante realizar el análisis de la correlación en función del género, para determinar si existen diferencias que justifiquen el perfil epidemiológico característico de hombres y mujeres hipertensos.

Con esta perspectiva de género, al analizar los niveles de expresión de ARNm del AR- $\alpha_{1B}$ , ya encontramos una diferencia que es interesante señalar. Observamos una correlación positiva entre las cifras de PAS y los ARs- $\alpha_{1B}$  en linfocitos circulantes humanos en el total de la población estudiada, y también en el grupo de hombres, pero no se observa esta misma correlación en las mujeres. Esta relación entre la expresión del AR- $\alpha_{1B}$  en linfocitos humanos y las cifras de PAS corrobora la hipótesis planteada en la presente tesis doctoral, sobre la importancia del AR- $\alpha_{1B}$  en la hipertensión, hipótesis apoyada también por otros autores (Michel y cols., 1989a, 1989b; Gesek, 1999). Tal y como vimos en ratas pre-hipertensas, la expresión de dicho subtipo a nivel renal se encuentra elevada en animales SHR prehipertensos e hipertensos, además de en ratas con hipertensión inducida por L-NAME, y probablemente sea responsable de una mayor retención de electrolitos, líquidos y por lo tanto del incremento de PA que podría marcar el inicio de la enfermedad

(Elhawary y Pang, 1994; Gesek, 1999). En nuestro caso, los pacientes incluidos en el estudio también se encuentran en un estadio inicial de la patología, pues se encuadran en el grupo de hipertensión leve-moderada, sin otras patologías concomitantes y sin alteración de órganos diana, por lo que podrían ser equiparables a la hipertensión que presentan los animales de experimentación utilizados. Dada la correlación observada entre la expresión de los ARs- $\alpha_{1B}$  en linfocitos y las cifras de PA, pensamos que los niveles de ARNm en linfocitos reflejan un mecanismo general que ocurre también a otro nivel, en territorios que controlan la PA como riñón o vasos (tal y como observábamos en ratas hipertensas). Por lo que respecta a la influencia del género, debemos señalar que los animales de experimentación utilizados son macho, luego futuros estudios podrán aclarar si en riñón de ratas SHR existe o no una relación dependiente de género entre la expresión del AR- $\alpha_{1B}$  y las cifras de PA, tal como hemos visto en linfocitos humanos.

Otro resultado a destacar en nuestro análisis, es la correlación significativa e inversa entre los niveles de expresión del AR- $\beta_2$  en linfocitos (ligeramente menores en los pacientes hipertensos) y las cifras de PAD diurna (y de 24 horas). Esta correlación sólo es significativa cuando consideramos el conjunto de la población, luego no se puede analizar en función del género. La correlación existente entre los niveles de ARNm para el AR- $\beta_2$  y las cifras de PAD se podría explicar desde dos perspectivas diferentes: en primer lugar como una participación directa del AR- $\beta_2$  en la regulación de la PAD, pero también suponiendo que la alteración de la PAD tiene como consecuencia una disminución en la expresión del AR- $\beta_2$ . Si consideramos que la vasodilatación  $\beta$ -adrenérgica (principalmente mediada por el subtipo  $\beta_2$ ) es un mecanismo clave en el control de la resistencia vascular (Feldman, 1987; Brodde y cols., 2006; Penela y cols., 2006), la interpretación más probable de la correlación observada es la primera, esto es, que una mayor expresión del AR- $\beta_2$  en los vasos (reflejada en linfocitos) facilitaría los mecanismos vasodilatadores, mediante la reducción de la resistencia vascular, lo que disminuiría los valores de PAD. Además, nuestros resultados podrían estar relacionados con trabajos previos que describen como la elevación de la PAD podría estar asociada al haplotipo del subtipo  $\beta_2$  que contiene la variante Gln27, inductora de la regulación a la baja de este subtipo (Binder y cols., 2006). Trabajos futuros podrían determinar la existencia o no de una correlación entre la presencia de la variante Gln27, una menor expresión del AR- $\beta_2$  y una elevación en la PAD.

Por otra parte, y a pesar de haber encontrado aumentados los niveles de expresión del subtipo  $\beta_1$  en los linfocitos de pacientes hipertensos, no encontramos una correlación significativa entre estos niveles y las cifras de PAS o PAD, por lo que

no existe una evidencia clínica que nos permita suponer que la expresión de este subtipo en linfocitos esté relacionada directa o indirectamente con el control de la PA. Sin embargo, es interesante señalar que aparece una correlación significativa entre los niveles de ARNm del AR- $\beta_1$  y la FC diurna que es dependiente del género, pues no se observa en el grupo de hombres, sino sólo en el de mujeres y en el total de pacientes. Ya hemos comentado que la expresión de los ARs- $\beta$  en el linfocito podría ser un reflejo de lo que está ocurriendo en el corazón (Brodde y cols., 1986), aunque este hecho no se puede asumir de forma generalizada, sobre todo en relación con el subtipo  $\beta_1$  (Michel y cols., 1986; Brodde y cols., 1989). Al menos en el grupo de mujeres hipertensas, nuestros resultados muestran una relación positiva entre la expresión linfocitaria del subtipo  $\beta_1$  y la FC diurna, función regulada por éste AR a nivel cardíaco, por lo que probablemente se pueda decir que, de un modo u otro, sí que estarían reflejando los linfocitos aquello que ocurre en el corazón en estas condiciones. La razón de la diferencia observada en función del género se puede explicar considerando que, según la edad media ( $47 \pm 3$  años), las mujeres incluidas en el estudio se encuentran bajo la influencia de los estrógenos y, tal como se ha demostrado recientemente en rata, los estrógenos ejercen un papel cardioprotector sobre el corazón, disminuyendo la expresión de los ARs- $\beta_1$  (Kam y cols., 2004; Wu y cols., 2008) y aumentando la expresión de los ARs- $\beta_2$  (Wu y cols., 2008). Podríamos suponer que en las mujeres, los estrógenos determinan la expresión del AR- $\beta_1$  no sólo en corazón sino también en linfocitos y otros órganos, y por ello, dependiendo del nivel estrogénico, encontramos una expresión en linfocitos que correlaciona con la FC, la variable indicativa de la funcionalidad del AR- $\beta_1$  en el corazón. Esta hipótesis se tendría que determinar en un futuro.

Nuestros resultados indican también que existe una relación entre la expresión del AR- $\beta_1$  en linfocitos y la excreción urinaria de albumina (EUA) en el grupo de pacientes con microalbuminuria. Dado el escaso número de pacientes con esta característica no hemos podido establecer si esta correlación varía o no en función del género.

La elevación de la EUA está controlada por factores metabólicos y hemodinámicos (Redon y cols., 2002), y se asocia al desarrollo de la hipertensión (Wang y cols., 2005) y el riesgo cardiovascular (Schmieder y cols., 2007), ya que se encuentra íntimamente relacionada con el daño endotelial (Deckert y cols., 1989; Perticone y cols., 2007), la rigidez de las grandes arterias (Hermans y cols., 2007), el remodelado vascular inadecuado (Hermans y cols., 2008) y el deterioro de la elasticidad aórtica (Duman y cols., 2008). Sin embargo, los mecanismos exactos que subyacen en la relación entre microalbuminuria y riesgo cardiovascular están aún por

definir. Así pues, nuestra observación adquiere relevancia si asumimos que la expresión del AR- $\beta_1$  en linfocitos circulantes refleja lo que está ocurriendo en otros órganos y/o vasos (Brodde y cols., 1985, 1986; Parfyonova y cols., 1988; Bono y cols., 1995) de lo que podríamos extrapolar que, un aumento en los niveles del subtipo  $\beta_1$  en vasos y/o riñón humano podría estar relacionado con el daño vascular y con alteraciones en la función renal. Nuestras observaciones acerca de la normalización de los niveles de expresión del subtipo  $\beta_1$  en linfocitos de pacientes tratados con IECA o ARAII podría explicar la evidencia clínica de que el bloqueo del sistema renina-angiotensina reduce la albuminuria y que el tratamiento combinado con  $\beta$ -bloqueantes causa una reducción adicional de la EUA (Bakris y cols., 2005). Quedaría por determinar si esta correlación observada entre el subtipo  $\beta_1$  y la EUA más que reflejar cambios en otros territorios, se debe al aumento en la expresión del AR- $\beta_1$  en las células responsables de la respuesta inmunitaria precisamente formando parte de un mecanismo activador o diferenciador de las mismas, que participa en una respuesta inflamatoria relacionada con la microalbuminuria (Pedrinelli y cols., 2001; Holm y cols., 2006).

Pese a no haber encontrado cambios significativos en los niveles de expresión de las GRKs en pacientes hipertensos, nuestro estudio revela que la expresión linfocitaria de GRK3 correlaciona de manera inversa y significativa con los valores de PAS y PAD ambulatoria, indicando que esta quinasa estaría involucrada en la regulación de la PA en el ser humano. Lo contrario (es decir, que la expresión de GRK3 es modulada por la PA), no se sustentaría si nos fijamos en estudios previos realizados con ratones transgénicos, en los cuales la inhibición selectiva de la GRK3 endógena cardíaca resultaba en un fenotipo con elevada PAS y PAD, y sin alteraciones en la FC, parámetros que fueron determinados por diferentes métodos en el ratón consciente (Vinge y cols., 2008).

Si asumimos que los cambios en la expresión de GRK3 en linfocitos reflejan cambios en el corazón y/o vasos, tal y como se demostró previamente para GRK2 y GRK5 (Gros y cols., 2000; Iaccarino y cols., 2005; Oyama y cols., 2005), nuestro trabajo es el primero en demostrar un papel fisiopatológico para la GRK3 humana en el sistema cardiovascular, y podría contribuir a un mejor entendimiento de la posición del gen de esta quinasa en un mismo *locus* del cromosoma 11, relacionado con la contractilidad del ventrículo izquierdo (Arnett y cols., 2001). El significado exacto de nuestro descubrimiento deberá ser confirmado por futuros estudios que sean capaces de determinar qué GPCR, directamente implicado en el control de la PA, es regulado por la GRK3. Si nos basamos en la evidencia que muestra que los cambios en la expresión de GRK3 no alteran ni las señales bioquímicas ni el papel funcional de

los ARs- $\beta$  en el miocardio, mientras que aquellas respuestas mediadas por el AR- $\alpha_{1B}$  se encuentran profundamente alteradas tras modificar la expresión de GRK3 (Iaccarino y cols., 1998; Eckhart y cols., 2000; Vinge y cols., 2007, 2008), podemos proponer que quizá esta quinasa en el corazón modula selectivamente la actividad de este subtipo que, como ya hemos comentado, parece directamente relacionado con el control de la PA. Futuros experimentos podrían determinar el papel de GRK3 en el control de la PA a través de la regulación del AR- $\alpha_{1B}$  o a través de cualquier otro GPCR.

También se han encontrado otras correlaciones, esta vez no con variables hemodinámicas típicas de la hipertensión, como acabamos de ver, sino con variables bioquímicas que marcan el estado del paciente. La primera correlación significativa aparece entre los niveles de ARNm del AR- $\alpha_{1B}$  con los niveles plasmáticos de Homocisteína. Muchos estudios han demostrado que existe una asociación clara entre la elevación de la homocisteína plasmática y el riesgo de enfermedad vascular periférica, cerebral y coronaria, aunque muchos otros autores afirman que es un factor de riesgo independiente de enfermedad vascular (Hankey y Eikelboom, 1999; Suárez García y cols., 2001). Por otro lado, más recientemente se ha planteado que la homocisteína podría ser un marcador relacionado con una menor tasa de filtración glomerular, o lo que es lo mismo con el deterioro de la función renal (Potter y cols., 2008). Esta última relación (mayores niveles de AR- $\alpha_{1B}$  asociados a mayores niveles de homocisteína plasmática, y esta a su vez asociada a un mayor deterioro de la función renal) concuerda con nuestra propuesta que atribuye al AR- $\alpha_{1B}$  renal un papel en la génesis de la hipertensión, tal como observábamos en ratas hipertensas. Si, como hemos mencionado anteriormente, una mayor expresión del AR- $\alpha_{1B}$  a nivel renal impide la correcta eliminación de líquidos, y una mayor expresión linfocitaria de este subtipo se asocia a un incremento de la PA, está clara la importancia de la homocisteína como factor predictivo del riesgo cardiovascular y renal.

A pesar de no haber encontrado cambios significativos en la expresión génica del AR- $\alpha_{1D}$  en los pacientes hipertensos, sí que hemos observado una correlación significativa al comparar los niveles de ARNm de este subtipo y las concentraciones plasmáticas de aldosterona. La aldosterona es el producto final del sistema renina-angiotensina, siendo responsable de la retención de líquidos asociada a la retención de  $\text{Na}^+$  (Guyton y Hall, 1996). Los primeros estudios sobre una posible regulación cruzada entre ambos sistemas adrenérgico y renina-angiotensina, sugieren que angiotensina II podría estar regulando la expresión de los ARs- $\alpha_1$  a nivel del músculo liso vascular (Hu y cols., 1995). Además, nuestros resultados previos (Gisbert y cols., 2002) y los de otros autores (Godínez-Hernández y cols., 2005) demuestran una

disminución en la expresión y la funcionalidad, del AR- $\alpha_{1D}$  en aortas de ratas SHR tras el tratamiento agudo o crónico con captopril lo que parece indicar que la inhibición de la síntesis de angiotensina II, con la consiguiente disminución en la síntesis de aldosterona, conduce a una menor expresión del subtipo  $\alpha_{1D}$ . Nuestros resultados confirmarían esta relación, ya que, como hemos observado, a mayor concentración de aldosterona, observamos una mayor expresión del AR- $\alpha_{1D}$ , aunque, con las evidencias de que disponemos, tampoco podemos descartar la relación opuesta, esto es, que la mayor expresión del subtipo  $\alpha_{1D}$  tenga como consecuencia una mayor liberación de aldosterona. Futuros estudios deberían aclarar la trascendencia fisiológica y/o patológica de esta posible regulación cruzada entre ambos sistemas, tan implicados en la génesis y mantenimiento de la hipertensión.

Resumiendo, en el modelo humano de hipertensión hemos observado que: 1) los niveles de expresión de los ARs- $\alpha_{1B}$  y  $\beta_1$  se encuentran elevados en linfocitos circulantes de pacientes hipertensos, y estos últimos se recuperan tras el tratamiento con IECA o ARAII; 2) los niveles de expresión del subtipo  $\alpha_{1B}$  se correlacionan de forma positiva con las cifras de PA en hombres, y con los niveles de homocisteína plasmática, algo que podría estar en relación con la actividad renal de dicho subtipo en el control de la PA y su implicación en el deterioro renal, complementando los resultados en modelos de hipertensión animal mostrados anteriormente; 3) los niveles de expresión del AR- $\beta_1$  se correlacionan con las cifras de FC en mujeres, y por otro lado, también correlacionan de manera directa con la EUA en pacientes hipertensos con microalbuminuria, lo que relaciona dicho receptor con el riesgo cardiovascular; 4) los niveles de expresión del AR- $\beta_2$  correlacionan de manera inversa con los valores de PAD, y los niveles de GRK3 correlacionan de forma inversa con los valores de PAS y PAD, resultados que confirman la importancia de la vasodilatación mediada por el AR- $\beta_2$  en el control de la resistencia vascular y sugiere un papel protector para la GRK3 en la regulación de la homeostasis cardiovascular; 5) por último, los niveles de expresión del AR- $\alpha_{1D}$  correlacionan de forma directa con las cifras de aldosterona plasmática, aportando nuevas evidencias sobre la posible regulación cruzada existente entre ambos sistemas adrenérgico y renina-angiotensina-aldosterona relacionados con la génesis y/o mantenimiento de la hipertensión esencial.

## 5 DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN Y FUNCIONALIDAD DE ARs Y GRKS EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA

Continuando el estudio iniciado en pacientes hipertensos sobre la expresión génica de ARs y GRKs en linfocitos circulantes, hemos cuantificado los niveles de ARNm para dichos genes en pacientes con Insuficiencia Cardíaca en un estado terminal de la enfermedad, cuando son sometidos a trasplante cardíaco. Continuamos el estudio en estos mismos pacientes a los que ya se les ha trasplantado un corazón normalmente funcionante.

### 5.1 PACIENTES CON INSUFICIENCIA CARDIACA EN FASE TERMINAL

Los principales cambios observados en pacientes con IC en fase terminal fueron por un lado, un incremento muy acusado en la expresión del AR- $\beta_1$ , acompañado de un incremento en la expresión de GRK5 y una disminución de la expresión de GRK2. Al analizar estos resultados observamos discrepancias con la literatura que describe una disminución en la expresión del subtipo  $\beta_1$  en linfocitos de pacientes con IC (Yu y cols., 2007), aunque se trata de un único trabajo, realizado con una metodología menos precisa que la empleada en nuestro laboratorio. Según nuestros resultados, el aumento observado en la expresión génica del AR- $\beta_1$  linfocitario no tendría por qué ser reflejo del corazón insuficiente, donde se produce una disminución de la expresión génica y proteica de los ARs- $\beta_1$  según lo descrito por otros autores (Engelhardt y cols., 1996; Leineweber y cols., 2005) y hemos confirmado recientemente en nuestro laboratorio (Montó y cols., 2009) Esta disminución en la expresión del subtipo  $\beta_1$  en la insuficiencia cardíaca parece ejercer un papel protector, que evita los efectos deletéreos de una estimulación continuada de este receptor sobre el corazón (Xiao y cols., 1995, 2004, 2006; Daaka y cols., 1997) por lo que puede tratarse de un mecanismo propio del corazón que no se reproduce en otros órganos o tejidos.

El aumento en los niveles de ARNm del AR- $\beta_1$  observado en linfocitos sería, en este caso, un mecanismo regulador propio del linfocito, debido a los cambios originados en el organismo por la evolución de la patología, que puedan desencadenar una respuesta inmunitaria, o bien el reflejo de cambios en otros órganos, como el riñón o los vasos, tal y como comentamos en el grupo de pacientes hipertensos. La presencia en linfocitos de ARNm para el AR- $\beta_1$  no se ha descrito hasta muy recientemente por otros autores (Yu y cols., 2007) y por nosotros mismos

(Oliver y cols., 2006, 2010), por lo que su papel en la respuesta inmunitaria no ha sido analizado. La evidencia obtenida en nuestro laboratorio de que la línea celular Jurkat expresan el AR- $\beta_1$  en mayor proporción que los linfocitos circulantes (Pérez-Aso y cols., 2008), apoya esta hipótesis. Es interesante señalar que en el grupo de pacientes hipertensos habíamos observado también una mayor expresión del subtipo  $\beta_1$  en linfocitos de pacientes con microalbuminuria, un problema relacionando con el daño endotelial e inflamación vascular o glomerular (Pedrinelli y cols., 2001; Holm y cols., 2006). Algunos autores han relacionado también la microalbuminuria con la insuficiencia cardiaca crónica, de modo que en pacientes en fases avanzadas de la enfermedad, como es nuestro caso, la EUA suele estar elevada (Gerstein y cols., 2001; van de Wal y cols., 2005; Jackson y cols., 2009).

La disminución en la expresión génica de la GRK2 contrasta con estudios en los que se ha observado un aumento en la expresión proteica y en la actividad de esta enzima en linfocitos de pacientes con insuficiencia cardiaca, y que, según los autores, refleja directamente aquello que ocurre en el corazón de estos pacientes (Iaccarino y cols., 2005; Hata y cols., 2006). A este respecto hay que puntualizar:

- El aumento en la expresión génica no tiene porque correlacionar necesariamente con un aumento en la expresión proteica, tal como hemos visto en este mismo trabajo cuando analizábamos los cambios en ratas con hipertensión inducida;
- El aumento de GRK2 parece depender de la fase en la que se encuentra la enfermedad, y de un aumento en las fases iniciales se pasa a una disminución de la actividad de GRK2 en la fase IV según la clasificación de la NYHA, que precisamente corresponde con la fase en la que se encuentran nuestros pacientes, (Leineweber y cols., 2005; Brodde y cols., 2006).
- El aumento observado en la actividad GRK que dichos autores atribuyen directamente a GRK2 en linfocitos circulantes (Iaccarino y cols., 2005), pero que no han analizado de forma diferencial, podría deberse a un aumento en la actividad de GRK5, cuya expresión no analizan y que, en nuestro caso, vemos que está aumentada en la insuficiencia cardiaca.

En esta línea, se ha descrito en modelos animales de insuficiencia cardiaca, que la elevación de los niveles de ARNm de GRK2 en corazón aparece en la fase inicial, coincidiendo con el desarrollo y la hipertrofia del miocardio, probablemente precediendo a la enfermedad, mientras que en fases tardías, se produciría una bajada de estos niveles, acompañada de un aumento progresivo del ARNm de GRK5 en miocardio coincidiendo con la disfunción ventricular y la dilatación de las cámaras

(Ping y cols., 1997; Vinge y cols., 2001). Nuestros resultados en corazón insuficiente no corroboran estos datos pues no llegamos a observar cambios significativos en la expresión de las GRKs en el ventrículo derecho del corazón insuficiente, pero quedaría por determinar si estos cambios aparecen sólo en el ventrículo izquierdo. Coincidiendo con nuestros resultados, tampoco otros autores han encontrado cambios en la expresión de GRK3 relacionados con la insuficiencia cardiaca (Ungerer y cols., 1994; Vinge y cols., 2001; Brodde y cols., 2006).

Nuestros resultados obtenidos en linfocitos de pacientes con insuficiencia cardiaca en fase terminal no apoyan la hipótesis planteada por otros autores en cuanto al uso de la expresión linfocitaria de las GRKs como biomarcador de los cambios que se producen en el corazón insuficiente (Dzimiri y cols., 2002; Oyama y cols., 2005), sin embargo, no excluimos que pueda considerarse al linfocito como un biomarcador en otras circunstancias.

En este sentido, si la disminución observada en la expresión génica de GRK2 se correlaciona con una disminución en la expresión proteica, podría representar un mecanismo específico del linfocito, tal como hemos comentado anteriormente en el caso del AR- $\beta_1$ , que se traduciría en una menor actividad de esta quinasa, y que tendría como consecuencia una mayor migración leucocitaria (Vroon y cols., 2004a), pudiendo estar relacionado con la activación del sistema inmune frente al corazón dañado que se ha descrito en la insuficiencia cardiaca (Yndestad y cols., 2003; Fildes y cols., 2009) que favorecería la actividad de los ARs- $\beta$  en esta respuesta inmunitaria.

## 5.2 PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE CARDIACO

Cuando analizamos la expresión de ARs y GRKs en linfocitos de pacientes sometidos a trasplante cardiaco nos enfrentamos a una situación compleja. En este caso, el paciente sufría insuficiencia cardiaca, y por tanto, sus linfocitos habían experimentado los cambios en la expresión descritos para esta enfermedad, pero, al trasplantarle un corazón sano y extraño, está desarrollando una respuesta inmunitaria frente al órgano trasplantado, que se controla farmacológicamente mediante inmunosupresores. Por todo ello los resultados que encontremos en estas circunstancias serán difícilmente interpretables en términos de buscar posibles mecanismos, pero nos aportaran datos importantes acerca de la posibilidad de utilizar el linfocito circulante como un biomarcador pues, en este caso, el linfocito está sometido a los mecanismos inherentes a su función en la respuesta inmunitaria y, por tanto, no esperaríamos encontrar un reflejo de lo que ocurre en otros órganos o tejidos.

Nuestros resultados muestran que en los pacientes trasplantados, aparece aumentada la expresión de los ARs- $\beta_1$  (al igual que ocurría en la insuficiencia cardíaca aunque en menor proporción) y  $-\beta_2$ , siendo este aumento específico de los pacientes trasplantados pues en los otros grupos analizados la expresión de  $\beta_2$  no cambia significativamente. Aumenta también la expresión de GRK5, como ocurría en la insuficiencia cardíaca, y se mantiene disminuida la GRK2 con respecto al grupo control, aunque ha aumentado significativamente si comparamos su expresión con la observada en esos pacientes antes del trasplante. No se observan cambios en la expresión de GRK3.

*¿Cómo podríamos interpretar estos resultados?* Habíamos comentado previamente que el aumento en la expresión del AR- $\beta_1$  en linfocitos de pacientes con insuficiencia cardíaca podía atribuirse a un mecanismo modulador dentro de la respuesta inmunitaria que acompaña a esta patología. Este mismo mecanismo lo encontramos, aunque menos evidente, en linfocitos de pacientes trasplantados, a los que se les está administrando un tratamiento inmunosupresor, luego podemos mantener la hipótesis planteada acerca del papel del AR- $\beta_1$  en la activación del linfocito, aunque como ya hemos comentado, esta hipótesis no se sustenta en trabajos anteriores, pues el subtipo  $\beta_1$  no ha sido caracterizado en linfocitos hasta muy recientemente por nuestro grupo y por otros autores (Oliver y cols., 2006, 2010; Yu y cols., 2007;), luego no se ha analizado su actividad específica en estas células. Hasta el momento, sólo se ha demostrado que la activación de los ARs- $\beta_2$ , mayoritariamente expresados en linfocitos, inhibe la función de las distintas líneas linfocitarias *in vitro* (García y cols., 2003; Hanania y Moore, 2004) y en procesos inflamatorios crónicos como la artrosis o el asma (Kohm y Sanders, 2001; Heijink y cols., 2004). Sería interesante estudiar la hipótesis a la que apuntan nuestros resultados y que plantea si precisamente el subtipo  $\beta_1$  tiene una actividad opuesta al  $\beta_2$ , facilitando la activación o la diferenciación de las células linfocitarias, y por tanto, la respuesta inflamatoria, lo que explicaría el aumento en su expresión en pacientes con microalbuminuria, en la insuficiencia cardíaca o tras el trasplante cardíaco.

Un cambio único observado en el paciente trasplantado es el aumento significativo de los niveles de ARNm del subtipo  $\beta_2$ . Como ya hemos comentado anteriormente, se ha demostrado que la activación de este subtipo inhibe la activación de los linfocitos, y que incluso la administración de corticoides podría estimular la síntesis de más ARs- $\beta_2$  (Baraniuk y cols., 1997; Johnson y cols., 2002). Si tenemos en cuenta que los pacientes incluidos en nuestro estudio se encuentran sometidos a tratamiento inmunosupresor, y que todos ellos reciben corticoides, podríamos suponer que este tratamiento inmunosupresor estaría induciendo una

sobreexpresión del AR- $\beta_2$  con el fin de favorecer la inhibición de la activación linfocitaria.

Por otro lado ya hemos comentado que la GRK2 está implicada en la regulación de receptores de quimiocinas y se ha visto que una disminución de su expresión en las líneas linfocitarias tiene como consecuencia la inducción de la quimiotaxis, la migración celular a los tejidos y por lo tanto una respuesta inflamatoria (Vroon y cols., 2004a). La GRK2 se encontraba disminuida en pacientes con insuficiencia cardiaca pero, después del trasplante, sus niveles aumentan, quizá también como consecuencia del tratamiento inmunosupresor.

Dado que el fenómeno de rechazo inmunitario va disminuyendo con el tiempo, lo que permite ajustar el tratamiento con inmunosupresores, hemos analizado los cambios en la expresión de ARs y GRKs en función del tiempo transcurrido desde el trasplante cardiaco.

En nuestro estudio observamos que, conforme avanza el tiempo tras el trasplante, se produce un aumento gradual en la expresión génica de los ARs- $\beta_2$  y de la GRK2 en linfocitos. Según habíamos comentado, algunos autores afirman que la expresión del AR- $\beta_2$  en linfocitos refleja la expresión en corazón (Michel y cols., 1986; Brodde y cols., 1989), sin embargo, en un trabajo reciente (Agüero y cols., 2009), nuestro grupo de investigación no encuentra en biopsias de aurícula derecha de pacientes trasplantados, esta misma correlación entre los niveles de ARNm del AR- $\beta_2$  o la GRK2 y el tiempo post-trasplante, luego en corazón no se está produciendo el aumento gradual en la expresión de ARs- $\beta_2$  que observamos en linfocitos, por lo que el linfocito, en estas circunstancias, no refleja lo que ocurre en corazón. Los cambios que observamos en linfocitos probablemente son debidos al tratamiento inmunosupresor pudiendo interpretar este aumento progresivo en la expresión del AR- $\beta_2$  linfocitario como un mecanismo que contribuye a disminuir la actividad o la diferenciación de las células inmunitarias evitando el rechazo. Ya comentamos la estrecha relación que guarda la expresión del AR- $\beta_2$  y la de la GRK2, lo que sugiere la existencia de un mecanismo regulador común para ambos genes. En este caso, se vuelve a confirmar esta relación y vemos como también la expresión de la GRK2 sigue una evolución idéntica a la del AR- $\beta_2$ .

Estudios del perfil genético, llevados a cabo en los últimos años en linfocitos circulantes de pacientes sometidos a trasplante cardiaco, indican que durante el primer mes después del trasplante, los cambios observados en la expresión de ciertos genes relacionados con la activación de los linfocitos o sensibles a los corticoides,

tenían un valor predictivo para posibles episodios futuros de rechazo del injerto (Mehra y cols., 2007). En nuestro caso, los niveles de expresión del AR- $\beta_2$  y de la GRK2 en el linfocito del paciente trasplantado, podrían estar reflejando la posibilidad o no de rechazo, e incluso servir como un biomarcador de este evento adverso. Esta observación abren las puertas a futuros estudios que puedan ampliar nuestro conocimiento en este campo de la investigación.



# C ONCLUSIONES



## CONCLUSIONES

- 1) El ARNm de los ARs- $\alpha_1$  ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  y  $\alpha_{1D}$ ) y  $-\beta$  ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$ ) y de la GRK2, se encuentra presente en aorta, ventrículo izquierdo y riñón de rata Wistar, WKY y SHR, siendo diferentes las proporciones según el tejido: los subtipos mayoritarios en aorta corresponden por un lado al  $\alpha_{1D}$ , principal responsable de la contracción de dicha arteria, y al subtipo  $\beta_3$ , cuyo rol funcional no está del todo claro; los subtipos  $\alpha_{1B}$  y  $\beta_1$  son mayoritarios en ventrículo izquierdo, mientras que en riñón predominan los ARs- $\alpha_{1B}$ ,  $-\alpha_{1D}$  y  $-\beta_1$ .
- 2) En el proceso de maduración de la rata WKY, comprendido entre las 6 y 16 semanas de vida, se observa en todos los territorios estudiados una disminución generalizada de la expresión y actividad del subtipo  $\alpha_{1D}$ , responsable de la contracción adrenérgica de arterias principales como la aorta, las arterias coronarias o la arteria renal; observamos también una disminución en la expresión del AR- $\alpha_{1B}$  en ventrículo izquierdo y riñón, tejidos en los que este subtipo es mayoritario y un aumento del AR- $\alpha_{1A}$  en corazón que podría estar relacionado con sus propiedades cardioprotectoras o con el proceso de crecimiento fisiológico del corazón; el subtipo  $\beta_3$  disminuye significativamente en aorta y riñón, y la GRK2 únicamente en riñón.
- 3) En linfocitos de rata se ha detectado ARNm del subtipo  $\beta_2$  en proporción mayor que el  $\beta_1$ , así como de las tres GRKs analizadas (GRK2, GRK3 y GRK5), siendo GRK2 la mayoritaria. En linfocitos circulantes de voluntarios sanos también se detectó como AR mayoritario el subtipo  $\beta_2$ , con semejante proporción entre las diferentes GRKs analizadas. En este caso si se encontró ARNm de los ARs- $\alpha_{1B}$  y  $-\alpha_{1D}$ , aunque en baja proporción.
- 4) En linfocitos circulantes humanos hemos encontrado una correlación significativa entre el ARNm del AR- $\beta_1$  y la GRK5, y del AR- $\beta_2$  y las GRKs 2 y 3, lo que sugiere la existencia de un mecanismo regulador único y la especificidad o preferencia de las GRKs por cada uno de los ARs.

- 5) En ratas SHR que aún no manifiestan la hipertensión, hemos encontrado cambios que podrían estar relacionados con el origen de la enfermedad: se observa un incremento en la expresión y funcionalidad del AR- $\beta_1$  en aorta y del AR- $\alpha_{1B}$  en el riñón de ratas, a la vez que disminuye la expresión de los subtipos  $\alpha_{1D}$  en corazón y riñón y del subtipo  $\alpha_{1A}$  únicamente en riñón. Es precisamente este último órgano el que experimenta mayores cambios en este estadio previo de la enfermedad lo que lo relacionaría con la génesis de la hipertensión.
- 6) En ratas SHR hipertensas, no podemos hablar de un mecanismo general que explique los cambios encontrados, pues estos son específicos de cada uno de los territorios estudiados. En aorta, se observa un aumento en la expresión de todos los ARs y la GRK2, que tiene como consecuencia un aumento en la funcionalidad del subtipo  $\alpha_{1D}$  junto con un deterioro de la vasodilatación  $\beta$ -adrenérgica. En ventrículo y riñón los cambios son similares a los ya descritos en ratas prehipertensas. El hecho de que los resultados obtenidos no se reproduzcan en el modelo de rata hipertensa por tratamiento crónico con L-NAME, indica que los cambios no son consecuencia del estado hipertensivo y podrían estar implicados en la génesis y mantenimiento de la hipertensión esencial.
- 7) No se observan diferencias en función del género en los niveles de expresión de los ARs y las GRKs. Los subtipos  $\alpha_{1B}$  y  $\beta_1$  se encuentran elevados en linfocitos circulantes de pacientes hipertensos. Estos últimos se recuperan tras el tratamiento con IECA o ARAII.
- 8) La existencia de una correlación entre los niveles de expresión de ARNm de los ARs y las GRKs en linfocitos circulantes y las variables clínicas determinadas en pacientes hipertensos sugiere que la expresión linfocitaria de un gen podría estar reflejando su expresión en un determinado tejido relacionado con la función que la variable clínica representa. En la hipertensión humana hemos observado correlaciones significativas entre: la expresión del AR- $\beta_1$  y el índice de masa corporal (correlación inversa), la frecuencia cardíaca (en mujeres únicamente) o la excreción urinaria de albúmina; la expresión del AR- $\beta_2$  y las cifras de PAD (correlación inversa); la expresión del subtipo  $\alpha_{1B}$  y las cifras de PAS (en hombres únicamente) o los niveles de homocisteína plasmática; la expresión del subtipo  $\alpha_{1D}$  y los niveles de aldosterona; la expresión de GRK3 y las cifras de PAS y PAD (correlación inversa).

- 9) En linfocitos procedentes de pacientes con insuficiencia cardiaca observamos un aumento en los niveles de ARNm para el AR- $\beta_1$  y la GRK5, además de una disminución en la expresión de GRK2. Estos resultados no concuerdan con los datos observados en el corazón insuficiente luego, en este caso, no podemos considerar que el linfocito esté reflejando los cambios que se producen en el corazón, tal como habían propuesto otros autores. Los cambios parecen responder a mecanismos propios, moduladores de la actividad del linfocito.
- 10) Tras el trasplante cardiaco, los linfocitos sufren aumentos en la expresión de ARs- $\beta_1$  y - $\beta_2$  que parecen depender de la respuesta inmunitaria y el tratamiento inmunosupresor, y tampoco reflejan los cambios cardiacos. A la vez, se observa un aumento en la expresión de GRK5 y una disminución de GRK2. Existe una correlación significativa entre la expresión de los ARs- $\beta_1$  y - $\beta_2$  y la GRK2 con el tiempo post-trasplante.





# R

---

# RESUMEN

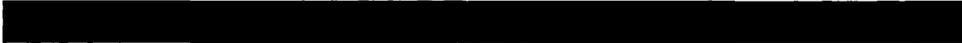


## RESUMEN

En la presente tesis doctoral analizamos, con una perspectiva de género, las diferencias en la expresión de los tres subtipos de ARs- $\alpha_1$  y - $\beta$  y las quinasas que modulan su actividad (GRK2, GRK3 y GRK5) en linfocitos humanos obtenidos de pacientes hipertensos, pacientes con insuficiencia cardiaca o pacientes a los que se ha realizado un trasplante cardiaco, correlacionando los niveles de ARNm con las variables clínicas propias de la enfermedad y el riesgo cardiovascular. Además, hemos estudiado en paralelo dos modelos animales de hipertensión, de origen genético (ratas espontáneamente hipertensas; SHR) o inducido por la inhibición de la producción de NO (ratas LNHR), para ver si existen diferencias en la expresión y funcionalidad de los ARs y las GRKs en distintos territorios (corazón, vasos, riñón, linfocitos), a fin de elucidar el grado de implicación de cada AR o GRK en la génesis y/o mantenimiento de la hipertensión. Destacamos los siguientes resultados:

- No se observan diferencias en función del género en los niveles de expresión de los ARs y las GRKs presentes en linfocitos humanos. En linfocitos de pacientes hipertensos, los niveles de ARNm de los subtipos  $\alpha_{1B}$  y  $\beta_1$  están elevados, existiendo una correlación significativa con las cifras de presión arterial y la excreción urinaria de albúmina respectivamente, sugiriendo que estos cambios responden a mecanismos generales implicados en la hipertensión.
- En linfocitos procedentes de pacientes con insuficiencia cardiaca, o sometidos a trasplante cardiaco, el linfocito no refleja los cambios que se producen en otros órganos, en especial el corazón, sino que los cambios representan mecanismos moduladores de la actividad del linfocito en la respuesta inmunitaria o son una consecuencia del tratamiento inmunosupresor que reciben los pacientes trasplantados.
- Se han encontrado cambios en la expresión y funcionalidad de los ARs- $\beta_1$  en aorta, - $\alpha_{1D}$  en corazón y - $\alpha_{1B}$  en el riñón de ratas SHR que preceden al estado hipertensivo y pueden estar relacionados con el origen de la enfermedad junto con otros que acompañan a la hipertensión en ambos modelos, y pueden ser una consecuencia de la misma. En aorta de rata SHR hipertensa, pero no en LNHR, se observa un aumento en la expresión de todos los ARs y la GRK2, que conduce a un aumento en la funcionalidad del subtipo  $\alpha_{1D}$  junto con un deterioro de la vasodilatación  $\beta$ -adrenérgica, y que podría estar implicado en la génesis y mantenimiento de la hipertensión esencial.



**E**   
ENGLISH VERSION



## INTRODUCTION

Adrenoceptors (ARs) are 7-transmembrane receptors, and members of the G-protein coupled receptors (GPCRs) superfamily (see Image 1 on page 16) which mediate the central and peripheral actions of two catecholamines: the neurotransmitter, Noradrenaline (NA); and the hormone and neurotransmitter, Adrenaline (A). Both NA and A play important roles in the control of blood pressure, myocardial contractile rate and force, airway reactivity, and a variety of metabolic and central nervous system functions. As these ARs control the action of catecholamines, they are closely implicated in the regulation of those physiological functions mediated by A and NA and, consequently, in the pathophysiological process related to them.

It was at the beginning of the 20<sup>th</sup> century when John Newport Langley and his student Sir Henry Dale were working together and explicitly stated the idea of a 'receptive substance' on reactive cells while looking for the activity of a suprarenal extract containing adrenaline, and the effect of the antagonist ergotoxine, thus establishing at the time the bases for the study of adrenergic receptors (Langley, 1901, 1905; Dale, 1906). Half a century was necessary for the first division performed by Ahlquist into two major types;  $\alpha$ - and  $\beta$ -ARs; based on their pharmacological characteristics.  $\alpha$ -ARs exhibited most of the excitatory actions (vasoconstriction), and  $\beta$ -ARs showed most of the inhibitory actions (vasodilatation) and one excitatory (myocardial contraction) (Ahlquist, 1948). Subsequently, both the  $\alpha$  and  $\beta$  types were subdivided into  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  and  $\beta_2$  subtypes (Lands, 1952, 1967; Brown and Gillespie, 1955; Berthelsen and Pettinger, 1977). Based on both pharmacological and molecular evidence, it is now clear that a more useful classification scheme is based on three major types ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  and  $\beta$ -ARs), each of which is further divided into at least three subtypes (see Image 2 on page 23) (Bylund *et al.*, 1994; Hieble *et al.*, 1995). In the present work, we will focus on the study of six of these subtypes:  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  and  $\beta_3$ .

All GPCR systems exhibit context-dependent activity, which means that receptors adjust their sensitivity to the range of agonist concentrations to which they are exposed. One important mechanism for regulating GPCR responsiveness is the G protein-coupled receptor kinase (GRK). GRKs recognize activated GPCRs and result in receptor phosphorylation at specific sites on the intracellular loops and carboxyl-terminal tail. Once phosphorylated, receptors become substrates for the binding of

arrestin proteins which prevents the receptor from activating additional G proteins. GRK phosphorylation and arrestin binding result in a cessation of G protein signaling by uncoupling the receptor from its G-protein and by promoting its internalization, despite the continued presence of the receptor activating agonist (see Image 8 on page 45). Therefore, the efficiency with which GPCRs, e.g.,  $\beta$ -ARs, interact with G-proteins depends on the phosphorylation of the receptor by GRKs, which are responsible for agonist-promoted desensitization (Bunneman *et al.*, 1999; Penela *et al.*, 2006; Premont and Gainetdinov, 2007). Of the seven different isoenzymes pertaining to the GRK family, we will focus on three; GRK2, GRK3 and GRK5; which seem essential in the regulation of a multitude of cardiovascular answers mediated by GPCRs, such as vasodilatation and heart rate.

According to the World Health Organization (WHO), cardiovascular diseases are presently the first cause of death, and are responsible for 30% of the total death rate worldwide. Cardiovascular pathologies such as hypertension or heart failure have considerably extended throughout developed countries. High hypertension prevalence ( $\frac{1}{4}$  of the total population of developed countries in 2000) makes this pathology the most important cardiovascular risk factor in these countries (Kearney *et al.*, 2005). Moreover, hypertension is the most common risk factor for congestive heart failure and contributes to a large number of heart failure cases (Levy *et al.*, 1996). Heart failure is one of the diseases with the highest short- and mid-term mortalities. In advanced stages of the disease, defined as New York Heart Association (NYHA) functional class IV, an annual survival rate of approximately 50% has been estimated in patients with optimal pharmacological therapy (Dickstein *et al.*, 2008).

It is well established that ARs ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  and  $\beta_3$ ) are expressed in the cardiovascular system. They not only represent essential targets in the control of its function, but are also implicated in their pathophysiological process (Guimaraes and Moura, 2001; Brodde *et al.*, 2006). Although there is growing evidence that essential hypertension is related to the overactivity of the sympathetic nervous system, the exact causes are still poorly understood. The adrenergic-dependent increase in vascular resistance could reflect an imbalance between the vasoconstrictor and vasodilator mechanisms relating to changes in both the expression and function of  $\alpha_1$ -adrenoceptors (ARs) which mediate vasoconstriction,  $\beta$ -ARs which mediate vasodilatation, and/or changes in GRKs, the key regulators of  $\beta$ -ARs (Feldman and Gros, 2006; Penela *et al.*, 2006). A generalized impairment of  $\beta$ -adrenergic-mediated vasodilatation has been shown in both animal hypertension models and the lymphocytes of hypertensive patients (Feldman, 1987, 1990; Borkowski *et al.*, 1992; Gros *et al.*, 1997). This impairment has been related to an increase in the activity of

GRKs, especially GRK2 which mediates reduced  $\beta$ -AR/G-protein coupling (Feldman and Gros, 2006). However, the possibility of the differential changes in both the expression and function of  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -, and  $\beta_3$ -ARs also being involved in this process has not been evaluated previously. An increased GRK2 expression may be the result of a rise in the  $\beta$ -AR expression, and the subsequent impairment of  $\beta$ -AR-mediated vasodilatation could be due to more complicated mechanisms, including different  $\beta$ -AR subtypes and GRKs. In fact, GRK3, and GRK5 in particular, predominate in the heart and may also participate in the phosphorylation of  $\beta$ -ARs, thereby modulating their desensitization process (Penela *et al.*, 2006). On the other hand, the  $\alpha_1$ -ARs present in vessels ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ) play an essential role not only in the modulation of the vascular tone, but also in the regulation of blood pressure through their vasoconstrictor activity (Piascik *et al.*, 1995; Noguera *et al.*, 1996; Villalobos-Molina and Ibarra, 1996; Hrometz *et al.*, 1999; Gisbert *et al.*, 2000, 2003a). An increased functional role of  $\alpha_{1D}$ -ARs has been proposed as one of the changes involved in the hypertensive increase of vascular resistance (Villalobos-Molina *et al.*, 1999; Gisbert *et al.*, 2002; Tanoue *et al.*, 2002a, 2002b; D'Ocon, 2003; Ziani *et al.*, 2002; Lyssand *et al.*, 2008). Nonetheless, the mechanism responsible for this increase has not yet been elucidated.  $\beta$ -ARs are studied mostly in connection with heart failure. A decrease in the expression and functionality of  $\beta_1$ -AR has been found in the myocardium during heart failure (Bristow *et al.*, 1982). This is accompanied by an increase in the activity of GRKs (GRK2 in first instance), which are responsible for an uncoupling of  $\beta$ -ARs from their effector enzyme, adenylate cyclase (Unguerer *et al.*, 1993), to prevent higher stimulation by catecholamines. This  $\beta$ -adrenergic impairment is a malignant change leading to the progression of this pathology (Leineweber *et al.*, 2005), especially at the end-stage point, to which GRK5 is apparently related (Vinge *et al.*, 2001). In the denervated heart (transplanted heart), an up-regulation of  $\beta_2$ -adrenoceptors has been described (Farrukh *et al.*, 1993). On the other hand, the expression of ARs and GRKs in human lymphocytes has been used as a practical surrogate for myocardial or vascular cells (Brodde *et al.*, 1985, 1986; Feldman *et al.*, 1987, 1990; Parfyonova *et al.*, 1988; Bono *et al.*, 1995; Gros *et al.*, 1997).

A better understanding of the etiology of these diseases would provide a better tool to search for more effective therapeutic targets. At this point the study of ARs and GRKs would prove very useful in not only the organs involved in pathogenesis, but also in peripheral blood lymphocytes as a reflection of the changes occurring around the organism. As summarized above, different studies of hypertensive patients or animal models of hypertension and heart failure have analyzed changes in the expression and functionality of ARs or GRKs. However, the ARs subtypes and GRKs in

the same group of animals or patients have not been assessed to date. The objectives of our work were:

- To analyze whether the changes in the expression and functionality of  $\alpha_1$ - and  $\beta$ -ARs, and GRKs in hypertension, are related to the genesis and maintenance of this pathology.
- To analyze whether the changes in the expression of  $\alpha_1$ - and  $\beta$ -ARs, and GRKs in peripheral blood lymphocytes from both hypertensive and heart failure patients, are related to the pathology state and its clinical consequences.

We believed that analyzing the expression of the different ARs involved in the control of blood pressure in the vessels, left ventricle and kidney, and also GRK2, the kinase regulating their activity, could lead to an accurate picture of the sympathetic changes related to the hypertensive state. Therefore in this study, we combined a relative quantification of mRNA levels for GRK2, and  $\alpha_{1A}$ -,  $\alpha_{1B}$ -,  $\alpha_{1D}$ -,  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -, and  $\beta_3$ -ARs, the determination of the protein expression by Western blot, and the functional studies performed to analyze the consequences of these changes in the control of the vascular tone. To determine whether the changes in the expression accompany the hypertensive state, we performed our study in three different groups of animals: 1) young rats in a prehypertensive state; 2) spontaneously hypertensive adult rats; and 3) L-NAME-induced hypertensive rats; and compared the results with their respective controls. We also used peripheral blood lymphocytes from both hypertensive and heart failure patients and compared with healthy volunteers.

# MATERIALS AND METHODS

## 1 ANIMALS

Wistar rats, wistar kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive (SHR) rats aged 6 and 16 weeks were used (Harlan Interfauna Ibérica, Barcelona) and housed under a 12-hour light/dark cycle at 22°C and 60% humidity. One group of Wistar rats received L-NAME (80 mg·kg<sup>-1</sup> per day in drinking water for 30 days) until the age of 16 weeks to induce hypertension (Ribeiro *et al.*, 1992; Linardi *et al.*, 2004). Systolic blood pressure and heart rate were measured weekly from the tail of unanesthetized rats using a plethysmographic method (NIPREM 645, Cibertec, Barcelona, Spain). An average of six readings was recorded for each animal. Rats were weighed and decapitated, and the heart, kidney and aorta were removed. Peripheral blood lymphocytes were isolated using Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) following the manufacturer's conditions. Cell pellets were immediately stored at -80°C until further analysis.

All the experimental procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee, and complied to the Spanish *Guide for Care and Use of Laboratory Animals*, following European Council Directive (86/609/EEC).

## 2 PATIENTS SELECTION

The patients included in the study were selected from an outpatient clinic. All the patients who fulfilled the inclusion criteria were invited to participate, and their written consent was requested. The total number of subjects of the study population was 72 (46 men and 26 women) aged between 16 and 68 years. All the patients were grouped depending on their pathology. The distribution of the different groups was: 10 healthy volunteers (**Control** group), 6 patients with isolated office hypertension (**HCA**), 15 with hypertension (**HT**), 10 treated hypertensive patients (**HT-Tr**), 14 with terminal heart failure (**IC**), and 17 patients after cardiac transplantation (**TC**). The anthropometric, hemodynamic and biochemical variables were determined for each subject. The control group was composed of ten healthy normotensive subjects, who were age and sex matched, with no established cardiovascular or renal diseases, and whose biochemical profile showed normal values.

Inside the hypertensive patient's block, both the hypertensive and isolated hypertensive patients had not been previously treated with any anti-hypertensive drugs. Those patients in the treated group had received ACEIs or ARBs for a minimum of a month prior to the sample collection date. All the patients underwent a complete clinical workup to rule out secondary hypertension. Serum biochemical profile, lipids, Urinary albumin excretion (UAE), office blood pressure and 24-hour ambulatory blood pressure were recorded in an outpatient setting. Ambulatory blood pressure was monitored on a regular working day using an oscillometric monitor (Spacelabs 90202 or 90207) for following time points: 24 hours, or day and night period. On the basis of blood pressure, patients were classified as patients with isolated office hypertension when they had office hypertension and normal ambulatory blood pressure; or as hypertension when they had office and ambulatory hypertension. Patients with established cardiovascular or renal diseases were excluded. All the procedures were performed following the recommendations of the British Hypertension Society (Williams *et al.*, 2004).

Those patients in the heart failure group were classified into the NYHA Class IV (The criteria committee of the NYHA, 1994) as having an advanced impairment of myocardial contractility. All the patients received pharmacological therapy for heart failure with diuretics,  $\beta$ -blockers, ACEIs or intravenous inotropic drugs according to their hemodynamic status. The patients with a severe concomitant pathology with contraindicate cardiac transplantation were excluded. Transplanted patients were included in a range of 14 to 471 days after transplantation. They all had normal hearts in the echocardiographic study, and right ventricle pressures were within the normal range and were treated by immunomodulator therapy. Those patients excluded from the study were those with hemodynamic instability, infection, depressed ventricular function during the echocardiography or a biopsy with any grade of rejection in the pathologic simple.

In both hypertensive and heart failure groups, clinical and echocardiographic data were obtained from patients within at least 24 hours of sample collection. Hemodynamic parameters were recorded in the same procedure. After enrolment, and according to the clinical criteria, all the patients received a non pharmacological treatment consisting of moderate salt restriction and a low-calorie diet if seen to be overweight. Blood samples (10ml) were anticoagulated with ethylene diamino tetraacetic acid (EDTA) in order to perform lymphocyte isolation, for which the Lymphoprep™ (for Control, HCA, HT and HT-Tr groups) or the Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) (for IC and TC groups) method was employed following the

manufacture's conditions. Cell pellets were immediately stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further analysis.

The Ethical Committees of the Alzira Hospital, the "La Fe" Hospital of Valencia and the University of Valencia approved the study.

### 3 REAL-TIME QUANTITATIVE RT-PCR

The different tissues, aorta, left ventricle and kidney, were rapidly frozen in liquid nitrogen. Frozen tissues were ground to powder in a mortar and a piece of them was dissolved in TriPure Isolation Reagent (Roche Group; U.S.) and homogenized by vortexing 3 times for 15 seconds at ambient temperature. Lymphocytes samples were homogenized by pipetting the dissolved pellets. Total RNA was obtained after chloroform extraction and isopropanol precipitation (following the manufacturer's instructions), and was dissolved in diethyl pyrocarbonate (DEPC)-treated water. The integrity of the RNA samples was checked by electrophoresis in agarose gel, and RNA concentrations were estimated spectrophotometrically. As the thesis time advanced, methods improved, so samples were also quantified and analyzed by running  $1\ \mu\text{g}$  of each sample by microfluidic electrophoresis using the Experion™ automated electrophoresis system (Bio-Rad) following the manufacture's conditions.

Total RNA ( $1\text{--}2\ \mu\text{g}$ ) and oligo(dT)16 primer (250 ng) in DEPC-treated water were preheated to  $70^{\circ}\text{C}$  and cooled on ice for cDNA synthesis. The reactions ( $25\ \mu\text{l}$ ) contained 50 mM Tris ·HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM DTT, 40 U of RNAsin® Ribonuclease Inhibitor (Promega Corp., Madison USA), 2 mM of each deoxynucleoside triphosphate, and 300 U of Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT), RNase H minus (Promega Corp., Madison, USA), and were incubated at  $42^{\circ}\text{C}$  for 60 min. In order to improve the methodology, samples from the Wistar and L-NAME rats, and from the heart failure and cardiac transplantation patients, were employed using 500 ng of total RNA and oligo(dT)16 as a primer (250 ng) in DEPC-treated water, and were pre-heated to  $70^{\circ}\text{C}$  and cooled on ice for cDNA synthesis. The reactions ( $20\ \mu\text{l}$ ) contained ImProm-II™ reaction buffer, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 U of Recombinant RNAsin® Ribonuclease Inhibitor (Promega Corp., Madison USA), 0.5 mM of each deoxynucleoside triphosphate, and  $1\ \mu\text{l}$  of ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega Corp., Madison, USA), and were incubated at  $25^{\circ}\text{C}$  for 5 min (annealing step), following by an extension step at  $42^{\circ}\text{C}$  for 60 min and a final step at  $70^{\circ}\text{C}$  for 15 min (Heat-inactivate).

The mRNAs encoding the three  $\alpha_1$ -ARs subtypes ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  and  $\alpha_{1D}$ ), three  $\beta$ -ARs ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  and  $\beta_3$ ), three GRKs (GRK2, GRK3 and GRK5), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as an internal standard, were quantified by TaqMan® real-time RT-PCR with either a GeneAmp 5700 sequence-detection system (Applied Biosystems, US) or a GeneAmp 7500 Fast System (Applied Biosystems, USA). We analyzed (in duplicate reactions) a 10-fold dilution of the RT reaction of each tissue using TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, US). These TaqMan® Gene expression assays consist of a 20X mix of unlabeled PCR primers and a TaqMan® MGB probe (FAM™ dye-labeled) designed for the detection and quantification of specific genetic sequences in a two-step RT-PCR.

The twenty specific primer-probes for rats and humans are described in Table IV (page 110). They were pre-designed and optimized to offer high sensitivity and specificity under universal thermal cycling conditions which provide high reproducibility. Probes were designed by crossing the exon-exon junction, whenever possible, to eliminate the possibility of detecting genomic DNA contamination and to increase specific hybridization (TaqMan® Gene expression assays protocol, Applied Biosystems, US).

Real-time PCR reactions were set in 25  $\mu$ l with TaqMan® Universal PCR Master Mix (AmpliTaq Gold® DNA Polymerase; Applied Biosystems, US) including 5  $\mu$ l of diluted RT reaction, and 1.25  $\mu$ l of the 20X TaqMan® Gene Expression Assay Mix (250 nM for the probe and 900 nM for each primer). cDNA was amplified following the manufacture's conditions: 1 initial Hold-step at 95°C for 10 min, a second step with 40 cycles of 15 s at 95°C (denaturation), and a 1 min at 60°C (annealing/extension).

The threshold cycle (Ct) values obtained for each gene were referenced to GAPDH and converted into the linear form using the term  $2^{-\Delta Ct}$  as a directly proportional value to the copy number of mRNA. GAPDH levels increased in the 16-week-old animals. To compare the mRNA levels of the target genes between strains, the expression was also assessed using the comparative ( $2^{-\Delta Ct}$ ) method, but in this case, the value obtained for each gene in the WKY animals was used as a reference (Livak and Schmittgen, 2001). To compare the mRNA levels of the target genes of the groups, the expression was also assessed using the comparative method ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) with the healthy volunteers constituting the control group (Livak and Schmittgen, 2001).

## 4 WESTERN BLOT

To obtain total proteins, the frozen aortas were ground to powder in a mortar and homogenized with a Microson XL 2000 Ultrasonic Liquid Processor in ice-cooled lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.5, 150mMNaCl, 10% glycerol, 1.5mMMgCl<sub>2</sub>, 0.1% SDS, 1 mM EGTA, 100 mM NaF, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate) containing the protease inhibitor cocktail (Complete; Roche Applied Science, Indianapolis, IN). This was centrifuged at 16,000*g* for 15 min at 4°C. The protein concentration was determined by the Bradford (1976) method (Bio-Rad, Hercules, CA).

Protein extracts (50 µg for GRK2 and 150 µg for adrenoceptors) were loaded onto the 10% SDS-polyacrylamide gels according to Laemmli (1970), and the electrophoresed proteins were transferred to polyvinylidene difluoride membranes 2 h at 375 mA using a liquid Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell system (Bio-Rad). Membranes were blocked in 6% nonfat dried milk in phosphate-buffered saline containing 0.1% Tween 20 for 1 h at room temperature with gentle agitation. Membranes were washed and then incubated with a goat or rabbit polyclonal antibody against ARs or GRK2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA) and with rabbit Anti-Actin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) as a loading control diluted in blocking solution at 4°C overnight. The dilutions and manufacturer's references are detailed in Table V (page 114). Membranes were then washed three times, incubated with either the rabbit anti-goat IgG horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Jackson Immuno-Research Laboratories Inc., West Grove, PA) or the donkey anti-rabbit IgG horseradish peroxidase conjugated (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) for 50 min at room temperature and washed extensively before incubation with an enhanced chemiluminescence Western blotting detection reagent (GE Healthcare).

After incubation with ECL® western blotting detection reagent (Amersham Bioscience), bands were immediately documented with an Autochemi™ BioImaging System using the Labworks 4.6 capture software (Ultra-Violet Products Ltd., Cambridge, UK). The quantification of the western blotting experiments was performed by optic densitometry by taking the integrated optic density (IOD) value. The results were normalized and expressed as the ratio to actin IOD.

## 5 FUNCTIONAL STUDY IN ISOLATED ORGAN BATH

The rat aorta was suspended in a 10 ml organ bath containing physiological solution, maintained at 37°C and gassed with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. An initial load of 1 g was applied to each preparation and maintained throughout a 75-90 min equilibration period. Tension was recorded isometrically by Grass FTO3 force-displacement transducers, and the data were recorded on a disc (MacLab). The composition of the physiological Ca<sup>2+</sup>-containing solution was (mM): NaCl 118, KCl 4.75, CaCl<sub>2</sub> 1.8, MgCl<sub>2</sub> 1.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25 and glucose 11. In Ca<sup>2+</sup>-free solution, CaCl<sub>2</sub> was omitted and EDTA (0.1 mM) was added.

The addition of cumulative doses of Phe (10<sup>-9</sup> to 10<sup>-5</sup> M) was carried out until a maximal response was reached (*E*<sub>max</sub>). The concentration [-log (molar)] needed to produce a 50% contraction (pEC<sub>50</sub>) was obtained from a nonlinear regression plot (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). After agonist removal from the tissue bath, we also analyzed the kinetics of tissue relaxation. For this purpose, the washing procedure was carried out by totally replacing the bathing solution with three repeated washes within the first 30 s and with two other repeated washes every 5 min in all cases.

Relaxation-response curves to β-AR agonists [isoprenaline (10<sup>-10</sup> to 10<sup>-4</sup> M), SR58611A (10<sup>-10</sup> to 10<sup>-4</sup> M), Salbutamol (10<sup>-10</sup> to 10<sup>-4</sup> M)] or α<sub>1</sub>-AR antagonists [BMY 7378 (10<sup>-9</sup> to 10<sup>-4</sup> M) or 5-methylurapidil (10<sup>-9</sup> to 10<sup>-4</sup> M)] were performed by adding cumulative concentrations to the vessels in which the sustained contractions had been induced by a maximal concentration of phenylephrine (10<sup>-6</sup> M). All the protocols are described in Image 12 (page 117).

The concentration [-log (molar)] needed to either produce 50% relaxation (pEC<sub>50</sub>) or inhibit 50% of the maximal contractile response (pIC<sub>50</sub>) was obtained from a nonlinear regression plot, and the data of the mean curve were fitted to one- or two-site models (GraphPad Software Inc.), as described previously (Marti *et al.*, 2005).

## 6 STATISTICAL ANALYSIS

The results are presented as the mean ± S.E.M. for *n* determinations obtained from the different animals. A statistical analysis was performed by a two-way analysis of variance, followed by a Student's *t*-test for unpaired samples or by the Dunnett

multiple comparison test (GraphPad Software Inc.). Significance was defined as  $P < 0.05$ .

Simple linear regression analyses were employed to establish the associations between the gene expression and the clinical variables following the Pearson test (Graph Pad Software). Statistical significance was considered to be  $P < 0.05$ .

## RESULTS

The results of the present thesis attempt to respond to two key points: 1) whether the changes in the genetic expression of  $\alpha_1$ - and  $\beta$ -ARs, and GRKs associated with the changes in their functional role accompanying two cardiovascular diseases, hypertension and heart failure, are the cause or the consequence of them; 2) whether human peripheral blood lymphocytes reflect the changes in several tissues in the cardiovascular system like vessels, heart or kidney, relate with these pathologies; and doing these analysis, whenever possible, from a gender differentiation perspective.

Next we show the results obtained in two animals hypertension models, and in human models of both hypertension and heart failure at several stages of each disease (*for the Results section, see the Tables and Figure listed below*).

### 1 TABLE LEGENDS

**Table VI.** Hemodynamic constants from young and adult rats. **Page 123**

**Table VII.** Parameters of the concentration-response curves of contraction to phenylephrine and the maximal contraction obtained with a depolarizing solution (80 mM KCl) in the aortas isolated from young and adult WKY rats. **Page 142**

**Table VIII.** Parameters of the concentration-response curves of relaxation obtained by the addition of  $\beta$ -adrenergic agonists (Isoprenaline and SR58611A) to aortas, isolated from young and adult WKY rats, precontracted by phenylephrine. **Page 143**

**Table IX.** Parameters of the concentration-response curves of contraction to phenylephrine and the maximal contraction obtained with a depolarizing solution (80 mM KCl) in the aortas isolated from young WKY and SHR animals. **Page 144**

**Table X.** Parameters of the concentration-response curves of relaxation obtained by the addition of  $\beta$ -adrenergic agonists (Isoprenaline and SR58611A) to aortas, isolated from young WKY and SHR animals, precontracted by phenylephrine. **Page 145**

**Table XI.** Parameters of the concentration-response curves of contraction to phenylephrine and the maximal contraction obtained with a depolarizing solution (60 mM KCl) in the aortas isolated from adult WKY and SHR animals. **Page 147**

**Table XII.** Parameters of the concentration-response curves of relaxation obtained by the addition of  $\alpha_1$ -adrenergic antagonists (5-MU and BMY 7378) to aortas, isolated from adult WKY and SHR animals, precontracted by phenylephrine. **Page 147**

**Table XIII.** Parameters of the concentration-response curves of relaxation obtained by the addition of  $\beta$ -adrenergic agonists (Isoprenaline and SR58611A) to aortas, isolated from adult WKY and SHR animals, precontracted by phenylephrine. **Page 149**

**Table XIV.** Parameters of the concentration-response curves of contraction to phenylephrine and the maximal contraction obtained with a depolarizing solution (80 mM KCl) in the aortas isolated from adult Wistar and LNHR animals. **Page 151**

**Table XV.** Parameters of the concentration-response curves of relaxation obtained by the addition of  $\beta$ -adrenergic agonists (Isoprenaline and Salbutamol) to aortas, isolated from adult Wistar and LNHR animals, precontracted by phenylephrine. **Page 152**

**Table XVI.** Demographic and anthropometric characteristics of the study population. **Page 153**

**Table XVII.** Demographic and anthropometric characteristics of the study population divided by cardiovascular pathology. **Page 154**

**Table XVIII.** Hemodynamic and biochemical characteristics of the hypertensive patient groups. **Page 155**

**Table XIX.** Clinical characteristics of the heart failure patients. **Page 157**

**Table XX.** Clinical characteristics of the transplanted patients. **Page 158**

## 2 FIGURE LEGENDS

**Figure 1. Comparative analysis of the hemodynamic constants between the different animal models of hypertension (A and B), and linear regression between the PAS and cardiac hypertrophic levels in LNHR animals (C).** Values expressed as the average of mmHg (PAS) (A) and % of increase of mg/g (heart/body weight ratio) (B)  $\pm$  S.E.M. of n=8-25 animals according to each group, indicated in the parentheses in the graph. \*\*\* P < 0.001 vs. Wistar, ### P < 0.001 vs. WKY, following the Student's t-test. (C) Values expressed as mg/g. The solid line represents a significant correlation. **Page 124**

**Figure 2. mRNA expression levels of the ARs and GRK2 in the aortas of young and adult WKY rats.** Values were normalized using GAPDH as a housekeeping gene and expressed as the average of  $2^{-\Delta Ct} \pm$  S.E.M. of n=4-6 different animals. \* P < 0.05 vs. WKY, following the Student's t-test. **Page 126**

**Figure 3. mRNA expression levels of the ARs and GRK2 in the aortas of young pre-hypertensive rats (SHR) and their controls (WKY).** Values were normalized using GAPDH as a housekeeping gene and expressed as the average of  $2^{-\Delta Ct} \pm$  S.E.M. of n=4-6 different animals. \* P < 0.05 vs. WKY, following the Student's t-test. **Page 127**

**Figure 4. The mRNA expression levels of GAPDH in different tissues from hypertensive adult rats.** Values were normalized using the average value of GAPDH expression levels in WKY/Wistar rats and expressed as the average of  $2^{-\Delta Ct} \pm$  S.E.M. of n=4-6 different animals. \*\* P < 0.01 vs. WKY/Wistar, following the Student's t-test. **Page 128**

**Figure 5. The mRNA expression levels of the ARs and GRK2 in the aortas of hypertensive adult rats (SHR) and their controls (WKY).** (A) Values were normalized using GAPDH as a housekeeping gene; (B) Values were normalized using the average value of the GAPDH expression levels in WKY. In both cases, values were expressed as the average of  $2^{-\Delta Ct} \pm$  S.E.M. of n=4-6 different animals. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001 vs. WKY, following the Student's t-test. **Page 129**

**Figure 6. The mRNA expression levels of the ARs and GRK2 in the aortas of hypertensive adult rats under L-NAME (LNHR) treatment and their controls (Wistar).** Values were normalized using GAPDH as a housekeeping gene and

expressed as the average of  $2^{-\Delta Ct} \pm$  S.E.M. of n=3-5 different animals. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs. WKY following the Student's t-test. Page 130

**Figure 7. The mRNA expression levels of the ARs and GRK2 in the left ventricle of young and adult WKY rats.** Values were normalized using GAPDH as a housekeeping gene and expressed as the average of  $2^{-\Delta Ct} \pm$  S.E.M. of n=4-6 different animals. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs. 6 weeks following the Student's t-test. Page 131

**Figure 8. The expression levels of the ARs and GRK2 in the left ventricle of young pre-hypertensive rats (SHR) and their controls (WKY).** Values were normalized using GAPDH as a housekeeping gene and expressed as the average of  $2^{-\Delta Ct} \pm$  S.E.M. of n=4-6 different animals. \* P < 0.05 vs. WKY following the Student's t-test. Page 132

**Figure 9. The mRNA expression levels of the ARs and GRK2 in the left ventricle of hypertensive adult rats (SHR) and their controls (WKY).** Values were normalized using GAPDH as a housekeeping gene and expressed as the average of  $2^{-\Delta Ct} \pm$  S.E.M. of n=4-6 different animals. \* P < 0.05 vs. WKY following the Student's t-test. Page 132

**Figure 10. The mRNA expression levels of the ARs and GRK2 in the left ventricle of hypertensive adult rats under L-NAME (LNHR) treatment and their controls (Wistar).** Values were normalized using GAPDH as a housekeeping gene and expressed as the average of  $2^{-\Delta Ct} \pm$  S.E.M. of n=3-5 different animals. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs. WKY following the Student's t-test. Page 133

**Figure 11. The mRNA expression levels of the ARs and GRK2 in kidneys of young and adult WKY rats.** Values were normalized using GAPDH as a housekeeping gene and expressed as the average of  $2^{-\Delta Ct} \pm$  S.E.M. of n=4-6 different animals. \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001 vs. 6 weeks following the Student's t-test. Page 134

**Figure 12. The expression levels of the ARs and GRK2 in kidneys of young pre-hypertensive rats (SHR) and their controls (WKY).** Values were normalized using GAPDH as a housekeeping gene and expressed as the average of  $2^{-\Delta Ct} \pm$  S.E.M. of n=4-6 different animals. \* P < 0.05, \*\*\* P < 0.001 vs. WKY following the Student's t-test. Page 135

**Figure 13. The mRNA expression levels of the ARs and GRK2 in the left ventricle of hypertensive adult rats (SHR) and their controls (WKY).** Values were normalized using GAPDH as a housekeeping gene and expressed as the average of  $2^{-\Delta Ct} \pm$  S.E.M. of n=4-6 different animals. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs. WKY following the Student's t-test. Page 136

$\Delta C_t \pm$  S.E.M. of n=4-6 different animals. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs. WKY following the Student's t-test. **Page 136**

**Figure 14. The mRNA expression levels of the ARs and GRK2 in kidneys of hypertensive adult rats under L-NAME (LNHR) treatment and their controls (Wistar).** Values were normalized using GAPDH as a housekeeping gene and expressed as the average of  $2^{-\Delta C_t} \pm$  S.E.M. of n=3-5 different animals. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs. WKY following the Student's t-test. **Page 137**

**Figure 15. The mRNA expression levels of the ARs and GRK2 in peripheral blood lymphocytes of hypertensive adult rats (SHR) and their controls (WKY).** Values were normalized using GAPDH as a housekeeping gene and expressed as the average of  $2^{-\Delta C_t} \pm$  S.E.M. of n=3-6 different animals. \*\*\* P < 0.001 vs. WKY following the Student's t-test. **Page 138**

**Figure 16. Western Blot and densitometric analysis of the protein expression in the aortas of young WKY and SHR rats.** Representative images of 3 experiments. Values were normalized using  $\beta$ -Actin as a load control and expressed as the ratio of the immunodetectable protein (n=3). \* P < 0.05 vs. WKY following the Student's t-test. **Page 139**

**Figure 17. Western Blot and densitometric analysis of the protein expression in the aortas of adult WKY and SHR rats.** Representative images from 3 experiments. Values normalized using  $\beta$ -Actin as load control and expressed as the ratio of immunodetectable protein (n= 3). \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001 vs. WKY, following the Student t test. **Page 140**

**Figure 18. Western Blot and densitometric analysis of the protein expression in aorta of adult Wistar and LNHR rat.** Representative images of 3 experiments. Values were normalized using  $\beta$  - Actin as a load control, expressed as the ratio of the immunodetectable protein (n=3). \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs. Wistar, following the Student's t-test. **Page 141**

**Figure 19. Cumulative concentration-response curves of relaxation by selective  $\beta$ -adrenergic agonists: Isoprenaline (A) and SR58611A (B) on the phenylephrine-induced contraction in young rats.** Experiments were carried out in the aortas obtained from young SHR and WKY rats. Values were expressed as the average  $\pm$  S.E.M. of n=4-8 experiments. **Page 145**

**Figure 20. (A) Cumulative concentration-response curves of contraction by Phenylephrine. (B) Time course of the decay in the maximal contractile response to phenylephrine after removal of the agonist in adult rats.** Experiments were carried out in aortas obtained from adult rats SHR and WKY. Values expressed as the average  $\pm$  s.e.m. of  $n = 4 - 8$  experiments. **Page 146**

**Figure 21. Cumulative concentration-response curves of relaxation by selective  $\alpha_1$ -adrenergic antagonists: 5-MU (A) and BMY 7378 (B) on the phenylephrine-induced contraction in adult rats.** Experiments were carried out in the aortas obtained from adult SHR and WKY rats. Values were expressed as the average  $\pm$  S.E.M. of  $n=4-8$  experiments. **Page 148**

**Figure 22. Cumulative concentration-response curves of relaxation by selective  $\beta$ -adrenergic agonists: Isoprenaline (A) and SR58611A (B) on the phenylephrine-induced contraction in adult rats.** Experiments were carried out in the aortas obtained from adult rats SHR and WKY. Values were expressed as the average  $\pm$  S.E.M. of  $n=4-8$  experiments. **Page 149**

**Figure 23. (A) Cumulative concentration-response curves of contraction by Phenylephrine. (B) Time course of the decay in the maximal contractile response to phenylephrine after removal of the agonist in adult rats.** Experiments were carried out in the aortas obtained from hypertensive adult rats (LNHR) and their controls (Wistar). Values were expressed as the average  $\pm$  S.E.M. of  $n=17-19$  experiments. **Page 150**

**Figure 24. Cumulative concentration-response curves of relaxation by selective  $\beta$ -adrenergic agonists Isoprenaline (A) and Salbutamol (B) on the phenylephrine-induced contraction in adult rats.** Experiments were carried out in the aortas obtained from adult rats, LNHR and their controls (Wistar). Values were expressed as the average  $\pm$  S.E.M. of  $n=4-7$  experiments. **Page 151**

**Figure 25. The mRNA expression levels of the ARs and GRKs in human peripheral blood lymphocytes from healthy volunteers.** Values were normalized using GAPDH as a housekeeping gene and expressed as the average of  $2^{-\Delta Ct} \pm$  S.E.M. of  $n=7-10$ . **Page 159**

**Figure 26. The mRNA expression levels of ARNm of the ARs and GRKs in the human peripheral blood lymphocytes from healthy volunteers and patients with cardiovascular pathologies.** Values were normalized using GAPDH as a

housekeeping gene and expressed as  $2^{-\Delta Ct}$  for n=7-1 studied patients. (•) Men, (◦) Women. **Page 160**

**Figure 27. Comparative analysis of the mRNA expression levels of  $\alpha_{1B}$ -AR (A) and  $\alpha_{1D}$ -AR (B) in the human peripheral blood lymphocytes in different cardiovascular pathologies.** Values were normalized using GAPDH as a housekeeping gene and compared with the control group (healthy volunteers). Data were expressed as the average of  $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm$  S.E.M. of n=5-15 depending on each group. N.D. not determined, \* P < 0.05 vs. the control group following the Student's t-test for independent variables. **Page 162**

**Figure 28. Comparative analysis of the mRNA expression levels of  $\beta_1$ -AR (A) and  $\beta_2$ -AR (B) in the human peripheral blood lymphocytes in different cardiovascular pathologies.** Values were normalized using GAPDH as a housekeeping gene and compared with the control group (healthy volunteers). Data were expressed as the average of  $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm$  S.E.M. of n=5-15 depending on each group. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs. the group control, # P < 0.05 vs. IC, following the Student's t-test for the independent variables. **Page 163**

**Figure 29. Comparative analysis of the mRNA expression levels of GRK2 (A), GRK3 (B) and GRK5 (C) in the human peripheral blood lymphocytes in different cardiovascular pathologies.** Values were normalized using GAPDH as a housekeeping gene and compared with the control group (healthy volunteers). Data were expressed as the average of  $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm$  S.E.M. of n=5-15 depending on each group. \* P < 0.05, \*\*\* P < 0.001 vs. the group control, ### P < 0.001 vs. IC, following the Student's t-test for independent variables. **Page 164**

**Figure 30. Linear regression between the mRNA expression levels of  $\beta_1$ -AR in human lymphocytes and body weight (A), and body mass index values (IMC) (B).** Values were normalized using GAPDH as a housekeeping gene and expressed as  $2^{-\Delta Ct}$  for the n=14-41 studied patients. (•) Men, (◦) Women, black line (the whole population), continuous line (significant correlations). **Page 165**

**Figure 31. Linear regression between the mRNA expression levels of  $\alpha_{1B}$ -AR in human lymphocytes and diurnal arterial blood pressure (PA).** Values were normalized using GAPDH as a housekeeping gene and expressed as  $2^{-\Delta Ct}$  for the n=19 studied patients. (•) Men, (◦) Women, continuous line (significant correlations). The upper and lower values of each graph represent systolic (solid circles) and depict diastolic (empty circles) blood pressures, respectively. **Page 166**

**Figure 32. Linear regression between the mRNA expression levels of  $\beta_2$ -AR in human lymphocytes and 24-h diastolic blood pressure (PAD).** Values were normalized using GAPDH as a housekeeping gene and expressed as  $2^{-\Delta Ct}$  for the n=40 studied patients. (•) Men, (•) Women, black line (the whole population), continuous line (significant correlations). **Page 167**

**Figure 33. Linear regression between the mRNA expression levels of GRK3 in human lymphocytes and diurnal and nocturnal systolic (A) and diastolic (B) blood pressures.** Values were normalized using GAPDH as a housekeeping gene and expressed as  $2^{-\Delta Ct}$  for the n=40 studied patients. (•) Men, (•) Women, black line (the whole population), continuous line (significant correlations). The upper and lower values of each graph represent the systolic (solid circles) and diastolic (empty circles) blood pressures, respectively. **Page 168**

**Figure 34. Linear regression between the mRNA expression levels of  $\beta_1$ -AR in human lymphocytes and diurnal heart rate (FC).** Values were normalized using GAPDH as a housekeeping gene and expressed as  $2^{-\Delta Ct}$  for the n=26 studied patients. (•) Men, (•) Women, black line (the whole population), continuous line (significant correlations). **Page 169**

**Figure 35. Linear regression between the mRNA expression levels of  $\alpha_{1B}$ -AR in human lymphocytes and plasmatic Homocystein levels.** Values were normalized using GAPDH as a housekeeping gene and expressed as  $2^{-\Delta Ct}$  for the n=16 studied patients. (•) Men, (•) Women, black line (significant correlation of the whole population). **Page 170**

**Figure 36. Linear regression between the mRNA expression levels of  $\alpha_{1D}$ -AR in human lymphocytes and plasmatic aldosterone levels.** Values were normalized using GAPDH as a housekeeping gene and expressed as  $2^{-\Delta Ct}$  for the n=19 studied patients. (•) Men, (•) Women, black line (significant correlation of the whole population). **Page 171**

**Figure 37. Linear regression between the mRNA expression levels of GRK5 in human lymphocytes from heart failure patients and plasmatic bilirubin levels.** Values were normalized using GAPDH as a housekeeping gene and expressed as  $2^{-\Delta Ct}$  for the n=14 studied patients. (•) Men, (•) Women, black line (the whole population), continuous line (significant correlations). **Page 172**

**Figure 38. Comparative analysis of the urinary albumin excretion (EUA) levels among healthy volunteers (controls), patients with isolated office hypertension, hypertensive patients, and hypertensive patients treated with AICEs or ARABs. Microalbuminuria was defined as  $EUA=30-300$  mg/24h (values above dotted line). (•) Men, (◐) Women. Page 173**

**Figure 39. Linear regression between the mRNA expression levels of  $\beta_1$ -AR in human lymphocytes from normo- and microalbuminuric patients and Urinary Albumin Excretion (EUA) values (A) and their logarithmic transformation, LogEUA (B). Values were normalized using GAPDH as a housekeeping gene and expressed as  $2^{-\Delta Ct}$  for the  $n=9-32$  studied patients. (•) Men, (◐) Women, black line (the whole population), continuous line (significant correlations). In the upper graph (A), the microalbuminuric patients EUA values are shown. In the lower graph (B), the microalbuminuric (solid circles) and normoalbuminuric (empty circles) patients LogEUA values are represented. A discontinuous line represents the total analysis of both the normo- and microalbuminuric populations (non significant correlation). Page 174**

**Figure 40. Linear regression between the mRNA expression levels of  $\beta$ -ARs and the GRKs in human lymphocytes from transplanted patients and time after transplantation. Values were normalized using GAPDH as a housekeeping gene and expressed as  $2^{-\Delta Ct}$  for the  $n=17$  studied patients. A continuous line represents significant correlations. (•) Men, (◐) Women. Page 176**

**Figure 41. Linear regression between the mRNA expression levels of ARs as and GRKs in human lymphocytes: A)  $\alpha_{1B}$ -AR vs. GRKs; B)  $\alpha_{1D}$ -AR vs. GRKs. Values normalized using GAPDH as a housekeeping gene and expressed as  $2^{-\Delta Ct}$  for the  $n = 15-25$  studied patients. (•) Men, (◐) Women. Page 178**

**Figure 42. Linear regression between the mRNA expression levels of ARs and GRKs in human lymphocytes: A)  $\beta_1$ -AR vs. GRKs; B)  $\beta_2$ -AR vs. GRKs. Values were normalized using GAPDH as a housekeeping gene and expressed as  $2^{-\Delta Ct}$  for the  $n=55-70$  studied patients. (•) Men, (◐) Women, black line (the whole population), a continuous line (significant correlations). Page 179**

## DISCUSSION

### 1 EXPRESSION OF ARS AND GRKS IN DIFFERENT TISSUES

Our first objective was to analyze the basal mRNA levels of the six ARs subtypes ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ) and three GRKs (GRK2, GRK3, GRK5) in several tissues and cells implicated in the maintenance of cardiovascular homeostasis: heart, kidney, blood vessels and lymphocytes.

We detected mRNA levels for all the genes in each tissue analyzed, but in different proportions. It is firstly important to emphasize the majority expression and functional role of  $\alpha_{1D}$ -ARs in the aorta, corroborating previous functional evidence (Gisbert *et al.*, 2000; Marti *et al.*, 2005), and secondly the unexpected results obtained with  $\beta$ -ARs, the higher levels of mRNA for  $\beta_3$ -AR, followed by  $\beta_1$ -AR and a slight expression of  $\beta_2$ -AR. Although a quantitative determination of mRNA for the different  $\beta$ -adrenoceptors has not been systematically performed before in rat aortas, these results contrast with classic pharmacological studies that attribute the  $\beta$ -mediated relaxant response in vessels to  $\beta_2$ -AR (Guimaraes and Moura, 2001). Furthermore, they coincide with the more recent evidence of  $\beta_1$ - (Chruscinski *et al.*, 2001) and  $\beta_3$ -ARs playing a role in the rat aorta (Trochu *et al.*, 1999; Rautureau *et al.*, 2002). However, the major expression of the  $\beta_3$  subtype in the aorta does not implicate its localization in vascular smooth muscle cells. Instead as previous results from our laboratory indicate,  $\beta_1$  is the main subtype expressed in the smooth muscle cells isolated from aortas (Pérez-Aso, 2010), while  $\beta_3$  is only present at low levels. Then, it would be interesting to determinate the cell type of this vessel in which the  $\beta_3$  subtype is expressed in a higher proportion, and its main functional role.

When we observed the mRNA levels in left ventricle, the main  $\alpha_1$ -AR was the  $\alpha_{1B}$  subtype, as previously described (Graham *et al.*, 1996). According to its functional role and previous bibliography, the main  $\beta$ -AR was the  $\beta_1$  subtype (66-83%, depending on the rat group), followed by  $\beta_2$  (17-33%) (Brodde, 1991) and  $\beta_3$  at a lower level (0.7-0.1%) (Gauthier *et al.*, 1996). In kidneys, we found that the  $\alpha_{1B}$  subtype is the main  $\alpha_1$ -AR, followed by  $\alpha_{1A}$  and  $\alpha_{1D}$ , as previously described (Graham *et al.*, 1996). Their physiological role still remains unclear, but it seems that the  $\alpha_{1B}$  subtype could mediate renal tubular sodium and water reabsorption in rats (Elhawary and Pang, 1994), and that  $\alpha_{1A}$  and  $\alpha_{1D}$  mediate the vascular contraction of the distal and proximal renal arteries, respectively (Elhawary *et al.*, 1992; Villalobos

Molina *et al.*, 1997). The main  $\beta$ -AR was the  $\beta_1$  subtype, as ascertained by its main function, that of controlling renin secretion (Osborn *et al.*, 1981; Lakhani *et al.*, 1994), followed by  $\beta_2$  and subtype  $\beta_3$  in a lower proportion.

On the other hand, we analyzed mRNA levels for the ARs and GRKs in circulating lymphocytes from human and adult rats. According to previous publications, the presence of  $\alpha_1$ -ARs in lymphocytes is not clear (Casale *et al.*, 1984; Heijnen *et al.*, 1996; Rouppe van der Voort *et al.*, 1999; Ricci *et al.*, 1999; Tayebati *et al.*, 2000), but the presence of  $\beta_2$  as the main AR has been assumed by most authors (Tayebati *et al.*, 2000; Veglio *et al.*, 2001; Kin and Sanders, 2006; Yu *et al.*, 2007). Our results obtained using real-time quantitative RT-PCR confirm the previous data acquired by a semi-quantitative method, and demonstrate the coexistence of the three  $\beta$ -AR subtypes ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  and  $\beta_3$ ) in human lymphocytes (Yu *et al.*, 2007). The highest level of expression was that of  $\beta_2$ , followed by that of  $\beta_1$ , which was significantly lower, and finally that of  $\beta_3$  was practically undetectable. Similar results were obtained when analyzing rat lymphocytes, where  $\beta_2$  was the main AR subtype (Loveland *et al.*, 1981).  $\beta_2$ -AR was described by other authors as the AR responsible for the communication between the nervous and immune systems, and as being implicated in cytokine secretion, cellular proliferation and differentiation (Kohm and Sanders, 2001; Kin and Sanders, 2006). In human lymphocytes, we detected both  $\alpha_{1D}$ - and  $\alpha_{1B}$ -ARs at a lower expression level in accordance with the literature (Ricci *et al.*, 1999; Tayebati *et al.*, 2000). It is important to stress that we only detected mRNA levels for the  $\alpha_1$ -ARs in a small group of human samples due to methodological problems in relation to the lower expression levels for these ARs.  $\alpha_1$ -ARs were not detected in rat lymphocytes. The implication of  $\alpha_1$ -ARs in the regulation/activation of the immune cell has not been well defined (Kavelaars, 2002). Human lymphocytes expressed not only GRK2, but also GRK3 and GRK5, as previously described (Dzimiri *et al.*, 2002; Iaccarino *et al.*, 2005; Hata *et al.*, 2006), where GRKs were implicated in the regulation of migration and inflammation (Vroon *et al.*, 2004a; Premont *et al.*, 2007).

Although the three GRKs share certain characteristics, they are distinct non redundant enzymes with specific functional and regulatory properties (Oppermann *et al.*, 1996; Bunemann and Hosey, 1999; Penela *et al.*, 2006). While the role of GRK2 in the regulation of  $\beta$ -ARs has been extensively studied, the specificities of the other isoforms for human GPCRs are unclear. Previous studies in mice reveal that the myocardium-targeted overexpression of GRK2 and GRK5 results in the attenuation of the contractile response to  $\beta$ -AR, whereas the cardiac overexpression of GRK3 is characterized by normal  $\beta$ -AR activity (Vinge *et al.*, 2008), suggesting a specific

desensitization of cardiac  $\beta$ -ARs (mainly the  $\beta_1$  subtype) which is mediated by GRK2 and GRK5, but not by GRK3. Despite the controversy, other authors suggest that both GRK3 and GRK5 could regulate cardiac  $\alpha_{1B}$ -AR (Rockman *et al.*, 1996; Eckhart *et al.*, 2000; Vinge *et al.*, 2008). These results open new fields to investigate which specific GRK regulates each AR subtype in accordance with the cellular type or pathological state, and it would be interesting to know which pathways could be altered in these cells or pathologies.

With this purpose in mind, linear regressions were established between the mRNA levels of ARs and GRKs in human lymphocytes by assuming that the existence of significant correlations would indicate a specific activity of each GRK in the regulation of a given AR. In human lymphocytes, we found significant correlations between  $\beta_1$ -AR/GRK5, and  $\beta_2$ -AR/GRK2 and GRK3. These results indicate that GRK5 could be responsible for  $\beta_1$ -AR regulation, while  $\beta_2$  depends on GRK2 and GRK3, as previously described (Benovic *et al.*, 1987, 1991; Freedman *et al.*, 1995; Rockman *et al.*, 1996; Bünemann *et al.*, 1999; Eckhart *et al.*, 2000; Vinge *et al.*, 2008). Moreover, this relationship suggests that the changes in the GRKs expression relate to the changes in  $\beta$ -ARs. Therefore, it is necessary to carefully interpret those isolated GRKs determinations that are not accompanied by a similar  $\beta$ -AR analysis.

## 2 CHANGES IN THE EXPRESSION AND FUNCTIONALITY OF ARS AND GRKS WITH AGE: MATURATION

Maturation and aging are associated with a variety of alterations in the cardiovascular function, but the origin of these changes needs to be clarified (Docherty, 1990). We analyzed changes in the expression and functionality of ARs and GRK2 in the maturation process of WKY rats aged between 6 (young immature) and 16 (young-adult) weeks. We found that the expression of  $\alpha_{1D}$ -AR lowered in rat aortas, which could be responsible for the lower potency of phenylephrine [ $pEC_{50}$  (6wo) =  $8.38 \pm 0.34$  vs.  $pEC_{50}$  (16wo) =  $7.70 \pm 0.08^*$ ], thus corroborating previous results reported by other authors who described a lower potency of NA accompanied by a lower intracellular calcium and  $IP_3$  signal (Gurdal *et al.*, 1995). Moreover, our results indicate a drop in the  $\beta_3$ -AR expression that is not accompanied by reduced potency of either Isoprenaline or SR58611A (which significantly increased). This suggests that the changes noted in the expression of this subtype could take place in a cell type that is not directly implicated in vascular tone control. According to other

authors, an impairment of  $\beta$ -adrenergic vasodilatation would not appear until advanced ages and would relate to aging (Baloglu *et al.*, 2007).

It has been established that the impairment of cardiac  $\beta$ -adrenergic activity is due to age (Abrass *et al.*, 1982), but whether these changes are due to either a decrease in expression or an impairment of the activation process remains unknown (Brodde and Leineweber, 2004). Our results indicate a decrease in the expression levels of  $\beta_1$ -AR in the left ventricle of adult WKY rats, according to previous results in both human and rat hearts in an advanced aging state (White *et al.*, 1994; Cerbai *et al.*, 1995; Dobson *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2009). This change appears only in hearts and not in vessels, which could be a response to a specific change in this tissue and not to a general change in the organism. In accordance with this hypothesis, we found significant correlations between age and the mRNA expression levels of  $\beta_1$ -AR in human explanted hearts (unpublished results), but not in lymphocytes.

Despite the evidence published about the age-related changes in  $\alpha_1$ -ARs being controversial, our results indicate a reduction of the cardiac and renal  $\alpha_{1D}$  subtype during the maturation process, according to previous observations (Miller *et al.*, 1996; Passmore *et al.*, 2005; Cao and Li, 2009), which probably relate to changes in the expression of renal or heart vessels, but the physiological meaning of this drop in expression needs to be clarified. We also observed an increase of the  $\alpha_{1A}$  subtype in the heart, which could relate to either its cardioprotector effect or the modulation of the physiological growth process, as other authors have suggested (O'Connell *et al.*, 2003; Du *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2007; Woodcock *et al.*, 2008), and finally we saw a decreased expression of the  $\alpha_{1B}$  subtype in both the heart and kidney, where this is the main subtype. The lower expression of renal  $\alpha_{1B}$ -AR could be related to changes in the tubular sodium reabsorption process (Guillery *et al.*, 1994; Elhawary and Pang, 1994), but this needs to be clarified. This reduction in sodium reabsorption, that appears at an early stage of the maturation process (Boer *et al.*, 2005), could also be related to a reduction of the GRK2 expression, as we have found and as other authors have previously suggested (Dinudom *et al.*, 2004).

### 3 EXPRESSION OF THE ARs AND GRKs IN HUMAN LYMPHOCYTES AND CARDIOVASCULAR RISK

If we consider the different cardiovascular risk factors, we know that age is the main factor involved, but that hypertension comes second. Obesity, on the other hand, along with intolerance to glucose, diabetes and alterations of the lipid profile, are factors that determine the appearance of cardiovascular problems in both men and women. In addition, it is necessary to evaluate cardiovascular risk from a gender perspective. By seeking this evidence, we firstly considered analyzing the expression of the ARs and GRKs related to the factors implicated in cardiovascular risk such as gender, age, body mass index, and other clinical parameters relating to diabetes and dyslipemic state. In the following section, we focus on analyzing the changes noted in the ARs and GRKs in hypertension.

We found no significant gender-related changes between the mRNA levels of the ARs and GRKs in human lymphocytes, but we did not rule out the possibility that gender-related changes appear in a specific organ, and there were no general changes reflected in circulating lymphocytes. Accordingly, no age-related differences in the expression of ARs were found in human lymphocytes, although there was a significant and inverse correlation between the mRNA levels of  $\beta_1$ -AR and age in the human left ventricle (results obtained in our laboratory).

Irrespectively of age and cardiovascular disease, we found a significant and inverse correlation between  $\beta_1$ -AR and weight and, consequently, with body mass index, which appeared in both men and women. This correlation could be related to the role of the  $\beta_1$  subtype in the control of lipolysis and thermogenesis (Lafontan and Berlan, 1993; Barbe *et al.*, 1997; Schiffelers *et al.*, 1999; Ohshiro *et al.*, 2008), thus providing new evidence for those works that relate increased  $\beta_1$  activity to weight loss (Hyltander *et al.*, 2000) or to resistance to obesity (Soloveva *et al.*, 1997). These results suggest new evidence to study the possible role of  $\beta_1$ -AR in obesity and its treatment. The low mRNA levels detected for subtype  $\beta_3$  in human lymphocytes enable us to perform a similar analysis. No significant correlations were found when comparing the mRNA levels of ARs and GRKs in human lymphocytes and for other clinical variables relating to diabetes or dyslipidemia, which are summarized in Table XVIII (page 175). Therefore, we did not establish a relationship between lymphocytic ARs or GRKs and these cardiovascular risk factors.

## 4 CHANGES IN THE EXPRESSION AND FUNCTIONALITY OF THE ARs AND GRKS IN HYPERTENSION

As mentioned previously, hypertension is one of the most important cardiovascular risk factors, and the relationship between blood pressure values and strokes is well established. Moreover, essential hypertension relates to the overactivity of the sympathetic nervous system which leads to an increase of vascular resistance. This vascular resistance could be caused by an imbalance between vasodilator and vasoconstrictor mechanisms. According to this hypothesis, our research group and other authors have found that the increased functional role of  $\alpha_{1D}$ -ARs is one of the changes involved in hypertension (Villalobos-Molina *et al.*, 1999; Gisbert *et al.*, 2002; Tanoue *et al.*, 2002a, 2002b; Ziani *et al.*, 2002; D'Ocon, 2003; Lyssand *et al.*, 2008). However, the origin of this change remains unknown. On the other hand, other authors have shown an impairment of  $\beta$ -adrenergic-mediated vasodilatation (Borkowski *et al.*, 1992) relating to an increase in GRK2 activity (Feldman and Gros, 2006). To date however, nobody has undertaken a parallel analysis of the changes in the expression of ARs and GRKs in relation to hypertension.

For this purpose, we analyzed these changes in the expression and functionality of the ARs and GRKs in a human hypertension model (lymphocytes from hypertensive patients) and in two animal models of hypertension (spontaneously hypertensive rats, SHR; and hypertensive rats induced by inhibition of NO with L-NAME treatment; a different origin but similar models from an hemodynamic viewpoint). Our objective is to know which of these changes precedes the hypertensive state and which accompany hypertension, and whether they are a consequence or a part of the causal mechanism of this disease.

### 4.1 CHANGES OBSERVED IN THE AORTAS OF HYPERTENSIVE RATS

In the aortas of young prehypertensive SHRs, only an increase in the  $\beta_1$ -adrenoceptor expression and function was observed. This change preceded the hypertensive state and could be involved in the development of hypertension. By comparing age-matched WKY rats and SHRs, however, we observed a higher expression (mRNA and protein) of  $\alpha_{1A}$ -,  $\alpha_{1B}$ -,  $\alpha_{1D}$ -,  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -, and  $\beta_3$ -ARs, accompanied by an up-regulation of GRK2. The increased mRNA expression of  $\alpha_{1D}$ - and  $\beta_3$ -AR in the aortas of SHRs has been previously described by Godínez-Hernández *et al.* (2006) and Mallem *et al.* (2005), respectively.



The higher protein expression of GRK2, which directly relates to hypertension, confirms previous evidence in the aortas and lymphocytes of rats (Gros *et al.*, 2000), and also in the lymphocytes of hypertensive patients (Gros *et al.*, 1999). Despite the higher protein expression previously observed, no changes in the mRNA levels for GRK2 are reported for either our adult SHR lymphocytes or other GRKs, although their protein expression, and probably their activity, could be higher, as the aforementioned authors described, even though they did not study the genetic expression levels of those enzymes (Gros *et al.*, 2000).

The increased mRNA and protein expressions in the GRK2 in adult hypertensive animals was not observed in young prehypertensive rats. Therefore, higher GRK2 could be an adaptive change as a result of the following: 1) the increase observed in the expression of adrenoceptors and/or 2) elevated blood pressure. The latter is not supported by the additional consideration that elevated blood pressure has been observed in transgenic mice with a smooth muscle cell-specific overexpression of GRK2, suggesting a more causal relationship between the increased GRK2 expression and the development of hypertension (Eckhart *et al.*, 2002).

*What could the hemodynamic consequences of these changes be?* The basic hemodynamic abnormality in hypertension is increased vascular resistance. Thus, an increase in vasoconstrictor mechanisms, because of a rise in the expression and functionality of the  $\alpha_1$ -adrenoceptors, would justify it. However, increases in the  $\alpha_1$  function in vessels could be counteracted by an increased expression of the  $\beta$ -adrenoceptors, which mediate vasodilatory mechanisms. In addition, elevated GRK2 expression and the associated impairment of adrenoceptor-G-protein coupling could have major functional implications.

It is well-known that GRK2 is apparently the main factor involved in diminishing  $\beta$ -AR signaling in hypertension (Feldman and Gros, 2006; Penela *et al.*, 2006). Nonetheless,  $\beta_3$ -AR is resistant to agonist-promoted GRK2-mediated desensitization (Rozec and Gauthier, 2006). Accordingly, an increased expression of  $\beta_1$ -ARs justifies the higher vasorelaxant potency of isoprenaline found in prehypertensive aortas. In hypertensive aortas, the higher expression of  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -ARs could be counteracted by increased levels of the active GRK2. However,  $\beta_3$ -ARs resist GRK2-mediated desensitization. Thus, the functional role of this subtype could increase in relation to the other two. Our functional studies have confirmed this proposal; in the aorta of hypertensive rats, the lower potency of isoprenaline (which exhibits a low affinity for  $\beta_3$ -ARs (Strosberg, 1997), and the high potency of the selective  $\beta_3$  agonist SR58611A, together with an increase in the percentage of high affinity sites for this agonist,

suggest an increased functional role of  $\beta_3$ -ARs in hypertension. From a pathophysiological point of view, since vascular  $\beta_3$ -ARs are only stimulated by higher doses of catecholamines (Strosberg, 1997), the major role of  $\beta_3$ -ARs in hypertensive vessels determines an impaired  $\beta$ -mediated vasodilator mechanism that is only triggered by a greater adrenergic stimulus.

In addition,  $\alpha_1$ -AR subtypes also exhibit different phosphorylation and internalization patterns:  $\alpha_{1B}$ -AR (Chalothorn *et al.*, 2002) undergoes a rapid and intense desensitization mediated by GRKs (Diviani *et al.*, 1996; Garcia-Sainz *et al.*, 2000). The  $\alpha_{1A}$  subtype exhibits a continuous, agonist-independent trafficking, which is also agonist- and GRK2-dependent, between the membrane and cytosol (Morris *et al.*, 2004; Pediani *et al.*, 2005). Finally, the intracellularly located  $\alpha_{1D}$  subtype (McCune *et al.*, 2000; Hague *et al.*, 2004) has a major affinity for the agonists (Minneman *et al.*, 1994; Marti *et al.*, 2005), does not exhibit agonist-dependent internalization (McCune *et al.*, 2000), and remains active even when the agonist is removed (Gisbert *et al.*, 2000, 2002, 2003a). Accordingly, the  $\alpha_{1D}$  subtype does not seem to be as sensitive to GRKs modulation as the  $\alpha_{1A}$  and  $\alpha_{1B}$  subtypes, and a greater increase in the GRK2 expression may be of no functional relevance in the activity of  $\alpha_{1D}$ -ARs. Thus, we must expect an increased functionality of the  $\alpha_{1D}$ -ARs in the aortas of adult SHR, even when the GRK2 expression increases. By considering that  $\alpha_{1D}$  directly regulates blood pressure via vasoconstriction (Tanoue *et al.*, 2002a, 2002b; Lyssand *et al.*, 2008), the higher functionality of this subtype in hypertensive arteries could determine an increase in the mean arterial pressure observed in adult SHR.

The results of this study and our previous observations in both aortas and main mesenteric and small mesenteric arteries (Gisbert *et al.*, 2002) confirm this proposal. The higher potency, exhibited only by the  $\alpha_{1D}$  selective antagonist BMY 7378 and not by the selective  $\alpha_{1A}$  antagonist 5-methylurapidil, indicates an increased role of the  $\alpha_{1D}$  subtype in the sympathetic vasoconstriction of the aortas of SHR. There were two hemodynamic consequences of the higher functionality of  $\alpha_{1D}$ -ARs: 1) a higher potency of phenylephrine in hypertensive aortas given the higher affinity of this subtype for agonists (Minneman *et al.*, 1994; Marti *et al.*, 2005), when the hypertensive vessels are more sensitive to the contractile adrenergic stimulus; 2) a slower decay of the contractile response after removing the agonist given the characteristic of  $\alpha_{1D}$ -AR remaining active when the stimulus disappears, as the present results confirm and our previous studies have described in the aorta, main mesenteric artery and small mesenteric arteries (Gisbert *et al.*, 2002, 2003a; Ziani *et al.*, 2002). Therefore, the consequences of an increased functionality of  $\alpha_{1D}$ -ARs,

which is greater sensitivity to an  $\alpha_1$ -adrenergic stimulus, together with a significantly slower decay in the contractile tone after stimulus removal, could determine the pathological increase in the adrenergic vascular tone observed in hypertension. This is especially relevant if we consider that, a similar increase in the functional role of  $\alpha_{1D}$ -ARs, as reported in aortas, was previously seen by our group in the small mesenteric arteries from SHR, and that this increase was prevented by captopril treatment (Gisbert *et al.*, 2002).

In short, our results clearly show that an increased  $\beta_1$ -AR expression precedes the hypertensive state, whereas an increased expression of  $\alpha_{1A}$ -,  $\alpha_{1B}$ -,  $\alpha_{1D}$ -,  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -, and  $\beta_3$ -adrenoceptors, accompanied by an increased GRK2 expression, occurs in aortas when the hypertensive state appears. A higher GRK2 expression impairs the vasodilator mechanisms mediated by  $\beta_1$  and  $\beta_2$ , and counteracts the vasoconstrictor mechanisms mediated by  $\alpha_{1A}$  and  $\alpha_{1B}$ . However, it does not affect the vasodilator response mediated by  $\beta_3$ -ARs or the vasoconstrictor response mediated by  $\alpha_{1D}$ -ARs, the main two subtypes in rat aortas. Therefore, the functional role of these subtypes is more evident. Because  $\beta_3$ -ARs are less sensitive, and  $\alpha_{1D}$ -ARs are more sensitive to the adrenergic stimulus, the hemodynamic consequences of these changes are 2-fold: 1) an imbalance between sensitivity to the vasoconstrictor (increased) and vasodilator (decreased) adrenergic stimuli in vessels of hypertensive animals; and 2) the slower kinetics of the disappearance of the contractile response when the adrenergic stimulus disappears because of the major role of  $\alpha_{1D}$ -ARs. These changes may be involved in the greater sympathetic vasoconstrictor tone that is characteristic of hypertension. Moreover, they may add new perspectives to its therapeutic management, suggesting that non-subtype-selective  $\alpha_1$ -AR antagonists or selective  $\beta_1$  and  $\beta_1/\beta_2$  antagonists might not prove to be the best therapeutic options.

In order to determine whether these changes are a result of the hypertensive state or, conversely, are involved in the genesis of hypertension, we analyzed the same parameters in another animal hypertension model: rats undergoing chronic L-NAME treatment to promote the endothelial dysfunction and, consequently, hypertension.

We observed no differences in the hemodynamic constants between genetic (SHR) and LNHR animals, thus corroborating the same hypertensive state in both strains. However, the changes in the expression and functional role of ARs and GRK2 differed in both hypertension models despite the hemodynamic constants being equal. The aortas of the LNHR animals exhibited a lower expression of  $\alpha_{1A}$ -AR and GRK2 at both the mRNA and protein levels vs. Wistar rats. This was accompanied by a

higher protein expression of  $\beta_2$ -AR, despite a down-regulation of the mRNA levels and a decreased  $\beta_1$ -AR protein expression, with no previous changes noted at the mRNA levels, which is probably due to post-transcriptional regulations. The functional result of these changes was a lower potency of phenylephrine and an enhanced potency of both the  $\beta$ -agonist Isoprenaline and the selective  $\beta_2$ -agonist Salbutamol, which could be explained by two mechanisms: the increased  $\beta_2$  protein expression together with the decreased GRK2 protein expression, which are probably accompanied by the corresponding changes in their activity.

On the other hand, GRK2 has been recently related to eNOS inhibition (Liu *et al.*, 2005). Our results suggest a direct relationship between both enzymes as a drop in GRK2 could lead to a compensatory mechanism against decreased NO-production. The higher  $\beta$ -adrenergic response, plus a lower potency of the vasoconstrictor stimulus mediated by  $\alpha_1$ -ARs, could also be established as a compensatory mechanism against the lack of NO-mediated vasodilatation. So, different changes in the expression and function of ARs and GRK2 were observed in LNHR and SHR, suggesting that both the increase in  $\alpha_1$ -adrenergic vasoconstriction and the impairment in  $\beta$ -AR-mediated vasodilatation observed only in the SHR animals could be part of the cause, but not the consequence, of the hypertensive state.

## 4.2 CHANGES OBSERVED IN THE HEARTS AND KIDNEYS OF HYPERTENSIVE RATS

When analyzing the changes in the expression of ARs and GRKs in hearts and kidneys, we found that these changes were specific of each tissue. In the hearts and kidneys of prehypertensive SHR rats, we noted a significant decrease in the expression of  $\alpha_{1D}$ -AR that remained down-regulated once hypertension appeared at the age of 16 weeks. This change could be involved in the genesis and maintenance of this disease.

If we consider the implication of the  $\alpha_{1D}$  subtype in the regulation of coronary artery contraction (Chalothorn *et al.*, 2003; Jensen *et al.*, 2009a), its down-regulation observed in hearts could be interpreted as a protective mechanism to improve heart irrigation. According to previous publications, no further significant changes in the expression of ARs or GRK2 were observed in the hearts of the SHR animals (Takata and Kato, 1996).

However in the kidneys of prehypertensive rats, apart from the decreased expression of the  $\alpha_{1D}$  subtype, we also noted a decrease in the  $\alpha_{1A}$ -AR expression together with a significant increase of  $\alpha_{1B}$ -AR. An increase in renal  $\alpha_{1B}$  functionality at this previous stage has been mentioned by some authors as one of the mechanisms involved in the genesis of hypertension (Michel *et al.*, 1989a, 1989b; Elhawary and Pang, 1994; Gesek, 1999), and its consequence could be the well-known decrease in sodium excretion due to the increase in its tubular reabsorption, which is characteristic of hypertension. On the other hand, the decrease in the minority subtypes of  $\alpha_1$ -ARs ( $\alpha_{1D}$  and  $\alpha_{1A}$ ), which are responsible for the contraction of renal arteries (Elhawary *et al.*, 1992; Villalobos-Molina *et al.*, 1997), could relate to a protective mechanism to improve renal circulation. In hypertensive kidneys, we found increased levels of mRNA for  $\alpha_{1B}$ -AR, unlike those authors who describe the recovery of the normal functions for this subtype once hypertension is established when  $\alpha_2$ -AR is responsible at this stage (Gesek, 1999). According to the literature, no significant changes have been found in the  $\beta$ -ARs and GRKs of kidneys of adult SHR rats (Michel *et al.*, 1993; Takata and Kato, 1996).

*Are these changes reproduced in the induced model of hypertension?* In the left ventricles obtained from LNHR rats, we observed the same decrease in the expression of  $\alpha_{1D}$  subtype, thus corroborating our previous hypothesis that the possible role of this change could lead to an improvement of heart irrigation (Chalothorn *et al.*, 2003; Jensen *et al.*, 2009a). The other significant changes found were increases in the expression levels of  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -ARs and GRK2, which have not been described before, and may relate to cardiac hypertrophy (Bohm *et al.*, 1992; Castellano *et al.*, 1993; Morisco *et al.*, 2001; Eckhart *et al.*, 2002; Xiao *et al.*, 2004, 2006).

Some authors describe how cardiac hypertrophy could be brought about by an up-regulation of plasmatic renin (Arnal *et al.*, 1993), especially in this model of hypertension where recovery of the NO levels did not restore the normal values, and in which the regression of this cardiac hypertrophy was observed after treatment with ACEIs (Ribeiro *et al.*, 1992; Pechanova *et al.*, 1997; Takemoto *et al.*, 1997; Bernatova *et al.*, 1999, 2000). Following this hypothesis, we saw increased mRNA levels of  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -ARs and GRK2 in the kidneys of LNHR. If we consider the implication of  $\beta$ -ARs in renin secretion (Kim *et al.*, 2007), this up-regulation could relate to the increased renin secretion in hypertension (Zanchi *et al.*, 1993), which could be partially responsible for high arterial blood pressure and cardiac hypertrophy. The increased renal GRK2 expression observed could relate to an increase taking place in the tubular sodium reabsorption process which, accompanied by the increase in renal  $\alpha_{1B}$  expression observed in this hypertension model, could be

responsible for the lower filtration rate observed in LNHR (Ribeiro *et al.*, 1992; Baylis *et al.*, 1992; Dinudom *et al.*, 2004), thus providing more evidence of this AR subtype's role in the genesis of essential hypertension.

### 4.3 CHANGES OBSERVED IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES

After having analyzed the changes in the expression and functionality of the ARs and GRKs in the aortas, hearts and kidneys of two animal hypertension models, our next objective was to extrapolate these results to human hypertension. To analyze the changes in the expression of the ARs and GRKs in hypertensive patients, we need a non invasive technique to obtain easy samples. For this purpose, we selected peripheral lymphocytes since previous studies have proposed that this model mirrors changes in other organs such as hearts and vessels (Michel *et al.*, 1986; Feldman, 1987; Brodde *et al.*, 1989; Ricci *et al.*, 1999; Gros *et al.*, 1997; 2000; Tayebati *et al.*, 2000; Veglio *et al.*, 2001; Dzimiri *et al.*, 2002; Oyama *et al.*, 2005; Hata *et al.*, 2006; Cohn *et al.*, 2009). Then, we perform our analysis in lymphocytes from both adult SHR and normotensive/hypertensive patients.

In the lymphocytes of the SHR rats, we saw a decrease in the  $\beta_1$ -AR expression. Our results do not agree with previous works studying  $\beta$ -AR density in human lymphocytes (Brodde *et al.*, 1985b; Parfyonova *et al.*, 1988; Bono *et al.*, 1995), but this is the first time that a similar analysis has been performed in the lymphocytes of SHR rats. In addition, other authors found impaired  $\beta$ -adrenergic activity relating to an increase in the protein expression and overactivity of GRK2 in both SHR (Gros *et al.*, 2000) and human lymphocytes (Gros *et al.*, 1999), without changes in the mRNA levels for this kinase. Our results agree with this scenario, and did not show changes in the mRNA levels of GRK2, GRK3 and GRK5 in the lymphocytes of SHR rats. The functional role of lymphocytic  $\beta$ -ARs and its relationship with proper cell activity in hypertension remains unclear and future works are needed to clarify it.

Our results show that changes in lymphocytes do not reflect similar changes in vessels, hearts or kidneys, but they represent the changes relating to the characteristic activity of this cell type. Our results do not support there being a correlation between the lymphocyte and heart expressions of ARs and GRKs, as previous works have suggested (Brodde *et al.*, 1986; Gros *et al.*, 2000; Dzimiri *et al.*, 2002; Oyama *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2007). To explain this apparent contradiction, we must consider that the variations in plasmatic catecholamines could be a factor which influences the results because an increase in circulating catecholamines occurs, which

could lead to an increase in the modulatory mechanisms, for instance, an increase in either the expression or activity of GRKs to counteract higher adrenergic activation. In this case, it could be possible to find a generalized increase in the expression and activity of GRKs which is similar in lymphocytes and vessels, hearts or kidneys. If this were to occur, we could then consider lymphocytes as biomarkers for these tissues (Attramadal, 2009). In other situations, a determined pathological state could trigger a sporadic change in a tissue or organ which is not necessarily reflected in lymphocyte. We thought this had taken place in 16-week-old SHR rats in which we found specific changes in the expression of ARS and GRK2 in vessels, hearts or kidneys which were not reflected in lymphocytes.

*What changes in the lymphocytic expression levels were observed in human hypertension?* We observed increased mRNA levels of  $\beta_1$ -AR which were slight in the lymphocytes of patients with isolated office hypertension and became statistically significant in the lymphocytes of hypertensive patients. Interestingly, this increase was attenuated in those hypertensive patients treated with ACEIs or ARBs, suggesting that the inhibition of the renin-angiotensin system directly or indirectly adjusts the  $\beta_1$ -AR expression.

The lack of a significant change in the mRNA levels of  $\beta_2$ -AR contrasts with previous reports of an increased density of this subtype in the lymphocytes of hypertensive patients (Brodde *et al.*, 1985; Parfyonova *et al.*, 1988; Bono *et al.*, 1995). This apparent discrepancy could be attributed to the fact that the authors assumed that  $\beta_2$ -AR is the only subtype present in lymphocytes, and they used a non-subtype-selective radioligand to quantify the receptors. Nonetheless, our results indicate that this increase would correspond to  $\beta_1$ -AR as we performed a differentiation between each subtype.

Increase mRNA levels of  $\alpha_{1B}$ -AR in the lymphocytes of hypertensive patients was observed, and this result relates with changes previously described in the kidneys of prehypertensive rats. In this case, the lymphocyte expression levels could mirror changes in kidneys, thus corroborating previous hypotheses put forward by our group and by other authors about this subtype's role in the genesis of hypertension (Michel *et al.*, 1989a, 1989b; Gesek, 1999).

On the other hand, an increased GRK2 protein expression in lymphocytes, which is not related to increased steady-state levels of mRNA, has been found in human hypertension models (Gros *et al.*, 1999). Our results confirm this finding since no significant changes in the GRK2 mRNA levels were observed in the lymphocytes of the

hypertensive patients. No change, or a weak but insignificant decrease in the mRNA levels of GRK3 and a non significant increase in the mRNA levels of GRK5 at the most, were observed in this group of patients. Given that the subjects of our study had high normal to moderate essential hypertension, further studies are required to analyze whether or not these slight changes are more pronounced in patients with severe hypertension.

As mentioned before, the  $\alpha_1$ - and  $\beta$ -AR mRNA levels in lymphocytes under certain circumstances could reflect levels in hearts and vessels by using peripheral blood lymphocytes as a biomarker (Brodde *et al.*, 1986; Ricci *et al.*, 1999; Tayebati *et al.*, 2000; Dzimiri *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2007). If this were the case, the clinical variables that are characteristic of the hypertensive state and dependent on the AR expression in hearts and vessels may relate to the mRNA levels observed in the lymphocytes of our study population. Based on this assumption, we assessed a possible correlation between ARs and the clinical variables determined in each patient (see Table XVIII on page 155). Our patients' characteristics enabled us to perform this evaluation since they were all relatively young, exhibited normal values for the biochemical parameters determined and did not suffer any concomitant pathology, all of which helped rule out confounding factors.

An important aspect to consider when comparing the expression levels of ARs or GRKs and clinical variables is the difference in the incidence of hypertension in terms of age and gender (see Image 13, page 195). For this purpose, we analyzed correlations in a gender-dependent manner whenever possible.

First of all, we found a positive correlation between the mRNA levels of  $\alpha_{1B}$ -AR and systolic blood pressure that was significant in men but not in women. This relationship corroborates the previous hypothesis proposed in the present work and suggested by other authors (Michel *et al.*, 1989a, 1989b; Gesek, 1999), that of the important role of this subtype in hypertension. The expression levels of the  $\alpha_{1B}$  subtype increased in not only the kidneys of the hypertensive rats, but also in the lymphocytes of the hypertensive patients who were relatively young and classified as low-moderate hypertension. Therefore, the hypertensive state could be comparable to prehypertensive rats. These rats were male, so future works need to clarify a possible gender dependency on this correlation.

The other major finding of our analysis is that the expression levels of  $\beta_2$ -AR, which were slightly lower among the hypertensive patients, significantly and inversely correlated with the diurnal diastolic blood pressure values (and

consequently with 24 h diastolic blood pressure – not shown). This correlation was significant only when the total population was analyzed, but not when performing a gender-dependent analysis. This suggests the direct participation of this subtype in diastolic blood pressure regulation and, conversely, that changes in the  $\beta_2$ -AR expression are a result of altered diastolic blood pressure. If we consider that  $\beta$ -adrenergic vasodilatation (mainly mediated by the  $\beta_2$  subtype) is a key mechanism of the modulation of vascular resistance (Feldman, 1990; Brodde *et al.*, 2006; Penela *et al.*, 2006), the most feasible interpretation of this correlation is that a higher expression of  $\beta_2$ -AR in vessels (mirrored in lymphocytes) facilitates vasodilatory mechanisms, thereby decreasing vascular resistance and lowering diastolic blood pressure values. Furthermore, our results could relate to a previous study which described how high diastolic blood pressure was associated with the  $\beta_2$  haplotypes containing the pro-down-regulatory Gln27 variant (Binder *et al.*, 2006). Future work could determine a correlation between the presence of the Gln27 variant, a lower expression of the  $\beta_2$ -ARs, and higher diastolic blood pressure values.

No significant correlation was found between the  $\beta_1$ -AR expression and ambulatory blood pressure values, thereby excluding a direct role for this receptor in blood pressure modulation. However, a correlation appeared when comparing the mRNA levels of  $\beta_1$ -AR and diurnal heart rate values (the function regulated by this AR in the heart), which was significant in a gender-dependent manner; it was positive for women, but not for men. In this case, it seems that the lymphocytic  $\beta_1$  expression reflects what happens in the heart, as previous authors have proposed (Brodde *et al.*, 1986). In women, this positive correlation could be explained by the influence of estrogens, whose cardioprotective action diminishes the  $\beta_1$ -AR expression in the heart (Kam *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2008) and improves the  $\beta_2$  AR expression (Wu *et al.*, 2008). We propose that, in women, estrogens modulate the  $\beta_1$ -AR expression levels in not only the heart, but in peripheral lymphocytes and other tissues, and are responsible for a significant correlation between the lymphocytic expression levels of this AR and the clinical variable relating to its functional role in the heart. Future works should be performed to confirm this proposal.

However, another major finding of our analysis is the positive relationship between the  $\beta_1$ -AR expression in lymphocytes and urinary albumin excretion (log UAE) in the group of microalbuminuric patients. Given the low number of patients with this characteristic, it was impossible to perform an analysis in a gender-dependent manner. Elevated UAE depends on the control of the hemodynamic and metabolic factors (Redon *et al.*, 2002), and is associated with the development of hypertension (Wang *et al.*, 2005) and cardiovascular risk (Schmieder *et al.*, 2007) as it

is closely related with endothelial damage (Deckert *et al.*, 1989; Perticone *et al.*, 2007), greater arterial stiffness (Hermans *et al.*, 2007), maladaptive vascular remodeling (Hermans *et al.*, 2008) and impaired aortic elasticity (Duman *et al.*, 2008). However, the exact mechanisms underlying the link between microalbuminuria and cardiovascular risk have not been fully defined. If we assume that the  $\beta_1$ -AR expression in circulating lymphocytes mirrors that in organs and/or vessels (Brodde *et al.*, 1985; 1986; Parfyonova *et al.*, 1988; Bono *et al.*, 1995), our present finding is highly relevant. Given the positive correlation of the  $\beta_1$ -AR expression with UAE, an increase in the  $\beta_1$ -AR levels in human vessels and/or kidneys could be related to subclinical vascular damage and kidney function alterations. Our observation that ACEIs and ARBs tend to normalize the increased  $\beta_1$ -AR expression in lymphocytes agrees with previous results, indicating that ACEIs decreases the expression of adrenoceptors  $\alpha_{1D}$  in spontaneously hypertensive rats (Gisbert *et al.*, 2002; Godinez-Hernandez *et al.*, 2006), and may explain clinical evidence that the renin-angiotensin system blockade reduces albuminuria and that combined treatment with  $\beta$ -blockers causes an additional reduction of UAE (Bakris *et al.*, 2005). It still remains to be determined whether this change in lymphocytes reflects the changes relating to other organs or tissues, or whether it is due to an immune response or lymphocyte differentiation during the inflammatory response which accompanies microalbuminuria.

Although significant changes in the expression levels of GRKs were not observed in hypertensive patients, our study reveals that the lymphocyte expression of GRK3 significantly and inversely correlates with systolic and diastolic ambulatory blood pressure values, indicating that this kinase is involved in the regulation of human blood pressure. The opposite – namely, that the GRK expression is modulated by blood pressure – has not been supported by previous findings in transgenic mice in which cardiac-restricted inhibition of endogenous GRK3 resulted in a phenotype with elevated systolic and diastolic blood pressure and without heart rate alterations, these being parameters that were determined by different methods in conscious and unrestrained mice (Vinge *et al.*, 2008).

If we assume that changes in the GRK3 expression in lymphocytes reflect changes in the heart and/or vessels, as previously demonstrated for GRK2 and GRK5 (Gros *et al.*, 2000; Iaccarino *et al.*, 2005; Oyama *et al.*, 2005), then this is the first report of a pathophysiological role of GRK3 in the human cardiovascular system, and could contribute to a better understanding of the position of the GRK3 gene in a locus on a chromosome associated with left ventricular mass and contractility (Arnett *et al.*, 2001). The exact significance of our findings must be confirmed by further

experiments to determine the G-protein-coupled receptor modulated by GRK3, and to directly implicate it in the regulation of blood pressure. Based on evidence that changes in the GRK3 expression do not alter the biochemical signaling and functional role of myocardial  $\beta$ -ARs, but the responses mediated by  $\alpha_{1B}$ -AR are profoundly altered when the GRK3 expression is modified (Iaccarino *et al.*, 1998; Eckhart *et al.*, 2000; Vinge *et al.*, 2007; 2008), future experiments may reveal a role of GRK3 in controlling blood pressure by acting on  $\alpha_{1B}$ -AR or on another G-protein coupled receptor.

On the other hand, we also found a significant correlation between the expression levels of ARs and other biochemical variables, which determines the patient's state. A significant correlation appeared between the mRNA levels of  $\alpha_{1B}$ -AR and plasmatic homocystein, a variable closely related to the low filtration rate (renal impairment) (Potter *et al.*, 2008) and peripheral vascular disease risk, but which could also be considered an independent risk factor for vascular disease (Hankey and Eikelboom, 1999; Suárez García *et al.*, 2001). This relationship –that of increased levels of  $\alpha_{1B}$ -AR accompanied by increased levels of plasmatic homocysteine– corroborates our previous hypothesis about the role of the  $\alpha_{1B}$  subtype in the genesis of hypertension, and reveals the clear importance of the plasmatic homocystein as a cardiovascular and renal risk factor.

Although significant changes in the expression levels of  $\alpha_{1D}$ -AR were not observed in the hypertensive patients, we saw a significant correlation when comparing the mRNA levels of this subtype and plasmatic aldosterone, the final product of the renin-angiotensin system. Previous studies on the possible crossregulation between both the adrenergic and renin-angiotensin systems have suggested that angiotensin II could regulate the vascular smooth muscle expression of  $\alpha_1$ -ARs (Hu *et al.*, 1995). Moreover, the results obtained in our laboratory (Gisbert *et al.*, 2002) and those of other groups (Godínez-Hernández *et al.*, 2005) corroborate a lower expression and functionality of  $\alpha_{1D}$ -AR in SHR rat aortas after captopril treatment, indicating that inhibition of Angiotensin II synthesis and, consequently, lower aldosterone levels, lead to a drop in the  $\alpha_{1D}$  subtype expression. Along these lines, the results of this work provide new information as we found that the higher the plasmatic aldosterone levels, the higher the  $\alpha_{1D}$  expression. However, we are presently unable to rule out the opposite relationship. Future works should clarify the physiological or pathological meaning of this crossregulation close to the genesis and maintenance of hypertension.

## 5 CHANGES IN THE EXPRESSION AND FUNCTIONALITY OF ARS AND GRKS IN HEART FAILURE

### 5.1 PATIENTS WITH A FAILING HEART

We found a very marked increase in the expression of  $\beta_1$ -AR, accompanied by an increase in the expression of GRK5 and a drop in GRK2 in the lymphocytes obtained from those patients with advanced heart failure. These results disagree with the literature as a previous paper describes a decreased  $\beta_1$ -AR expression (Yu *et al.*, 2007). Nonetheless, the different methodologies employed could be behind the differences in results. Therefore, the increased lymphocytic  $\beta_1$  mRNA expression observed does not reflect heart failure where a lower  $\beta_1$ -AR expression was found, as described by others (Engelhardt *et al.*, 1996; Leineweber *et al.*, 2005) and our own group (Montó *et al.*, 2009). This down-regulation seems to be a protective mechanism to avoid the deleterious effects of a continuous stimulation of cardiac  $\beta_1$ -AR (Xiao *et al.*, 1995, 2004, 2006; Daaka *et al.*, 1997), thus it could be a matter of a specific change taking place in the heart, but not in other organs or tissues. In this case, the increased expression of lymphocytic  $\beta_1$ -AR could be a proper mechanism of this cell type because of an immune response, or it may reflect changes in other organs such as kidneys or vessels, as previously mentioned in hypertensive patients.

The decrease in the genetic expression levels of GRK2 also contradicts the previous results found by other authors who discovered an increase in both lymphocytic protein expression and activity reflecting changes in failing hearts (Iaccarino *et al.*, 2005; Hata *et al.*, 2006). In this sense, we thought that:

- Increases in the mRNA expression levels are not necessarily accompanied by the same increase in protein expression, as we previously showed in the animal induced hypertension model.
- The increase noted by other authors in the GRK2 expression seems to depend on the heart failure stage, and decreases when those patients classified as stage IV according to the NYHA classification (Leineweber *et al.*, 2005; Brodde *et al.*, 2006); that is, the stage at which our patients were classified.
- The increased GRK activity found by other authors could also be due to an increase in GRK5 activity because these authors did not differentiate between the isoforms of GRKs (Iaccarino *et al.*, 2005).

According to these alleged thoughts, other authors described that the increase in the GRK2 expression in hearts in animal models appeared in initial stages, coinciding with myocardial hypertrophy, and probably with preceding heart failure, whereas lower GRK2 expression levels were observed in the late stages of this disease, accompanied by an increase in the mRNA levels of GRK5 and coinciding with ventricular dysfunction and cardiac chamber dilatation (Ping *et al.*, 1997; Vinge *et al.*, 2001). No changes in the GRK3 expression were reported, according to previous results (Ungerer *et al.*, 1994; Vinge *et al.*, 2001; Brodde *et al.*, 2006).

Our results do not follow the hypothesis presented by other authors as to the use of the GRKs expression in lymphocytes as a biomarker for changes in failing hearts (Dzimiri *et al.*, 2002; Oyama *et al.*, 2005). However, we do not exclude this possibility under other circumstances. In this sense, the decreased mRNA levels of GRK2 could be due to a specific change in lymphocytes which could lead to lower GRK2 activity and, consequently, to increased leukocyte migration (Vroon *et al.*, 2004a), which could relate to the autoimmunity mechanisms described in heart failure (Yndestad *et al.*, 2003; Fildes *et al.*, 2009).

## 5.2 CARDIAC TRANSPLANTATION PATIENTS

When analyzing the expression levels of the ARs and GRKs in the human lymphocytes of those patients who had undergone cardiac transplantation, we must consider that these patients were at a terminal stage of heart failure, so their lymphocytes had undergone the changes described previously but, presently, they are developing an immune response against the transplanted heart which is controlled by immunomodulatory pharmacology. The interpretation of the results obtained in such circumstances is no easy task.

We saw an increase in  $\beta_1$ - (to a lesser extent than the increase observed in heart failure) and in the  $\beta_2$ -AR expression, accompanied by not only an increase in the GRK5 expression, but also a lower GRK2 expression, be it slightly increased if compared with those patients with heart failure. No changes in the GRK3 expression were found.  $\beta_1$  up-regulation could be due to a change in immune response, as we proposed before. In this way, the participation of the  $\beta_1$  subtype in the lymphocyte activation could explain the increase in its expression in microalbuminuric, heart failure and transplanted patients. Although clear evidence is lacking about the implication of this subtype in immune response, our published data move in this direction: we found an increased expression of the  $\beta_1$  subtype in both Jurkat cells and

activated lymphocytes (Pérez-Aso *et al.*, 2008). Conversely, however, it is well established that  $\beta_2$  subtype activation inhibits lymphocyte activation *in vitro* (García *et al.*, 2003; Hanania and Moore, 2004), and also in the chronic inflammatory process (Kohm and Sanders, 2001; Heijink *et al.*, 2004). It would be interesting to confirm the existence of opposite functions of the  $\beta_1$  and  $\beta_2$  subtypes on both the activation and differentiation of lymphocytes and, consequently, on immune response. In our patients, an increased  $\beta_2$ -AR expression could be due to the chronic administration of corticoids or immunomodulators (Baraniuk *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 2002) to lower immune response.

On the other hand, GRK2 is implicated in the regulation of chemokine receptors, and a decreased expression of this kinase in lymphocytes relates to an induction of cellular migration and, consequently, inflammatory response (Vroon *et al.*, 2004a). The results we obtained in heart failure patients show a lower expression of GRK2, which increases after cardiac transplantation, and could be due to the immunological treatment.

As the possibility of the transplanted heart being rejected lowers with time, when we analyzed the changes in the ARs and GRKs expressions in lymphocytes in relation to time after transplantation, we found a gradual increase in the expression of both lymphocytic  $\beta_2$ -AR and GRK2. According to other authors, lymphocytic  $\beta_2$  expression levels could reflect changes in the heart (Michel *et al.*, 1986; Brodde *et al.*, 1989). However in a recent work (Agüero *et al.*, 2009), we found no correlation between the expression levels of lymphocytes and heart biopsies of the same patient. Thus, the changes observed in terms of time could be due to the post-transplant immunomodulatory treatment if we consider that the progressively increasing  $\beta_2$ -AR expression levels to be a mechanism that lowers lymphocytic activity and triggers the rejection of the transplanted organ.

The genetic profiling studies carried out in heart transplanted patients in recent years indicate that those changes observed in the expression of certain genes in the peripheral lymphocytes in the first few months after transplant offer a predictive value for future rejection episodes (Mehra *et al.*, 2007). Therefore, the differences in the genetic expression of  $\beta_2$ -AR and GRK2 observed previously could reflect the possibility of cellular rejection and serve as a biomarker for this adverse event. This field of research requires further study to help us increase our knowledge and to assess the clinical applicability of monitoring rejection and immunomodulatory load.

## CONCLUSIONS

- 1) We detected mRNA levels of  $\alpha_1$ - ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  and  $\alpha_{1D}$ ),  $\beta$ -ARs ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  and  $\beta_3$ ) and GRK2 in the aortas, left ventricles and kidneys of Wistar, WKY and SHR rats, with different proportions between tissues: the main subtypes in the aorta corresponded to  $\alpha_{1D}$ , which is responsible for the contraction of this artery, and to  $\beta_3$ , whose functional role still remains unclear;  $\alpha_{1B}$  and  $\beta_1$  are the main subtypes in the left ventricle, whereas  $\alpha_{1B}$ -,  $\alpha_{1D}$ - and  $\beta_1$ -ARs predominate in kidneys.
- 2) A generalized decrease in the expression and functionality of  $\alpha_{1D}$ -AR, which is responsible for the contraction of main arteries like the aorta, renal or coronary arteries, was observed in all the studied tissues during the maturation process between the 6- and the 16-week-old WKY rats. Moreover, a drop in the expression of  $\alpha_{1B}$ -AR was noted in left ventricles and kidneys, tissues in which this subtype is the main subtype. Besides, an increase of  $\alpha_{1A}$ -AR was seen in the heart, which could relate to its cardioprotector properties or to the heart's physiological growth process; the  $\beta_3$  subtype significantly decreased in both aortas and kidneys, while GRK2 only decreased in kidneys.
- 3) We detected mRNA levels for  $\beta_2$ -AR in rat lymphocytes in a higher proportion than for  $\beta_1$ , and also for the three GRKs analyzed (GRK2, GRK3 and GRK5), of which GRK2 is the main one. In the peripheral blood lymphocytes of healthy volunteers, the main subtype detected was  $\beta_2$ -AR, with a similar proportion between the different GRKs analyzed. In this case, a lower proportion of the mRNA levels for  $\alpha_{1B}$ - and  $\alpha_{1D}$ -ARs were detected.
- 4) Significant correlations between the mRNA levels of  $\beta_1$ -AR and GRK5, and between  $\beta_2$ -AR and GRKs 2 and 3, were found in human lymphocytes, suggesting the existence of a unique regulating mechanism, as well as the specificity or preference of GRKs for each AR.
- 5) In the pre-hypertensive SHR rats, we found changes which may be implicated in the origin of the disease: an increase in the expression and functionality of both  $\beta_1$ -AR in the aorta and  $\alpha_{1B}$ -AR in the kidney, accompanied by a drop in the expression of not only the  $\alpha_{1D}$  subtype in both the heart and kidney, but also the  $\alpha_{1A}$  subtype in the

kidney. Prehypertensive rat kidneys exhibited more marked changes in this previous stage of disease, which could relate to the genesis of hypertension.

- 6) In the hypertensive SHR rats, there is not a general mechanism, but there are specific changes depending on the tissue. In the rat aorta, an increase in the expression of all the ARs and the GRK2 was observed with a resulting consequence: an increase in the functionality of the  $\alpha_{1D}$  subtype accompanied by an impairment of  $\beta$ -adrenergic vasodilatation. The changes noted in left ventricles and kidneys were similar to those observed in the prehypertensive rats. The fact that the results obtained are not reproduced in the rat hypertensive model by chronic L-NAME treatment indicates that these observed changes are not the result of the hypertensive state, and could be implied in the genesis and maintenance of the essential hypertension.
- 7) No gender-dependent changes in the expression of ARs and GRKs in human lymphocytes were observed. Otherwise, the  $\alpha_{1B}$  and  $\beta_1$  subtypes increased in the lymphocytes obtained from the hypertensive patients. The increase noted in  $\beta_1$  recovered after treatment with ACEIs or ARBs.
- 8) The fact that there were correlations between the mRNA levels of ARs and GRKs in human lymphocytes and the clinical variables of the hypertensive patients suggests that the expression of these genes could reflect their expression in another tissue in relation to the specific function that this clinical variable represents. In human hypertension, we observed significant correlations between: the expression levels of  $\beta_1$ -AR and body mass index (inverse correlation), heart rate (only in women) or urinary albumin excretion; the expression levels of  $\beta_2$ -AR and diastolic blood pressure (inverse correlation); the expression levels of  $\alpha_{1B}$ -AR and systolic blood pressure (only in men) or plasmatic homocystein; the expression levels of the  $\alpha_{1D}$  subtype and plasmatic aldosterone; the expression levels of GRK3 and both the systolic and diastolic blood pressure values (inverse correlation).
- 9) An increase was observed in the mRNA levels of  $\beta_1$ -AR and GRK5, accompanied by a lowering GRK2 expression in human lymphocytes obtained from the heart failure patients. These results do not agree with the data observed for failing hearts, so we cannot consider that lymphocytes reflect the changes occurring in other organs, especially in the heart, as other authors have previously proposed. The changes noted seem to relate to the modulator mechanism of lymphocyte activity.

- 10) After cardiac transplantation, an increased expression of  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -ARs was observed, which apparently depends on the immune response and the immunosuppressor treatment, and does not reflect the changes occurring in the heart. We also observed an increase in the GRK5 expression and a decrease in GRK2. Significant correlations were seen between the expression levels of  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -ARs, and GRK2 with the time that had passed after transplantation.

## ABSTRACT

In this thesis, we analyzed differences in the expressions of  $\alpha_1$ - and  $\beta$ -ARs and the kinases regulating their activity (GRK2, GRK3 and GRK5) in human lymphocytes obtained from hypertensive, heart failure or cardiac transplanted patients. We correlated mRNA levels with the characteristic clinical variables of each disease and cardiovascular risk from the gender perspective. Moreover, we use two animal hypertension models, one of a genetic origin (spontaneously hypertensive rats; SHR), and one induced by the chronic inhibition of NO production (LNHR) to analyze whether there were any changes in the expression and functionality of ARs and GRKs in different tissues (heart, vessels, kidney or lymphocytes) to elucidate the degree of implication of each AR or GRK in the genesis and/or maintenance of hypertension. The following results stand out:

- No inter-gender differences in the expression levels of ARs and GRKs in human lymphocytes were found. The mRNA levels of both the  $\alpha_{1B}$  and  $\beta_1$  subtypes increased in the lymphocytes of our hypertensive patients, which significantly correlate with arterial blood pressure and urinary albumin excretion, respectively. These results suggest that these changes could relate to the general mechanisms implicated in hypertension.
- The lymphocytes obtained from the heart failure and cardiac transplanted patients do not reflect the changes taking place in other tissues, especially in the heart, then these changes represent a modulatory mechanism probably relateds to lymphocyte activity in the immunological response, or may result from the immunomodulatory treatment that transplanted patients receive.
- Changes were noted in the expression and functionality of aortic  $\beta_1$ -, cardiac  $\alpha_{1D}$ - and renal  $\alpha_{1B}$ -AR in SHR prior to the hypertensive state, which may be related to the origin of this disease,. In the hypertensive rat aortas from SHR, but not from LNHR, we report an increase in the expression of all six ARs and GRK2 which, in turn, leads to an increase in the functional role of the  $\alpha_{1D}$  subtype accompanied by impaired  $\beta$ -adrenergic vasodilation, which could be implicated in the genesis and maintenance of essential hypertension.



# BIBLIOGRAFÍA

---



## BIBLIOGRAFÍA

Aarons RD, Nies AS, Gal J, Hegstrand LR, and Molinoff PB (1980) Elevation of beta-adrenergic receptor density in human lymphocytes after propranolol administration. *J.Clin.Invest* **65**:949-957.

Aarons RD and Molinoff PB (1982) Changes in the density of beta adrenergic receptors in rat lymphocytes, heart and lung after chronic treatment with propranolol. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **221**:439-443.

Abraham G, Kottke C, Dhein S, and Ungemach FR (2003) Pharmacological and biochemical characterization of the beta-adrenergic signal transduction pathway in different segments of the respiratory tract. *Biochem.Pharmacol.* **66**:1067-1081.

Abrass IB, Davis JL, and Scarpace PJ (1982) Isoproterenol responsiveness and myocardial beta-adrenergic receptors in young and old rats. *J.Gerontol.* **37**:156-160.

Ahlquist RP (1948) A study of the adrenotropic receptors. *Am.J.Physiol* **153**:586-600.

Aleixandre A, Lopez-Miranda V, and Ortega A (2001) Alpha-vascular responses after short-term and long-term inhibition of nitric oxide synthesis. *J.Cardiovasc.Pharmacol* **37**:133-142.

ALLHAT (2000) Major cardiovascular events in hypertensive patients randomized to doxazosin vs chlorthalidone: the antihypertensive and lipid-lowering treatment to prevent heart attack trial (ALLHAT). ALLHAT Collaborative Research Group. *JAMA* **283**:1967-1975.

Almenar-Bonet L (2008) [Spanish Heart Transplantation Registry. 19th Official Report of the Spanish Society of Cardiology Working Group on Heart Failure, Heart Transplantation and Associated Therapies (1984-2007)]. *Rev.Esp.Cardiol.* **61**:1178-1190.

Anderson KM, Eckhart AD, Willette RN, and Koch WJ (1999) The myocardial beta-adrenergic system in spontaneously hypertensive heart failure (SHHF) rats. *Hypertension* **33**:402-407.

Anthony A, Schepelmann S, Guillaume JL, Strosberg AD, Dhillon AP, Pounder RE, and Wakefield AJ (1998) Localization of the beta(beta)3-adrenoceptor in the human gastrointestinal tract: an immunohistochemical study. *Aliment.Pharmacol.Ther.* **12**:519-525.

Arch JR, Ainsworth AT, Cawthorne MA, Piercy V, Sennitt MV, Thody VE, Wilson C, and Wilson S (1984) Atypical beta-adrenoceptor on brown adipocytes as target for anti-obesity drugs. *Nature* **309**:163-165.

Arendshorst WJ and Beierwaltes WH (1979) Renal tubular reabsorption in spontaneously hypertensive rats. *Am.J.Physiol* **237**:F38-F47.

Ariens EJ (1954) Affinity and intrinsic activity in the theory of competitive inhibition. I. Problems and theory. *Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.* **99**:32-49.

Arnal JF, el Amrani AI, Chatellier G, Menard J, and Michel JB (1993) Cardiac weight in hypertension induced by nitric oxide synthase blockade. *Hypertension* **22**:380-387.

Arnett DK, Devereux RB, Kitzman D, Oberman A, Hopkins P, Atwood L, Dewan A, and Rao DC (2001) Linkage of left ventricular contractility to chromosome 11 in humans: The HyperGEN Study. *Hypertension* **38**:767-772.

Asano M, Masuzawa K, and Matsuda T (1988) Evidence for reduced beta-adrenoceptor coupling to adenylate cyclase in femoral arteries from spontaneously hypertensive rats. *Br.J.Pharmacol* **94**:73-86.

Asano M, Masuzawa K, Matsuda T, and Asano T (1991) Decreased responsiveness to beta-adrenoceptor agonists in arterial strips from spontaneously hypertensive rats is not associated with alterations in beta-adrenoceptors. *J.Hypertens.* **9**:607-613.

Attramadal H (2009) Hypertension: Are we beta-ARKing up the right tree? *Hypertension* **54**:27-28.

Bakris GL, Fonseca V, Katholi RE, McGill JB, Messerli F, Phillips RA, Raskin P, Wright JT, Jr., Waterhouse B, Lukas MA, Anderson KM, and Bell DS (2005) Differential effects of beta-blockers on albuminuria in patients with type 2 diabetes. *Hypertension* **46**:1309-1315.

Baloglu E, Kiziltepe O, and Gurdal H (2007) The role of Gi proteins in reduced vasorelaxation response to beta-adrenoceptor agonists in rat aorta during maturation. *Eur.J.Pharmacol* **564**:167-173.

Bank N, Aynedjian HS, and Khan GA (1994) Mechanism of vasoconstriction induced by chronic inhibition of nitric oxide in rats. *Hypertension* **24**:322-328.

Barbe P, Stich V, Galitzky J, Kunesova M, Hainer V, Lafontan M, and Berlan M (1997) In vivo increase in beta-adrenergic lipolytic response in subcutaneous adipose tissue of obese subjects submitted to a hypocaloric diet. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **82**:63-69.

Baylis C, Mitruka B, and Deng A (1992) Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J.Clin.Invest* **90**:278-281.

Begonha R, Moura D, and Guimaraes S (1995) Vascular beta-adrenoceptor-mediated relaxation and the tone of the tissue in canine arteries. *J.Pharm.Pharmacol.* **47**:510-513.

Beierwaltes WH, Arendshorst WJ, and Klemmer PJ (1982) Electrolyte and water balance in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **4**:908-915.

Bengtsson T, Cannon B, and 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 Pt 3**:643-651.

Benovic JL, Strasser RH, Caron MG, and Lefkowitz RJ (1986) Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **83**:2797-2801.

Benovic JL, Kuhn H, Weyand I, Codina J, Caron MG, and Lefkowitz RJ (1987) Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **84**:8879-8882.

Benovic JL, Mayor F, Jr., Staniszewski C, Lefkowitz RJ, and Caron MG (1987) Purification and characterization of the beta-adrenergic receptor kinase. *J.Biol.Chem.* **262**:9026-9032.

Benovic JL, Onorato JJ, Arriza JL, Stone WC, Lohse M, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Caron MG, and Lefkowitz RJ (1991) Cloning, expression, and chromosomal localization of beta-adrenergic receptor kinase 2. A new member of the receptor kinase family. *J.Biol.Chem.* **266**:14939-14946.

Benovic JL (2002) Novel beta2-adrenergic receptor signaling pathways. *J.Allergy Clin.Immunol.* **110**:S229-S235.

Bernatova I, Pechanova O, and Simko F (1999) Effect of captopril in L-NAME-induced hypertension on the rat myocardium, aorta, brain and kidney. *Exp.Physiol* **84**:1095-1105.

Bernatova I, Pechanova O, Pelouch V, and Simko F (2000) Regression of chronic L-NAME-treatment-induced left ventricular hypertrophy: effect of captopril. *J.Mol.Cell Cardiol.* **32**:177-185.

Berridge MJ (1983) Rapid accumulation of inositol trisphosphate reveals that agonists hydrolyse polyphosphoinositides instead of phosphatidylinositol. *Biochem.J.* **212**:849-858.

Berthelsen S and Pettinger WA (1977) A functional basis for classification of alpha-adrenergic receptors. *Life Sci.* **21**:595-606.

Betriu A (1996) Insuficiencia cardíaca, in *Medicina Interna* (Farreras P and Rozman C eds) pp 483-493, Mosby-Doyma libros.

Bianchi G, Fox U, Di Francesco GF, Bardi U, and Radice M (1973) The hypertensive role of the kidney in spontaneously hypertensive rats. *Clin.Sci Mol.Med.Suppl* **45 Suppl 1**:135s-9.

Binder A, Garcia E, Wallace C, Gbenga K, Ben Shlomo Y, Yarnell J, Brown P, Caulfield M, Skrabal F, Kotanko P, and Munroe P (2006) Haplotypes of the beta-2 adrenergic receptor associate with high diastolic blood pressure in the Caerphilly prospective study. *J.Hypertens.* **24**:471-477.

Blumenthal SJ, McConnaughey MM, and Iams SG (1982) Myocardial adrenergic receptors and adenylate cyclase in the developing spontaneously hypertensive rat. *Clin.Exp.Hypertens.A* **4**:883-901.

Boer PA, Morelli JM, Figueiredo JF, and Gontijo JA (2005) Early altered renal sodium handling determined by lithium clearance in spontaneously hypertensive rats (SHR): role of renal nerves. *Life Sci* **76**:1805-1815.

Bohm M, Mende U, Schmitz W, and Scholz H (1986) Increased sensitivity to alpha-adrenoceptor stimulation but intact purinergic and muscarinergic effects in prehypertensive cardiac hypertrophy of spontaneously hypertensive rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol* **333**:284-289.

Bohm M, Beuckelmann D, Diet F, Feiler G, Lohse MJ, and Erdmann E (1988) Properties of cardiac alpha- and beta-adrenoceptors in spontaneously hypertensive rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol* **338**:383-391.

Bohm M, Diet F, Feiler G, Kemkes B, and Erdmann E (1988) Alpha-adrenoceptors and alpha-adrenoceptor-mediated positive inotropic effects in failing human myocardium. *J.Cardiovasc.Pharmacol* **12**:357-364.

Bohm M, Gierschik P, Knorr A, Larisch K, Weismann K, and Erdmann E (1992) Desensitization of adenylate cyclase and increase of Gi alpha in cardiac hypertrophy due to acquired hypertension. *Hypertension* **20**:103-112.

Bond RA and Clarke DE (1988) Agonist and antagonist characterization of a putative adrenoceptor with distinct pharmacological properties from the alpha- and beta-subtypes. *Br.J.Pharmacol.* **95**:723-734.

Bono M, Cases A, Calls J, Gaya J, Jimenez W, Carretero J, Rivera F, and Revert L (1995) Effect of antihypertensive treatment on the increased beta 2-adrenoceptor density in patients with essential hypertension. *Am.J.Hypertens.* **8**:487-493.

- 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.
- Borow KM, Neumann A, Arensman FW, and Yacoub MH (1989) Cardiac and peripheral vascular responses to adrenoceptor stimulation and blockade after cardiac transplantation. *J.Am.Coll.Cardiol.* **14**:1229-1238.
- Botey A and Revert L (1996) Hipertensión arterial, in *Medicina Interna* (Farreras P and Rozman C eds) pp 667-689, Mosby-Doyma libros.
- Bouvier M, Hausdorff WP, de Blasi A, O'Dowd BF, Kobilka BK, Caron MG, and Lefkowitz RJ (1988) Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature* **333**:370-373.
- Boyum A (1964) Separation of white blood cells. *Nature* **204**:793-794.
- 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.
- Braunwald E (2003) Insuficiencia Cardíaca, in *Harrison: Principios de Medicina Interna* (Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, and Jameson JL eds) pp 1552-1563, McGraw-Hill Interamericana.
- Briones AM, Daly CJ, Jimenez-Altayo F, Martinez-Revelles S, Gonzalez JM, McGrath JC, and Vila E (2005) Direct demonstration of beta1- and evidence against beta2- and beta3-adrenoceptors, in smooth muscle cells of rat small mesenteric arteries. *Br.J.Pharmacol.* **146**:679-691.
- Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC, and Stinson EB (1982) Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N.Engl.J.Med.* **307**:205-211.
- Bristow MR, Minobe W, Rasmussen R, Hershberger RE, and Hoffman BB (1988) Alpha-1 adrenergic receptors in the nonfailing and failing human heart. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **247**:1039-1045.
- Bristow MR, Hershberger RE, Port JD, Minobe W, and Rasmussen R (1989) Beta 1- and beta 2-adrenergic receptor-mediated adenylate cyclase stimulation in nonfailing and failing human ventricular myocardium. *Mol.Pharmacol.* **35**:295-303.
- Bristow MR, Hershberger RE, Port JD, Gilbert EM, Sandoval A, Rasmussen R, Cates AE, and Feldman AM (1990) Beta-adrenergic pathways in nonfailing and failing human ventricular myocardium. *Circulation* **82**:112-125.
- Bristow MR (1993) Changes in myocardial and vascular receptors in heart failure. *J.Am.Coll.Cardiol.* **22**:61A-71A.
- Brodde OE, Stuka N, Demuth V, Fesel R, Bergerhausen J, Daul A, and Bock KD (1985) Alpha- and beta-adrenoceptors in circulating blood cells of essential hypertensive patients: increased receptor density and responsiveness. *Clin.Exp.Hypertens.A* **7**:1135-1150.
- Brodde OE, Daul AE, O'Hara N, Wang XL, and Bock KD (1985) Acute regulation of lymphocyte beta 2-adrenoceptors is altered in patients with essential hypertension. *J.Hypertens.Suppl* **3**:S149-S152.

Brodde OE, Kretsch R, Ikezono K, Zerkowski HR, and Reidemeister JC (1986) Human beta-adrenoceptors: relation of myocardial and lymphocyte beta-adrenoceptor density. *Science* **231**:1584-1585.

Brodde OE, Michel MC, Gordon EP, Sandoval A, Gilbert EM, and Bristow MR (1989) Beta-adrenoceptor regulation in the human heart: can it be monitored in circulating lymphocytes? *Eur.Heart J.* **10 Suppl B**:2-10.

Brodde OE (1990) Beta- and alpha-adrenoceptor-agonists and -antagonists in chronic heart failure. *Basic Res.Cardiol.* **85 Suppl 1**:57-66.

Brodde OE (1991) Beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol.Rev.* **43**:203-242.

Brodde OE, Khamssi M, and Zerkowski HR (1991) Beta-adrenoceptors in the transplanted human heart: unaltered beta-adrenoceptor density, but increased proportion of beta 2-adrenoceptors with increasing posttransplant time. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **344**:430-436.

Brodde OE and Michel MC (1992) Adrenergic receptors and their signal transduction mechanisms in hypertension. *J.Hypertens.Suppl* **10**:S133-S145.

Brodde OE (1994) Adrenoceptors and their signal transduction mechanisms. *J.Auton.Pharmacol.* **14**:3-4.

Brodde OE, Adamczyk M, Busch F, Bossaller C, Duske E, Fleck E, Gotze S, and Auch-Schwelk W (1995) Selective downregulation of rat cardiac beta 1-adrenoceptors by cyclosporine A: prevention by diltiazem or angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J.Am.Coll.Cardiol.* **25**:761-767.

Brodde OE and Leineweber K (2004) Autonomic receptor systems in the failing and aging human heart: similarities and differences. *Eur.J.Pharmacol.* **500**:167-176.

Brodde OE, Bruck H, and Leineweber K (2006) Cardiac adrenoceptors: physiological and pathophysiological relevance. *J.Pharmacol.Sci* **100**:323-337.

Brodde OE (2007) Beta-adrenoceptor blocker treatment and the cardiac beta-adrenoceptor-G-protein(s)-adenylyl cyclase system in chronic heart failure. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **374**:361-372.

Brodde OE (2008) Beta-1 and beta-2 adrenoceptor polymorphisms: functional importance, impact on cardiovascular diseases and drug responses. *Pharmacol Ther.* **117**:1-29.

Brown GL and Gillespie JS (1957) The output of sympathetic transmitter from the spleen of the cat. *J.Physiol* **138**:81-102.

Brown L, Amos G, and Miller B (1994) Disease-induced changes in alpha-adrenoceptor-mediated cardiac and vascular responses in rats. *Clin.Exp.Pharmacol Physiol* **21**:721-728.

Bruschi G, Spaggiari M, Tacinelli L, Bruschi ME, Caroppo M, and Cavatorta A (1984) Regulation of arterial adrenoceptors during hypertension development in spontaneously hypertensive rats. *J.Hypertens.Suppl* **2**:S89-S93.

Brutsaert DL and De Keulenaer GW (2006) Diastolic heart failure: a myth. *Curr.Opin.Cardiol.* **21**:240-248.

Bunemann M, Lee KB, Pals-Rylaarsdam R, Roseberry AG, and Hosey MM (1999) Desensitization of G-protein-coupled receptors in the cardiovascular system. *Annu.Rev.Physiol* **61**:169-192.

Burt RP, Chapple CR, and Marshall I (1998) Alpha<sub>1A</sub>-adrenoceptor mediated contraction of rat prostatic vas deferens and the involvement of ryanodine stores and Ca<sup>2+</sup> influx stimulated by diacylglycerol and PKC. *Br.J.Pharmacol.* **123**:317-325.

Buscher R, Herrmann V, Ring KM, Kailasam MT, O'Connor DT, Parmer RJ, and Insel PA (1999) Variability in phenylephrine response and essential hypertension: a search for human alpha<sub>1B</sub>-adrenergic receptor polymorphisms. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **291**:793-798.

Bylund DB (1988) Subtypes of alpha<sub>2</sub>-adrenoceptors: pharmacological and molecular biological evidence converge. *Trends Pharmacol.Sci.* **9**:356-361.

Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Molinoff PB, Ruffolo RR, Jr., and Trendelenburg U (1994) International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol.Rev.* **46**:121-136.

Cao XJ and Li YF (2009) Alteration of messenger RNA and protein levels of cardiac alpha<sub>1</sub>-adrenergic receptor and angiotensin II receptor subtypes during aging in rats. *Can.J.Cardiol.* **25**:415-420.

Casale TB and Kaliner M (1984) Demonstration that circulating human blood cells have no detectable alpha<sub>1</sub>-adrenergic receptors by radioligand binding analysis. *J.Allergy Clin.Immunol.* **74**:812-818.

Castellano M, Beschi M, Rizzoni D, Paul M, Bohm M, Mantero G, Bettoni G, Porteri E, Albertini A, and Agabiti-Rosei E (1993) Gene expression of cardiac beta<sub>1</sub>-adrenergic receptors during the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *J.Hypertens.* **11**:787-791.

Cavalli A, Lattion AL, Hummler E, Nenniger M, Pedrazzini T, Aubert JF, Michel MC, Yang M, Lembo G, Vecchione C, Mostardini M, Schmidt A, Beermann F, and Cotecchia S (1997) Decreased blood pressure response in mice deficient of the alpha<sub>1b</sub>-adrenergic receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **94**:11589-11594.

Cerbai E, Guerra L, Varani K, Barbieri M, Borea PA, and Mugelli A (1995) Beta-adrenoceptor subtypes in young and old rat ventricular myocytes: a combined patch-clamp and binding study. *Br.J.Pharmacol* **116**:1835-1842.

Chalothorn D, McCune DF, Edelmann SE, Garcia-Cazarin ML, Tsujimoto G, and Piascik MT (2002) Differences in the cellular localization and agonist-mediated internalization properties of the alpha<sub>1</sub>-adrenoceptor subtypes. *Mol.Pharmacol.* **61**:1008-1016.

Chalothorn D, McCune DF, Edelmann SE, Tobita K, Keller BB, Lasley RD, Perez DM, Tanoue A, Tsujimoto G, Post GR, and Piascik MT (2003) Differential cardiovascular regulatory activities of the alpha<sub>1B</sub>- and alpha<sub>1D</sub>-adrenoceptor subtypes. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **305**:1045-1053.

Chang DJ, Chang TK, Yamanishi SS, Salazar FH, Kosaka AH, Khare R, Bhakta S, Jasper JR, Shieh IS, Lesnick JD, Ford AP, Daniels DV, Eglan RM, Clarke DE, Bach C, and Chan HW (1998) Molecular cloning, genomic characterization and expression of novel human alpha<sub>1A</sub>-adrenoceptor isoforms. *FEBS Lett.* **422**:279-283.

Chen J, Makino CL, Peachey NS, Baylor DA, and Simon MI (1995) Mechanisms of rhodopsin inactivation in vivo as revealed by a COOH-terminal truncation mutant. *Science* **267**:374-377.

Chen L, Xin X, Eckhart AD, Yang N, and Faber JE (1995) Regulation of vascular smooth muscle growth by alpha<sub>1</sub>-adrenoceptor subtypes in vitro and in situ. *J.Biol.Chem.* **270**:30980-30988.

Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, Choi HJ, Kuhn P, Weis WI, Kobilka BK, and Stevens RC (2007) High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* **318**:1258-1265.

Chesley A, Lundberg MS, Asai T, Xiao RP, Ohtani S, Lakatta EG, and Crow MT (2000) The beta(2)-adrenergic receptor delivers an antiapoptotic signal to cardiac myocytes through G(i)-dependent coupling to phosphatidylinositol 3'-kinase. *Circ.Res.* **87**:1172-1179.

Chester MR, Amadi AA, and Barnett DB (1995) Beta adrenoceptor density in the donor heart: a guide to prognosis? *Br.Heart J.* **73**:540-543.

Chiam P, Abdullah F, Chow HK, Adeeb SM, and Yousafzai MS (2002) The ethnic characteristics and prevalence of diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia in patients who underwent coronary artery bypass grafting in Hospital Universiti Kebangsaan Malaysia. *Med.J.Malaysia* **57**:460-466.

Chitale K, Weber D, and Webb RC (2001) RhoA/Rho-kinase, vascular changes, and hypertension. *Curr.Hypertens.Rep.* **3**:139-144.

Cho MC, Rapacciuolo A, Koch WJ, Kobayashi Y, Jones LR, and Rockman HA (1999) Defective beta-adrenergic receptor signaling precedes the development of dilated cardiomyopathy in transgenic mice with caldesmon overexpression. *J.Biol.Chem.* **274**:22251-22256.

Choi DJ, Koch WJ, Hunter JJ, and Rockman HA (1997) Mechanism of beta-adrenergic receptor desensitization in cardiac hypertrophy is increased beta-adrenergic receptor kinase. *J.Biol.Chem.* **272**:17223-17229.

Chomczynski P and Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* **162**:156-159.

Chruscinski A, Brede ME, Meinel L, Lohse MJ, Kobilka BK, and 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.

Chuang TT, Sallese M, Ambrosini G, Parruti G, and de Blasi A (1992) High expression of beta-adrenergic receptor kinase in human peripheral blood leukocytes. Isoproterenol and platelet activating factor can induce kinase translocation. *J.Biol.Chem.* **267**:6886-6892.

Clark AJ (1937) *The Mode of Action of Drugs on Cells*. Edwards Arnold, London.

Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth EM, Bromage N, Bunyan J, Erhardt W, Flecknell P, Gregory N, Hackbarth H, Morton D, and Warwick C (1996) Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. DGXI of the European Commission. *Lab Anim* **30**:293-316.

Cohn HI, Xi Y, Pesant S, Harris DM, Hyslop T, Falkner B, and Eckhart AD (2009) G protein-coupled receptor kinase 2 expression and activity are associated with blood pressure in black Americans. *Hypertension* **54**:71-76.

Communal C, Singh K, Sawyer DB, and Colucci WS (1999) Opposing effects of beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis : role of a pertussis toxin-sensitive G protein. *Circulation* **100**:2210-2212.

Communal C, Colucci WS, and Singh K (2000) p38 mitogen-activated protein kinase pathway protects adult rat ventricular myocytes against beta -adrenergic receptor-stimulated apoptosis. Evidence for Gi-dependent activation. *J.Biol.Chem.* **275**:19395-19400.

Cong M, Perry SJ, Lin FT, Fraser ID, Hu LA, Chen W, Pitcher JA, Scott JD, and Lefkowitz RJ (2001) Regulation of membrane targeting of the G protein-coupled receptor kinase 2 by protein kinase A and its anchoring protein AKAP79. *J.Biol.Chem.* **276**:15192-15199.

Corman B and Michel JB (1986) Renin-angiotensin system, converting-enzyme inhibition and kidney function in aging female rats. *Am.J.Physiol* **251**:R450-R455.

Cotecchia S, Schwinn DA, Randall RR, Lefkowitz RJ, Caron MG, and Kobilka BK (1988) Molecular cloning and expression of the cDNA for the hamster alpha 1-adrenergic receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **85**:7159-7163.

Cotecchia S, Bjorklof K, Rossier O, Stanasila L, Greasley P, and Fanelli F (2002) The alpha1b-adrenergic receptor subtype: molecular properties and physiological implications. *J.Recept.Signal.Transduct.Res.* **22**:1-16.

Criqui MH, Langer RD, Fronek A, Feigelson HS, Klauber MR, McCann TJ, and Browner D (1992) Mortality over a period of 10 years in patients with peripheral arterial disease. *N.Engl.J.Med.* **326**:381-386.

D'Ocon P (2003) Physiological and pathological role of the constitutively active alpha1D-adrenoceptors, in *Inverse agonism* (Ijzerman AP ed) pp 63-74, Leiden: Elsevier.

Daaka Y, Pitcher JA, Richardson M, Stoffel RH, Robishaw JD, and Lefkowitz RJ (1997) Receptor and G betagamma isoform-specific interactions with G protein-coupled receptor kinases. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **94**:2180-2185.

Daaka Y, Luttrell LM, and Lefkowitz RJ (1997) Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* **390**:88-91.

Daaka Y, Luttrell LM, Ahn S, Della Rocca GJ, Ferguson SS, Caron MG, and Lefkowitz RJ (1998) Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase. *J.Biol.Chem.* **273**:685-688.

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, and McGrath JC (2002) A knockout approach indicates a minor vasoconstrictor role for vascular alpha1B-adrenoceptors in mouse. *Physiol Genomics* **9**:85-91.

Daniels DV, Gever JR, Jasper JR, Kava MS, Lesnick JD, Meloy TD, Stepan G, Williams TJ, Clarke DE, Chang DJ, and Ford AP (1999) Human cloned alpha1A-adrenoceptor isoforms display alpha1L-adrenoceptor pharmacology in functional studies. *Eur.J.Pharmacol.* **370**:337-343.

Danner S and Lohse MJ (1997) Cell type-specific regulation of beta2-adrenoceptor mRNA by agonists. *Eur.J.Pharmacol.* **331**:73-78.

De Champlain J (1990) Pre- and postsynaptic adrenergic dysfunctions in hypertension. *J.Hypertens.Suppl* **8**:S77-S85.

De Lean A, Stadel JM, and Lefkowitz RJ (1980) A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *J.Biol.Chem.* **255**:7108-7117.

De Vries L, Zheng B, Fischer T, Elenko E, and Farquhar MG (2000) The regulator of G protein signaling family. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **40**:235-271.

Deckert T, Feldt-Rasmussen B, Borch-Johnsen K, Jensen T, and Kofoed-Enevoldsen A (1989) Albuminuria reflects widespread vascular damage. The Steno hypothesis. *Diabetologia* **32**:219-226.

Denniss AR, Marsh JD, Quigg RJ, Gordon JB, and Colucci WS (1989) Beta-adrenergic receptor number and adenylate cyclase function in denervated transplanted and cardiomyopathic human hearts. *Circulation* **79**:1028-1034.

Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, Stromberg A, van Veldhuisen DJ, Atar D, Hoes AW, Keren A, Mebazaa A, Nieminen M, Priori SG, Swedberg K, Vahanian A, Camm J, De Caterina R, Dean V, Dickstein K, Filippatos G, Funck-Brentano C, Hellemans I, Kristensen SD, McGregor K, Sechtem U, Silber S, Tendera M, Widimsky P, and Zamorano JL (2008) ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur.Heart J.* **29**:2388-2442.

Dinudom A, Fotia AB, Lefkowitz RJ, Young JA, Kumar S, and Cook DI (2004) The kinase Grk2 regulates Nedd4/Nedd4-2-dependent control of epithelial Na<sup>+</sup> channels. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **101**:11886-11890.

Diviani D, Lattion AL, Larbi N, Kunapuli P, Pronin A, Benovic JL, and Cotecchia S (1996) Effect of different G protein-coupled receptor kinases on phosphorylation and desensitization of the alpha1B-adrenergic receptor. *J.Biol.Chem.* **271**:5049-5058.

Diviani D, Lattion AL, and Cotecchia S (1997) Characterization of the phosphorylation sites involved in G protein-coupled receptor kinase- and protein kinase C-mediated desensitization of the alpha1B-adrenergic receptor. *J.Biol.Chem.* **272**:28712-28719.

Dixon RA, Kobilka BK, Strader DJ, Benovic JL, Dohlman HG, Frielle T, Bolanowski MA, Bennett CD, Rands E, Diehl RE, Mumford RA, Slater EE, Sigal IS, Caron MG, Lefkowitz RJ, and Strader CD (1986) Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* **321**:75-79.

Dobson JG, Jr., Fray J, Leonard JL, and Pratt RE (2003) Molecular mechanisms of reduced beta-adrenergic signaling in the aged heart as revealed by genomic profiling. *Physiol Genomics* **15**:142-147.

Docherty JR and McGrath JC (1980) A comparison of pre- and post-junctional potencies of several alpha-adrenoceptor agonists in the cardiovascular system and anococcygeus muscle of the rat. Evidence for two types of post-junctional alpha-adrenoceptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **312**:107-116.

Docherty JR (1990) Cardiovascular responses in ageing: a review. *Pharmacol Rev* **42**:103-125.

Docherty JR (1998) Subtypes of functional alpha1- and alpha2-adrenoceptors. *Eur.J.Pharmacol.* **361**:1-15.

Docherty JR (2002) Age-related changes in adrenergic neuroeffector transmission. *Auton.Neurosci.* **96**:8-12.

Dorn GW, Tepe NM, Lorenz JN, Koch WJ, and Liggett SB (1999) Low- and high-level transgenic expression of beta2-adrenergic receptors differentially affect cardiac hypertrophy and function in Galphaq-overexpressing mice. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **96**:6400-6405.

Dorn GW (2009) GRK mythology: G-protein receptor kinases in cardiovascular disease. *J.Mol.Med.* **87**:455-463.

Drouin C, Darracq L, Trovero F, Blanc G, Glowinski J, Cotecchia S, and Tassin JP (2002) Alpha1b-adrenergic receptors control locomotor and rewarding effects of psychostimulants and opiates. *J.Neurosci.* **22**:2873-2884.

Du XJ, Gao XM, Wang B, Jennings GL, Woodcock EA, and Dart AM (2000) Age-dependent cardiomyopathy and heart failure phenotype in mice overexpressing beta(2)-adrenergic receptors in the heart. *Cardiovasc.Res.* **48**:448-454.

Du XJ, Fang L, Gao XM, Kiriazis H, Feng X, Hotchkiss E, Finch AM, Chaulet H, and Graham RM (2004) Genetic enhancement of ventricular contractility protects against pressure-overload-induced cardiac dysfunction. *J.Mol.Cell Cardiol.* **37**:979-987.

Dubocovich ML and Langer SZ (1974) Negative feed-back regulation of noradrenaline release by nerve stimulation in the perfused cat's spleen: differences in potency of phenoxybenzamine in blocking the pre- and post-synaptic adrenergic receptors. *J.Physiol* **237**:505-519.

Duman D, Demirtunc R, Karadag B, and Karatas M (2008) Association of albuminuria with impaired aortic elasticity and left ventricular diastolic dysfunction in type 2 diabetes. *Anadolu.Kardiyol.Derg.* **8**:10-15.

Dungan JR, Conley YP, Langae TY, Johnson JA, Kneipp SM, Hess PJ, and Yucha CB (2009) Altered beta-2 adrenergic receptor gene expression in human clinical hypertension. *Biol.Res.Nurs.* **11**:17-26.

Dzimiri N, Basco C, Moorji A, Afrane B, and Al Halees Z (2002) Characterization of lymphocyte beta 2-adrenoceptor signalling in patients with left ventricular volume overload disease. *Clin.Exp.Pharmacol Physiol* **29**:181-188.

Eckhart AD, Duncan SJ, Penn RB, Benovic JL, Lefkowitz RJ, and Koch WJ (2000) Hybrid transgenic mice reveal in vivo specificity of G protein-coupled receptor kinases in the heart. *Circ.Res.* **86**:43-50.

Eckhart AD, Ozaki T, Tevaearai H, Rockman HA, and Koch WJ (2002) Vascular-targeted overexpression of G protein-coupled receptor kinase-2 in transgenic mice attenuates beta-adrenergic receptor signaling and increases resting blood pressure. *Mol.Pharmacol.* **61**:749-758.

Eichmann T, Lorenz K, Hoffmann M, Brockmann J, Krasel C, Lohse MJ, and Quitterer U (2003) The amino-terminal domain of G-protein-coupled receptor kinase 2 is a regulatory Gbeta gamma binding site. *J.Biol.Chem.* **278**:8052-8057.

Elhawary AM, Pettinger WA, and Wolff DW (1992) Subtype-selective alpha-1 adrenoceptor alkylation in the rat kidney and its effect on the vascular pressor response. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **260**:709-713.

Elhawary AM and Pang CC (1994) Alpha 1b-adrenoceptors mediate renal tubular sodium and water reabsorption in the rat. *Br.J.Pharmacol.* **111**:819-824.

Elorza A, Penela P, Sarnago S, and Mayor F, Jr. (2003) MAPK-dependent degradation of G protein-coupled receptor kinase 2. *J.Biol.Chem.* **278**:29164-29173.

Emorine LJ, Marullo S, Briand-Sutren MM, Patey G, Tate K, Delavier-Klutchko C, and Strosberg AD (1989) Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. *Science* **245**:1118-1121.

Engelhardt S, Bohm M, Erdmann E, and Lohse MJ (1996) Analysis of beta-adrenergic receptor mRNA levels in human ventricular biopsy specimens by quantitative polymerase chain reactions: progressive reduction of beta 1-adrenergic receptor mRNA in heart failure. *J.Am.Coll.Cardiol.* **27**:146-154.

- Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F, and Lohse MJ (1999) Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **96** :7059-7064.
- Evans BA, Papaioannou M, Hamilton S, and Summers RJ (1999) Alternative splicing generates two isoforms of the beta3-adrenoceptor which are differentially expressed in mouse tissues. *Br.J.Pharmacol.* **127**:1525-1531.
- Evans JG and Rose G (1971) Hypertension. *Br.Med.Bull.* **27**:37-42.
- Ezzati M, Lopez AD, Rodgers A, Vander HS, and Murray CJ (2002) Selected major risk factors and global and regional burden of disease. *Lancet* **360**:1347-1360.
- Fain JN and Garcia-Sainz JA (1980) Role of phosphatidylinositol turnover in alpha 1 and of adenylate cyclase inhibition in alpha 2 effects of catecholamines. *Life Sci* **26**:1183-1194.
- Falloon BJ and Heagerty AM (1994) In vitro perfusion studies of human resistance artery function in essential hypertension. *Hypertension* **24**:16-23.
- Farrukh HM, White M, Port JD, Handwerger D, Larrabee P, Klein J, Roden RA, Skerl L, Renlund DG, Feldman AM, and . (1993) Up-regulation of beta 2-adrenergic receptors in previously transplanted, denervated nonfailing human hearts. *J.Am.Coll.Cardiol.* **22**:1902-1908.
- Faure C, Gouhier C, Langer SZ, and Graham D (1995) Quantification of alpha 1-adrenoceptor subtypes in human tissues by competitive RT-PCR analysis. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **213**:935-943.
- Felder RA, Sanada H, Xu J, Yu PY, Wang Z, Watanabe H, Asico LD, Wang W, Zheng S, Yamaguchi I, Williams SM, Gainer J, Brown NJ, Hazen-Martin D, Wong LJ, Robillard JE, Carey RM, Eisner GM, and Jose PA (2002) G protein-coupled receptor kinase 4 gene variants in human essential hypertension. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **99**:3872-3877.
- Feldman DS, Elton TS, Sun B, Martin MM, and Ziolo MT (2008) Mechanisms of disease: detrimental adrenergic signaling in acute decompensated heart failure. *Nat.Clin.Pract.Cardiovasc.Med.* **5**:208-218.
- Feldman RD (1987) Beta-adrenergic receptor alterations in hypertension--physiological and molecular correlates. *Can.J.Physiol Pharmacol* **65**:1666-1672.
- Feldman RD (1990) Defective venous beta-adrenergic response in borderline hypertensive subjects is corrected by a low sodium diet. *J.Clin.Invest* **85**:647-652.
- Feldman RD, Tan CM, and Chorazyczewski J (1995) G protein alterations in hypertension and aging. *Hypertension* **26**:725-732.
- Feldman RD and Gros R (1998) Impaired vasodilator function in hypertension: the role of alterations in receptor-G protein coupling. *Trends Cardiovasc.Med.* **8**:297-305.
- Feldman RD (2002) Deactivation of vasodilator responses by GRK2 overexpression: a mechanism or the mechanism for hypertension? *Mol.Pharmacol* **61**:707-709.
- Feldman RD and Gros R (2006) Defective vasodilatory mechanisms in hypertension: a G-protein-coupled receptor perspective. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* **15**:135-140.
- Ferguson SS, Downey WE, III, Colapietro AM, Barak LS, Menard L, and Caron MG (1996) Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science* **271**:363-366.

Ferguson SS (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol.Rev.* **53**:1-24.

Ferro A, Queen LR, Priest RM, Xu B, Ritter JM, Poston L, and Ward JP (1999) Activation of nitric oxide synthase by beta 2-adrenoceptors in human umbilical vein endothelium in vitro. *Br.J.Pharmacol.* **126**:1872-1880.

Fildes JE, Shaw SM, Yonan N, and Williams SG (2009) The immune system and chronic heart failure: is the heart in control? *J.Am.Coll.Cardiol.* **53**:1013-1020.

Flavahan NA and Vanhoutte PM (1986) [alpha]1-Adrenoceptor subclassification in vascular smooth muscle. *Trends in Pharmacological Sciences* **7**:347-349.

Folkow B (1982) Physiological aspects of primary hypertension. *Physiol Rev.* **62**:347-504.

Folkow B (1990) "Structural factor" in primary and secondary hypertension. *Hypertension* **16**:89-101.

Ford AP, Williams TJ, Blue DR, and Clarke DE (1994) Alpha 1-adrenoceptor classification: sharpening Occam's razor. *Trends Pharmacol.Sci* **15**:167-170.

Ford AP, Arredondo NF, Blue DR, Jr., Bonhaus DW, Jasper J, Kava MS, Lesnick J, Pfister JR, Shieh IA, Vimont RL, Williams TJ, McNeal JE, Stamey TA, and Clarke DE (1996) RS-17053 (N-[2-(2-cyclopropylmethoxyphenoxy)ethyl]-5-chloro-alpha, alpha-dimethyl-1H-indole-3-ethanamine hydrochloride), a selective alpha 1A-adrenoceptor antagonist, displays low affinity for functional alpha 1-adrenoceptors in human prostate: implications for adrenoceptor classification. *Mol.Pharmacol.* **49**:209-215.

Ford AP, Daniels DV, Chang DJ, Gever JR, Jasper JR, Lesnick JD, and Clarke DE (1997) Pharmacological pleiotropism of the human recombinant alpha1A-adrenoceptor: implications for alpha1-adrenoceptor classification. *Br.J.Pharmacol.* **121**:1127-1135.

Fraeyman N, Van d, V, Van Ermen A, Bazan A, Vanderheyden P, Van Emmelo J, and Vandekerckhove J (2000) Effect of maturation and aging on beta-adrenergic signal transduction in rat kidney and liver. *Biochem.Pharmacol* **60**:1787-1795.

Fredericks ZL, Pitcher JA, and Lefkowitz RJ (1996) Identification of the G protein-coupled receptor kinase phosphorylation sites in the human beta2-adrenergic receptor. *J.Biol.Chem.* **271**:13796-13803.

Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, and Schiöth HB (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol.Pharmacol.* **63**:1256-1272.

Freedman NJ, Liggett SB, Drachman DE, Pei G, Caron MG, and Lefkowitz RJ (1995) Phosphorylation and desensitization of the human beta 1-adrenergic receptor. Involvement of G protein-coupled receptor kinases and cAMP-dependent protein kinase. *J.Biol.Chem.* **270**:17953-17961.

Freeman K, Lerman I, Kranias EG, Bohlmeyer T, Bristow MR, Lefkowitz RJ, Iaccarino G, Koch WJ, and Leinwand LA (2001) Alterations in cardiac adrenergic signaling and calcium cycling differentially affect the progression of cardiomyopathy. *J.Clin.Invest* **107**:967-974.

Frielle T, Collins S, Daniel KW, Caron MG, Lefkowitz RJ, and Kobilka BK (1987) Cloning of the cDNA for the human beta 1-adrenergic receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **84**:7920-7924.

Fu C, Wang H, Wang S, Shi Y, Zhou X, Sun K, Chen J, Song X, Xue H, and Hui R (2008) Association of beta 1-adrenergic receptor gene polymorphisms with left ventricular hypertrophy in human essential hypertension. *Clin.Biochem.* **41**:773-778.

Fujimoto S, Dohi Y, AOKI K, Asano M, and Matsuda T (1987) Diminished beta-adrenoceptor-mediated relaxation of arteries from spontaneously hypertensive rats before and during development of hypertension. *Eur.J.Pharmacol* **136**:179-187.

Furchgott RF (1964) Receptor mechanisms. *Annu.Rev.Pharmacol.* **4**:21-50.

Furchgott RF (1967) The pharmacological differentiation of adrenergic receptors. *Ann.N.Y.Acad.Sci* **139**:553-570.

Furchgott RF and Bursztyn P (1967) Comparaison of dissociation constants and of relative efficacies of selected agonist acting on parasympathetic receptors. *Ann.N.Y.Acad.Sci* **144**:882-899.

Furchgott RF (1984) The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **24**:175-197.

Gaballa MA, Eckhart AD, Koch WJ, and Goldman S (2000) Vascular beta-adrenergic receptor adenylyl cyclase system in maturation and aging. *J.Mol.Cell Cardiol.* **32**:1745-1755.

Gaddum JH (1926) The action of adrenalin and ergotamine on the uterus of the rabbit. *J.Physiol* **61**:141-150.

Gagnon AW, Kallal L, and Benovic JL (1998) Role of clathrin-mediated endocytosis in agonist-induced down-regulation of the beta2-adrenergic receptor. *J.Biol.Chem.* **273**:6976-6981.

Gainetdinov RR, Bohn LM, Sotnikova TD, Cyr M, Laakso A, Macrae AD, Torres GE, Kim KM, Lefkowitz RJ, Caron MG, and Premont RT (2003) Dopaminergic supersensitivity in G protein-coupled receptor kinase 6-deficient mice. *Neuron* **38**:291-303.

Garcia-Sainz JA and Torres-Padilla ME (1999) Modulation of basal intracellular calcium by inverse agonists and phorbol myristate acetate in rat-1 fibroblasts stably expressing alpha1d-adrenoceptors. *FEBS Lett.* **443**:277-281.

Garcia-Sainz JA, Vazquez-Prado J, and Villalobos-Molina R (1999) Alpha 1-adrenoceptors: subtypes, signaling, and roles in health and disease. *Arch.Med.Res.* **30**:449-458.

Garcia-Sainz JA, Vazquez-Prado J, and del Carmen ML (2000) Alpha 1-adrenoceptors: function and phosphorylation. *Eur.J.Pharmacol.* **389**:1-12.

Garcia JJ, del Carmen SM, De la FM, and Ortega E (2003) Noradrenaline and its end metabolite 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol inhibit lymphocyte chemotaxis: role of alpha- and beta-adrenoceptors. *Mol.Cell Biochem.* **254**:305-309.

Gardiner SM, Compton AM, Bennett T, Palmer RM, and Moncada S (1990) Regional haemodynamic changes during oral ingestion of NG-monomethyl-L-arginine or NG-nitro-L-arginine methyl ester in conscious Brattleboro rats. *Br.J.Pharmacol* **101**:10-12.

Gardiner SM, Kemp PA, and Bennett T (1991) Effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester on vasodilator responses to acetylcholine, 5'-N-ethylcarboxamidoadenosine or salbutamol in conscious rats. *Br.J.Pharmacol* **103**:1725-1732.

Garg LC (1992) Actions of adrenergic and cholinergic drugs on renal tubular cells. *Pharmacol.Rev.* **44**:81-102.

Gauthier C, Tavernier G, Charpentier F, Langin D, and Le Marec H (1996) Functional beta3-adrenoceptor in the human heart. *J.Clin.Invest* **98**:556-562.

Gauthier C, Leblais V, Kobzik L, Trochu JN, Khandoudi N, Bril A, Balligand JL, and Le Marec H (1998) The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J.Clin.Invest* **102**:1377-1384.

Gauthier C, Seze-Goismier C, and Rozec B (2007) Beta 3-adrenoceptors in the cardiovascular system. *Clin.Hemorheol.Microcirc.* **37**:193-204.

Gerstein HC, Mann JF, Yi Q, Zinman B, Dinneen SF, Hoogwerf B, Halle JP, Young J, Rashkow A, Joyce C, Nawaz S, and Yusuf S (2001) Albuminuria and risk of cardiovascular events, death, and heart failure in diabetic and nondiabetic individuals. *JAMA* **286**:421-426.

Gesek FA (1999) Alpha1- and alpha2-adrenoceptor control of sodium transport reverses in developing hypertension. *Hypertension* **33**:524-529.

Gilbert EM, Eiswirth CC, Mealey PC, Larrabee P, Herrick CM, and Bristow MR (1989) Beta-adrenergic supersensitivity of the transplanted human heart is presynaptic in origin. *Circulation* **79**:344-349.

Gilbert EM, Abraham WT, Olsen S, Hattler B, White M, Mealy P, Larrabee P, and Bristow MR (1996) Comparative hemodynamic, left ventricular functional, and antiadrenergic effects of chronic treatment with metoprolol versus carvedilol in the failing heart. *Circulation* **94**:2817-2825.

Gisbert R, Noguera MA, Ivorra MD, and 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, and 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, Perez-Vizcaino F, Cogolludo AL, Noguera MA, Ivorra MD, Tamargo J, and D'Ocon P (2003) Cytosolic Ca<sup>2+</sup> and phosphoinositide hydrolysis linked to constitutively active alpha 1D-adrenoceptors in vascular smooth muscle. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **305**:1006-1014.

Gisbert R, Madrero Y, Sabino V, Noguera MA, Ivorra MD, and 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.

Godinez-Hernandez D, Gallardo-Ortiz IA, Lopez-Sanchez P, and Villalobos-Molina R (2006) Captopril therapy decreases both expression and function of alpha-adrenoceptors in pre-hypertensive rat aorta. *Auton.Autacoid.Pharmacol.* **26**:21-29.

Goldstein DS (1983) Plasma catecholamines and essential hypertension. An analytical review. *Hypertension* **5**:86-99.

Goodman OB, Jr., Krupnick JG, Santini F, Gurevich VV, Penn RB, Gagnon AW, Keen JH, and Benovic JL (1996) Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* **383**:447-450.

Gopalakrishnan SM, Chen C, and Lokhandwala MF (1993) Identification of alpha 1-adrenoceptor subtypes in rat renal proximal tubules. *Eur.J.Pharmacol.* **250**:469-472.

Gorman AL and Dunn AJ (1993) Beta-adrenergic receptors are involved in stress-related behavioral changes. *Pharmacol.Biochem.Behav.* **45**:1-7.

Graham I, Atar D, Borch-Johnsen K, Boysen G, Burell G, Cifkova R, Dallongeville J, De Backer G, Ebrahim S, Gjelsvik B, Herrmann-Lingen C, Hoes A, Humphries S, Knapton M, Perk J, Priori SG, Pyorala K, Reiner Z, Ruilope L, Sans-Menendez S, Op Reimer WS, Weissberg P, Wood D, Yarnell J, Zamorano JL, Walma E, Fitzgerald T, Cooney MT, Dudina A, Vahanian A, Camm J, De Caterina R, Dean V, Dickstein K, Funck-Brentano C, Filippatos G, Hellemans I, Kristensen SD, McGregor K, Sechtem U, Silber S, Tendera M, Widimsky P, Zamorano JL, Altiner A, Bonora E, Durrington PN, Fagard R, Giampaoli S, Hemingway H, Hakansson J, Kjeldsen SE, Larsen L, Mancina G, Manolis AJ, Orth-Gomer K, Pedersen T, Rayner M, Ryden L, Sammut M, Schneiderman N, Stalenhoef AF, Tokgozoglu L, Wiklund O, and Zampelas A (2007) European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: full text. Fourth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Eur.J.Cardiovasc.Prev.Rehabil.* **14 Suppl 2**:S1-113.

Graham RM, Perez DM, Hwa J, and Piascik MT (1996) alpha 1-adrenergic receptor subtypes. Molecular structure, function, and signaling. *Circ.Res.* **78**:737-749.

Grammas P, Diglio C, Giacomelli F, and Wiener J (1994) Growth properties and receptor expression in vascular smooth muscle cells from hypertensive rats. *Clin.Exp.Hypertens.* **16**:207-227.

Granneman JG (1992) Effects of agonist exposure on the coupling of beta 1 and beta 3 adrenergic receptors to adenyl cyclase in isolated adipocytes. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **261**:638-642.

Gray DW and Marshall I (1992) Novel signal transduction pathway mediating endothelium-dependent beta-adrenoceptor vasorelaxation in rat thoracic aorta. *Br.J.Pharmacol* **107**:684-690.

Green SA, Turki J, Innis M, and Liggett SB (1994) Amino-terminal polymorphisms of the human beta 2-adrenergic receptor impart distinct agonist-promoted regulatory properties. *Biochemistry* **33**:9414-9419.

Gros R, Benovic JL, Tan CM, and Feldman RD (1997) G-protein-coupled receptor kinase activity is increased in hypertension. *J.Clin.Invest* **99**:2087-2093.

Gros R, Tan CM, Chorazyczewski J, Kelvin DJ, Benovic JL, and Feldman RD (1999) G-protein-coupled receptor kinase expression in hypertension. *Clin.Pharmacol Ther.* **65**:545-551.

Gros R, Chorazyczewski J, Meek MD, Benovic JL, Ferguson SS, and Feldman RD (2000) G-Protein-coupled receptor kinase activity in hypertension : increased vascular and lymphocyte G-protein receptor kinase-2 protein expression. *Hypertension* **35**:38-42.

Gross G, Hanft G, and Rugevics C (1988) 5-Methyl-urapidil discriminates between subtypes of the alpha 1-adrenoceptor. *Eur.J.Pharmacol.* **151**:333-335.

Guarino RD, Perez DM, and Piascik MT (1996) Recent advances in the molecular pharmacology of the alpha 1-adrenergic receptors. *Cell Signal.* **8**:323-333.

Guillery EN, Segar JL, Merrill DC, Nakamura KT, Jose PA, and Robillard JE (1994) Ontogenic changes in renal response to alpha 1-adrenoceptor stimulation in sheep. *Am.J.Physiol* **267**:R990-R998.

Guimaraes S and Moura D (2001) Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol.Rev.* **53**:319-356.

Gurdal H, Cai G, and Johnson MD (1995) Alpha 1-adrenoceptor responsiveness in the aging aorta. *Eur.J.Pharmacol* **274**:117-123.

Guyton AG and Hall JE (1996) *Tratado de Fisiología Médica*. McGraw-Hill Interamericana.

Hadcock JR and Malbon CC (1988) Down-regulation of beta-adrenergic receptors: agonist-induced reduction in receptor mRNA levels. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **85**:5021-5025.

Hague C, Chen Z, Uberti M, and Minneman KP (2003) Alpha(1)-adrenergic receptor subtypes: non-identical triplets with different dancing partners? *Life Sci*. **74**:411-418.

Hague C, Chen Z, Pupo AS, Schulte NA, Toews ML, and Minneman KP (2004) The N terminus of the human alpha1D-adrenergic receptor prevents cell surface expression. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **309**:388-397.

Hall JE, Mizelle HL, Hildebrandt DA, and Brands MW (1990) Abnormal pressure natriuresis. A cause or a consequence of hypertension? *Hypertension* **15**:547-559.

Hall RA, Premont RT, Chow CW, Blitzer JT, Pitcher JA, Claing A, Stoffel RH, Barak LS, Shenolikar S, Weinman EJ, Grinstein S, and Lefkowitz RJ (1998) The beta2-adrenergic receptor interacts with the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger regulatory factor to control Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. *Nature* **392**:626-630.

Han C, Abel PW, and Minneman KP (1987) Heterogeneity of alpha 1-adrenergic receptors revealed by chlorethylclonidine. *Mol.Pharmacol.* **32**:505-510.

Hanania NA and Moore RH (2004) Anti-inflammatory activities of beta2-agonists. *Curr.Drug Targets.Inflamm.Allergy* **3**:271-277.

Hankey GJ and Eikelboom JW (1999) Homocysteine and vascular disease. *Lancet* **354**:407-413.

Hanna MK and Khairallah PA (1986) Alterations of myocardial alpha 1-adrenergic receptors in hypertensive cardiac hypertrophy in the rat. *Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.* **283**:80-93.

Harding VB, Jones LR, Lefkowitz RJ, Koch WJ, and Rockman HA (2001) Cardiac beta ARK1 inhibition prolongs survival and augments beta blocker therapy in a mouse model of severe heart failure. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **98**:5809-5814.

Harris DM, Cohn HI, Pesant S, and Eckhart AD (2008) GPCR signalling in hypertension: role of GRKs. *Clin.Sci (Lond)* **115**:79-89.

Hartmann A, Andereassen AK, Holdaas H, Simonsen S, Geiran O, and Berg KJ (1996) Five years' follow-up of renal glomerular and tubular functions in heart transplant recipients. *J.Heart Lung Transplant.* **15**:972-979.

Hata JA, Williams ML, Schroder JN, Lima B, Keys JR, Blaxall BC, Petrofski JA, Jakoi A, Milano CA, and Koch WJ (2006) Lymphocyte levels of GRK2 (betaARK1) mirror changes in the LVAD-supported failing human heart: lower GRK2 associated with improved beta-adrenergic signaling after mechanical unloading. *J.Card Fail.* **12**:360-368.

Hawrylyshyn KA, Michelotti GA, Coge F, Guenin SP, and Schwinn DA (2004) Update on human alpha1-adrenoceptor subtype signaling and genomic organization. *Trends Pharmacol.Sci* **25**:449-455.

Head RJ, Cassis LA, Robinson RL, Westfall DP, and Stitzel RE (1985) Altered catecholamine contents in vascular and nonvascular tissues in genetically hypertensive rats. *Blood Vessels* **22**:196-204.

Head RJ (1989) Hypertensive innervation: its relationship to functional and hyperplastic changes in the vasculature of the spontaneously hypertensive rat. *Blood Vessels* **26**:1-20.

Heijink IH, van den BM, Vellenga E, de Monchy JG, Postma DS, and Kauffman HF (2004) Altered beta2-adrenergic regulation of T cell activity after allergen challenge in asthma. *Clin.Exp.Allergy* **34**:1356-1363.

Heijnen CJ, Rouppe vd, V, Wulffraat N, van der NJ, Kuis W, and Kavelaars A (1996) Functional alpha 1-adrenergic receptors on leukocytes of patients with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. *J.Neuroimmunol.* **71**:223-226.

Hein P and Michel MC (2007) Signal transduction and regulation: are all alpha1-adrenergic receptor subtypes created equal? *Biochem.Pharmacol.* **73**:1097-1106.

Hendriks-Balk MC, Peters SL, Michel MC, and Alewijnse AE (2008) Regulation of G protein-coupled receptor signalling: focus on the cardiovascular system and regulator of G protein signalling proteins. *Eur.J.Pharmacol.* **585**:278-291.

Hermans MM, Henry R, Dekker JM, Kooman JP, Kostense PJ, Nijpels G, Heine RJ, and Stehouwer CD (2007) Estimated glomerular filtration rate and urinary albumin excretion are independently associated with greater arterial stiffness: the Hoorn Study. *J.Am.Soc.Nephrol.* **18**:1942-1952.

Hermans MM, Henry RM, Dekker JM, Nijpels G, Heine RJ, and Stehouwer CD (2008) Albuminuria, but not estimated glomerular filtration rate, is associated with maladaptive arterial remodeling: the Hoorn Study. *J.Hypertens.* **26**:791-797.

Hicks PE, Nahorski SR, and Cook N (1983) Postsynaptic alpha-adrenoceptors in the hypertensive rat: studies on vascular reactivity in vivo and receptor binding in vitro. *Clin.Exp.Hypertens.A* **5**:401-427.

Hieble JP, Bylund DB, Clarke DE, Eikenburg DC, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, and Ruffolo RR, Jr. (1995) International Union of Pharmacology. X. Recommendation for nomenclature of alpha 1-adrenoceptors: consensus update. *Pharmacol.Rev.* **47**:267-270.

Hirasawa A, Shibata K, Horie K, Takei Y, Obika K, Tanaka T, Muramoto N, Takagaki K, Yano J, and Tsujimoto G (1995) Cloning, functional expression and tissue distribution of human alpha 1c-adrenoceptor splice variants. *FEBS Lett.* **363**:256-260.

Hirasawa A, Sugawara T, Awaji T, Tsumaya K, Ito H, and Tsujimoto G (1997) Subtype-specific differences in subcellular localization of alpha1-adrenoceptors: chlorethylclonidine preferentially alkylates the accessible cell surface alpha1-adrenoceptors irrespective of the subtype. *Mol.Pharmacol.* **52**:764-770.

Holck MI (1988) Alpha 1-adrenoceptor reserve and effects of a Ca<sup>2+</sup> entry blocker (Ro 18-3981) on aorta of spontaneously hypertensive rats. *Eur.J.Pharmacol* **148**:9-15.

Holm J, Ravn J, and Ingemann HS (2006) Urinary excretion of alpha1-microglobulin and albumin in acute myocardial infarction. Correlation with plasma concentrations of troponin I and C-reactive protein. *Scand.J.Urol.Nephrol.* **40**:339-344.

Horinouchi T, Tanaka Y, and Koike K (2003) Function of beta1-adrenoceptors and mRNA expression of beta1- and beta2-adrenoceptors in guinea-pig esophagus. *Eur.J.Pharmacol.* **473**:79-82.

Hrometz SL, Edelmann SE, McCune DF, Olges JR, Hadley RW, Perez DM, and Piascik MT (1999) Expression of multiple alpha1-adrenoceptors on vascular smooth muscle: correlation with the regulation of contraction. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **290**:452-463.

Hu ZW, Shi XY, Okazaki M, and Hoffman BB (1995) Angiotensin II induces transcription and expression of alpha 1-adrenergic receptors in vascular smooth muscle cells. *Am.J.Physiol* **268**:H1006-H1014.

Hu ZW, Shi XY, Lin RZ, and Hoffman BB (1996) Alpha1 adrenergic receptors activate phosphatidylinositol 3-kinase in human vascular smooth muscle cells. Role in mitogenesis. *J.Biol.Chem.* **271**:8977-8982.

Huang Y, Wright CD, Merkwan CL, Baye NL, Liang Q, Simpson PC, and O'Connell TD (2007) An alpha1A-adrenergic-extracellular signal-regulated kinase survival signaling pathway in cardiac myocytes. *Circulation* **115**:763-772.

Hubbard KB and Hepler JR (2006) Cell signalling diversity of the Gqalpha family of heterotrimeric G proteins. *Cell Signal.* **18**:135-150.

Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Jessup M, Konstam MA, Mancini DM, Michl K, Oates JA, Rahko PS, Silver MA, Stevenson LW, Yancy CW, Antman EM, Smith SC, Jr., Adams CD, Anderson JL, Faxon DP, Fuster V, Halperin JL, Hiratzka LF, Jacobs AK, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, and Riegel B (2005) ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society. *Circulation* **112**:e154-e235.

Hunt SA (2008) Cardiac Transplantation and Prolonged Assisted Circulation, in *Harrison's Principles of Internal Medicine* (Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, and Loscalzo J eds) McGraw-Hill.

Hunt SC, Williams RR, and Barlow GK (1986) A comparison of positive family history definitions for defining risk of future disease. *J.Chronic.Dis.* **39**:809-821.

Hutri-Kahonen N, Kahonen M, Wu X, Sand J, Nordback I, Taurio J, and Porsti I (1999) Control of vascular tone in isolated mesenteric arterial segments from hypertensive patients. *Br.J.Pharmacol* **127**:1735-1743.

Hwang KC, Gray CD, Sweet WE, Moravec CS, and Im MJ (1996) Alpha 1-adrenergic receptor coupling with Gh in the failing human heart. *Circulation* **94**:718-726.

Hyltander A, Daneryd P, Sandstrom R, Korner U, and Lundholm K (2000) Beta-adrenoceptor activity and resting energy metabolism in weight losing cancer patients. *Eur.J.Cancer* **36**:330-334.

Iaccarino G, Rockman HA, Shotwell KF, Tomhave ED, and Koch WJ (1998) Myocardial overexpression of GRK3 in transgenic mice: evidence for in vivo selectivity of GRKs. *Am.J.Physiol* **275**:H1298-H1306.

Iaccarino G, Tomhave ED, Lefkowitz RJ, and Koch WJ (1998) Reciprocal in vivo regulation of myocardial G protein-coupled receptor kinase expression by beta-adrenergic receptor stimulation and blockade. *Circulation* **98**:1783-1789.

Iaccarino G, Dolber PC, Lefkowitz RJ, and Koch WJ (1999) Bbeta-adrenergic receptor kinase-1 levels in catecholamine-induced myocardial hypertrophy: regulation by beta- but not alpha1-adrenergic stimulation. *Hypertension* **33**:396-401.

Iaccarino G, Barbato E, Cipolleta E, Esposito A, Fiorillo A, Koch WJ, and Trimarco B (2001) Cardiac betaARK1 upregulation induced by chronic salt deprivation in rats. *Hypertension* **38**:255-260.

Iaccarino G, Barbato E, Cipolletta E, De A, V, Margulies KB, Leosco D, Trimarco B, and Koch WJ (2005) Elevated myocardial and lymphocyte GRK2 expression and activity in human heart failure. *Eur.Heart J.* **26**:1752-1758.

Ibarra M, Pardo JP, Lopez-Guerrero JJ, and Villalobos-Molina R (2000) Differential response to chloroethylclonidine in blood vessels of normotensive and spontaneously hypertensive rats: role of alpha 1D- and alpha 1A-adrenoceptors in contraction. *Br.J.Pharmacol.* **129**:653-660.

Ishizaka N, Alexander RW, Laursen JB, Kai H, Fukui T, Oppermann M, Lefkowitz RJ, Lyons PR, and Griendling KK (1997) G protein-coupled receptor kinase 5 in cultured vascular smooth muscle cells and rat aorta. Regulation by angiotensin II and hypertension. *J.Biol.Chem.* **272**:32482-32488.

Jaarsma T, Stromberg A, Martensson J, and Dracup K (2003) Development and testing of the European Heart Failure Self-Care Behaviour Scale. *Eur.J.Heart Fail.* **5**:363-370.

Jaber M, Koch WJ, Rockman H, Smith B, Bond RA, Sulik KK, Ross J, Jr., Lefkowitz RJ, Caron MG, and Giros B (1996) Essential role of beta-adrenergic receptor kinase 1 in cardiac development and function. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **93**:12974-12979.

Jackson CE, Solomon SD, Gerstein HC, Zetterstrand S, Olofsson B, Michelson EL, Granger CB, Swedberg K, Pfeffer MA, Yusuf S, and McMurray JJ (2009) Albuminuria in chronic heart failure: prevalence and prognostic importance. *Lancet* **374**:543-550.

Jensen BC, Swigart PM, Laden ME, DeMarco T, Hoopes C, and Simpson PC (2009) The alpha-1D is the predominant alpha-1-adrenergic receptor subtype in human epicardial coronary arteries. *J.Am.Coll.Cardiol.* **54**:1137-1145.

Jensen BC, Swigart PM, De Marco T, Hoopes C, and Simpson PC (2009) {alpha}1-Adrenergic Receptor Subtypes in Nonfailing and Failing Human Myocardium. *Circ.Heart Fail.* **2**:654-663.

Johnson M (1998) The beta-adrenoceptor. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **158**:S146-S153.

Johnson RD and Minneman KP (1987) Differentiation of alpha 1-adrenergic receptors linked to phosphatidylinositol turnover and cyclic AMP accumulation in rat brain. *Mol.Pharmacol.* **31**:239-246.

Jover B, Dupont M, Geelen G, Wahba W, Mimran A, and Corman B (1993) Renal and systemic adaptation to sodium restriction in aging rats. *Am.J.Physiol* **264**:R833-R838.

Kallal L, Gagnon AW, Penn RB, and Benovic JL (1998) Visualization of agonist-induced sequestration and down-regulation of a green fluorescent protein-tagged beta2-adrenergic receptor. *J.Biol.Chem.* **273**:322-328.

Kam KW, Qi JS, Chen M, and Wong TM (2004) Estrogen reduces cardiac injury and expression of beta1-adrenoceptor upon ischemic insult in the rat heart. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **309**:8-15.

Kannel WB (1996) Blood pressure as a cardiovascular risk factor: prevention and treatment. *JAMA* **275**:1571-1576.

Kaplan NM (2005) Hypertension in the population at large, in *Kaplan's Clinical Hypertension* pp 1-24, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore.

Kaumann AJ (1997) Four beta-adrenoceptor subtypes in the mammalian heart. *Trends Pharmacol.Sci* **18**:70-76.

Kaumann AJ and Molenaar P (1997) Modulation of human cardiac function through 4 beta-adrenoceptor populations. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **355**:667-681.

Kavelaars A (2002) Regulated expression of alpha-1 adrenergic receptors in the immune system. *Brain Behav.Immun.* **16**:799-807.

Kavelaars A, Vroon A, Raatgever RP, Fong AM, Premont RT, Patel DD, Lefkowitz RJ, and Heijnen CJ (2003) Increased acute inflammation, leukotriene B4-induced chemotaxis, and signaling in mice deficient for G protein-coupled receptor kinase 6. *J.Immunol.* **171**:6128-6134.

Kawahara RS and Bylund DB (1985) Solubilization and characterization of putative alpha-2 adrenergic isoceptors from the human platelet and the rat cerebral cortex. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **233**:603-610.

Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, and He J (2005) Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* **365**:217-223.

Keeton TK and Campbell WB (1980) The pharmacologic alteration of renin release. *Pharmacol Rev* **32**:81-227.

Kelly E, Bailey CP, and Henderson G (2008) Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *Br.J.Pharmacol.* **153 Suppl 1**:S379-S388.

Keys JR, Zhou RH, Harris DM, Druckman CA, and Eckhart AD (2005) Vascular smooth muscle overexpression of G protein-coupled receptor kinase 5 elevates blood pressure, which segregates with sex and is dependent on Gi-mediated signaling. *Circulation* **112**:1145-1153.

Kilts JD, Gerhardt MA, Richardson MD, Sreeram G, Mackensen GB, Grocott HP, White WD, Davis RD, Newman MF, Reves JG, Schwinn DA, and Kwatra MM (2000) Beta(2)-adrenergic and several other G protein-coupled receptors in human atrial membranes activate both G(s) and G(i). *Circ.Res.* **87**:705-709.

Kim HR, Appel S, Vetterkind S, Gangopadhyay SS, and Morgan KG (2008) Smooth muscle signalling pathways in health and disease. *J.Cell Mol.Med.* **12**:2165-2180.

Kim SM, Chen L, Faulhaber-Walter R, Oppermann M, Huang Y, Mizel D, Briggs JP, and Schnermann J (2007) Regulation of renin secretion and expression in mice deficient in beta1- and beta2-adrenergic receptors. *Hypertension* **50**:103-109.

Kin NW and Sanders VM (2006) It takes nerve to tell T and B cells what to do. *J.Leukoc.Biol.* **79**:1093-1104.

Klag MJ, Whelton PK, Randall BL, Neaton JD, Brancati FL, Ford CE, Shulman NB, and Stamler J (1996) Blood pressure and end-stage renal disease in men. *N.Engl.J.Med.* **334**:13-18.

Kobilka BK, Matsui H, Kobilka TS, Yang-Feng TL, Francke U, Caron MG, Lefkowitz RJ, and Regan JW (1987) Cloning, sequencing, and expression of the gene coding for the human platelet alpha 2-adrenergic receptor. *Science* **238**:650-656.

Koch WJ, Inglese J, Stone WC, and Lefkowitz RJ (1993) The binding site for the beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins on the beta-adrenergic receptor kinase. *J.Biol.Chem.* **268**:8256-8260.

Koch WJ, Rockman HA, Samama P, Hamilton RA, Bond RA, Milano CA, and Lefkowitz RJ (1995) Cardiac function in mice overexpressing the beta-adrenergic receptor kinase or a beta ARK inhibitor. *Science* **268**:1350-1353.

- Kohm AP and Sanders VM (2001) Norepinephrine and beta 2-adrenergic receptor stimulation regulate CD4+ T and B lymphocyte function in vitro and in vivo. *Pharmacol.Rev.* **53**:487-525.
- Kohout TA, Takaoka H, McDonald PH, Perry SJ, Mao L, Lefkowitz RJ, and Rockman HA (2001) Augmentation of cardiac contractility mediated by the human beta(3)-adrenergic receptor overexpressed in the hearts of transgenic mice. *Circulation* **104**:2485-2491.
- Kong JQ, Taylor DA, and Fleming WW (1991) Mesenteric vascular responses of young spontaneously hypertensive rats. *J.Pharmacol Exp.Ther.* **258**:13-17.
- Koshimizu TA, Tanoue A, Hirasawa A, Yamauchi J, and Tsujimoto G (2003) Recent advances in alpha1-adrenoceptor pharmacology. *Pharmacol.Ther.* **98**:235-244.
- Kotchen TA (2008) Hypertensive vascular disease, in *Harrison's Principles of Internal Medicine* (Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, and Loscalzo J eds) McGraw-Hill.
- Krueger KM, Daaka Y, Pitcher JA, and Lefkowitz RJ (1997) The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification. *J.Biol.Chem.* **272**:5-8.
- Kunapuli P and Benovic JL (1993) Cloning and expression of GRK5: a member of the G protein-coupled receptor kinase family. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **90**:5588-5592.
- Kunapuli P, Onorato JJ, Hosey MM, and Benovic JL (1994) Expression, purification, and characterization of the G protein-coupled receptor kinase GRK5. *J.Biol.Chem.* **269**:1099-1105.
- Kunos G, Robertson B, Kan WH, Preiksaitis H, and Mucci L (1978) Adrenergic reactivity of the myocardium in hypertension. *Life Sci* **22**:847-854.
- Kwan CY and Lee RM (1990) Changes of beta-adrenoceptors in the aortic muscle cells of spontaneously hypertensive rats. *Can.J.Physiol Pharmacol* **68**:1461-1468.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Lafontan M and Berlan M (1993) Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J.Lipid Res.* **34**:1057-1091.
- Lakhlani PP, Amenta F, Napoleone P, Felici L, and Eikenburg DC (1994) Pharmacological characterization and anatomical localization of prejunctional beta-adrenoceptors in the rat kidney. *Br.J.Pharmacol.* **111**:1296-1308.
- Lands AM (1952) Sympathetic receptor action. *Am.J.Physiol* **169**:11-21.
- Lands AM, Arnold A, McAuliff JP, Luduena FP, and Brown TG, Jr. (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.
- Langley JN (1901) Observations on the physiological action of extracts of the supra-renal bodies. *J.Physiol* **27**:237-256.
- Langley JN (1905) On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curari. *J.Physiol* **33**:374-413.

Lanier SM, Downing S, Duzic E, and Homcy CJ (1991) Isolation of rat genomic clones encoding subtypes of the alpha 2-adrenergic receptor. Identification of a unique receptor subtype. *J.Biol.Chem.* **266**:10470-10478.

Lee S, Schwinger RH, and Brixius K (2008) Genetically changed mice with chronic deficiency or overexpression of the beta-adrenoceptors--what can we learn for the therapy of heart failure? *Pflugers Arch.* **455**:767-774.

Lefkowitz RJ (1993) G protein-coupled receptor kinases. *Cell* **74**:409-412.

Lefkowitz RJ (2004) Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol.Sci.* **25**:413-422.

Leineweber K, Klapproth S, Beilfuss A, Silber RE, Heusch G, Philipp T, and Brodde OE (2003) Unchanged G-protein-coupled receptor kinase activity in the aging human heart. *J.Am.Coll.Cardiol.* **42**:1487-1492.

Leineweber K, Rohe P, Beilfuss A, Wolf C, Sporkmann H, Bruck H, Jakob HG, Heusch G, Philipp T, and Brodde OE (2005) G-protein-coupled receptor kinase activity in human heart failure: effects of beta-adrenoceptor blockade. *Cardiovasc.Res.* **66**:512-519.

Leineweber K and Heusch G (2009) Beta1- and beta2-adrenoceptor polymorphisms and cardiovascular diseases. *Br.J.Pharmacol* **158**:61-69.

Leonardi A, Sironi G, and Motta G (2000) Receptors in cardiovascular disease: review and introduction. *Pharm.Acta Helv.* **74**:157-161.

Levy D, Larson MG, Vasan RS, Kannel WB, and Ho KK (1996) The progression from hypertension to congestive heart failure. *JAMA* **275**:1557-1562.

Li H, Ma XQ, Ye F, Zhang J, Zhou X, Wang ZH, Li YM, and Zhang GY (2009) Expressions of cardiac sympathetic norepinephrine transporter and beta1-adrenergic receptor decreased in aged rats. *J.Zhejiang.Univ Sci B* **10**:203-210.

Li J, Cao YX, Liu H, and Xu CB (2007) Enhanced G-protein coupled receptors-mediated contraction and reduced endothelium-dependent relaxation in hypertension. *Eur.J.Pharmacol* **557**:186-194.

Lifton RP, Gharavi AG, and Geller DS (2001) Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* **104**:545-556.

Liggett SB, Freedman NJ, Schwinn DA, and Lefkowitz RJ (1993) Structural basis for receptor subtype-specific regulation revealed by a chimeric beta 3/beta 2-adrenergic receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **90**:3665-3669.

Liggett SB, Wagoner LE, Craft LL, Hornung RW, Hoit BD, McIntosh TC, and Walsh RA (1998) The Ile164 beta2-adrenergic receptor polymorphism adversely affects the outcome of congestive heart failure. *J.Clin.Invest* **102**:1534-1539.

Liggett SB, Tepe NM, Lorenz JN, Canning AM, Jantz TD, Mitarai S, Yatani A, and Dorn GW (2000) Early and delayed consequences of beta(2)-adrenergic receptor overexpression in mouse hearts: critical role for expression level. *Circulation* **101**:1707-1714.

Liggett SB, Mialet-Perez J, Thaneemit-Chen S, Weber SA, Greene SM, Hodne D, Nelson B, Morrison J, Domanski MJ, Wagoner LE, Abraham WT, Anderson JL, Carlquist JF, Krause-Steinrauf HJ, Lazzeroni LC,

Port JD, Lavori PW, and Bristow MR (2006) A polymorphism within a conserved beta(1)-adrenergic receptor motif alters cardiac function and beta-blocker response in human heart failure. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **103**:11288-11293.

Liggett SB, Cresci S, Kelly RJ, Syed FM, Matkovich SJ, Hahn HS, Diwan A, Martini JS, Sparks L, Parekh RR, Spertus JA, Koch WJ, Kardia SL, and Dorn GW (2008) A GRK5 polymorphism that inhibits beta-adrenergic receptor signaling is protective in heart failure. *Nat.Med.* **14**:510-517.

Light KC, Koepke JP, Obrist PA, and Willis PW (1983) Psychological stress induces sodium and fluid retention in men at high risk for hypertension. *Science* **220**:429-431.

Limas CJ and Limas C (1987) Altered intracellular adrenoceptor distribution in myocardium of spontaneously hypertensive rats. *Am.J.Physiol* **253**:H904-H908.

Lin FT, Krueger KM, Kendall HE, Daaka Y, Fredericks ZL, Pitcher JA, and Lefkowitz RJ (1997) Clathrin-mediated endocytosis of the beta-adrenergic receptor is regulated by phosphorylation/dephosphorylation of beta-arrestin1. *J.Biol.Chem.* **272**:31051-31057.

Linardi A, Panunto PC, Ferro ES, and Hyslop S (2004) Peptidase activities in rats treated chronically with N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME). *Biochem.Pharmacol.* **68**:205-214.

Linne Y, Dahlman I, and Hoffstedt J (2005) beta1-Adrenoceptor gene polymorphism predicts long-term changes in body weight. *Int.J.Obes.(Lond)* **29**:458-462.

Liu S, Premont RT, Kontos CD, Zhu S, and Rockey DC (2005) A crucial role for GRK2 in regulation of endothelial cell nitric oxide synthase function in portal hypertension. *Nat.Med.* **11**:952-958.

Livak KJ and 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.

Lohse MJ, Lefkowitz RJ, Caron MG, and Benovic JL (1989) Inhibition of beta-adrenergic receptor kinase prevents rapid homologous desensitization of beta 2-adrenergic receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **86**:3011-3015.

Lohse MJ, Benovic JL, Caron MG, and Lefkowitz RJ (1990) Multiple pathways of rapid beta 2-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors. *J.Biol.Chem.* **265**:3202-3211.

Lohse MJ, Andexinger S, Pitcher J, Trukawinski S, Codina J, Faure JP, Caron MG, and Lefkowitz RJ (1992) Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems. *J.Biol.Chem.* **267**:8558-8564.

Lohse MJ, Engelhardt S, and Eschenhagen T (2003) What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ.Res.* **93**:896-906.

Lomasney JW, Cotecchia S, Lorenz W, Leung WY, Schwinn DA, Yang-Feng TL, Brownstein M, Lefkowitz RJ, and Caron MG (1991) Molecular cloning and expression of the cDNA for the alpha 1A-adrenergic receptor. The gene for which is located on human chromosome 5. *J.Biol.Chem.* **266**:6365-6369.

Lopez RM, Ortiz CS, Ruiz A, Velez JM, Castillo C, and Castillo EF (2004) Impairment of smooth muscle function of rat thoracic aorta in an endothelium-independent manner by long-term administration of N(G)-nitro-L-arginine methyl ester. *Fundam.Clin.Pharmacol* **18**:669-677.

Loveland BE, Jarrott B, and McKenzie IF (1981) The detection of beta-adrenoceptors on murine lymphocytes. *Int.J.Immunopharmacol.* **3**:45-55.

Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, Lin F, Kawakatsu H, Owada K, Luttrell DK, Caron MG, and Lefkowitz RJ (1999) Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* **283**:655-661.

Lymperopoulos A, Rengo G, Funakoshi H, Eckhart AD, and Koch WJ (2007) Adrenal GRK2 upregulation mediates sympathetic overdrive in heart failure. *Nat.Med.* **13**:315-323.

Lynch GS and Ryall JG (2008) Role of beta-adrenoceptor signaling in skeletal muscle: implications for muscle wasting and disease. *Physiol Rev.* **88**:729-767.

Lyssand JS, Defino MC, Tang XB, Hertz AL, Feller DB, Wacker JL, Adams ME, and Hague C (2008) Blood pressure is regulated by an alpha1D-adrenergic receptor/dystrophin signalosome. *J.Biol.Chem.* **283**:18792-18800.

Lyubarsky AL, Chen C, Simon MI, and Pugh EN, Jr. (2000) Mice lacking G-protein receptor kinase 1 have profoundly slowed recovery of cone-driven retinal responses. *J.Neurosci.* **20**:2209-2217.

Maehle AH (2004) "Receptive substances": John Newport Langley (1852-1925) and his path to a receptor theory of drug action. *Med.Hist* **48**:153-174.

Maie S, Ohusuzu F, Katsushika S, Akanuma M, Aosaki N, Nakamura H, and Ohashi H (1991) Enhanced beta-adrenergic signal transduction in spontaneously hypertensive rats. *Clin.Exp.Pharmacol Physiol* **18**:671-673.

Mallem MY, Toumaniantz G, Serpillon S, Gautier F, Gogny M, Desfontis JC, and Gauthier C (2004) Impairment of the low-affinity state beta1-adrenoceptor-induced relaxation in spontaneously hypertensive rats. *Br.J.Pharmacol* **143**:599-605.

Mallem Y, Holopherne D, Reculeau O, Le Coz O, Desfontis JC, and Gogny M (2005) Beta-adrenoceptor-mediated vascular relaxation in spontaneously hypertensive rats. *Auton.Neurosci.* **118**:61-67.

Malloy BJ, Price DT, Price RR, Bienstock AM, Dole MK, Funk BL, Rudner XL, Richardson CD, Donatucci CF, and Schwinn DA (1998) Alpha1-adrenergic receptor subtypes in human detrusor. *J.Urol.* **160**:937-943.

Mancia G, Ferrari A, Gregorini L, Parati G, Pomidossi G, Bertinieri G, Grassi G, di Rienzo M, Pedotti A, and Zanchetti A (1983) Blood pressure and heart rate variabilities in normotensive and hypertensive human beings. *Circ.Res.* **53**:96-104.

Mancia G, Facchetti R, Bombelli M, Grassi G, and Sega R (2006) Long-term risk of mortality associated with selective and combined elevation in office, home, and ambulatory blood pressure. *Hypertension* **47**:846-853.

Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, Grassi G, Heagerty AM, Kjeldsen SE, Laurent S, Narkiewicz K, Ruilope L, Rynkiewicz A, Schmieder RE, Boudier HA, Zanchetti A, Vahanian A, Camm J, De Caterina R, Dean V, Dickstein K, Filippatos G, Funck-Brentano C, Hellemans I, Kristensen SD, McGregor K, Sechtem U, Silber S, Tendera M, Widimsky P, Zamorano JL, Erdine S, Kiowski W, Agabiti-Rosei E, Ambrosioni E, Lindholm LH, Viigimaa M, Adamopoulos S, Agabiti-Rosei E, Ambrosioni E, Bertomeu V, Clement D, Erdine S, Farsang C, Gaita D, Lip G, Mallion JM, Manolis AJ, Nilsson PM, O'Brien E, Ponikowski P, Redon J, Ruschitzka F, Tamargo J, van Zwieten P, Waeber B, and Williams B (2007) 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the

Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J.Hypertens.* **25**:1105-1187.

Mann DL (2008) Heart Failure and Cor Pulmonale, in *Harrison's Principles of Internal Medicine* (Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, and Loscalzo J eds) McGraw-Hill.

Marshall I, Burt RP, and Chapple CR (1995) Noradrenaline contractions of human prostate mediated by alpha 1A-(alpha 1c-) adrenoceptor subtype. *Br.J.Pharmacol.* **115**:781-786.

Marti D, Miquel R, Ziani K, Gisbert R, Ivorra MD, Anselmi E, Moreno L, Villagrasa V, Baretino D, and 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**:H1923-H1932.

Martin-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Tunon J, Munoz-Garcia B, Madrigal-Matute J, Moreno JA, Vega dC, and Egido J (2009) Biomarkers in cardiovascular medicine. *Rev Esp.Cardiol.* **62**:677-688.

Matsumori Y, Ohyanagi M, Kawamoto H, Shibata R, and Iwasaki T (1989) Intracellular distribution of cardiac beta-adrenoceptors in SHR and WKY. *Jpn.Circ.J.* **53**:113-120.

Mayor F, Jr., Penela P, and Ruiz-Gomez A (1998) Role of G protein-coupled receptor kinase 2 and arrestins in beta-adrenergic receptor internalization. *Trends Cardiovasc.Med.* **8**:234-240.

Mayor F, Jr. and Penela P (2003) Mecanismos de regulación de receptores heptahélicos acoplados a proteínas G, in *Receptores para neurotransmisores* (Garcia-Sevilla JA and Pazos A eds) pp 263-279, Ediciones en Neurociencias.

McCune DF, Edelman SE, Olges JR, Post GR, Waldrop BA, Waugh DJ, Perez DM, and Piascik MT (2000) Regulation of the cellular localization and signaling properties of the alpha(1B)- and alpha(1D)-adrenoceptors by agonists and inverse agonists. *Mol.Pharmacol.* **57**:659-666.

McGrath JC (1982) Evidence for more than one type of post-junctional alpha-adrenoceptor. *Biochem.Pharmacol.* **31**:467-484.

Mehra MR, Kobashigawa JA, Deng MC, Fang KC, Klingler TM, Lal PG, Rosenberg S, Uber PA, Starling RC, Murali S, Pauly DF, Dedrick R, Walker MG, Zeevi A, and Eisen HJ (2007) Transcriptional signals of T-cell and corticosteroid-sensitive genes are associated with future acute cellular rejection in cardiac allografts. *J.Heart Lung Transplant.* **26**:1255-1263.

Mertens MJ, Batink HD, Pfaffendorf M, and van Zwieten PA (1991) Depressed inotropic response to alpha 1-adrenoceptor agonists in hearts from spontaneously hypertensive rats. *J.Hypertens.Suppl* **9**:S66-S67.

Mertens MJ, Batink HD, Pfaffendorf M, and van Zwieten PA (1992) Impaired inotropic response to alpha 1- but not to beta-adrenoceptor stimulation in isolated hearts from spontaneously hypertensive rats. *J.Hypertens.* **10**:143-148.

Metaye T, Gibelin H, Perdrisot R, and Kraimps JL (2005) Pathophysiological roles of G-protein-coupled receptor kinases. *Cell Signal.* **17**:917-928.

Michel MC, Beckeringh JJ, Ikezono K, Kretsch R, and Brodde OE (1986) Lymphocyte beta 2-adrenoceptors mirror precisely beta 2-adrenoceptor, but poorly beta 1-adrenoceptor changes in the human heart. *J.Hypertens.Suppl* **4**:S215-S218.

Michel MC, Wang XL, Schlicker E, Gothert M, Beckeringh JJ, and Brodde OE (1987) Increased beta 2-adrenoreceptor density in heart, kidney and lung of spontaneously hypertensive rats. *J.Auton.Pharmacol* **7**:41-51.

Michel MC, Kanczik R, Khamssi M, Knorr A, Siegl H, Beckeringh JJ, and Brodde OE (1989) Alpha and beta-adrenoceptors in hypertension. I. Cardiac and renal alpha 1-, beta 1-, and beta 2-adrenoceptors in rat models of acquired hypertension. *J.Cardiovasc.Pharmacol* **13**:421-431.

Michel MC, Insel PA, and Brodde OE (1989) Renal alpha-adrenergic receptor alterations: a cause of essential hypertension? *FASEB J.* **3**:139-144.

Michel MC, Brodde OE, and Insel PA (1990) Peripheral adrenergic receptors in hypertension. *Hypertension* **16**:107-120.

Michel MC, Siepmann F, Buscher R, Philipp T, and Brodde OE (1993) Ontogenesis of sympathetic responsiveness in spontaneously hypertensive rats. I. Renal alpha 1-, alpha 2-, and beta-adrenergic receptors and their signaling. *Hypertension* **22**:169-177.

Michel MC and Vrydag W (2006) Alpha1-, alpha2- and beta-adrenoceptors in the urinary bladder, urethra and prostate. *Br.J.Pharmacol.* **147 Suppl 2**:S88-119.

Michelotti GA, Price DT, and Schwinn DA (2000) Alpha 1-adrenergic receptor regulation: basic science and clinical implications. *Pharmacol.Ther.* **88**:281-309.

Milano CA, Dolber PC, Rockman HA, Bond RA, Venable ME, Allen LF, and Lefkowitz RJ (1994) Myocardial expression of a constitutively active alpha 1B-adrenergic receptor in transgenic mice induces cardiac hypertrophy. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **91**:10109-10113.

Milano CA, Allen LF, Rockman HA, Dolber PC, McMinn TR, Chien KR, Johnson TD, Bond RA, and Lefkowitz RJ (1994) Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the beta 2-adrenergic receptor. *Science* **264**:582-586.

Miller JW, Hu ZW, Okazaki M, Fujinaga M, and Hoffman BB (1996) Expression of alpha 1 adrenergic receptor subtype mRNAs in the rat cardiovascular system with aging. *Mech.Ageing Dev.* **87**:75-89.

Minneman KP, Hegstrand LR, and Molinoff PB (1979) Simultaneous determination of beta-1 and beta-2-adrenergic receptors in tissues containing both receptor subtypes. *Mol.Pharmacol.* **16**:34-46.

Minneman KP (1988) Alpha 1-adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates, and sources of cell Ca<sup>2+</sup>. *Pharmacol.Rev.* **40**:87-119.

Minneman KP, Theroux TL, Hollinger S, Han C, and Esbenshade TA (1994) Selectivity of agonists for cloned alpha 1-adrenergic receptor subtypes. *Mol.Pharmacol.* **46**:929-936.

Miquel R, Gisbert R, Serna E, Perez-Vizcaino F, Anselmi E, Noguera MA, Ivorra MD, and D'Ocon MP (2005) Acute and chronic captopril, but not prazosin or nifedipine, normalize alterations in adrenergic intracellular Ca<sup>2+</sup> handling observed in the mesenteric arterial tree of spontaneously hypertensive rats. *J.Pharmacol Exp.Ther.* **313**:359-367.

Modesti PA, Morabito M, Bertolozzi I, Massetti L, Panci G, Lumachi C, Giglio A, Bilo G, Caldara G, Lonati L, Orlandini S, Maracchi G, Mancina G, Gensini GF, and Parati G (2006) Weather-related changes in 24-hour blood pressure profile: effects of age and implications for hypertension management. *Hypertension* **47**:155-161.

Molenaar P, Bartel S, Cochrane A, Vetter D, Jalali H, Pohlner P, Burrell K, Karczewski P, Krause EG, and Kaumann A (2000) Both beta(2)- and beta(1)-adrenergic receptors mediate hastened relaxation and phosphorylation of phospholamban and troponin I in ventricular myocardium of Fallot infants, consistent with selective coupling of beta(2)-adrenergic receptors to G(s)-protein. *Circulation* **102**:1814-1821.

Molenaar P and Parsonage WA (2005) Fundamental considerations of beta-adrenoceptor subtypes in human heart failure. *Trends Pharmacol.Sci* **26**:368-375.

Molenaar P, Chen L, Semmler AB, Parsonage WA, and Kaumann AJ (2007) Human heart beta-adrenoceptors: beta1-adrenoceptor diversification through 'affinity states' and polymorphism. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* **34**:1020-1028.

Moncada S, Palmer RM, and Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* **43**:109-142.

Moncada S and Higgs EA (2006) The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br.J.Pharmacol* **147 Suppl 1**:S193-S201.

Moniotte S, Kobzik L, Feron O, Trochu JN, Gauthier C, and Balligand JL (2001) Upregulation of beta(3)-adrenoceptors and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardium. *Circulation* **103**:1649-1655.

Monto F, Vicente D, Oliver E, Baretino D, Rueda J, Agüero J, Almenar L, and D'Ocon P (2009) beta-ARs and GRKs cardiac expression levels change in heart failure and correlate to clinical variables. *Methods. Find.Exp.Clin.Pharmacol* **31**:139 (P-094).

Morimoto A, Hasegawa H, Cheng HJ, Little WC, and Cheng CP (2004) Endogenous beta3-adrenoreceptor activation contributes to left ventricular and cardiomyocyte dysfunction in heart failure. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **286**:H2425-H2433.

Morisco C, Zebrowski DC, Vatner DE, Vatner SF, and Sadoshima J (2001) Beta-adrenergic cardiac hypertrophy is mediated primarily by the beta(1)-subtype in the rat heart. *J.Mol.Cell Cardiol.* **33**:561-573.

Moriyama N, Nasu K, Takeuchi T, Akiyama K, Murata S, Nishimatsu H, Yano J, Tsujimoto G, and Kawabe K (1997) Quantification and distribution of alpha 1-adrenoceptor subtype mRNAs in human vas deferens: comparison with those of epididymal and pelvic portions. *Br.J.Pharmacol.* **122**:1009-1014.

Morris DP, Price RR, Smith MP, Lei B, and Schwinn DA (2004) Cellular trafficking of human alpha1a-adrenergic receptors is continuous and primarily agonist-independent. *Mol.Pharmacol.* **66**:843-854.

Morrow AL and Creese I (1986) Characterization of alpha 1-adrenergic receptor subtypes in rat brain: a reevaluation of [3H]WB4104 and [3H]prazosin binding. *Mol.Pharmacol.* **29** :321-330.

Mulvany MJ and Nyborg N (1980) An increased calcium sensitivity of mesenteric resistance vessels in young and adult spontaneously hypertensive rats. *Br.J.Pharmacol* **71**:585-596.

Muramatsu I, Ohmura T, Kigoshi S, Hashimoto S, and Oshita M (1990) Pharmacological subclassification of alpha 1-adrenoceptors in vascular smooth muscle. *Br.J.Pharmacol.* **99**:197-201.

Muramatsu I, Ohmura T, and Kigoshi S (1995) Pharmacological profiles of a novel alpha 1-adrenoceptor agonist, PNO-49B, at alpha 1-adrenoceptor subtypes. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **351**:2-9.

Muramatsu I, Morishima S, Suzuki F, Yoshiki H, Anisuzzaman AS, Tanaka T, Rodrigo MC, Myagmar BE, and Simpson PC (2008) Identification of alpha 1L-adrenoceptor in mice and its abolition by alpha 1A-adrenoceptor gene knockout. *Br.J.Pharmacol.* **155**:1224-1234.

Neylon CB and Summers RJ (1985) [3H]-rauwolscine binding to alpha 2-adrenoceptors in the mammalian kidney: apparent receptor heterogeneity between species. *Br.J.Pharmacol.* **85**:349-359.

Nijkamp FP, Engels F, Henricks PA, and Van Oosterhout AJ (1992) Mechanisms of beta-adrenergic receptor regulation in lungs and its implications for physiological responses. *Physiol Rev.* **72**:323-367.

Nishizuka Y (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* **308**:693-698.

Noguera MA and D'Ocon MP (1993) Evidence that depletion of internal calcium stores sensitive to noradrenaline elicits a contractile response dependent on extracellular calcium in rat aorta. *Br.J.Pharmacol* **110**:861-867.

Noma T, Lemaire A, Naga Prasad SV, Barki-Harrington L, Tilley DG, Chen J, Le Corvoisier P, Violin JD, Wei H, Lefkowitz RJ, and Rockman HA (2007) Beta-arrestin-mediated beta1-adrenergic receptor transactivation of the EGFR confers cardioprotection. *J.Clin.Invest* **117**:2445-2458.

O'Brien E, Asmar R, Beilin L, Imai Y, Mallion JM, Mancia G, Mengden T, Myers M, Padfield P, Palatini P, Parati G, Pickering T, Redon J, Staessen J, Stergiou G, and Verdecchia P (2003) European Society of Hypertension recommendations for conventional, ambulatory and home blood pressure measurement. *J.Hypertens.* **21**:821-848.

O'Connell TD, Ishizaka S, Nakamura A, Swigart PM, Rodrigo MC, Simpson GL, Cotecchia S, Rokosh DG, Grossman W, Foster E, and Simpson PC (2003) The alpha(1A/C)- and alpha(1B)-adrenergic receptors are required for physiological cardiac hypertrophy in the double-knockout mouse. *J.Clin.Invest* **111**:1783-1791.

O'Donnell SR and Wanstall JC (1984) Beta-1 and beta-2 adrenoceptor-mediated responses in preparations of pulmonary artery and aorta from young and aged rats. *J.Pharmacol Exp.Ther.* **228**:733-738.

Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, and Caron MG (1999) Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J.Biol.Chem.* **274**:32248-32257.

Ohmura T, Oshita M, Kigoshi S, and Muramatsu I (1992) Identification of alpha 1-adrenoceptor subtypes in the rat vas deferens: binding and functional studies. *Br.J.Pharmacol.* **107**:697-704.

Ohshiro Y, Hayashi M, Yabiku K, Ueda K, Wakasaki H, Ishigame M, Furuta H, Nishi M, Sasaki H, Takasu N, and Nanjo K (2008) Mutations in the beta1 adrenergic receptor gene and massive obesity in Japanese. *Diabetes Res.Clin Pract.* **80**:213-217.

Ohsuzu F, Katsushika S, Maie S, Akanuma M, Yanagida S, Sakata N, Ishida H, Aosaki N, and Nakamura H (1992) Enhanced myocardial adenylate cyclase activity in spontaneously hypertensive rats. *Jpn.Circ.J.* **56**:301-309.

Okamoto K and Aoki K (1963) Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn.Circ.J.* **27**:282-293.

- Oliver E, Marti D, Rovira E, Valldecabres C, Muedra V, Barettino D, and D'Ocon P (2006) Differences in the mRNA levels of beta1, beta2, alpha1 adrenergic receptors subtypes, and of GRK2 and GRK3 in peripheral blood lymphocytes of hypertensive patients. *Methods.Find.Exp.Clin.Pharmacol.* **28**:98 (P-018).
- Oliver E, Rovira E, Monto F, Valldecabres C, Julve R, Muedra V, Ruiz N, Barettino D, and D'Ocon P (2010) beta-Adrenoceptor and GRK3 expression in human lymphocytes is related to blood pressure and urinary albumin excretion. *J.Hypertens.* **28**(6):1281-1289.
- Oparil S, Meng QC, Chen YF, Yang RH, Jin HK, and Wyss JM (1988) Genetic basis of NaCl-sensitive hypertension. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **12 Suppl 3**:S56-S69.
- Oppermann M, Diverse-Pierluissi M, Drazner MH, Dyer SL, Freedman NJ, Peppel KC, and Lefkowitz RJ (1996) Monoclonal antibodies reveal receptor specificity among G-protein-coupled receptor kinases. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **93**:7649-7654.
- Osborn JL, DiBona GF, and Thames MD (1981) Beta-1 receptor mediation of renin secretion elicited by low-frequency renal nerve stimulation. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **216**:265-269.
- Osborn JL, Holdaas H, Thames MD, and DiBona GF (1983) Renal adrenoceptor mediation of antinatriuretic and renin secretion responses to low frequency renal nerve stimulation in the dog. *Circ.Res.* **53**:298-305.
- Oyama N, Urasawa K, Kaneta S, Sakai H, Saito T, Takagi C, Yoshida I, Kitabatake A, and Tsutsui H (2005) Chronic beta-adrenergic receptor stimulation enhances the expression of G-Protein coupled receptor kinases, GRK2 and GRK5, in both the heart and peripheral lymphocytes. *Circ.J.* **69**:987-990.
- Palczewski K, McDowell JH, and Hargrave PA (1988) Purification and characterization of rhodopsin kinase. *J.Biol.Chem.* **263**:14067-14073.
- Parfyonova EV, Korichneva IL, Suvorov YI, and Krasnikova TL (1988) Characteristics of lymphocyte beta-adrenoceptors in essential hypertension: effects of propranolol treatment and dynamic exercise. *Health Psychol.* **7 Suppl**:33-52.
- Parruti G, Ambrosini G, Sallese M, and de Blasi A (1993) Molecular cloning, functional expression and mRNA analysis of human beta-adrenergic receptor kinase 2. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **190**:475-481.
- Passmore JC, Joshua IG, Rowell PP, Tyagi SC, and Falcone JC (2005) Reduced alpha adrenergic mediated contraction of renal preglomerular blood vessels as a function of gender and aging. *J.Cell Biochem.* **96**:672-681.
- Pechanova O, Bernatova I, Pelouch V, and Simko F (1997) Protein remodelling of the heart in NO-deficient hypertension: the effect of captopril. *J.Mol.Cell Cardiol.* **29**:3365-3374.
- Pediani JD, Colston JF, Caldwell D, Milligan G, Daly CJ, and McGrath JC (2005) Beta-arrestin-dependent spontaneous alpha1a-adrenoceptor endocytosis causes intracellular transportation of alpha-blockers via recycling compartments. *Mol.Pharmacol.* **67**:992-1004.
- Pedrinelli R, Dell'Omo G, Penno G, and Mariani M (2001) Non-diabetic microalbuminuria, endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Vasc.Med.* **6**:257-264.
- Pei G, Tiberi M, Caron MG, and Lefkowitz RJ (1994) An approach to the study of G-protein-coupled receptor kinases: an in vitro-purified membrane assay reveals differential receptor specificity and regulation by G beta gamma subunits. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **91**:3633-3636.

Penela P, Ruiz-Gomez A, Castano JG, and Mayor F, Jr. (1998) Degradation of the G protein-coupled receptor kinase 2 by the proteasome pathway. *J.Biol.Chem.* **273**:35238-35244.

Penela P, Ribas C, and Mayor F, Jr. (2003) Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases. *Cell Signal.* **15**:973-981.

Penela P, Murga C, Ribas C, Tutor AS, Peregrin S, and Mayor F, Jr. (2006) Mechanisms of regulation of G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and cardiovascular disease. *Cardiovasc.Res.* **69**:46-56.

Penn RB, Pronin AN, and Benovic JL (2000) Regulation of G protein-coupled receptor kinases. *Trends Cardiovasc.Med.* **10**:81-89.

Perez DM, Piascik MT, and Graham RM (1991) Solution-phase library screening for the identification of rare clones: isolation of an alpha 1D-adrenergic receptor cDNA. *Mol.Pharmacol.* **40**:876-883.

Perticone F, Maio R, Tripepi G, Sciacqua A, Mallamaci F, and Zoccali C (2007) Microalbuminuria, endothelial dysfunction and inflammation in primary hypertension. *J.Nephrol.* **20 Suppl 12**:S56-S62.

Pérez-Aso M, Oliver E, D'Ocon MP, and Noguera MA (2008) Intracellular calcium changes mediated by alpha1- or beta-adrenoceptors in human Jurkat T lymphocyte cell line. *Methods.Find.Exp.Clin Pharmacol.* **30**:168 (P-104).

Pérez-Aso, M (2010) Caracterización de la señalización intracelular tras la activación de receptores adrenérgicos. *Tesis Doctoral.* Universitat de Valencia.

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**:e45.

Philipp M and Hein L (2004) Adrenergic receptor knockout mice: distinct functions of 9 receptor subtypes. *Pharmacol.Ther.* **101**:65-74.

Piascik MT, Guarino RD, Smith MS, Soltis EE, Saussy DL, Jr., and 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.

Piascik MT, Hrometz SL, Edelmann SE, Guarino RD, Hadley RW, and 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.

Piascik MT and Perez DM (2001) Alpha1-adrenergic receptors: new insights and directions. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **298**:403-410.

Pierce KL, Premont RT, and Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **3**:639-650.

Ping P, Anzai T, Gao M, and Hammond HK (1997) Adenylyl cyclase and G protein receptor kinase expression during development of heart failure. *Am.J.Physiol* **273**:H707-H717.

Pippig S, Andexinger S, and Lohse MJ (1995) Sequestration and recycling of beta 2-adrenergic receptors permit receptor resensitization. *Mol.Pharmacol.* **47**:666-676.

Pitcher JA, Inglese J, Higgins JB, Arriza JL, Casey PJ, Kim C, Benovic JL, Kwatra MM, Caron MG, and Lefkowitz RJ (1992) Role of beta gamma subunits of G proteins in targeting the beta-adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors. *Science* **257**:1264-1267.

Pitcher JA, Payne ES, Csontos C, DePaoli-Roach AA, and Lefkowitz RJ (1995) The G-protein-coupled receptor phosphatase: a protein phosphatase type 2A with a distinct subcellular distribution and substrate specificity. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **92**:8343-8347.

Pitcher JA, Freedman NJ, and Lefkowitz RJ (1998) G protein-coupled receptor kinases. *Annu.Rev.Biochem.* **67**:653-692.

Ponicke K, Vogelsang M, Heinroth M, Becker K, Zolk O, Bohm M, Zerkowski HR, and Brodde OE (1998) Endothelin receptors in the failing and nonfailing human heart. *Circulation* **97**:744-751.

Port JD and Bristow MR (2001) Altered beta-adrenergic receptor gene regulation and signaling in chronic heart failure. *J.Mol.Cell Cardiol.* **33**:887-905.

Porter JP (1992) beta-Adrenoceptor modulation of renin response to short-term reductions in pressure in young SHR. *Am.J.Physiol* **263**:R405-R411.

Portillo MP, Rocandio AM, Garcia-Calonge MA, Diaz E, Campo E, Martinez-Blazquez C, Errasti J, and Del Barrio 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.

Potter K, Hankey GJ, Green DJ, Eikelboom JW, and Arnolda LF (2008) Homocysteine or renal impairment: which is the real cardiovascular risk factor? *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **28**:1158-1164.

Premont RT, Macrae AD, Stoffel RH, Chung N, Pitcher JA, Ambrose C, Inglese J, MacDonald ME, and Lefkowitz RJ (1996) Characterization of the G protein-coupled receptor kinase GRK4. Identification of four splice variants. *J.Biol.Chem.* **271**:6403-6410.

Premont RT and Gainetdinov RR (2007) Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annu.Rev.Physiol* **69**:511-534.

Price DT, Lefkowitz RJ, Caron MG, Berkowitz D, and Schwinn DA (1994) Localization of mRNA for three distinct alpha 1-adrenergic receptor subtypes in human tissues: implications for human alpha-adrenergic physiology. *Mol.Pharmacol.* **45**:171-175.

Priest RM, Hucks D, and Ward JP (1997) Noradrenaline, beta-adrenoceptor mediated vasorelaxation and nitric oxide in large and small pulmonary arteries of the rat. *Br.J.Pharmacol.* **122**:1375-1384.

Pucci ML, Lin L, and Nasjletti A (1992) Pressor and renal vasoconstrictor effects of NG-nitro-L-arginine as affected by blockade of pressor mechanisms mediated by the sympathetic nervous system, angiotensin, prostanoids and vasopressin. *J.Pharmacol Exp.Ther.* **261**:240-245.

Putney JW, Jr. (1986) A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* **7**:1-12.

Raake PW, Vinge LE, Gao E, Boucher M, Rengo G, Chen X, DeGeorge BR, Jr., Matkovich S, Houser SR, Most P, Eckhart AD, Dorn GW, and Koch WJ (2008) G protein-coupled receptor kinase 2 ablation in cardiac myocytes before or after myocardial infarction prevents heart failure. *Circ.Res.* **103**:413-422.

Ramos-Ruiz R, Penela P, Penn RB, and Mayor F, Jr. (2000) Analysis of the human G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) gene promoter: regulation by signal transduction systems in aortic smooth muscle cells. *Circulation* **101**:2083-2089.



Ramos BP and Arnsten AF (2007) Adrenergic pharmacology and cognition: focus on the prefrontal cortex. *Pharmacol. Ther.* **113**:523-536.

Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC, Burghammer M, Ratnala VR, Sanishvili R, Fischetti RF, Schertler GF, Weis WI, and Kobilka BK (2007) Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **450**:383-387.

Rautureau Y, Toumaniantz G, Serpillon S, Jourdon P, Trochu JN, and Gauthier C (2002) Beta 3-adrenoceptor in rat aorta: molecular and biochemical characterization and signalling pathway. *Br.J.Pharmacol.* **137**:153-161.

Redon J, Rovira E, Miralles A, Julve R, and Pascual JM (2002) Factors related to the occurrence of microalbuminuria during antihypertensive treatment in essential hypertension. *Hypertension* **39**:794-798.

Regan JW, Kobilka TS, Yang-Feng TL, Caron MG, Lefkowitz RJ, and Kobilka BK (1988) Cloning and expression of a human kidney cDNA for an alpha 2-adrenergic receptor subtype. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **85**:6301-6305.

Reithmann C, von Scheidt W, and Werdan K (1996) Beta-adrenoceptor desensitization despite cardiac denervation in human failing transplanted myocardium. *Int.J.Cardiol.* **56**:11-15.

Rembold CM (1992) Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. *Hypertension* **20**:129-137.

Rettig R, Stauss H, Folberth C, Ganten D, Waldherr B, and Unger T (1989) Hypertension transmitted by kidneys from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am.J.Physiol* **257**:F197-F203.

Ribas C, Penela P, Murga C, Salcedo A, Garcia-Hoz C, Jurado-Pueyo M, Aymerich I, and Mayor F, Jr. (2007) The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling. *Biochim.Biophys.Acta* **1768**:913-922.

Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, Lovisollo SM, and Zatz R (1992) Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension* **20**:298-303.

Ricci A, Bronzetti E, Conterno A, Greco S, Mulatero P, Schena M, Schiavone D, Tayebati SK, Veglio F, and Amenta F (1999) alpha1-adrenergic receptor subtypes in human peripheral blood lymphocytes. *Hypertension* **33**:708-712.

Rockman HA, Choi DJ, Rahman NU, Akhter SA, Lefkowitz RJ, and Koch WJ (1996) Receptor-specific in vivo desensitization by the G protein-coupled receptor kinase-5 in transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **93**:9954-9959.

Rockman HA, Chien KR, Choi DJ, Iaccarino G, Hunter JJ, Ross J, Jr., Lefkowitz RJ, and Koch WJ (1998) Expression of a beta-adrenergic receptor kinase 1 inhibitor prevents the development of myocardial failure in gene-targeted mice. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **95**:7000-7005.

Rockman HA, Choi DJ, Akhter SA, Jaber M, Giros B, Lefkowitz RJ, Caron MG, and Koch WJ (1998) Control of myocardial contractile function by the level of beta-adrenergic receptor kinase 1 in gene-targeted mice. *J.Biol.Chem.* **273**:18180-18184.

Rodriguez M, Carillon C, Coquerel A, Le Fur G, Ferrara P, Caput D, and Shire D (1995) Evidence for the presence of beta 3-adrenergic receptor mRNA in the human brain. *Brain Res.Mol.Brain Res.* **29**:369-375.

Rohrer DK and Kobilka BK (1998) Insights from in vivo modification of adrenergic receptor gene expression. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **38**:351-373.

Rokosh DG and Simpson PC (2002) Knockout of the alpha 1A/C-adrenergic receptor subtype: the alpha 1A/C is expressed in resistance arteries and is required to maintain arterial blood pressure. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **99**:9474-9479.

Roupe vd, V, Kavelaars A, van de PM, and Heijnen CJ (1999) Neuroendocrine mediators up-regulate alpha1b- and alpha1d-adrenergic receptor subtypes in human monocytes. *J.Neuroimmunol.* **95**:165-173.

Roupe vd, V, Kavelaars A, van de PM, and Heijnen CJ (2000) Noradrenaline induces phosphorylation of ERK-2 in human peripheral blood mononuclear cells after induction of alpha(1)-adrenergic receptors. *J.Neuroimmunol.* **108**:82-91.

Rozec B and Gauthier C (2006) beta3-adrenoceptors in the cardiovascular system: putative roles in human pathologies. *Pharmacol.Ther.* **111**:652-673.

Rudner XL, Berkowitz DE, Booth JV, Funk BL, Cozart KL, D'Amico EB, El Moalem H, Page SO, Richardson CD, Winters B, Marucci L, and Schwinn DA (1999) Subtype specific regulation of human vascular alpha(1)-adrenergic receptors by vessel bed and age. *Circulation* **100**:2336-2343.

Ruffolo RR, Jr., Nichols AJ, Stadel JM, and Hieble JP (1991) Structure and function of alpha-adrenoceptors. *Pharmacol.Rev.* **43**:475-505.

Rybin VO, Xu X, Lisanti MP, and Steinberg SF (2000) Differential targeting of beta -adrenergic receptor subtypes and adenylyl cyclase to cardiomyocyte caveolae. A mechanism to functionally regulate the cAMP signaling pathway. *J.Biol.Chem.* **275**:41447-41457.

Samama P, Cotecchia S, Costa T, and Lefkowitz RJ (1993) A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J.Biol.Chem.* **268**:4625-4636.

Sanders VM and Straub RH (2002) Norepinephrine, the beta-adrenergic receptor, and immunity. *Brain Behav.Immun.* **16**:290-332.

Sattar MA and Johns EJ (1995) alpha1-Adrenoceptor subtypes mediating antinatriuresis in Wistar and stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Eur.J.Pharmacol.* **294**:727-736.

Satwani S, Dec GW, and Narula J (2004) Beta-adrenergic blockers in heart failure: review of mechanisms of action and clinical outcomes. *J.Cardiovasc.Pharmacol Ther.* **9**:243-255.

Sbirrazzuoli V and Lapalus P (1989) Human lymphocyte and myocardial beta-adrenoceptors: up and down regulation. *Biomed.Pharmacother.* **43**:369-374.

Scharin TM, Lindberg E, Gruner SB, Magnusson Y, and Andersson B (2007) Cardiac reserve in the transplanted heart: effect of a graft polymorphism in the beta1-adrenoceptor. *J.Heart Lung Transplant.* **26**:915-920.

Schiffelers SL, van Harmelen VJ, de Grauw HA, Saris WH, and van Baak MA (1999) Dobutamine as selective beta(1)-adrenoceptor agonist in in vivo studies on human thermogenesis and lipid utilization. *J.Appl.Physiol* **87**:977-981.

Schmieder RE, Schrader J, Zidek W, Tebbe U, Paar WD, Bramlage P, Pittrow D, and Bohm M (2007) Low-grade albuminuria and cardiovascular risk : what is the evidence? *Clin.Res.Cardiol.* **96**:247-257.

Schroeder JS (2003) Trasplante Cardíaco, in *Harrison: Principios de Medicina Interna* (Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, and Jameson JL eds) pp 1563-1566, McGraw-Hill Interamericana.

Schulz R, Rassaf T, Massion PB, Kelm M, and Balligand JL (2005) Recent advances in the understanding of the role of nitric oxide in cardiovascular homeostasis. *Pharmacol. Ther.* **108**:225-256.

Schutzer WE, Reed JF, Bliziotis M, and Mader SL (2001) Upregulation of G protein-linked receptor kinases with advancing age in rat aorta. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* **280**:R897-R903.

Schwarz B, Percy E, Gao XM, Dart AM, Richardt G, and Du XJ (2003) Altered calcium transient and development of hypertrophy in beta2-adrenoceptor overexpressing mice with and without pressure overload. *Eur.J.Heart Fail.* **5**:131-136.

Schwinn DA, Lomasney JW, Lorenz W, Szklut PJ, Fremeau RT, Jr., Yang-Feng TL, Caron MG, Lefkowitz RJ, and Cotecchia S (1990) Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel alpha 1-adrenergic receptor subtype. *J.Biol.Chem.* **265**:8183-8189.

Schwinn DA, Page SO, Middleton JP, Lorenz W, Liggett SB, Yamamoto K, Lapetina EG, Caron MG, Lefkowitz RJ, and Cotecchia S (1991) The alpha 1C-adrenergic receptor: characterization of signal transduction pathways and mammalian tissue heterogeneity. *Mol.Pharmacol.* **40**:619-626.

Scriba D, Aprath-Husmann I, Blum WF, and Hauner H (2000) Catecholamines suppress leptin release from in vitro differentiated subcutaneous human adipocytes in primary culture via beta1- and beta2-adrenergic receptors. *Eur.J.Endocrinol.* **143**:439-445.

Sega R, Cesana G, Bombelli M, Grassi G, Stella ML, Zanchetti A, and Mancia G (1998) Seasonal variations in home and ambulatory blood pressure in the PAMELA population. *Pressione Arteriose Monitorate E Loro Associazioni. J.Hypertens.* **16**:1585-1592.

Shenoy SK, McDonald PH, Kohout TA, and Lefkowitz RJ (2001) Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science* **294**:1307-1313.

Siegrist J, Peter R, Motz W, and Strauer BE (1992) The role of hypertension, left ventricular hypertrophy and psychosocial risks in cardiovascular disease: prospective evidence from blue-collar men. *Eur.Heart J.* **13 Suppl D**:89-95.

Simon V, Robin MT, Legrand C, and Cohen-Tannoudji J (2003) Endogenous G protein-coupled receptor kinase 6 triggers homologous beta-adrenergic receptor desensitization in primary uterine smooth muscle cells. *Endocrinology* **144**:3058-3066.

Simpson P (1983) Norepinephrine-stimulated hypertrophy of cultured rat myocardial cells is an alpha 1 adrenergic response. *J.Clin.Invest* **72**:732-738.

Smith JA, Shah AM, and Lewis MJ (1991) Factors released from endocardium of the ferret and pig modulate myocardial contraction. *J.Physiol* **439**:1-14.

Soloveva V, Graves RA, Rasenick MM, Spiegelman BM, and Ross SR (1997) Transgenic mice overexpressing the beta 1-adrenergic receptor in adipose tissue are resistant to obesity. *Mol.Endocrinol.* **11**:27-38.

Somers RL and Klein DC (1984) Rhodopsin kinase activity in the mammalian pineal gland and other tissues. *Science* **226**:182-184.

Starke K, Montel H, Gayk W, and Merker R (1974) Comparison of the effects of clonidine on pre- and postsynaptic adrenoceptors in the rabbit pulmonary artery. Alpha-sympathomimetic inhibition of Neurogenic vasoconstriction. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **285**:133-150.

Starke K, Endo T, and Taube HD (1975) Pre- and postsynaptic components in effect of drugs with alpha adrenoceptor affinity. *Nature* **254**:440-441.

Starke K, Borowski E, and Endo T (1975) Preferential blockade of presynaptic alpha-adrenoceptors by yohimbine. *Eur.J.Pharmacol.* **34**:385-388.

Stassen FR, Willemsen MJ, Janssen GM, and DeMey JG (1997) Alpha 1-adrenoceptor subtypes in rat aorta and mesenteric small arteries are preserved during left ventricular dysfunction post-myocardial infarction. *Cardiovasc.Res.* **33**:706-713.

Steinfath M, Chen YY, Lavicky J, Magnussen O, Nose M, Rosswag S, Schmitz W, and Scholz H (1992) Cardiac alpha 1-adrenoceptor densities in different mammalian species. *Br.J.Pharmacol* **107**:185-188.

Steinfath M, von der LH, Hecht A, Neumann KH, Schmitz W, Scholz H, Haverich A, and Heublein B (1992) Decrease in beta 1- and increase in beta 2-adrenoceptors in long-term follow-up after orthotopic cardiac transplantation. *J.Mol.Cell Cardiol.* **24**:1189-1198.

Stephenson RP (1956) A modification of receptor theory. *Br.J.Pharmacol.Chemother.* **11**:379-393.

Sterin-Borda L, Bernabeo G, Ganzinelli S, Joensen L, and Borda E (2006) Role of nitric oxide/cyclic GMP and cyclic AMP in beta3 adrenoceptor-chronotropic response. *J.Mol.Cell Cardiol.* **40**:580-588.

Sterne-Marr R and Benovic JL (1995) Regulation of G protein-coupled receptors by receptor kinases and arrestins. *Vitam.Horm.* **51**:193-234.

Stewart S, MacIntyre K, Hole DJ, Capewell S, and McMurray JJ (2001) More 'malignant' than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure. *Eur.J.Heart Fail.* **3**:315-322.

Stone EA, Lin Y, Itteera A, and Quartermain D (2001) Pharmacological evidence for the role of central alpha 1B-adrenoceptors in the motor activity and spontaneous movement of mice. *Neuropharmacology* **40**:254-261.

Streb H, Irvine RF, Berridge MJ, and Schulz I (1983) Release of Ca<sup>2+</sup> from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* **306**:67-69.

Strosberg AD (1997) Structure and function of the beta 3-adrenergic receptor. *Annu.Rev Pharmacol Toxicol.* **37**:421-450.

Strosberg AD, Gerhardt CC, Gros J, Jockers R, and Pietri-Rouxel F (1998) On the putative existence of a fourth beta-adrenoceptor: proof is still missing. *Trends in Pharmacological Sciences* **19**:165-166.

Suarez Garcia I, Gomez Cerezo JF, Rios Blanco JJ, Barbado Hernandez FJ, and Vazquez Rodriguez JJ (2001) [Homocysteine. The cardiovascular risk factor of the next millennium?]. *An.Med.Interna* **18**:211-217.

Summers RJ and Kuhar MJ (1983) Autoradiographic localization of beta-adrenoceptors in rat kidney. *Eur.J.Pharmacol.* **91**:305-310.

Szabo G, Bahrle S, Braun M, Stumpf N, Vahl CF, and Hagl S (2002) Modulation of catecholamine responsiveness and beta-adrenergic receptor/adenylyl cyclase pathway during cardiac allograft rejection. *Transplantation* **73**:535-540.

Takata Y and Kato H (1996) Adrenoceptors in SHR: alterations in binding characteristics and intracellular signal transduction pathways. *Life Sci* **58**:91-106.

Takemoto M, Egashira K, Usui M, Numaguchi K, Tomita H, Tsutsui H, Shimokawa H, Sueishi K, and Takeshita A (1997) Important role of tissue angiotensin-converting enzyme activity in the pathogenesis of coronary vascular and myocardial structural changes induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. *J.Clin.Invest* **99** :278-287.

Tamaoki J, Tagaya E, Isono K, and Nagai A (1998) Atypical adrenoceptor-mediated relaxation of canine pulmonary artery through a cAMP-dependent pathway. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **248**:722-727.

Tanaka Y, Horinouchi T, and Koike K (2005) New insights into beta-adrenoceptors in smooth muscle: distribution of receptor subtypes and molecular mechanisms triggering muscle relaxation. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* **32**:503-514.

Tanoue A, Nasa Y, Koshimizu T, Shinoura H, Oshikawa S, Kawai T, Sunada S, Takeo S, and Tsujimoto G (2002) The alpha(1D)-adrenergic receptor directly regulates arterial blood pressure via vasoconstriction. *J.Clin.Invest* **109**:765-775.

Tanoue A, Koba M, Miyawaki S, Koshimizu TA, Hosoda C, Oshikawa S, and Tsujimoto G (2002) Role of the alpha1D-adrenergic receptor in the development of salt-induced hypertension. *Hypertension* **40**:101-106.

Tanoue A, Koshimizu TA, Shibata K, Nasa Y, Takeo S, and Tsujimoto G (2003) Insights into alpha1 adrenoceptor function in health and disease from transgenic animal studies. *Trends Endocrinol.Metab* **14**:107-113.

Tayebati SK, Bronzetti E, Morra DC, Mulatero P, Ricci A, Rossodivita I, Schena M, Schiavone D, Veglio F, and Amenta F (2000) In situ hybridization and immunocytochemistry of alpha1-adrenoceptors in human peripheral blood lymphocytes. *J.Auton.Pharmacol.* **20**:305-312.

Taylor DO, Edwards LB, Boucek MM, Trulock EP, Deng MC, Keck BM, and Hertz MI (2005) Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-second official adult heart transplant report--2005. *J.Heart Lung Transplant.* **24**:945-955.

Taylor DO, Stehlik J, Edwards LB, Aurora P, Christie JD, Dobbels F, Kirk R, Kucheryavaya AY, Rahmel AO, and Hertz MI (2009) Registry of the international society for heart and lung transplantation: twenty-sixth official adult heart transplant report-2009. *J.Heart Lung Transplant.* **28**:1007-1022.

The criteria committee of the New York Hear Academy (1994) *Nomenclature and Criteria for Diagnosis of diseases of the heart and great vessels*. Little, Brown & Company.

Theroux TL, Esbenshade TA, Peavy RD, and Minneman KP (1996) Coupling efficiencies of human alpha 1-adrenergic receptor subtypes: titration of receptor density and responsiveness with inducible and repressible expression vectors. *Mol.Pharmacol.* **50**:1376-1387.

Thompson MM, Oyama TT, Kelly FJ, Kennefick TM, and Anderson S (2000) Activity and responsiveness of the renin-angiotensin system in the aging rat. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* **279**:R1787-R1794.

Thorsby E and Bratlie A (1970) A rapid method for preparation of pure lymphocyte suspensions, in *Histocompatibility Testing* (P.I.Terasaki ed) pp 665-666.

Tonolo G, Melis MG, Secchi G, Atzeni MM, Angius MF, Carboni A, Ciccarese M, Malavasi A, and Maioli M (1999) Association of Trp64Arg beta 3-adrenergic-receptor gene polymorphism with essential hypertension in the Sardinian population. *J.Hypertens.* **17**:33-38.

Touhara K, Koch WJ, Hawes BE, and Lefkowitz RJ (1995) Mutational analysis of the pleckstrin homology domain of the beta-adrenergic receptor kinase. Differential effects on G beta gamma and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate binding. *J.Biol.Chem.* **270**:17000-17005.

Townsend SA, Jung AS, Hoe YS, Lefkowitz RY, Khan SA, Lemmon CA, Harrison RW, Lee K, Barouch LA, Cotecchia S, Shoukas AA, Nyhan D, Hare JM, and Berkowitz DE (2004) Critical role for the alpha-1B adrenergic receptor at the sympathetic neuroeffector junction. *Hypertension* **44**:776-782.

Trochu JN, Leblais V, Rautureau Y, Beverelli F, Le Marec H, Berdeaux A, and 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.

Tsao P, Cao T, and von Zastrow M (2001) Role of endocytosis in mediating downregulation of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol.Sci* **22**:91-96.

Tsao PI and von Zastrow M (2001) Diversity and specificity in the regulated endocytic membrane trafficking of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol.Ther.* **89**:139-147.

Turnbull L, McCloskey DT, O'Connell TD, Simpson PC, and Baker AJ (2003) Alpha 1-adrenergic receptor responses in alpha 1AB-AR knockout mouse hearts suggest the presence of alpha 1D-AR. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **284**:H1104-H1109.

Ungerer M, Bohm M, Elce JS, Erdmann E, and Lohse MJ (1993) Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation* **87**:454-463.

Ungerer M, Parruti G, Bohm M, Puzicha M, DeBlasi A, Erdmann E, and Lohse MJ (1994) Expression of beta-arrestins and beta-adrenergic receptor kinases in the failing human heart. *Circ.Res.* **74**:206-213.

Valdizan EM and Pazos A (2003) Biología y estructura molecular de las proteínas G, in *Receptores para neurotransmisores* (Garcia-Sevilla JA and Pazos A eds) pp 263-279, Ediciones en Neurociencias.

Vallance P, Collier J, and Moncada S (1989) Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* **2**:997-1000.

van de Wal RM, Asselbergs FW, Plokker HW, Smilde TD, Lok D, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH, and Voors AA (2005) High prevalence of microalbuminuria in chronic heart failure patients. *J.Card Fail.* **11**:602-606.

Vanhoutte PM (2001) Endothelial adrenoceptors. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **38**:796-808.

Veglio F, Tayebati SK, Schiavone D, Ricci A, Mulatero P, Bronzetti E, Rabbia F, and Amenta F (2001) Alpha1-adrenergic receptor subtypes in peripheral blood lymphocytes of essential hypertensives. *J.Hypertens.* **19**:1847-1854.

Vila E, Tabernero A, and Ivorra MD (1993) Inositol phosphate formation and contractile response linked to alpha 1-adrenoceptor in tail artery and aorta from spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *J.Cardiovasc.Pharmacol* **22**:191-197.

Villalobos-Molina R and 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, and Ibarra M (1997) Alpha 1D- and alpha 1A-adrenoceptors mediate contraction in rat renal artery. *Eur.J.Pharmacol.* **322**:225-227.

Villalobos-Molina R and Ibarra M (1999) Vascular alpha 1D-adrenoceptors: are they related to hypertension? *Arch.Med.Res.* **30**:347-352.

Villalobos-Molina R, Lopez-Guerrero JJ, and Ibarra M (1999) Functional evidence of alpha1D-adrenoceptors in the vasculature of young and adult spontaneously hypertensive rats. *Br.J.Pharmacol.* **126**:1534-1536.

Vinge LE, Oie E, Andersson Y, Groggaard HK, Andersen G, and Attramadal H (2001) Myocardial distribution and regulation of GRK and beta-arrestin isoforms in congestive heart failure in rats. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **281**:H2490-H2499.

Vinge LE, Andressen KW, Attramadal T, Andersen GO, Ahmed MS, Peppel K, Koch WJ, Freedman NJ, Levy FO, Skomedal T, Osnes JB, and Attramadal H (2007) Substrate specificities of G protein-coupled receptor kinase-2 and -3 at cardiac myocyte receptors provide basis for distinct roles in regulation of myocardial function. *Mol.Pharmacol.* **72**:582-591.

Vinge LE, von Lueder TG, Aasum E, Qvigstad E, Gravning JA, How OJ, Edvardsen T, Bjornerheim R, Ahmed MS, Mikkelsen BW, Oie E, Attramadal T, Skomedal T, Smiseth OA, Koch WJ, Larsen TS, and Attramadal H (2008) Cardiac-restricted expression of the carboxyl-terminal fragment of GRK3 Uncovers Distinct Functions of GRK3 in regulation of cardiac contractility and growth: GRK3 controls cardiac alpha1-adrenergic receptor responsiveness. *J.Biol.Chem.* **283**:10601-10610.

Vroon A, Heijnen CJ, Lombardi MS, Cobelens PM, Mayor F, Jr., Caron MG, and Kavelaars A (2004) Reduced GRK2 level in T cells potentiates chemotaxis and signaling in response to CCL4. *J.Leukoc.Biol.* **75**:901-909.

Vroon A, Heijnen CJ, Raatgever R, Touw IP, Ploemacher RE, Premont RT, and Kavelaars A (2004) GRK6 deficiency is associated with enhanced CXCR4-mediated neutrophil chemotaxis in vitro and impaired responsiveness to G-CSF in vivo. *J.Leukoc.Biol.* **75**:698-704.

Waldeck B (2002) Beta-adrenoceptor agonists and asthma--100 years of development. *Eur.J.Pharmacol.* **445**:1-12.

Walker JK, Peppel K, Lefkowitz RJ, Caron MG, and Fisher JT (1999) Altered airway and cardiac responses in mice lacking G protein-coupled receptor kinase 3. *Am.J.Physiol* **276**:R1214-R1221.

Walker JK, Gainetdinov RR, Feldman DS, McFawn PK, Caron MG, Lefkowitz RJ, Premont RT, and Fisher JT (2004) G protein-coupled receptor kinase 5 regulates airway responses induced by muscarinic receptor activation. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **286**:L312-L319.

Wang TJ, Evans JC, Meigs JB, Rifai N, Fox CS, D'Agostino RB, Levy D, and Vasan RS (2005) Low-grade albuminuria and the risks of hypertension and blood pressure progression. *Circulation* **111**:1370-1376.

Wang W, Zhu W, Wang S, Yang D, Crow MT, Xiao RP, and Cheng H (2004) Sustained beta1-adrenergic stimulation modulates cardiac contractility by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase signaling pathway. *Circ.Res.* **95**:798-806.

- Wang WC, Mhlbachler KA, Bleecker ER, Weiss ST, and Liggett SB (2008) A polymorphism of G-protein coupled receptor kinase5 alters agonist-promoted desensitization of beta2-adrenergic receptors. *Pharmacogenet.Genomics* **18**:729-732.
- Warne T, Serrano-Vega MJ, Baker JG, Moukhametzianov R, Edwards PC, Henderson R, Leslie AG, Tate CG, and Schertler GF (2008) Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **454**:486-491.
- Watanabe K, Shibata A, Wakabayashi H, Shimada K, Tsuchihashi H, Kinami J, and Nagatomo T (1991) Changes in alpha 1- and beta 1-adrenergic receptors and calcium ion binding sites in the fetal myocardium of spontaneously hypertensive rats (SHR). *J.Pharmacobiodyn.* **14**:182-186.
- Weinshank RL, Zgombick JM, Macchi M, Adham N, Lichtblau H, Branchek TA, and Hartig PR (1990) Cloning, expression, and pharmacological characterization of a human alpha 2B-adrenergic receptor. *Mol.Pharmacol.* **38**:681-688.
- Weiss ER, Raman D, Shirakawa S, Ducceschi MH, Bertram PT, Wong F, Kraft TW, and Osawa S (1998) The cloning of GRK7, a candidate cone opsin kinase, from cone- and rod-dominant mammalian retinas. *Mol.Vis.* **4**:27.
- Weiss ER, Ducceschi MH, Horner TJ, Li A, Craft CM, and Osawa S (2001) Species-specific differences in expression of G-protein-coupled receptor kinase (GRK) 7 and GRK1 in mammalian cone photoreceptor cells: implications for cone cell phototransduction. *J.Neurosci.* **21**:9175-9184.
- Weller M, Virmaux N, and Mandel P (1975) Light-stimulated phosphorylation of rhodopsin in the retina: the presence of a protein kinase that is specific for photobleached rhodopsin. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **72**:381-385.
- Werner C, Werdan K, Ponicke K, and Brodde OE (2001) Impaired beta-adrenergic control of immune function in patients with chronic heart failure: reversal by beta1-blocker treatment. *Basic Res.Cardiol.* **96**:290-298.
- White DC, Hata JA, Shah AS, Glower DD, Lefkowitz RJ, and Koch WJ (2000) Preservation of myocardial beta-adrenergic receptor signaling delays the development of heart failure after myocardial infarction. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **97**:5428-5433.
- White M, Roden R, Minobe W, Khan MF, Larrabee P, Wollmering M, Port JD, Anderson F, Campbell D, Feldman AM, and . (1994) Age-related changes in beta-adrenergic neuroeffector systems in the human heart. *Circulation* **90**:1225-1238.
- Whitworth JA (2003) 2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *J.Hypertens.* **21**:1983-1992.
- Williams B, Poulter NR, Brown MJ, Davis M, McInnes GT, Potter JF, Sever PS, and McG TS (2004) Guidelines for management of hypertension: report of the fourth working party of the British Hypertension Society, 2004-BHS IV. *J.Hum.Hypertens.* **18**:139-185.
- Williams GH, Dluhy RG, Lifton RP, Moore TJ, Gleason R, Williams R, Hunt SC, Hopkins PN, and Hollenberg NK (1992) Non-modulation as an intermediate phenotype in essential hypertension. *Hypertension* **20**:788-796.
- Williams GH (2003) Vasculopatía hipertensiva, in *Harrison: Principios de Medicina Interna* (Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, and Jameson JL eds) pp 1660-1678, McGraw-Hill Interamericana.

Williams LT, Snyderman R, and Lefkowitz RJ (1976) Identification of beta-adrenergic receptors in human lymphocytes by (-) (3H) alprenolol binding. *J.Clin.Invest* **57**:149-155.

Wilson SK (1991) Peripheral alpha-1 and alpha-2 adrenergic receptors in three models of hypertension in rats: an in vitro autoradiography study. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **256**:801-810.

Wolff DW, Dang HK, Liu MF, Jeffries WB, and Scofield MA (1998) Distribution of alpha1-adrenergic receptor mRNA species in rat heart. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **32**:117-122.

Woodcock EA, Du XJ, Reichelt ME, and Graham RM (2008) Cardiac alpha 1-adrenergic drive in pathological remodelling. *Cardiovasc.Res.* **77**:452-462.

World Health Organization (2002) *The World Health Report 2002: Risks to Health*. World Health Organization, Geneva.

Wu DQ, Lee CH, Rhee SG, and Simon MI (1992) Activation of phospholipase C by the alpha subunits of the Gq and G11 proteins in transfected Cos-7 cells. *J.Biol.Chem.* **267**:1811-1817.

Wu Q, Zhao Z, Sun H, Hao YL, Yan CD, and Gu SL (2008) Oestrogen changed cardiomyocyte contraction and beta-adrenoceptor expression in rat hearts subjected to ischaemia-reperfusion. *Exp.Physiol* **93**:1034-1043.

Xiao RP, Ji X, and Lakatta EG (1995) Functional coupling of the beta 2-adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. *Mol.Pharmacol.* **47**:322-329.

Xiao RP, Tomhave ED, Wang DJ, Ji X, Boluyt MO, Cheng H, Lakatta EG, and Koch WJ (1998) Age-associated reductions in cardiac beta1- and beta2-adrenergic responses without changes in inhibitory G proteins or receptor kinases. *J.Clin.Invest* **101**:1273-1282.

Xiao RP, Zhu W, Zheng M, Chakir K, Bond R, Lakatta EG, and Cheng H (2004) Subtype-specific beta-adrenoceptor signaling pathways in the heart and their potential clinical implications. *Trends Pharmacol.Sci* **25**:358-365.

Xiao RP, Zhu W, Zheng M, Cao C, Zhang Y, Lakatta EG, and Han Q (2006) Subtype-specific alpha1- and beta-adrenoceptor signaling in the heart. *Trends Pharmacol.Sci* **27**:330-337.

Xie HG, Kim RB, Stein CM, Gainer JV, Brown NJ, and Wood AJ (1999) Alpha1A-adrenergic receptor polymorphism: association with ethnicity but not essential hypertension. *Pharmacogenetics* **9**:651-656.

Xin X, Yang N, Eckhart AD, and Faber JE (1997) Alpha1D-adrenergic receptors and mitogen-activated protein kinase mediate increased protein synthesis by arterial smooth muscle. *Mol.Pharmacol.* **51**:764-775.

Xu K, Lu Z, Wei H, Zhang Y, and Han C (1998) Alteration of alpha1-adrenoceptor subtypes in aortas of 12-month-old spontaneously hypertensive rats. *Eur.J.Pharmacol* **344**:31-36.

Yamada S, Ishima T, Tomita T, Hayashi M, and Hayashi E (1982) Increased renal beta-adrenoceptors in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Eur.J.Pharmacol* **83**:149-150.

Yamada S, Ishima T, Tomita T, Hayashi M, Okada T, and Hayashi E (1984) Alterations in cardiac alpha and beta adrenoceptors during the development of spontaneous hypertension. *J.Pharmacol Exp.Ther.* **228**:454-460.

- Yamori Y (1984) The development of Spontaneously Hypertensive Rat (SHR) and of various spontaneous rat models, and their implications, in *Handbook of Hypertension. Vol. 4. Experimental and genetic models of hypertension* (de Jong W ed) pp 224-239, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford.
- Yndestad A, Holm AM, Muller F, Simonsen S, Froland SS, Gullestad L, and Aukrust P (2003) Enhanced expression of inflammatory cytokines and activation markers in T-cells from patients with chronic heart failure. *Cardiovasc.Res.* **60**:141-146.
- Yoshida M and Satoh S (1991) Role of renal nerves on pressure natriuresis in spontaneously hypertensive rats. *Am.J.Physiol* **260**:F81-F85.
- Yu XY, Lin SG, Wang XM, Liu Y, Zhang B, Lin QX, Yang M, and Zhou SF (2007) Evidence for coexistence of three beta-adrenoceptor subtypes in human peripheral lymphocytes. *Clin.Pharmacol.Ther.* **81**:654-658.
- Yusuf S, Theodoropoulos S, Mathias CJ, Dhalla N, Wittes J, Mitchell A, and Yacoub M (1987) Increased sensitivity of the denervated transplanted human heart to isoprenaline both before and after beta-adrenergic blockade. *Circulation* **75**:696-704.
- Zeng C, Villar VA, Eisner GM, Williams SM, Felder RA, and Jose PA (2008) G protein-coupled receptor kinase 4: role in blood pressure regulation. *Hypertension* **51**:1449-1455.
- Zhang J, Ferguson SS, Barak LS, Menard L, and Caron MG (1996) Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J.Biol.Chem.* **271**:18302-18305.
- Zhang T, Maier LS, Dalton ND, Miyamoto S, Ross J, Jr., Bers DM, and Brown JH (2003) The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ.Res.* **92**:912-919.
- Zheng M, Zhu W, Han Q, and Xiao RP (2005) Emerging concepts and therapeutic implications of beta-adrenergic receptor subtype signaling. *Pharmacol.Ther.* **108**:257-268.
- Zhu WZ, Zheng M, Koch WJ, Lefkowitz RJ, Kobilka BK, and Xiao RP (2001) Dual modulation of cell survival and cell death by beta(2)-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **98**:1607-1612.
- Zhu WZ, Wang SQ, Chakir K, Yang D, Zhang T, Brown JH, Devic E, Kobilka BK, Cheng H, and Xiao RP (2003) Linkage of beta1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II. *J.Clin.Invest* **111**:617-625.
- Zhu X, Chang YP, Yan D, Weder A, Cooper R, Luke A, Kan D, and Chakravarti A (2003) Associations between hypertension and genes in the renin-angiotensin system. *Hypertension* **41**:1027-1034.
- Ziani K, Gisbert R, Noguera MA, Ivorra MD, and 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**:H475-H481.
- Zuscik MJ, Chalothorn D, Hellard D, Deighan C, McGee A, Daly CJ, Waugh DJ, Ross SA, Gaivin RJ, Morehead AJ, Thomas JD, Plow EF, McGrath JC, Piascik MT, and Perez DM (2001) Hypotension, autonomic failure, and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing the alpha 1B-adrenergic receptor. *J.Biol.Chem.* **276**:13738-13743.



