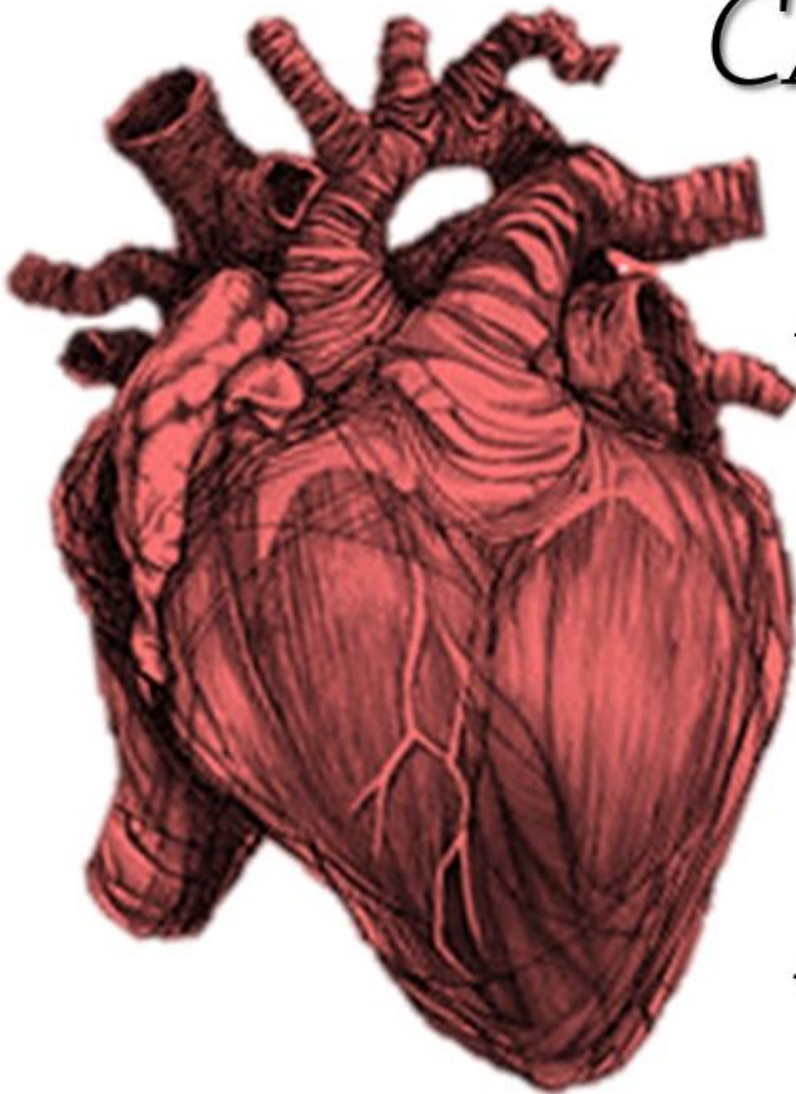


PROGRAMA DE DOCTORADO
FARMACOLOGÍA

VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



Fermí J. Montó Guillot



*CAMBIOS EN LA
EXPRESIÓN DE
ADRENOCEPTORES
Y GRK EN
INSUFICIENCIA
CARDICA E
HIPERTENSIÓN
ARTERIAL*

TESIS DOCTORAL DEC 20





VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA (Q*) Facultat de Farmàcia

Programa de doctorado en FARMACOLOGÍA

CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE ADRENOCEPTORES Y GRK EN INSUFICIENCIA CARDIACA E HIPERTENSIÓN ARTERIAL

Fermí Josep Montó Guillot
Valencia, Diciembre 2015



VNIVERSITATIS VALÈNCIAE

Facultat de Farmàcia

Departament de Farmacologia

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

CERTIFICA:

Que la memoria titulada: “*Cambios en la expresión de adrenoceptores y GRK en insuficiencia cardíaca e hipertensión arterial*”, realizada por el Ldo. en Farmacia ***D. Fermí Josep Montó Guillot***, 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 26 de octubre de 2015

Dña. Pilar D'Ocon Navaza

A mi padre

Agradecimientos

Disculpen si me extiendo en este apartado de agradecimientos, pero estarán de acuerdo conmigo que 10 años dan para mucho. Múltiples serían los calificativos con que podría definir esta década de mi vida que empezó a mediados del mes de septiembre de 2005 hasta el día de hoy. 10 años de formación, experiencias y amistades. Numerosas son las personas con las que me he podido cruzar durante este período en el Departamento de Farmacología, de los cuales, algunos han pasado de ser simples compañeros de trabajo a ser grandes amigos e incluso, sin exagerar, a formar parte esencial de mi vida.

Dedicar y agradecer a todas las personas con las que he trabajado en el laboratorio durante estos años, ya que cada una de ellas forma parte de esta tesis. Pero permítanme que la principal dedicatoria y homenaje vaya destinado a mi padre, que desgraciadamente nos dejó durante mi periodo de doctorando. Él me enseñó los principales valores de la vida, como es el respeto hacia el prójimo, la constancia para conseguir mis objetivos y la honradez. Y por ello, con mi idioma materno y dirigiendo la mirada al cielo, “Pare, allí on estigues, esta tesis va per tu” .

Agradecer a mi familia a la cual le debo todo lo que soy. A mi madre por apoyarme en todos mis objetivos y enseñarme a elegir el camino correcto, “Te vuic mare” . A Ana, mi hermana, una de las personas que más quiero, por acompañarme en esta apasionante aventura de la vida. Mi cuñado Borja por su forma de alegrarnos la vida. A mis sobrinos Marcel ·la y Marc a los que adoro. Y a todos mis tíos/as y primos/as por sus ánimos en este último escalón hacia la obtención del título de doctor.

No quiero dejar de nombrar a seres tan queridos como mi madrina-tía Pili, mi tía Maruja, mis abuelos (Fermín y Mercedes / José y María) y mis tíos-abuelos Lola, Amparo, Luis y Noreta. Mención a Maruja Maset que me quiso como una madre. Maravillosas personas todas ellas, que nos dejaron y que estarían orgullosos de verme como doctor.

En lo que respecta a mi estancia en el departamento de la Farmacología, no se imaginan la cantidad de gente con la que me he podido cruzar, trabajar y simpatizar durante 10 años en el laboratorio, estudiantes de prácticas, doctorandos, profesores, directores, extranjeros de estancias o Erasmus, técnicos, PAS, PDI, etc... cada uno de ellos son artífices de este trabajo, son sin duda un pedacito de esta tesis. Aunque la ciencia e investigación sean los principales protagonistas de la tesis, sin el calor humano y la amistad de toda esta gente me hubiera sido imposible su desarrollo. Me gustaría dedicar unas palabras de agradecimiento a cada una de estas personas con las que he trabajado o colaborado, hecho que me va a ser imposible por la gran cantidad de gente que son. Y aunque dejaré plasmado el nombre de cada uno de ellos en

esta tesis como reconocimiento a su cariño, me explayaré un poco más en aquellas que me han acompañado de cerca.

En primer lugar agradecer a Pilar D'Ócon en darme la gran oportunidad de poder trabajar en una de mis pasiones, la investigación. Mientras otros no confiaban en “mi no excelente expediente académico” , desde el primer día Pilar me dio la facilidad y animó para incorporarme a su grupo de investigación. De profesora y madrina de promoción de licenciatura, a directora de tesis, en todo momento ha estado dispuesta a ayudarme y ha depositado su confianza en mí en importantes menesteres y tareas del día a día del laboratorio. Agradecer a Loles y Marian por su incondicional ayuda y cercanía, que aunque no firmen mi tesis como directoras, las considero parte fundamental en mi desarrollo como investigador y doctor.

A Edu, persona que con el tiempo paso de ser, el compañero de laboratorio que me enseñó de manera espléndida como desenvolverme en la investigación, a ser uno de mis mejores amigos, al cual admiro y respeto por sus logros, y quiero por su amistad incondicional. A Javier, otro ser especial que me ha dado el doctorado, un gran amigo y confidente, con el que las horas pasan volando por su forma de alegrar la vida a la gente que le rodea con su buena “refritez” . A Miguel, del cual no titubeo al decir que es el mejor científico que ha pasado en la última década por el departamento, por sus conocimientos y pasión que demostraba cada día en el laboratorio. Gracias a los tres por los grandes momentos vividos juntos y por esas charlas, precisamente no muy científicas, acompañadas de risas y buen rollo.

A Nicla, con la que empecé toda esta aventura del doctorado, siempre dispuesta a echarme una mano, nunca olvidaré la ilusión con la empezamos ambos esta etapa. A Vanessa con la que he trabajado durante años, siempre dispuesta a ayudar en los problemas diarios del laboratorio, gracias por tu bondad y cercanía. A Diana, mi “germaneta científica” , con la que he trabajado codo con codo y a la que empecé instruyendo los pequeños trucos del laboratorio y terminó ella siendo la que me enseñó numerosas técnicas y protocolos, gracias por tus consejos y sinceridad.

A Isabel, a la que tanto afecto tengo por todo lo vivido junto a ella, compañera inseparable durante años. Amiga, compañera, confidente...

A Cristina, mi actual y entrañable compañera que hace que el día a día en el laboratorio sea más fácil y animado.

Destacar dentro de esta década un periodo especial que comprenderían mis primeros 3 años (2005-2008), el cual bautizaría como la etapa dorada del doctorado, donde un bonito grupo de becarios y becarias compaginábamos la ciencia con una sana y pura amistad. De esta etapa recordar y reconocer a Maria Dolores, Marieta, Aitana, María Valls, Vicky, Nuria, Isabel Garcia, Tommaso, Amer y Jose Miguel. Muchas gracias a todos por vuestro afecto, amistad y lo vivido juntos.

Como segunda etapa, que comprendería alrededor del 2009- 2013, coincidiría con un grupo de becarios y becarias maravillosas con los que he compartido grandes momentos y experiencias. Recordar y reconocer a Lidia, Rosa, Ana, Rita, Julia, Giacomo, Marta, Elisa, las gemelas Carmen y Elena, Jorge y Víctor. Muchas gracias a todos por vuestro cariño, amistad y lo vivido juntos.

Como última etapa y hasta la actualidad, aunque en estos últimos años la crisis ha hecho que mermaran el número de becarios en nuestro laboratorio, aún existen valientes que aman esta profesión y demuestran cada día su ilusión y entusiasmo: María Bové, Andrea, Laura, Giovana, Miguel, Laura Catalán y los estudiantes Patricia, Ramón, Vicky y Enrique. A todos ellos, con los que comparto recientemente bancada y experimentos, gracias por hacerme sentir importante en el laboratorio.

A la familia Arce, madre e hijo. Mamen, siempre dispuesta a ayudarme sin perder la sonrisa, capaz de solucionar cualquier fastidioso papeleo. Y como no a Sergio, al que he visto crecer y estoy orgulloso de él, gracias por tu amistad y por esas largas charlas futboleras tan necesarias para un hombre de futbol como yo.

Por otro lado, agradecer a Havard Attramadal, excelente investigador y persona que me permitió realizar las estancias en su laboratorio situado en el Rikshospitalet en Oslo y donde aprendí a ver la ciencia desde otra perspectiva. A Fran Buendía, Ximo Rueda, Jaime Agüero, Vicente Muedra, Paloma Pérez y Susana Masiá por su colaboración e incondicional ayuda cuando se les precisa. Mención especial a Domingo Baretino, siempre fuiste cordial y afectuoso, dispuesto a solucionar todas las dudas, no llegará el día en que no tenga tu recuerdo en cualquiera de mis visitas al Instituto de Biomedicina de Valencia.

Agradecer también a todos los profesores y directores del departamento, Carmen Montesinos, M^a Carmen Terencio, M^a Carmen Recio, Marisa, Isabel Guillem, Amalia, Rosa Giner, Salva, Diego, José Luis, Miguel Payá, María José y Amparo los cuales siempre estáis dispuestos a ayudarnos y socorrernos cuando existe algún dificultad en el laboratorio.

Agradecer también a la sección de secretaría que nos ayudan y hacen más fácil el trabajo burocrático, Mati, Irene, Inés, Raquel, y como no, a Ángel allí donde estés. A Carlos, técnico y manitas, por sus arreglos y su buen rollo.

A Nuria (informática), Inma (veterinaria), Ana y María Jesús (cultivos celulares) por su paciencia y amabilidad en cada una de mis peticiones, siempre solucionadas con éxito. A Mónica (limpiadora) por el aguante que tiene con todos nosotros cuando ensuciamos por donde ella limpia.

Y para terminar agradecerle a Sofía, y no crean que por ser la última es la menos importante, todo lo contrario, ya que ella es la dueña de mi corazón, por aguantarme y entenderme en esta última y tediosa etapa de escritura de la tesis.

Fermí

Valencia, octubre del 2015

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 GRK 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 α_{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 α_1 y β_2 en linfocitos circulantes” .

Financiado por **Escuela Valenciana de Estudios para la Salud (CS2005-100)**

"Intervención de los Adrenoceptores α_{1D} constitutivamente activos en la hipertensión: estudio en linfocitos humanos y en modelos animales de hipertensión".

Financiado por **CICYT (SAF 2004-01541)**

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

β_2 - AND β_1 -ADRENOCEPTOR EXPRESSION EXHIBIT A COMMON REGULATORY PATTERN WITH GRK2 AND GRK5 IN HUMAN AND ANIMAL MODELS OF CARDIOVASCULAR DISEASES.

Montó F, Oliver E, Vicente D, Buendía F, Rueda J, Agüero J, Almenar L, Valdecabres C, Rovira E, Muedra V, Noguera MA, Ivorra MD, D'Ocon P.

Journal of Cardiovascular Pharmacology. 2015 Aug 4. [Ahead of print]

THE THREE α_1 -ADRENOCEPTOR SUBTYPES SHOW DIFFERENT SPATIO-TEMPORAL MECHANISMS OF INTERNALIZATION AND ERK1/2 PHOSPHORYLATION.

Perez-Aso M, Segura V, **Montó F**, Baretino D, Noguera MA, Milligan G, D'Ocon P.

Biochimica et Biophysica Acta. 2013 Oct; 1833(10):2322-33

MYOCARDIAL AND LYMPHOCYTIC EXPRESSION OF eNOS AND nNOS BEFORE AND AFTER HEART TRANSPLANTATION: RELATIONSHIP TO CLINICAL STATUS.

Vicente D, **Montó F**, Oliver E, Buendía F, Rueda J, Agüero J, Almenar L, Baretino D, D'Ocon P.

Life Sciences. 2013 Jul 30; 93(2-3):108-15

DIFFERENCES IN THE SIGNALING PATHWAYS OF α_{1A} - AND α_{1B} -ADRENOCEPTORS ARE RELATED TO DIFFERENT ENDOSOMAL TARGETING.

Segura V, Pérez-Aso M, **Montó F**, Carceller E, Noguera MA, Pediani J, Milligan G, McGrath IC, D'Ocon P.

PLoS One. 2013 May 24;8(5):e64996.

DIFFERENT EXPRESSION OF ADRENOCEPTORS AND GRKS IN THE HUMAN MYOCARDIUM DEPENDS ON HEART FAILURE ETIOLOGY AND CORRELATES TO CLINICAL VARIABLES.

Montó F, Oliver E, Vicente D, Rueda J, Agüero J, Almenar L, Ivorra MD, Baretino D, D'Ocon P.

American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology. 2012 Aug 1;303(3):H368-76.

MYOCARDIAL G-PROTEIN RECEPTOR-COUPLED KINASE EXPRESSION CORRELATES WITH FUNCTIONAL PARAMETERS AND CLINICAL SEVERITY IN ADVANCED HEART FAILURE.

Agüero J, Almenar L, **Montó F**, Oliver E, Sánchez-Lázaro I, Vicente D, Martínez-Dolz L, D'Ocon P, Rueda J, Salvador A.

Journal of Cardiac Failure. 2012 Jan; 18(1):53-61.

BETA-ADRENOCEPTOR AND GRK3 EXPRESSION IN HUMAN LYMPHOCYTES IS RELATED TO BLOOD PRESSURE AND URINARY ALBUMIN EXCRETION.

Oliver E, Rovira E, **Montó F**, Valdecabres C, Julve R, Muedra V, Ruiz N, Baretino D, D'Ocon P.

Journal of Hypertension. 2010 Jun; 28(6):1281-9.

MYOCARDIAL AND PERIPHERAL LYMPHOCYTIC TRANSCRIPTOMIC DISSOCIATION OF BETA-ADRENOCEPTORS AND G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR KINASES IN HEART TRANSPLANTATION.

Agüero J, Almenar L, D'Ocon P, Oliver E, **Montó F**, Rueda J, Vicente D, Martínez-Dolz L, Salvador A.

The Journal of Heart and Lung Transplantation. 2009 Nov; 28(11):1166-71.

THE IMPACT OF ALPHA1-ADRENOCEPTORS UP-REGULATION ACCOMPANIED BY THE IMPAIRMENT OF BETA-ADRENERGIC VASODILATATION IN HYPERTENSION.

Oliver E, Martí D, **Montó F**, Flacco N, Moreno L, Baretino D, Ivorra MD, D'Ocon P.

Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2009 Mar; 328 (3):982-90.

CORRELATION BETWEEN BETA-ADRENOCEPTORS AND G-PROTEIN-COUPLED RECEPTOR KINASES IN PRETRANSPLANTATION HEART FAILURE.

Agüero J1, Almenar L, D'Ocon P, Oliver E, **Montó F**, Moro J, Castelló A, Rueda J, Martínez-Dolz L, Sánchez-Lázaro I, Montero JA.

Transplantation Proceedings. 2008 Nov; 40(9):3014-6.

ABREVIATURAS

7TM	Receptores de 7 dominios transmembrana
A	Adrenalina
AC	Adenilato ciclasa
ACC	<i>American College of Cardiology</i>
ADH	Hormona antidiurética
ADN	Ácido ribonucleico
ADNc	ADN complementario del ARN
AEMPS	Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios
AHA	<i>American Heart Association</i>
ALLHAT	<i>Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Attack Trial</i>
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de la varianza
Ao	Aorta
AR	Adrenoceptor o Receptor Adrenérgico
ARAI	Antagonistas de los Receptores para Angiotensina-II
ARN	Ácido desoxirribonucleico
ARNm (<i>mRNA</i>)	Ácido desoxirribonucleico mensajero
ATP	Adenosin 5' -trifosfato
β -ARK	Quinasa de los Adrenoceptores- β
BNP	Péptido natriurético tipo B
Bmax	Número máximo de lugares de fijación
Ca ⁺²	Calcio
CaM	Calmodulina
CaMKII	Proteína quinasa II dependiente de la calcio-calmodulina
CI (<i>IC</i>)	Cardiopatía isquémica (<i>ischemic cardiomyopathy</i>)

Ct	Ciclo umbral
DAG	Diacilglicerol
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEN	Dulbecco' s modified Eagle' s medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTD-VI (<i>LVEDD</i>)	Diámetro tele-diastólico del VI (<i>LV end-systolic diameter</i>)
DTS-VD (<i>LVESD</i>)	Diámetro tele-sistólico del VI (<i>LV end-diastolic diameter</i>)
ECL	Sustrato aumentador de la quimioluminiscencia
ECG	Electrocardiograma
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
e.e.m.	Error estándar de la media
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
ERK	Quinasa de respuesta exógena
ESC	<i>European Society of Cardiology</i>
FC	Frecuencia cardiaca
FE	Fracción de eyección
FEVI (<i>LVEF</i>)	Fracción de eyección del VI (<i>Left Ventricle ejection fraction</i>)
FMLC (<i>PBMC</i>)	Fracción monolinfocitaria circulante (<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>)
GAPDH	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
GC	Gasto cardiaco
GDP	Difosfato de guanosina
GMPc	Guanosin monofosfato cíclico
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GRK	Quinasa de los GPCR
GTP	Trifosfato de guanosina
HEPES	Acido 2-[4-(2-hidroxietyl)piperazin-1-il] etanosulfónico
HT	Hipertensión
HTA	Hipertensión Arterial

HT-Tr	Hipertensión arterial tratada
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintasa de óxido nítrico
NYHA	<i>New York heart Association</i>
NFH	<i>Non Failing Heart</i>
P	Coefficiente de Pearson
PA	Presión arterial
PAD	Presión arterial diastólica
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAPM	Presión arterial pulmonar media
PAPS	Presión arterial pulmonar sistólica
PAS	Presión arterial sistólica
PBS	Tampón fosfato salino
PBS-T	PBS con Tween20
PCP	Presión capilar pulmonar
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
PIP ₂	Fosfatidil inositol 4,5-bifosfato
PKA	Proteín quinasa dependiente de AMPc
PKC	Proteín quinasa C
PKG	Proteín quinasa dependiente de GMPc
PLA	Fosfolipasa A
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
PVDF	Fluoruro de polivinildieno
RGS	Proteínas reguladoras de la señalización de proteínas G
Rñ	Riñón
RT	Transcripción reversa
SDS	Dodecil sulfato de sodio

SEC	Sociedad Española de Cardiología
SHR	Rata espontáneamente hipertensa (<i>Spontaneous hypertension rat</i>)
SNA	Sistema nervioso autónomo
TBP	TATA-box binding protein
TC	Trasplante cardiaco
VD (<i>RV</i>)	Ventrículo derecho (<i>Right Ventricle</i>)
VI (<i>LV</i>)	Ventrículo izquierdo (<i>Left Ventricle</i>)
VO ₂ máx	Máximo consumo de oxígeno
VS	Volumen sistólico
WKY	Wistar Kyoto

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	13
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	15
1. Anatomía y Fisiología Cardíaca	15
1.1 Morfología cardíaca	15
1.2 Gasto Cardíaco	16
1.3 Regulación Gasto Cardíaco	17
2. Receptores Adrenérgicos	19
2.1 Características generales	19
2.2 Clasificación receptores adrenérgicos	20
2.2.1 AR- α_1	22
2.2.2 AR- β	26
2.3 Regulación de los receptores adrenérgicos: las GRK	30
2.3.1 Mecanismo de regulación mediado por las GRK	33
2.3.2 Clasificación, distribución y papel fisiológico de las GRK	36
2.4 Localización y funciones fisiológicas de los Adrenoceptores a nivel cardiovascular e inmunitario	40
2.4.1 AR a nivel cardiovascular	40
2.4.2 AR a nivel renal	43
2.4.3 AR a nivel inmunitario	43
3. Insuficiencia Cardíaca	45
3.1 Definición	45
3.2 Clasificación	47
3.3 Epidemiología	49
3.4 Etiopatogenia	51
3.5 Fisiopatología	53
3.5.1 Mecanismo de Frank-Starling	53
3.5.2 Activación de los Sistemas neurohormonales	54
3.5.3 Remodelado miocárdico	56
3.6 Diagnóstico de la IC	57
3.6.1 Síntomas y signos de la IC	57
3.6.2 Técnicas diagnósticas	58

3.7 Trasplante de corazón	62
4. Relación de los AR y GRK con la Insuficiencia Cardiaca	65
4.1 Adrenoceptores β	65
4.2 Adrenoceptores α	68
4.3 GRK	68
4.4 Cambios en el corazón trasplantado	70
5. Tratamiento de elección en la Insuficiencia Cardica	72
5.1 Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs)	74
5.2 β - bloqueantes	76
Carvedilol	77
6. Hipertensión arterial.	80
6.1 Definición y etiología	80
6.2 Clasificación	83
6.3 Hipertensión y riesgo cardiovascular	85
6.4 Relación de la AR y GRK en la HTA	87
7. AR y GRK en linfocitos como Biomarcadores en patología cardiovascular.	95
OBJETIVOS	101
MATERIALES Y MÉTODOS	103
1. Modelos de experimentación	103
1.1 Ensayos en humanos	103
1.1.1 Selección de pacientes y tipos de muestra	104
1.1.2 Población y criterios de inclusión según tipo de muestra	106
1.1.3 Obtención de muestras biológicas	106
1.2 Ensayo en animales	107
1.2.1 Animales de experimentación	108
1.2.1.1 Ratas hipertensas	108
1.2.1.2 Ratas Wistar tratadas con carvedilol y captopril	108
1.2.1.3 Medida de las constantes hemodinámicas en cola del animal consciente	109
1.2.1.4 Sacrificio y obtención de muestras	109

1.3 Modelo <i>ex vivo</i>	110
1.3.1 Tratamiento de VI de rata Wistar con carvedilol	110
1.4 Modelo <i>in vitro</i>	111
1.4.1 Células HEK 293	111
1.4.2 Tratamiento con carvedilol sobre células HEK 293	112
2. Técnicas experimentales	113
2.1 Determinación de la expresión génica	113
2.1.1. Extracción de ARNm total	113
2.1.2. Cuantificación y análisis cualitativo de la integridad del ARN	115
2.1.3. Transcripción reversa (RT)	115
2.1.4. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (PCR)	116
2.1.5. Elección gen de referencia	117
2.1.6. Análisis de los resultados	118
2.2 Cuantificación de la expresión proteica	118
2.2.1 Extracción de proteínas totales	118
2.2.2 Determinación del contenido proteico	119
2.2.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y Western Blot	119
2.2.4 Análisis de los resultados	120
2.3 Estudio de la unión del radioligando al receptor	121
2.3.1 Obtención de membranas	121
2.3.2 Ensayos de saturación	121
2.3.3 Análisis de los resultados	122
3. Análisis estadísticos de los resultados	123
RESULTADOS	125
1. Expresión de los AR y GRK en el sistema cardiovascular y cambios observados en IC e HTA	127
1.1 Modelo humano	127
1.1.1 Corazón	128
1.1.1.1 Ventrículo izquierdo procedente de donante	128
1.1.1.2 Corazón trasplantado	129
1.1.1.3 Corazón insuficiente	130
1.1.1.3.1. Expresión de AR y GRK según etiología de la IC	134
1.1.1.3.2 Variables clínicas según etiología de la IC	139
1.1.1.3.3 Expresión de AR y GRK según FEVI	140

1.1.2 Fracción Monolinfocitaria circulante	141
1.1.2.1 Sujetos sanos	141
1.1.2.2 Pacientes con trastornos cardiovasculares	142
1.2 Modelo animal	145
1.2.1 Expresión de AR y GRK en corazón de rata	145
1.2.2 Obtención de ratas hipertensas por tratamiento con L-NAME y comparación entre modelos animales de hipertensión	147
1.2.3 Corazón procedente de Ratas Hipertensas	148
1.2.4 Riñón procedente de Ratas Hipertensas	151
2. Cambios en la expresión de AR y GRK inducidos por los tratamientos de elección en la IC	154
2.1 Carvedilol	155
2.1.1 Ensayo en humano	155
2.1.2 Ensayo en animales	156
2.1.3. Expresión génica de AR y GRK en células HEK293 tratadas con Carvedilol	158
2.2 Captopril	158
2.2.1 Modelo Humano	158
2.2.2 Modelo animal	160
3. Correlación entre la expresión de los AR y GRK de VI de corazón insuficiente y variables clínicas.	161
- Fracción de eyección del VI	162
- Gasto cardiaco	162
- Volumen tele-sistólico y tele-diastólico	162
- Presión arterial pulmonar media y sistólica	163
- Presión capilar pulmonar	163
4. Correlaciones en la expresión de AR y GRK entre distintos territorios ____	164
4.1. Correlación entre la expresión de ARNm de AR y GRK en VI frente y VD de corazón insuficiente	164
4.2. Correlación entre la expresión de ARNm de AR y GRK en FMLC y cavidades cardiacas	165
5. Correlaciones entre AR y GRK en un mismo territorio	166
5.1 Fracción monolinfocitaria circulante	166

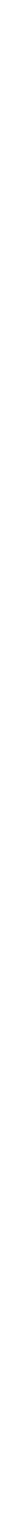
5.2 Corazón humano	167
DISCUSIÓN	169
1.- La expresión de los AR y las GRK en el miocardio humano, depende de la etiología de la IC y se correlaciona con las variables clínicas	169
2.- Linfocitos, como posibles biomarcadores en la IC	180
3. Influencia del tratamiento farmacológico de la IC en la expresión de los AR y GRK	183
4. Cambios de expresión de AR y GRK en corazón y riñón de ratas hipertensas ...	185
5. La expresión de los AR β_1 y β_2 exhibe un patrón de regulación común con la GRK2 y la GRK5 en todos los territorios y condiciones estudiados	187
CONCLUSIONES	191
RESUMEN	195
ENGLISH VERSION	197
ABSTRACT	219
BIBLIOGRAFÍA	221



La imponente energía del corazón El corazón realiza más trabajo físico que cualquier otro músculo del cuerpo. Cada día, el corazón humano genera energía como para desplazar un vehículo durante 32 kilómetros. Según la Fundación Española del Corazón, el corazón bombea 5 litros de sangre cada minuto (lo que denominamos gasto cardíaco). En el plazo de toda una vida, bombeará 1,5 millones de barriles de sangre.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN




INTRODUCCIÓN

El presente trabajo centra su estudio en los principales adrenoceptores (AR) y las cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRK) que los regulan, a nivel del sistema cardiovascular, haciendo mayor hincapié en su órgano central, el corazón. Estudiaremos de qué manera estos AR y GRK rigen la funcionalidad del corazón tanto en situaciones de normalidad como en situaciones patológicas, concretamente en hipertensión, insuficiencia cardiaca o situaciones extremas de trasplante cardiaco.

Un atrayente aspecto de esta tesis es la combinación del trabajo experimental a nivel de laboratorio junto con el clínico a nivel hospitalario. Esta alianza entre datos de expresión génica obtenidos a nivel experimental de los AR y GRK adyacente con el conocimiento de las diferentes variables clínicas conseguidas durante la observación y control del paciente ayudarán a conocer ciertos aspectos de la idiosincrasia de la insuficiencia cardiaca (IC).

Por otro lado, además de estudiar estos receptores y sus cinasas reguladoras en tres de los componentes más importantes del sistema cardiovascular como son el corazón, la aorta y el riñón, examinaremos estos en linfocitos circulantes humanos donde estudios previos mostraron la posibilidad de poder ser utilizados como biomarcadores durante el desarrollo de una patología cardiaca o tras trasplante de corazón por los cambios de expresión sufridos en tales dolencias.

No hay que olvidar que esta tesis nació y se desarrolló en un ambiente farmacológico como es el Departamento de Farmacología de la Universidad de Valencia por lo que abordaremos también como los diferentes tratamientos de elección administrados frente a la IC repercuten en la expresión de los AR y las GRK, hecho que nos puede ayudar a entender y a conocer diferentes aspectos a nivel intracelular.



El corazón late sin descanso unas 80 veces por minuto incluso antes de nuestro nacimiento, cuando aún nos encontramos en la placenta (con apenas 4 semanas). A lo largo de un día, una media de 100.000 latidos bombearán en torno a 8.000 litros de sangre, según el Texas Heart Institute. Si el corazón fuese una fuente, su potencia haría que la sangre alcanzara los 10 metros de altura

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.- ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA CARDIACA

2.- RECEPTORES ADRENÉRGICOS

3.- INSUFICIENCIA CARDIACA

4.- RELACIÓN DE LOS AR Y LAS GRK CON LA
INSUFICIENCIA CARDIACA

5.-TRATAMIENTO DE ELECCIÓN EN LA INSUFICIENCIA
CARDIACA

6.- HIPERTENSIÓN ARTERIAL

7.- AR Y GRK EN LINFOCITOS COMO
BIOMARCADORES EN PATOLOGÍA CARDIOVASCULAR

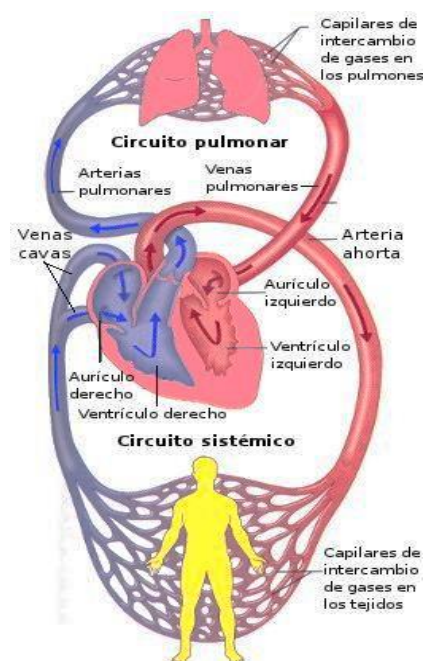
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.- ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA CARDIACA

Aunque bien conocida es la figura del corazón en el organismo, se hace necesario recordar ciertos aspectos de éste para una apropiada comprensión de la presente tesis, por ello, abordaremos en el primer apartado un pequeño memorándum de la fisiología del órgano central del sistema circulatorio.

1.1.- Morfología cardiaca

El corazón, distinguido por ser el órgano principal del aparato circulatorio, posee la función de bomba, que impulsa y favorece la llegada de la sangre a todas las partes del organismo. Se trata de un órgano muscular auto-controlado, una bomba aspirante e impelente, formado por dos bombas en paralelo que trabajan al unísono para propulsar la sangre hacia todos los órganos del cuerpo. Por una parte existe el bombeo de la sangre en ciclo cerrado usando los vasos sanguíneos como conductos a todas las partes del sistema corporal, denominado circuito sistémico, y por otra el circuito que solo atiende a los pulmones, o circuito pulmonar encargado de oxigenar la sangre. Esta actividad fisiológica la consigue el corazón a través de la división de su estructura en cuatro cámaras o cavidades: dos superiores, las aurículas derecha e izquierda y dos inferiores, el ventrículo derecho (VD) e izquierdo (VI). Las aurículas son cámaras de recepción, que envían la sangre que reciben hacia los ventrículos, que funcionan como cámaras de expulsión.

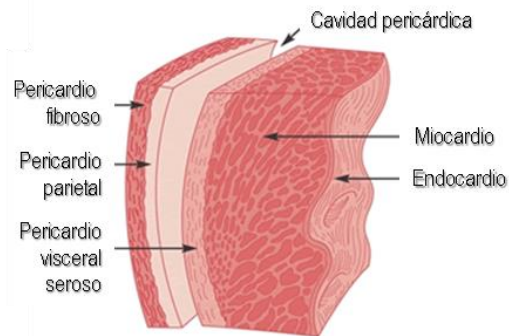


La pared del corazón se encuentra formada por tres capas:

El **endocardio**, una membrana serosa de endotelio y tejido conectivo de revestimiento interno, con la cual entra en contacto la sangre. Incluye fibras elásticas y de colágeno, vasos sanguíneos y fibras musculares especializadas, las cuales se denominan Fibras de Purkinje (conducen el impulso eléctrico que ocasiona la

contracción coordinada de los ventrículos del corazón). En su estructura encontramos las trabéculas carnosas, que dan resistencia para aumentar la contracción del corazón.

- El **miocardio**, es una masa muscular contráctil. El músculo cardíaco propiamente dicho; encargado de impulsar la sangre por el cuerpo mediante su contracción. Encontramos también en esta capa tejido conectivo, capilares sanguíneos, capilares linfáticos y fibras nerviosas.
- El **pericardio** es una membrana fibroserosa constituida en pericardio visceral seroso o epicardio y el pericardio fibroso y parietal, que envuelve al corazón y a los grandes vasos separándolos de las estructuras vecinas. Forma una especie de bolsa o saco que cubre completamente al corazón y se prolonga hasta las raíces de los grandes vasos. En conjunto recubren a todo el corazón para que este no tenga alguna lesión.



1.2.- Gasto cardíaco

El gasto cardíaco (GC) o volumen minuto se conoce como la cantidad de sangre bombeada cada minuto por cada ventrículo. De esta

<p>GC = VS x FC</p> <p>(VS: volumen sistólico de eyección; FC: frecuencia cardíaca)</p> <p>En condiciones normales en varones, GC = 70 ml/latido x 75 latidos/min \approx 5 L/min.</p> <p>En las mujeres es un 10 a un 20% menor de este valor</p>
--

forma el flujo que circula por el circuito mayor o menor corresponde a lo proyectado por el sistema de bombeo. Se calcula mediante el producto del volumen sistólico, (volumen impulsado en cada latido cardíaco) por la frecuencia cardíaca (número de latidos o ciclos cardíacos por minuto). Para un individuo adulto medio, el GC se encuentra entre 5-6 litros/min, aunque puede variar dependiendo, por ejemplo, de la actividad que se esté realizando. El corazón impulsa la sangre mediante los movimientos de sístole (contracción del corazón para expulsar la sangre hacia los tejidos) y diástole (relajación del corazón para recibir la sangre procedente de los tejidos).

El volumen sistólico de eyección (VS) a su vez depende de dos factores: actividad mecánica y postcarga. La actividad mecánica del corazón depende de la fuerza de contracción y de la contractilidad. La postcarga es la fuerza que se opone a la salida de sangre del ventrículo durante la sístole; o bien puede ser definida como el grado de estrés en la pared del ventrículo a lo largo de la sístole ventricular.

La frecuencia cardíaca o de contracción (FC), en condiciones normales, modula directamente el volumen de expulsión; ya que la postcarga se mantiene constante.

1.3.- Regulación del gasto cardíaco

El funcionamiento del corazón humano es un proceso con cierta autonomía, la habilidad del músculo cardíaco de contraerse rítmicamente para bombear la sangre al cuerpo es intrínseca (propia), es una propiedad del músculo en sí mismo y no depende del sistema nervioso. Pero aun así, el corazón sano tiene un amplio suministro de fibras nerviosas que pueden alterar el ritmo de funcionamiento establecido por los factores intrínsecos.

El corazón se ayuda de diversos mecanismos para mantener el GC según las demandas del organismo cuando aumenta la sobrecarga hemodinámica, ya sea de presión o de volumen, o cuando ha sufrido una pérdida de masa miocárdica o de la contractilidad. Entre los mecanismos más importantes están los diversos cambios neurohumorales que, según el momento, pueden ser de carácter adaptador y no adaptador. Aunque estos ajustes son útiles porque mantienen la presión de perfusión arterial ante una disminución brusca del GC, también aumentan la carga hemodinámica y las necesidades de oxígeno del ventrículo insuficiente por lo que, a largo plazo, pueden ejercer un efecto deletéreo (Harrison y cols., 2001).

Uno de los sistemas más importantes de control es el Sistema Nervioso Autónomo (SNA) o también conocido como vegetativo. El SNA controla las acciones involuntarias, a diferencia del sistema nervioso somático. Este se divide en:

- Sistema simpático: usa noradrenalina (NA) y adrenalina (A) como neurotransmisor. Está implicado en actividades que requieren gasto de energía. También es llamado sistema adrenérgico o noradrenérgico el cual prepara al cuerpo para reaccionar ante una situación de estrés. A nivel de corazón aumenta el ritmo y fuerza de contracción. La estimulación simpática que puede aparecer en situaciones de fuerte estrés o de intenso ejercicio físico, aumentan la frecuencia cardíaca (taquicardia, o efecto cronotrope positivo) pudiendo llegar a alcanzar frecuencias de 200-220 latidos/minuto, así como la velocidad de conducción.

- Sistema parasimpático: Su neurotransmisor es la acetilcolina. Está encargado de almacenar y conservar la energía. Es llamado también sistema colinérgico, mantiene al cuerpo en situaciones normales y luego de haber pasado la situación de estrés es antagónico al simpático. A nivel cardíaco reduce el ritmo y fuerza del corazón. La bradicardia que se produce durante el sueño, se basa en el incremento de actividad parasimpática y en la disminución de actividad simpática.

- Sistema nervioso entérico: Se encarga de controlar directamente el sistema gastrointestinal.

La utilización de neurotransmisores por el sistema nervioso, los cuales son liberados como respuesta a distintos estímulos, son reconocidos por proteínas especializadas, denominados receptores, localizados en las membranas de las células diana. Como consecuencia de esta interacción los receptores a menudo sufren un cambio conformacional que afecta a la actividad de su dominio intracitoplasmático en un proceso conocido como transducción de señales.

Existen varios sistemas de receptores que regulan la contractibilidad y el ritmo cardíaco, entre ellos encontramos los receptores adrenérgicos (AR), muscarínicos, de endotelina y angiotensina II, encargados de mediar eventos esenciales en la función cardiovascular como resistencia vascular, contractilidad cardíaca, desarrollo del sistema cardiovascular y el crecimiento y remodelado de diferentes tipos de células cardíacas (Frey & Olson, 2003).

2.- RECEPTORES ADRENÉRGICOS

Como se ha comentado en el primer punto de la introducción, el sistema adrenérgico juega un papel crucial en la preparación del organismo ante una situación de estrés. Los receptores adrenérgicos son los encargados de emprender diversos procesos fisiológicos en presencia del agonista, como es el caso del aumento de la contractilidad y la frecuencia cardiaca a nivel cardiovascular. Ante la importancia de estos receptores abordaremos en este segundo apartado de la introducción sus principales características y peculiaridades concretando más a nivel cardiovascular.

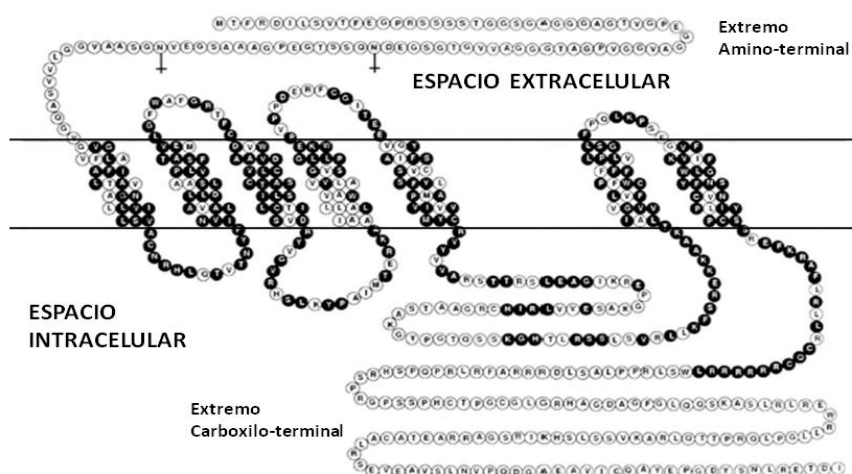
2.1 Características generales

Los Receptores Adrenérgicos o Adrenoceptores (AR), son proteínas pertenecientes a la familia de los receptores de siete dominios transmembrana (7TM), también conocidos como receptores acoplados a proteína G (GPCR), 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, las principales catecolaminas endógenas: el neurotransmisor NA, y la hormona y neurotransmisor A. Así pues, los receptores adrenérgicos, por ser los encargados de transmitir la señal de estas catecolaminas, están directamente implicados en diferentes procesos fisiológicos. A nivel circulatorio, ambas catecolaminas juegan un papel importante en el control de la presión arterial, la frecuencia cardiaca, la fuerza de contracción cardiaca o la reactividad de las vías aéreas. Por todo ello, se han convertido a lo largo de su historia en diana terapéutica de diferentes enfermedades tanto cardiovasculares, tan importantes como la hipertensión arterial (HTA) o la IC, en enfermedades respiratorias como el asma, como en otras patologías no menos importantes como la hipertrofia prostática benigna, la congestión nasal, la obesidad, o el dolor entre muchas otras (Guimaraes & Moura, 2001; Pierce y cols., 2002; Lefkowitz, 2004).

La estructura de los AR 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.

Comprenden dos requerimientos básicos gracias a los cuales estas proteínas pueden ser clasificadas como GPCR:

- Se componen de siete regiones, o dominios transmembrana, de entre 20 a 35 aminoácidos cada una, en conformación 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 GPCR 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).



Modelo de receptor de la familia de los GPCR con 7 dominios transmembrana.

Imagen modificada del modelo de estructura y secuencia aminoacídica diseñado para el AR- α_{1A} por Lomasney y cols., 1991.

2.2.- Clasificación de los receptores adrenérgicos

La clasificación actual a día de hoy aceptada por la IUPHAR (The International Union of Basic and Clinical Pharmacology) consta de 9 subtipos diferentes de AR (Bylund y cols., 1994; Hieble y cols., 1995; García-Sáinz y cols., 1999; Michelotti y cols., 2000). Los receptores adrenérgicos están subdivididos en tres subfamilias: α_1 , α_2 y β según su estructura, farmacología y mecanismos de señalización (Hieble y cols., 1995). Al menos tres subtipos han sido identificados dentro de cada subfamilia. Así los AR- α_1 se subdividen en AR- α_{1A} , - α_{1B} y - α_{1D} , los AR- α_2 se subdividen en AR- α_{2A} , - α_{2B} y - α_{2C} , mientras que entre los AR- β se encuentran los subtipos AR- β_1 , - β_2 y - β_3 .

Clasificación Receptores Adrenérgicos

Clasificación IUPHAR

AR- α_1			AR- α_2			AR- β		
α_{1A}	α_{1B}	α_{1D}	α_{2A}	α_{2B}	α_{2D}	β_1	β_2	β_3

Bylund y cols., 1994, Hieble y cols., 1995

Hasta llegar a esta clasificación aceptada por la IUPHAR, numerosos investigadores durante el último siglo han centrado sus investigaciones en esclarecer tal entramado sistema. Desde los primeros investigadores como Langley en 1901, que abrió las puertas hacia estas deducciones gracias a sus experimentos de fisiología y farmacología clásica, iniciando así el concepto de “sustancia receptora” y posteriormente Dale el cual, en 1906, observó los efectos antagónicos de la ergotoxina sobre la contracción inducida por A, sentando las bases para el estudio de los AR (además de receptores muscarínicos y nicotínicos) hasta nuestros días. En la actualidad, en el campo de los AR, destacan los científicos estadounidenses Robert J. Lefkowitz y Brian K. Kobilka los cuales fueron galardonados con el Premio Nobel de Química 2012 por sus estudios en el ámbito de los adrenoreceptores β y otros receptores acoplados a proteínas G.

Los mencionados Langley y Dale establecieron las bases de la interacción fármaco-receptor. Ahlquist en 1948 postuló por primera vez la existencia de más de un receptor adrenérgico; basó su hipótesis en un estudio sobre las habilidades de la A, NA y otros agonistas relacionados para regular diversos procesos fisiológicos. Así, se denominó adrenoceptor α (AR- α) al receptor que mediaba respuestas celulares en las cuales el orden de potencia que se obtenía para los agonistas era: $A \geq NA \gg$ isoprenalina. Las respuestas observadas en este caso fueron: vasoconstricción, contracción del útero y los uréteres, contracción de la membrana nictitante, dilatación de la pupila e inhibición del tono del intestino. Para las respuestas definidas o mediadas por el adrenoceptor β (AR- β) se obtenía un orden de potencia diferente: isoprenalina $>$ $A \geq NA$. Las respuestas definidas farmacológicamente según este orden de potencia fueron: vasodilatación, relajación uterina y estimulación del miocardio (inotropismo positivo).

Más tarde Langer (1974) basándose en su localización anatómica, subdividió los AR- α en α_2 , localizados a nivel de las terminales nerviosas simpáticas donde actúan como inhibidores de la liberación de NA, y en α_1 , localizados postsinápticamente. Esta clasificación anatómica se descartó posteriormente, al demostrarse la existencia de AR- α_2 también en células efectoras de la musculatura lisa vascular (McGrath, 1983), y se sustituyó por una clasificación farmacológica y funcional, ante la notable habilidad de la yohimbina y la rauwolscina para actuar como antagonistas α_2 . Actualmente, el desarrollo de agonistas y

antagonistas potentes y selectivos ha permitido una clasificación farmacológica más precisa de los AR- α . Así, el adrenoceptor α_1 se caracteriza por su activación específica por fenilefrina, metoxamina y cirazolina y su respuesta fisiológica es antagonizada por una concentración baja de prazosin; los AR- α_2 son activados por los agonistas BHT 933 y UK 14304 y son antagonizados selectivamente por yohimbina y rauwolscina (Bylund y cols., 1994).

Como bien se ha comentado anteriormente, deben de recibir mención especial Robert J. Lefkowitz y Brian K. Kobilka por su reconocimiento con el premio Nobel de Química en el 2012. Premiados por sus hallazgos sobre los receptores acoplados a las proteínas G, deben tanpreciado galardón a sus estudios sobre los receptores adrenérgicos. Lefkowitz determinó la secuencia, estructura y función de los AR- β y descubrió y caracterizó dos familias de proteínas que regulan estos receptores, las cinasas que se unen a los receptores acoplados a proteínas G (GRK) y las β -arrestinas. Mientras que en el caso de Kobilka, destacan sus estudios en la estructura y actividad de los GPCR, en particular, su laboratorio estableció la estructura molecular del AR- β_2 mediante rayos X, y seguidamente pronto se determinó la estructura de otros receptores.

2.2.1 Adrenoceptores α_1

Los AR- α_1 son los principales responsables de la regulación de procesos fisiológicos como la contracción vascular y la fuerza de contracción del corazón, por lo tanto están directamente implicados en la regulación de la presión arterial (PA), del flujo sanguíneo, el inotropismo cardiaco aunque también están relacionados con la hipertrofia cardiaca y la hipertrofia prostática benigna. Por ello, son las dianas terapéuticas de enfermedades tan frecuentes como la HTA (Michelotti y cols., 2000; Hein & Michel, 2007) y la hipertrofia prostática benigna.

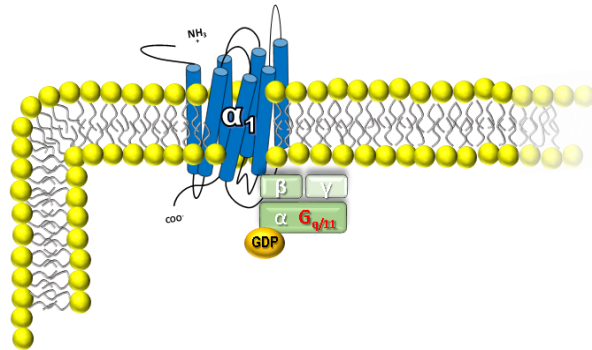
Los tres subtipos descritos: α_{1A} , α_{1B} , y α_{1D} , se encuentran acoplados a la proteína Gq/11, por lo que inician los procesos fisiológicos a través de la activación de la fosfolipasa C (PLC). Además estos receptores se encuentran en mayor o menor medida acoplados a otros sistemas de señalización intracelular implicados en procesos de regulación de la expresión de genes, síntesis de proteínas y control del ciclo celular (Piascik & 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 presión arterial, o en uno u otro proceso fisiológico o patológico, dependiendo del territorio que se trate (Piascik & Pérez, 2001). Así pues, el conocimiento exacto de las diferencias en las funciones de los subtipos de AR- α_1 estará relacionado con las diferencias

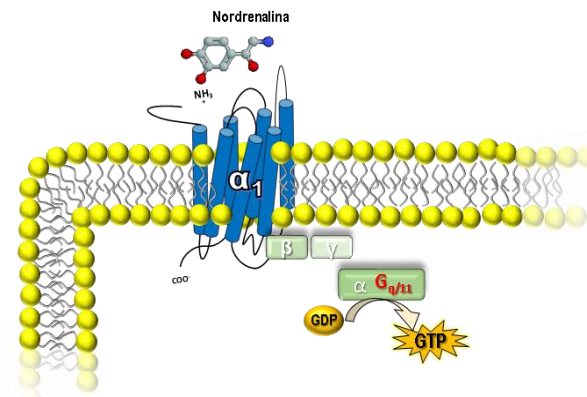
entre características tales como la distribución tisular, la eficiencia de acoplamiento a la proteína G, las vías de señalización capaces de activar y los sistemas de regulación propios de los receptores (Tanoue y cols., 2003). El estudio de todos estos factores nos llevará a entender mejor el papel fisiológico de estos AR cuya alteración podría conducir al desequilibrio fisiológico que da lugar a la enfermedad cardiovascular.

- **Vías de señalización intracelular**

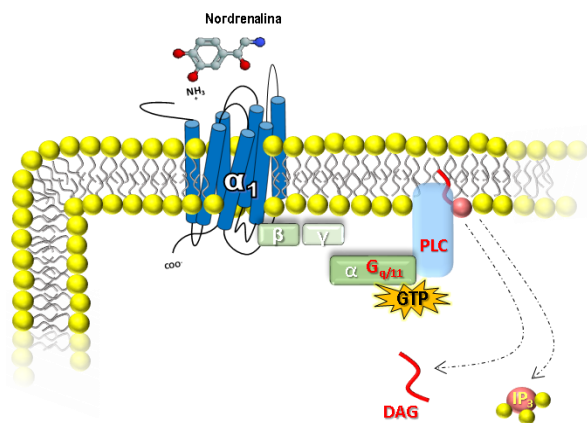
Como hemos dicho anteriormente, se trata de receptores de 7TM acoplados a proteínas G. Estas proteínas G son proteínas heterotriméricas, formadas por tres sub-unidades ($\alpha\beta\gamma$), capaces de fijar moléculas de difosfato de guanosina (GDP).



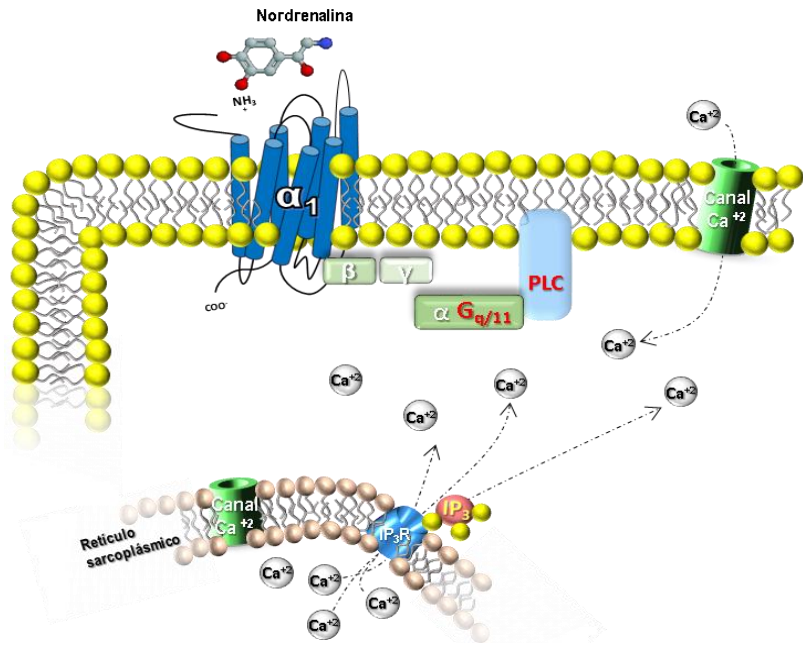
Cuando las catecolaminas, agonistas endógenos de los AR, interaccionan con los aminoácidos, que conforman su lugar de unión en el receptor, se favorece la interacción con la subunidad α de la proteína G que cataliza el paso de una molécula de GDP hacia una molécula de GTP, produciéndose la disociación del complejo ($\alpha\beta\gamma$), quedando separadas las subunidades $G\beta\gamma$ por un lado y la subunidad $G\alpha$ -GTP por otro, siendo así capaces de activar los sistemas efectores correspondientes (Valdizán & Pazos, 2003; Hubbard & Hepler, 2006)



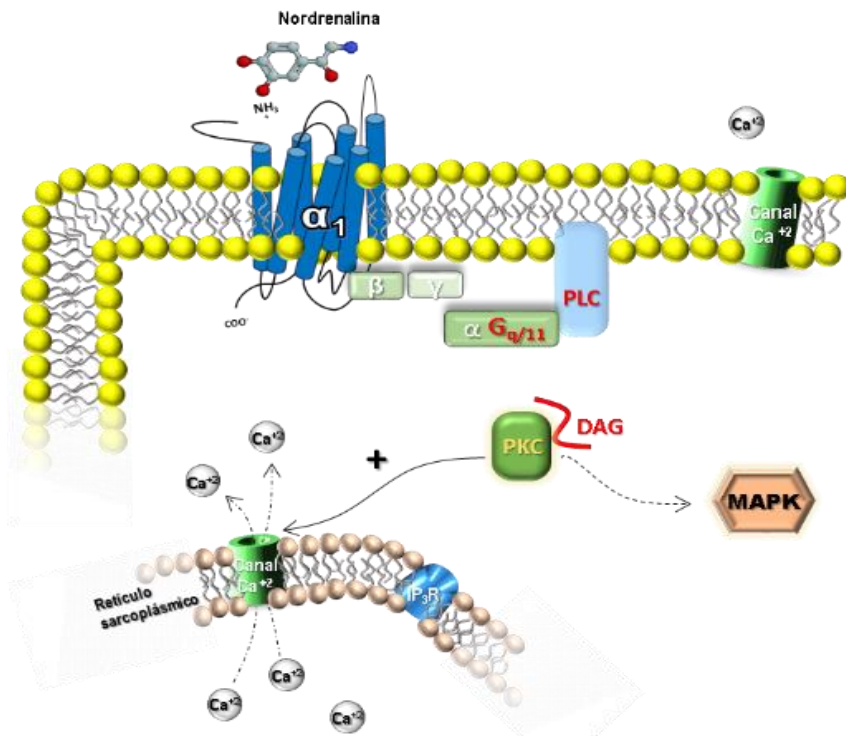
La isoforma β de la PLC es capaz de unirse a la subunidad $G\alpha$ -GTP de la familia de proteínas $G_{q/11}$ produciendo así su activación (Wu y cols., 1992). Con la activación de la PLC β se produce el inicio de la hidrólisis de los fosfolípidos de membrana, el fosfatidil inositol 4,5-bifosfato (PIP₂) es hidrolizado dando 1,4,5- trifosfato de inositol (IP₃) y dialciloilglicerol (DAG) (Fain & Garcia-Saínz., 1980; Berridge, 1983).



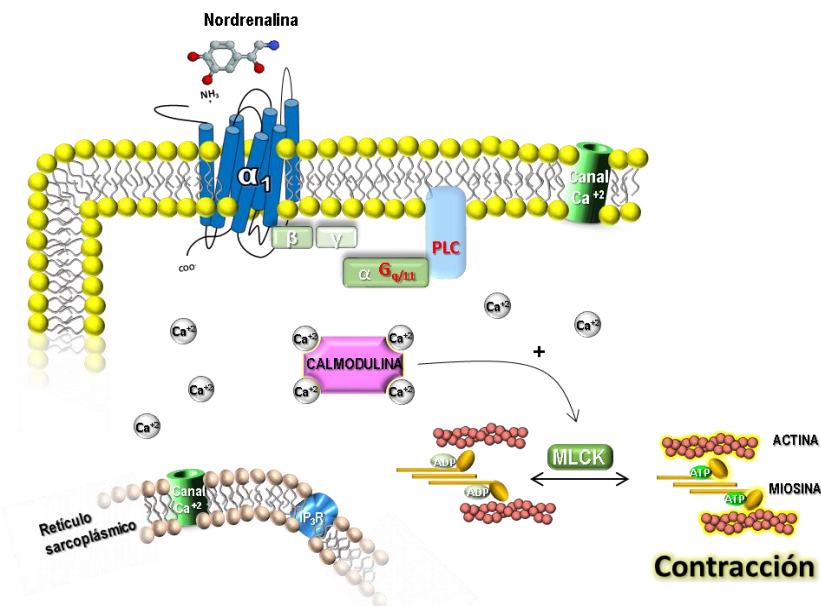
Una vez sintetizado, el IP₃ es capaz de difundir desde la proximidad de la membrana celular hasta el retículo endoplásmico o sarcoplásmico, donde se une a sus receptores específicos (IP₃R). Estos receptores forman un canal que se abrirá tras su activación por IP₃, controlando así la salida del Ca⁺² situado 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 lado, el DAG sintetizado por la PLCβ a partir de PIP₂, producirá la estimulación de la proteína cinasa C (PKC) (Nishizuka, 1984), la cual será capaz de fosforilar distintos sustratos 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 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 AR- α_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 cinasa 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).



Además a lo largo de los años también han aparecido evidencias de la activación de muchas otras vías de señalización (Gi, Go, Gs, G12/13, incluso Gh) por parte de los AR- α_1 , así como la activación de otros sistemas efectores (PLA2, PLD, aumento de adenosinmonofosfato cíclico (AMPC), activación de canales de Ca^{+2} , de intercambiadores de Na^+-H^+ y $\text{Na}^+-\text{Ca}^{+2}$, 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- α_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, 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 & Michel, 2007).

Interesante es la propuesta de recientes estudios que sugieren que en cardiomiocitos la mayoría de los AR- α_1 ($\geq 80\%$) se encuentran localizados en la membrana nuclear así como su señalización sobre $\text{G}\alpha_q$ y $\text{PLC}\beta_1$. Uno de los mecanismos que utiliza la célula para que las catecolaminas consigan atravesar la membrana citoplasmática y acceder así a la membrana nuclear, es mediante el transportador de NA EMT/OCT3 (extraneuronal

monoamine transporter/organic cation transporter 3) el cual se encuentra expresado tanto en la membrana citoplasmática como en la nuclear (Wring, 2008; 2012)

El resultado final de la activación de cada subtipo en un determinado tejido dependerá de la proporción, 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; Perez-Asó y cols., 2013).

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 α_{1A} y α_{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).

2.2.2 Adrenoceptores β

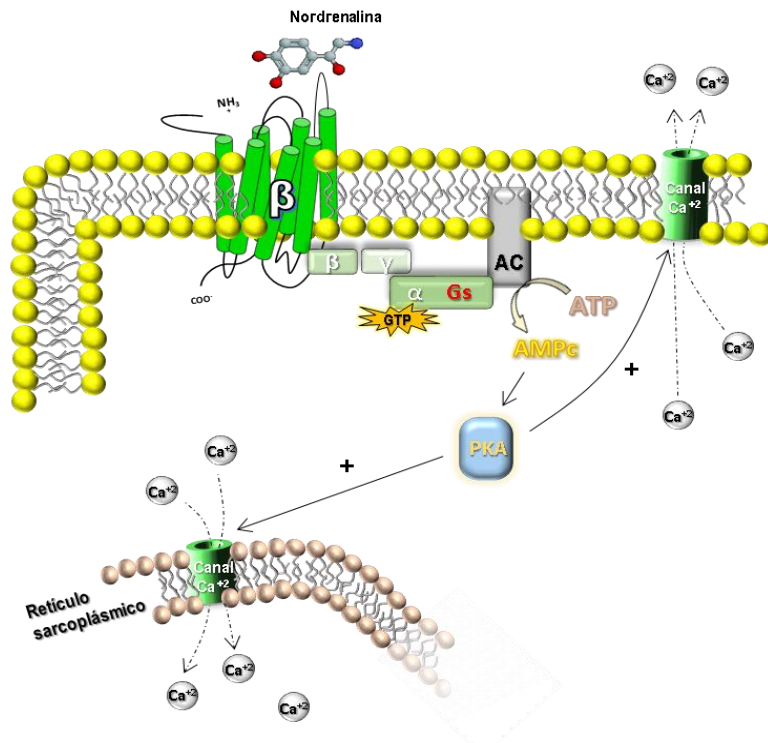
Los AR- β son GPCR encargados, entre sus funciones más importantes en el organismo, de mediar las respuestas cardiovasculares frente a la NA liberada de las terminaciones nerviosas y la A circulante. Además de mediar a nivel cardiovascular, relajando el músculo liso y la contractilidad y control del ritmo cardíaco, también interviene en la relajación de las vías aéreas, en el metabolismo lipídico y de la glucosa. Así pues, este grupo de AR estará implicado en el control de la presión arterial, del flujo sanguíneo, en el cronotropismo e inotropismo cardíaco y por lo tanto en el control de la frecuencia cardíaca, convirtiéndose así, al igual que los AR- α_1 , en importantes dianas terapéuticas en enfermedades cardiovasculares como la HTA, arritmias cardíacas o la IC, incluso en enfermedades respiratorias como el asma, o en la obesidad entre otras (Guimaraes & Moura, 2001).

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 a nivel arterial los AR- β periféricos más abundantes (AR- β_2) controlan la relajación vascular, y por otro lado el subtipo más abundante en el corazón (AR- β_1) media la contracción y el ritmo cardíaco, mientras que el subtipo minoritario, más abundante en tejido adiposo (AR- β_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, 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 & Moura, 2001).

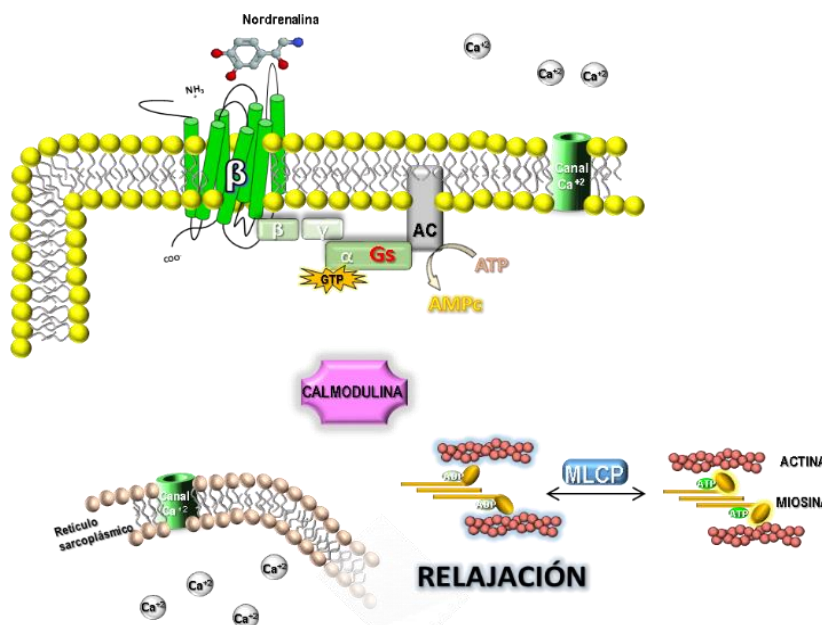
- **Vías de señalización de los AR- β**

Los tres subtipos descritos: β_1 , β_2 , y β_3 , se encuentran acoplados a la proteína Gs, 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 cinasa dependiente de AMPC (PKA) que es capaz de fosforilar numerosas

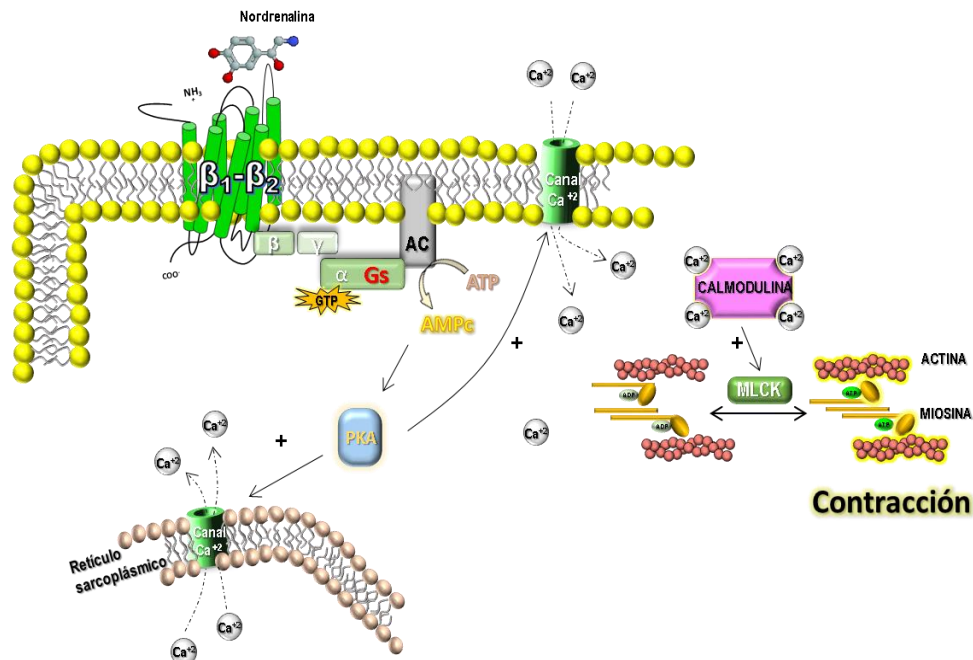


proteínas. En células del músculo liso vascular, la generación de AMPC y activación de la PKA, fosforila proteínas asociadas a la relajación vascular. Además el AMPC es capaz de inhibir la liberación de Ca^{+2} de los depósitos intracelulares, reduce la entrada de Ca^{+2} del exterior celular, y estimula la recaptación intracelular de Ca^{+2} (Bristow y cols., 1989).

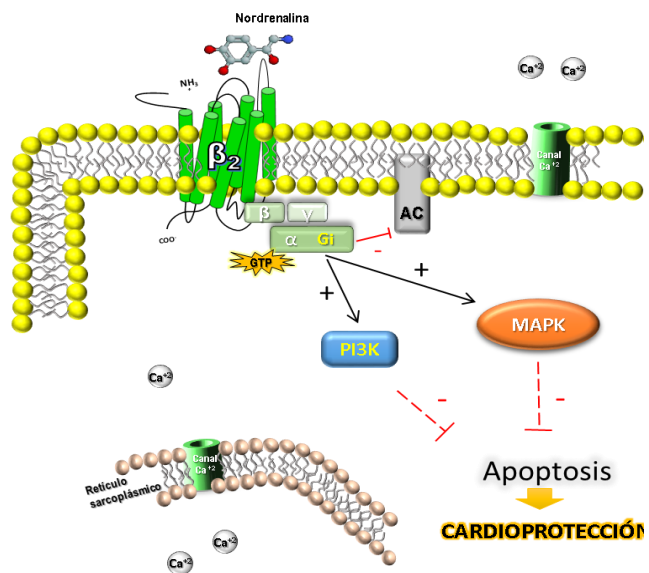
La bajada de concentración del catión en el espacio intracelular impide la unión de este a la CaM y así, reprimiendo los mecanismos de contracción, se favorece la relajación vascular (Rembold, 1992; Johnson, 1998).



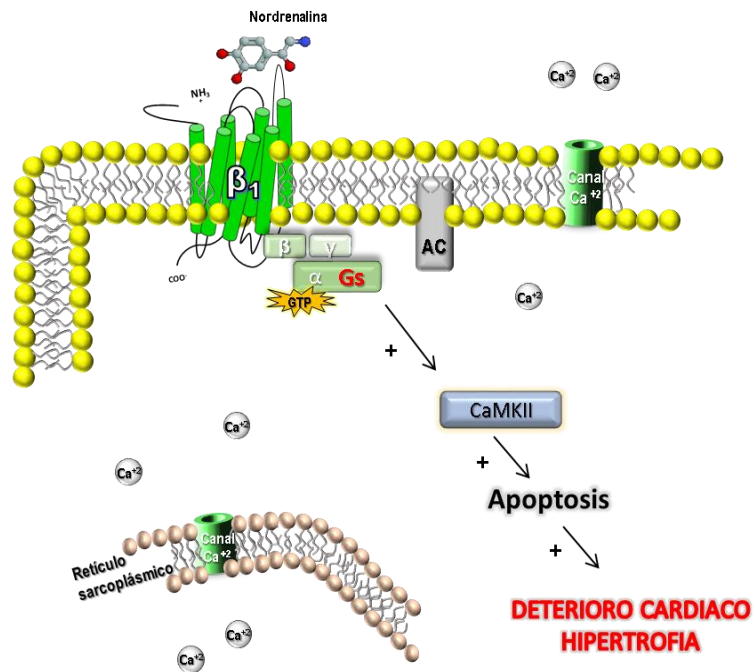
En el caso del músculo cardíaco, tras la activación de los AR- β_1 y - β_2 , se producen fenómenos más complejos. Por un lado, se disocia la subunidad $G_s\alpha$ que activa la enzima AC generándose AMPc con la consiguiente activación de la PKA que fosforilará, entre otras proteínas, los canales de Ca^{+2} del retículo sarcoplásmico por lo que, contrariamente a lo que ocurre en músculo liso, se induce la liberación del catión del sarcolema, y se favorecen así los procesos que conducen a la contracción muscular (Bristow y cols., 1989).



Además, se ha demostrado que en corazón el AR- β_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). Se ha demostrado la relación que existe entre esta activación de la proteína G_i mediada por AR- β_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). Así un subtipo, en un momento determinado, puede ser cardioprotector y otro puede estimular la hipertrofia cardíaca 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 IC (Xiao y cols., 2004; 2006).



Por otro lado, el aumento de Ca^{+2} intracelular que conduce a la contracción del músculo cardíaco mediado por el AR- β_1 , a través de Gs, también favorecerá a largo plazo la activación de la vía apoptótica de la protein cinasa II dependiente de calcio y calmodulina (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 la 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 β_1 se encuentra exclusivamente acoplado a la vía de la proteína Gs, mientras que el subtipo β_2 activa ambas vías (Gs y Gi), siendo este acoplamiento un punto importante en la regulación de la actividad del receptor, ya que además la vía Gi/PI3K inhibe la respuesta mediada por Gs, controlando los efectos inotrópicos del mismo (Chesley y cols., 2000).



Se requiere una consideración aparte para hablar de los AR- β_3 . Estos AR 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 Gs/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 producen 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 el AR- β_3 localizado principalmente en el endotelio. El NO liberado es capaz de activar la enzima guanilato ciclasa soluble que producirá guanosin monofosfato cíclico (GMPc). Este nucleótido activaría la proteína cinasa 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 & Gauthier, 2006).

En el corazón, la estimulación selectiva del subtipo β_3 provoca inotropismo negativo como válvula de escape ante un estímulo adrenérgico intenso (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., 2005). 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 AR- β , además del ya mencionado β_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 & Moura, 2001; Vanhoutte, 2001; Flacco y cols., 2013).

2.3- Regulación de los receptores adrenérgicos: las GRK

Toda la complejidad en la señalización mediada por los AR, así como el resto de GPCR, 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. 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 & Penela, 2003).

Hay múltiples mecanismos que controlan la señal y la densidad de los GPCR, participando en el apagado o desensibilización del receptor tras la unión del agonista y la activación del mismo. Muchos receptores son fosforilados por cinasas, 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*), siendo su recuperación muy lenta ya que requiere la síntesis de nuevos receptores (Haddock & 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.

- 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).
- 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 del resto de procesos y donde no interviene la internalización del receptor (Lohse y cols., 1990).

En el proceso de desensibilización, la fosforilación del receptor es un paso clave y necesario llevado a cabo por dos tipos de cinasas: las cinasas dependientes de segundos mensajeros (PKC y PKA) y las cinasas específicas de los GPCR, más comúnmente conocidas como GRK, 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 GRK es esencial pero no suficiente, ya que se requiere de la unión de las proteínas β -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). Sin embargo no todos los GPCR 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 fosfatasas 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 & von Zastrow, 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 fosfatasas, 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 β -arrestinas con el receptor también activa otras vías de señalización intracelular. La endocitosis de los GPCR a través de β -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 β -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 (Luttrell 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).

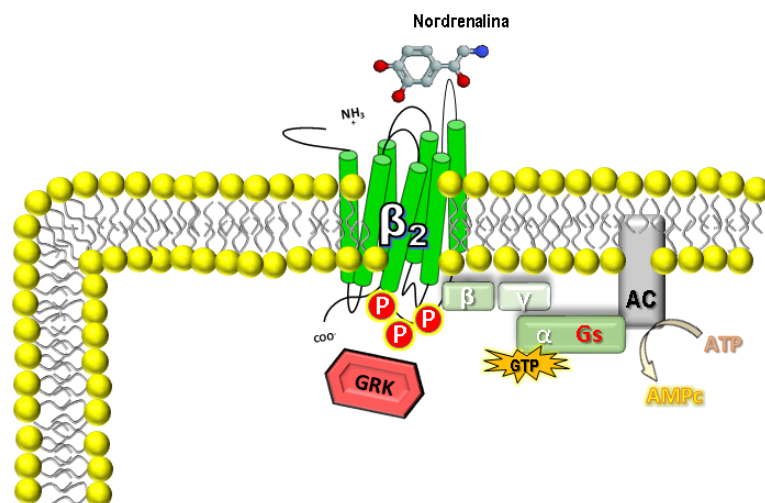
Además de todos los procesos comentados existen otros mecanismos de regulación que contribuyen a suavizar las señales de los receptores ante una estimulación continuada. Un ejemplo son las proteínas reguladoras de la señalización de proteínas G (RGS), que son una familia de proteínas con actividad GTPasa, de modo que aceleran la hidrólisis del GTP unido a la subunidad $G\alpha$ de la proteína G activada, 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). La desensibilización no sólo depende 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 cinasas de segundo mensajero, por la vía de las GRK, o incluso por una combinación de ambas (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 GRK (Bünemann y cols., 1999). Por lo tanto, el conocimiento preciso de los mecanismos de regulación de los AR será un punto muy importante para el total entendimiento de los procesos fisiológicos y patológicos en los que participan.

2.3.1- Mecanismo de regulación mediado por las GRK.

La vía de desensibilización mediada por GRK fue descubierta por primera vez para el receptor de rodopsina (Weller y cols., 1975), sin embargo, para explicar el mecanismo exacto de la regulación de los AR mediado por las GRK, se utiliza el modelo más estudiado y conocido, el proceso de desensibilización homóloga del AR- β_2 mediado principalmente por la enzima anteriormente denominada cinasa 1 del receptor adrenérgico- β (β -ARK1), actualmente conocida como GRK2 (Benovic y cols., 1987; Bünemann y cols., 1999).

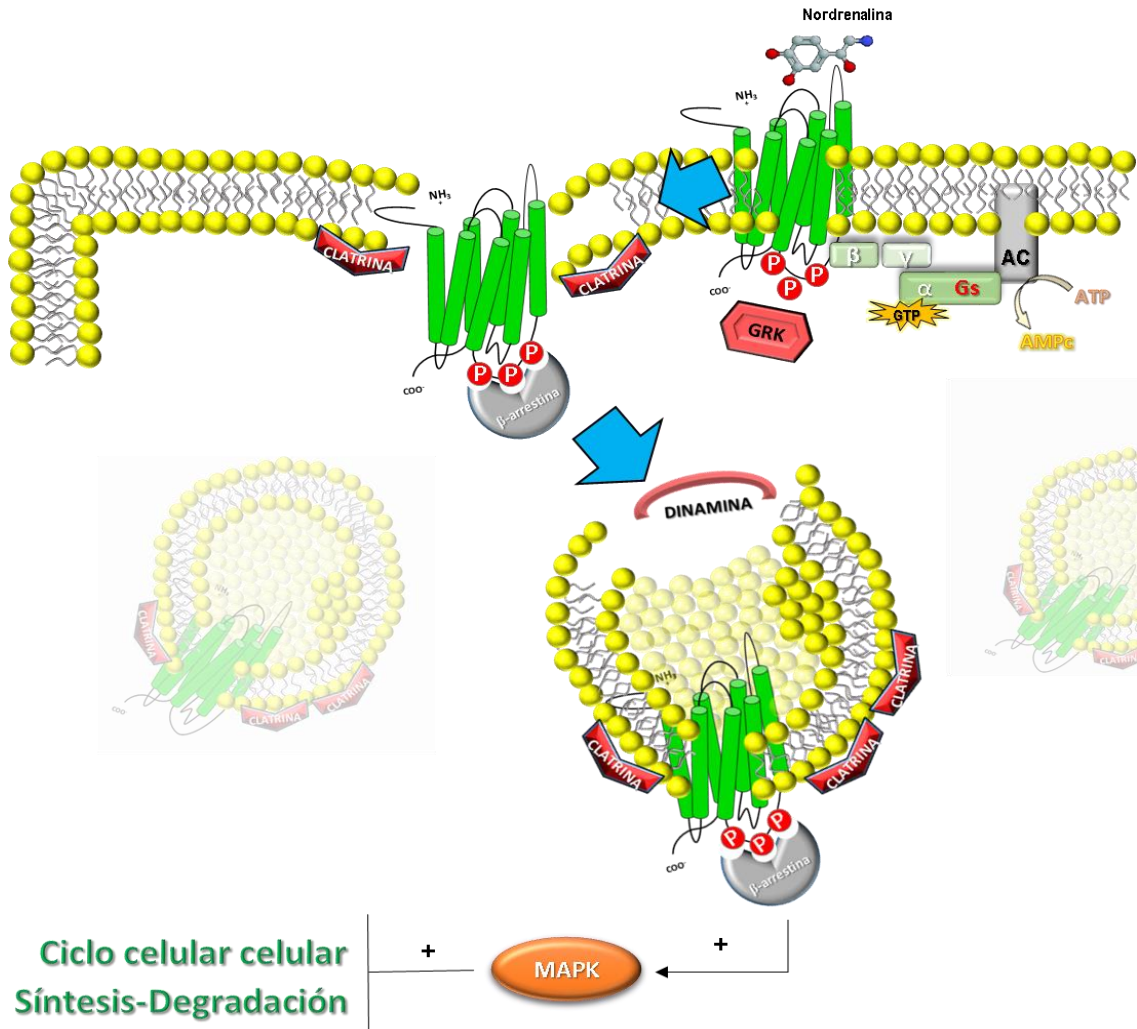
Como ya hemos explicado, la unión del agonista al receptor provoca el acoplamiento con la proteína G (Samama y cols., 1993), separándose las subunidades $G\alpha$ por un lado, encargada de activar la vía de señalización, y la subunidad $G\beta\gamma$ que ayuda a atraer a la GRK a la membrana (Pitcher y cols., 1992; Koch y cols., 1993; Daaka y cols., 1997b), donde fosforilará al receptor en su dominio C-terminal (Fredericks y cols., 1996; Diviani y cols., 1997).



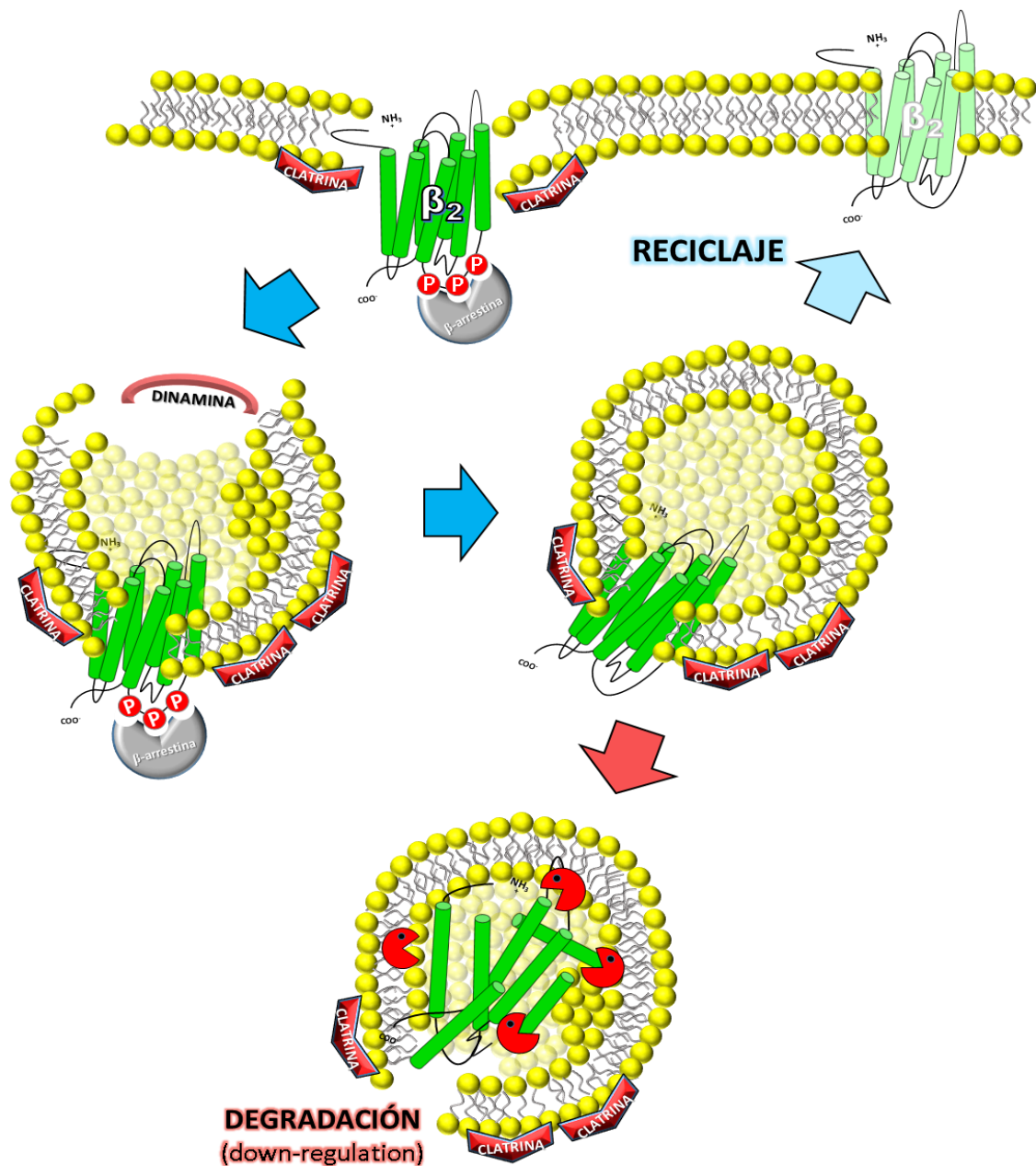
Seguidamente las β -arrestinas se unirán a los grupos fosforilados del receptor provocando la finalización de la señal gracias al desacoplamiento físico del receptor y la proteína G (Sterne-Marr & Benovic, 1995; Ferguson y cols., 1996; Goodman y cols., 1996). Las β -arrestinas tienen dominios de unión 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. La dinamina se encuentra involucrada principalmente en la escisión de las vesículas recién formadas de la membrana de un compartimento celular, su orientación, y su

fusión con otro compartimento, tanto en la superficie de la célula (en particular la internalización de caveolas), así como en el aparato de Golgi (Zhang y cols., 1996).

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).



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 & Lohse, 1997; Gagnon y cols., 1998; Kallal y cols., 1998; Tsao y cols., 2001; Tsao y von Zastrow, 2001).



Además, las GRK pueden ser reguladas por otros mecanismos de regulación, como en el caso de su fosforilación por otras cinasas como la PKC o la PKA, muchas veces con efectos opuestos según el subtipo de GRK del que se trate. Muchas otras proteínas como caveolina, clatrina, miembros de la familia de las Raf cinasas, de las MAPK, ERK, c-Src, Akt, PI3K también modulan la actividad de las GRK de un modo u otro (Penn y cols., 2000; Penela y cols., 2006; Ribas y cols., 2007).

En definitiva, la complejidad funcional que supone las interacciones de las GRK con otras proteínas indican un rol centralizado de estas cinasas en la regulación de numerosas vías de señalización intracelular (Penela y cols., 2006).

2.3.2 Clasificación, distribución tisular y papel fisiológico de las GRK.

Las GRK son enzimas que pertenecen a la familia de cinasas 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 a los GPCR. Todas ellas comparten semejanzas estructurales.

Su peso molecular está en torno a 60-80 kDa, con dominio catalítico central muy conservado dentro de la familia de cinasas de serina/treonina de ~270 aminoácidos, encontrándose cercado 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 $G\beta\gamma$, (Eichmann y cols., 2003), y 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 subcelular y a la traslocación dependiente de agonista, favoreciendo la interacción con lípidos y otras proteínas, conteniendo un dominio homólogo de pleckstrina con puntos de unión a PIP_2 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 GRK diferentes pero que comparten algunas de las características mencionadas anteriormente, y que en definitiva son diferentes cinasas con propiedades reguladoras específicas. Así pues, basándose en las diferencias estructurales y funcionales, los miembros de la familia de las GRK se han separado en tres subfamilias:

- 1) Subfamilia de las cinasas de rodopsina, donde se encuentran GRK1 y GRK7, también denominadas GRK visuales por estar presentes de manera específica en células de la retina;

- 2) Subfamilia de las cinasas de los AR- β , compuesta por GRK2 y GRK3;
- 3) Subfamilia GRK4 a la que además también pertenecen GRK5 y GRK6 (Metayé y cols., 2005; Ribas y cols., 2007).

Existen 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)

GRK1

Fue la primera cinasa de la que se tuvo conciencia, inicialmente llamada cinasa 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 cinasa ha sido detectada sobre todo en células específicas de la retina (conos y bastones) y en la glándula pineal (Somers & 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).

GRK2

Una de las cinasas que más se ha estudiado por su papel regulador mayoritario sobre los AR- β . Anteriormente nombrada como la cinasa 1 de los AR- β (β -ARK1) (Benovic y cols., 1986, 1987b), se encuentra expresada a lo largo de todo el organismo en multitud de órganos y tejidos diferentes, sobre todo en aquellos en los que los AR- β juegan un papel importante, pero también es responsable de la regulación de la inmensa mayoría de receptores acoplados a proteínas G (Premont & Gainetdinov, 2007). Numerosos estudios han probado el rol de la GRK2 en el control de funciones cardiovasculares como la contracción y el desarrollo cardíaco, o la regulación de la presión arterial. Estudios en ratones *knock out* (KO) para la GRK2, han demostrado que esta cinasa juega un papel importante en el desarrollo embrionario y la función cardíaca 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 \pm se desarrollan normalmente pero presentan un aumento de la contracción ventricular tras estimulación con agonistas β -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 AR- β 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 β -adrenérgica (Eckhart y cols., 2002). Por otro lado se ha comprobado tanto la presencia de esta cinasa 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).

GRK3

Anteriormente llamada β -ARK2 (Benovic y cols., 1991). Como su homóloga GRK2, se encuentra expresada a lo largo de todo el organismo en multitud de órganos y tejidos diferentes. El análisis del ARNm en tejidos humanos revela una moderada expresión de GRK3 en pulmón, corazón y adipocitos, siendo los 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

GRK4

La única identificada con 4 isoformas, expresada en su mayoría en testículos y cerebro, aunque también se ha 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).

del corazón mediada por los AR- β (Iaccarino y cols., 1998a).

GRK5

Perteneciente a la tercera subfamilia. Importante en la regulación cardiovascular, abundante en el corazón por lo que se le supone un papel fundamental en la regulación de la contractilidad cardíaca, además de estar expresada en pulmón, músculo esquelético o riñón en menor proporción (Kunapuli & Benovic, 1993). Se ha visto que la sobreexpresión selectiva de GRK5 en corazón de ratones transgénicos provocaba una mayor

desensibilización de los AR- β , y por lo tanto una disminución de sus funciones fisiológicas, comprobándose la implicación de esta cinasa en la regulación de la función cardiaca (Rockman y cols., 1996). Por otro lado parece que la GRK5 está implicada en la regulación cardiopulmonar a través de receptores muscarínicos M2 (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- β_2 y sobre el AR- β_1 (Keys y cols., 2005).

GRK6

Pertenciente a la tercera sub-familia. En cultivo celular se ha visto implicada en la desensibilización de numerosos GPCR como los receptores para la hormona folículo estimulante, tromboxano A2, muscarínicos M3 entre otros (Metayé y cols., 2005), así como de los AR- β 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 cinasa en la regulación de la quimiotaxis en linfocitos T y neutrófilos (Kavelaars y cols., 2003; Vroon y cols., 2004b). Además, la falta de esta cinasa en ratones KO, provoca un aumento en la sensibilidad ante efectos locomotrices de psicoestimulantes tales como cocaína y anfetamina, dos compuestos relacionadas con la transmisión dopaminérgica (Gainetdinov y cols., 2003).

GRK7

La última cinasa clonada hasta el momento (Weiss y cols., 1998), localizada en la retina, que en humanos se encuentra exclusivamente en conos y 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).

Todas estas cinasas 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 IC (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 & 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 GPCR 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 cinasas más implicadas en el control de la funcionalidad y la enfermedad a nivel cardiovascular: GRK2, GRK3 y GRK5.

2.4.- Localización y funciones fisiológicas de los Adrenoceptores a nivel cardiovascular e inmunitario.

La distribución de cada subtipo a lo largo del organismo varía, por lo que un subtipo u otro estará más o menos implicado en el control en uno u otro proceso fisiológico o patológico, dependiendo del territorio que se trate (Piascik & Pérez, 2001). Así pues, el conocimiento exacto de las diferencias en las funciones de los subtipos de AR 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 AR cuya alteración podría conducir al desequilibrio fisiológico que conduce a la enfermedad cardiovascular. Clasificaremos y expondremos su distribución a lo largo de esta sección, expresando mayor empeño a nivel cardiovascular.

2.4.1 Adrenoceptores a nivel cardiovascular

○ Alfa

La contracción vascular, la fuerza de contracción del corazón, o la hipertrofia celular, están reguladas por AR- α_1 por lo que están directamente implicados en la regulación de la presión arterial, del flujo sanguíneo, el inotropismo cardiaco, o la hipertrofia cardiaca entre otros (Michelotti y cols., 2000; Hein & Michel, 2007).

Muchos trabajos han encontrado ARNm y proteína para los tres subtipos de AR- α_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. α_{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). α_{1B} , se encuentra expresado en todos los vasos pero en

menor proporción a los otros subtipos (Marti y cols., 2005). Existe poca evidencia de su papel exacto en la contracción vascular, aunque sí que parece estar implicado de alguna manera en ella (Cavalli y cols., 1997; Daly y cols., 2002). α_{1D} se encuentra expresado sobre todo en la aorta, las arterias femorales, ilíacas 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 esencial evitando cambios bruscos en el calibre de los vasos controlando el mantenimiento del flujo sanguíneo en unos niveles estables (Ziani y cols., 2002).

Gracias a estudios con ratones 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 α_{1A} y α_{1D} los más implicados y el subtipo α_{1B} el que contribuye en menor proporción (Daly y cols., 2002; Oliver y cols., 2009).

En corazón encontramos los tres subtipos de AR- α_1 , donde al parecer los 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 α_{1A} destaca como mayoritario (Graham y cols., 1996; Jensen y cols., 2009b; Montó y cols., 2012) pero al parecer con niveles similares en todas las partes o cámaras del corazón (Wolf y cols., 1998). Los modelos con ratones KO también han aportado información sobre el papel de los subtipos en la regulación de la función y remodelados cardíacos. Se sabe que los subtipos α_{1A} y α_{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 & Hein, 2004); mientras que el subtipo minoritario, el α_{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 & Hein, 2004).

- **Beta**

Si bien tradicionalmente se describió que el responsable de la relajación del músculo liso era el AR- β_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. En el caso de los grandes vasos de conductancia como la aorta, las arterias mesentérica, esplénica y pulmonar entre otras, el mayoritario es el subtipo β_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; Flacco y cols., 2013) y las arterias mesentéricas de resistencia quién predomina es el β_1 y por lo tanto el principal implicado en la vasorelajación en estos tejidos (Briones y cols., 2005; Flacco y cols., 2013). Por otro lado también se ha descrito el subtipo β_3 en células del músculo liso vascular (Tamaoki y cols., 1998) siendo su efecto menor, pero sobre todo en el endotelio, cuyo efecto vasodilatador viene mediado por la producción de NO (Trochu y cols., 1999).

En corazón se encuentran presentes los tres subtipos, siendo el de mayor porcentaje el subtipo β_1 (70-80%) frente a β_2 (20-30%) (Brodde, 1991; Montó y cols., 2012) y el minoritario con diferencia el β_3 . El subtipo β_1 es el principal responsable de la contracción muscular del corazón y del control del ritmo cardiaco, y por ello crucial en el control de la frecuencia y gasto cardiaco, mientras que el subtipo β_2 está implicado en menor medida en la contracción debido a que se encuentra inicialmente secuestrado en las caveolas (Rybin y cols., 2000). Ambos subtipos mayoritarios β_1 y β_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). Se conoce que una estimulación sostenida del AR- β_1 cardiaco desencadena el deterioro del corazón por estimular la apoptosis, mientras que el estímulo sostenido del subtipo β_2 facilita la activación de efectos cardioprotectores, 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 IC, y es 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 β_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 IC o la hipertensión (Gauthier y cols., 1996; 2007).

- **Adrenoceptores a nivel renal**

- **Alfa**

En el riñón también se han descrito los AR, siendo mayoritario el subtipo $\alpha_{1B} \geq \alpha_{1A}$ según su localización (Graham y cols., 1996), pero su rol funcional no parece estar claro aún. Al parecer tanto α_{1A} , en mayor grado, como α_{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 Na^+ (efecto antidiurético), y es capaz de producir hipertensión (Yoshida & Satoh, 1991). Numerosos estudios indican que los AR- α_1 aumentan la retención de Na^+ (Osborn y cols., 1983; Elhawary y cols., 1992; Sattar & Johns, 1995) y al parecer sería el subtipo α_{1B} quien mediaría este proceso en las células del túbulo distal (Elhawary & 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 AR, los α_2 (Gesek, 1999).

- **Beta**

En riñón el subtipo predominante es el β_1 . Se ha visto que los agonistas β 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 β_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 β_1 y β_2 reduce significativamente la liberación de renina, y el receptor β_3 minoritario no tendría efectos marcados (Kim y cols., 2007).

2.4.3 Adrenoceptores en el sistema inmune

- **Alfa**

Algunos autores han descrito la presencia de los AR- α_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 α_{1A} sería el de menor presencia (Ricci y cols., 1999; Tayebati y cols., 2000), otros autores no han podido detectarlos atribuyéndose esta falta de AR- α_1 , al parecer, a las condiciones de reposo funcional de la actividad propia del linfocito (Roupe van der Voort y cols., 1999). En linfocitos y monocitos se induce la expresión de los AR- α_1 al ser estimulados, observándose un aumento en la expresión de dos subtipos, los AR- α_{1B} y α_{1D} (Roupe van der Voort y col. 1999; 2000). No se conoce el papel exacto de los AR- α_1 en la regulación/activación de la célula inmune (Kavelaars, 2002), pero

sí que se ha sugerido la posibilidad de usarlos como biomarcador o de enfermedades cardiovasculares entre otras, ya que podría reflejar cambios en estos receptores en el organismo (Ricci y cols., 1999; Tayebati y cols., 2000).

- **Beta**

La distribución de los tres subtipos en linfocitos es $\beta_2 > \beta_1 \gg \beta_3$ (Yu y cols., 2007). La presencia de los AR- β , lleva mucho tiempo siendo estudiada desde que se describieran por primera vez (William y cols., 1976). El subtipo mayoritario, β_2 (Loveland y cols., 1981), es el 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 & Sanders, 2001; Sanders & Straub, 2002). Incluso se ha llegado a sugerir que el AR- β_2 pudiera ser la conexión entre el sistema nervioso y el sistema inmune (Kin & Sanders, 2006). Se ha observado una correlación en la densidad de los AR- β 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 AR en linfocitos en enfermedades cardiovasculares como la HTA (Brodde y cols., 1985; Parfyonova y cols., 1988) y la IC entre otras (Iaccarino y cols., 2005; Yu y cols., 2007)

3.- INSUFICIENCIA CARDIACA

Una vez conocido cómo los AR y GRK actúan y se distribuyen a nivel cardiovascular en condiciones fisiológicas, pasaremos a indagar cómo actúan en estados de estrés o patología cardíaca. En la presente tesis unificaremos datos experimentales obtenidos a nivel de laboratorio con datos procedentes de la clínica, para intentar así, esclarecer el papel que ejercen los AR y sus cinasas reguladoras en la IC. Ante esto, necesitamos conocer aquellos aspectos que determinan la IC tanto a nivel etiológico como clínico y el papel que juega la regulación farmacológica de estos receptores.

3.1.- Definición.

La insuficiencia cardíaca es una situación grave, progresiva e irreversible. No se trata de una enfermedad concreta, sino de un amplio síndrome en el que los pacientes presentan las siguientes características:

- síntomas, falta de aire o fatiga tanto en reposo como durante el ejercicio,
- signos de retención de líquidos, como congestión pulmonar o hinchazón de tobillos,
- evidencia objetiva de una alteración cardíaca estructural o funcional en reposo.

Desde que Hipócrates describió la IC como la hidropesía de los pulmones hasta que en 1628 William Harvey publicó *De Motus Cordis*, prevaleció la idea hipocrática de que la función del corazón era generar el espíritu vital (*pneuma*) o bien la galénica que le atribuía la función de calentamiento de la sangre. Con la nueva concepción del corazón como bomba de Harvey, basada en demostraciones empíricas, se abrieron las puertas para identificar a la disnea y los edemas como consecuencias clínicas del fallo de bomba. Sin embargo, tenemos que esperar al último siglo para asistir a los mayores avances el conocimiento del síndrome de IC que provocaron un cambio progresivo en la definición de esta patología.

Por la variedad de rasgos que presenta el síndrome, surge la dificultad de establecer una única definición universalmente aceptada. Aunque el reconocimiento de los casos típicos de IC sea sencillo en la práctica clínica, es extremadamente complicado formular una definición que englobe satisfactoriamente todas sus facetas. Se ha ido variando el concepto de IC a medida que aumentaba el conocimiento de su etiopatogenia, pasando de un primer modelo cardiorrenal, a un modelo hemodinámico, posteriormente a un modelo neurohormonal y actualmente se estudia el modelo molecular.

Algunas de las definiciones aceptadas durante el transcurso del siglo XX:

“Condición en la que el corazón fracasa en descargar adecuadamente su contenido” (Lewis, 1933).

“Situación fisiopatológica en la que el corazón es incapaz de sufragar las necesidades tisulares partiendo de una presión ventricular de llenado normal” (Harrison, 1939).

“Estado en el que el corazón falla en mantener una adecuada circulación para las necesidades corporales a pesar de disponer de una presión de llenado satisfactoria” (Wood, 1950).

Aproximándonos al siglo XXI Packer propone una definición especialmente útil para comprender tanto su fisiopatología como sus manifestaciones clínicas, y afirma que la IC es un *“síndrome clínico complejo que se caracteriza por anomalías de la función ventricular izquierda y de la regulación neurohormonal, que conlleva intolerancia al ejercicio, retención de líquidos y disminución de la longevidad”* (Packer, 1988; McMurray, 2012)

Una de las definiciones más habitualmente utilizada, es la propuesta por Braunwald quien establece que la IC es la *“incapacidad del corazón de bombear la sangre necesaria para proporcionar los requerimientos metabólicos del organismo, o bien cuando esto sólo es posible a expensas de una elevación de la presión de llenado ventricular”* (Braunwald y cols., 2003)

A nivel molecular Katz expone que la IC es un *“síndrome clínico en el que una enfermedad del corazón disminuye el gasto cardíaco, aumenta las presiones venosas y se acompaña de anomalías moleculares que causan un deterioro progresivo del corazón disfuncionante y una muerte prematura de las células miocárdicas”* .

Dos de las más importantes sociedades que se centran en el estudio de las enfermedades cardíacas también han buscado su definición. La American Heart Association (AHA) explica que la IC es un *“síndrome clínico consecuencia de trastornos estructurales o funcionales que disminuyen la capacidad del ventrículo para llenarse o para bombear sangre, añadiendo que las manifestaciones esenciales de la IC son la disnea y la fatiga, que limitan la tolerancia al esfuerzo y la retención de fluidos que puede conducir a la congestión pulmonar y al edema periférico”* , mientras que según las guías de práctica clínica de la Sociedad Europea de Cardiología, la IC se puede definir como una *“anomalía de la estructura o la función cardíacas que hace que el corazón no pueda suministrar oxígeno a una frecuencia acorde con las necesidades de los tejidos metabolizantes pese a presiones normales de llenado (o solo a costa de presiones de llenado aumentadas)”* (McMurray y cols. 2012).

Ante tanta definición y buscando una generalidad en común, observamos como actualmente no existen muchas diferencias entre las diversas definiciones de IC y que todas las mostradas comprenden y llevan a la misma dirección, la incapacidad del corazón para mantener la circulación en el nivel requerido para la oxigenación hística, provocando una serie de alteraciones neuroendocrinas, o bien que la cumple a costa de activar mecanismos de compensación perniciosos.

3.2 Clasificación

Al igual que se hace complicado encontrar una definición adecuada para la IC lo mismo ocurre en su clasificación. Las definiciones antes comentadas son escasamente aplicables en la clínica, por lo que precisa la ayuda de una serie de términos descriptivos para acotar mejor el concepto y la situación clínica del paciente. Entre las diferentes clasificaciones encontramos:

- Según síntomas y funcionalidad tras actividad física (Clasificación NYHA):

Se trata de una de las más empleada por los clínicos, 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 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.

Clase I: Sin limitación de la actividad física; el ejercicio normal no causa limitaciones.

Clase II: Ligera limitación de la actividad física, sin síntomas en reposo; la actividad física normal causa fatiga, palpitaciones o disnea.

Clase III: Acusada limitación de la actividad física, sin síntomas en reposo; cualquier actividad física provoca aparición de síntomas.

Clase IV: Incapacidad de realizar actividad física; los síntomas están presentes incluso en reposo y aumenta con cualquier actividad física.

- Según cambios estructurales o daños sufridos en músculo cardíaco (Clasificación ACC/AHA).

Describe los distintos grados de IC basados en cambios estructurales o daños sufridos en el músculo cardíaco y sus síntomas asociados. Esta clasificación estructural es la 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).

Estadio A: Con alto riesgo de IC. Anomalía estructural o funcional no identificada; sin signos ni síntomas.

Estadio B: Enfermedad cardiaca estructural desarrollada claramente en relación con la IC, pero sin signos ni síntomas.

Estadio C: IC sintomática asociada a enfermedad estructural subyacente.

Estadio D: Enfermedad cardiaca estructural avanzada y síntomas acusados de IC en reposo a pesar del tratamiento médico.

o Según Fracción de eyección (FE) del corazón:

- FE conservada (>50%)
- FE baja (<50%)

La mayoría de las IC, por definición, cursan con bajo GC pero hay una serie de situaciones en las que aparece IC a pesar de existir un GC elevado. Los mecanismos patogénicos de la IC de gasto elevado son dependientes del proceso patológico primario y, frecuentemente, muy complejos. En la mayor parte de los casos la causa suele ser que el corazón se ve obligado a mantener un elevado GC para mantener una oxigenación tisular normal, por incremento patológico de las demandas (hipertiroidismo), por la existencia de shunts (fístulas) o por defecto de los vectores transportadores de O₂ (anemia severa)

o Según Curso clínico:

- Agudo
- Crónico

Las manifestaciones clínicas de la IC dependen en gran medida de la rapidez de su instauración, estableciéndose o no la posibilidad de puesta en marcha de los mecanismos de compensación. El prototipo de la IC aguda sería la que puede establecerse como complicación de un infarto agudo de miocardio (IAM) extenso, mientras que el de IC crónica podría ser la que se observa en pacientes portadores de una miocardiopatía dilatada que progresa lentamente. En el primer caso, la reducción brusca del GC es fácil que determine una grave hipoperfusión secundaria de órganos y riesgo vital mientras que en el segundo caso los mecanismos compensadores permiten una adaptación funcional gradual con la aparición de síntomas y signos de lenta evolución.

o Según localización ventricular:

- Izquierda: Disnea progresiva, ortopnea, tos de decúbito y disnea paroxística nocturna
- Derecha: Ingurgitación yugular, hepatomegalia, ascitis y edemas

En la IC derecha se objetivan datos de congestión sistémica, en la IC izquierda predomina la congestión pulmonar, y en la IC global o biventricular existe hipertensión venosa generalizada. Por ejemplo, en el caso de una estenosis mitral los primeros síntomas que

aparecen son los de congestión pulmonar por fallo retrogrado, es decir, una IC izquierda. Por el contrario, en la estenosis tricuspídea, la clínica inicial será la de una acumulación de líquidos en el territorio venoso periférico, con edemas, ingurgitación yugular y hepatomegalia, es decir, una IC derecha. Sin embargo, a lo largo de la historia natural de la enfermedad ambas situaciones se interrelacionaran coexistiendo una IC izquierda y derecha, en cuyo caso suele hablarse de IC congestiva.

- Según la eficacia de los mecanismos de compensación:

- Compensada
- Descompensada

La IC terminal o refractaria es una situación especial, irreversible, en la que se han agotado los recursos terapéuticos habituales y sólo queda la opción potencial del trasplante cardíaco.

- Según la capacidad del GC de los ventrículos:

- IC sistólica o anterógrada: síntomas derivados del bajo GC y la dilatación ventricular.
- IC diastólica o retrógrada: dificultad al llenado ventricular por trastorno de relajación o por la existencia de obstrucción mecánica, se expresa mediante signos de congestión pulmonar con contractilidad normal.

Un ejemplo de IC sistólica es la que se produce en las miocardiopatías dilatadas en las que el trastorno fundamental es que el miocardio no tiene “fuerza” para impulsar la sangre durante la sístole, dando lugar a la forma clásica de IC en la que la sintomatología se relaciona fundamentalmente con un GC disminuido. Por el contrario, la IC diastólica suele deberse a isquemia miocárdica y/o hipertrofia ventricular izquierda, sobre todo en ancianos, y se manifiesta fundamentalmente con disnea y signos de congestión pulmonar.

3.3 Epidemiología

La IC es un trastorno progresivo y letal, aun con tratamiento adecuado. La supervivencia es del 50% a los 5 años del diagnóstico, por lo que no es mejor que la de muchos cánceres, por ello se trata de un problema de salud pública de primer orden. El consumo de recursos sanitarios atribuible a esta enfermedad es ingente. Históricamente, la IC ha sido causa del 3-5% de los ingresos hospitalarios en nuestro medio, y es la primera causa de hospitalización de mayores de 65 años con un 7,8%. Se estima que un 2% del gasto sanitario en países desarrollados se destina a la IC, y no parece que haya tendencia a la reducción de ingresos por IC en la última década.

En los países desarrollados, aproximadamente un 2% de la población adulta padece IC, una prevalencia que aumenta exponencialmente con la edad, pues es inferior al 1% antes de los 50 años y posteriormente se duplica con cada década hasta superar el 8% entre los mayores de 75 años. El elevado número de casos de IC en España está determinado fundamentalmente por el envejecimiento progresivo de su población. En el periodo desde el censo de población de 1991 hasta la estimación del 1 de enero del 2012, la población española mayor de 65 años pasó de 5.370.252 a 8.029.674, un incremento del 50%.

Datos epidemiológicos destacables a nivel nacional sobre la IC

Prevalencia: 5%, 2.336.000 pacientes (Prevalencia > 8% en > 75 años) (Sayago y cols., 2013)

Incidencia: 0,39 % ,182.222 nuevos pacientes cada año (Sayago y cols., 2013)

Mortalidad: 18.453 muertes/año por Insuficiencia Cardíaca (12.041mujeres / 6.412 hombres) (INE 2012)

Hospitalizaciones: 133.029 / año (INE 2012)

Duración de la estancia hospitalaria en días: 9 ± 5 días (Sayago y cols., 2013)

Las hospitalizaciones por Insuficiencia cardíaca suponen el 5% del total de las hospitalizaciones, siendo la primera causa de hospitalización en personas > 65 años (Sayago y cols., 2013)

El coste de la asistencia sanitaria de esta enfermedad supone entre el 1,8 y el 3,1% del total del presupuesto sanitario público. La atención hospitalaria supone el 73% de este gasto (Sayago y cols., 2013)

En España tan sólo disponemos de un estudio sobre incidencia de la IC, centrado en la población de Puerto Real (Cádiz), que estudió a individuos mayores de 14 años (267.231) adscritos al Sistema Nacional de Salud entre 2000 y 2007. El diagnóstico de IC se basó en los criterios clínicos de Framingham. La incidencia encontrada fue de 2,96/1.000 personas-año en 2000 y 3,90/1.000 personas-año en 2007. Las cifras no difieren esencialmente de las del estudio de Framingham, efectuado en Estados Unidos en los años ochenta, en que la incidencia entre los mayores de 45 años era de 4,7/1.000 personas-año. En estudios europeos más recientes, como los de Rotterdam y Hillingdon, se describió una incidencia de IC creciente con la edad, que en este último pasó de 1,4 (cada 1.000 personas-año) a los 50-59 años, 3,1 a los 60-64 años, 5,4 a los 65-69 años, 11,7 a los 70-74 años y > 17,0 a los 75 y más años.

En España solo se han realizado dos estudios sobre prevalencia de la IC de base poblacional, PRICE (Prevalencia de Insuficiencia Cardíaca en España) y EPISERVE (Insuficiencia cardíaca en consultas ambulatorias: comorbilidades y actuaciones diagnóstico- terapéuticas por diferentes especialistas) ambos publicados en el año 2008.

En el estudio PRICE, mediante muestreo aleatorio, se invitó a participar a 2.703 personas mayores de 45 años, de las que el 66% aceptó. El diagnóstico de IC se sospechó en atención primaria por criterios de Framingham, y se confirmó por cardiólogos tras el hallazgo de alguna anomalía ecocardiográfica, orgánica o funcional significativa. Con esos criterios, se describe una prevalencia de IC del 6,8%, similar en varones y mujeres. Por edades, la prevalencia fue del 1,3% entre los 45-54 años, del 5,5% entre los 55-64, del 8% entre los 65-75 y del 16,1% entre los mayores de 75.

En el estudio EPISERVE participaron 507 investigadores, homogéneamente distribuidos por toda España, que atendían a pacientes en consultas ambulatorias de atención primaria, cardiología y medicina interna. Se estudió a un total de 2.534 pacientes (5 cada investigador), y se definió la IC según los criterios de Framingham. La prevalencia encontrada fue del 4,7% (Sayago-Silva y cols., 2013)

3.4 Etiopatogenia

Las causas capaces de provocar una IC pueden clasificarse en tres grupos:

- a) Las que producen un daño miocárdico directo
- b) Las que provocan sobrecargas ventriculares
- c) Las que provocan una obstrucción o restricción del llenado ventricular

a) Daño miocárdico

El daño de la fibra miocárdica lleva a la IC por disminución directa de la contractilidad. Este daño miocárdico puede ser primario o secundario. Entre las enfermedades que causan un *daño miocárdico primario* ventricular se incluyen fundamentalmente las Miocarditis y las Miocardiopatías idiopáticas entre las cuales la más frecuente es la Miocardiopatía dilatada idiopática. Mientras que las causan *daño miocárdico secundario*, la más frecuente, es la Cardiopatía Isquémica que se caracteriza por alteraciones segmentarias de la contractilidad por isquemia o necrosis, tras un IAM. A largo plazo, también las sobrecargas ventriculares, tanto de presión como de volumen, acaban produciendo daño miocárdico y alteración de la contractilidad.

b) Sobrecarga ventricular:

Las sobrecargas ventriculares, tanto de presión como de volumen, pueden causar IC aun cuando la contractilidad sea inicialmente normal, pero a largo plazo, acabarán produciendo daño miocárdico.

Las *sobrecargas de presión* se producen cuando existe "un obstáculo" para el normal vaciamiento de la cavidad cardiaca correspondiente y en consecuencia suponen un aumento de la postcarga. Cuando se produce sobre el ventrículo izquierdo, como ocurre en la HTA o en la Estenosis Aórtica, provocan fundamentalmente IC izquierda, mientras que en el caso del ventrículo derecho, las sobrecargas de presión o aumentos de la postcarga, como ocurre en la Hipertensión Pulmonar o en la Estenosis de la Pulmonar, provocan IC derecha.

En ambos casos, el aumento mantenido de la postcarga va a condicionar hipertrofia ventricular concéntrica en un intento de mantener la tensión de la pared ventricular y evitar la aparición de síntomas clínicos, a más largo plazo esta hipertrofia patológica se acompaña de fibrosis, aumento del colágeno y cambios en la estructura proteica del miocito, que acabarán condicionando un deterioro de la función contráctil.

Las *sobrecargas de volumen* ocurren cuando aumenta el contenido de la cavidad cardiaca correspondiente e implican por lo tanto un aumento de la precarga. Se incluyen como causa de IC por este mecanismo la Insuficiencia Mitral y Aórtica, la Comunicación Interauricular e Interventricular y el Conducto Arterioso persistente, siendo entre todas ellas la Insuficiencia Mitral la causa más frecuente de IC.

En las sobrecargas de volumen agudas, como ocurre en las roturas valvulares que condicionan insuficiencia mitral o aórtica agudas, se produce un aumento brusco e importante de la precarga, que supera rápidamente los límites de tolerancia, no dando tiempo a la puesta en marcha de otros mecanismos de compensación como la hipertrofia con lo que se produce rápidamente una IC sin que existan obligatoriamente alteraciones de la contractilidad. Sin embargo en las sobrecargas crónicas de volumen, cuando aparecen signos de IC casi siempre existe un deterioro añadido de la función contráctil, puesto que en las fases previas los mecanismos de compensación suelen ser suficientes durante mucho tiempo para mantener el paciente asintomático.

c) Restricción y Obstrucción del llenado ventricular

En estos casos, la IC es consecuencia de una dificultad al llenado ventricular que impide que el ventrículo se rellene de sangre de forma adecuada aumentando la presión de forma retrógrada en las aurículas y el sistema venoso. Por lo tanto, no suele haber disfunción sistólica ventricular. Esta dificultad al llenado ventricular puede deberse a una obstrucción en el tracto de entrada ventricular como sucede en la Estenosis Mitral y Tricuspídea o a un impedimento de la cámara ventricular para distenderse en diástole como ocurre en el Taponamiento Cardíaco, Constricción Pericárdica o en las Miocardiopatías Restrictivas. También puede existir una dificultad al llenado ventricular en la Miocardiopatía Hipertrofica y en los casos excepcionales de tumor intraauricular como es el caso de los Mixomas.

Encontramos dos patrones de IC, uno con función sistólica preservada, más asociado a la hipertensión, y otro con función deprimida, más relacionado con la cardiopatía isquémica. La HTA explica cerca de la mitad de los casos de IC, y la enfermedad isquémica del corazón una cuarta parte de éstos (González, 2005)

3.5.- Fisiopatología

Como se ha comentado en la etiopatología, la IC puede ser provocada principalmente por tres causas como son el daño directo en miocardio, sobrecargas ventriculares y obstrucción o restricción del llenado ventricular. Dependiendo del origen se ocasionará la activación de los diferentes mecanismos de adaptación que buscan mantener y normalizar la función de bomba del corazón

3.5.1.- Mecanismo de Frank-Starling:

Cuando se produce daño miocárdico se deteriora la capacidad de vaciamiento del ventrículo durante la sístole aumentando por lo tanto el volumen de sangre al final de la diástole y la tensión que se ejerce sobre las fibras miocárdicas no dañadas en esta fase. El ventrículo responde a este incremento en la tensión diastólica o precarga potenciando su contracción de acuerdo a la *ley de Frank-Starling* según la cual la energía liberada en cada contracción es proporcional a la elongación de la fibra muscular cardíaca al final de la diástole y por lo tanto depende fundamentalmente del volumen telediastólico. En el corazón sano este proceso es muy eficaz y a medida que aumenta el volumen telediastólico aumenta tanto la fuerza de contracción como el volumen de eyección, sin embargo en corazón insuficiente este mecanismo se encuentra más limitado de manera que se requieren aumentos importantes del volumen de llenado para lograr menores incrementos del volumen de eyección que en el corazón normal. En esta situación el corazón dilatado e insuficiente resulta ser más dependiente de la postcarga que de la precarga y se ve incapaz de soportar pequeños incrementos de la postcarga sin sufrir un descenso sustancial del GC. Si esto perdura en el tiempo puede desarrollarse un deterioro en el que aumentos adicionales de volumen diastólico ya no solo no consiguen aumentos del volumen de eyección sino que lo disminuyen. En estadios avanzados en los que la contractilidad miocárdica está deprimida, la curva de Frank-Starling se convierte en aplanada, por lo que la mayor precarga no se traduce en un mayor GC. Por lo que este mecanismo tiene como contrapartida efectos negativos como congestión retrógrada, aumento de la tensión de la pared, dificultad de flujo coronario subendocárdico e insuficiencia mitral progresiva.

Contribuyen a la activación del mecanismo de Frank-Starling la activación del sistema simpático, la vasopresina y el eje renina-angiotensina aldosterona. A largo plazo, resulta ser

un mecanismo adverso, puesto que la distensión crónica de la fibra miocárdica promueve la hipertrofia y aumenta la tensión sistólica y diastólica de la pared y, en consecuencia, los requerimientos metabólicos de oxígeno favoreciéndose la isquemia. Por lo tanto, el mecanismo de Frank-Starling es útil a corto plazo, pero cuando se necesita su actuación crónica, es capaz de facilitar el desarrollo de IC (González, 2005).

3.5.2.- Activación de los sistemas neurohormonales.

- Activación del sistema simpático
- Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
- Hormona antidiurética
- Péptido Atrial Natriurético.

En las fases tempranas de la IC aguda intentan mantener la perfusión de los órganos vitales, expandiendo un volumen arterial inadecuado, pero a medida que la IC se hace crónica estos mecanismos pueden causar efectos indeseables tales como una vasoconstricción excesiva, aumento de la postcarga, exagerada retención de sodio y agua, alteraciones electrolíticas y arritmias. Estos efectos pueden llevar, superado un límite, a un mayor deterioro de la función ventricular y a la progresión de los síntomas de la IC.

- Sistema nervioso simpático.

En condiciones normales, los barorreceptores de las paredes arteriales emiten impulsos que frenan los centros diencefálicos vasopresores que controlan la vasoconstricción por medio de la activación del sistema simpático y, en consecuencia, por medio de la liberación de aminas simpaticomiméticas como la dopamina y NA.

En los pacientes con IC, la disminución de la presión arterial secundaria a la caída del GC hace que los barorreceptores dejen de emitir los impulsos frenadores al centro vasopresor con la consiguiente activación del sistema simpático y aumento de la liberación de catecolaminas, que determinan un aumento de la frecuencia cardíaca y contractilidad miocárdica principalmente por activación de los AR- β , y un aumento del retorno venoso por medio de una venoconstricción en este caso por activación de AR- α , todas ellas llevarán a un aumento del GC. Además, la vasoconstricción arterial periférica determinada por este mismo motivo, permite una redistribución del GC hacia territorios vitales como el lecho coronario y la circulación cerebral, en detrimento de otros territorios viscerales como el hígado, riñón y músculo estriado.

La estimulación simpática, y por lo tanto el sistema adrenérgico, juegan un papel muy importante en la compensación del GC, tanto a nivel del corazón como vascular, con el fin

de restablecer la función deteriorada en una IC (Guyton & Hall, 1996). Superado cierto límite, este mecanismo compensador puede tener un efecto deletéreo sobre el corazón del enfermo con IC al aumentar excesivamente la postcarga, el trabajo cardíaco, el consumo miocárdico y precipitar la aparición de arritmias.

- Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

Este sistema se activa como consecuencia de la caída del GC y en estrecha conexión con la activación del sistema simpático, ya que la secreción de renina se estimula por medio de la activación de los AR- β_1 del aparato yuxtaglomerular como consecuencia de la activación inicial del sistema simpático y por estímulo de los barorreceptores de presión del lecho vascular renal que se activan como consecuencia del bajo flujo plasmático renal.

La activación de la renina determina la liberación de angiotensina I a partir del angiotensinógeno, siendo transformada en angiotensina II por medio de la enzima convertidora de angiotensina que se libera en el pulmón y otros tejidos. La angiotensina II es un potente vasoconstrictor y por lo tanto contribuye, junto con la activación simpática, al aumento de las resistencias vasculares sistémicas y de la postcarga, sirviendo además de estímulo para la liberación de aldosterona que, a su vez, actúa sobre la nefrona distal reteniendo sodio y agua y eliminando potasio, con el consiguiente incremento de la precarga.

Superados ciertos límites la activación conjunta del sistema simpático y del eje renina-angiotensina aldosterona, puede crear un círculo vicioso en los enfermos con IC puesto que dicha activación puede llevar a un aumento de la precarga y de la postcarga que empeore la IC.

- Hormona antidiurética o Vasopresina

En condiciones normales, la producción y liberación de vasopresina por parte de la hipófisis responde a factores osmóticos de tal forma que un aumento de la osmolaridad plasmática induce su liberación pero, además, existen receptores de estiramiento en las aurículas que responden a la distensión auricular con la inhibición de la liberación de esta hormona. En la IC se produce una pérdida de la sensibilidad de estos receptores que dejan de responder al estiramiento disparándose la liberación de la hormona antidiurética (ADH). Esta hormona es un potente vasoconstrictor que contribuye al aumento de la postcarga y que, además, condiciona la retención de agua libre, aumentando la precarga y contribuyendo a la hiponatremia que en ocasiones se observa en los estadios avanzados de la IC crónica

- Péptido Atrial Natriurético.

Se produce como consecuencia de un incremento de la presión de distensión auricular y se comporta como una hormona contra reguladora que se opone a los efectos vasoconstrictores

y de retención de sodio y agua de los sistemas adrenérgicos, renina angiotensina-aldosterona y vasopresina. Por lo tanto protege al sistema circulatorio contra la sobrecarga de volumen, provocando vasodilatación e incrementando la excreción de sodio y agua. (Francis y cols., 1984; Packer, 1992)

3.5.3.- Remodelado miocárdico

Los primeros mecanismos de adaptación aparecen rápidamente y pueden mantener la función de bomba a niveles relativamente normales. La hipertrofia y el remodelado se desarrollan de forma más lenta, y tienen un papel fundamental en la adaptación a largo plazo a la sobrecarga hemodinámica impuesta al ventrículo, constituyendo un mecanismo compensador que se fundamenta en la Ley de Laplace, según el cual: tensión o estrés es directamente proporcional a la presión intraventricular y al radio de la cavidad, e inversamente proporcional al grosor de la pared ventricular. Por lo tanto, ante una sobrecarga de presión o una dilatación ventricular, el corazón responde con la hipertrofia o engrosamiento de la pared en un intento por mantener la tensión parietal. Ello se consigue mediante el incremento subsecuente de sarcómeros. Además, las proteínas miofibrilares sintetizadas como consecuencia de ello tienen las características de las miofibrillas del miocardio fetal, que tiene una menor actividad ATPasa y una menor velocidad de acortamiento con lo que el consumo energético es menor; con todo ello se disminuye el consumo de O₂, tanto en un sentido cuantitativo (más grosor = menor tensión) como cualitativo (miofibrillas de menor consumo de O₂).

Se pueden diferenciar clásicamente dos tipos de hipertrofia principales, según el tipo de sobrecarga:

- La *hipertrofia concéntrica* es la que se produce como consecuencia de una sobrecarga de presión. En este caso el estrés sistólico aumentado (postcarga) induce la replicación de los sarcómeros en paralelo con el consiguiente aumento del grosor de la célula miocárdica. El resultado es el engrosamiento de la pared ventricular sin aumentar el diámetro de la cavidad e incluso, en algunos casos, disminuyendo el tamaño de la cavidad, como se ve en algunos casos de estenosis aórtica severa.

- La *hipertrofia excéntrica* que ocurre como consecuencia de una sobrecarga de volumen, el aumento de tensión de la pared en diástole (precarga) induce la replicación de los sarcómeros en serie, dando lugar a un alargamiento de las células miocárdicas con aumento del diámetro de la cámara ventricular. Es decir, el grosor de la pared y el diámetro ventricular aumentan proporcionalmente manteniéndose la relación entre el grosor y el radio de la cavidad, como es el caso de las insuficiencias valvulares y sobre todo de la mitral pura.

Nos encontramos también la hipertrofia fisiológica (deportistas) que puede desencadenar en patológica cuando supera un cierto límite, en este caso, tras el aumento del número de sarcómeros también se produce un aumento desproporcionado de fibroblastos y de la matriz colágena intersticial contribuyendo al aumento del grosor de la pared pero no a la capacidad contráctil del corazón, lo que nos lleva en fases avanzadas a un mayor grado de disfunción sistólica. (González, 2005)

3.6.- Diagnóstico de la insuficiencia cardíaca

En 1933, Sir Thomas Lewis afirmó en su libro de texto sobre enfermedad cardíaca que “*la verdadera esencia de la medicina cardiovascular está en la identificación de la insuficiencia cardíaca en su fase inicial*” .

3.6.1.- Síntomas y signos de la insuficiencia cardíaca

Los síntomas y signos de la IC son la clave para la detección precoz de la enfermedad, ya que son éstos los que impulsan al paciente a buscar atención médica. Realizar una historia médica completa y una exploración física exhaustiva son habilidades imprescindibles que el clínico debe dominar. La falta de aire, el cansancio y la fatiga son síntomas característicos; sin embargo, obtener y evaluar esta información requiere experiencia y habilidad, especialmente cuando se trata del paciente de edad avanzada. Durante el examen clínico deben evaluarse los síntomas clínicos de la IC mediante la observación, la palpación y la auscultación (Tabla 1).

● ● ● **Tabla 1**

Aspectos fundamentales de la exploración física de los pacientes con IC

Aspecto	Nivel de conciencia, estado nutricional, peso
Pulso	Frecuencia, ritmo, caracter
Presión arterial	Sistólica, diastólica, presión del pulso
Sobrecarga de fluidos	Presión yugular venosa Edema periférico, hepatomegalia, ascitis
Pulmones	Frecuencia respiratoria Esternones Derrame pleural Desplazamiento apical
Corazón	Galopes, tercer ruido Soplos que indican disfunción valvular

Al igual que los síntomas, los signos de la IC inicial son difíciles de interpretar tanto en el paciente anciano como en el obeso. Por lo tanto, la sospecha clínica de IC debe confirmarse mediante estudios diagnósticos objetivos, especialmente los que nos permiten evaluar la función cardíaca (Dickstein y cols., 2008).

3.6.2.- Técnicas diagnósticas

En la práctica clínica habitual se emplean distintas pruebas diagnósticas para confirmar o descartar la IC. Estas pruebas generalmente son más sensibles en la detección de la IC con la fracción de eyección reducida. Las pruebas diagnósticas que se describe a continuación son las que se considera adecuadas en pacientes con IC.

- Electrocardiograma (ECG): Se trata de la representación gráfica de la actividad eléctrica del corazón, con ayuda de electrocardiógrafo. Los cambios electrocardiográficos son frecuentes en los pacientes con IC aunque un ECG anormal tiene poco valor predictivo para determinar con total seguridad la presencia de IC. Si el ECG es completamente normal, especialmente los parámetros relativos a la función sistólica, la presencia de IC es poco probable (<10%).
- Radiografía de tórax: La radiografía de tórax es una herramienta fundamental en el proceso diagnóstico de la IC. Permite evaluar la presencia de congestión pulmonar y puede revelar causas pulmonares o torácicas que expliquen la disnea. La radiografía de tórax es útil para detectar cardiomegalia, congestión pulmonar y acumulación de líquido pleural y puede evidenciar la presencia de enfermedad o infección pulmonar que podría causar o contribuir a la disnea. Aparte de la congestión, los hallazgos de la radiografía de tórax sólo tienen un valor predictivo de IC cuando haya signos y síntomas típicos de esta enfermedad. La cardiomegalia puede estar ausente tanto en la IC aguda como en su forma crónica.
- Pruebas de laboratorio: Un examen sistemático completo del paciente con sospecha de IC incluye un hemograma completo (hemoglobina, leucocitos y plaquetas), electrolitos séricos, creatinina sérica, tasa de filtración glomerular estimada, glucosa, pruebas de la función hepática y análisis de orina. Dependiendo del cuadro clínico del paciente, se considerarán otras pruebas adicionales. Las alteraciones hemáticas o electrolíticas no son frecuentes en la IC leve o moderada que no ha sido tratada; sin embargo, son comunes la anemia leve, la hiponatremia, la hiperpotasemia y una función renal reducida, especialmente en pacientes tratados con diuréticos e inhibidores neurohormonales (inhibidores de la enzima de conversión de angiotensina [IECA], antagonistas de los receptores de angiotensina [ARA], antagonistas de la aldosterona). Es fundamental controlar adecuadamente al paciente durante las fases de instauración, ajuste y seguimiento del tratamiento de la IC.

Péptidos natriuréticos: Las concentraciones plasmáticas de péptidos natriuréticos son biomarcadores útiles en el diagnóstico de la IC y en el manejo de los pacientes con IC crónica establecida. El aumento de estrés en la pared miocárdica eleva las cifras del

péptido natriurético tipo B (BNP) y el pro-BNP aminoterminal (NT-proBNP). La evidencia disponible respalda su uso en el diagnóstico y en la planificación de las distintas fases de tratamiento, a la hora de tomar decisiones respecto a ingresos y altas hospitalarias y en la identificación de pacientes con riesgo de complicaciones clínicas. Una concentración plasmática normal en un paciente sin tratar tiene un alto poder predictivo de exclusión de la enfermedad. Una concentración elevada de péptidos natriuréticos pese a tratamiento óptimo indica un mal pronóstico.

Troponinas: Ante la sospecha de IC y cuando el cuadro clínico indique un síndrome coronario agudo, se determinarán las troponinas I o T. El aumento de troponinas cardíacas es un indicador de necrosis de miocitos, en cuyo caso, y si está indicado, debe considerarse la posibilidad de revascularización, para lo cual se realizarán las pruebas diagnósticas necesarias. La elevación de las troponinas es un importante factor pronóstico en la IC, especialmente en presencia de elevados valores de péptidos natriuréticos.

- Ecocardiografía: El término ecocardiografía se utiliza para referirse a todas las técnicas de imagen cardíaca por ultrasonidos. La confirmación del diagnóstico de IC o disfunción cardíaca mediante ecocardiografía es imprescindible y debe realizarse con prontitud ante la sospecha de IC. Además de su amplia disponibilidad, la ecocardiografía es una técnica no invasiva y segura que proporciona abundante información sobre la anatomía cardíaca (volúmenes, geometría, masa), la movilidad de las paredes y la función valvular. Esta prueba proporciona información fundamental sobre la etiología de la IC.

Cuando se pretende valorar la función ventricular, la determinación de la fracción de eyección del VI (FEVI) (valor normal, > 45-50%) es la prueba más práctica ya que permite diferenciar a los pacientes con disfunción sistólica de los que tienen la función sistólica conservada. Sin embargo, el punto de corte es relativamente arbitrario. La FEVI depende en gran medida de los volúmenes, la precarga, la poscarga, la frecuencia cardíaca y la función valvular

- Resonancia Magnética cardíaca: La RMC es una técnica versátil, precisa y reproducible que permite la medición y la evaluación de los volúmenes ventriculares derecho e izquierdo, la función ventricular general, la movilidad regional de la pared, el grosor miocárdico, el engrosamiento, la masa miocárdica y los tumores, las válvulas cardíacas, los defectos congénitos y la enfermedad pericárdica. Actualmente se la considera la técnica de elección por su gran precisión y reproducibilidad a la hora de evaluar volúmenes, masa y movilidad de la pared. El uso de medios de contraste paramagnéticos, como el gadolinio, proporciona evidencia sobre inflamación, infiltración y cicatrices en pacientes con infarto, miocarditis, pericarditis,

miocardiopatías y enfermedades infiltrativas y de depósito. Las limitaciones de esta técnica incluyen el coste, la disponibilidad, los pacientes con disritmia o dispositivos implantados y la intolerancia del paciente.

- Tomografía computarizada: En pacientes con IC, el estudio no invasivo de la anatomía coronaria puede ser útil y aportar información que nos permita tomar decisiones respecto a la necesidad de angiografía coronaria. La realización de angiografía con tomografía computarizada debe considerarse en pacientes con probabilidad baja o intermedia de enfermedad coronaria en los que la prueba de esfuerzo o estrés no sea concluyente. La aterosclerosis documentada mediante tomografía computarizada confirma la enfermedad coronaria, pero no implica necesariamente que haya isquemia.
- Ventriculografía isotópica: Estudio en el que se emplea un radioisótopo que muestra cómo la sangre se acumula en el corazón en reposo, durante el ejercicio o en ambos casos. La ventriculografía isotópica se considera un método bastante preciso para la determinación de la FEVI y se suele realizar en el contexto de una gammagrafía de perfusión miocárdica para obtener información adicional sobre la viabilidad miocárdica y evidencia de isquemia. Tiene poco valor en la determinación de volúmenes o índices más sutiles relativos a la función sistólica o diastólica.
- Prueba de esfuerzo: La prueba de esfuerzo proporciona una evaluación objetiva de la capacidad de ejercicio y de los síntomas durante el esfuerzo, como la disnea y la fatiga. La marcha durante 6 min es una prueba simple, reproducible y asequible que se utiliza para medir la capacidad funcional submáxima y para evaluar la respuesta a una posible intervención. Un pico normal de ejercicio en un paciente sin tratar excluye el diagnóstico de IC sintomática. Se puede utilizar tanto la ergometría cíclica como la cinta sin fin con un protocolo adaptado a la IC, en el que el incremento de la carga de trabajo se hace lentamente. Es aconsejable realizar un análisis del intercambio de gases durante el ejercicio, ya que proporciona una medida reproducible de la limitación al ejercicio, permite diferenciar causas cardíacas o respiratorias de la disnea y evaluar la eficiencia de la ventilación y aporta información pronóstica. El máximo consumo de oxígeno (VO_2 máx.) y el umbral anaeróbico son indicadores útiles de la capacidad funcional del paciente; el VO_2 máx y el gradiente VE/VCO_2 (respuesta ventilatoria al ejercicio) son una variable pronóstica importante.

La tasa de máximo intercambio respiratorio es un índice útil para determinar el grado de anaerobiosis alcanzada. No existe una correlación importante entre la capacidad de ejercicio, la fracción de eyección y la mayor parte de los parámetros hemodinámicos en reposo.

- Monitorización electrocardiográfica ambulatoria (Holter): Consiste en la monitorización ambulatoria del registro electrocardiográfico por un tiempo prolongado, habitualmente unas veinticuatro horas. Se nombra así por el biofísico Norman Holter que estableció las bases de la monitorización cardíaca en 1949. Se trata de una herramienta útil para el estudio de pacientes con síntomas compatibles con arritmia (como palpitaciones o síncope) y para monitorizar el control de la frecuencia ventricular en pacientes con fibrilación auricular. Permite detectar y cuantificar la naturaleza, la frecuencia y la duración de las arritmias auriculares y ventriculares y episodios de isquemia silente que podrían causar o exacerbar los síntomas de IC. Los episodios de taquicardia ventricular sintomática no mantenida son frecuentes en la IC y conllevan mal pronóstico.
- Cateterismo cardíaco derecho: También denominado cateterización de Swan-Ganz, donde la sonda alcanza el lado derecho del corazón con el fin de monitorizar el paso de sangre a través del corazón y vigilar la función cardíaca. Este proporciona importante información hemodinámica, como presiones de llenado, resistencia vascular y GC. La información que proporciona es básica para la clasificación de Forrester (correlaciona datos hemodinámicos y datos clínicos en los pacientes que sufren una IC tras un infarto de miocardio). Se trata del método más preciso para evaluar los parámetros hemodinámicos en pacientes que no responden al tratamiento, antes del trasplante cardíaco o en ensayos clínicos para la evaluación de intervenciones. El cateterismo arterial pulmonar se considerará para la monitorización de las variables hemodinámicas en pacientes hospitalizados con shock cardiogénico o no cardiogénico o para establecer el tratamiento en pacientes que no responden al tratamiento inicial. Sin embargo, no se ha demostrado que el uso del cateterismo arterial pulmonar mejore los resultados.
- Biopsia endomiocárdica: Determinadas alteraciones miocárdicas pueden diagnosticarse mediante una biopsia endomiocárdica. En estos casos, las decisiones clínicas deben guiarse por los resultados de ensayos clínicos controlados y por la opinión de expertos. Un documento sobre las indicaciones de la biopsia endomiocárdica publicado recientemente por las asociaciones AHA, ACC y *European Society of Cardiology* (ESC) indica que debe considerarse la realización de esta prueba en pacientes con IC aguda o fulminante, de etiología desconocida y que presentan un rápido deterioro con arritmias ventriculares y/o bloqueo aurículo ventricular o en pacientes que no responden al tratamiento convencional de la IC. La indicación de biopsia endomiocárdica también se considerará en la IC crónica en la que se sospecha procesos infiltrativos como amiloidosis, sarcoidosis y hemocromatosis, así como en la miocarditis eosinofílica y en la miocardiopatía restrictiva de origen desconocido. (Dickstein y cols., 2008)

3.7 Trasplante de corazón.

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 cardiaca 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, 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.

Los 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 frecuencia cardiaca.

Además el ejercicio moderado, es capaz de liberar catecolaminas al torrente circulatorio que mejoran la función cardiaca gracias a sus efectos inotrópicos y cronotrópicos positivos, aumentando el GC hasta un 70% de lo esperado para la edad del paciente, cifra más que suficiente para una vida normal (Schroeder, 2003; Hunt, 2008).

El Informe realizado por la Sociedad Internacional para el trasplante de Corazón y Pulmón (International Society for Heart and Lung Transplantation, ISHLT), presenta información sobre cerca de 100.000 trasplantes de corazón llevados a cabo en todo el mundo. La edad media de estos pacientes es de 54 años de edad, siendo en su mayoría hombres. En el periodo comprendido de enero del 2005 a junio 2010, las cardiopatías no isquémicas fueron la principal causa de trasplante de corazón (53.3%), siendo la segunda causa más frecuente la cardiopatía isquémica (37.7%), seguida de cardiopatías congénitas (2.9%), valvulopatías (2.7%), y retrasplante (2.6%). La vida media de estos pacientes es de 11 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. 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 (Stehlik, 2011).

Los datos más recientes, obtenidos en España en 2013, indican que las características de los pacientes receptores fueron de una media de edad de 47 ± 19 (intervalo, 0-70) años; el 71% eran varones, con diagnósticos basales mayoritarios de miocardiopatía isquémica (33,6%), miocardiopatía dilatada idiopática (37,2%), miocardiopatía de origen valvular (8,1%) y otras etiologías (21,1%). En el último periodo destaca que un 30% de los receptores eran > 60 años y que las mujeres superaban el 25%. Se constata asimismo un incremento en condiciones de riesgo como disfunción renal, diabetes mellitus, infección en los 15 días previos al trasplante y la necesidad de ventilación mecánica. Se observa, en cambio, una tendencia significativa a la disminución del retrasplante en el periodo más reciente, en el que apenas llega al 2% de todos los trasplantes, con un promedio anual histórico del 2,4%.

En el caso de los donantes, la media de edad era $40,2 \pm 16,1$ años (el 44% eran > 45 años) y el 53,8% eran varones. En el 25% de los casos, el peso del donante fue un 20% mayor que el del receptor, mientras que sucedió lo contrario en el 10,1%. En el 27,8% de los casos, se injertó de donante mujer a receptor varón.

En 2013, la evolución anual de la mortalidad quirúrgica (primeros 30 días tras la cirugía) fue del 11,3%, ligeramente inferior a la de la cohorte histórica, con un promedio del 15% anual. La mortalidad promedio de un 2-3% al año aproximadamente, con una mediana de supervivencia de 10,8 años. Hubo diferencias significativas según la edad del receptor en el momento del trasplante y por el tipo de procedimiento. La supervivencia de los pacientes < 16 años fue significativamente mejor que la de los pacientes de 16-60 años, y la de estos respecto a los pacientes > 60 años. (González y cols., 2014).

Tal y como hemos mencionado en apartados anteriores, la estimulación simpática, y por lo tanto el sistema adrenérgico, juegan un papel muy importante en la compensación del GC, tanto a nivel del corazón como vascular, con el fin de restablecer la función deteriorada en una IC (Guyton & Hall, 1996), pero también juegan un papel importante en el desarrollo y la progresión de la enfermedad, sobre todo los AR- α_1 y $-\beta$, además de las GRK, que estarán implicados en mayor o menor medida. Por todo ello, se hace necesario abrir nueva sección para desarrollar con mayor hincapié el rol de estos receptores y sus cinasas reguladoras en estados de estrés o IC.

4.- RELACIÓN DE LOS AR Y LAS GRK CON LA INSUFICIENCIA CARDIACA

4.1. Adrenoceptores β

Los AR- β han sido los más estudiados en esta enfermedad. Se ha demostrado en numerosas ocasiones que el sistema β -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 IC (Port & Bristow, 2001; Feldman y cols., 2008), de ahí que el uso de fármacos β -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 AR- β cardiacos supone un aumento de la contractilidad del corazón, necesario para compensar la IC pero que no se puede sostener durante un periodo muy prolongado, ya que acaba desembocando en una regulación a la baja de estos receptores, 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- β_1 , más sensibles a las catecolaminas, y con una elevada función cardiaca, muchos de estos ratones adultos, con el paso del tiempo, acababan desarrollando IC 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 los AR- β_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- β_2 , también se pudo observar un aumento de la función cardiaca 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 cardiaca deterioradas (Dorn y cols., 1999), aunque otros estudios observaron que una sobreexpresión excesiva de este subtipo sí que estaba relacionado con una hipertrofia cardiaca 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 β_3 cuyo efecto en corazón es contrapuesto al de los otros subtipos (inotropismo negativo), la sobreexpresión mostró una disminución de la función cardiaca 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 cardiaca 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 AR- β 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 expresión génica y proteica del AR- β_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 β_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 Gs/AC, produciéndose finalmente un deterioro maligno de la función cardiaca. En este caso la vía de la proteína Gi parece estar aumentada, teniendo como consecuencia por un lado una disminución añadida de la respuesta funcional β -adrenérgica, además de disminuir la respuesta de muchos otros receptores acoplados a la misma vía por inhibición de la AC. Por otro lado, parece que este cambio podría estar produciéndose como mecanismo protector del corazón insuficiente, ya que además el aumento de la vía mediada por la proteína Gi, hace que la estimulación del AR- β_2 , que a su vez se encuentra sobreexpresado, resulte cardioprotectora debido al efecto anti-apoptótico de dicha vía (Xiao y cols., 2004; Brodde, 2007). No obstante, estudios recientes ponen en entredicho la actividad cardioprotectora de la activación de Gi mediada por el AR- β_2 , sugiriendo que una señalización continuada de β_2 en IC llega a ser cardiotóxica (Fajardo y cols., 2013). Entre ambos subtipos, β_1 - β_2 , la balanza entre efectos tóxicos y protectores depende del tipo de enfermedad y/o modelo específico utilizado para estudiar los efectos de los AR- β , por lo que parece que la señalización β_1 puede también ser cardioprotectora y para ciertas formas de IC la señalización β_2 es cardiotóxica (Baker, 2014).

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 AR- β 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).

En lo que respecta a la localización de los AR- β en miocitos, algunos autores proponen la posibilidad de la redistribución de la localización AR- β_2 en la superficie celular en estados de IC. Evidencias recientes indican que la vía de señalización AR β_2 -Gs-AMPC ocurre casi exclusivamente en la superficie celular del sarcolema de miocitos ventriculares de rata (Cros & Brett, 2013). Por un lado, en cardiomiocitos de ratas adultas sanas se determinaron las señales de AMPC inducidas por AR- β_2 en las profundidades de los tubulos-T de la membrana mientras que las inducidas por los AR- β_1 se mostraron a nivel de toda la superficie celular (Nikolaev y cols., 2010); mientras que en cardiomiocitos procedentes de

modelos de IC crónica en rata, los AR- β_2 fueron redistribuidos en la zona del espacio que forman los tubulos T de la membrana celular (Nikolaev y cols., 2010). En la actualidad, se ha mostrado como un aumento de caveolina-3 (proteínas integrales de la membrana plasmática presentes en estructuras celulares denominadas caveolas) en miocitos procedentes de IC parcialmente restablece la localización alterada de AR- β_2 y normaliza la compartimentación de la vía de señalización de AR- β_2 - Gs - AMPc (Wright y cols., 2014)

Se ha demostrado que la inhibición de la isoforma 5 de la AC (25-30% en cardiomiocitos) previene la cardiomiopatía inducida por la estimulación crónica de los AR- β . Ratones transgénicos con el subtipo β_2 sobrespresado (β_2 -AR Tg) exhibieron un incremento de la función cardiaca en edades tempranas pero desarrollaron disminución de la función cardiaca y cardiomiopatía en edades avanzadas. Así pues, a partir de ratones bigénicos que presentaban sobreexpresión de AR- β_2 e inhibición de la AC5 (β_2 -AR x AC5 KO) se observó un aumento de la MnSOD (superóxido dismutasa), de potente actividad frente al estrés oxidativo con mejora en la función cardiaca y prevención de la cardiomiopatía (Yan y cols., 2014). Se conoce que el incremento del estrés oxidativo está envuelto en la patogénesis de varios tipos de cardiomiopatías. Antioxidantes tales como la MnSOD, son capaces de proteger el corazón frente apoptosis y desarrollo de la cardiopatía. Los ratones deficientes de MnSOD fallecen pronto tras nacimiento a causa de cardiomiopatías (Hare, 2001; Kannan y cols., 2000).

Numerosos estudios han investigado la posible asociación de polimorfismos genéticos de los AR y las enfermedades cardiovasculares. Se han visto varios polimorfismos para el subtipo β_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 β -bloqueantes (Liggett y cols., 2006), y la variante Gly49 confiere mejor resistencia al estrés, mejor función diastólica y un menor fallo cardiaco en pacientes trasplantados (Scharin y cols., 2007). En relación al subtipo β_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).

4.2. Adrenoceptores α

Por lo que respecta a los AR- α_1 , minoritarios a nivel de corazón (10% del total), se sabe que ejercen un efecto inotrópico pero que es minoritario frente al efecto β -adrenérgico y su relación con la IC ha sido poco estudiada (Brodde y cols., 2006). Por un lado algunos autores han descrito un aumento en la densidad de estos AR (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 Gq/PLC (Pönicke y cols., 1998; Bristow, 1993), y en cualquier caso estos receptores seguían mediando su ligero efecto inotrópico positivo. Sí que se sabe que, como comentábamos anteriormente, la estimulación α_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 presión arterial, algo que podría conducir al deterioro del corazón. Al parecer el subtipo α_{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 α_{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 qué 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. Datos del ensayo clínico ALLHAT (*Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Attack Trial*) en humanos mostró un efecto cardioprotector mediado por los AR- α_1 . El ensayo fue detenido prematuramente a causa de un incremento de la IC en el grupo de pacientes que recibieron tratamiento con el antagonista α_1 respecto a los otros grupos. Esto sugirió que la activación de los AR- α_1 es cardioprotectora en IC. (ALLHAT, 2000)

Existen diferentes respuestas inotrópicas de los AR- α_1 en VD insuficiente frente a VI insuficiente, encontrándose incrementada su respuesta inotrópica en VD no ocurriendo así a nivel de VI (Wang y cols., 2010).

4.3. GRK

La implicación de las GRK en la regulación de la función del corazón en la IC parece clara. Dichas cinasas son las principales responsables de la desensibilización (o desacoplamiento a la vía de la AC) y de la regulación a la baja de los AR- β tras ese largo periodo de activación neuro-hormonal característico de la IC, contribuyendo de forma clara a la reducción de la actividad, sobre todo del subtipo β_1 , y por lo tanto contribuyendo a la reducción del GC favoreciendo así el desarrollo y la progresión de la enfermedad. De hecho, se sabe que la

GRK2, la primera cinasa 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 β -adrenérgica supone un aumento en la frecuencia cardíaca y la eyección ventricular, ambos imprescindibles para el aumento del GC necesario para compensar la disminución que se produce durante la insuficiencia, algo que termina por provocar la desensibilización de los receptores mediada por ambas cinasas, 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; Unguerer 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 cardíaca (Anderson y cols., 1999; Cho y cols., 1999). Se sabe también que el aumento de actividad de esta cinasa se correlaciona con la disminución en la actividad β -adrenérgica en muestras de corazón humano insuficiente (Iaccarino y cols., 2005).

Se conoce que la infusión crónica de Isoprenalina, agonista β -adrenérgico, induce hipertrofia cardíaca acompañada de una marcada desensibilización de los AR- β y un aumento de ARNm y proteína de GRK2, mientras que de forma opuesta, la infusión con β -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 cinasa se ha inhibido de forma selectiva en corazón, además de favorecer el rescate del corazón insuficiente en modelos genéticos de IC (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 β -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 cronificada (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) (Leineweber y cols., 2005). De forma general, todos estos experimentos sugieren que quizás la inhibición selectiva de esta cinasa 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 cinasa juega un papel importante en la activación de la señal independiente de proteína G para el AR- β_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 cinasa podría modificar la respuesta frente a la terapia con β -bloqueantes tradicionales en la IC (Dorn y cols., 2009). En animales transgénicos que sobreexpresan esta cinasa se ha visto un deterioro de las respuestas de los AR- β_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 cinasa no se ha encontrado alterada ni en modelos animales ni en modelos humanos de IC (Unguerer y cols., 1994; Brodde y cols., 2006)

Por lo que respecta a la influencia que los polimorfismos genéticos puedan tener en la IC, 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 IC (Liggett y cols., 2008)

4.4. Cambios en el corazón trasplantado

Pocos estudios hablan de la relación entre los AR y las GRK 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 β -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 AR- β , aunque no está del todo claro, sí que parece que tanto el número como la funcionalidad de los AR se normalizan, 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 AR- β 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 β_1 acompañada de un incremento del β_2 (Brodde y cols., 1991; Steinfath y cols., 1992b; Farrukh y cols., 1993). Esta disminución a largo plazo de la densidad del subtipo β_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 AR también se han relacionado con el fallo agudo del injerto, observándose una pérdida de densidad de los AR- β y de la actividad AC en corazones con un rechazo severo (Chester y cols., 1995; Szabo y cols., 2002). Por lo que respecta a los AR- α_1 , únicamente se ha observado que en pacientes trasplantados se produce una reducción en la sensibilidad ante el estímulo con agonistas α_1 -adrenérgicos (Borow y cols., 1989). Nada se sabe hasta el momento sobre las GRK 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 cinasas.

5.- TRATAMIENTO DE ELECCIÓN EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA

Como farmacólogos, no debemos de obviar la importancia del tratamiento farmacológico ni dejar de comentar el arsenal terapéutico de que disponemos para poder tratar la IC. El término tratamiento hace referencia a la forma o los medios que se utilizan para llegar a la esencia de algo, bien porque ésta no se conozca o porque se encuentra alterada por otros elementos. De forma que, en el contexto de salud el tratamiento es el conjunto de medios de cualquier clase cuya finalidad es la curación o el alivio de las enfermedades o síntomas. Por otro lado, a nivel científico, la utilización de diferentes principios activos o medicamentos nos puede ayudar a la mejor comprensión de las diferentes vías de señalización a nivel celular. Con ello, en este apartado, abordaremos como los diferentes tratamientos de elección administrados frente a la IC pueden repercutir en la expresión de los AR y GRK.

Los objetivos del tratamiento en pacientes con IC establecida son aliviar los síntomas y signos (p. ej., edema), evitar el ingreso en el hospital y mejorar la supervivencia. Aunque anteriormente los ensayos clínicos se centraban en la mortalidad, actualmente se reconoce que prevenir la hospitalización por IC es importante para los pacientes y para los sistemas de atención sanitaria (McMurray, 2012)

Debido a que los signos y síntomas son variados (dependiendo de la afectación orgánica) y a que existen diferentes grados de insuficiencia, el tratamiento debe realizarse de forma individualizada, teniendo en cuenta tanto la propia IC como las posibles enfermedades subyacentes y las características de cada paciente. De hecho, nuevos estudios muestran como terapias convencionales en IC con fracción de eyección reducida no son efectivas frente IC con fracción de eyección preservada, necesitando así diferentes estrategias terapéuticas (Konstantinou, 2013).

El tratamiento frente a la IC incluye una serie de medidas tanto farmacológicas como generales. Dentro de las medidas generales o no farmacológicas a nivel de IC se debe aconsejar a los pacientes sobre la importancia de mantenerse en un peso adecuado (dieta hipocalórica), evitar la ingesta excesiva de sal y el consumo de alcohol, realizar ejercicio de forma regular (depende del grado de IC, ya que en algunos casos se aconseja reposo) y abandonar el hábito de fumar. A nivel farmacológico existen distintos tipos de medicamentos, solos o asociados, que se orientan preferentemente hacia una reducción de la pre y postcarga cardíaca o a una mejora de la contractilidad del ventrículo izquierdo. La elección de tratamiento se determina primeramente según la gravedad de la IC, aunque

también hay que tener en cuenta si existe enfermedad subyacente o intolerancia o contraindicación a algún tipo de fármaco.

Diferentes son los tipos de tratamientos utilizados según el tipo de IC que sufre el paciente, por ello, hemos visto preciso organizar y explicar cada uno de los medicamentos que componen tal arsenal terapéutico frente a la IC. Según el tipo de dolencia cardiaca que padezca el paciente se instaurará un tratamiento u otro, variando según nos enfrentemos a una IC aguda (ICA) o Crónica (ICC).

En el caso de la **ICA** se trata de un término utilizado para describir el rápido inicio o cambio de los síntomas y signos de la IC. Es una enfermedad de riesgo vital que requiere atención médica inmediata y suele conllevar hospitalización urgente, a menudo en una Unidad de Cuidados Intensivos cardiovasculares. En la mayoría de los casos, la **ICA** surge como consecuencia del deterioro en pacientes con **ICC** ya diagnosticada, pero en algunos casos también se da como primera presentación de la IC (*ICA de novo*). En la **ICA** el grado de gravedad puede ser diverso, y muchos pacientes describen un periodo de deterioro (p. ej., disnea en aumento o edema) de días o incluso semanas, y otros sufren IC en cuestión de horas a minutos (p. ej., en asociación con un infarto agudo de miocardio). Los objetivos del tratamiento deben perseguir la estabilización clínica y mejorar el pronóstico vital. El manejo terapéutico comprende la monitorización de los parámetros biológicos y la adopción de las terapias farmacológicas o invasivas, ajustadas al perfil clínico individualizado (McMurray, 2012).

A nivel de **ICA**, el tratamiento va encaminado a mejorar los síntomas y la situación hemodinámica, las cuales se dividen en medidas generales como son posturales (cama incorporada a 45°), dietéticas (restricción de sodio y agua, contenido calórico adecuado...) y monitorización del paciente (controlar constantes vitales, oxigenación de tejidos...) y medidas farmacológicas que se dividen en tratamiento de primera o segunda línea.

El tratamiento de primera línea incluye diuréticos en caso de sobrecarga de volumen y vasodilatadores cuando existe congestión pulmonar y/o crisis de hipertensión arterial. La situación clínica del paciente determinará la vía de administración. Es frecuente el uso de sulfato de morfina en situaciones de malestar físico y/o psicológico asociado a dificultad respiratoria aliviando así los síntomas de congestión pulmonar.

El tratamiento de segunda línea se realiza cuando existe un fracaso terapéutico con el de primera línea o en situaciones de extrema gravedad, como el shock cardiogénico. Este comprende los fármacos inotrópicos y vasopresores. Por norma general estos deben de ser administrados en una unidad coronaria y monitorizados con métodos invasivos.

En lo que respecta al tratamiento etiológico o causal, es vital detectar y tratar las causas y los factores precipitantes (Farré y cols., 2009).

Los objetivos del tratamiento en la ICC son prolongar la supervivencia y mejorar la capacidad funcional y la calidad de vida. La estrategia secuencial de tratamiento incluye la identificación de los factores causales y agravantes o precipitantes del síndrome, medidas orientadas a modificar el estilo de vida, tratamiento con fármacos y terapias intervencionistas. Todos los pacientes deben recibir tratamiento con fármacos que mejoran la expectativa de vida (IECA y ARA), mientras que el tratamiento orientado a mejorar los síntomas (diuréticos, ivabradina, hidralazina/nitratos, digoxina) debe estratificarse de acuerdo con la clase funcional. En el caso de la ICC se requieren una serie de medidas en la alimentación y en el estilo de vida así como el tratamiento farmacológico de elección según la etiología de la cardiopatía (Pabón y cols., 2013).

Aun habiendo diferentes posibilidades según el tipo de IC a tratar, cabe destacar tres grupos farmacológicos que resultan imprescindibles ya que han demostrado en diferentes ensayos clínicos una reducción de la mortalidad y de las hospitalizaciones: inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (IECA), β -bloqueantes y antagonistas de la aldosterona (ARA). Estos fármacos se suelen asociar a diuréticos para aliviar los síntomas y signos de congestión (McMurray, 2012; Yancy, 2013). Estos han demostrado disminuir la mortalidad a largo plazo en pacientes con ICC, así como también en ICA donde su indicación se lleva a cabo tras estabilización clínica y hemodinámica del paciente.

En la presente tesis, dentro de los principales fármacos utilizados frente la IC, serán el captopril (IECA) y el carvedilol (β -bloqueante) los que centrarán nuestra atención, realizándose estudios sobre pacientes con IC, así como ensayos *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro* en animales y líneas celulares respectivamente. Por ello, se hace preciso explicar más ampliamente alguna de sus principales particularidades.

5.1 Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA)

Estos fármacos previenen la conversión de Angiotensina I, un octapéptido inactivo a Angiotensina II, la cual es un potente vasoconstrictor y estimulador de la Aldosterona. En adición los IECA previenen la degradación de bradiquininas (sustancias vasodilatadoras) por inhibición de la quinasa II. Los niveles de bradiquinina son incrementados, conduciendo a la síntesis de varias prostaglandinas (las cuales también actúan como vasodilatadoras). Por lo tanto, los IECA tienen una acción combinada disminuyendo la generación de Angiotensina II e incrementando los niveles de bradiquinina y varias prostaglandinas (PGI-2, PGE-2).

La introducción en la clínica diaria de los IECA a lo largo de la década de los ochenta ha sido uno de los avances terapéuticos más significativos en la lucha contra la HTA y en el tratamiento de la IC. Los IECA prolongan la supervivencia, optimizan la capacidad funcional y la capacidad de ejercicio, mejoran los síntomas y reducen los ingresos hospitalarios, un beneficio que se extiende a los pacientes con IC sintomática, disfunción ventricular izquierda asintomática y disfunción ventricular postinfarto agudo de miocardio (Pabón y cols., 2013). La vasodilatación inducida por los IECA no se acompaña de taquicardia refleja ni de activación del sistema nervioso simpático. También se produce un aumento de la diuresis, secundaria a una mayor natriuresis así como a la reducción de los niveles de aldosterona, al mejor flujo renal, la inhibición del tono simpático y probablemente a una acción tubular directa (González y cols., 2000).

Los IECA se clasifican en tres grandes grupos:

1. Contienen un grupo sulfhidrilo: **Captopril**, Zofenopril, Atiopril, Alacepril, Fentiapril, Rentiapril, etc.
2. Contienen un grupo carboxilo: Ramipril, Enalapril, Benazepril, Lisinopril, Quinapril, Cilazapril, Perindopril, etc.
3. Contienen un grupo fosfonilo: Fosinopril y Ceranapril (González y cols., 2000).

Al menos cinco mecanismos diferentes pueden justificar el beneficio terapéutico de este grupo:

1. Inhibición del Sistema Renina-Angiotensina circulante.
2. Inhibición del Sistema Renina-Angiotensina tisular y vascular.
3. Disminución de la liberación de NA desde las terminaciones nerviosas.
4. Aumento de la formación de bradikinas y prostaglandinas de acción vasodilatadora.
5. Menor retención de sodio por la disminución de los niveles de aldosterona y/o incremento de la fracción de filtración glomerular (González y cols., 2000).

Indicaciones. Pacientes con disfunción ventricular izquierda (sintomática o no sintomática) y fracción de eyección igual o inferior al 40%. En pacientes con IC sintomática, la combinación de IECA y β -bloqueantes debe iniciarse cuanto antes, debido a la eficacia aditiva de estas terapias (Pabón y cols., 2013).

Por último, pueden darse interacciones medicamentosas y dietéticas con suplementos de potasio, diuréticos ahorradores de potasio (amiloride, inhibidores de los mineralocorticoides y sustitutos de la sal con alto contenido en potasio, antiinflamatorios no esteroideos y trimetoprim-sulfametoxazol) (Pabón y cols., 2013).

5.2 Betabloqueantes

A través del bloqueo sobre los receptores beta adrenérgicos impiden la unión de la catecolaminas. Realizan un antagonismo competitivo y reversible sobre los AR- β .

La trascendencia de la estimulación neurohumoral, y por tanto del Sistema Nervioso Simpático, hizo pensar en la posibilidad de que los agentes β -bloqueantes, a pesar de su efecto inotrope negativo, pudieran ser útiles en el tratamiento de la IC. La necrosis y disfunción de los cardiomiocitos parecen estar más relacionadas con la concentración de catecolaminas en el intersticio miocárdico que a nivel plasmático. El tratamiento de la IC con β -bloqueantes se inició hace más de 20 años y en los grandes estudios de intervención postinfarto se comprobó que la reducción de la mortalidad con β -bloqueantes fue fundamentalmente a expensas de los pacientes con mayor deterioro de la función cardíaca. Los mecanismos de la acción beneficiosa de los β -bloqueantes podrían estar relacionado con alguno de los siguientes efectos:

1. Protegen frente al efecto cardiotoxico de las catecolaminas, determinante para la progresión de la enfermedad.
2. Incrementan la densidad de los β_1 -receptores, con mejor respuesta hemodinámica tanto a las catecolaminas circulantes como a los agentes β -estimulantes como dopamina o dobutamina.
3. Contrarrestan la activación neurohormonal ya que el bloqueo de los AR- β_1 inhibe la liberación de renina por las células yuxtaglomerulares y el de los AR- β_2 presinápticos la liberación de NA.
4. Disminuyen la necesidad de oxígeno por el miocardio, que junto a su efecto bradicardizante le confieren acción antiisquémica, a la que se le añade efecto antiarrítmico y antihipertensivo.
5. Mejoran la relajación diastólica, por su efecto bradicardizante y el beneficio sobre la cinética y la utilización del calcio.

En la IC, la reducción de la frecuencia cardíaca por β -bloqueantes mejora el llenado y el rendimiento ventriculares con traducción clínica de mejora tanto de la función sistólica como de la diastólica. En comparación con digoxina e IECA, los β -bloqueantes inducen un mayor incremento de la fracción de eyección. Para alcanzar este efecto biológico celular, el ventrículo claudicante tiene que tolerar la retirada del soporte que supone la mayor actividad simpática. El incremento de la fracción de eyección parece relacionado con la dosis siendo los pacientes con miocardiopatía dilatada de origen no isquémico los que en principio parecen beneficiarse más del tratamiento con β -bloqueantes.

La estimulación adrenérgica aumenta la liberación de ácidos grasos libres propiciando su utilización por parte del miocardio con menor eficacia metabólica. Los β -bloqueantes mejoran el metabolismo energético del miocito mediante una utilización más eficiente de los

hidratos de carbono, sustrato de glucosa y piruvato, y menor de los ácidos grasos libres. La relación entre creatinfosfato y ATP mejora con el tratamiento crónico con β -bloqueantes (González y cols., 2000)

A nivel celular se sabe que el tratamiento con β -bloqueantes, de primera o segunda generación (como metoprolol o bisoprolol, selectivos β_1), provoca un aumento de densidad, probablemente del AR- β_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 AR, coincidiendo con un aumento muy marcado de los niveles de NA plasmática (Brodde, 1990; Gilbert y cols., 1996; Leineweber y cols., 2005). Se sugiere la posibilidad de combinar una terapia con bloqueantes selectivos de los AR- β_1 (para evitar los efectos pro-apoptóticos debidos de la sobreestimulación de este subtipo), junto con agonistas selectivos β_2 (para estimular los efectos cardioprotectores relacionados con la proteína Gi), además de poner de relieve la importancia de ambos receptores en la IC (Xiao y cols., 2006).

El tratamiento a largo plazo con β -bloqueantes 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, contribuyendo al efecto beneficioso de estos fármacos en el tratamiento de la IC (Leineweber y cols., 2005).

Indicaciones: tratamiento inicial estándar de la IC por disfunción sistólica en cualquier clase funcional, incluida la disfunción ventricular asintomática, mientras que no existan contraindicaciones o intolerancia. Evita la progresión del proceso derivada de la estimulación neurohumoral crónica, con bases racionales de mejorar la mortalidad (Pabón y cols., 2013)

○ CARVEDILOL

El carvedilol es un antagonista adrenérgico con propiedades bloqueantes sobre los receptores adrenérgicos β y α_1 , que demostró beneficio clínico significativo en el manejo de los pacientes con IC. Cuando se lo compara con otros β -bloqueantes, posee también propiedades secundarias únicas que pueden contribuir a la mejora de los resultados positivos propios de la acción bloqueante.

Entre las diferentes acciones farmacológicas complementarias, además de su actividad β -bloqueante, se encuentran, la antioxidante, antiinflamatorio y antiarrítmico, todas ellas, actividades demostradas en modelos experimentales y ensayos clínicos (Beattie y cols., 2013)

Al tratarse de un β -bloqueantes no selectivo, inhibe la actividad inotrópica y cronotrópica iniciada por los AR- β_1 y β_2 situados en corazón y con ello disminuye la demanda de

oxígeno por el miocardio. En adición, aparece disminución de sobrecarga del VI a través de la vasodilatación periférica debida a las propiedades bloqueantes sobre los AR- α_1 . Ambas acciones desencadenan una reducción del estrés cardiaco y con ello una disminución en la posibilidad de hipertrofia o isquemia (Kopecky, 2006).

Tras infarto agudo de miocardio surgen diferentes mecanismos inflamatorios y oxidativos que contribuyen al incremento en la demanda de oxígeno y estrés del miocardio, facilitando el remodelado ventricular y/o la isquemia (Reiter y cols., 1998; Dambrink y cols., 1994). Gracias a su actividad antioxidante que llega a ser 10 veces mayor que la vitamina E, el carvedilol favorece a la neutralización de los radicales libres de oxígeno protegiendo así a las células, limitando la apoptosis de cardiomiocitos y con ello reduciendo la isquemia miocárdica (Feuerstein y cols., 1997; Khandoudi y cols., 1998). Por otro lado, carvedilol muestra inhibición de la infiltración de neutrófilos tras infarto agudo de miocardio. Estas células inflamatorias liberan quimiocinas y enzimas proteolíticas así como radicales libres que incrementan la extensión del daño en la isquemia miocárdica. (Feuerstein y cols., 1997)

En un pequeño estudio entre carvedilol y propranolol, en 60 pacientes con hipertensión tratados durante 6 meses, se observó una disminución significativa de la proteína C-reactiva en aquellos pacientes tratados con carvedilol comparado con el propranolol (Yasunari y cols., 2004).

A nivel celular se ha demostrado un perfil “*biased*” del carvedilol al estabilizar una conformación del AR- β_2 que, aunque desacoplada de la proteína Gs, es capaz de estimular la señalización mediada por β -arrestina (Wisler y cols. 2007; Rajagopal y cols., 2010; Tzingounis y cols. 2010). Se desconoce si su acción cardioprotectora está relacionada con su actividad como agonista “*biased*” (Patel y cols. 2010) sobre esta doble vía de señalización característica del AR- β_2 . A su vez, es interesante señalar que el carvedilol posee más afinidad por los subtipos α_{1B} y α_{1D} que por el α_{1A} (Koshimizu y col. 2004) y es capaz de aumentar la señalización mediada por AR- α_1 en IC humana (van Tassell y col, 2008), pero no se han analizado hasta ahora las implicaciones de estas observaciones ni si de ellas depende la actividad cardioprotectora de carvedilol.

Sabemos que el carvedilol, gracias a su perfil “*biased*”, señala a través de la activación de ERK1/2 independiente de proteína G (Wisler y col., 2007) pero no se conoce la localización citosólica o nuclear de la ERK1/2 así activada ni sus consecuencias funcionales.

Existen numerosos estudios clínicos sobre el carvedilol y la comparación de este con otros β -bloqueantes que demostraron sus beneficios en la IC:

- En el estudio COPERNICUS de pacientes con insuficiencia cardíaca grave, los pacientes que recibieron carvedilol tuvieron, en comparación con placebo, 35% de reducción del riesgo de muerte luego de un seguimiento promedio de 10.4 meses, 24% de disminución del índice combinado de causas globales de mortalidad por hospitalización y 27% de reducción del índice combinado de muerte cardiovascular durante la hospitalización.
- El ensayo CAPRICORN en pacientes con disfunción ventricular izquierda luego de infarto de miocardio sugieren que el carvedilol a largo plazo, es de elección para los pacientes en fase post aguda del infarto de miocardio y con disfunción ventricular izquierda.
- Los resultados del ensayo clínico CAFE sugieren que la adición de carvedilol a la terapia con digoxina en los pacientes con insuficiencia cardíaca y fibrilación auricular, potencia el control de la frecuencia cardíaca y mejora la función ventricular y el estado clínico.
- Un metaanálisis de 6 estudios con β -bloqueantes demostró beneficios en el pronóstico de los pacientes diabéticos con IC tratados con terapia β -bloqueantes, si bien la magnitud de ese efecto no es tan notoria como en los pacientes sin diabetes. El estudio COMET encontró que el carvedilol, debido a sus propiedades vasodilatadoras, se asoció con un riesgo 22% menor que el metoprolol para el desarrollo de complicaciones relacionadas con la aparición de diabetes que incluyeron hiperglucemia, coma diabético y gangrena periférica (Stroe y cols., 2004).
- El uso del carvedilol se ha asociado con efectos beneficiosos o neutros sobre los niveles lipídicos en sangre y la sensibilidad a la insulina. El estudio Glycemic Effect in Diabetes Mellitus: Carvedilol-Metoprolol Comparison in Hypertensives study (GEMINI), comparó el carvedilol con el metoprolol en 1200 pacientes diabéticos e hipertensos. En este estudio se mostró como la resistencia a la insulina fue reducida por carvedilol (9,1%, $p=0,004$), no siendo así en el caso del metoprolol. El metoprolol aumentó los niveles de triglicéridos en un 13% ($p=0,001$) mientras que el carvedilol no mostró cambios significativos. Además, existió disminución significativa en el colesterol total en pacientes tratados con carvedilol, no existiendo cambios en aquellos que recibieron metoprolol (Bakris y cols., 2004).

6.- HIPERTENSIÓN ARTERIAL

La HTA se encuentra catalogada como uno de las principales causas de riesgo cardiovascular, por ello, en el presente apartado desarrollaremos de forma más amplia su fisiopatología y como en muchos casos llega a desencadenar IC.

La sangre impulsada por el corazón fluye al sistema arterial, sometida a una presión denominada presión arterial la cual posee dos componentes: la presión arterial sistólica (PAS), que viene determinada por el impulso cardíaco generado por las contracciones del ventrículo izquierdo; y la presión arterial diastólica (PAD), que depende de las resistencias que oponen las arterias al paso de la sangre. En suma, la presión arterial depende fundamentalmente de dos variables: el GC y las resistencias periféricas. Las resistencias periféricas se trata de la suma de las resistencias vasculares 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 & Revert, 1996). El correcto equilibrio entre estas fuerzas responsables de la regulación de la presión arterial hará posible que estas cifras se mantengan en los niveles adecuados para el buen funcionamiento del organismo. Un desequilibrio de alguno o varios de estos mecanismos provocaría niveles inadecuados que, mantenidos en el tiempo, conducirían a un estado patológico, la HTA.

Importante es que la presión arterial se mantenga a un nivel adecuado capaz de permitir el buen funcionamiento cerebral, una correcta presión de perfusión renal y una perfusión suficiente de las arterias coronarias, todos ellos procesos fundamentales para la supervivencia del individuo.

6.1 Definición y etiología

La HTA podría definirse como la elevación crónica y anormal de los niveles de PAS y/o PAD, sin embargo, desde un punto de vista epidemiológico, estos niveles de presión arterial que definen la enfermedad no están del todo 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 presión arterial (Kaplan, 2005).

Entre los múltiples sistemas de control, cuatro son los que desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la presión arterial entre unos límites adecuados:

- los barorreceptores arteriales,
- el metabolismo hidrosalino,
- el sistema reninaangiotensina
- la autorregulación vascular (Botey & Revert, 1996).

Los niveles absolutos de presión arterial varían con muchos factores, 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); 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); con la alimentación, debido al consumo de sal (Oparil y cols., 1988) o proteínas, 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 presión arterial y/o al mantenimiento de la HTA.

La causa exacta que conduce a la elevación de las cifras de presión arterial se desconoce en la mayoría de los casos. Se conocen dos tipos de HTA según el origen de esta:

- a) La HTA esencial es la que presenta una patogenia más complicada. En la mayoría de los pacientes con este tipo de HT se ha visto una tendencia hereditaria, y por lo tanto un componente genético importante (Hunt y cols., 1986; Williams y cols., 1992). 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 presión arterial (adrenérgico, periféricos o centrales, renales, hormonales y vasculares) y a la complejidad de las interacciones entre estos sistemas (Williams, 2003). De entre las 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). El sistema nervioso adrenérgico, provocaría aumentos intermitentes de la presión arterial debidos a incrementos del GC 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 presión arterial, lo que conduciría a alteraciones en los vasos de resistencia suficientes para mantener la presión elevada (Folkow, 1982).

b) HTA secundaria. Esta se produce por una alteración específica de un órgano que es responsable de la regulación de la presión arterial. La prevalencia de la hipertensión secundaria es de entre 1-15% de todos los pacientes hipertensos (Botey & Revert, 1996). La hipertensión secundaria puede tener varias etiologías (Guyton & Hall, 1996; Williams, 2003), las causas más frecuentes son:

- HTA por *disfunciones renales* que tienen como consecuencia una alteración del control de 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 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 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

mueres debidas a hipertensión son consecuencia de infartos de miocardio o IC congestiva (Williams, 2003).

Todos los estudios coinciden en que tanto la PAS como la 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 hombres 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 & Revert, 1996; Kaplan, 2005).

6.2 Clasificación

Desde un punto de vista clínico, la HTA debería definirse como aquellos niveles de presión arterial a partir de los cuales la instauración de un tratamiento produce beneficio y reduce el riesgo, es decir, reduce la morbimortalidad relacionada (Evans & Rose, 1971). La relación inversa entre el riesgo cardiovascular y los niveles de presión arterial 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 2013, 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 (Tabla 2).

● ● ● **Tabla 2**

Definiciones y clasificación de las cifras de presión arterial en consulta (mmHg)

Categoría	Sistólica	Diastólica
Óptima	< 120	< 80
Normal	120-129	80-84
Normal alta	130-139	85-89
HTA grado 1	140-159	90-99
HTA grado 2	160-179	100-109
HTA grado 3	≥ 180	≥ 100
HTA sistólica aislada	≥ 140	< 90

HTA: Hipertensión arterial sistólica

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 presión arterial. Esta 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 presión arterial tan sólo se encuentre ligeramente elevada, incluso de varios meses, para definir así la “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 presión arterial 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 presión arterial establecidos para definir la HTA serán diferentes según el momento del día o el método de medida usado, de hecho, los valores de presión arterial ambulatoria y domiciliaria suelen ser inferiores a los del consultorio, tal y como se muestra en la Tabla 3 (Mancia y cols., 2013)

● ● ● **Tabla 3**

Definiciones de hiperpresión arterial según los valores de la presión arterial en consulta y fuera de consulta(mmHg)

Categoría	PAS	PAD
<u>PA en consulta</u>	≥ 140	≥ 90
<u>PA ambulatoria</u>		
Diurna	≥ 135	≥ 85
Nocturna (durante descanso)	≥ 120	≥ 70
PA de 24 h	≥ 130	≥ 80
<u>PA en domicilio</u>	≥ 135	≥ 85

HTA: Hipertensión arterial sistólica; PA: Presión arterial; PAS: Presión arterial sistólica; PAD: Presión arterial diastólica. PA medidas en mmHG

6.3 Hipertensión y riesgo cardiovascular.

A nivel cardiovascular, concretamente en su órgano central, el corazón, la hipertensión puede desarrollar lesiones tales como cardiomegalia o hipertrofia del ventrículo izquierdo por la sobrecarga de trabajo que sufre este, algo que conduce al deterioro de ésta cámara produciéndose una dilatación que acaba desembocando en una IC 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 angina de pecho o infarto de miocardio (Williams, 2003). En el caso de los vasos, estos también sufren el impacto de la hipertensión mediante cambios adaptativos (funcionales y estructurales) y cambios patológicos. 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 presión arterial, siendo en un principio, y siempre y cuando se mantengan niveles elevados de presión arterial, un efecto beneficioso, ocurriendo los mayores problemas en bajadas bruscas que pueden ocasionar problemas de insuficiencia cerebral. 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 & Revert, 1996).

En 1994, las Sociedades Europeas de Cardiología (ESC), HTA (ESH) y Aterosclerosis desarrollaron conjuntamente una serie de recomendaciones sobre la prevención de la enfermedad coronaria en la práctica clínica, poniendo especial énfasis en que la prevención de la enfermedad coronaria debía de tener en cuenta la cuantificación de riesgo cardiovascular total. Este concepto se basa en que solo un pequeño porcentaje de la población hipertensa presenta únicamente presión arterial elevada, mientras que la gran mayoría presenta factores de riesgo cardiovasculares adicionales. Además, cuando coexisten la HTA y otros factores de riesgo cardiovascular pueden potenciarse mutuamente lo que resulta un riesgo total mayor que la suma de sus componentes individuales. La estimación del riesgo cardiovascular total resulta sencilla en subgrupos de pacientes determinados, como aquellos con antecedentes de enfermedad cardiovascular establecida, diabetes mellitus o con factores de riesgo individuales muy elevados. En todas estas entidades, el riesgo cardiovascular total es alto y requiere medidas intensivas de reducción del riesgo. Sin embargo, un elevado número de pacientes con HTA no pertenecen a ninguna de las categorías mencionadas y la identificación de los pacientes con riesgo bajo, moderado, alto o muy alto requiere el uso de modelos de estimación del riesgo cardiovascular total, de manera que se pueda ajustar la estrategia terapéutica en consonancia.

La clasificación de riesgo bajo, moderado, alto y muy alto se refiere al riesgo de muerte cardiovascular en 10 años, tal como aparece definido en la guía sobre prevención publicada por la ESC en 2012 (Tabla 4). Los factores en que se basa la estratificación del riesgo se resumen en la Tabla 5.

• • • **Tabla 4**

Estratificación del riesgo cardiovascular total en categorías

	PAS normal elevada 130-139 o PAD 85-89	HTA grado I PAS 140-159 o PAD	HTA grado II PAS 160-179 o PAD 100-109	HTA grado III PAS ≥180 o PAD ≥110
Sin otros Factores de riesgo		Riesgo bajo	Riesgo moderado	Riesgo elevado
1-2 Factores de riesgo	Riesgo bajo	Riesgo moderado	Riesgo moderado-elevado	Riesgo elevado
≥3 Factores de riesgo	Riesgo bajo-moderado	Riesgo moderado-elevado	Riesgo moderado-elevado	Riesgo elevado
Lesión daño orgánico, enfermedad renal crónica fase 3 o diabetes	Riesgo moderado-elevado	Riesgo elevado	Riesgo elevado	Riesgo elevado-muy elevado
Enfermedad cardiovascular, Enfermedad renal crónica, ≥4 o diabetes con daño orgánico	Riesgo muy elevado	Riesgo muy elevado	Riesgo muy elevado	Riesgo muy elevado

Tabla extraída y modificada de la "Guía práctica clínica de la ESH/ESC 2013 para el manejo de la hipertensión"

• • • **Tabla 5**

Factores diferentes a la presión arterial utilizados para la estratificación del riesgo cardiovascular total

Factores de riesgo

- Sexo masculino
- Edad (varones ≥ 55 años; mujeres ≥ 65 años)
- Tabaquismo
- Dislipemias
- Diabetes
- Obesidad (IMC ≥ 30)
- Historia familiar de ECV prematura

Daño orgánico asintomático

- Presión de pulso ≥ 60 mmHg
- Hipertrofia ventricular izquierda electrocardiográfica y ecocardiográfica
- Grosor de la pared carotídea o placa
- Microalbuminuria
- Índice tobillo-brazo < 0,9

Enfermedad CV o renal manifiesta

- Enfermedad cerebrovascular; ictus isquémico; hemorragia cerebral
- Insuficiencia cardíaca
- Enfermedad arterial periférica sintomática en extremidades inferiores
- Enfermedad renal crónica
- Retinopatía avanzada

Tabla extraída de la "Guía práctica clínica de la ESH/ESC 2013 para el manejo de la hipertensión"

6.4 Relación de los AR y las GRK con la hipertensión arterial.

El sistema nervioso autónomo mantiene la homeostasis cardiovascular, mediante el control de la presión arterial, 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 presión arterial.

Los AR, 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 presión arterial, 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 AR- α_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 AR- β_1 del miocardio estimula el ritmo y la fuerza de la contracción cardíaca, y en consecuencia aumenta el GC 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 presión arterial. Por último, la activación de los AR- β_2 por la A 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 GRK/ β -arrestinas, fenómeno que explica la disminución de la respuesta, o desensibilización 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. Asimismo, 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 presión arterial, quedando por comprobar si dicho papel es o no parte de la causa de la enfermedad (Kotchen, 2008).

Numerosos estudios han demostrado alteraciones en la función de los AR debido a alteraciones en la densidad o en las vías de señalización intracelular, en concreto en tejidos de ratas espontáneamente hipertensas (SHR), en particular en el corazón, vasos sanguíneos y el riñón, tejidos que juegan un papel muy importante en la regulación de la presión arterial (Takata & Kato, 1996).

- Estudios sobre los AR- α_1 en HTA.
 - A nivel del corazón.

Existe cierta controversia entre diferentes autores en algunos estudios realizados:

 - En ratas pre-hipertensas algunos autores describen un aumento en la densidad de los AR- α_1 (Hanna & 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, encontramos estudios que hablan de un aumento de densidad (Hanna & Khairallah, 1986; Limas & 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 estudio se han apreciado cambios en la afinidad de los ligandos por estos receptores a nivel cardiaco.
 - El efecto inotrópico positivo de estos receptores sobre el corazón es ligeramente mayor en ratas SHR pre-hipertensas (Bohm y cols., 1986) y menor en hipertensas (Kunos y cols., 1978; Mertens y cols., 1992) comparando con sus respectivos controles.
 - A nivel vascular

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 AR- α_1 (Takata & Kato, 1996; Villalobos-Molina & Ibarra, 1999; Gisbert y cols., 2002; Miquel y cols., 2005). Hay muchos datos que hablan del posible papel de los AR- α_1 en el desarrollo o el mantenimiento del estado hipertensivo (Guimaraes & 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. Indiquemos algunos ejemplos:

 - La contracción inducida por NA en aorta de ratas SHR es mayor cuando la comparamos con sus respectivos controles (WKY) (Brown y cols., 1994; Chitaley y cols., 2001; Gisbert y cols., 2002; Miquel y cols., 2005), mientras que otros autores

indican una disminución en la respuesta contráctil frente a dicha catecolamina (Holck, 1988; Vila y cols., 1993).

- En vasos mesentéricos se ha descrito un aumento en la sensibilidad a la NA en SHR respecto a WKY (Mulvany & Nyborg, 1980; Gisbert y cols., 2002; Miquel y cols., 2005)
- En vasos de resistencia de ratas SHR jóvenes se ha detectado un aumento en la vasoconstricción mediada por los AR- α_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; Oliver y cols., 2009).

En humanos hipertensos se ha detectado un incremento en la vasoconstricción mediada por el AR- α_1 (Folkow, 1990; Brodde & Michel, 1992; Li y cols., 2007), mientras que otros autores indican que la sensibilidad a agentes vasoconstrictores permanece inalterada en arterias mesentéricas de pacientes hipertensos (Falloon & Heagerty, 1994; Hutri-Kähönén y cols., 1999).

- 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 AR- α_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).

Se sabe que existe una proporción relativa de cada uno de los subtipos de AR- α_1 a nivel vascular, por lo que los cambios en la sensibilidad a los agonistas podrían deberse a cambios en este aspecto. Existen numerosos estudios que se centran en los diferentes subtipos de AR- α_1 . Entre los más destacables:

- En aorta de ratas SHR de 12 semanas, de la expresión AR- α_{1D} se encuentra aumentada, a expensas de una disminución en la proporción de los subtipos α_{1A} y α_{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., 1996 y 1999; Gisbert y cols., 2002; 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- α_{1D} (Stassen y cols., 1997; Xu y cols., 1998; Villalobos-Molina y cols., 1999).
- Ratones KO para el AR- α_{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).

- La actividad constitutiva del AR- α_{1D} sirve 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 del subtipo α_{1D} 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 AR- α_{1D} constitutivamente activos (Gisbert y cols., 2002; Miquel y cols., 2005).

Se ha visto que los AR- α_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 presión arterial, como se ha sugerido para el subtipo α_{1D} en células del músculo liso vascular (Xin y cols., 1997), o para los subtipos α_{1A} y α_{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 α_{1B} (Woodcock y cols., 2008), mientras que el subtipo α_{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 α_{1A} (Price y cols., 1994), explicaría los efectos adversos del tratamiento crónico con antagonistas no selectivos de los AR- α_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.

- Estudios sobre AR- β en HTA

- o A nivel del corazón:

- No hay cambios de densidad en los AR- β en ratas SHR pre-hipertensas (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 & 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 pérdida de densidad β en corazón ha sido relacionada con una pérdida proporcional para el subtipo β_1 , incluso a nivel de ARNm, sin cambios observados para el β_2 (Yamada y cols., 1984; De Champlain, 1990; Castellano y cols., 1993). Esta bajada del subtipo β_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 presión arterial.
- o A nivel vascular:
 - Disminución en la densidad de los AR- β (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)
 - Un aumento de AR- β 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),
La posibilidad de que el aumento de AR- β_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 β -adrenérgica (Asano y cols., 1991; Borkowski y cols., 1992).
 - En el subtipo β_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 está muy aceptado es que la vasorelajación mediada por los AR- β , 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).

El deterioro de la respuesta β -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 AR- β 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 & Kato, 1996). En humanos también se ha descrito un descenso generalizado de la respuesta β -adrenérgica en la hipertensión (Michel y cols., 1990), con una alteración de los niveles de proteína G (Feldman, 1987;1990; 1995; Fujimoto y cols., 1987; Asano y cols., 1988).

Estudios realizados en nuestro laboratorio mostraron como en aortas de ratas SHR jóvenes, en las cuales todavía no se encontraba establecida la hipertensión, aparecía un aumento de la expresión del AR- β_1 , mientras que en ratas SHR adultas el aumento de expresión existe tanto a nivel de los tres subtipos de AR- α_1 como en los AR- β (Oliver y cols., 2009)

- Estudios sobre GRK en HTA

- A nivel del corazón

Referente a la HTA, también se relaciona el deterioro de la señal del AR- β_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) debido a una hiper-estimulación simpática crónica de los AR- β cardiacos (Iaccarino y cols., 1999). Además, el tratamiento con un β -bloqueante como Atenolol previene el aumento de la GRK2 (Iaccarino y cols., 2001). Por todo ello, 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 puede estar involucrado en la hipertensión, al aumentar el GC asociado a un aumento de la actividad del AR- α_{1B} , responsable de la fuerza de contracción del corazón (Vinge y cols., 2008).

- A nivel vascular

El deterioro de la vasodilatación mediada por los AR- β juega un papel importante en el desarrollo y/o mantenimiento de la HTA. A su vez, este deterioro de la respuesta β -adrenérgica depende en gran parte de las GRK, 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 β -adrenérgico durante la HTA, se obtuvieron en linfocitos de pacientes hipertensos, en los que tanto la actividad como la expresión proteica de esta cinasa 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 presión arterial, los

aumentos en la proteína están relacionados con los aumentos en la presión arterial, sugiriendo que este podría ser un importante factor para el deterioro de la vasodilatación β -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). 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 cinasa 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 cinasa 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 cinasa 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 cinasa, se ha visto en modelos transgénicos que la sobreexpresión a nivel vascular eleva las cifras de presión arterial, induciendo HTA a través del deterioro β_2 , pero sobre todo facilitando el acoplamiento del $AR-\beta_1$ a la vía de la proteína Gi que provoca vasoconstricción por inhibición de la AC en animales macho, sin observarse hipertrofia de ningún tejido cardiovascular (Keys y cols., 2005).

Resumiendo, a nivel vascular todo apunta a que el desequilibrio entre los procesos de contracción y relajación responsables del aumento de la presión arterial durante la HTA, podría venir de la mano de un aumento en la funcionalidad de los $AR-\alpha_1$ acompañado de un deterioro de la vasodilatación β -adrenérgica por una desensibilización excesiva por parte de las GRK. 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 presión arterial o, como

proponen algunos, ante uno de los mecanismos causantes de la enfermedad. Mientras que a nivel cardiaco, el deterioro de la señal del AR- β_1 sin cambios observados en AR- β_2 , con aumento en la actividad y la expresión proteica de GRK2 estaría relacionado con el continuo estímulo de NA, atenuando así el efecto inotrópico en el corazón jugando un papel compensador ante la elevada presión arterial.

7.- AR Y GRK EN LINFOCITOS COMO BIOMARCADORES EN PATOLOGÍA CARDIOVASCULAR

La predicción del riesgo cardiovascular es uno de los principales retos de la medicina moderna. En el caso de los linfocitos circulantes, estudios previos, han mostrado la posibilidad de ser utilizados como biomarcadores durante el desarrollo de una patología cardíaca o tras trasplante de corazón por los cambios de expresión que sufren sus AR durante tales dolencias.

La búsqueda de nuevos biomarcadores se basa en la búsqueda de nuevas moléculas que desempeñen un papel clave en el desarrollo de la enfermedad. Estas moléculas 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, los linfocitos han sido ampliamente utilizados para el estudio de proteínas biomarcadoras de la enfermedad cardiovascular, 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 AR- α_1 y $-\beta$, así como de las GRK 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 AR presentes en células del sistema inmune, más concretamente al subtipo mayoritario, que el AR- β_2 podría ser la posible conexión existente entre dicho sistema y el sistema nervioso simpático (Kin & Sanders, 2006). Pero sobre todo, la presencia de los AR y las GRK 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 AR- β 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 en pacientes tratados con β -bloqueantes (Aarons y cols., 1980). Un ejemplo sería el tratamiento crónico con propranolol, con el que se pudo observar un aumento de densidad de AR- β que ocurría tanto en linfocitos como en corazón y pulmón de animales tratados (Aarons & 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 β_2 en linfocitos de pacientes hipertensos, reflejando el aumento de la actividad simpática que puede contribuir al aumento de la presión arterial (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 presión arterial 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 AR- β 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 β_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 cómo en pacientes con IC se producía una disminución de la densidad de los AR- β a medida que progresaba la enfermedad, tanto en corazón como en linfocitos, y además el tratamiento con β -bloqueantes hacía recuperar esa pérdida en ambas muestras (Sbirrazzuoli & Lapalus, 1989). Por otra parte, en linfocitos de pacientes con hipertensión arterial esencial se observó una disminución de la actividad β -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- β_1 , tal y como ocurría en muestras de corazón insuficiente (Werner y cols., 2001). Por último se ha encontrado disminuida la expresión de los AR- β_1 y β_2 en linfocitos de pacientes insuficientes (Yu y cols., 2007).

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se mostró como, el subtipo β_1 que se encontraba incrementado en linfocitos circulantes de pacientes hipertensos, con el tratamiento con IECA y ARA II volvió su expresión a la normalidad. (Oliver y cols., 2010).

En el caso de las cinasas reguladoras, se comprobó que este deterioro de la actividad β -adrenérgica era debido al aumento en la expresión y la actividad de 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 el uso de esta

cinasa 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 cinasa que se observaba en linfocitos de pacientes hipertensos, se correlacionaba con el deterioro de la señal β -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- β_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 β -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 β -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.

Se ha observado una asociación directa del incremento en la expresión y actividad de GRK2, pero no de GRK5, con las cifras de presión arterial 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 cinasa en el linfocito (Cohn y cols., 2009). También se han observado cambios en la expresión linfocitaria de estas y otras GRK relacionados con otras enfermedades del sistema inmune como artritis reumatoide, tanto en modelos humanos como animales (Premont & Gainetdinov, 2007).

Los AR- α_1 , los menos expresados en linfocitos han sido muy poco estudiados como biomarcadores. Sí que se ha visto, que los subtipos α_{1B} y α_{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 α_{1B} , y el minoritario el α_{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 cómo los cambios que veían en los AR- α_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).

Estos trabajos anhelan el uso de los linfocitos circulantes 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 analizaremos la posibilidad que los linfocitos puedan ser una herramienta de trabajo para evaluar el papel de los AR y las GRK en la patología cardiovascular.



Según la Fundación Española del Corazón, escuchar música mientras se hace ejercicio, es una de las formas más efectivas de ayudar a la oxigenación del corazón. Esto se debe a que la música aumenta hasta en 25% el diámetro de los vasos sanguíneos, así como la oxigenación del propio corazón.

OBJETIVOS


OBJETIVOS



OBJETIVOS

Conocida la importante implicación de los adrenoceptores y las GRK en los mecanismos fisiopatológicos de regulación del sistema cardiovascular, nos planteamos los siguientes objetivos:

- Analizar las diferencias en la expresión de los AR α_1 (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}) y β (β_1 , β_2 y β_3) así como de las GRK (GRK2, GRK3 y GRK5) en muestras de corazón sano, insuficiente y corazón trasplantado, así como las variaciones de dicha expresión en función de la etiología de la IC, las variables clínicas o los distintos tratamientos farmacológicos.
- Analizar la utilidad de los linfocitos circulantes como posibles biomarcadores de los cambios que se producen, en patologías cardiovasculares, en la expresión de AR y GRK en el corazón.
- Analizar la posible existencia de un patrón común de regulación de la expresión de AR y GRK en modelos humanos y animales de patología cardiovascular.



Los síntomas de un ataque cardíaco en mujeres y hombres pueden ser distintos según la AHA. Ellos tienden a mostrar dolor intenso en el pecho y en el brazo. Las mujeres podrían presentar síntomas como náuseas, indigestión y dolores en el hombro.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN

- Ensayo en humanos
- Ensayo en animales
 - Modelo ex vivo
 - Modelo in vitro

2.- TÉCNICAS EXPERIMENTALES

- RT-PCR
- Western Blot
- Estudio de la unión de radioligandos

3.- ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN

1.1. Ensayo en humanos

1.1.1. Selección de pacientes y tipos de muestra.

Las muestras humanas utilizadas para la realización de la presente tesis doctoral proceden de dos hospitales de la provincia de Valencia, el Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia y el Hospital de la Ribera (Alzira).

En el caso del Hospital Universitario y Politécnico la Fe las muestras fueron obtenidas a partir de pacientes seleccionados en la Unidad de IC y Trasplante cardiaco, estas comprenden:

- Explantes de VI de corazón sano
- Biopsias de VD procedentes de corazón trasplantado
- Explantes de VI y VD procedentes de corazones insuficientes
- Fracción Monolinfocitaria circulante de pacientes con IC severa
- Fracción Monolinfocitaria circulante de pacientes con corazón trasplantado

Y en el caso del Hospital de la Ribera de Alzira fueron obtenidas a partir de pacientes seleccionados en la Unidad de Hipertensión del Servicio de Medicina Interna, estas comprenden:

- Fracción Monolinfocitaria circulante de voluntarios sanos
- Fracción Monolinfocitaria circulante de pacientes hipertensos.

Los protocolos utilizados para la adquisición de muestras humanas 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 y del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, obteniendo en cada caso el consentimiento informado del paciente.

1.1.2 Población y criterios de inclusión según tipo de muestra.

a) Fracción Monolinfocitaria circulante (FMLC)

Los sujetos poseen un rango de edad comprendido entre los 16 y los 68 años en el momento del estudio. Son 77 sujetos (49 hombres y 28 mujeres) que fueron distribuidos por grupos según la patología cardiovascular sufrida, como se muestra en la Tabla 6.

● ● ● **Tabla 6**
Fracción Monolinfocitaria circulante (n=77)

Grupos		Procedencia/Hospital
Voluntarios sanos (Control)	n=10	La Ribera
	n=11	La Fe
Hipertensión (HT)	n=15	La Ribera
Hipertensos tratados (HT-Tr)	n=10	La Ribera
Insuficiencia cardíaca en fase terminal (IC)	n=14	La Fe
Pacientes sometidos a trasplante cardíaco (TC)	n=17	La Fe

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. De las muestras procedentes del Hospital de la Ribera, el bloque de pacientes con HTA no había tomado previamente ninguna terapia antihipertensiva. Los pacientes hipertensos tratados, recibían tratamiento con IECA o ARAII 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, 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 caso de la FMLC obtenida del grupo de pacientes con IC se incluyeron pacientes en situación funcional avanzada con deterioro grave de la contractilidad miocárdica, Clase IV en la escala NYHA de evaluación de la IC (The criteria committee of the NYHA, 1994), recibiendo terapia para tratamiento de la enfermedad (diuréticos, β -bloqueantes, IECA o fármacos inótrópicos) dependiendo de su estado hemodinámico. A todos los sujetos se les determinaron variables antropométricas, hemodinámicas y perfiles bioquímicos en suero. Se

excluyeron aquellos con enfermedades concomitantes graves que contraindicaban la realización del trasplante cardíaco.

En cuanto al grupo de pacientes trasplantados, se incluyeron pacientes en un rango de 14 a 471 días tras el trasplante, estos recibieron tratamiento inmunosupresor en diferente grado según el tiempo transcurrido desde el trasplante y poseían un corazón funcionalmente normal según los datos clínicos.

b) Corazón

De las muestras procedentes de corazón, la población total del estudio consistió en 73 sujetos (Tabla 7). Las muestras de corazón insuficiente se obtuvieron de 42 sujetos (32 hombres y 10 mujeres) de rango de edad comprendido entre los 17 y 68 años en el momento del trasplante.

● ● ● **Tabla 7**
Explantos de corazón (n=63)

Grupos	Procedencia/Hospital	
Sanos (Control)	VI, n=4	La Fe
Insuficiencia cardíaca en fase terminal	VI y VD, n=42	La Fe
Pacientes sometidos a trasplante cardíaco	VD, n=17	La Fe

En cuanto a los pacientes trasplantados, se incluyeron los mismos descritos en el apartado anterior. Los pacientes excluidos en este grupo post-trasplante fueron:

- pacientes inestables desde el punto de vista clínico,
- pacientes con depresión en la función ventricular valorada mediante ecocardiografía,
- muestras de biopsia con algún grado de rechazo según el análisis anatomopatológico.

En todos los 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.

1.1.3 Obtención de muestras biológicas.

a) Fracción Monolinfocitaria circulante.

Para el aislamiento de linfocitos se extrajeron 10 ml de sangre que se situaron en tubo estandarizado de recogida, conteniendo EDTA como anticoagulante. Dependiendo del hospital se realizó un determinado procesado de aislamiento.

- Procedentes del Hospital de la Ribera.

Las muestras de sangre fueron obtenidas la mañana posterior a la monitorización y se procesaron en los laboratorios del Área de diagnóstico biológico. Las FMLC fueron aisladas usando el reactivo Lymphoprep™, reactivo estéril y libre de endotoxinas diseñado para el aislamiento puro de linfocitos por gradiente de densidad (Boyum, 1964; Thorsby & Bratlie, 1970), y siguiendo las condiciones indicadas por el fabricante (Axis-Shield). Las FMLC obtenidas fueron inmediatamente congelados en nitrógeno líquido, y almacenados a -80°C hasta su posterior uso.

- Procedentes del Hospital Universitario y Politécnico La Fe.

Las muestras de sangre fueron obtenidas momentos antes del trasplante (grupo IC), o tras el trasplante, coincidiendo con la evaluación del injerto (grupo TC). Se utilizó el reactivo Ficollpaque Plus (GE Healthcare), reactivo estéril y libre de endotoxinas diseñado para el aislamiento puro de linfocitos por gradiente de densidad, basado en el método publicado por Boyum en 1964, y mejorado por Thorsby y Bratlie en 1970. Los linfocitos obtenidos fueron inmediatamente congelados en nitrógeno líquido, y almacenados a -80°C hasta su posterior uso.

b) Corazón

- Explantes de VI de pacientes sanos

Como muestras control se obtuvieron un total de 4 muestras de VI de explantes de corazones procedentes de donantes que no pudieron ser aprovechados en trasplante cardiaco. Inmediatamente tras la extracción del órgano, se deposita en suero fisiológico a 4°C y tras la obtención de la fracción deseada del VI estas se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su procesado

- Biopsias de VD de corazón trasplantado

Se incluyeron en el estudio 17 pacientes sometidos a trasplante cardiaco. Tras el trasplante, siguiendo el protocolo habitual para control de rechazo, se realizó biopsia endocárdica del VD. Se utilizó acceso venoso femoral y la toma de muestras se dirigió a los segmentos apicales del ventrículo. Estas fueron congeladas inmediatamente a -80°C hasta su posterior procesado.

- Explantes de VI y VD de pacientes con IC

Inmediatamente tras la extracción del órgano, se deposita en suero fisiológico a 4°C, hasta la toma de muestras que se lleva a cabo en las primeras 8 h tras el explante. En el caso de los corazones que sufrían cardiopatía isquémica se evitaron las zonas que macroscópicamente se consideran fibrosis (cicatriz del infarto). Se obtuvieron un total de 42 muestras que se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su procesado.



Obtención de explantes de corazón insuficiente

1.2 Ensayo en animales

En el caso del ensayo en animales abordaremos los posibles cambios en la expresión de AR y GRK, en modelos animales de hipertensión y en animales tratados con fármacos de elección en la IC, así pues partiremos de:

- Ratas espontáneamente hipertensas (SHR)
- Ratas hipertensas por tratamiento con L-NAME.
- Ratas Wistar tratadas con carvedilol (β -bloqueante) y captopril (IECA).

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 Experimentación Animal de la Universidad de Valencia.

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

1.2.1 Animales de experimentación

1.2.1.1 Ratas hipertensas

- Ratas espontáneamente hipertensas (SHR)

SHR son un modelo de hipertensión arterial animal ampliamente utilizado desde que en 1963, Okamoto y Aoki, desarrollaron 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 adultas de 16 semanas de edad (peso medio entre 250-325 g) suministradas por Harlan Interfauna Ibérica (Barcelona) que muestran cifras elevadas de presión arterial con respecto a sus controles, las ratas Wistar-Kyoto (WKY) o Normotensas.

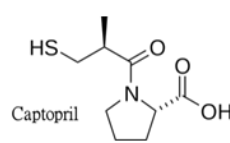
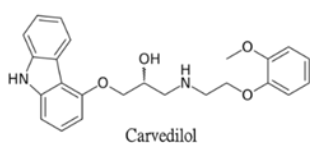
- Ratas tratadas con L-NAME.

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.

El L-NAME (NG-nitro-L-arginina metil éster) es un inhibidor de la sintasa del óxido nítrico (NOS), encargada de la síntesis del NO. 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; Oliver y cols., 2014). 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.

1.2.1.2 Ratas Wistar tratadas con carvedilol y captopril.

Se realizó el tratamiento sobre 4 ratas Wistar durante 4 semanas en agua de bebida con carvedilol (20mg/kg/día) o captopril (50mg/kg/día). 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 y L-NAME.

Para la dosificación de ambos medicamentos se tuvo en cuenta el aumento en el peso medio de los animales así como la ingesta del líquido.

Los tres principios utilizados en tratamientos de los animales (L-NAME, carvedilol y captopril) proceden de Sigma Chemical Co (USA).

1.2.1.3 Medida de las constantes hemodinámicas en cola del animal consciente

Para confirmar la presencia de presión arterial elevada tanto en ratas SHR como en las tratadas con L-NAME se realizó la medida de las constantes hemodinámicas en cola del animal consciente. En ambos modelos animales, la PAS y la FC, fueron determinadas semanalmente para conseguir así la habituación del animal, tomándose la última medida el día anterior al sacrificio de los animales. Se utilizó el método no-invasivo de



Pletismómetro modelo NIPREM 645 de Cibertec (Barcelona).

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).

1.2.1.4 Sacrificio y obtención de muestras.

a) Sacrificio

El sacrificio de los animales se llevó a cabo por decapitación y posterior exanguinación, previa anestesia, usando el anestésico inhalatorio volátil Isoflurano (Esteve), teniendo en cuenta las recomendaciones para la eutanasia de los animales, de la Dirección General de Medio Ambiente de la Comisión Europea, para el sacrificio con el mínimo sufrimiento físico y mental del animal (Close y cols., 1996)

b) Obtención de muestras

Una vez sacrificado el animal, todos los tejidos objeto del estudio fueron aislados y extraídos:

- *Aorta torácica*: se realizó una toracotomía y se separaron los pulmones y el corazón visualizándose el segmento de la arteria, la cual se extrajo cuidadosamente con ayuda de lanceta y pinzas de precisión desde el cayado aórtico hasta el diafragma. El fragmento extraído se depositó en placa Petri conteniendo suero fisiológico estéril, eliminando el

tejido adiposo cuidadosamente y con la mayor rapidez posible para evitar la degradación del ARN y/o proteínas, dejando así la pared arterial desnuda.

- *Corazón entero*: una vez realizada la toracotomía, seccionando los arcos costales a nivel esternal, 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 depositándolo en placa Petri en suero fisiológico estéril, se limpió inmediatamente de cualquier resto de sangre y se eliminó el posible tejido adiposo existente. Este fue secado y pesado para su posterior análisis
- *Ventrículo izquierdo*: Extraído el corazón como se explica anteriormente, seguidamente se separaron las aurículas derecha e izquierda, y una vez localizada la cámara correspondiente, el ventrículo izquierdo fue cuidadosamente diseccionado del ventrículo derecho y de la pared interventricular.
- *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 unida a la aorta mediante la arteria renal. Se realizó una nefrectomía radical unilateral seccionando arteria y vena para extraer el riñón que se secó y se limpió de cualquier resto de tejido adiposo.

Los tejidos extraídos se congelaron inmediatamente situándose inmediatamente en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenaron a -80°C hasta su procesado.

1.3 Modelo *ex vivo*.

1.3.1 Tratamiento de VI de rata Wistar con Carvedilol

Un pequeño ensayo *ex vivo* se realizó sobre corazones enteros de rata Wistar los cuales se trataron con el antagonista β -adrenérgico carvedilol.

A partir de 3 ratas Wistar de 16 semanas de edad, se extrajo el corazón (ver apartado 2.2 Sacrificio y obtención de muestras) e inmediatamente se depositó en solución de Krebs (NaCl, 118 mM; KCl, 4.7 mM; CaCl_2 1.8 mM; KH_2PO_4 1.2 mM; NaHCO_3 25.0 mM; Glucosa 11.0 mM) durante 30 min y en esa misma solución, se añadió carvedilol 10^{-6} M durante 180 min, a 37°C y con burbujeo de carbógeno (O_2/CO_2 95:5). Finalizada la incubación, las muestras se secaron y congelaron en nitrógeno líquido permaneciendo almacenadas a -80°C hasta su procesado.

1.4 Modelo *in vitro*.

1.4.1 Células HEK 293

La línea celular HEK 293 (Human Embryonic Kidney, ATCC CRL-1573) presenta morfología epitelial y crece en adhesión formando una monocapa. Las células fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium, Sigma St Louis MO, USA) suplementado con suero NBCS (Newborn Calf Serum, Sigma St Louis MO, USA) al 10%, L-glutamina 2 mM (Gibco BRL, Gaithersburg MD, USA), 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomina, e incubada en atmósfera húmeda al 5% de CO₂ y 37°C. Las células crecen adheridas formando una monocapa. Los pases se realizaron en frascos de 25cm² cada 2-3 días llegando a una confluencia de entre 70 y 80%.

- Subcultivo celular:

El cultivo de líneas celulares implica la propagación de células inmortalizadas y/o transformadas en superficies, normalmente de plástico, donde se adhieren y forman una monocapa. Cuando las células cubren en casi su totalidad la superficie del soporte, se realiza la tripsinización o pase de células que consiste en la disgregación de la monocapa mediante un proceso enzimático y mecánico que permite el replaqueo de las células en otro frasco o placa nueva con medio fresco.

Todas las soluciones deben de atemperarse a 37°C antes de su utilización en un baño termostático. Toda manipulación de cultivo celular debe de realizarse en condiciones estériles por ello el uso de campana de flujo laminar.

Con la ayuda de una pipeta pasteur estéril se aspira el medio de cultivo y las células se lavan con tampón fosfato salino (PBS, Gibco) para eliminar restos de medio de cultivo y suero que podrían inhibir la acción de la tripsina. Tras aspirar el PBS, se añade Tripsina-EDTA al 0.25% (T4049, Sigma) y se deja actuar hasta que las células comiencen a desprenderse. Cuando las células se desprendan, se añade medio de cultivo fresco y se recogen las células por centrifugación. Las células se homogenizan en medio de cultivo fresco según la dilución adecuada y se cultivan en frascos estériles (Sarsted). Las células se mantienen en estufas termostáticas, a 37°C en atmósfera húmeda, conteniendo 5% de dióxido de carbono (CO₂).

- Congelación:

Las células se dejan crecer hasta un 70-80% de confluencia en frasco de 25cm². Tras tripsinización, la suspensión celular se centrifuga 5 minutos a 1000g y el sedimento resultante se resuspende en 3 ml de medio de congelación (DMEM/ 20%NCBS / 10%DMSO). El DMSO (dimetilsulfóxido, D2650 Sigma) actuará como agente crioprotector manteniendo así la viabilidad celular en el proceso de congelación. Rápidamente, el volumen total se divide en

crioviales (0,1 – 10 millones de células por criovial) que se situarán en un recipiente de congelación con isopropanol lo que permitirá una bajada paulatina de la temperatura cuando se sitúen las muestras a -80°C .

- Descongelación.

La descongelación de las células se lleva a cabo de una manera rápida, sumergiendo los crioviales en un baño termostático a 37°C hasta la licuación de su contenido, que rápidamente se diluyó 10 veces en medio completo con la ayuda de una pipeta. La suspensión celular fue centrifugada 5 minutos a 1000g para eliminar el crioprotector y resuspendida en medio completo en frasco. El medio se renovó pasadas 24 horas.

1.4.2 Tratamiento con carvedilol sobre células HEK 293.

En el ensayo del tratamiento de células HEK 293 con carvedilol se situaron las células en placa de 35 mm hasta confluencia del 60-70 % y se administró carvedilol 10^{-6} M dejándolo actuar durante 48h, pasado este tiempo se recogieron las células con Tripure para posterior extracción de ARN.

2.- TÉCNICAS EXPERIMENTALES

2.1 Determinación de la expresión génica.

El análisis cuantitativo de la expresión génica de los diferentes AR y GRK se realizó mediante RT-PCR a tiempo real , tal y como se describe a continuación.

2.1.1 Extracción de ARN total.

El protocolo de extracción de ARN total es el basado en el método publicado por Chomczynski y Sacchi en 1987. Las muestras tisulares precisan de un triturado previo, este variará ligeramente según el tipo de muestra. En cualquier caso y en todo momento, los experimentos se realizaron en condiciones apropiadas libres de RNasas, en zona de laboratorio habilitada únicamente para la extracción de ARN cuidadosamente higienizada y tratada con inhibidor de RNasas (RNaseZAP®, Sigma)

Durante el triturado de los tejidos, las muestras se mantuvieron congeladas con nitrógeno líquido para evitar su degradación. El triturado de las muestras se realizó en mortero. Destacar que dependiendo del tamaño de la muestra a triturar se utilizaron diferentes tipos de morteros (Tabla 8). Estos se enfriaron previamente con nitrógeno líquido para mantener siempre temperaturas de congelación. Tras triturado se obtiene un homogenizado pulverulento. En el caso de las muestras de mayor tamaño se trituraron con



Mortero de porcelana



Mortero de aluminio

mortero estándar de porcelana y se utilizó solo una pequeña porción del homogenizado en polvo para la extracción de ARN total, almacenándose el sobrante. Por otro lado, para las muestras de pequeño tamaño se utilizó el mortero de precisión cilíndrico de aluminio para evitar la pérdida durante el procedimiento. En el caso de estas muestras la totalidad del triturado llevado a homogenizado pulverulento se utilizó para la extracción de ARN

● ● ● **Tabla 8****Tipo de mortero utilizado en el procesado de triturado según tamaño de la muestra**

Muestras de humano	Tamaño	Procesado
Fracción aorta	6-8 μ m	Mortero precisión
Biopsias ventrículo derecho trasplantado	2-4 μ m	Mortero precisión
Explante ventrículo izquierdo sano	1,5-2 cm	Mortero estándar
Explante ventrículos izquierdo insuficiente	1,5-2 cm	Mortero estándar
Explante ventrículo derecho insuficiente	1,5-2 cm	Mortero estándar
Muestra de rata Wistar	Tamaño	Procesado
Ventrículo izquierdo	1 cm	Mortero estándar
Aorta	1,5-2 cm	Mortero estándar
Riñón	1,5-2 cm	Mortero estándar

Una vez triturada la muestra, se situó la pequeña fracción de polvo necesaria en un 1 ml de reactivo de aislamiento Tripure Isolation Reagent (Roche Applied Science) (mezcla monofásica de fenol y tiocianato de guanidina). 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. En el caso del pellet de linfocitos y células HEK 293 se añadió directamente 1 ml de Tripure y seguidamente se procedió de la misma forma que en las muestras trituradas.

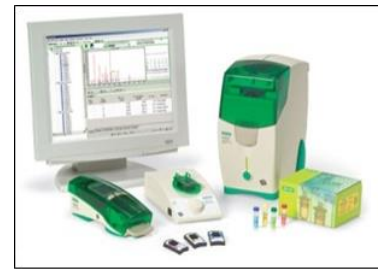
Con el fin de eliminar restos de tejido y/o restos celulares no lisados, a partir del homogenizado de las muestras con el reactivo de lisis descrito en el apartado anterior, se realizó una primera centrifugación a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C, quedándonos con el sobrenadante que deberá permanecer a T^a ambiente durante 5 minutos. Pasado ese tiempo se añadió a la muestra un volumen de 200 μ l de Cloroformo por cada ml de reactivo Tripure, mezclando la muestra intensamente durante 15 segundos en vortex y dejando 10 minutos a T^a 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 μ l 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^a 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.

2.1.2 Cuantificación y análisis cualitativo de la integridad del ARN.

Se utilizó el sistema automático Experion™ (Bio-Rad) basado en la tecnología Lab-on-a-Chip de separación, detección y análisis mediante electroforesis microfluídica. El análisis de la calidad y la cuantificación 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.



Chip Experion



Experion™ (Biorad)

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 microcanales del chip gracias a un sistema de llenado por aire comprimido. Seguidamente, 1 μ l 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 láser 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.

2.1.3 Transcripción reversa (RT)

Para la reacción de Transcripción Reversa o Retrotranscripción (RT) de los ARN obtenidos de cada muestra se utilizó una enzima de alta sensibilidad, ImProm-II (Promega Corp. Madison, USA), que permite partir de cantidades inferiores de ARN total (0,1-1 μ g). Se decidió la utilización de una enzima de alta sensibilidad a causa de las pequeñas cantidades de ARN total que se extraían a partir de biopsias de miocardio humano debido a su reducido tamaño.

Tras incubar el ARN total con el cebador oligo(dT16) (250 ng) en agua-DEPC a 70°C y luego enfriado en hielo, se llevó a cabo la reacción de transcripción reversa conteniendo tampón de reacción ImProm-II™, 3 mM de MgCl₂, 0,5 mM de cada deoxinucleósido trifosfato, 20 U del inhibidor de ribonucleasas recombinante RNAsin® (Promega Corp. Madison, USA), y 1 μ l de Transcriptasa reversa ImProm-II™ (Promega Corp. Madison, USA) con un volumen final de 20 μ l. 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.

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

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- α (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}), AR- β (β_1 , β_2 , β_3), cinasas 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 el termociclador GeneAmp 7500 Fast system. 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 9.

• • • **Tabla 9**
Ensayos Taqman® de expresión génica utilizados

ENSAYOS EN MUESTRA DE RATA		
Gen (Símbolo)	Secuencia de ref. (NCBI)	Id. Ensayo
GAPDH (Gapdh)	NM_017008.3	Rn99999916_s1
α_{1A} -AR (Adra1a)	NM_017191.2	Rn00567876_m1
α_{1B} -AR (Adra1b)	NM_016991.2	Rn01471343_m1
α_{1D} -AR (Adra1d)	NM_024483.1	Rn00577931_m1
β_1 -AR (Adrab1)	NM_012701.1	Rn00824536_s1
β_2 -AR (Adrab2)	MN_012492.2	Rn00560650_s1
β_3 -AR (Adrab3)	MN_013108.1	Rn00565393_m1
GRK2 (Adrbk1)	MN_012776.1	Rn00562822_m1
GRK3 (Adrbk2)	MN_012897.2	Rn00563688_m1
GRK5 (GRK5)	MN_030829.1	Rn00578086_m1
ENSAYOS EN MUESTRA DE HUMANO		
Gen (Símbolo)	Secuencia de ref. (NCBI)	Id. Ensayo
GAPDH (GAPDH)	NM_002046.3	Hs99999905_m1
TATA box binding protein (TBP)	NM_003194.4	Hs99999910_m1
α_{1A} -AR (ADRA1A) Isof.3	NM_033302.2	Hs00169124_m1
α_{1B} -AR (ADRA1B)	NM_000679.3	Hs00171263_m1
α_{1D} -AR (ADRA1D)	NM_000678.3	Hs00169865_m1
β_1 -AR (ADRAB1)	NM_000684.2	Hs00265096_s1
β_2 -AR (ADRAB2)	MN_000024.4	Hs00240532_s1
β_3 -AR (ADRAB3)	MN_000025.1	Hs00609046_m1
GRK2 (ADRBK1)	MN_001619.3	Hs00176395_m1
GRK3 (ADRBK2)	MN_005160.3	Hs00178266_m1
GRK5 (GRK5)	MN_005308.2	Hs00178389_m1

Datos proporcionados por Applied Biosystem

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 μ l con Taqman® Universal Master Mix (AmpliAq Gold® DNA Polymerase; Applied Biosystems, US), incluyendo 5 μ l de la dilución de la reacción de transcripción reversa y 1,2 μ 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.

2.1.5 Elección gen de referencia

La RT-PCR se trata de un método experimental sensible de cuantificación del ARNm donde se requiere una expresión invariable en los genes de referencia elegidos. La estrategia común es normalizar la expresión de un gen específico para un único gen de referencia, asumiendo que la expresión del gen control o de referencia es invariable entre la comparación de estados fisiológicos dados (Brattelid y cols., 2010).

La validación de elección de un gen o genes de referencia es importante según muestra a cuantificar, es evidente la dificultad de identificar un gen de referencia general, el cual pueda ser utilizado en un número elevado de ensayos y diferentes tipos de muestras. Estudios previos han testado diferentes genes de referencia en muestras procedentes de corazones insuficientes de diferentes especies (ratón, rata y humano) (Brattelid y cols., 2010). El GAPDH y el ARN 18S ribosomal son dos de los genes de referencia más utilizados en la cuantificación de la expresión en muestras de corazón insuficiente (Seeland y cols., 2007; Schmechel y cols., 2009). Dos de los genes testados en dicho estudio elegidos como controles internos en nuestras muestras de corazón humano insuficiente son el GAPDH y la proteína de unión a TATA (TBP).

Tras realizar la RT-PCR utilizando las sondas GAPDH y TBP sobre explantes de VI procedentes de corazón humano insuficiente y biopsias de VD de corazones trasplantados observamos como existe una fuerte correlación en la expresión entre los genes de referencia elegidos (Figura 1). Así pues, consideramos el gen de referencia GAPDH como apto siendo el seleccionado tanto en ensayos de expresión génica como proteica.

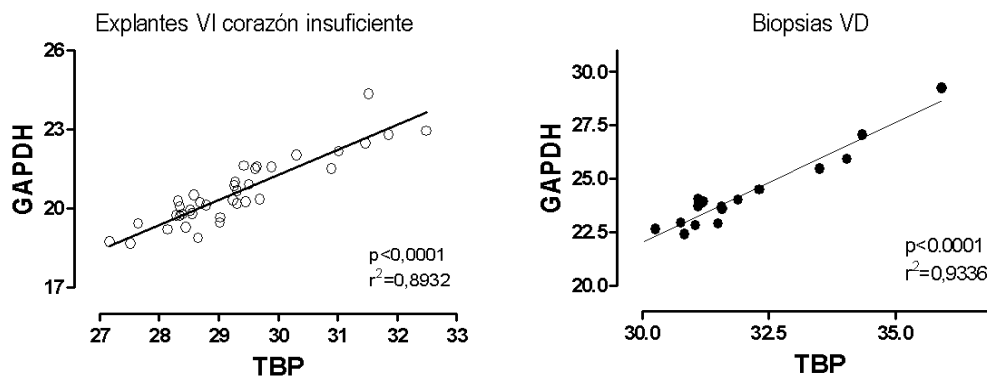


Figura 1. Regresión lineal de los niveles de expresión de ARNm de los genes de referencia Gliceraldeido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y la TATA-box binding protein (TBP) en muestras de VI de corazón humano insuficiente y en Biopsias de VD de corazón humano trasplantado. Valores de Ct para un n=39 en explantes de VI y un n=17 en Biopsias de VD. La línea continua representa correlación positiva a $P < 0,05$.

2.1.5 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 7500 Fast sequence-detectionsystem (Applied Biosystems, US). Los valores Ct fueron normalizados usando como gen de referencia el GAPDH, siendo ΔCt la diferencia entre Ct del gen estudiado y el de referencia. El valor ΔCt se transformó matemáticamente mediante la expresión $2^{-\Delta Ct}$, directamente proporcional al número inicial de copias de cada gen (Livak & Schmittgen, 2001).

2.2 Cuantificación de la expresión proteica.

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

2.2.1 Extracción de proteínas totales

Las muestras, congeladas y pulverizadas, siguiendo el protocolo que se detalla en el anterior apartado 2.1.1, se añadieron a un tubo conteniendo el tampón de lisis RIPA compuesto por 50mM HEPES (Acido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il] etanosulfónico) pH 7.5, 150mM NaCl, 10% Glicerol, 1,5mM MgCl₂, 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). Se realizó la homogenización con 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 durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido, que fue alicuotado y guardado a -80°C, contiene las proteínas solubles.

2.2.2 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). 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.

2.2.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida con Dodecil 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 μ g) 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 carga 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 cargó 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 AR y GRK estudiadas. Las diluciones y los anticuerpos primarios empleados se detallan en la Tabla 10. 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 10), 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 GAPDH.

• • • **Tabla 10****Anticuerpos utilizados en el estudio de la expresión proteica**

Proteína	Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario
GAPDH	Ac.policlonal de conejo (G9545; Sigma)	1:2500	Anti-rabbit IgG (GE Healthcare); 1:2500
α_{1A} -AR	Ac.policlonal de cabra (sc-1477; Sta. Cruz)	1:100	Anti-goat IgG (Jackson IR); 1:2500
β_1 -AR	Ac.policlonal de conejo (sc-568; Sta. Cruz)	1:100	Anti-rabbit IgG (GE Healthcare); 1:2500
B_2 -AR	Ac.policlonal de conejo (sc-9042; Sta. Cruz)	1:500	Anti-rabbit IgG (GE Healthcare); 1:2500
GRK2	Ac.policlonal de conejo (sc-562; Sta. Cruz)	1:250	Anti-rabbit IgG (GE Healthcare); 1:2500
GRK3	Ac.policlonal de conejo (sc-563; Sta. Cruz)	1:250	Anti-rabbit IgG (GE Healthcare); 1:2500
GRK5	Ac.policlonal de conejo (sc-565; 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

2.2.4 Análisis de los resultados

Las imágenes de quimioluminiscencia fueron capturadas inmediatamente mediante un Autochemi™ 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 GAPDH, y expresando los resultados como unidades arbitrarias de proteína.

2.3 Estudio de la unión de radioligandos.

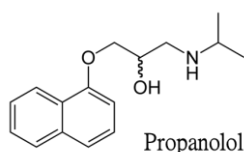
A partir de ensayos de unión del radioligando [³H]CGP12177 estudiaremos la proporción de AR-β existentes en corazón humano insuficiente. Realizaremos ensayos de saturación donde se mide la cantidad de ligando unido para una cantidad fija de receptores.

2.3.1 Obtención de membranas.

A partir de triturado de explantes de VI de corazón insuficiente almacenados a -80°C situamos entre 1 y 1,5 g de triturado en tampón Tris-EDTA-HCl 10mM, 1mM EDTA pH 7.5 junto con inhibidores de proteasas en una proporción 1/10 (p/v). Homogenizaremos con ayuda de un homogenizador ultra turrax (Janke & Kunkel, Starfen, Alemania) durante 10 segundos a velocidad media. A continuación, filtraremos el homogenizado a través de filtros de nylon con ayuda de un sistema de filtración con bomba de vacío desechando las porciones de tejido no homogenizado. Centrifugaremos el homogenizado obtenido durante 15 min a 1500 g quedándonos con el sobrenadante y obteniendo así proteínas totales, las cuales cuantificaremos mediante el método Bradford (Ver apartado 2.2.2)

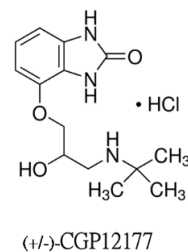
2.3.2 Ensayos de saturación

Los experimentos de saturación se realizaron incubando por duplicado 2 mg de homogenizado de explantes de VI en presencia de concentraciones crecientes 0,1-10 nM, del radioligando [³H]CGP12177 (Amersham International, Buckinghamshire, UK) (agonista β₁ y β₂). La unión inespecífica se determinó en presencia y ausencia de Propanolol (RBI, Natick MA, USA) 10⁻³M en volumen final de 250 μl en Tris-HCl (50mM, pH 7.5).



El propanolol es un antagonista no selectivo de los ARs-β₁ y β₂ que en una concentración elevada (10⁻³ M) impide que el radioligando se fije al AR. La radioactividad debida a uniones inespecíficas del [³H]CGP12177 se define como la radioactividad unida que no es desplazada por una concentración elevada de propanolol. La diferencia entre la unión total y la unión no específica es considerada como la fijación específica del [³H]CGP12177 al AR-β presente en corazón.

Las muestras se incubaron durante 1 hora a 25°C con agitación constante. Tras el periodo de incubación, se añadió a los tubos tampón de incubación frío Tris-HCl (50mM, pH 7.5) (4°C) y se realizó una filtración rápida en filtros de fibra de vidrio (Schleider & Schuell, GF52) previamente humedecidos en solución de polietilenimina (Sigma) al 0,1%. Se utilizó un filtrador automático para múltiples muestras (Cell Harvester Brandel M24R), los filtros se



lavaron tres veces con 4 ml de tampón frío y tras secarse a temperatura ambiente, se colocaron en viales a los que se añadió líquido de centelleo (4 ml) (BCS, Amersham). Se valoró la radioactividad retenida en los filtros con un contador de centelleo (Wallace 14.10).

2.3.3 Análisis de los resultados

- Determinación de K_D y B_{max} .

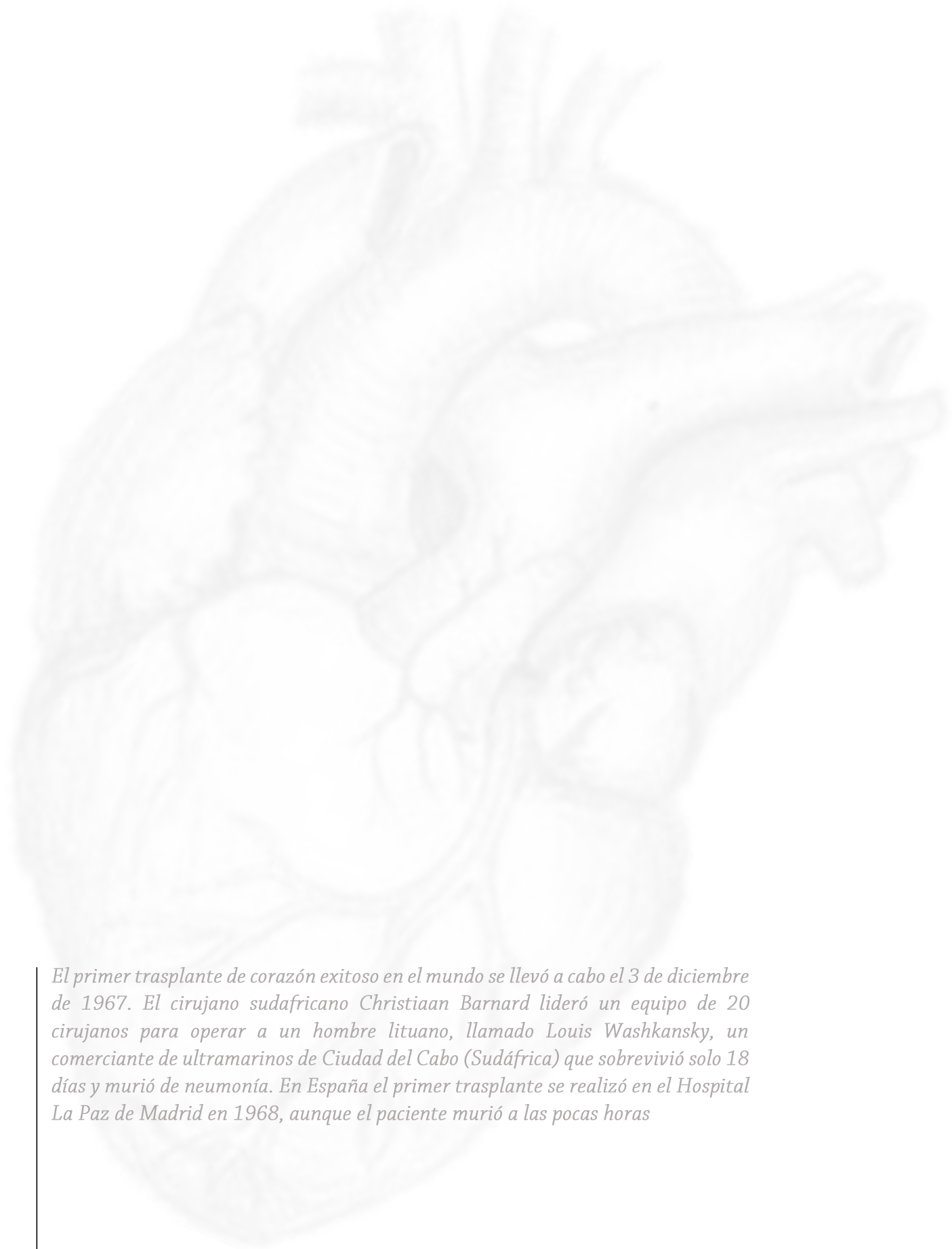
Los valores de unión específica para cada concentración de radioligando se calcularon como la diferencia de los datos experimentales de unión total y de unión inespecífica de [3 H]CGP12177 y se ajustaron por regresión lineal a la ecuación de una hipérbola mediante el programa Prism v.4.0 (Graph Pad Software;) obteniéndose los siguientes parámetros.

- K_D (constante de disociación en el equilibrio): Representa la inversa de la constante de afinidad que posee el radioligando por el AR- β y corresponde a la concentración de radioligando necesaria para ocupar el 50% de los receptores. Se representa en concentración molar
- B_{max} (número máximo de lugares de fijación): Representa la densidad de ARs- β en un determinado tejido. Se expresa en fmol/mg de proteínas.

3.- ANALISIS ESTADÍSTICOS 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) seguido por el test de Dunnett para la comparación de más de dos muestras o el test t de Student para dos muestras independientes (Prism v.4.0; Graph Pad Software). Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $P < 0,05$.

Para determinar si existen correlaciones entre dos variables analizadas, utilizamos el análisis de regresión lineal que nos informa acerca de la existencia o no de relación lineal (si $P < 0,05$). Se evaluó el coeficiente de correlación de Pearson (Prism v.4.0; Graph Pad Software) para conocer 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).



El primer trasplante de corazón exitoso en el mundo se llevó a cabo el 3 de diciembre de 1967. El cirujano sudafricano Christiaan Barnard lideró un equipo de 20 cirujanos para operar a un hombre lituano, llamado Louis Washkansky, un comerciante de ultramarinos de Ciudad del Cabo (Sudáfrica) que sobrevivió solo 18 días y murió de neumonía. En España el primer trasplante se realizó en el Hospital La Paz de Madrid en 1968, aunque el paciente murió a las pocas horas

RESULTADOS

- 1.-Expresión de los AR y GRK en el sistema cardiovascular y cambios observados en IC e HTA
- 2.- Cambios en la expresión de AR y GRK inducidos por los tratamientos de elección en la IC
- 3.- Correlación entre la expresión de los AR y GRK de VI de corazón insuficiente y variables clínicas
- 4.- Correlaciones en la expresión de AR y GRK entre distintos territorios
- 5.- Correlaciones entre AR y GRK en un mismo territorio

RESULTADOS

Laborioso se ha hecho ordenar los numerosos resultados obtenidos en el desarrollo de la presente tesis por la gran cantidad de datos, por un lado clínicos procedentes del ámbito hospitalario y por otro experimentales adquiridos en el laboratorio. Por ello, para una mejor comprensión y discusión de estos, constituiremos el apartado de resultados en cinco grandes bloques:

1.- Expresión de los AR y GRK en el sistema cardiovascular y cambios observados en IC e HTA.

Analizaremos los diferentes tipos de expresión de los AR (α_{1A} , α_{1AB} , α_{1D} , β_1 , β_2 y β_3) y las GRK (GRK2, GRK3 y GRK5) a nivel génico, y en algunos casos proteico, en muestras representativas del sistema cardiovascular en muestras humanas y modelos animales.

2.- Cambios en la expresión de AR y GRK inducidos por los tratamientos de elección en la IC.

Las enfermedades cardiovasculares requieren de un tratamiento específico para mejorar la morbilidad y supervivencia de los pacientes. El tratamiento seleccionado variará según el tipo y etiología de la enfermedad instaurada en cada paciente. Por ello, se examinará cómo los diferentes tratamientos farmacológicos pueden afectar la expresión de los distintos subtipos de AR y GRK. De entre todos los principios activos estudiados haremos mayor hincapié en dos de los más importantes fármacos utilizados en la IC, el β -bloqueante carvedilol y el IECA captopril.

Además, para corroborar la implicación de los diferentes tratamientos sobre los AR y GRK en modelo humano y animal, llevaremos a cabo estudios *in vitro* en células HEK 293 y *ex vivo* en corazón de rata Wistar tratados con carvedilol.

3.- Correlación entre la expresión de los AR y GRK y las variables clínicas.

Cada muestra humana proporcionada por las unidades de cardiología del Hospital Universitario y Politécnico la Fe de Valencia y el Hospital de la Ribera de Alcira (Valencia) fue acompañada con la base datos de variables clínicas procedentes del historial clínico del paciente correspondiente.

Agrupando datos originarios de la historia clínica de cada paciente obtendremos las características demográficas y antropométricas de la población en estudio. Por otro lado nos permitirán la realización de análisis estadísticos entre las diferentes variables clínicas y los niveles de expresión de los AR y GRK en cada muestra, y conocer así, las posibles correlaciones existentes entre ambos.

4.- Correlaciones en la expresión de AR y GRK entre distintos territorios

En probabilidad y estadística, la correlación indica la fuerza y la dirección de una relación lineal y proporcionalidad entre dos variables. Se considera que dos variables cuantitativas están correlacionadas cuando los valores de una de ellas varían sistemáticamente con respecto a los valores homónimos de la otra: dos variables (A y B) poseen correlación si al aumentar (o disminuir) los valores de A lo hacen también los de B (o a la inversa). Con ello, a partir de las diferentes expresiones obtenidas entre los AR y GRK se analizó si existía una posible correlación entre la expresión en VI y VD, o bien entre las cavidades cardíacas y los linfocitos circulantes. La existencia de esta correlación permitiría establecer la existencia de un mecanismo regulador común en los distintos territorios y, por tanto, la utilización de los linfocitos circulantes como biomarcadores de los cambios que se puedan producir a nivel cardíaco.

5.- Correlaciones entre AR y GRK en un mismo territorio

A partir de las diferentes expresiones de los AR y GRK mediante estudios de regresión lineal analizaremos la presencia de correlación entre los diferentes AR y sus cinasas reguladoras en cada territorio estudiado. La existencia de esta correlación entre AR/GRK sugeriría la actuación de un mecanismo regulador común para cada pareja de genes así como la posible especificidad de una cinasa por un AR.

1.- Expresión de los AR y GRK en el sistema cardiovascular y cambios observados en IC e HTA

Los cimientos de esta tesis se basan en el estudio de la expresión génica de los AR y sus GRK reguladoras a nivel cardiovascular. En este primer apartado estableceremos como los AR y las GRK se expresan y distribuyen en los diferentes tejidos más representativos del sistema cardiovascular, destacando su órgano central, el corazón.

Una sencilla manera de entender mejor la idiosincracia de estas proteínas es comparando sus posibles cambios de expresión en estados de enfermedad frente a estados de normalidad. Por ello, a partir de diferentes tipos de muestras obtenidos de modelo humano y animal separados en estados de normalidad/sanos y de enfermedad/IC o hipertensión, estudiaremos mediante técnicas de expresión génica (RT-PCR), inmunobloting (WB) y unión de radioligandos como se ven afectados los principales AR (α_{1A} , α_{1AB} , α_{1D} , β_1 , β_2 y β_3) y tres de sus cinasas reguladoras (GRK2, GRK3 y GRK5) mayoritariamente expresadas en el sistema cardiovascular.

1.1 Modelo humano

Además de las muestras de VI (n=4) obtenidas de donantes de los que desconocemos sus características, la población incluida en el estudio (n=105) se distribuye en los siguientes grupos según sus características demográficas, antropométricas y clínicas:

● ● ● **Tabla 11.**
Características demográficas y antropométricas de la población

	LINFOCITOS		EXPLANTES LINFOCITOS	
	Control	Hipertensión	Insuficiencia cardiaca	Trasplante cardiaco
Edad (años)	41 ± 5	53 ± 3	52 ± 2	47 ± 4
Rango de Edad	23 - 64	31 - 67	17 - 68	16 - 63
Hombre/ Mujer (n)	12 / 9 (21)	12 / 13 (25)	32 / 10 (42)	13 / 4 (17)
Peso (Kg)	80,7 ± 5,8	80,4 ± 4,8	77 ± 2	67,5 ± 3,2
Talla (cm)	172 ± 2	167 ± 3	168 ± 1,2	168 ± 2
IMC (kg/m ²)	27,5 ± 1,3	28,1 ± 1,2	26,8 ± 0,7	24,1 ± 0,8

Valores expresados como la media ± e.e.m. IMC indica el Índice de Masa Corporal.

1.1.1. Corazón

1.1.1.1. Ventrículo izquierdo procedente de donante

Trabajamos con 4 muestras de VI procedentes de corazón de donantes que, finalmente, no se han considerado adecuados para el trasplante.

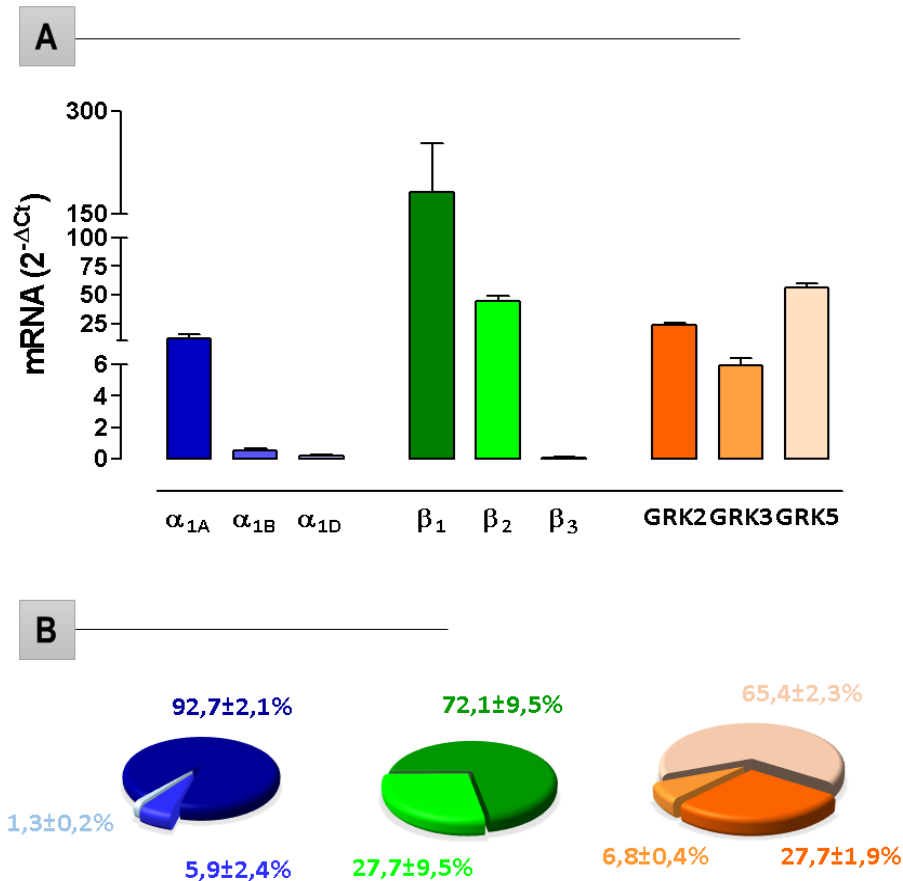


Figura 2. Análisis de la expresión de los diferentes subtipos de AR y GRK en explantes de VI de corazón sano. Valores normalizados utilizando como gen de referencia el GAPDH y expresados como 2^{-ΔCt} de un n=4. A) Gráfico de barras donde se representa la media ± e.e.m. B) Diagrama de sectores donde se representa la media ± e.e.m del porcentaje de los niveles de expresión de los subtipos en cada paciente.

La Figura 2 muestra, al igual que describió Brodde en 1991 en los primeros estudios de expresión de AR en VI, que el subtipo mayoritario es el β₁, con un porcentaje del 70-80%, frente al 20-30% del β₂, siendo minoritario el β₃. En el caso de los subtipos α₁, los cuales se expresan en menor proporción que los subtipos β, el α_{1A} destaca como mayoritario, resultados que también concuerdan con estudios anteriores (Graham y cols., 1996; Jensen y cols., 2009b). Por otro lado, GRK2 y GRK5 aparecen en nuestros resultados como las GRK predominantes en VI como ya se exponía con anterioridad (Belmonte & Blaxall 2011).

1.1.1.2. Corazón trasplantado

Además de corroborar el correcto funcionamiento de los corazones trasplantados con pruebas hemodinámicas, se obtuvieron biopsias del VD para la realización de estudios de infiltración linfocitaria descartando así posibles rechazos del trasplante. Una parte de estas biopsias se cedió para realizar estudios de expresión génica. Trabajamos en este caso con 17 biopsias cuyas características clínicas se detallan en la Tabla 11.

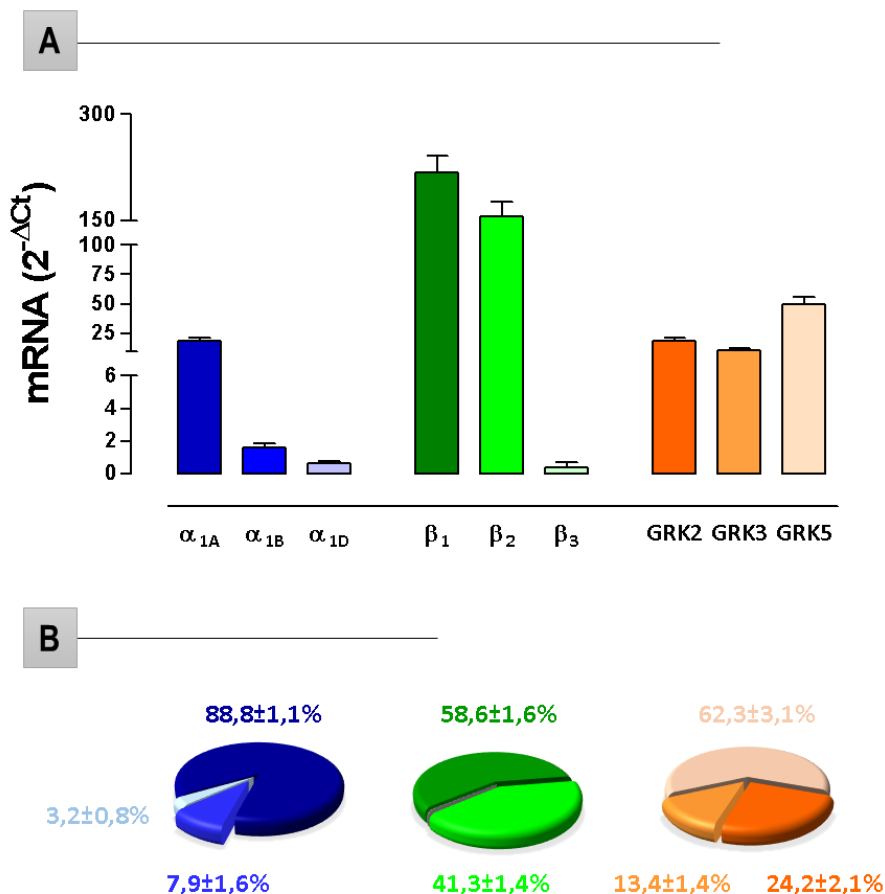


Figura 3. Análisis de la expresión de los diferentes subtipos de AR y GRK en biopsias de VD de corazones trasplantados. Valores normalizados utilizando como gen de referencia el GAPDH y expresados como 2^{-ΔCt} de un n=17. A) Gráfico de barras donde se representa la media ± e.e.m. B) Diagrama de sectores donde se representa la media ± e.e.m del porcentaje de los niveles de expresión de los subtipos en cada paciente.

En biopsias de VD de corazón trasplantado (Figura 3), los subtipos de AR mayoritarios son β₁ y β₂ al igual que ocurría en VI de corazón sano. En el caso de las biopsias, a diferencia de los explantes de VI de corazón sano, la proporción β₁/β₂ cambia significativamente, siendo de un 58.6±1.6% para el subtipo β₁ en VD frente al 72.1 ±9.5 para este mismo subtipo en VI (p= 0,6002) y de un 41.3±1.4% para el subtipo β₂ en VD frente al 27.7±9.5% en el VI (**p = 0,0064), lo que indica un mayor nivel de expresión del subtipo β₂ en VD de corazón trasplantado respecto al VI del corazón sano.

En el caso de los AR α_1 , las expresiones y proporciones de cada subtipo se asemejan a las mostradas en VI de corazón sano, siendo el mayoritario el α_{1A} . Respecto a las cinasas reguladoras se mantiene la GRK5 como mayoritaria.

1.1.1.3. Corazón insuficiente

De corazones insuficientes extirpados procedentes de pacientes sometidos a trasplante cardiaco se obtuvieron porciones o explantes de VI y VD con los que realizamos estudios de expresión de ARNm para los diferentes subtipos de AR y GRK.

En las siguientes figuras, los resultados obtenidos en VI y VD de pacientes con IC, se confrontan con los obtenidos en las muestras de corazón sano y biopsias obtenidas del VD del aloinjerto, para conocer así las posibles diferencias de expresión entre estados de normalidad funcional (donantes y pacientes trasplantados) e insuficiencia cardiaca.

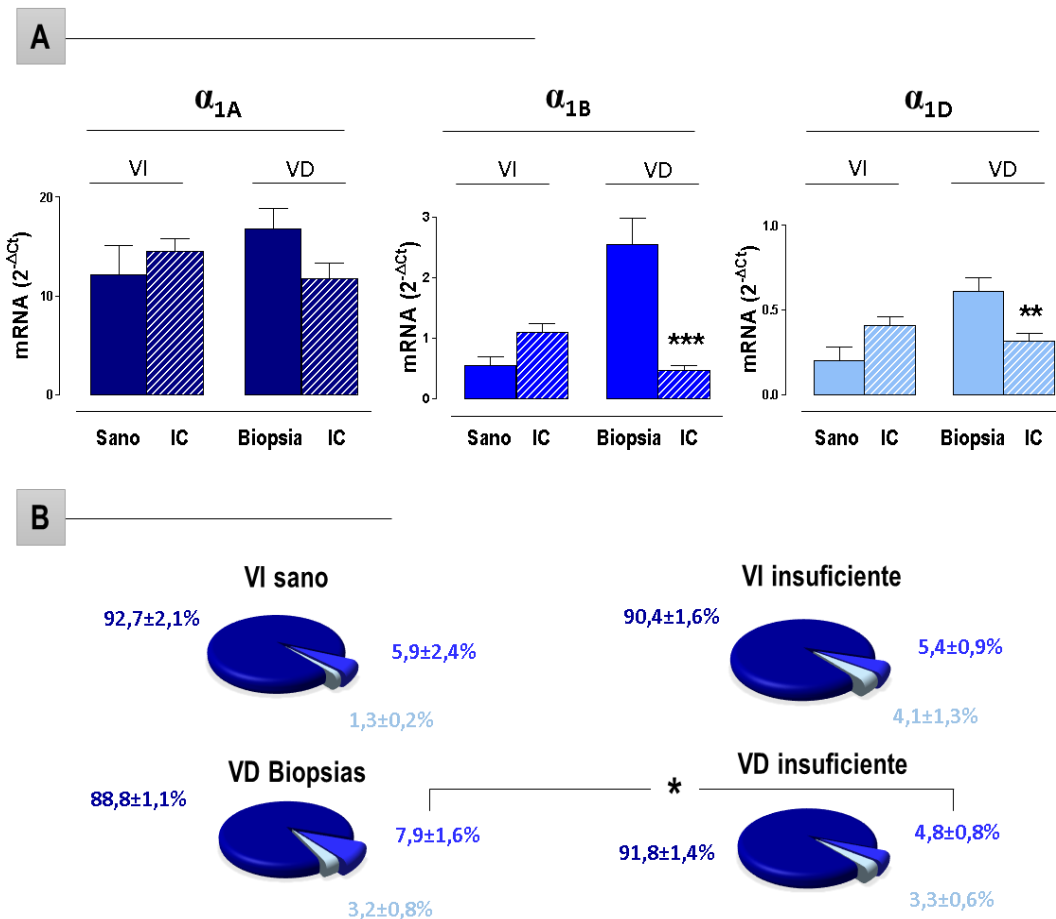


Figura 4. Análisis comparativo de expresión de los diferentes subtipos de AR- α_1 en muestras de corazón sano frente a insuficiente. Valores normalizados utilizando como gen de referencia el GAPDH y expresados como $2^{-\Delta Ct}$ de un n=4 en explantes de VI sano, n=17 en biopsias de VD de corazón trasplantado, n=42 en explantes de VI de corazón insuficiente y n=31 en explantes de VD de corazón insuficiente. A) Gráfico de barras donde se representa la media \pm e.e.m. B) Diagrama de sectores donde se representa la media \pm e.e.m calculando el porcentaje de los niveles de expresión de cada subtipo en cada paciente. Siendo en ambas representaciones * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001 vs. VI sano o VD biopsias, según el test t de Student para variables independientes.

Por lo que respecta a los AR- α_1 , tal como queda reflejado en la Figura 4, no se observan diferencias significativas entre el VI sano o insuficiente, pero vemos una disminución de la expresión de ARNm de los tres subtipos en VD de corazón insuficiente, llegando a ser significativo para α_{1B} y α_{1D} . Este hecho muestra como la expresión de estos subtipos es menor en corazón insuficiente, observando en el aloinjerto, tras el trasplante, una mayor expresión de los AR- α_1 en el VD. Considerando el porcentaje de cada subtipo respecto al total en cada cavidad cardiaca, a nivel del VI no aparecen cambios característicos, mientras que en VD existe una disminución significativa en el porcentaje de expresión del subtipo α_{1B} en VD de corazón insuficiente respecto a las biopsias obtenidas tras el trasplante.

En el caso de las diferencias de expresión de los AR- α_1 entre las diferentes cavidades (VI y VD) de corazón insuficiente, observamos que la expresión del subtipo α_{1B} es significativamente menor en VD que en VI ($p= 0,0008$), no siendo así a nivel de los subtipos α_{1A} ($p= 0,180$) y α_{1D} ($p= 0,234$).

A nivel de los AR- β (Figura 5), distinguimos en corazón insuficiente una disminución marcada y representativa de la expresión de ARNm del subtipo β_1 en ambas cavidades del corazón (Figura 5A). En el caso del subtipo β_2 aparece un aumento de la expresión en VI de los pacientes con IC frente a donantes sanos y disminución en VD respecto a la expresión en casos de trasplante (Figura 5A). No se manifiestan cambios significativos en el subtipo β_3 cuya expresión es muy minoritaria respecto a los otros dos.

Esta disminución drástica de la expresión del subtipo β_1 en corazón insuficiente lleva a la aparición de un cambio en la armonía entre β_1/β_2 existente en estados de normalidad funcional. Este cambio se observa bien en la representación de diagramas de sectores, con el porcentaje de cada subtipo respecto al total, donde aparecen cambios significativos en ambas cavidades (Figura 5B). Mientras que los niveles de normalidad se encuentran en un 70-80% β_1 / 20-30% β_2 como ya reveló Brodde en 1991 y que corroboramos en la presente tesis en las Figuras 2 y 5, en la IC pasan a ser cerca del 50% β_1 / 50% β_2 . Estos resultados sugieren que la contribución relativa de subtipo β_2 en la respuesta adrenérgica podría estar incrementada en la IC. Por lo que respecta al nivel de expresión de los AR- β entre las diferentes cavidades (VI y VD) de corazón insuficiente, observamos que no aparecen diferencias significativas en la expresión de los diferentes subtipos (β_1 , $p= 0,789$; β_2 , $p= 0,079$; β_3 , $p= 0,366$).

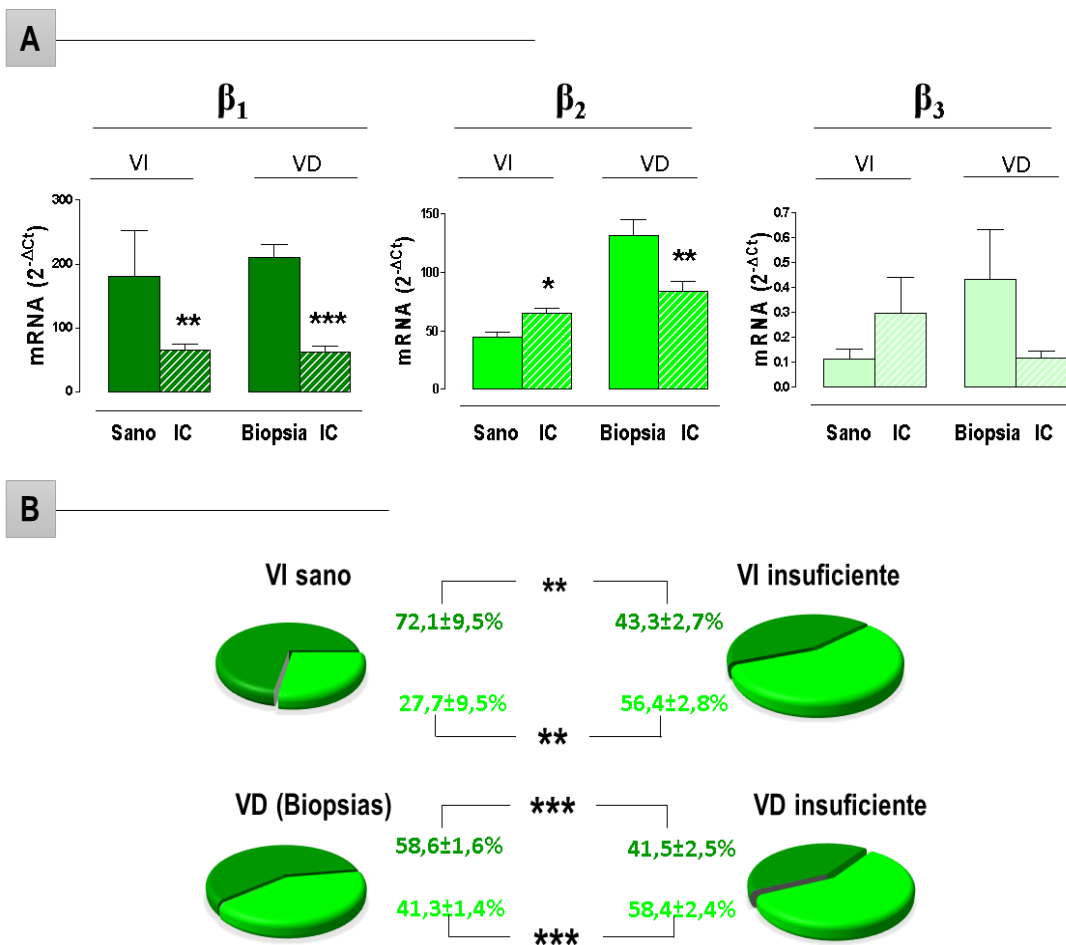


Figura 5. Análisis comparativo de la expresión de los diferentes subtipos de AR -β en muestras de corazón sano frente a insuficiente. Valores normalizados utilizando como gen de referencia el GAPDH y expresados como media de 2^{-ΔCt} de un n=4 explantes de VI sano, n=17 biopsias de VD de corazón transplantado, n=42 explantes de VI de corazón insuficiente y n=31 explantes de VD de corazón insuficiente. A) Gráfico de barras donde se representa la media ± e.e.m. B) Diagrama de sectores donde se representa la media ± e.e.m calculando el porcentaje de los niveles de expresión de cada subtipo en cada paciente. Siendo en ambas representaciones ** P < 0,01, *** P < 0,001 vs. VI sano o VD biopsia, según el test t de Student para variables independientes.

Al realizar cálculos de proporción relativa del total de los AR mayoritarios en cada cavidad (Figura 6) observamos a nivel de VI insuficiente como el AR-α_{1A} aumenta su proporción respecto del total de un 5% al 10%. Este aumento se produce a causa de la drástica disminución del AR-β₁, hecho que podría llevar al subtipo α_{1A} a ostentar una mayor implicación en las funciones cardiacas en situaciones de IC.

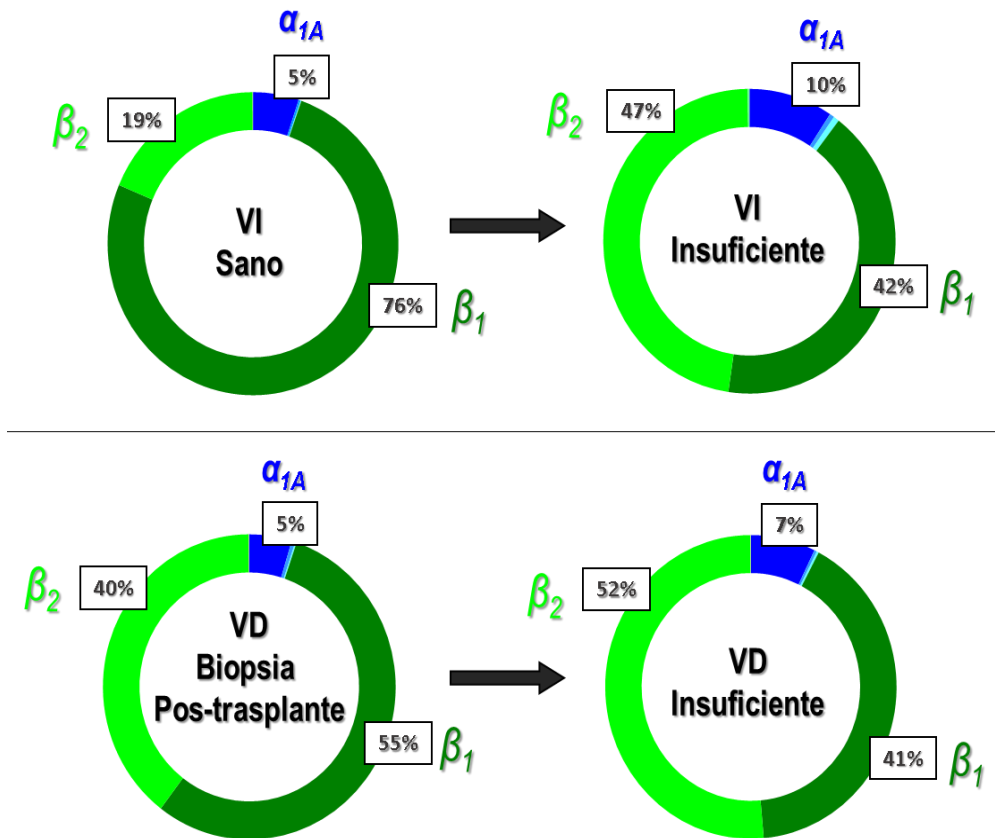


Figura 6. Proporción relativa AR- α_{1A} , β_1 y β_2 en VI y VD de corazón sano, insuficiente y post-trasplante.

A nivel de las GRK, tal como muestra la Figura 7, aparece un incremento significativo de la isoforma GRK2 en VI insuficiente respecto al sano. Se observa una mayor expresión de GRK5 en VD insuficiente previo al trasplante. En lo que respecta a los porcentajes representados mediante diagrama de sectores, se observa una proporción menor de la GRK2 y mayor de GRK5 en las muestras de VD insuficiente comparado con el VD del corazón trasplantado.

En el caso de las diferencias en la expresión de las GRK entre las cavidades (VI y VD) de corazón insuficiente, observamos que no aparecen cambios significativos en la expresión de ninguna de las tres cinasas (GRK2, $p=0,552$; GRK3, $p=0,501$; GRK5, $p=0,831$).

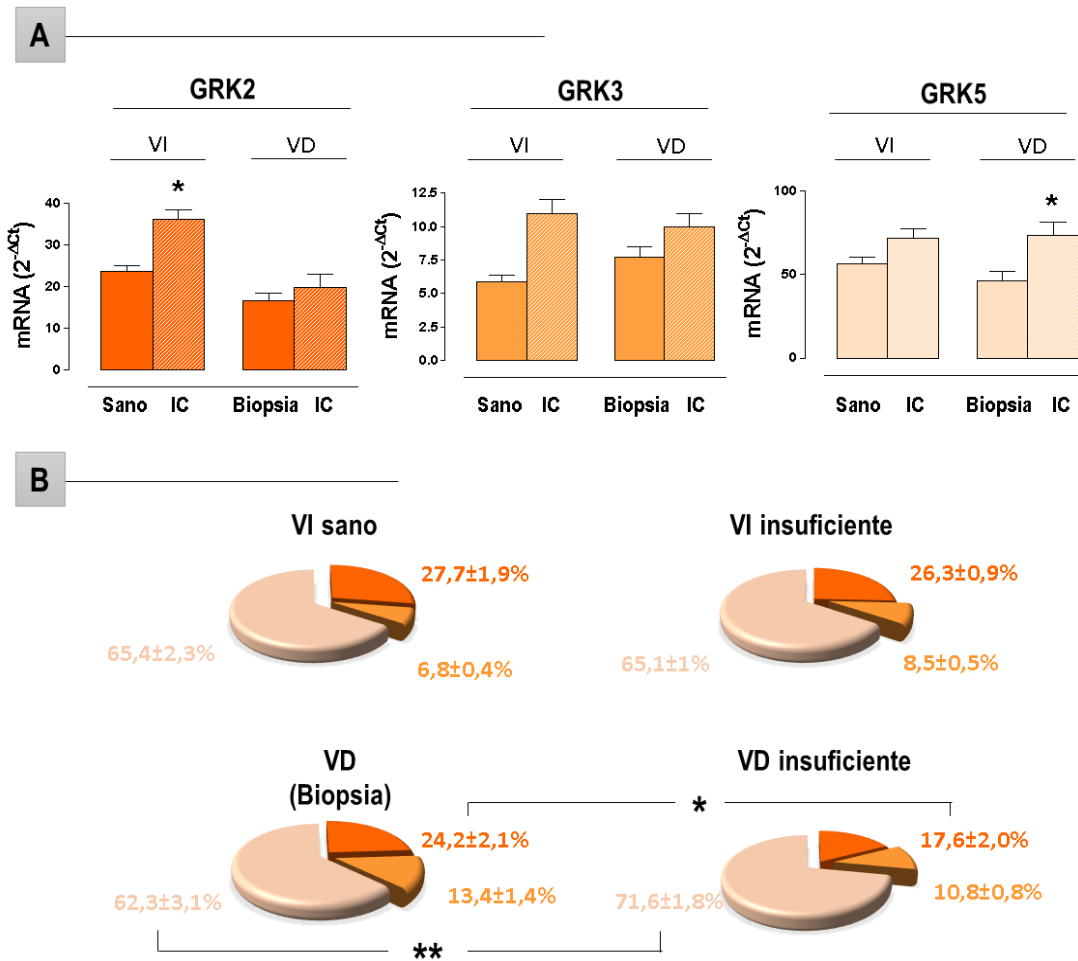


Figura 7. Análisis comparativo de la expresión de los diferentes subtipos GRK en muestras de corazón sano frente a insuficiente. Valores normalizados utilizando como gen de referencia el GAPDH y expresados como media de 2^{-ΔCt} de un n=4 explantes de VI sano, n=17 biopsias de VD de corazón transplantado, n=42 explantes de VI de corazón insuficiente y n=31 explantes de VD de corazón insuficiente. A) Gráfico de barras donde se representa la media ± e.e.m. B) Diagrama de sectores donde se representa la media ± e.e.m calculando el porcentaje de los niveles de expresión de cada subtipo en cada paciente. Siendo en ambas representaciones * P < 0,05, ** P < 0,01 vs. VI sano o VD biopsia, según el test t de Student para variables independientes.

1.1.1.3.1. Expresión de AR y GRK según etiología de la IC

La población objeto de estudio a partir de la cual se obtuvieron las muestras de VI y VD durante el proceso del trasplante cardiaco poseía una severa IC en fase terminal o clase IV según la clasificación de la NHYA. La IC puede ser desencadenada por diferentes tipos de cardiopatías, por ello, tras el estudio de la expresión de ARNm de los AR y GRK de corazones insuficientes procedentes de los 42 pacientes, distribuimos los datos obtenidos en tres grupos según el tipo de cardiopatía causante de la IC. En nuestro caso y como muestra la Tabla 12, fueron la Cardiopatía Isquémica (CI) y la Miocardiopatía dilatada (MD) las predominantes, y a partir de las cuales se constituyeron los dos primeros grupos. El tercer grupo, denominado NI-ND (No isquémicas-No dilatadas)

engloba una amalgama de muestras que no se podían incluir en los dos anteriores. En este tercer grupo se incluyen pacientes con valvulopatías, displasia de VD, trasplante, miocarditis, enfermedad restrictiva y cardiopatía congénita. A partir de estos grupos realizamos, además del estudio génico mediante RT-PCR, estudios a nivel proteico de inmunoblotting mediante WB y de unión de [^3H]CGP12177, radioligando específico de los AR- β , para conocer así los diferentes cambios que se dan en la expresión de los AR y GRK según el tipo de cardiopatía sufrida.

● ● ● Tabla 12

Etiología de la Insuficiencia Cardíaca

	<u>n</u>	<u>(%)</u>
Cardiopatía Isquémica	10	23,8
Miocardopatía dilatada	17	40,5
No Isquémicas-No dilatadas	15	35,7
Valvulopatías	3	5,7
Miocarditis, Sarcoidosis, Mastocitosis	3	5,7
Retrasplante	2	3,8
Displasias del VD	2	3,8
Enfermedad restrictiva	2	3,8
Miocardopatía hipertrófica	2	1,9
Congénitas	1	1,9

Distribución de las diferentes etiologías de la Insuficiencia Cardíaca para un total de 42 pacientes

En la mayoría de los casos estos pacientes, además de la IC avanzada, poseían algunas enfermedades asociadas las cuales mostramos en la Tabla 13.

● ● ● Tabla 13

Enfermedades asociadas

	<u>n</u>	<u>(%)</u>
Hipercolesterolemia	19	45,2
Diabetes mellitus	8	19
Hipertensión arterial	6	14,3
Hipertriglicemia	2	4,7
Hiperuricemia	2	4,7

Distribución de las diferentes enfermedades asociadas que presentan un total de 42 pacientes con Insuficiencia Cardíaca

Sobre los AR- α_1 se realizaron estudios de RT-PCR en los tres subtipos (α_{1A} , α_{1B} y α_{1D}), así como también estudios de WB sobre el subtipo α_1 mayoritario, el α_{1A} . Como muestra la Figura 8, en ninguno de los tres subtipos α_1 se encontraron cambios significativos entre los diferentes grupos de etiologías de la IC. A nivel del subtipo α_{1A} tanto a nivel génico como proteico no existieron cambios.

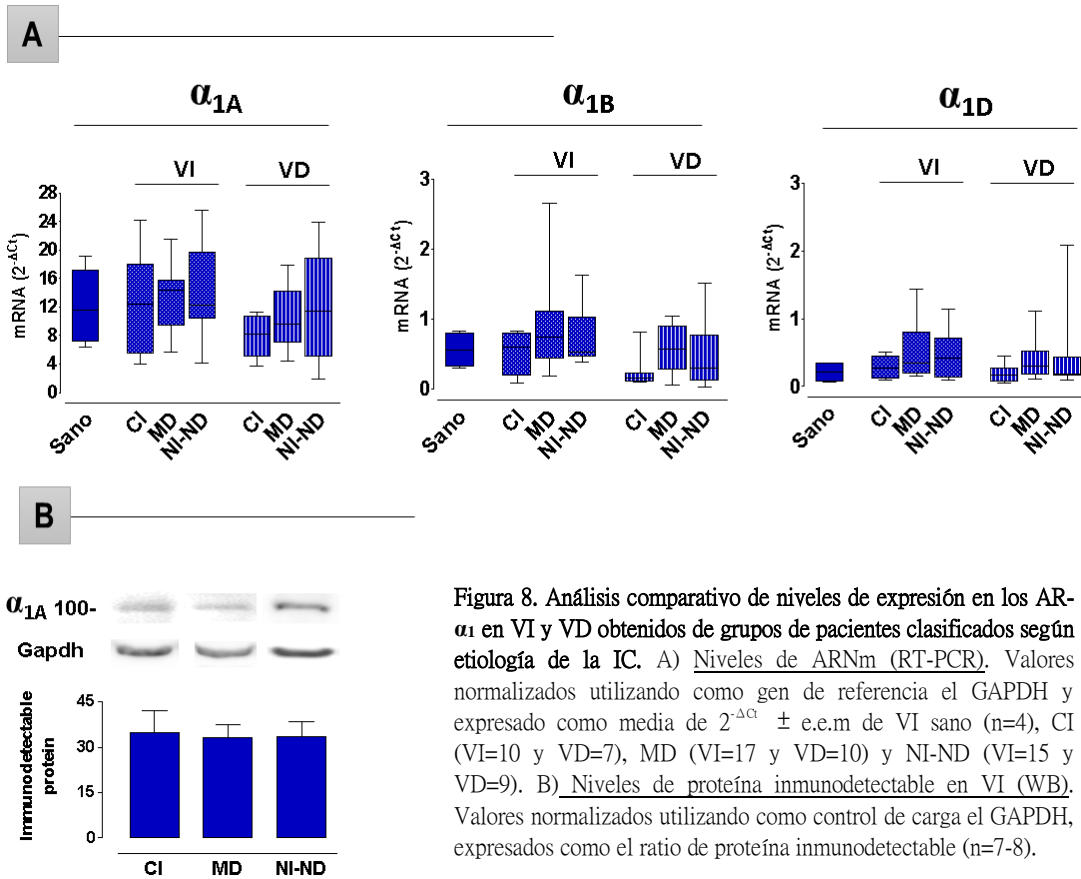


Figura 8. Análisis comparativo de niveles de expresión en los AR- α_1 en VI y VD obtenidos de grupos de pacientes clasificados según etiología de la IC. A) Niveles de ARNm (RT-PCR). Valores normalizados utilizando como gen de referencia el GAPDH y expresado como media de $2^{-\Delta Ct} \pm$ e.e.m de VI sano (n=4), CI (VI=10 y VD=7), MD (VI=17 y VD=10) y NI-ND (VI=15 y VD=9). B) Niveles de proteína inmunodetectable en VI (WB). Valores normalizados utilizando como control de carga el GAPDH, expresados como el ratio de proteína inmunodetectable (n=7-8).

Como ya se mostró en la Figura 5, donde se representaron los niveles de expresión de los AR- β en corazón insuficiente y donde se comprobó una evidente disminución en la expresión de los AR- β_1 , la Figura 9 vuelve a revelar esta tendencia, pero esta vez, se desglosa en cuál de las etiologías causante de la IC se encuentra más patente esta disminución, correspondiendo a los pacientes con CI en los que disminuye el AR- β_1 tanto en VI como en VD. En los otros dos casos, observamos una disminución significativa del AR- β_1 sólo en VI de pacientes con MD y en el VD de pacientes NI-ND (Figura 9A).

En explantes de VI, además de realizarse estudios de RT-PCR, se llevaron a cabo técnicas de inmunobloting (Figura 9B). En ambas casos aparece una disminución significativa del AR- β_1 en CI y MD. En el subtipo β_2 no observamos cambios significativos entre etiologías en ninguna de las dos cavidades cardiacas (Figuras 9A y 9B)

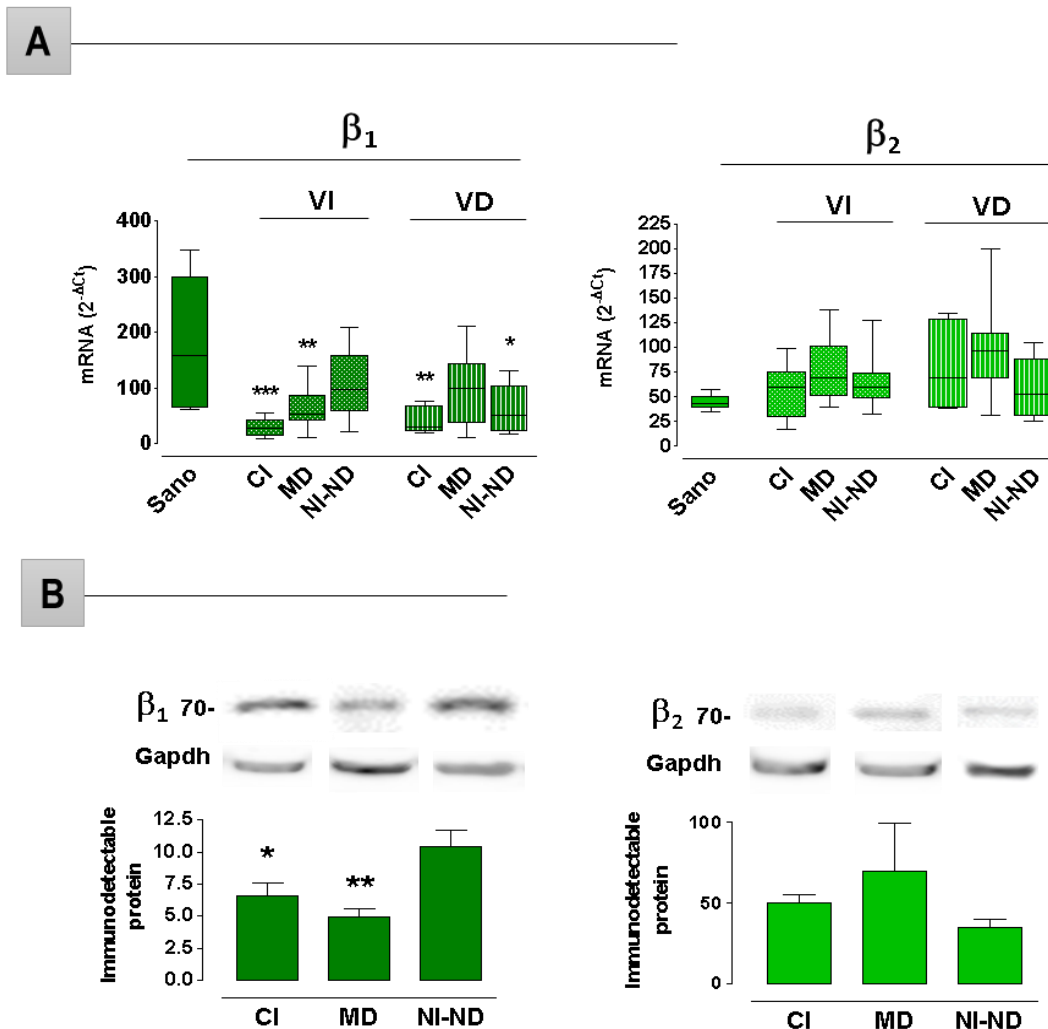


Figura 9. Análisis comparativo de niveles de expresión de los AR- β en VI y VD obtenidos de grupos de pacientes clasificados según etiología de la IC. A) Niveles de ARNm (RT-PCR). Valores normalizados utilizando como gen de referencia el GAPDH y expresados como media de $2^{-\Delta C_t} \pm e.e.m$ de VI sano (n=4), CI (VI=10 y VD=7), MD (VI=17 y VD=10) y NI-ND (VI=15 y VD=9). Siendo *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 vs VI sano, según ANOVA seguido del test de Dunnett. B) Niveles de proteína inmunodetectable en VI (WB). Valores normalizados utilizando como control de carga el GAPDH, expresados como el ratio de proteína inmunodetectable (n=7-8). Siendo *P<0,05, **P<0,01 vs NI-ND, según ANOVA seguido del test de Dunnett.

Tras observar mediante RT-PCR y WB la disminución del subtipo β_1 en VI de pacientes con CI y MD, nos ayudaremos de una tercera prueba experimental para corroborar tal descenso. Así pues, a partir de ensayos de unión del radioligando al receptor, buscaremos conocer la proporción de AR- β existentes en los tres grupos de cardiopatías (CI, MD y NI-ND) en corazón humano. Realizaremos ensayos de saturación (o curva de unión) donde se mide la cantidad de ligando unido para una cantidad fija de receptores. Tal como se muestra en la figura 10, este ensayo mostró una mayor proporción de AR- β en los pacientes con cardiopatías NI-ND.

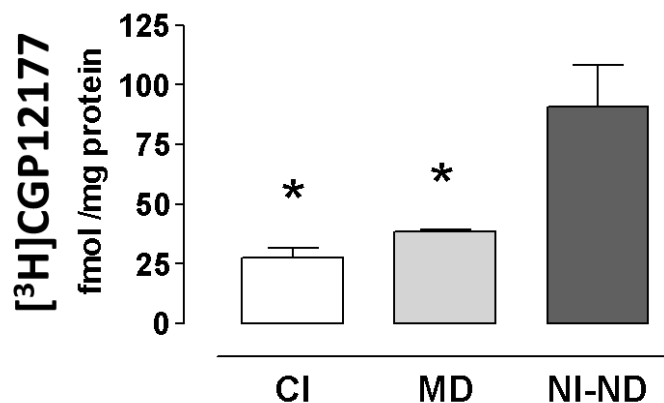


Figura 10. Unión específica de [³H]CGP12177 sobre receptores β adrenérgicos en VI de pacientes con cardiopatía isquémica (CI), miocardiopatía dilatada (MD) y cardiopatías no isquémicas no dilatadas (NI-ND). Los valores cuantificados representan la media \pm e.e.m de n=3 pacientes para cada grupo. Siendo * P < 0,05 vs. NI-ND, según ANOVA seguido del test de Dunnett.

Por último, si analizamos los cambios en la expresión de las GRK en los tres grupos de cardiopatías, observamos que en el caso de la GRK2, existe un aumento en la expresión del ARNm en MD y NI-ND de VI (Figura 11A), observándose también a nivel de inmunoproteína detectable (Figura 11B). En VD la GRK2 disminuye acentuadamente en CI. La GRK3 no presenta cambios relevantes en ninguna de las cavidades. La GRK5 aumenta marcadamente en VI tanto a nivel génico como proteico en NI-ND, mientras que en VD el aumento es significativo en estudios de RT-PCR.

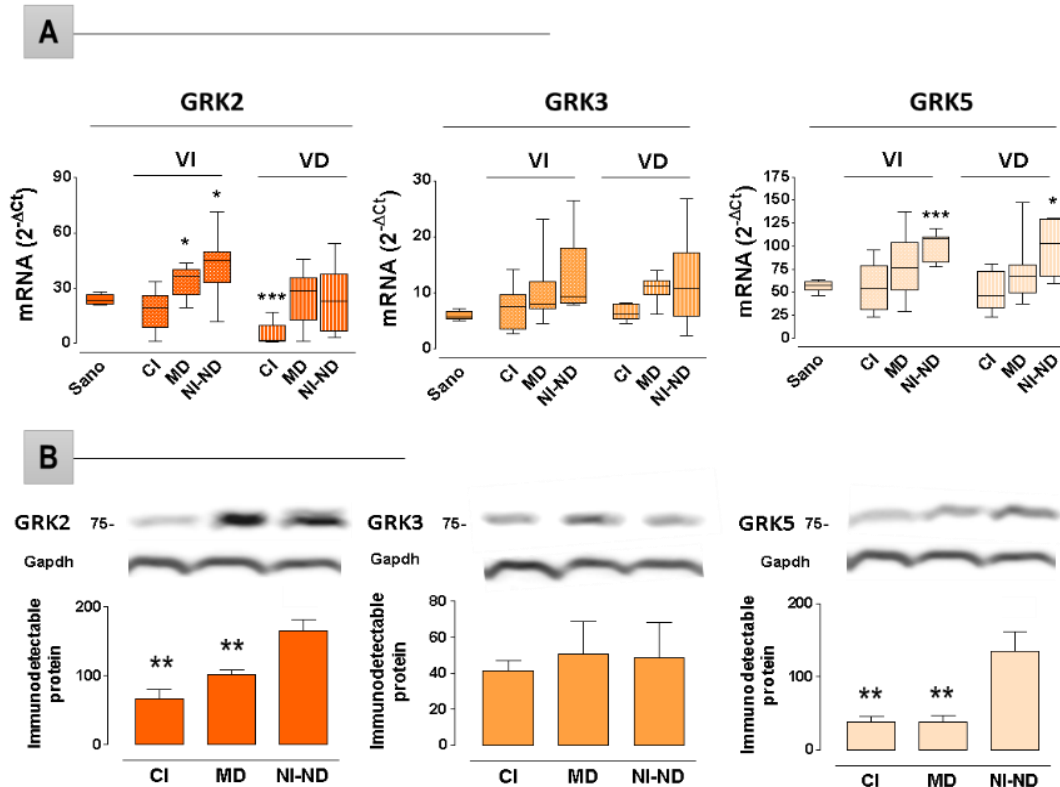


Figura 11. Análisis comparativo de niveles de expresión en las GRK en VI y VD obtenidos de grupos de pacientes clasificados según etiología de la IC. A) Niveles de ARNm (RT-PCR). Valores normalizados utilizando como gen de referencia el GAPDH y expresado como media de 2^{-ΔCt} ± e.e.m de VI sano (n=4), CI (VI=10 y VD=7), MCD (VI=17 y VD=10) y NI-ND (VI=15 y VD=9). Siendo *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 vs sano, según ANOVA seguido del test de Dunnett. **B) Niveles de proteína inmunodetectable en VI (WB).** Valores normalizados utilizando como control de carga el GAPDH, expresados como el ratio de proteína inmunodetectable (n=7-8). Siendo *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 vs NI-ND, según ANOVA seguido del test de Dunnett.

1.1.1.3.2 Variables clínicas según etiología de la IC.

Comparando los diferentes grupos de cardiopatías (NI-ND, MD, CI) observamos las diferencias que se dan a nivel de dos importantes variables clínicas en el diagnóstico de la IC, la FEVI (Figura 12) y DTS-VI y DTD-VI (Figura13)

Se observó que los pacientes que sufrieron una isquemia (CI) o miocardiopatía (MD) poseían una FEVI significativamente reducida en comparación con los pacientes NI-ND.

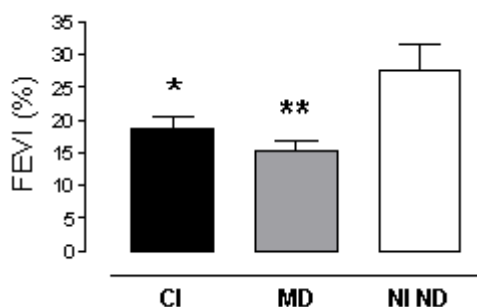


Figura 12. FEVI según grupos de cardiopatías. Valores cuantificados representan la media ± e.e.m de n=10 para CI, n=17 para MD y n=15 para NI-ND. Siendo * P < 0,05, ** P < 0,01 vs. NI-ND según ANOVA seguido del test de Dunnett.

En el caso del diámetro del VI tras punto final de la sístole y diástole se observa que existe un aumento tanto en MD y CI respecto a NI-ND.

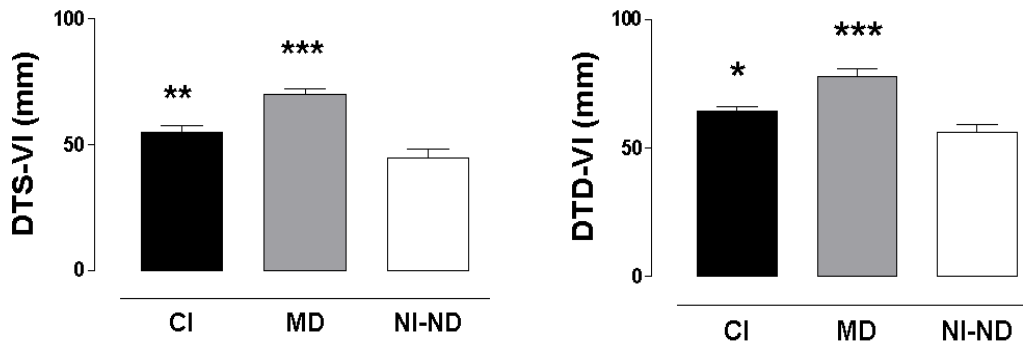


Figura 13. Análisis de los niveles de DTS y DTD en VI según grupos de cardiopatías (CI, MD, NI-ND). Pacientes con cardiopatías, CI n=10, MD n=13 y NI-ND n=14. Los valores cuantificados representan la media \pm e.e.m. Siendo * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001 vs. NI-ND según ANOVA seguido del test de Dunnett.

1.1.1.3.3 Expresión de AR y GRK en VI según FEVI

Agrupando los pacientes con IC según FEVI >25% y FEVI <25% (Figura 14) vemos como el AR- β_1 se encuentra disminuido significativamente en el grupo donde el corazón bombea menor cantidad de sangre o posee una funcionalidad más mermada. De la misma forma ocurre con la GRK5 que disminuyó en el grupo con FEVI <25%.

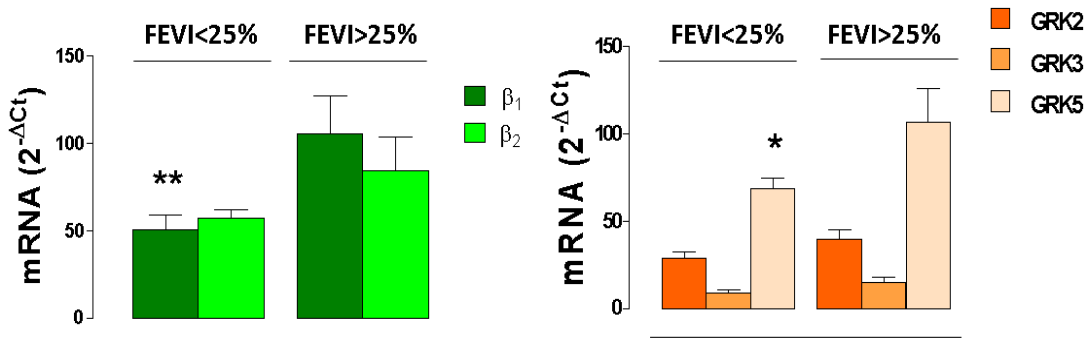


Figura 14. Análisis de los niveles de expresión génica de los AR y GRK en VI según niveles de FEVI. Pacientes con FEVI \leq 25% n=21 y FEVI > 25% n=6. Los valores cuantificados representan la media \pm e.e.m. Siendo * P < 0,05, ** P < 0,01 FEVI \leq 25% vs. FEVI > 25% según el test t de Student.

1.1.2. Fracción Monolinfocitaria circulante (FMLC)

A partir de la extracción de sangre de los diferentes pacientes se aisló la fracción FMLC de donde se extrajo ARNm para la realización de estudios de expresión génica. Pocos son los estudios realizados en relación a la expresión de los AR y las GRK en FMLC. Se conoce que el subtipo mayoritario es el β_2 del cual algunos autores han sugerido que podría ser la posible conexión existente entre el sistema inmunitario y el sistema nervioso simpático (Kin & Sanders, 2006).

● ● ● **Tabla 14**

Características demográficas y antropométricas de la población incluida en el estudio de la FMLC

	Control	Hipertensión	Hipertensión tratada	Insuficiencia cardiaca	Trasplante cardiaco
Edad (años)	41 ± 5	46 ± 3	59 ± 2	49 ± 5	47 ± 4
Rango de Edad	23 - 64	31 - 60	52 - 67	17 - 63	16 - 63
Hombre/ Mujer (n)	12 / 9 (21)	8 / 7 (15)	4 / 6 (10)	11 / 3 (14)	13 / 4 (17)
Peso (Kg)	80,7 ± 5,8	81,3 ± 4	79,7 ± 5,6	74,8 ± 3,9	67,5 ± 3,2
Talla (cm)	172 ± 2	171 ± 2	163 ± 3	167 ± 2	168 ± 2
IMC (kg/m²)	27,5 ± 1,3	27,7 ± 1,0	28,4 ± 1,3	26,8 ± 1,5	24,1 ± 0,8

Valores expresados como la media ± e.e.m según grupos de un total de 66 en el estudio. IMC indica el Índice de Masa Corporal.

1.1.2.1. Sujetos sanos

Se obtienen muestras de voluntarios sanos (n = 21) cuyas características demográficas y antropométricas han sido previamente descritas y que no presentan ninguna patología conocida.

Es de destacar que, en la expresión de los AR- α_1 (α_{1A} , α_{1B} y α_{1D}) así como el AR- β_3 , es minoritaria, resultando difícil detectar el ARNm para estos genes en una gran proporción de muestras (Figura 15). Por ello, sólo comentaremos los resultados obtenidos con los genes que manifiestan un nivel de expresión más elevado y que, por tanto, mejora la precisión y reproducibilidad de los resultados.

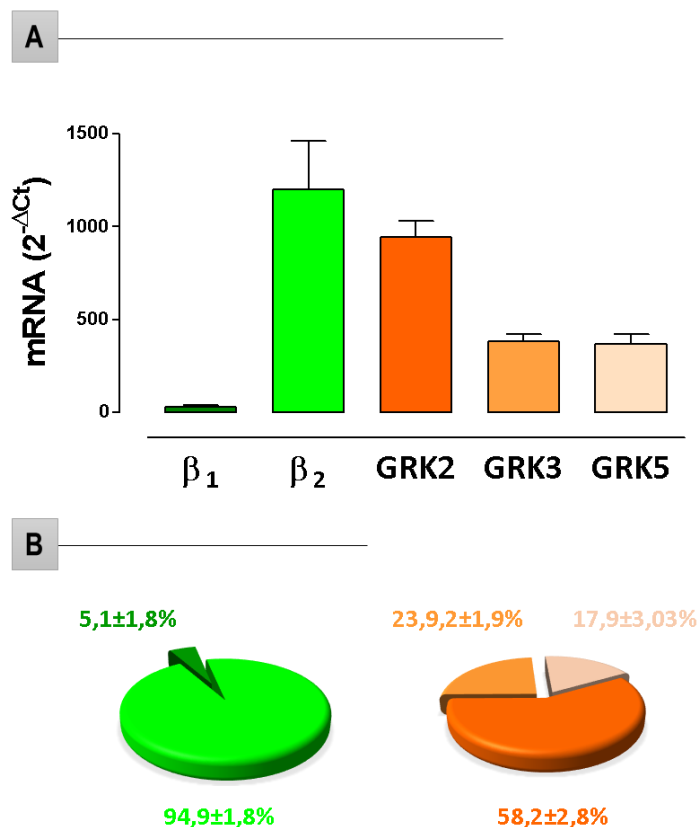


Figura 15. Análisis de la expresión de los diferentes subtipos de AR y GRK en FMLC de sujetos sanos. Valores normalizados utilizando como gen de referencia el GAPDH y expresados como $2^{-\Delta Ct}$ de un $n=21$. A) Gráfico de barras donde se representa la media \pm e.e.m. B) Diagrama de sectores donde se representa la media \pm e.e.m calculando el porcentaje de los niveles de expresión de cada subtipo en cada sujeto.

1.1.2.2. Pacientes con trastornos cardiovasculares

Conocida la expresión de AR y GRK en sujetos sanos, acometeremos el estudio de los posibles cambios de expresión en FMLC de pacientes con trastornos cardiovasculares. En nuestro caso, dividiremos los pacientes en función de su patología en los siguientes grupos: hipertensos (HTA), pacientes con insuficiencia cardiaca (IC) y pacientes sometidos a trasplante cardiaco (TC).

Vemos en la Figura 16A una mayor expresión de los AR- β_1 en FMLC de pacientes con IC acompañado de una disminución del AR- β_2 , esto lleva a cambios significativos en la relación β_1/β_2 como se observa en el diagrama de sectores (Figura 16B).

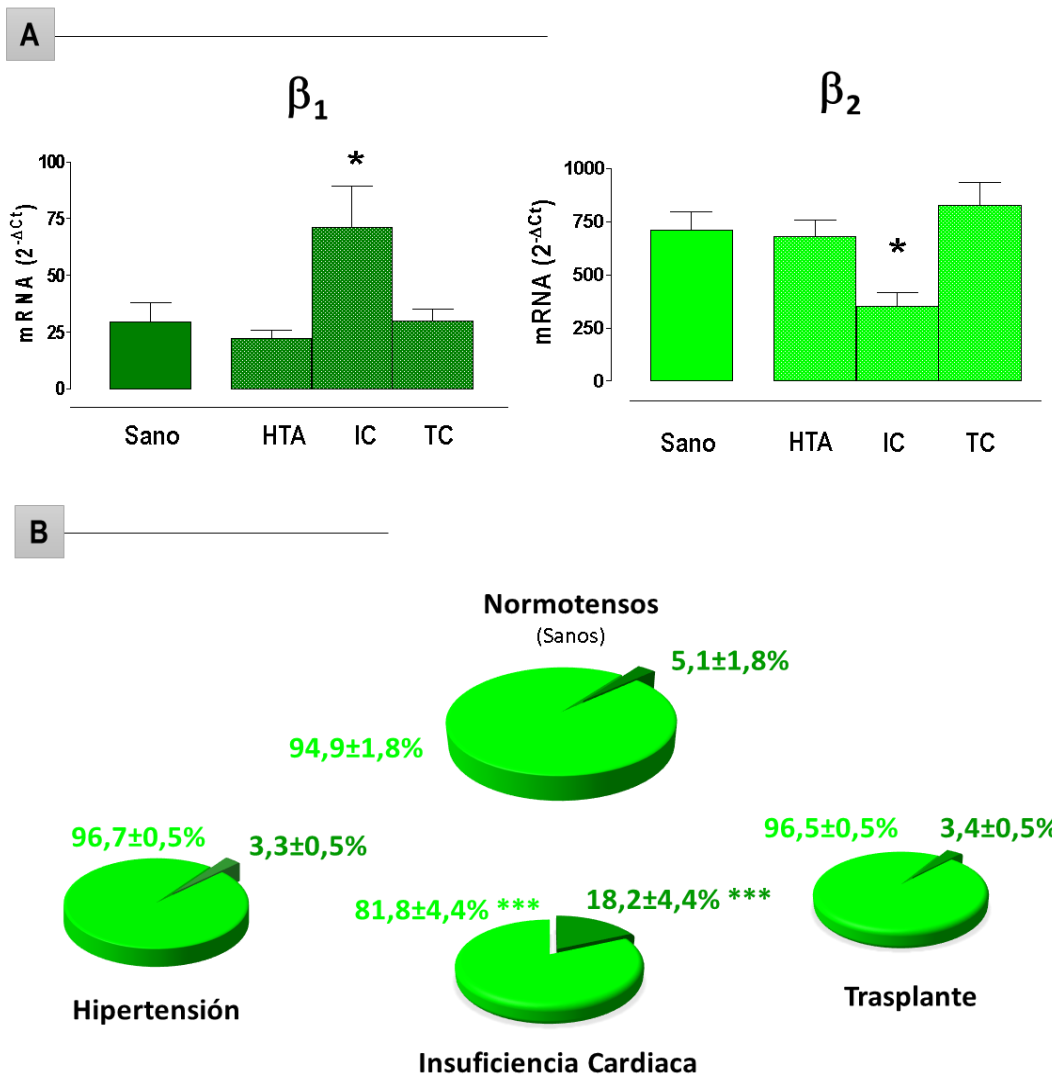


Figura 16. Análisis comparativo de la expresión de los diferentes AR-β en FMLC de sujetos sanos y pacientes con patologías cardiovasculares. Valores normalizados utilizando como gen de referencia el GAPDH y expresados como la media de 2^{-ΔCt} de n=21 en sanos, n=21 en hipertensos (HTA), n=14 en Insuficiencia cardiaca (IC) y n=17 en trasplante cardicaco (TC). A) Gráfico de barras donde se representa la media ± e.e.m. B) Diagrama de sectores donde se representa la media ± e.e.m calculando el porcentaje de los niveles de expresión de cada subtipo en cada paciente. Siendo en ambas representaciones * P < 0,05 vs. Sano, según ANOVA seguido del test de Dunnett.

En el caso de las GRK mostradas en la Figura 17, se observa una reducción significativa de los niveles de ARNm de GRK2 en FMLC procedentes de pacientes que presentan IC y aquellos que fueron sometidos a trasplante cardiaco. A nivel de la GRK3 no se aprecia ningún cambio significativo en ninguno de los grupos. La GRK5, por el contrario, aumenta significativamente en las muestras procedentes de pacientes con IC. Todo esto lleva, como muestra la representación de diagrama de sectores, a una permuta de la GRK mayoritariamente expresada en linfocitos de pacientes con IC, donde la GRK5 pasa a ser la cinasa predominante (Figura 17B)

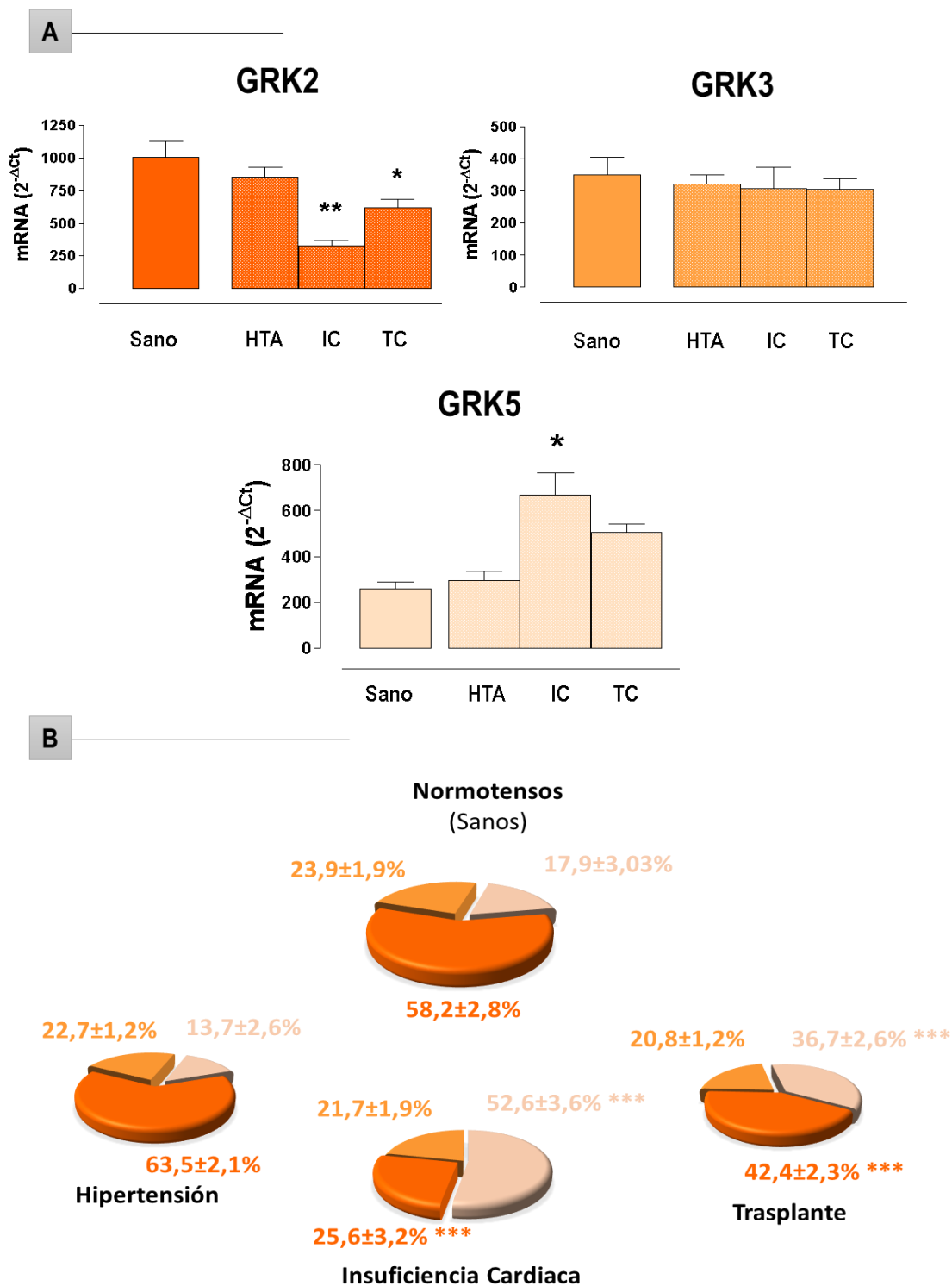


Figura 17. Análisis comparativo de la expresión de las diferentes GRK en FMLC de pacientes sanos y pacientes con patologías cardiovasculares. Valores normalizados utilizando como gen de referencia el GAPDH y expresados como la media de $2^{-\Delta Ct}$ de n=21 en sanos, n=21 en hipertensos (HTA), n=14 en Insuficiencia cardiaca (IC) y n=17 en trasplante cardiaco (TC). A) Gráfico de barras donde se representa la media \pm e.e.m. B) Diagrama de sectores donde se representa la media \pm e.e.m calculando el porcentaje de los niveles de expresión de cada subtipo en cada paciente. Siendo en ambas representaciones * P < 0,05, ** P < 0,01, ***P 0,001 < vs. Sano, según ANOVA seguido del test de Dunnett.

1.2 Modelo animal

Partiendo de dos modelos de hipertensión en rata, se llevaron a cabo los diferentes estudios de expresión del ARNm de los AR y GRK en los tejidos más característicos del sistema cardiovascular:

- a) Ratas Wistar criadas en el animalario de la Facultad de Farmacia de 12 semanas de edad las cuales fueron tratadas durante 4 semanas con el inhibidor de la óxido nítrico sintasa (L-NAME), induciéndoles así hipertensión.
- b) Ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y sus respectivos controles normotensos (WKY) de 16 semanas de edad procedentes de Harlan Interfauna Ibérica.

1.2.1 Expresión de AR y GRK en corazón de rata

Al igual que se abordó en corazón humano, comenzaremos analizando las características de expresión de los AR y GRK en ratas sanas, y conocer así, su distribución en estados de normalidad. Partimos de ratas Wistar adultas de 16 semanas a las cuales extirparemos corazón entero, VI, aorta (Ao) y riñón (Rñ). En la Figura 18 mostramos la expresión de ARNm de los diferentes subtipos de AR y GRK en VI y corazón entero de rata Wistar.

Destacar las diferencias de expresión entre VI de rata y humano en los subtipos de AR- α_1 , apareciendo como mayoritario en el caso de la rata el α_{1B} mientras que en humanos prevalece el α_{1A} . En los AR- β el subtipo mayoritario es el β_1 seguido del β_2 , siendo en VI del 80%/20 al igual que ocurre en VI humano.

En el caso de las cinasas reguladoras es la GRK2 la predominante seguida de la GRK5 siendo en humanos a la inversa, donde prevalece la GRK5 sobre la GRK2.

En lo que se refiere a la distribución total de la expresión en los subtipos β se aprecia que los porcentajes de expresión de β_1 y β_2 se igualan en el conjunto del corazón mientras que cuando estamos analizando el VI prevalece el β_1 , siendo en VI del 80%/20% mientras que en corazón entero del 60%/40% aproximadamente.

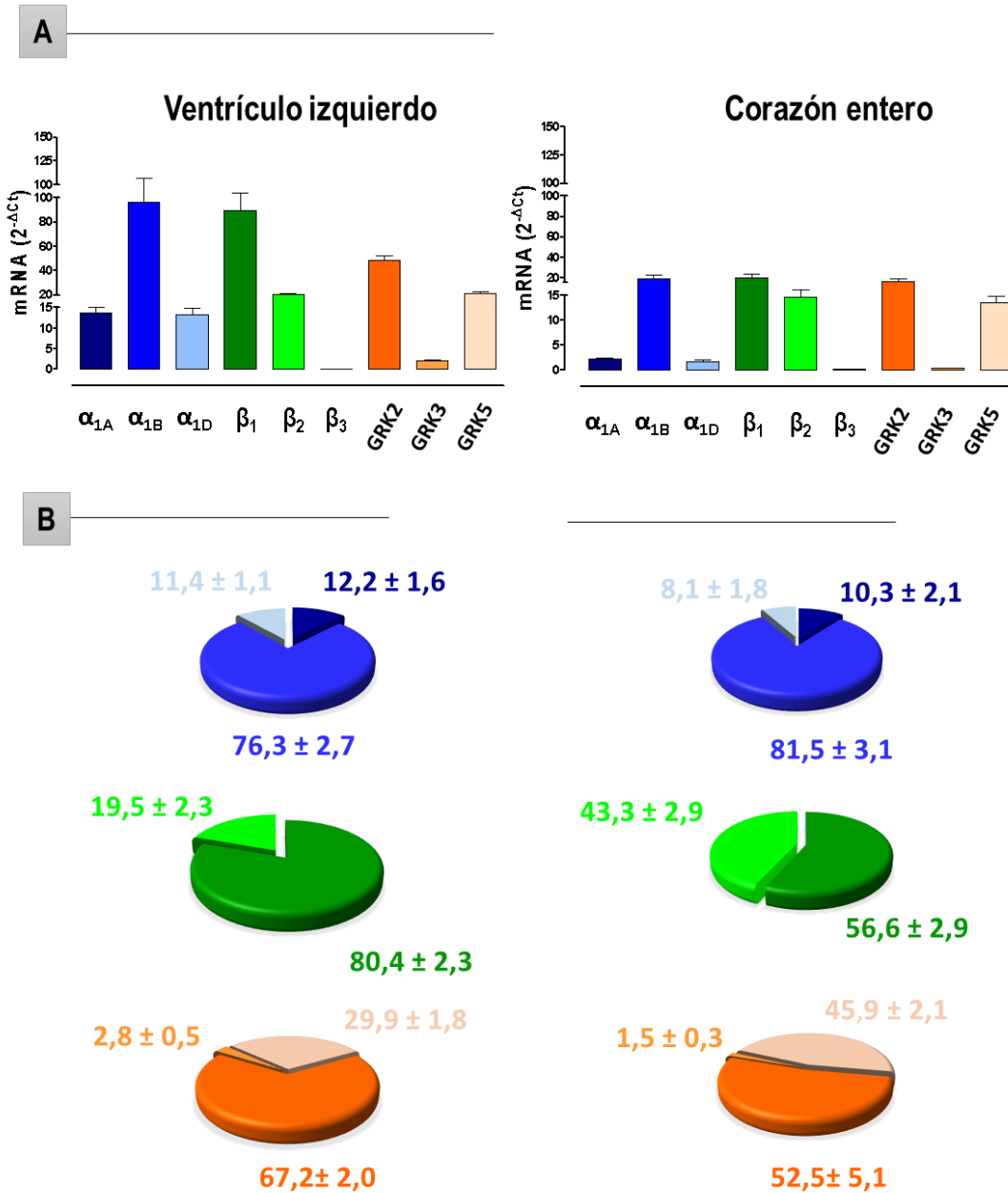


Figura 18. Análisis de la expresión de los diferentes AR y GRK en VI y corazón entero de rata Wistar. Valores normalizados utilizando como gen de referencia el GAPDH y expresados como $2^{-\Delta C_t}$ de un n=5. A) Gráfico de barras donde se representa la media \pm e.e.m. B) Diagrama de sectores donde se representa la media \pm e.e.m calculando el porcentaje de los niveles de expresión de cada subtipo en cada animal.

1.2.2 Obtención de ratas hipertensas por tratamiento con L-NAME y comparación entre modelos animales de hipertensión

A partir de ratas Wistar adultas de 12 semanas estas fueron tratadas con L-NAME durante 4 semanas y se realizó su control semanal de ingesta tanto sólida como líquida, así como también se controló semanalmente su presión arterial. El día del sacrificio se evalúan las constantes hemodinámicas de los diferentes grupos, se pesan los animales y corazón tras su extracción para calcular la razón peso corazón/peso corporal. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 15.

● ● ● **Tabla 15**

Constantes hemodinámicas en ratas SHR y tratadas con L-NAME y sus respectivos controles

	<u>WKY</u>	<u>SHR</u>	<u>Wistar</u>	<u>L-NAME</u>
Numero de animales (n)	8	15	5	5
PAS (mmHg)	140 ± 2	197 ± 4***	115,1 ± 1,6	193,3 ± 1,7***
FC (latidos/minuto)	311 ± 10	374 ± 7 ***	376 ± 12	373 ± 11
Peso (g)	246 ± 9	318 ± 6 ***	382,3 ± 4,5	309 ± 19 **
Ratio corazón/rata (mg/g)	3,3 ± 0,1	3,9 ± 0,1***	2,5 ± 3	3,5 ± 3*

*PAS indica presión arterial sistólica, FC indica frecuencia cardíaca. Los valores son expresados como la media ± e.e.m. Siendo *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 vs respectivo control WKY o Wistar, según test t de Student.*

Como observamos, tanto el grupo de ratas SHR como las tratadas con L-NAME mostraron niveles de presión arterial significativamente elevados previos al sacrificio respecto a sus controles, WKY y Wistar. En el grupo de ratas SHR también se observó un aumento significativo de la frecuencia cardíaca no siendo así en las ratas tratadas con L-NAME. En lo que respecta al peso del animal, mientras que las ratas SHR apareció un peso significativo mayor, a nivel de las L-NAME fueron sus controles las que mostraron este aumento de peso significativo. Destacar el ratio peso del corazón/peso corporal, donde tanto en SHR como en L-NAME mostró un aumento significativo lo que indica hipertrofia cardíaca acompañando a la hipertensión.

1.2.3 Corazón procedente de Ratas Hipertensas

Tal como se observa en la Figura 19, a nivel de los AR- α_1 se aprecian cambios significativos en la expresión del subtipo α_{1D} , que disminuye en aquellos animales que sufren hipertensión, no mostrándose ningún cambio destacable en los demás casos.

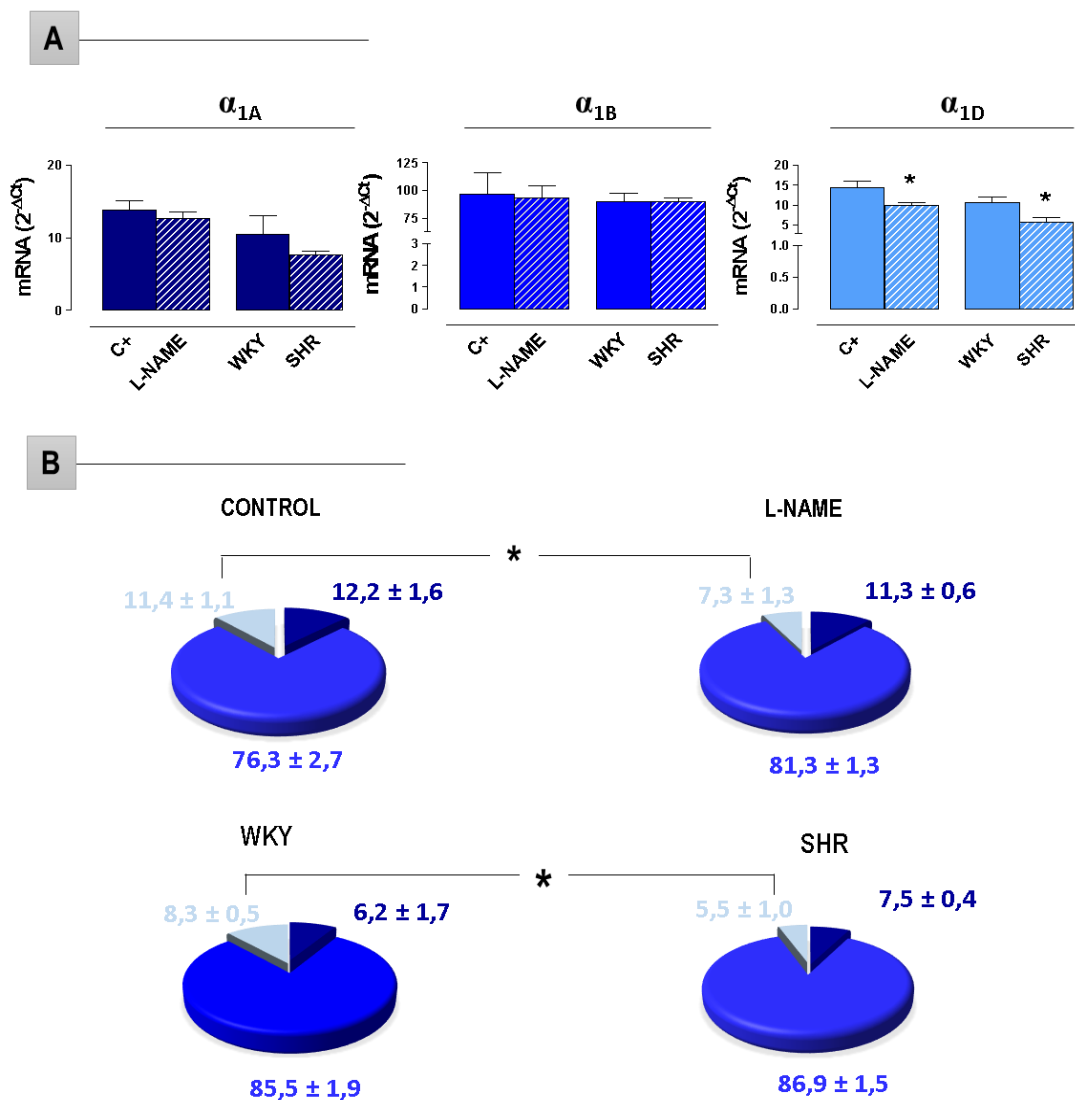


Figura 19. Análisis de la expresión de los AR- α_1 en VI de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y sus controles (WKY) y de ratas hipertensas por tratamiento con L-NAME y sus controles. Valores normalizados utilizando como gen de referencia el GAPDH y expresados como $2^{-\Delta C_t}$ de n=3-5 animales. A) Gráfico de barras donde se representa la media \pm e.e.m. B) Diagrama de sectores donde se representa la media \pm e.e.m calculando el porcentaje de los niveles de expresión de cada subtipo en cada animal. Siendo en ambas representaciones * P < 0,05 vs. Normotenso, según el test t de Student.

Respecto a los AR- β , la Figura 20 nos muestra cambios destacables entre cepas, como es el caso del subtipo β_1 el cual, en aquellas ratas a las que se le indujo la hipertensión mediante tratamiento con L-NAME, apareció un aumento significativo de su expresión, no siendo así en SHR donde no surgieron cambios relevantes. En el caso del subtipo β_2 , el aumento estadísticamente significativo a nivel de VI aparece también en ratas hipertensas tratadas con L-NAME, pero no se observan cambios en las ratas SHR. El subtipo β_3 no se muestra en la figura a causa de su baja expresión y por ausencia de cambios significativos.

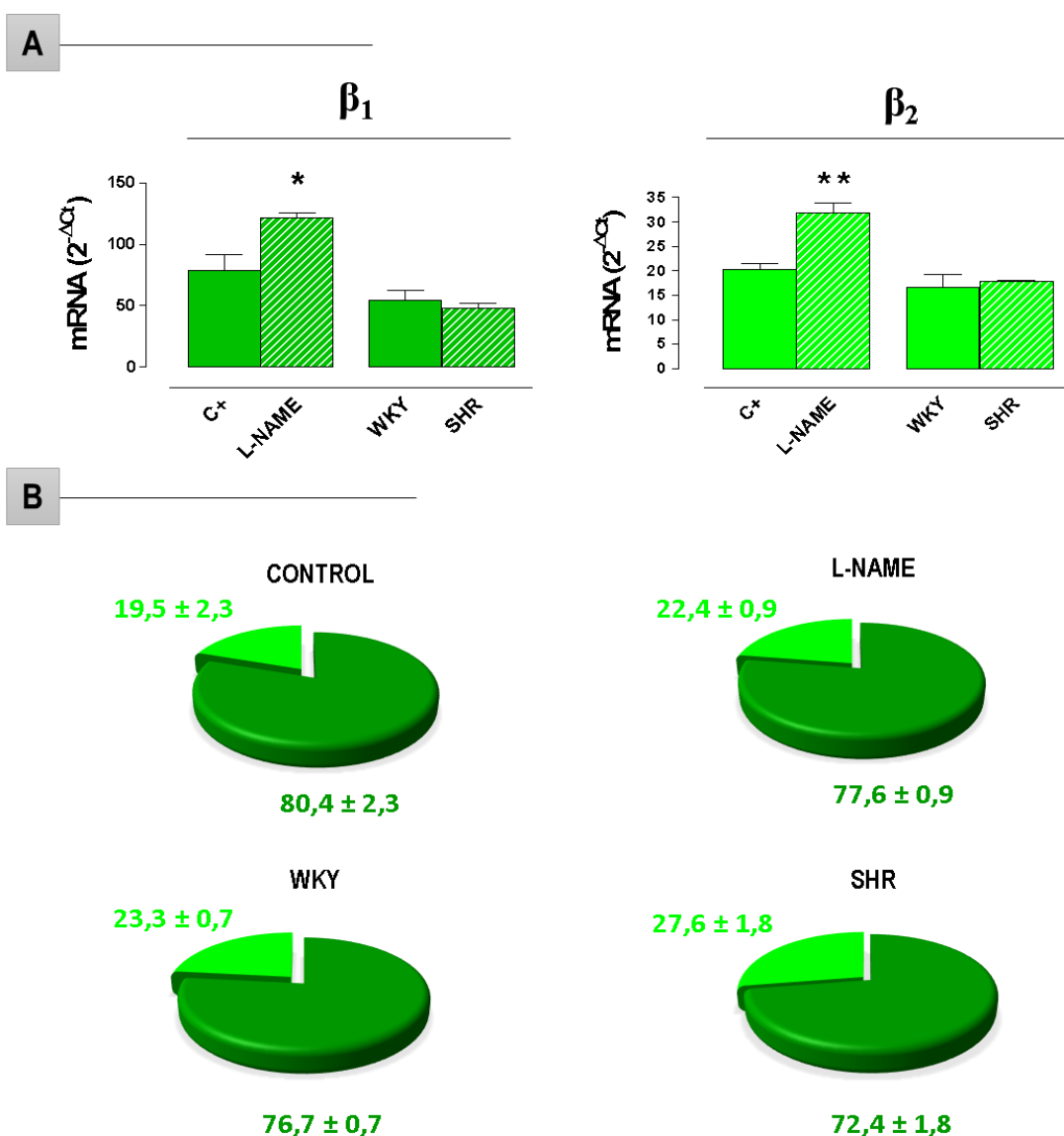


Figura 20. Análisis de la expresión de los AR- β en VI de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y sus controles (WKY) y de ratas hipertensas por tratamiento con L-NAME y sus controles. Valores normalizados utilizando como gen de referencia el GAPDH y expresados como $2^{-\Delta C_t}$ de n=3-5 animales. A) Gráfico de barras donde se representa la media \pm e.e.m. B) Diagrama de sectores donde se representa la media \pm e.e.m calculando el porcentaje de los niveles de expresión de cada subtipo en cada animal. Siendo en ambas representaciones * P < 0,05, ** P < 0,01 vs. Normotenso, según el test t de Student.

En las ratas en las que se indujo la hipertensión mediante tratamiento con L-NAME, aparece un aumento significativo en la expresión de la GRK2 mientras que en las SHR es la GRK5 la que aumenta significativamente (Figura 21). En el caso de la GRK3 no aparecen cambios significativos.

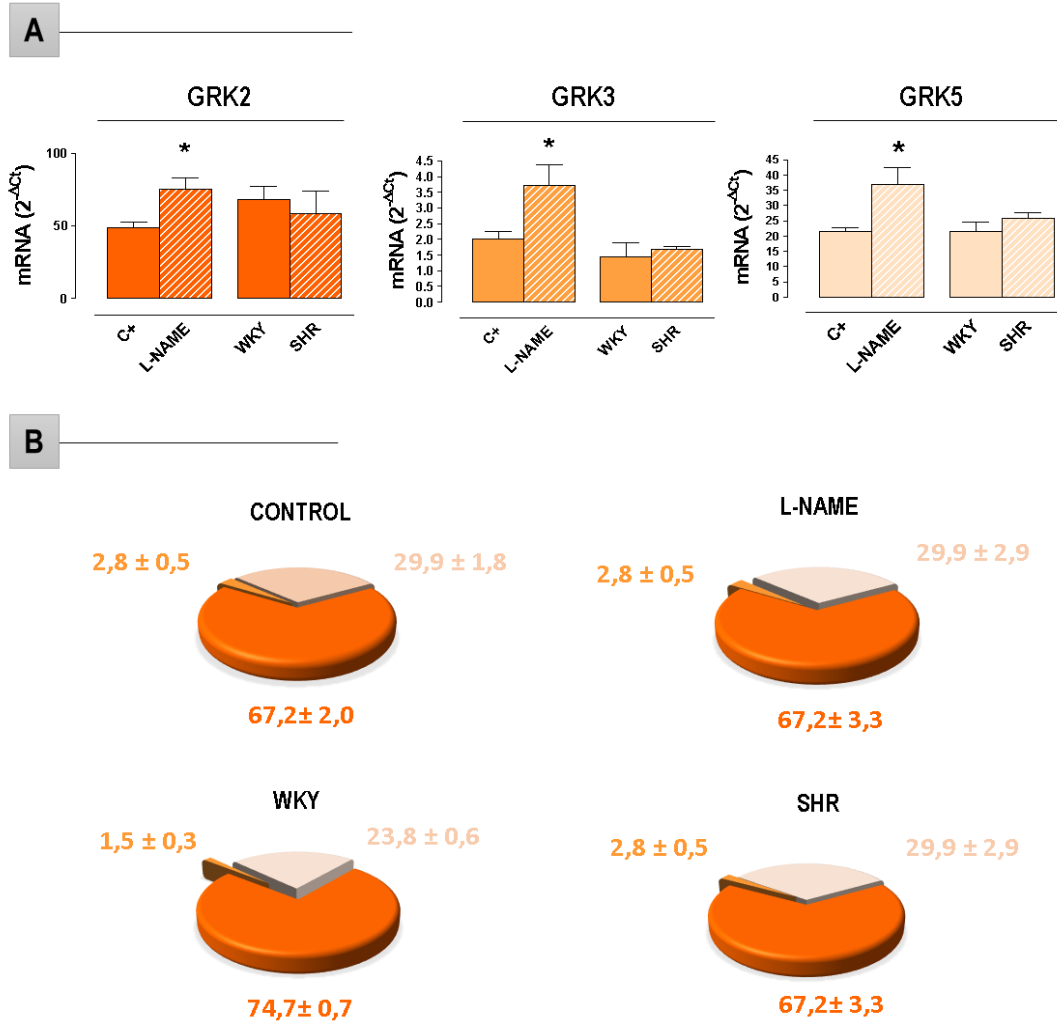


Figura 21. Análisis de la expresión de las GRK en VI de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y sus controles (WKY) y de ratas hipertensas por tratamiento con L-NAME y sus controles. Valores normalizados utilizando como gen de referencia el GAPDH y expresados como 2^{-ΔCt} de n=3-5 animales. A) Gráfico de barras donde se representa la media ± e.e.m. B) Diagrama de sectores donde se representa la media ± e.e.m calculando el porcentaje de los niveles de expresión de cada subtipo en cada animal. Siendo en ambas representaciones * P < 0,05 vs. Normotenso, según el test t de Student.

1.2.4 Riñón procedente de Ratas Hipertensas

Analizamos la expresión de AR y GRK en riñón, órgano fundamental en la regulación de la presión arterial.

A nivel de los AR- α_1 , destacar como subtipo mayoritario el α_{1B} . Aparece un aumento significativo en ratas tratadas con L-NAME en los subtipos α_{1B} y α_{1D} (Figura 22).

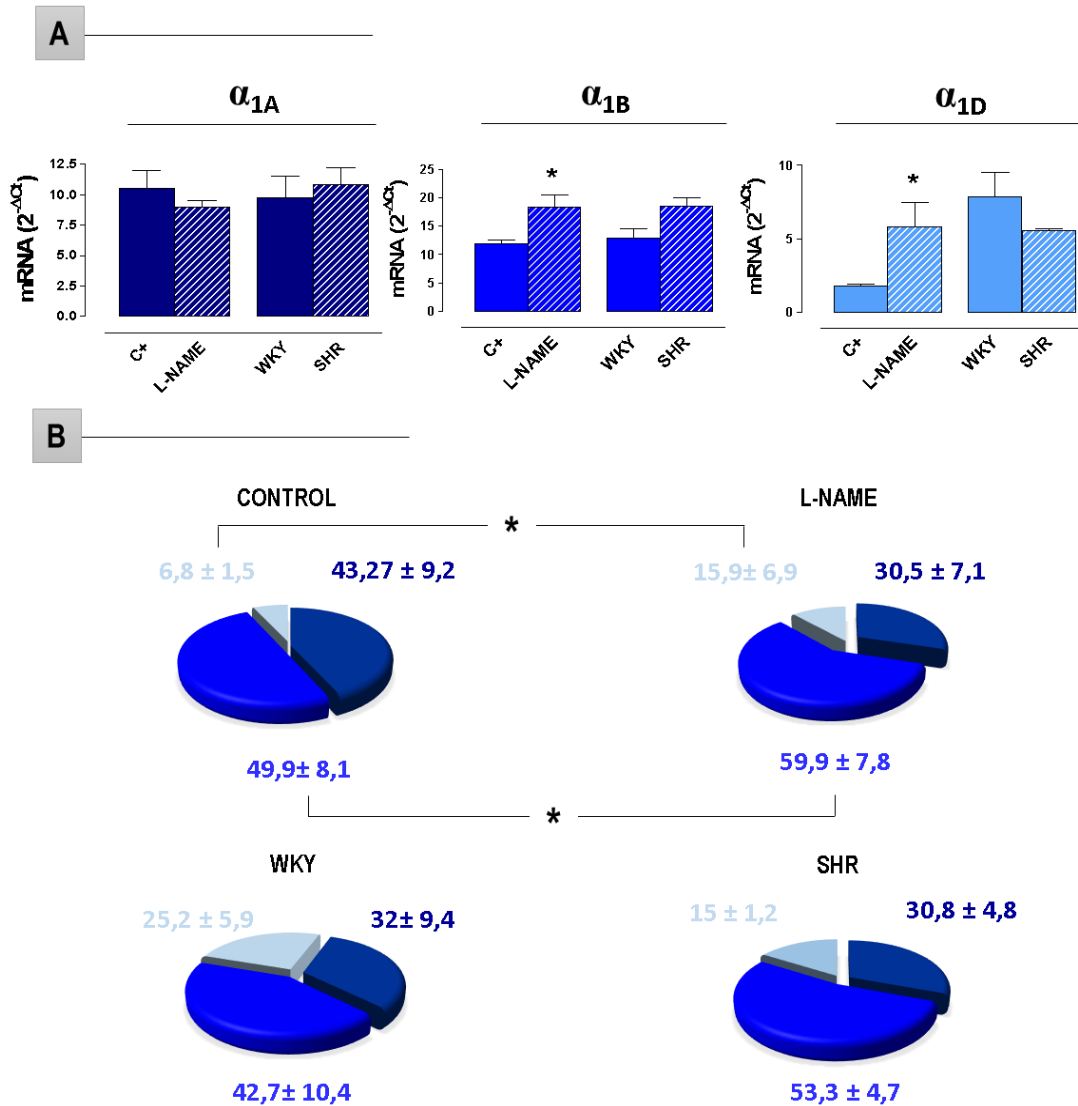


Figura 22. Análisis de la expresión de los AR - α_1 en Riñón de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y sus controles (WKY) y de ratas hipertensas por tratamiento con L-NAME y sus controles. Valores normalizados utilizando como gen de referencia el GAPDH y expresados como $2^{-\Delta Ct}$ de n=3-5 animales. A) Gráfico de barras donde se representa la media \pm e.e.m. B) Diagrama de sectores donde se representa la media \pm e.e.m calculando el porcentaje de los niveles de expresión de cada subtipo en cada animal. Siendo en ambas representaciones * $P < 0,05$ vs. Normotenso, según el test t de Student.

A nivel de los AR- β (Figura 23), el subtipo predominante es el β_1 . En el caso de las ratas tratadas con L-NAME se observó un aumento significativo de β_1 y β_2 frente a los controles que no recibieron el tratamiento.

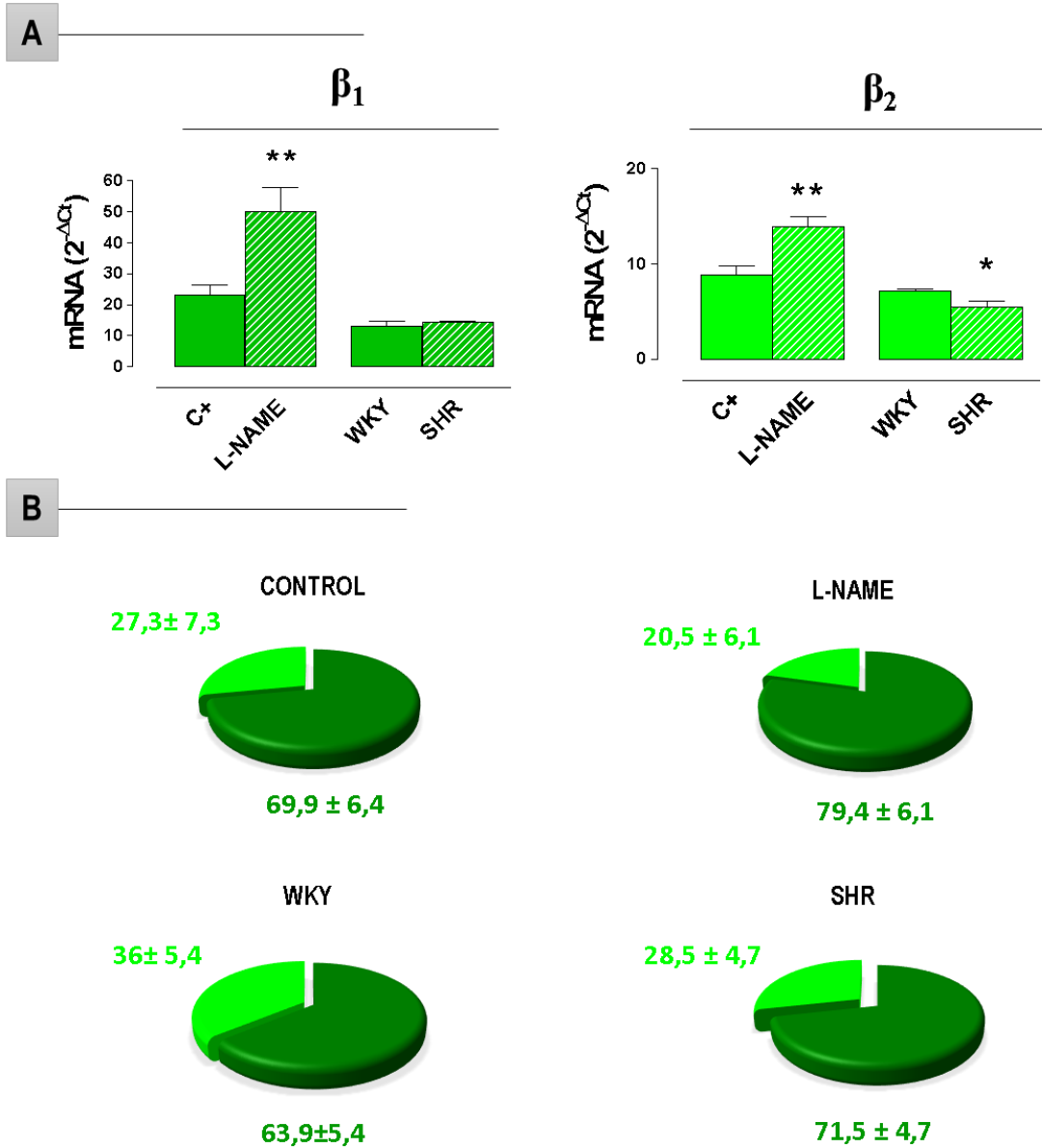


Figura 23. Análisis de la expresión de los AR- β en Riñón de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y sus controles (WKY) y de ratas hipertensas por tratamiento con L-NAME y sus controles. Valores normalizados utilizando como gen de referencia el GAPDH y expresados como $2^{-\Delta Ct}$ de n=3-5 animales. A) Gráfico de barras donde se representa la media \pm e.e.m. B) Diagrama de sectores donde se representa la media \pm e.e.m calculando el porcentaje de los niveles de expresión de cada subtipo en cada animal. Siendo en ambas representaciones * P < 0,05, ** P < 0,01 vs. Normotenso, según el test t de Student.

En las GRK (Figura 24), la isoforma predominante fue la GRK2, siendo en la cepa de rata Wistar más representativa (73,4 % del total) que en las WKY (45,6 % del total). La hipertensión provocada por el tratamiento con L-NAME produjo un aumento significativo de GRK2 y GRK3 mientras que en las ratas SHR se observó una disminución significativa de la GRK2.

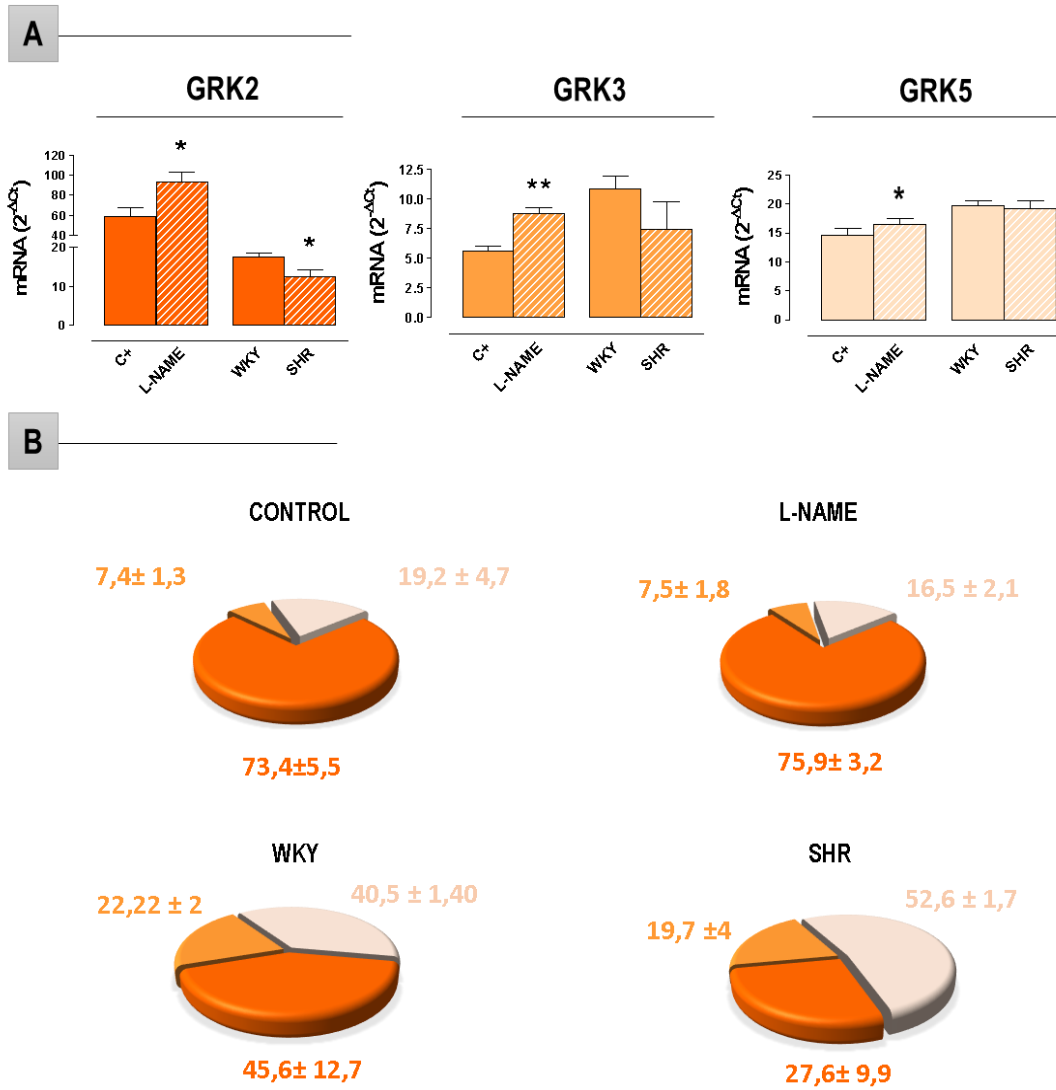


Figura 24. Análisis de la expresión de las GRK en Riñón de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y sus controles (WKY) y de ratas hipertensas por tratamiento con L-NAME y sus controles. Valores normalizados utilizando como gen de referencia el GAPDH y expresados como $2^{-\Delta C_t}$ de n=3-5 animales. A) Gráfico de barras donde se representa la media \pm e.e.m. B) Diagrama de sectores donde se representa la media \pm e.e.m calculando el porcentaje de los niveles de expresión de cada subtipo en cada animal. Siendo en ambas representaciones * P < 0,05, ** P < 0,01 vs. Normotenso, según el test t de Student.

2.- Cambios en la expresión de AR y GRK inducidos por los tratamientos de elección en la IC.

Dentro del tratamiento de elección en la IC cabe destacar dos importantes grupos de fármacos como son los β -bloqueantes y los IECA, ambos prioritarios en la mayoría de procedimientos frente a la IC. Para determinar la influencia del tratamiento en la expresión de AR y GRK, agruparemos a los pacientes en función de que reciban o no cada uno de estos tratamientos.

En la Tabla 16 se muestran los fármacos más relevantes en el tratamiento de la IC avanzada administrados a los 42 pacientes incluidos en el estudio.

● ● ● **Tabla 16**

Tratamiento de la Insuficiencia Cardíaca

<u>Farmacológico</u>	n	(%)
Carvedilol	17	32,1
IECA	29	54,7
Espironolactona	31	58,5
Digoxina	18	34,0
Dobutamina	19	35,1
Noradrenalina	13	24
<u>No farmacológico</u>		
Desfibrilador automático implantable	11	20,8
Resincronización o Marcapasos biventricular	7	13,2

Distribución de las diferentes tratamientos para un total de 42 pacientes con IC

Acompañando al estudio en humanos, trabajaremos también con ratas tratadas con carvedilol y captopril. Para completar este análisis, en algunos casos administraremos carvedilol *ex vivo* y en cultivos celulares *in vitro*.

2.1 Carvedilol

2.1.1 Modelo humano

En el grupo de pacientes con IC, se formaron dos subgrupos en función de que reciban o no tratamiento con carvedilol.

En el grupo de pacientes tratados con carvedilol observamos disminución en los niveles de NT-proBNP, péptido utilizado en el diagnóstico de la IC como indicador del aumento de estrés en la pared miocárdica (Figura 25).

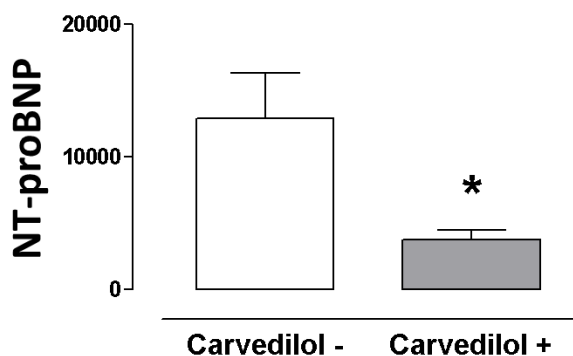


Figura 25. Análisis de los niveles de pro péptido natriurético tipo B aminoterminal (NT-proBNP) en pacientes tratados con o sin carvedilol. Los valores cuantificados representan la media ± e.e.m de n=10-12. Siendo * P < 0,05, según el test t de Student.

Como se observa en la Figura 26, el tratamiento con carvedilol produjo cambios significativos a nivel del AR-β₁ y de las diferentes GRK en VI.

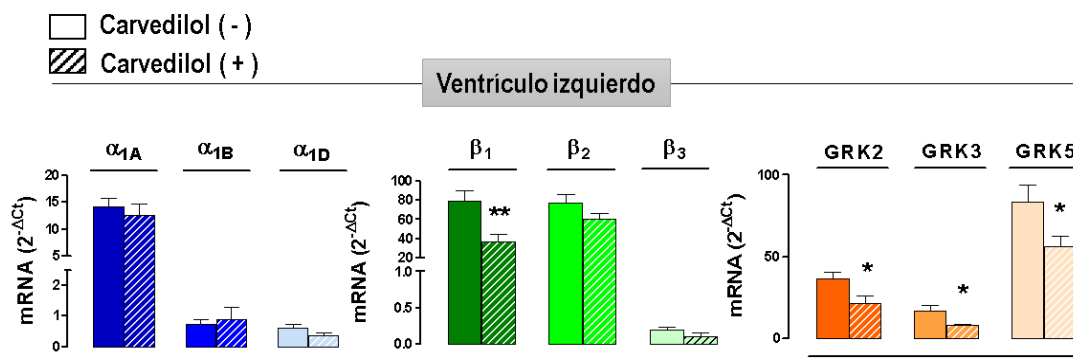


Figura 26. Análisis de la expresión de AR y GRK en VI de pacientes con IC según tratamiento con o sin carvedilol. Valores normalizados utilizando como gen de referencia el GAPDH y expresados como 2^{-ΔCt} para un n=18 en pacientes sin tratamiento con carvedilol y n=17 en pacientes tratados con carvedilol. Los valores cuantificados representan la media ± e.e.m. Siendo * P < 0,05, ** P < 0,01 vs. No tratados según el test t de Student.

En el caso de los linfocitos procedentes de esos mismos pacientes no se aprecia ningún cambio entre los pacientes tratados o no con carvedilol, en los niveles de expresión de los AR y GRK estudiados (Figura 27)

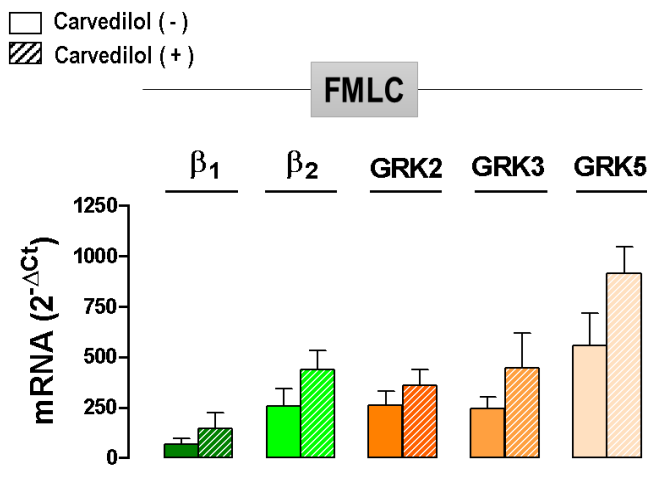


Figura 27. Análisis de la expresión de AR y GRK en linfocitos de pacientes con IC según tratamiento con o sin carvedilol. Valores normalizados utilizando como gen de referencia el GAPDH y expresados como 2^{-ΔCt} para un n=7 en pacientes sin tratamiento con carvedilol y n=5 en pacientes tratados con carvedilol. Los valores cuantificados representan la media ± e.e.m.

2.1.2. Modelo animal

Se realizaron estudios *in vivo* donde se trataron ratas Wistar de 12 semanas de edad con carvedilol (20 mg/kg/día) durante 4 semanas en agua de bebida y estudios *ex vivo* con corazón aislado tratado con el β-bloqueante (10⁻⁶ M) durante 180 minutos.

Se observó en las ratas tratadas con carvedilol *in vivo* una disminución significativa en todos los subtipos de AR-α₁ y en el subtipo β₁ a nivel de VI (Figura 28) no siendo así en Ao (Figura 29). En el caso de las cinasas reguladoras fueron las dos principales, tanto la GRK2 como la GRK5, las que sufrieron disminución significativa tras tratamiento con el β-bloqueante tanto a nivel de VI como de Ao.

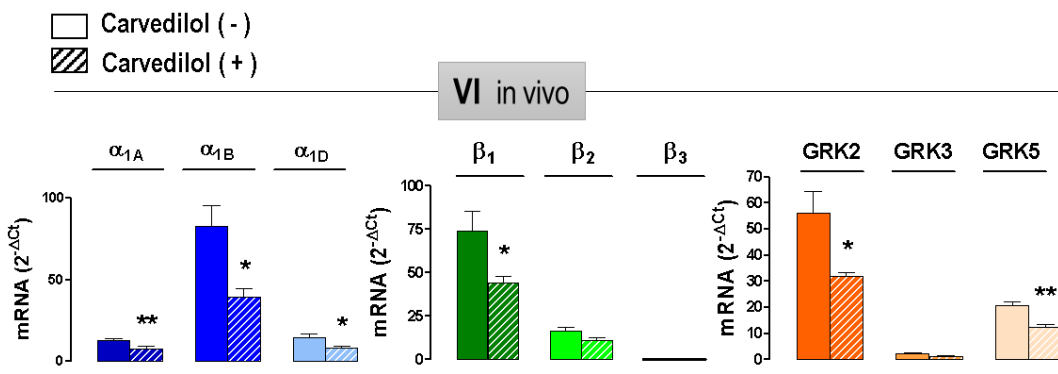


Figura 28. Análisis de la expresión de AR y GRK en VI de rata Wistar tratada o no tratada con carvedilol. Valores normalizados utilizando como gen de referencia el GAPDH y expresados como 2^{-ΔCt} (n=4). Los valores cuantificados representan la media ± e.e.m. Siendo * P < 0,05, ** P < 0,01 vs No tratadas según el test t de Student.

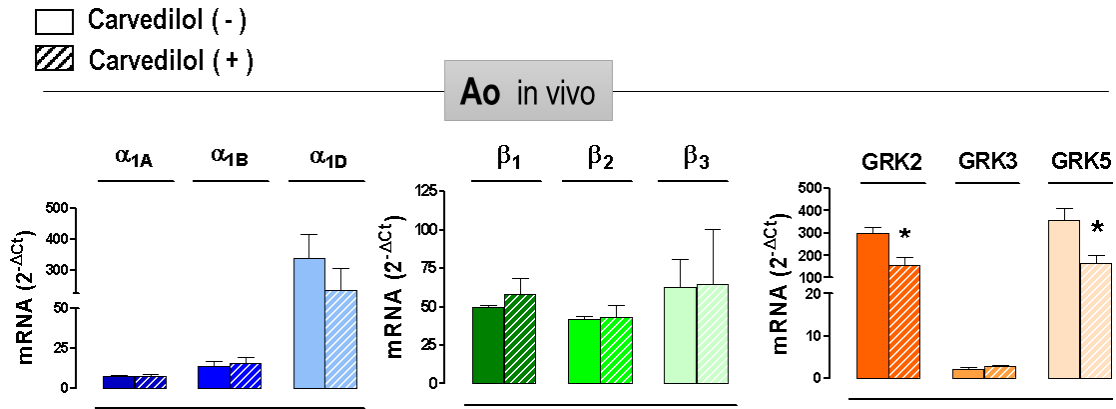


Figura 29. Análisis de la expresión de AR y GRK en Ao de rata Wistar tratada o no tratada con carvedilol. Valores normalizados utilizando como gen de referencia el GAPDH y expresados como 2^{-ΔCt} (n=4). Los valores cuantificados representan la media ± e.e.m. Siendo * P < 0,05 vs No tratadas según el test t de Student.

En el caso de los VI tratados con carvedilol *ex vivo* (Figura 30) no aparecen cambios significativos en ningún caso.

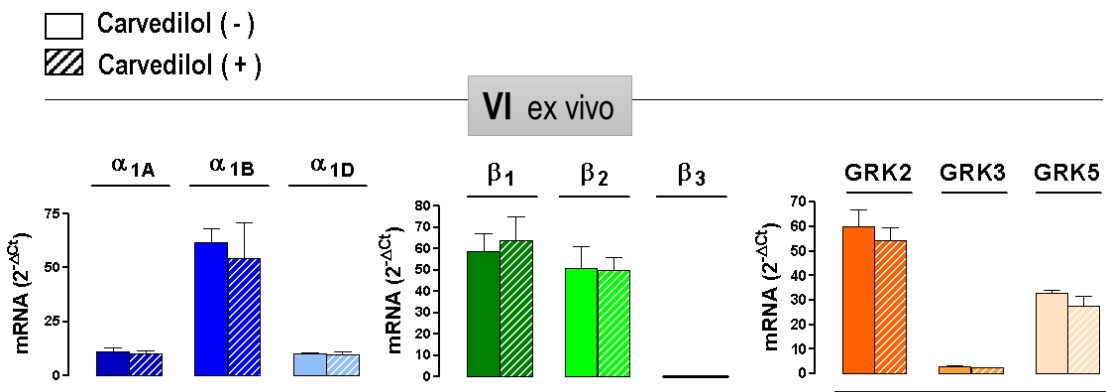


Figura 30. Análisis de la expresión de AR y GRK en VI de rata Wistar tratada *ex vivo* con carvedilol. Valores normalizados utilizando como gen de referencia el GAPDH y expresados como 2^{-ΔCt} (n=4). Los valores cuantificados representan la media ± e.e.m.

2.1.3.- Expresión génica de AR y GRK en células HEK 293 tratadas con carvedilol.

A partir de la línea células HEK 293, tras confluencia del 70-75 %, fueron estabilizadas durante 8-12 horas mediante exclusión del suplemento SBF. A continuación, se añadió al medio carvedilol (10^{-6} M) durante 48 h. Pasado este tiempo, se recogieron las células y se llevó a cabo el protocolo de extracción del ARN.

Tal como se observa en la Figura 31, no aparecen cambios en la expresión de AR y GRK en las células HEK 293 tratadas con carvedilol.

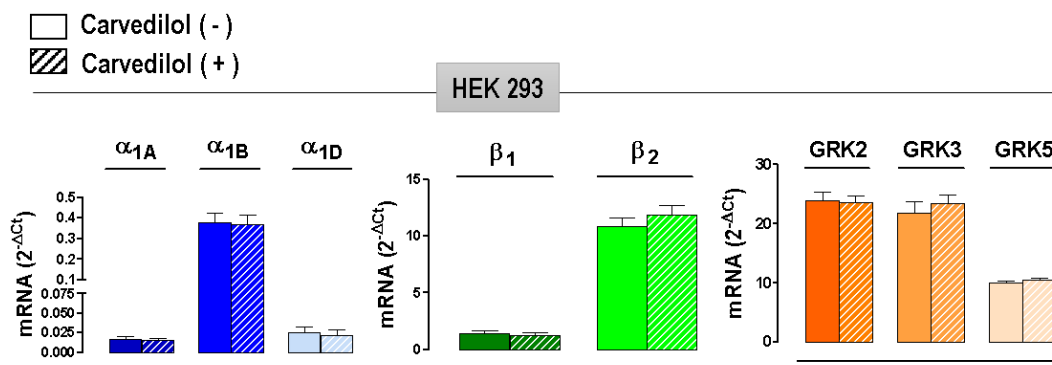


Figura 31. Análisis de la expresión de AR y GRK en células HEK 293 tratadas o no con 10^{-6} M carvedilol durante 48h. Valores normalizados utilizando como gen de referencia el GAPDH y expresados como $2^{-\Delta Ct}$ (n=4). Los valores cuantificados representan la media \pm e.e.m.

2.2 Captopril

2.2.1 Modelo Humano

En muestras procedentes de corazón insuficiente de pacientes tratados con captopril, no se observó ninguna diferencia significativa en la expresión de los AR y GRK, tal y como muestra la Figura 32.

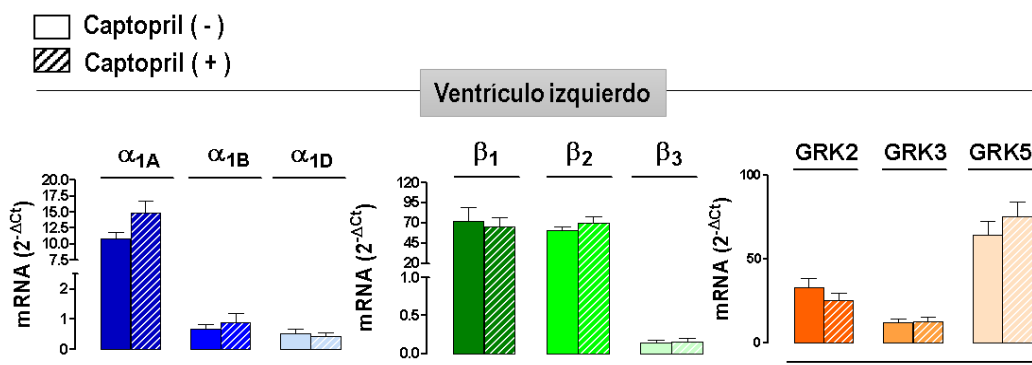


Figura 32. Análisis de la expresión de AR y GRK en corazón de pacientes con IC según tratamiento con o sin captopril. Valores normalizados utilizando como gen de referencia el GAPDH y expresados como $2^{-\Delta Ct}$ para un n=10 de VI en pacientes no tratados con captopril y n=25 de VI en pacientes tratados con captopril. Los valores cuantificados representan la media \pm e.e. m.

En el caso de los linfocitos procedentes de pacientes con IC tratados con captopril, tampoco se aprecia ningún cambio en los niveles de expresión de los AR y GRK estudiados (Figura 33).

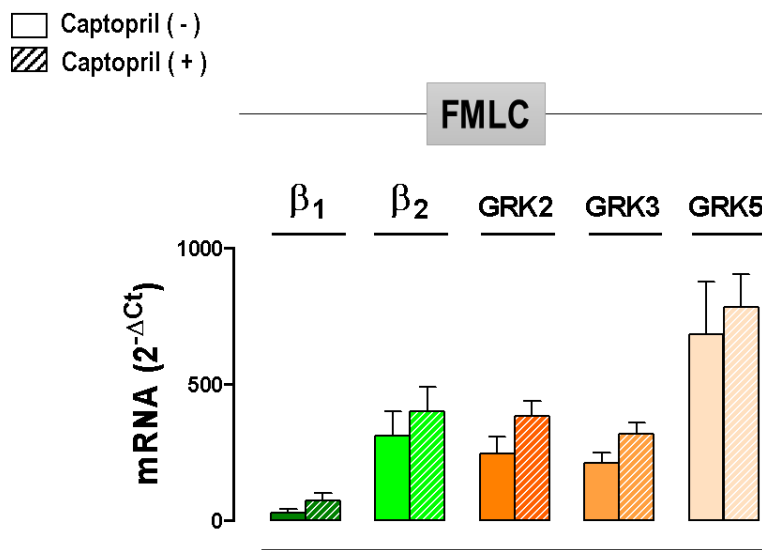


Figura 33. Análisis de la expresión de AR y GRK en linfocitos de pacientes con IC tratados con o sin captopril. Valores normalizados utilizando como gen de referencia el GAPDH y expresados como $2^{-\Delta C_t}$ para un n=6 en pacientes no tratados con captopril y n=8 tratados con captopril. Los valores cuantificados representan la media \pm e.e.m.

Lo mismo ocurre cuando estudiamos la expresión de AR y GRK en linfocitos procedentes de pacientes con HTA donde no se observó ningún cambio de expresión en pacientes tratados con IECA frente a los hipertensos sin tratar (Figura 34)

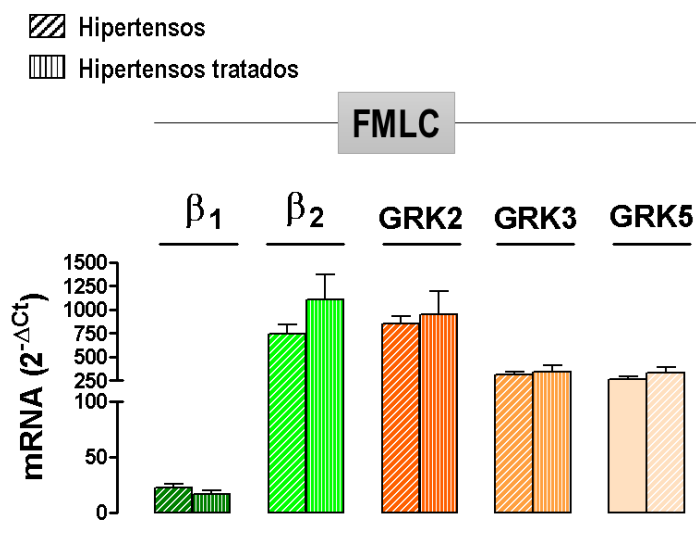


Figura 34. Análisis de la expresión de AR y GRK en linfocitos de pacientes hipertensos tratados o no tratados con IECAs. Valores normalizados utilizando como gen de referencia el GAPDH y expresados como $2^{-\Delta C_t}$ para un n=15 pacientes hipertensos y n=10 en pacientes hipertensos tratados. Los valores cuantificados representan la media \pm e.e.m.

2.2.2 Modelo animal

En ratas Wistar tratadas con captopril (50mg/kg/día) en el agua de bebida durante 4 semanas, se observó a nivel del VI una disminución significativa del subtipo AR- α_{1A} , no siendo relevantes los cambios observados en los otros subtipos ni en VI ni en Ao. Sin embargo en el caso de las cinasas GRK2 y GRK5 tanto en VI como en Ao se observó una disminución significativa en las ratas tratadas con captopril (Figuras 35 y 36).

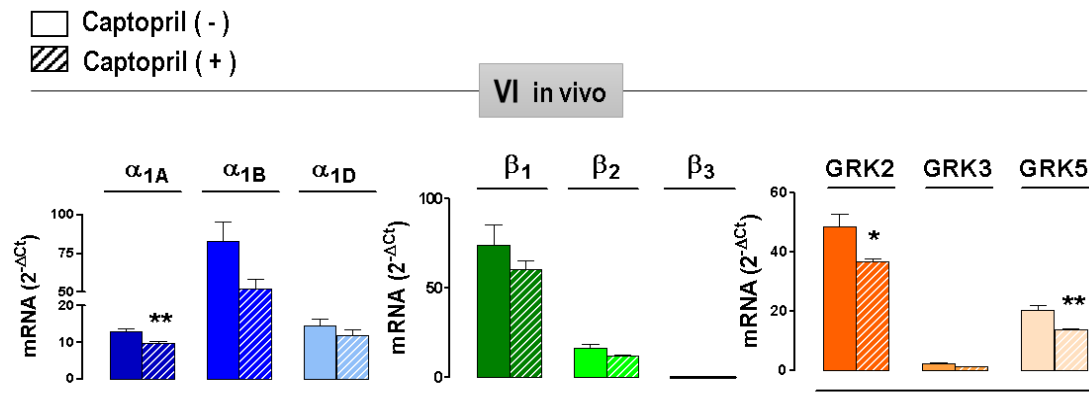


Figura 35. Análisis de la expresión de AR y GRK en VI de rata Wistar tratada con captopril. Valores normalizados utilizando como gen de referencia el GAPDH y expresados como $2^{-\Delta Ct}$ (n=4-5). Los valores cuantificados representan la media \pm e.e.m. Siendo * P < 0,05, ** P < 0,01, vs No tratadas según el test t de Student.

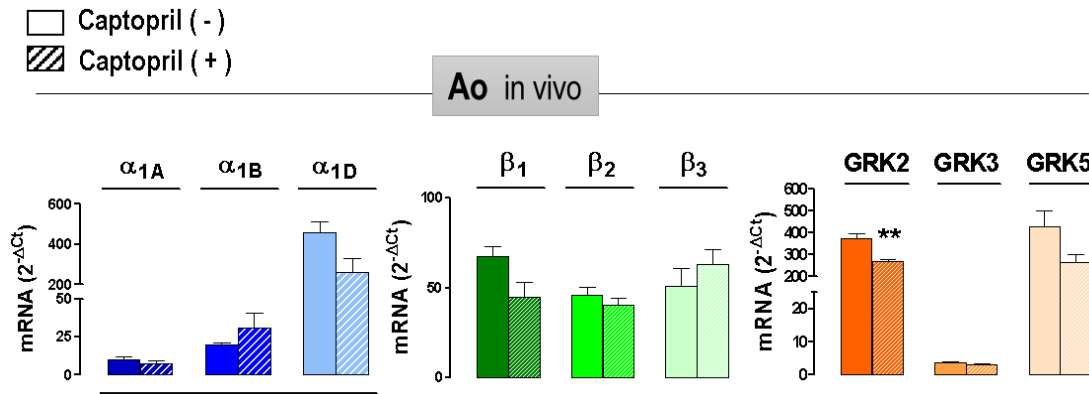


Figura 36. Análisis de la expresión de AR y GRK en Ao de rata Wistar tratada con captopril. Valores normalizados utilizando como gen de referencia el GAPDH y expresados como $2^{-\Delta Ct}$ (n=4-5). Los valores cuantificados representan la media \pm e.e.m. Siendo ** P < 0,01 vs. No tratadas según el test t de Student.

3.- Correlación entre la expresión de los AR y GRK de VI de corazón insuficiente y variables clínicas.

Conjuntamente con cada muestra proporcionada disponemos de la base de datos de las diferentes variables clínicas obtenidas del historial de cada paciente examinado a nivel hospitalario. Las principales variables clínicas (hemodinámicas y eco-cardiográficas) analizadas se presentan en la Tabla 17.

● ● ● **Tabla 17**
Variables Clínicas

Eco-cardiográficas	Media ± e.e.m
Diámetro tele-Diastólico del VI., DTDVI (mm)	67,5 ± 1,8
Diámetro tele-Sistólico del VI., DTSVI (mm)	57,9 ± 2,1
Fracción de eyección del VI., FEVI (%)	19,1 ± 1,2
Diámetro de la Aurícula izquierda (mm)	48,4 ± 1,3
Hemodinámicas	Media ± e.e.m
Gasto cardiaco, GC (l/min)	3,6 ± 0,2
Presión capilar pulmonar, PCP (mmHg)	28,3 ± 1,3
Resistencia vascular pulmonar, RVP (U. Wood)	2,8 ± 0,2
Presión media pulmonar, PMP (mmHg)	37,3 ± 1,7
Bioquímicas	Media ± e.e.m
Bilirrubina (mg/dl)	1,3 ± 0,1
GOT (U/l)	46,7 ± 9,9
GPT (U/l)	56,1 ± 15,5
NT-proBNP (pg/ml [P25-P75])	9025,9 ± 1933,4

Valores expresados como la media ± e.e.m de n=42 pacientes con Insuficiencia Cardiaca

Siguiendo el orden de las variables clínicas eco-cardiográficas y hemodinámicas mostradas en la Tabla 17, realizamos estudios de correlación mediante el test de regresión lineal de Pearson frente a los niveles de expresión de ARNm de AR y GRK en VI de corazón insuficiente, para conocer así, si existe una relación entre ambos.

• Fracción de eyección del VI

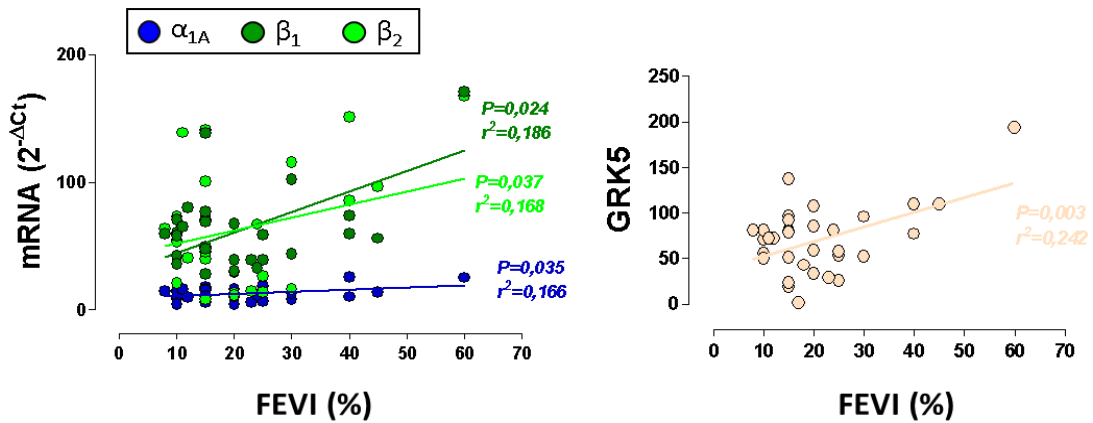


Figura 37. Regresión lineal entre FEVI y los niveles de expresión de ARNm de los diferentes subtipos de AR y GRK en VI. La línea continua representa correlación significativa.

• Gasto cardiaco

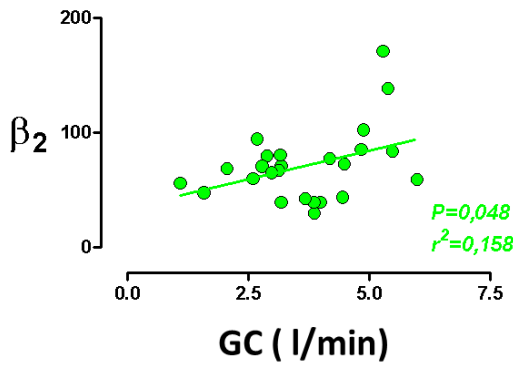


Figura 38. Regresión lineal del Gasto Cardiaco frente nivel de expresión de ARNm de AR-β₂ en VI. La línea continua representa correlación significativa.

• Volumen tesi-sistólico y tele-diastólico del VI

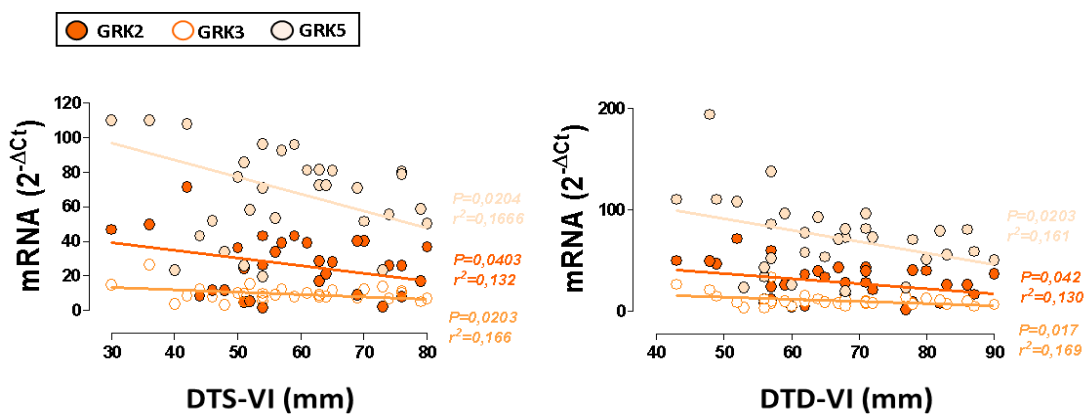


Figura 39. Regresión lineal entre el diámetro tele-Sistólico y tele-Diastólico y los niveles de expresión de ARNm de los diferentes subtipos de AR y GRK en VI. La línea continua representa correlación significativa.

- Presión arterial pulmonar media y sistólica

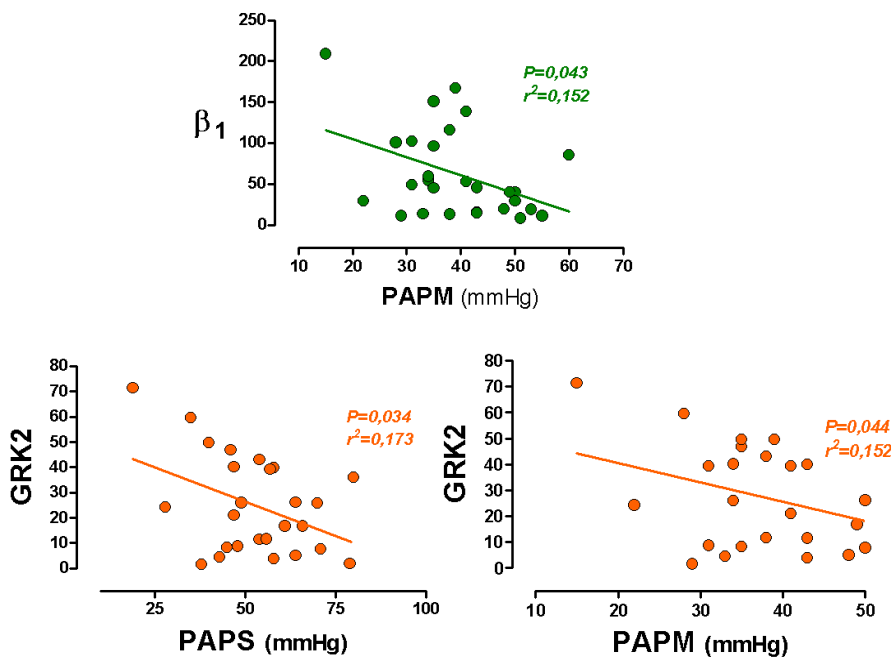


Figura 40. Regresión lineal de la Presión arterial pulmonar media y sistólica frente los niveles de expresión de ARNm de los diferentes subtipos de AR y GRK en VI. La línea continua representa correlación significativa.

- Presión capilar pulmonar.

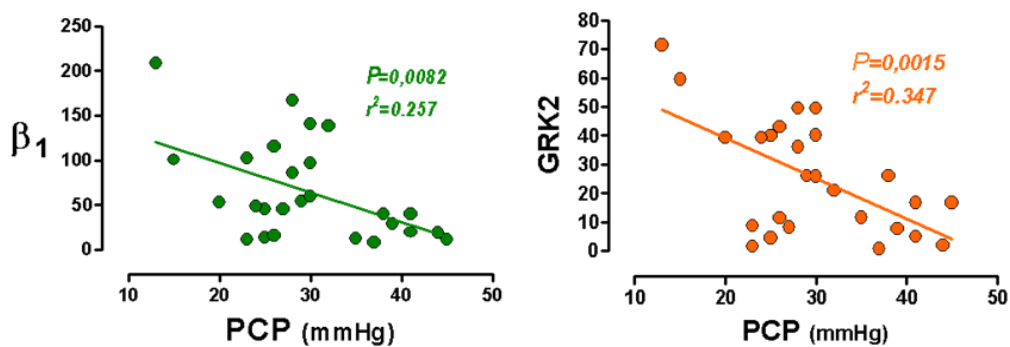


Figura 41. Regresión lineal de la Presión capilar pulmonar frente los niveles de expresión de ARNm de los diferentes subtipos de AR y GRK en VI. La línea continua representa correlación significativa.

Resumiendo en lo que respecta a las variables clínicas, FEVI correlacionó con α_{1A} , β_1 , β_2 y GRK5 (Figura 37), GC con β_2 (Figura 38), DTS y DTD del VI correlacionó con las tres GRK (Figura 39), PAPS correlacionó de manera inversa con GRK2 y PAPM con el β_1 y GRK2 (Figura 40) y PCP correlacionó de manera inversa con β_1 y GRK2 (Figura 41).

4.- Correlaciones en la expresión de AR y GRK entre distintos territorios

4.1. Correlación entre la expresión de ARNm de AR y GRK en VI y VD de corazón insuficiente

Para conocer si existe una relación lineal en la expresión de los diferentes subtipos de AR y GRK entre las dos cavidades, VI y VD, en corazón insuficiente, realizaremos cálculos estadísticos de correlaciones con los datos de expresión de ARNm.

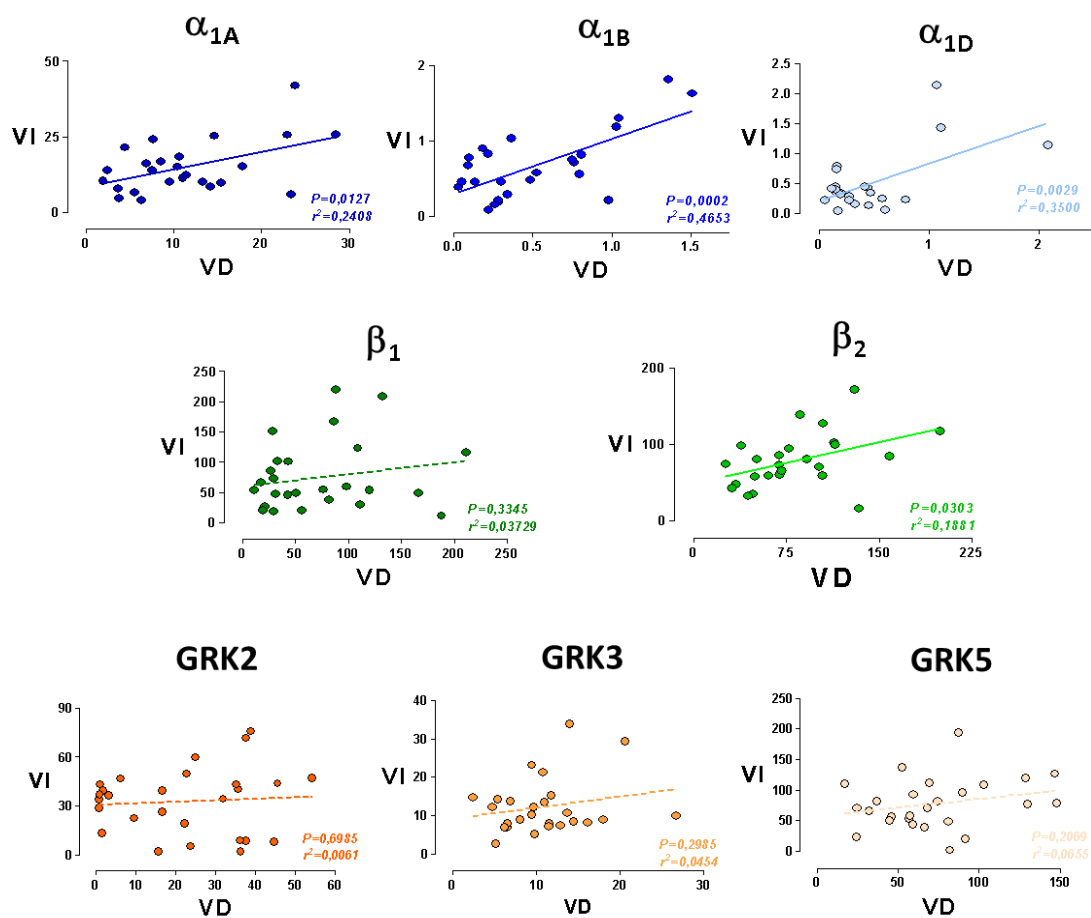


Figura 42. Regresión lineal entre los niveles de expresión de ARNm de los diferentes subtipos de AR y GRK en VI y VD de corazón insuficiente. Valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia y expresados como $2^{-\Delta Ct}$ para los $n = 27$ pacientes estudiados. La línea continua representa correlación significativa.

Vemos en la Figura 42 la existencia de correlación significativa entre VI y VD en la expresión de los tres subtipos de AR α_1 y en el β_2 , mientras que esta correlación no existe para el AR- β_1 , y tampoco con ninguna de las tres GRK analizadas.

4.2. Correlación entre la expresión de ARNm de AR y GRK en FMLC y cavidades cardíacas

De la misma forma que se hizo entre el VI y VD, analizamos si existe una correlación significativa entre la expresión de los diferentes subtipos de AR y GRK, en VI frente la FMLC de pacientes con IC.

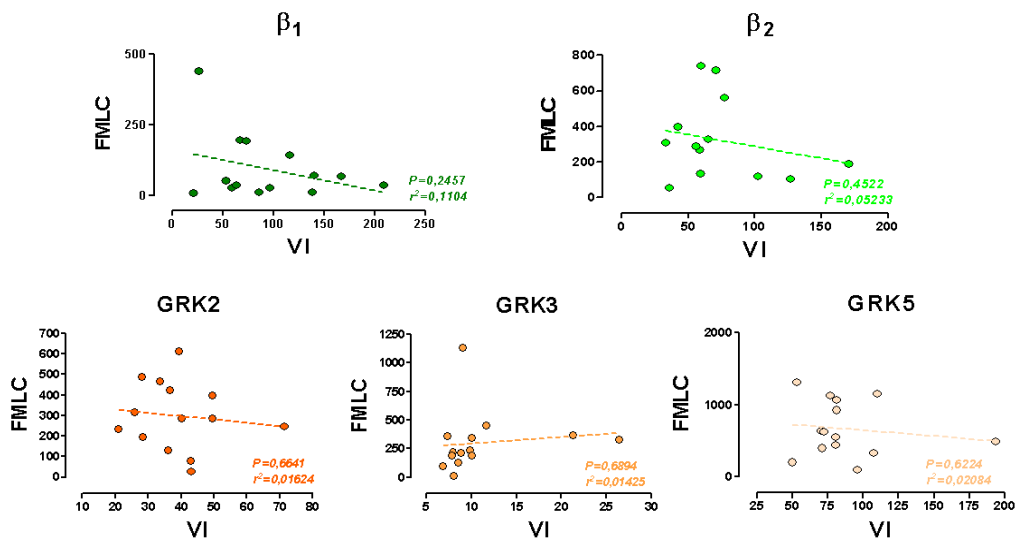


Figura 43. Regresión lineal de los niveles de expresión de ARNm de los diferentes subtipos de AR y GRK en VI frente la FMLC en pacientes con IC. Valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia y expresados como $2^{-\Delta Ct}$ para los n = 14 pacientes estudiados. La línea continua representa correlación significativa.

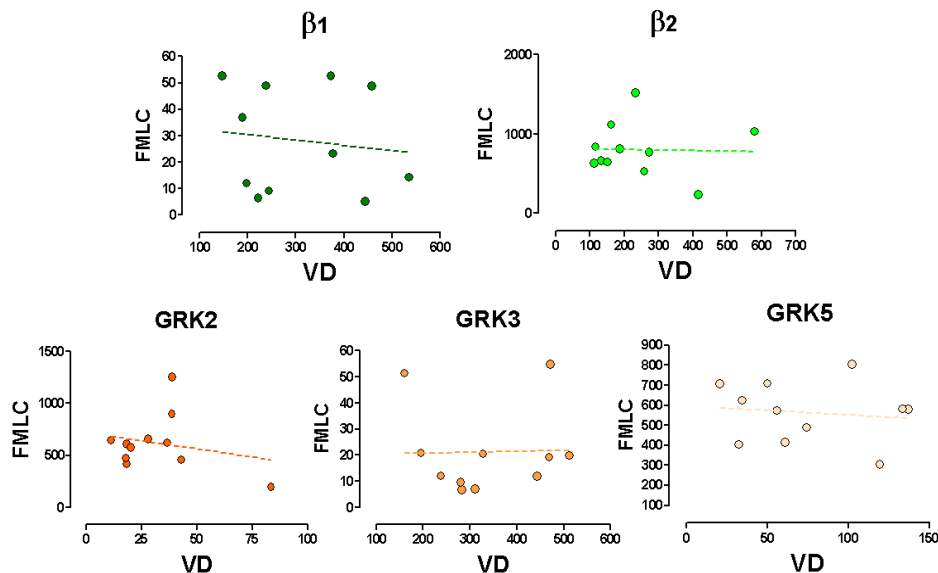


Figura 44. Regresión lineal de los niveles de expresión de ARNm de los diferentes subtipos de AR y GRK en biopsias de VD de corazón trasplantado frente la FMLC. Valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia y expresados como $2^{-\Delta Ct}$ para los n = 15 pacientes estudiados. La línea continua representa correlación significativa.

Como se muestra en la Figura 43 y 44, no apareció correlación significativa entre ambos territorios en la expresión de ninguno de los subtipos de AR y GRK

5.- Correlaciones entre AR y GRK en un mismo territorio.

5.1 Fracción monolinfocitaria circulante

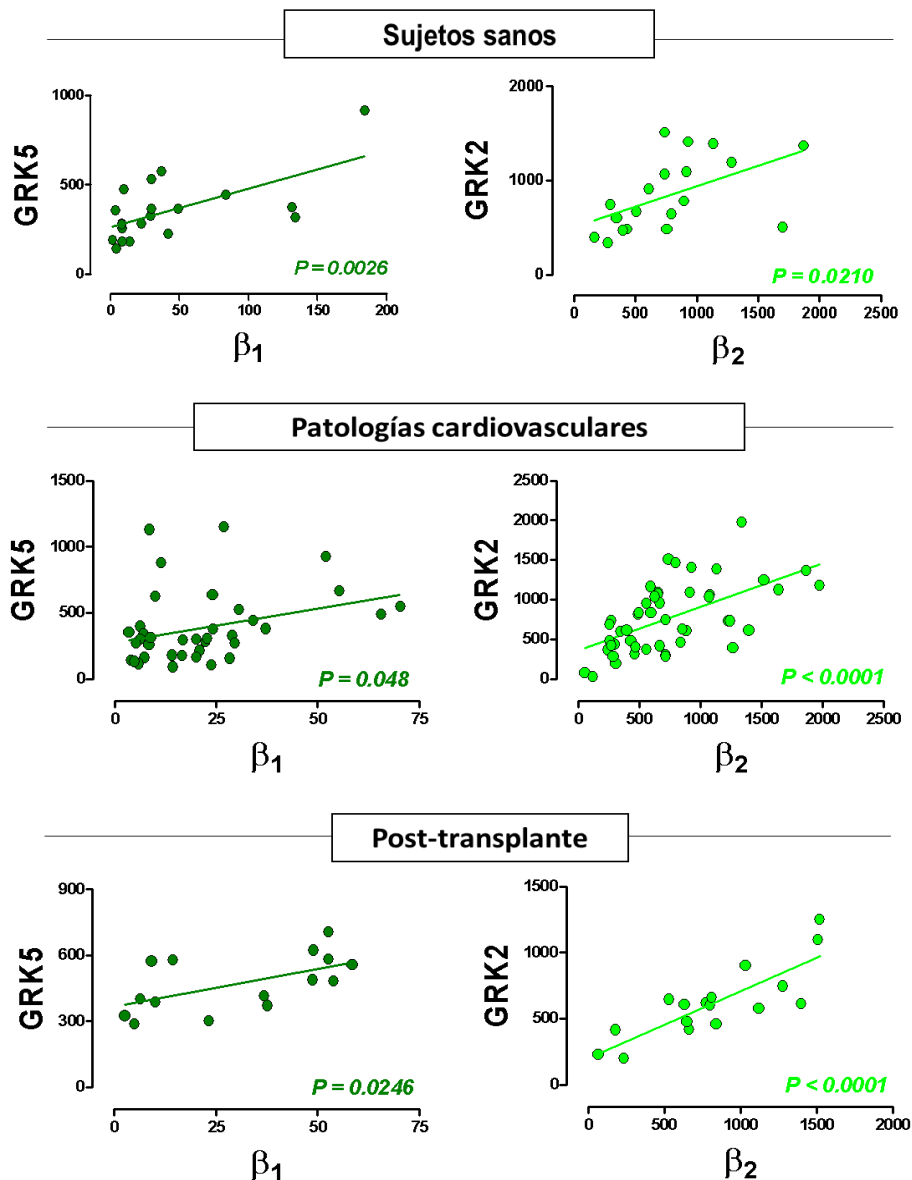


Figura 45. Regresión lineal de los niveles de expresión de ARNm de los AR- β (β_1 y β_2) y GRK2 o GRK5 en FMLC de voluntarios sanos, pacientes con patologías cardiovasculares (hipertensión o insuficiencia cardiaca) y pacientes sometidos a trasplante de corazón: Valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia y expresados como $2^{-\Delta Ct}$ para un n =14-18 pacientes sanos, n= 52-56 pacientes con patología cardiovascular y n=17 pacientes sometidos a trasplante cardiaco. La línea continua representa correlación significativa.

Cuando analizamos la expresión de los AR y GRK en un mismo territorio y establecemos la existencia o no de una correlación, se aprecia (Figura 45) como el subtipo β_1 correlaciona significativamente con la GRK5, mientras que el subtipo β_2 correlaciona significativamente con la GRK2 en los diferentes grupos de pacientes estudiados.

5.2 Corazón humano.

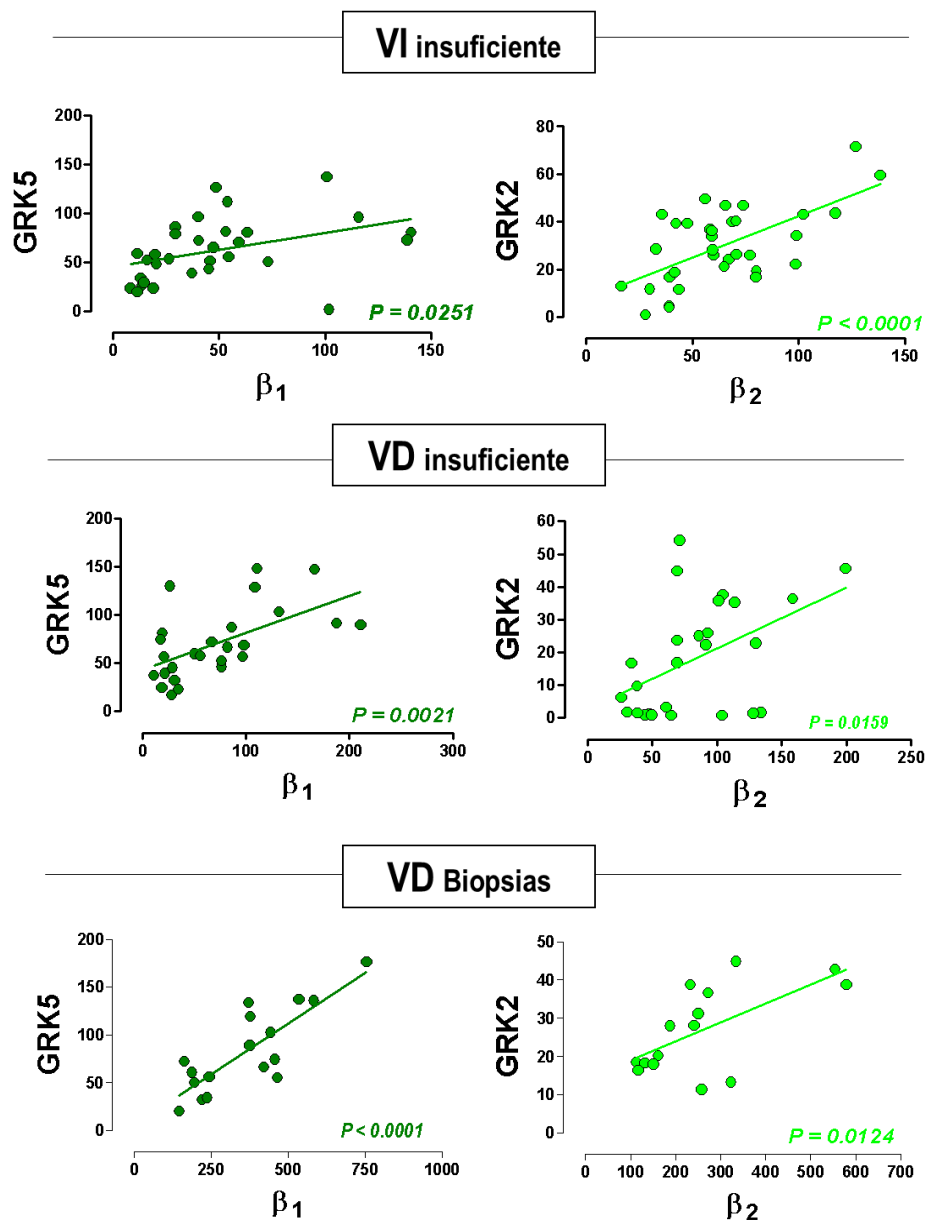


Figura 46. Regresión lineal de los niveles de expresión de ARNm de los AR- β (β_1 y β_2) y GRK2 o GRK5 en muestras de corazón: Valores normalizados usando GAPDH como gen de referencia y expresados como $2^{-\Delta C_t}$ para un $n = 35$ de explantes VI procedente de IC, $n = 26$ de explantes de VD procedentes de IC y $n = 17$ de biopsias de VD de corazón trasplantado. La línea continua representa correlación significativa.

A nivel de corazón (Figura 46), de la misma forma que se mostró a nivel en FMLC, el subtipo β_1 correlaciona significativamente con la GRK5, mientras que el subtipo β_2 correlaciona significativamente con la con la GRK2 en los diferentes grupos de pacientes estudiados.



Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en el mundo. Simplemente en 2012, causaron casi 17,5 millones de muertes; es decir, 3 de cada 10, según la Organización Mundial de la Salud (WHO).

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

1. - La expresión de los AR y las GRK en el miocardio humano, depende de la etiología de la IC y se correlaciona con las variables clínicas.

Al Sistema Adrenérgico también denominado Sistema Nervioso Simpático, desde el punto de vista neuroquímico, se le asigna un papel regulador esencial de la función cardiaca. En situaciones de IC el Sistema Adrenérgico se encuentra implicado en el intento de optimizar la incapacidad del corazón, mermado en sus funciones de distribución de nutrientes y de los diferentes elementos formes de la sangre a todo el organismo. Esta activación adrenérgica puede perdurar en el tiempo pasando a ser crónica y desencadenando un peligroso círculo vicioso que agravaría la progresión de la IC.

Numerosos han sido los estudios realizados sobre los AR y sus cinasas reguladoras encargadas de mantener la funcionalidad cardiaca. Bien conocida es la expresión en el miocardio de los diferentes subtipos de AR- β (β_1 , β_2 , β_3) y de AR- α_1 (α_{1A} , α_{1B} y α_{1D}) (Moniotte y cols., 2001; Brodde y cols., 2006; Jensen y cols., 2009; 2011; Woodcock y cols., 2007), así como también, de tres de las diferentes isoformas de cinasas reguladoras de los AR, las GRK (GRK2, GRK3 y GRK5) (Iaccarino y Koch 1999; Penela y cols., 2006; Huang y cols.,2011; Kamal y cols., 2012; Sato y cols.,2015).

Una de las bases de la presente tesis es mostrar los cambios de expresión que se dan en estos receptores y sus cinasas reguladoras en situaciones de IC, y esclarecer las diversas causas que lo desencadenan así como su explicación fisiopatológica.

En nuestro estudio, en ensayos con donantes y pacientes, partiremos de cuatro tipos de muestras de corazón:

- explantes de VI de corazón sano,
- VI y VD de explantes de corazón con insuficiencia avanzada,
- y biopsias de VD de corazones trasplantados,

A partir de estas muestras examinamos los diferentes niveles de expresión génica (PCR) y proteica (WB) de AR y GRK y evaluamos las diferencias entre las muestras de corazón sano frente las de corazón trasplantado e insuficiente.

La mayoría de estudios realizados sobre AR en IC, tanto experimentales como clínicos, se centran en el subtipo β_1 como AR más importante e influyente a nivel cardiaco. Este es considerado como mayoritario y principal responsable de la contracción y ritmo cardiaco, y

por ello crucial en el control de la frecuencia y GC. En el caso de las GRK, diferencias entre la cantidad localizada intracelularmente, los mecanismos de activación y la especificidad por un receptor dado sugieren que las distintas GRK juegan un papel regulador no redundante en el corazón (Hata y col., 2003; Metaye y cols., 2005; Hendriks-Balk y cols., 2008; Dorn, 2009). Un buen ejemplo es la rápida regulación al alza o a la baja de la isoforma GRK2, que correlaciona con la función ventricular e implica un papel para esta cinasa en la regulación aguda de la función cardíaca. No ocurre lo mismo con la GRK5, ya que los cambios en su expresión son menos dinámicos y, por ello, pueden tener un papel más relevante en la regulación crónica del corazón. (Liggett y cols., 2008).

En la presente tesis, en muestras de corazón sano, los AR más expresados fueron los β_1 y β_2 seguidos del subtipo α_{1A} . Los otros tres AR, α_{1B} , α_{1D} y β_3 son minoritarios (Figura 2). Estudios previos muestran que en condiciones de normalidad en corazones explantados procedentes de donantes, el AR- β_1 constituye el 70-80% del total de los AR, mientras que el AR- β_2 constituye el restante 20-30%, estando el AR- β_3 muy poco expresado (Moniotte y cols., 2001; Xiang y cols., 2003; Lohse y cols., 2003; Brodde y cols., 2006). Siendo estos resultados similares a los obtenidos en nuestro laboratorio (72%/28%) (Figura 2B).

A nivel de los subtipos α_1 su densidad en estados de normalidad es de 10-15% del total de los AR (Brodde y cols. 2006; Woodcock, 2007; Jensen y cols, 2009). Entre los tres subtipos α_1 , y como estudios previos muestran (Jensen y cols., 2009), obtuvimos que el subtipo α_{1A} es notoriamente el más abundante en miocardio humano (Figura 2)

En lo que respecta a las cinasas reguladoras, el orden de expresión que mostraron fue $GRK5 > GRK2 \geq GRK3$ (Figura 2) datos que se corroboran con estudios previos (Ungerer y cols., 1994; Liggett y cols., 2008; Triposkiadis y cols., 2009), siendo la GRK2 y GRK5 las cinasas para las que, hasta el momento, se conoce una mayor funcionalidad a nivel cardíaco (Belmonte & Blaxall 2011).

En el caso de las biopsias de VD procedentes de corazones trasplantados hay que remarcar su peculiaridad al tratarse de muestras procedentes de corazones denervados y de pacientes sometidos a tratamiento inmunosupresor, condiciones ambas que pueden alterar la expresión de AR y GRK. En cualquier caso, las pruebas clínicas demuestran que su funcionalidad equivale a la de un corazón “sano”, lo que implica un adecuado control adrenérgico de los mismos. Por lo que respecta a la denervación cardíaca, se manifiesta de manera clara en los primeros momentos tras el trasplante, pero existe la evidencia clínica de que se va recuperando poco a poco el control nervioso de manera que, al cabo de un tiempo, se observa con claridad el control autónomo del corazón, por ejemplo, a través del reflejo vagal y una recuperación parcial del control adrenérgico (Buendía, 2013). En el caso de la inmunosupresión, el tratamiento es muy agresivo en los primeros períodos tras el trasplante pero, con el tiempo, se va adaptando a la respuesta inmunológica del paciente por lo que

disminuye hasta el mínimo admisible. Para determinar el nivel de influencia de estas variables en la expresión de AR y GRK y validar nuestros controles, hemos seleccionado biopsias obtenidas en un intervalo de tiempo amplio tras el trasplante (entre 18 y 471 días). Así pues, realizados los diferentes ensayos de expresión del ARNm en biopsias de VD observamos como el ratio β_1/β_2 se encuentra alrededor de 60/40 a diferencia de los 70/30 observado en explantes de VI de corazón sano (Figura 3B). A nivel de los AR- α y GRK estos se mantienen prácticamente en las mismas proporciones que se dan en corazón sano.

¿Qué ocurre en situaciones de IC con los AR?

En IC, independientemente de la etiología, varios sistemas intentan compensar las necesidades del organismo que se encuentran mermadas por la incapacidad del corazón de bombear suficiente sangre para abastecer las demandas fisiológicas. Como hemos comentado, un regulador esencial de la función cardiaca es el Sistema Adrenérgico, el cual responde con un aumento de la actividad, un aumento de catecolaminas circulantes y, por tanto, una mayor estimulación de los adrenoceptores (Triposkiadis y cols., 2009). En consecuencia, la estimulación adrenérgica continua aumenta la inotropía y cronotropía cardíacas que, compensan, a corto plazo, la insuficiencia pero que conducen a un alto gasto energético cardiaco y a un efecto deletéreo a largo plazo. Por ello, al tratarse de un sistema no rígido que se adapta al continuo estímulo producido por las catecolaminas, un aumento crónico del tono adrenérgico se traduce a largo plazo en una alteración de los niveles de expresión de los AR, principalmente del subtipo β_1 (Brodde y cols., 1991).

Numerosos autores (Engelhardt y cols., 1996; Lohse y cols., 2003; Jahns y cols., 2004) han descrito que en IC avanzada la contractilidad anormal, propia del corazón insuficiente se debe a una menor densidad de receptores β_1 cardíacos, a la que acompaña un aumento en la expresión y la actividad de una de las cinasas encargadas de modular su actividad, la GRK2 (Ungerer y cols., 1993; Penela y cols., 2006) pero se desconoce el mecanismo que regula este cambio y, sobre todo, no se ha estudiado en profundidad si los otros subtipos de AR y GRK sufren también cambios en su expresión.

Nuestros resultados coinciden con lo descrito en cuanto a la menor expresión del AR- β_1 en VI y VD (Figura 6), y de la GRK2 en VI, pero además, observamos un aumento significativo en la expresión del AR β_2 en VI y de la GRK5 en VD (Figura 7) cuando se analiza el conjunto de pacientes con IC. Como se discutirá más adelante, la etiología de la IC juega un papel fundamental para explicar estos resultados.

Asumido el cambio en la expresión del AR- β_1 como un mecanismo de defensa del corazón frente al excesivo estímulo adrenérgico (Brodde y cols., 1991), el resultado de esta adaptación es que los cardiomiocitos disminuyen su respuesta a las catecolaminas por lo que, la IC inicialmente compensada por el Sistema Adrenérgico, se manifiesta

clínicamente desencadenando con el tiempo un reducido GC, cambios en la estructura del VI y una progresiva disfunción cardíaca (Eschenhagen, 2008).

Si los niveles de catecolaminas son la razón de la regulación a la baja del AR- β_1 descrito previamente, ¿es este subtipo el único que reduce su expresión en situaciones de IC?

De la misma forma que muestran trabajos anteriores, similares son los resultados que obtuvimos en nuestro estudio a partir del análisis de los niveles de ARNm procedentes de las muestras de VI y VD de corazones con IC avanzada, confirmando así, la existencia de un mecanismo que disminuye drásticamente los niveles de expresión del AR- β_1 . Esta disminución del subtipo β_1 en corazón insuficiente llevó a la aparición de un cambio en la proporción entre β_1/β_2 y α_1/β respecto a las existentes en estados de normalidad (Figuras 5B y 6). Mientras que en VI sano se encuentran en un 70-80% β_1 / 20-30% β_2 según Brodde y cols., (1991) y también los ensayos realizados en nuestro laboratorio, en la IC pasan a ser cerca del 50/50% β_1/β_2 o incluso menor (Port y cols., 2001; Lowes y cols., 2002; Vanderheyden y cols., 2008). En nuestro caso la proporción β_1/β_2 en corazón insuficiente es 44/56 % en VI y 42/58% en VD (Figura 5B), siendo este cambio semejante en ambas cavidades y atribuido, fundamentalmente, a la regulación a la baja del AR- β_1 (Bristow y cols., 1993; Brodde y cols., 2006; Engelhardt y cols., 1996; Lohse y cols., 2003) lo que confirma la existencia de un mecanismo específico de drástica regulación a la baja de la expresión del subtipo β_1 en corazón insuficiente.

Además, cuando analizamos la correlación existente en la expresión de un AR determinado en VI y VD del mismo paciente, encontramos que para todos ellos esta correlación es significativa excepto en el caso del subtipo β_1 (Figura 42), lo que corrobora la regulación específica de este subtipo en cada cámara cardíaca.

Aunque los resultados obtenidos no muestran cambios en la expresión de ARNm en los subtipos de AR- α_1 en IC, existe un incremento relativo en su proporción a expensas de una disminución en la densidad de los AR- β pasando de $5,37\pm 0,32\%$ en corazón sano a $10,5\pm 0,6\%$ en corazón insuficiente (Figura 6). Aunque los AR- α_1 no se consideran generalmente como los principales reguladores de la función contráctil cardíaca en condiciones fisiológicas, se piensa que poseen mayor influencia en condiciones patológicas como es el caso de la IC (Jensen y cols., 2011) y el cambio observado en nuestro trabajo justificaría dicha hipótesis.

En estas circunstancias, el AR β_2 y el α_{1A} pueden ejercer un papel mayor del que normalmente ejercen en corazón sano, lo que explicaría que, según nuestros resultados, en

corazón insuficiente, la FEVI correlaciona directamente no solo con β_1 sino también con β_2 y α_{1A} (Figura 37), como se discute más adelante.

¿Qué explicación fisiológica tiene la disminución drástica de la expresión del AR- β_1 en corazón insuficiente?

En los pacientes que se encuentran en un estadio avanzado de IC, y con niveles elevados de catecolaminas, una actividad excesiva del AR- β_1 tiene consecuencias deletéreas en el corazón, como también se mostró en ratones transgénicos (Xiang y cols., 2003; Xiao y cols., 2004; 2006). Por esta razón, la disminución específica en la expresión y funcionalidad del AR- β_1 podría ser un mecanismo protector en el corazón dañado (Engelhardt y cols., 1996) que reduce la señalización perjudicial mediada por el AR- β_1 (Xiao y cols., 2004; 2006; Zhu y cols., 2005).

En este sentido, el aumento de Ca^{+2} intracelular que conduce a la contracción del músculo cardíaco mediado por el AR- β_1 a través de la activación de la proteína Gs, y la vía AC/AMPC, favorece la activación de la vía apoptótica de la CaMKII, y con ello el deterioro del corazón (Zhu y cols., 2001; 2003; Wang y cols., 2004). El AR- β_2 tiene una vía de señalización que coincide sólo en parte con el AR- β_1 ya que es capaz de activar la proteína Gs pero, tras una estimulación sostenida por el agonista y la fosforilación del receptor por GRK2, también activa la proteína Gi, que posee capacidad para inhibir la AC (Xiao y cols., 1995; Daaka y cols., 1997a; Kilts y cols., 2000). Se ha demostrado la relación que existe entre esta activación de la proteína Gi mediada por AR- β_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. Así pues, la vía de señalización β_2 -Gi juega un importante papel cardioprotector frente a la apoptosis de cardiomiocitos (Zhu y cols., 2005; 2006; Xiao y cols., 2006;). Por ello, el incremento en la expresión de GRK2 y un mayor papel funcional del AR- β_2 , derivado de la regulación a la baja del AR- β_1 y de una mayor expresión del β_2 en VI, favorecerían los mecanismos de cardioprotección mediados por la vía β_2 -Gi.

Por otro lado, observamos en nuestros resultados que la expresión de los subtipos de AR- α_1 no se encuentra disminuida en explantes de VI de corazón insuficiente frente a explantes de corazón sano, a diferencia de lo que ocurre para el AR- β_1 (Figura 3). Si a esto le unimos que al subtipo α_{1A} , mayoritario en corazón humano, se le asocian acciones cardioprotectoras mientras que el subtipo α_{1B} se asocia con hipertrofia cardíaca (Huang y cols., 2007; Woodcock y cols., 2008; Jensen y cols., 2011), pensamos que este aumento en la proporción de los AR- α_{1A} en corazón insuficiente podría suponer un mecanismo protector del corazón. Esto quedó demostrado en el ensayo clínico ALLHAT realizado en el año 2000 (The Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial) donde

aquellos pacientes que recibieron α_1 -bloquantes mostraron una menor protección frente a la IC así como también la Doxazosina (bloqueante α -adrenérgico) indujo apoptosis de cardiomiocitos de ratón y humanos (González-Juanatey y cols., 2003).

Resumiendo, el cambio de proporcionalidad que se da en corazón insuficiente entre β_1/β_2 y α_{1A}/β podría explicarse como un mecanismo de defensa del corazón favoreciendo la funcionalidad de los subtipos que poseen vías de señalización que favorecen la cardioprotección a expensas del AR- β_1 el cual, aun siendo el AR de mayor relevancia por sus acciones inotrópicas y cronotrópicas, posee en condiciones de continuo estímulo adrenérgico una actividad apoptótica y cardiotóxica.

¿Las tres isoformas de GRK presentes en el miocardio humano son reguladas de la misma forma en estados de IC?

Anteriores estudios muestran que la expresión de las GRK está alterada en condiciones patológicas en las que está aumentado el tono adrenérgico, o por administración de agonistas, los cuales incrementan los niveles de GRK (Moniotte y cols., 2001; Port y cols., 2001; Lowes y cols., 2002; Metaye y cols., 2005; O'Connell y cols., 2006; Oliver y cols., 2010; Segura y cols., 2010; Noor y cols., 2011; Rengo y cols., 2011;) o bien por la administración de antagonistas o la exclusión de los agonistas endógenos, que conducen a una disminución de las GRKs (Skomedal y cols., 1997; Port y cols., 2001; Metaye y cols., 2005; O'Connell y cols., 2006).

En nuestro caso, las GRK mantuvieron el orden de expresión característica, $GRK5 > GRK2 \geq GRK3$ (Figura 2), datos que corroboran estudios previos (Ungerer y cols., 1994; Liggett y cols., 2008; Triposkiadis y cols., 2009) y apareció una tendencia a aumentar la expresión de las tres isoformas al comparar el corazón insuficiente con el corazón sano, siendo GRK2 y GRK5 las que mostraron niveles de expresión significativamente mayores (Figura 7).

Estos resultados están en la línea de estudios previos que encuentran una sobreexpresión de GRK2 y GRK5 en modelos de IC (Ungerer y cols., 1996; Rockman y cols., 1998; Anderson y cols., 1999; Harding y cols., 2001; Iaccarino y cols., 2001; Vinge y cols., 2001; Petrofski y cols., 2003; Brinks y cols., 2010), aunque en nuestro caso la diferencia no llega a ser significativa en todas las cavidades, lo que puede atribuirse a diferencias en la etiología de la IC, como se discute a continuación.

¿Los cambios en la expresión de AR y GRK dependen de la etiología de la IC?

La población objeto de estudio a partir de la cual se obtuvieron las muestras de VI y VD durante el proceso del trasplante cardiaco poseía una severa IC en fase terminal o clase IV según la clasificación de la NHYA. El término IC no se refiere a una enfermedad concreta sino que engloba una serie de síndromes en los que los pacientes presentan diferentes signos, síntomas y alteración cardiaca estructural. La IC puede tener diferente etiología, teniendo como desencadenante común la incapacidad del corazón de abastecer al organismo de la oxigenación y nutrientes necesarios. Conocida la expresión de los diferentes AR y GRK en situaciones de IC, decidimos localizar posibles diferencias de esta expresión según la etiología causante de la insuficiencia. Para ello, dividimos las muestras en tres grupos: pacientes con Cardiopatía Isquémica (CI) (n=10), pacientes con Miocardiopatía Dilatada (MD) (n=17) y el tercer grupo fue denominado NI-ND (No isquémicas-No dilatadas) (n=15) y engloba una amalgama de cardiopatías diferentes a la CI y MD (Tabla 12). Este último grupo de pacientes NI-ND conserva niveles de FEVI superiores al 25% mientras que los otros dos grupos, CI y MD, poseen niveles inferiores al 25% (Figura 12). Sin perder la atención a estas diferencias en la fracción de eyección en cada grupo se analizó la posible variación en la expresión de los AR y GRK.

Comparando los tres grupos de cardiopatías, el grupo de pacientes NI-ND mostró una leve disminución del AR- β_1 en VI, que no llega a ser significativa si lo comparamos con los explantes de corazón sano (Figura 9). Esta ligera disminución no significativa del AR- β_1 en VI de pacientes NI-ND podría ser una de las razones por la que no se observa una disminución tan marcada de la FEVI en este grupo de pacientes con respecto a los pacientes que padecían CI o MD (Figura 12). En el grupo de pacientes con CI el AR- β_1 disminuyó significativamente tanto en VI como en VD, mientras que en el grupo que sufría MD solo se mostró esta disminución a nivel del VI. Es de señalar que en el grupo de NI-ND, se observan niveles menores de AR- β_1 en el VD pero no en el VI, lo que podría deberse a que, en este grupo de pacientes, la funcionalidad del VI está más preservada mientras que es el VD el que parece estar más afectado. Tanto el subtipo β_2 como los AR- α_1 no mostraron cambios relevantes entre los diferentes grupos ni tras compararlos con corazón sano (Figuras 8A y 9A), aunque observamos una tendencia al aumento, que no llega a ser significativa, en VI de pacientes con CI y MD, pero no en NI-ND. Aunque en el conjunto de pacientes con IC encontrábamos significativamente aumentada la expresión del AR β_2 en VI, al dividirlos en grupos, el análisis estadístico pierde significación, por lo que pensamos que sería necesario un número mayor de pacientes en cada grupo para que esta diferencia alcanzase significación estadística.

Para confirmar los resultados expuestos a nivel génico se realizaron ensayos de Western Blot en explantes de VI comparando los tres grupos (MD, CI y NI-ND). Los resultados revelaron que los niveles de proteína siguieron la misma pauta de expresión que la marcada a nivel de ARNm, apareciendo una disminución significativa del subtipo β_1 en MD y CI frente a NI-ND (Figura 8B y 9B). Tras observar la disminución del AR- β_1 tanto a nivel proteico como génico en VI de pacientes con CI y MCD, nos ayudamos de una tercera prueba experimental para corroborar tal descenso, y son los ensayos de unión de un radioligando específico de los AR- β , que no discrimina entre subtipos. A partir de esta última prueba cuantificamos los AR- β existentes en los tres grupos de cardiopatías (CI, MCD y NI-ND). Estos resultados demostraron una vez más que en VI de pacientes MD y CI existió una disminución en la densidad de los AR- β , estadísticamente significativa en comparación con el grupo NI-ND (Figura 10)

Desde otro punto de vista, agrupando los valores obtenidos de expresión de ARNm de los AR y GRK según porcentaje de FEVI, siendo estos porcentajes de FEVI $\leq 25\%$ y FEVI $> 25\%$, los resultados fueron de nuevo aclaratorios sobre la importancia que ejerce el AR- β_1 en la funcionalidad cardiaca. Se observó un nivel de expresión menor del subtipo β_1 en el VI de los corazones con FEVI $\leq 25\%$, demostrándose una vez más, la jerarquía de este subtipo en el corazón. La menor expresión de β_1 fue acompañada de un nivel menor de ARNm de GRK5 en los pacientes que poseían una FEVI $\leq 25\%$, esta disminución paralela relacionaría esta cinasa como reguladora principal del subtipo β_1 (Figura 14), como se discute más adelante, revelando su importancia reguladora en estados de IC.

En el caso de las GRK, como bien explicamos al principio de la discusión, el promedio de expresión en VI de los explantes de corazón insuficiente de todos los pacientes estudiados mostró un ligero aumento en las tres isoformas, que sólo alcanza significación para la GRK2 en VI y para la GRK5 en VD. Cuando agrupamos las muestras según la etiología, observamos cambios característicos en cada una de ellas. Un resultado destacable es el aumento significativo en la expresión de GRK2 en VI de pacientes con MD y NI-ND (Figura 11), lo que coincide con estudios previos que describen la regulación al alza de esta isoforma en la IC (Ungerer y cols., 1993 y 1994; Vinge y cols., 2001; Hata y cols., 2003; Dzimiri y cols., 2004; Iaccarino y cols., 2005).

Según la propuesta de Leineweber (2005) las GRK en corazón insuficiente aumentan conforme avanza la gravedad de la enfermedad en estadios leves o iniciales (clases I-II de la NHYA), pero bajan hasta niveles controles en estadios más graves o avanzados (clases III-IV de la NHYA). De la misma manera, en modelos animales de IC se ha descrito el aumento de los niveles de GRK2 en la fases iniciales, y con el trascurso del tiempo, en las fases tardías de la IC se produce una bajada en los niveles de GRK2 coincidiendo con la disfunción ventricular y la dilatación de las cámaras (Ping y cols., 1997; Vinge y cols.,

2001). La rápida regulación tanto al alza como a la baja de GRK2 mostrada en anteriores estudios (Liggett y cols., 2008) sugiere que esta isoforma puede funcionar predominantemente en la modulación aguda de la señalización de los AR- β . En este caso, el aumento de la expresión de la GRK2 observada en la MD y NI-ND (Figura 11) podría estar relacionada con el aumento crónico de la actividad simpática en la IC (Rengo y cols., 2011), la severidad clínica de la IC, o el tratamiento farmacológico que recibe el paciente (Agüero y cols., 2012). Un análisis profundo de la expresión de GRK2 en relación con las catecolaminas circulantes en sangre o el tratamiento farmacológico que reciben los pacientes (β -bloqueantes o dobutamina, dopamina o noradrenalina) podría ser una herramienta en futuros estudios, pero el número limitado de muestras del presente trabajo y la complejidad de los tratamientos que reciben los pacientes no nos ha permitido establecer una relación clara.

Sin embargo, hay que destacar el resultado obtenido en el grupo de pacientes con CI, donde la expresión de las tres isoformas de GRK no es estadísticamente diferente de la observada en VI sano, pero es menor que la encontrada en MD o NI-ND (Figura 11). La marcada alteración en la actividad cardíaca, como muestra su FEVI (<25%) (Figura 12), coincidiría en estos pacientes con la mayor regulación a la baja del AR- β_1 , sin que haya un aumento de las GRK. Por lo tanto, de esta observación podemos concluir que la regulación a la baja del AR- β_1 , y no un aumento en la expresión de GRK, parece ser el mecanismo que conduce a la disminución de la fracción de eyección cardíaca observada en estos pacientes. Los resultados obtenidos en el grupo de pacientes NI-ND corroboran esta conclusión ya que este grupo exhibe una mayor expresión de AR- β_1 en el VI (Figura 9), junto con una mayor FEVI, a pesar del aumento significativo de GRK2 y GRK5 en esta cámara cardíaca.

Resumiendo, el grupo de pacientes con insuficiencia NI-ND muestra una mayor expresión del AR- β_1 junto con una mayor expresión de GRK2 y GRK5, siendo el grupo que presenta mayores niveles de FEVI. En el grupo de pacientes con CI ocurre lo contrario, apareciendo una disminución importante de la expresión de β_1 no acompañada de aumento en las GRK y que conduce a FEVI menores del 25%, confirmando así un mecanismo deletéreo en condiciones de alto desgaste miocárdico atribuible, fundamentalmente a cambios en el AR- β_1 y no tanto a cambios en las GRK.

En esta línea están las observaciones de Leineweber y cols., (2005) y nuestros propios resultados (Agüero y cols. 2012) que, como ya hemos comentado, demuestran como aumentan las GRK en corazón insuficiente en estadios leves o iniciales (clases I-II de la NHYA) pero, conforme avanza la gravedad de la enfermedad, bajan hasta niveles similares a los controles sanos (clases III-IV de la NHYA) donde precisamente la FEVI está

dramáticamente disminuida, al igual que ocurre en modelos animales de IC (Ping y cols., 1997; Vinge y cols., 2001).

¿Qué relación existe entre las variables clínicas y la expresión de AR y GRK en pacientes con IC?

Una de las técnicas diagnósticas más utilizadas para conocer la funcionalidad del corazón es la ecografía o ecocardiograma, la cual nos proporciona una abundante información sobre la anatomía cardíaca (volúmenes, geometría, masa), la movilidad de las paredes y la función valvular. Esta prueba proporciona información fundamental sobre la etiología de la IC. Así pues, cuando se pretende valorar la función ventricular, la determinación de la fracción de eyección es la variable más útil obtenida en la ecografía cardíaca (Dickstein y cols., 2008) y ya hemos comentado su relación con la etiología de la IC y los cambios en la expresión del AR- β_1 .

Cuando analizamos si existe una correlación lineal entre los valores de FEVI para un determinado paciente y la expresión de los AR y las GRK en VI de ese mismo paciente, encontramos que existe una correlación significativa y positiva con la expresión génica de los AR α_{1A} , β_1 , β_2 y la cinasa GRK5 (Figura 37). Aun encontrándonos frente a corazones con funcionalidad disminuida, siendo una de las principales causas la fuerte regulación a la baja del AR- β_1 , se conserva la correlación de este subtipo con esta variable, y esto se puede interpretar en el sentido de que, aun sufriendo esta drástica disminución, el subtipo β_1 continuaría siendo uno de los AR con mayor importancia funcional en el corazón.

En el caso del subtipo β_2 , la correlación con la FEVI encontrada en nuestro grupo de pacientes parece indicar un papel funcional de importancia en condiciones de IC. Cabe destacar la correlación encontrada, y no descrita en estudios previos, entre la FEVI y los niveles de expresión de ARNm del AR- α_{1A} en VI (Figura 37). Este hallazgo apunta a que el subtipo α_{1A} podría contribuir al mantenimiento de la funcionalidad del corazón insuficiente, así como también, corroboraría los efectos cardioprotectores mostrados en resultados previos por este subtipo (Jensen y cols., 2011), todo lo contrario al subtipo α_{1B} al cual le asignan efectos hipertróficos en el desarrollo cardíaco del ratón (O'Connell y cols., 2006) y humano (Skomedal y cols., 1997; Wang y cols., 2010). En este contexto, donde la variable clínica ecocardiográfica FEVI correlaciona directamente no solo con el AR- β_1 si no también con los AR α_{1A} y β_2 , consideramos que los tres subtipos parecen jugar un papel importante en la regulación cardíaca en estados de insuficiencia.

Además de los AR α_{1A} , β_1 y β_2 , también se observó correlación significativa y positiva entre la GRK5 y la FEVI (Figura 37). Esta cinasa es la más expresada de las tres isoformas en el corazón, como demuestran tanto resultados nuestros como previos (Ungerer y cols.,

1994; Liggett y cols., 2008; Triposkiadis y cols., 2009) y junto con la GRK2, se considera como una de principales reguladoras de los AR- β . La aparición de una correlación positiva entre los niveles de expresión de GRK5 en VI y la FEVI indicaría que esta isoforma podría tener también un papel central en la funcionalidad cardiaca en estados de insuficiencia.

Otro resultado interesante no previamente descrito, es la existencia de una mayor expresión de GRK3 y GRK5 asociada a un menor diámetro tele-sistólico (DTS-VI) y tele-diastólico (DTD-VI) del VI (Figura 13), añadiendo así nueva información sobre la importancia de la actividad de estas cinasas en la regulación cardiaca. DTS y DTD del VI son variables obtenidas mediante ecocardiograma que informan del tamaño del diámetro del VI tras la sístole y la diástole, ayudando al clínico a conocer las dimensiones del espacio existente en VI en su punto final de contracción y dilatación, y con ello, su relación con el volumen de sangre que es capaz de expulsar el corazón. La correlación negativa de DTS y DTD del VI con la expresión de GRK3 (Figura 39) corroboraría estudios previos que atribuyen a esta cinasa un papel protector en el sistema cardiovascular (Vinge y cols., 2008; Oliver y cols., 2010) y contribuye a un mayor entendimiento de la posición del gen que codifica esta cinasa en un locus del cromosoma asociado con la masa del VI y su contractilidad (Arnett y cols., 2001).

La correlación inversa encontrada entre la expresión de GRK5 (una cinasa que modula la contractilidad cardiaca) y estas variables DTS y DTD (Figura 39) apoyaría la evidencia clínica, en caso de IC, del papel protector de un polimorfismo de esta cinasa que inhibe la señalización de los AR- β_1 de una forma más efectiva (Liggett y cols., 2008).

Otra interesante correlación que se observa es la existente entre el GC y los niveles de ARNm del AR- β_2 (Figura 38), variables entre las que existe una correlación, significativa y positiva, que no encontramos entre el GC y el AR- β_1 . Como bien explicábamos anteriormente, a diferencia del AR- β_1 , el AR- β_2 posee la capacidad de activar tanto la proteína Gs como la Gi, dependiendo de su mayor grado de fosforilación y la vía de señalización regulada por la proteína Gi juega un importante papel cardioprotector (Zhu y cols., 2005; Xiao y cols., 2006). Ante esto, pensamos que la correlación entre el GC y el subtipo β_2 fortalecería la hipótesis de la capacidad de la vía β_2 /Gi de beneficiar mecanismos cardioprotectores en estados de insuficiencia.

Por último, otras correlaciones significativas son las existentes entre la expresión del AR- β_1 o la GRK2 y la Presión Capilar Pulmonar (PCP) (Figura 41), la Presión Arterial Pulmonar Media (PAPM) y la Presión Arterial Pulmonar Sistólica (PAPS) (Figura 40). El AR- β_1 correlacionó de forma inversa con la PCP y PAPM, mientras que la GRK2 lo hizo también de forma inversa con PCP, PAPS y PAPM lo que se traduce en que, a menor expresión del AR β_1 o la GRK2 mayor presión pulmonar. La disminución de la expresión del AR- β_1 en IC conlleva una reducción en la funcionalidad cardiaca, por lo que es de esperar un aumento de

las presiones pulmonares ya que el corazón es incapaz de bombear correctamente sangre hacia el pulmón.

No esta tan clara, sin embargo, la relación entre una menor expresión de GRK2 y un aumento de las presiones pulmonares (capilar, sistólica y media). Sabemos que la expresión de GRK2 se altera en condiciones patológicas o tras la administración de agonistas o antagonistas (Sato, 2015). También se ha observado un cambio en la expresión y actividad de GRK2 en linfocitos y corazón de pacientes (Ungerer y cols., 1993; 1994; Dzimiri y cols., 2002; 2004; Iaccarino y cols., 2005; Agüero y cols., 2012) o modelos animales de IC (Ungerer y cols., 1996; Rockman y cols., 1998; Anderson y cols., 1999; Iaccarino y cols., 2001; Harding y cols., 2001; Vinge y cols., 2001; Petrofski y Koch, 2003; Brinks y Eckahrt, 2010) y se ha relacionado esta cinasa con la hipertrofia cardiaca (Choi y cols., 1997) y el daño miocárdico (Sato y cols., 2015). Por ello, ni los antecedentes publicados ni nuestros resultados nos permiten aventurar una hipótesis que explique la relación inversa entre los niveles de expresión de GRK2 y las presiones pulmonares.

2. Los Linfocitos, como posibles biomarcadores en la IC.

Los linfocitos circulantes han sido propuestos como biomarcadores al pensar que podrían reflejar cambios en la expresión de genes en otros órganos o tejidos, constituyendo una población celular de fácil acceso y manejo (Gros y cols., 2000; Oyama y cols., 2005; Oliver y cols., 2010; Hata y cols., 2006). En concreto, trabajos anteriores proponen a los linfocitos como marcadores de los cambios en la expresión, a nivel cardiaco, de los AR- β (Brodde y cols., 1985 y 1986) y de la GRK2 (Gros y cols., 2000; Iaccarino y cols., 2005; Oyama y cols., 2005). Es por ello que estudiamos la expresión de AR y GRK en linfocitos obtenidos de los mismos pacientes a los que se había analizado la expresión en miocardio.

A nivel de los linfocitos circulantes la mayoría de autores asumen como subtipo mayoritario el β_2 (Tayebati y cols., 2000; Veglio y cols., 2001; Kin & Sanders, 2006; Yu y cols., 2007). Nuestros resultados en sujetos sanos (Figura 15) muestran la coexistencia de los tres subtipos de AR- β (β_1 , β_2 , y β_3) confirmando trabajos previos (Yu y cols., 2007). El mayor nivel de expresión correspondió al subtipo β_2 , seguido del β_1 , y muy de lejos, en niveles prácticamente indetectables el AR- β_3 . Se ha descrito al AR- β_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 & Sanders, 2001; Kin & Sanders, 2006).

La GRK2 es la cinasa predominante, constituyendo más del 50% de las tres isoformas estudiadas, y estando GRK3 y GRK5 en niveles inferiores (Figura 15), tal y como ha sido previamente descrito (Dzimiri y cols., 2002; Iaccarino y cols., 2005; Hata y cols., 2006). Se ha mencionado la implicación de la GRK2 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).

Además de trabajar con linfocitos procedentes de voluntarios sanos, se obtuvieron linfocitos de pacientes con hipertensión, pacientes con insuficiencia cardiaca avanzada (pre-trasplante) y pacientes a los que se les realizó trasplante cardiaco (post-trasplante). Los resultados obtenidos indican que entre los diferentes grupos, los pacientes con IC avanzada son los únicos que mostraron un aumento de expresión significativa del AR β_1 y la GRK5 en linfocitos circulantes, a la vez que una disminución de la expresión de β_2 y GRK2 (Figura 16 y 17), resultados que no concuerdan con lo observado en corazón insuficiente (Figura 4 y 5), donde ya hemos descrito cambios que siguen un patrón opuesto.

No se encontró una diferencia estadísticamente reveladora en los niveles de ARNm del AR- β_2 en el grupo de pacientes hipertensos respecto a los controles, lo que contrasta con estudios previos que muestran un incremento en la densidad de dicho subtipo en la hipertensión (Brodde y cols., 1985; Parfyonova y cols., 1988; Bono y cols., 1995). Esta aparente discrepancia podría deberse al hecho de que algunos autores asumían que el AR- β_2 era el único subtipo presente en linfocitos y utilizaban radioligandos no selectivos para cuantificar dichos receptores, por lo que en sus resultados observan un aumento del AR- β que interpretan como correspondiente al subtipo β_2 , pero que nosotros, que hemos diferenciado entre ambos subtipos, vemos que podría corresponder al β_1 . Aun así, no encontramos aumentada la expresión del AR- β_1 en nuestra población de pacientes hipertensos, pero si en un trabajo previo de nuestro grupo (Oliver y cols., 2010) en el que demostramos que dicho aumento se correlaciona con cifras elevadas de microalbuminuria más que con el estado hipertensivo en sí mismo. Esta observación explicaría la divergencia de resultados encontrados por distintos autores trabajando con pacientes hipertensos, ya que dependiendo de las características clínicas del grupo, especialmente de su función renal, podremos encontrar resultados diferentes en los niveles de expresión del AR- β_1 en linfocitos.

Al igual que ocurre en el corazón insuficiente, donde el constante estímulo adrenérgico llevó a la disminución de la expresión de su subtipo más relevante, a nivel linfocitario podría ocurrir con su equivalente, tratándose de un mecanismo adaptativo similar y salvando así el constante estímulo catecolaminérgico. Sin embargo, llama la atención que la disminución del subtipo β_2 en linfocitos de pacientes con IC estuvo acompañada del aumento en la expresión

del AR β_1 (Figura 16), cambio al que no podemos atribuir un papel claro y que no se correlaciona con la disminución de este subtipo encontrada en corazón insuficiente.

Es interesante señalar que, comparando los linfocitos procedentes de pacientes en situación de pre-trasplante con los linfocitos procedentes del mismo paciente pasado un tiempo tras el trasplante, se observó una normalización en los niveles de expresión de los AR y GRK (Figura 16) pero nuestros resultados no nos permiten concluir la significación fisiopatológica de este cambio. En cualquier caso, la normalización de la función cardiaca parece revertir los cambios observados en la expresión de los AR y GRK en linfocitos circulantes de pacientes con IC.

Como ya hemos indicado, estudios previos encontraron que, en algunos casos, los cambios en la expresión de los AR- β o GRK2 en corazón o vasos de pacientes con IC o HTA se vieron reflejados en los niveles de expresión en linfocitos circulantes, lo que sustentaba la hipótesis de que los linfocitos puedan ser utilizados como biomarcadores periféricos de los AR o las GRK en situaciones de IC (Gros y cols., 2000; Oyama y cols., 2005; Oliver y cols., 2010; Hata y cols., 2006). Sin embargo, nuestros resultados no apoyan esta hipótesis ya que los cambios observados en corazón no sólo no coinciden con los observados en linfocitos, sino que siguen un patrón opuesto. Encontramos una disminución del AR- β_1 en corazón insuficiente (Figura 4) junto con un aumento de este subtipo en linfocitos (Figura 16) de los mismos pacientes; al mismo tiempo, encontramos una disminución en la expresión del subtipo β_2 en linfocitos, cuando en VI insuficiente observábamos un aumento. Todo esto refuerza la idea de que en la IC se produce una regulación a la baja del AR- β_1 en el corazón que no responde a un mecanismo general y por ello no se refleja en otros órganos o tipos celulares del organismo, como es el caso de los linfocitos.

Además de estos mecanismos específicos que sólo se producen en el corazón insuficiente y no se reflejan en linfocitos, la aparente relación encontrada por otros autores en determinados grupos de pacientes, entre la expresión de AR- β o GRK en corazón y linfocitos, podemos atribuirle a una regulación general que podría observarse sólo en circunstancias en las que se está produciendo un cambio en el tono adrenérgico que afecte por igual a distintos órganos y/o sistemas. En esta interpretación coincidimos con otros autores (Atramadal, 2009).

3. Influencia del tratamiento farmacológico de la IC en la expresión de los AR y GRK

Existen diferentes posibilidades en la combinación de fármacos para el tratamiento de la IC, las cuales dependerán principalmente de la etiología causante. Dentro del arsenal terapéutico, destacan dos grupos que resultan imprescindibles por demostrar en múltiples ensayos clínicos una reducción de la mortalidad y de las hospitalizaciones: inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (IECA) y β -bloqueantes. Mientras que los β -bloqueantes actúan directamente sobre los AR encargados de aumentar el ritmo y frecuencia cardiaca, los IECA lo hacen de forma indirecta evitando la síntesis de angiotensina, que posee propiedades vasoconstrictoras, facilitando así el vaciado del corazón a través de la disminución de las presiones arteriales. En definitiva, aunque mediante mecanismos diferentes, ambos tratan de disminuir el compromiso del corazón en situaciones de estrés frenando así su agotamiento y los efectos cardiotóxicos que surgen tras activación de los mecanismos reguladores. Ambos se combinan en los diferentes tratamientos frente a la IC y son en la mayoría de los casos de obligada elección.

En la práctica clínica, el perfil farmacológico que conduce a mejores resultados en cuanto a evolución y supervivencia en pacientes con patologías cardíacas es el de los β -bloqueantes vasodilatadores como el carvedilol, que además de comportarse como un agonista “*biased*” (Wisler y cols. 2007; Rajagopal y cols., 2010; Tzingounis y cols. 2010) sobre adrenoceptores β , también es antagonista de los adrenoceptores α_1 favoreciendo así una disminución de la sobrecarga del VI a través de la vasodilatación periférica. Por otro lado, se ha propuesto que el carvedilol puede favorecer la vasodilatación dependiente de endotelio en pacientes con miocardiopatía dilatada a través de un aumento en la biodisponibilidad de NO (Nishioka y cols., 2007).

En nuestro trabajo, comparando los pacientes con IC tratados con carvedilol frente a aquellos que no recibieron tratamiento con este β -bloqueante, observamos una disminución de la expresión del AR β_1 y de las tres GRK en el VI de los pacientes que recibieron dicho tratamiento (Figura 26), disminución inesperada tratándose de un antagonista de estos receptores, pero que justificaría su efecto cardioprotector. Sin embargo, en los linfocitos circulantes no se observó cambio alguno en la expresión de los AR y GRK tras tratamiento con carvedilol (Figuras 27) lo que indica una acción selectiva sobre el miocardio.

Otro interesante dato que apoya los efectos cardioprotectores del carvedilol, es la disminución de los niveles del péptido natriurético tipo B (BNP) y el pro-BNP aminoterminal (NT-proBNP) (indicador de estrés en la pared miocárdica) en aquellos pacientes que recibieron tratamiento con carvedilol (Figura 25).

A partir de estos resultados en pacientes, tratamos de analizar si los cambios observados eran causa o efecto del tratamiento con carvedilol y para ello escogimos un modelo más simple en el que la única variable determinante de los resultados fuese el tratamiento con carvedilol. Trabajamos con ratas Wistar, que se trataron durante 4 semanas con carvedilol 20 mg/kg/día, una dosis equiparable a la que reciben nuestros pacientes, confirmándose la disminución de la expresión de AR- β_1 , GRK2 y GRK5, a la que se unió una disminución significativa de los AR- α_1 (Figura 28) tras este tratamiento. La disminución en la expresión de los AR- β_1 y las GRK tanto en corazón humano como de rata Wistar tras administración crónica de carvedilol resulta paradójica ya que, en la mayoría de los casos, el tratamiento prolongado con β -bloqueantes conlleva un mecanismo compensador de regulación al alza de los receptores bloqueados. Aunque en algunos casos se ha observado que el tratamiento con ciertos β -bloqueantes como metoprolol o bisoprolol no cambia la expresión (Brodde y cols., 1989; Schmiedebergs, 1989) y el tratamiento con alprenolol la disminuye (Hughes y cols., 1988) estos cambios se han observado en cultivos celulares y no *in vivo*, como ocurre en nuestro caso. La peculiaridad de esta modulación de los AR- β_1 por el carvedilol, podría estar relacionada con su actividad como agonista “*biased*” y explicaría su éxito terapéutico y su capacidad de modular la actividad adrenérgica a través de una disminución de las acciones deletéreas de la continua estimulación del AR- β_1 , asignándole así los conocidos efectos cardioprotectores.

Es interesante señalar que tratamientos *ex vivo*, en corazón aislado de rata Wistar (Figura 30) o *in vitro* sobre células HEK 293 (Figura 31) no originan cambios en los niveles de expresión de AR- β_1 y GRK, lo que parece indicar que la modulación solo se produce tras un tratamiento crónico *in vivo* con carvedilol. También es de destacar que en los pacientes que reciben este tratamiento, los cambios en la expresión del AR- β_1 y las GRK solo se observan en VI y no en linfocitos circulantes, lo que indica que se trata de un mecanismo específico de regulación de la actividad cardiaca.

En lo que atañe al tratamiento con IECA, el captopril no modificó la expresión de los AR y GRK en pacientes con IC (Figura 32), sin embargo mostró en ratas Wistar tratadas durante 4 semanas con una dosis de 50 mg/kg/día, una disminución del AR- α_{1A} , y las cinasas GRK2 y GRK5 (Figura 35). Como vemos, los cambios son diferentes en función del tratamiento y, con los datos obtenidos, no es posible hacer una interpretación de la trascendencia de los cambios encontrados tras el tratamiento con captopril.

4. Cambios de expresión de AR y GRK en corazón y riñón de ratas hipertensas.

La presión arterial es el producto del GC y la resistencia vascular periférica, y los cambios en estos parámetros dependen de la interacción de diversos sistemas que actúan interrelacionados entre sí. Mientras unos tienden a elevar los niveles de presión arterial (actividad adrenérgica, sistema renina-angiotensina, prostaglandinas vasoconstrictoras, endotelinas) otros tienden a disminuirlos (óxido nítrico, prostaglandinas vasodilatadoras, bradikinina). La interacción entre variaciones genéticas y factores ambientales tales como el estrés, la dieta y la actividad física, contribuyen al desarrollo de la HTA esencial. Esta interacción origina los denominados fenotipos intermedios, mecanismos que determinan el fenotipo final de HTA a través del gasto cardíaco y la resistencia vascular total. Los fenotipos intermedios incluyen, entre otros: el sistema nervioso autónomo, el sistema renina-angiotensina, factores endoteliales, hormonas vasopresoras y vasodepresoras, volumen líquido corporal (Maicas y cols., 2003)

En la HTA sostenida se reajusta la actividad de los barorreceptores sin perder su sensibilidad. Esta disfunción facilita la perpetuación de la actividad simpática inapropiadamente elevada de la HTA establecida. La mayor liberación de adrenalina y noradrenalina en individuos con HTA esencial provoca de forma secuencial aumento de la secreción de renina, seguido de una disminución en la excreción de sodio urinario al aumentar la reabsorción tubular y, finalmente, disminuye el flujo sanguíneo renal y la tasa de filtrado glomerular. Existe un feedback positivo del Sistema nervioso simpático y el Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona: la angiotensina II actúa periférica y centralmente para incrementar la descarga simpática (Maicas y cols., 2003).

Este aumento de los niveles de catecolaminas en sangre en busca de compensar resistencias periféricas podría desencadenar con el tiempo cambios en la expresión de los AR y GRK a nivel cardíaco que podrían coincidir con los observados en la IC. Por ello, analizamos los cambios en la expresión de los AR y las GRK en corazón, aorta y riñón obtenidos de dos modelos de ratas hipertensas y sus respectivos controles.

Realizando la comparativa entre donantes y ratas Wistar, existe una clara diferencia a nivel de los subtipos α_1 en VI donde el α_{1B} (Figura 18) aparece como predominante en rata (Jensen y cols., 2009), mientras que en VI humano pasa a ser el α_{1A} (Figura 2). En el caso de los AR- β se mantiene la misma proporcionalidad siendo el mayoritario el subtipo β_1 . Sin embargo, a nivel de las GRK, la cinasa mayoritaria en VI de rata Wistar es la GRK2 (Figura 18) mientras que en VI humano es la GRK5 (Figura 2)

Observando los resultados de expresión de los AR y GRK en los diferentes modelos de hipertensión en ratas utilizados, encontramos importantes diferencias. Mientras que en VI de ratas SHR no aparecieron cambios de expresión de los AR respecto a sus controles WKY, en las ratas Wistar tratadas con L-NAME se observa en VI un aumento en la expresión tanto de AR β_1 como β_2 (Figura 20). Además, se observa un aumento significativo en la expresión de las GRK en VI de ratas tratadas con L-NAME, mientras que en ratas SHR no encontramos tampoco cambios significativos (Figura 21). En riñón de ratas Wistar tratadas con L-NAME, encontramos también un aumento en la expresión de los AR β_1 y β_2 mientras que en riñón de ratas SHR encontramos una disminución del subtipo β_2 (Figura 23). Por lo que respecta a las GRK, en riñón de ratas tratadas con L-NAME encontramos aumentadas las tres isoformas estudiadas mientras que en riñón de ratas SHR solo observamos una disminución significativa de la GRK2. Llama la atención el paralelismo encontrado en los cambios entre el subtipo β_2 y la GRK2 y entre el subtipo β_1 y la GRK5.

Dado que la elevación de las cifras de presión arterial y la hipertrofia cardiaca son semejantes en ambos modelos de ratas hipertensas (Tabla 15), la diferencia en los cambios de expresión observados en uno y otro modelo de hipertensión indica que dichos cambios no son una consecuencia del estado hipertensivo sino, por el contrario, pueden estar implicados en la génesis o bien en los mecanismos moduladores de dicho estado, que serán diferentes según la etiología.

En el caso de las ratas tratadas durante cuatro semanas con L-NAME, potente inhibidor de las sintasas de óxido nítrico (NOS), las cifras de presión arterial se elevan como consecuencia de la disfunción endotelial que supone la inhibición de este mediador vasodilatador. En este modelo, encontramos en corazón y riñón un aumento en los niveles de expresión tanto del AR- β_1 como del - β_2 .

En las ratas SHR la actividad y la expresión de la isoforma endotelial de la NOS (eNOS) se encuentra incrementada (Nava y cols., 1995; 1998) existiendo una mayor producción de NO y, por tanto, se podría pensar que esta mayor disponibilidad favorecería la función endotelial. Sin embargo, esto no ocurre, pues las células endoteliales de las ratas SHR producen más anión superóxido (O_2^-) a partir de la xantina oxidasa, NAD(P)H e incluso de la propia eNOS, lo que disminuye la biodisponibilidad de NO, pero sin llegar a una situación de pérdida completa de la liberación de NO como ocurre en ratas tratadas con L-NAME (Oliver y cols., 2014). En estas ratas SHR, en las que no se observa una marcada disfunción endotelial (Feletou y cols., 2009; 2010; Porteri y cols., 2009), tampoco se observan cambios en la expresión de los AR- β en VI y solo encontramos significativamente disminuida la expresión del AR- β_2 en riñón.

Sabemos que los AR- β se encuentran localizados en el endotelio modulando la liberación de NO (Flacco y cols., 2014). El aumento en la expresión de los AR- β encontrado en corazón y riñón de las ratas hipertensas por tratamiento con L-NAME podría formar parte de un mecanismo compensador que tratase de revertir la pérdida en la producción de este mediador, lo que no ocurre en ratas SHR.

5. La expresión de los AR- β_1 y - β_2 exhibe un patrón de regulación común con la GRK2 y la GRK5 en todos los territorios y condiciones estudiados.

Analizando en conjunto los cambios en la expresión de los AR y las GRK en distintos territorios obtenidos de los modelos animales y humanos, observamos la existencia de un patrón de cambio semejante en el caso del AR- β_2 y la GRK2 y en el caso del AR- β_1 y la GRK5. Esta observación casual, nos llevó a un estudio profundo de la posible relación por lo que, analizamos los resultados anteriormente descritos, tratando de ver si existe una correlación significativa entre cada pareja de genes en distintos territorios, a fin de demostrar de forma más concluyente la existencia del patrón común de expresión, que podría corresponder por una parte, a un mecanismo regulador común para cada pareja de genes y, por otra, a una cierta especificidad de cada cinasa por un subtipo de AR- β .

Los resultados obtenidos evidencian la existencia de una correlación significativa entre los niveles de ARNm del AR- β_2 y la GRK2 y una correlación similar entre los niveles de AR- β_1 y la GRK5. Esta correlación se observa en todos los territorios estudiados y en todas las condiciones patológicas analizadas, lo que sustenta la idea de un patrón común que regula la expresión de ambos genes. La falta de correlación observada entre la expresión de GRK3 y los AR- β_1 o - β_2 , refuerza la hipótesis de un patrón regulador específico para los otros casos.

La expresión de GRK2 esta aumentada en todos los tejidos en los que aumenta la expresión del AR- β_2 , como es el caso del VI (Figura 20 y 21) y el Rñ (Figura 23 y 24) de las ratas tratadas con L-NAME (*vs* las ratas Wistar) y en el VI de los pacientes con IC (*vs* donantes sanos) (Figura 6 y 7). De forma semejante, en los tejidos en los que el AR- β_2 disminuye, como es el caso del Rñ de las ratas SHR (Figura 23 y 24) o los linfocitos de los pacientes con IC (Figura 16 y 17), la expresión de la GRK2 también es menor que la de sus respectivos controles. Además, y en la misma línea que nuestros resultados, en un trabajo previo también se observan cambios paralelos del AR- β_2 y la GRK2 en Aorta y arterias mesentéricas de resistencia obtenidas de ratas SHR o tratadas con L-NAME (Oliver y cols., 2014). Por tanto, todos estos datos proporcionan la primera evidencia de que en diferentes condiciones patológicas y en diferentes tejidos humanos o procedentes de dos cepas

diferentes de ratas, los niveles de ARNm de la GRK2 se correlacionan con la expresión del AR- β_2 .

Por lo que respecta al AR- β_1 , se ha observado un aumento en su expresión, acompañado de un aumento en la expresión de la GRK5, en VI de ratas L-NAME *vs* Wistar (Figura 20 y 21) y en linfocitos de pacientes con IC *vs* voluntarios sanos (Figura 16 y 17), lo que, como ya se ha comentado, sugiere la existencia de un patrón regulador común para ambos genes. Sin embargo, en corazón humano insuficiente, encontramos una regulación a la baja de la expresión del AR- β_1 que no fue acompañada de una disminución similar de la GRK5 (Figura 5 y 7). Por tanto, podemos postular la existencia de, al menos, dos mecanismos reguladores de la expresión de los AR- β_1 : uno de ellos común al mecanismo que regula la expresión de GRK5 y el otro responsable de la regulación específica del AR- β_1 que encontramos en el corazón insuficiente. En este caso, la dramática disminución en la expresión del AR- β_1 , al no ir acompañada de una disminución semejante de la expresión de GRK5 explicaría la pérdida patológica de la función cardiaca característica del corazón insuficiente. Sin embargo, es interesante señalar que, incluso en estas circunstancias, en las que encontramos una disminución específica del AR- β_1 , se mantiene la correlación positiva y significativa entre los genes β_1 y GRK5 cuando analizamos su expresión en cada paciente.

La existencia de un mecanismo común de regulación génica se apoya también en el hecho de que la correlación significativa entre los niveles de ARNm del AR- β_1 y la GRK5 o el β_2 y la GRK2 se observa en muestras humanas procedentes de donantes sanos pero también en pacientes con diferentes patologías cardiovasculares (insuficiencia cardiaca de distinta etiología, post trasplante, hipertensión) (Figura 45 y 46), lo que nos indica que, sin excluir mecanismos adicionales específicos de cada gen, el mecanismo regulador común opera independientemente de la patología. En este sentido hay que señalar que en VD humano, la correlación se observa antes y después del trasplante cardiaco (Figura 46), por lo que actúa con independencia de la terapia inmunosupresora. Además, la genética del corazón trasplantado no coincide con la del paciente receptor y, aun así, se mantiene la correlación observada entre los niveles de ARNm de β_2 /GRK2 y β_1 /GRK5 lo que refuerza la idea de un mecanismo regulador común para cada par de genes.

Estudios previos han demostrado que las distintas isoformas de las GRK pueden ser selectivas actuando sobre un receptor determinado. De hecho, GRK2 puede fosforilar la mayoría de los receptores acoplados a proteínas G *in vitro* (Pitcher y cols., 1998), pero los experimentos *in vivo* demuestran que la GRK2 atenúa la actividad de los AR- β cardiacos y el receptor de la angiotensina II, mientras que no es capaz de desensibilizar los receptores de adenosina o los AR α_1 (Rockman y cols., 1996; Eckhart y cols., 2000). *In vivo*, la GRK5 puede desensibilizar los AR- β y los receptores de adenosina, pero no afecta los receptores de angiotensina II (Brinks y Koch, 2010). Como una consecuencia indirecta de estas

observaciones, podemos asumir que la existencia de una correlación significativa en la expresión génica de una isoforma de GRK y un AR- β determinado podría indicar una actividad específica de esa cinasa por ese subtipo de receptor. Con estas bases, nuestros resultados pueden interpretarse como indicativos de que mayoritariamente, la GRK2 sería responsable de la regulación del AR- β_2 mientras que la GRK5 sería la cinasa responsable de la regulación del AR- β_1 .

En el mismo sentido, el hecho de que en ningún caso los niveles de ARNm de los AR- β correlacionen con los niveles de GRK3 puede interpretarse como la falta de un mecanismo de regulación común. A su vez, ese mecanismo regulador común sería innecesario si, como se ha propuesto previamente, GRK2 y GRK5 son las cinasas que controlan fundamentalmente la contractilidad y cronotropía cardiacas a través de los AR- β , mientras que la GRK3 jugaría un papel en la regulación del crecimiento y la hipertrofia cardiacas a través de la regulación de los AR- α_1 (Iaccarino y cols., 1998a; Vinge y cols., 2007; 2008).

Como se ha comentado anteriormente, la expresión de GRK se altera en condiciones patológicas o tras la administración de agonistas o antagonistas (Iaccarino y cols., 1998a; 1998b; Hurlé, 2001; Díaz y cols., 2002; Fan y cols., 2002; Bezard y cols., 2005; Oyama y cols., 2006; Rubino y cols., 2006; Vinge y cols., 2007; 2008; Schroeder y cols., 2009; Sato, 2015). También se ha observado un cambio en la expresión y actividad de GRK2 o GRK5 en linfocitos y corazón de pacientes (Ungerer y cols., 1993; 1994; Dzimiri y cols., 2002; 2004; Iaccarino y cols., 2005; Ahmed y cols., 2008; Agüero y cols., 2012) o modelos animales de IC (Ungerer y cols., 1996; Rockman y cols., 1998; Anderson y cols., 1999; Iaccarino y cols., 2001; Harding y cols., 2001; Vinge y cols., 2001; Petrofski & Koch, 2003; Brinks & Eckahrt, 2010). Se ha relacionado también a la GRK2 con la hipertrofia cardiaca (Choi y cols., 1997) y el daño miocárdico (Sato y cols., 2015). Finalmente, en los pacientes que utilizan dispositivos de asistencia cardiaca, el aumento en la actividad de GRK2 observado antes de la implantación del dispositivo retorna a valores normales cuando este se ha implantado y ha conseguido normalizar la función cardiaca (Hata y cols., 2006; Akhter y cols., 2010). El problema es que todos estos estudios se centran en analizar únicamente la expresión y/o actividad de la GRK2, sin aportar datos acerca de la expresión de los AR- β_2 . De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, un cambio significativo en los niveles de GRK2 va siempre acompañado de un cambio semejante en los niveles de AR- β_2 luego, para llegar a conclusiones más precisas sobre la trascendencia fisiopatológica de cualquier cambio en la expresión de la GRK2, se hace necesario un estudio paralelo de la expresión del AR- β_2 . Otro tanto podría decirse en el caso de la GRK5 y el AR- β_1 .



¿Cuándo se producen más ataques el corazón? Los días festivos son más delicados. El día de Navidad, el 25 de diciembre, ocupa el primer puesto en número de infartos, seguido del 26 de diciembre, y en tercer lugar, el 1 de enero.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES




CONCLUSIONES

- 1.- En corazón insuficiente se observa una disminución significativa en la expresión del AR- β_1 , junto con un aumento en la expresión de GRK2 y GRK5, pero no de los otros AR estudiados ni de la GRK3. Estos cambios forman parte de un mecanismo protector que reduce la señalización deletérea derivada de la excesiva activación del AR- β_1 inducida por el aumento del tono adrenérgico característico de la IC.
- 2.- Cuando analizamos los cambios en función de la etiología de la IC, vemos que los pacientes con cardiopatías NI-ND no presentan una disminución significativa del AR- β_1 pero sí un aumento en la expresión de GRK2 y GRK5, sin que se observe disminución de la FEVI en este grupo de pacientes. Por el contrario, en pacientes con CI, existe una disminución drástica del AR- β_1 sin aumento en las GRK, siendo los niveles de FEVI menores del 25%. Esto indica que la disfunción miocárdica es atribuible, fundamentalmente a cambios en el AR- β_1 y no tanto a cambios en la expresión de las GRK.
- 3.- La expresión de GRK3 y GRK5 se correlaciona de forma inversa con el diámetro telesistólico y tele-diastólico del VI lo que sustenta el papel protector de estas cinasas en la regulación cardiaca.
- 4.- Existe una correlación inversa entre la expresión del AR- β_1 y la Presión Capilar Pulmonar, la Presión Arterial Pulmonar Media y la Presión Arterial Pulmonar Sistólica lo que confirma que la disminución de la expresión del AR- β_1 en corazón insuficiente implica una reducción en la funcionalidad cardiaca, y por tanto, un aumento de las presiones pulmonares.
- 5.- Nuestros resultados no apoyan la utilización de los linfocitos circulantes como biomarcadores periféricos de los AR o las GRK en situaciones de IC, ya que los cambios observados en corazón no sólo no coinciden con los observados en linfocitos, sino que siguen un patrón opuesto.

6.- Se observa una disminución en la expresión de los AR- β_1 y las GRK en corazón (humano y de rata) tras administración crónica de carvedilol, que no se observa en linfocitos. Es interesante señalar que tratamientos *ex vivo*, en corazón aislado de rata Wistar o *in vitro* sobre células HEK 293 no originan cambios en los niveles de expresión de AR- β_1 y GRK. La peculiaridad de esta modulación de los AR- β_1 por el carvedilol, podría estar relacionada con su actividad como agonista “*biased*”.

7.- Los cambios en la expresión del AR- β_2 van acompañados de cambios semejantes en la expresión de la GRK2. Lo mismo ocurre para el AR β_1 y la GRK5. Estos resultados sugieren la existencia de un mecanismo común de regulación para cada pareja de genes, que se apoya también en la correlación significativa encontrada entre los niveles de ARNm del AR- β_1 y la GRK5 o el β_2 y la GRK2. Sin excluir mecanismos adicionales específicos de cada gen, el mecanismo regulador común opera independientemente de la patología. La falta de correlación observada entre la expresión de GRK3 y los AR β_1 o β_2 , refuerza la hipótesis de un patrón regulador específico en los otros dos casos.



El médico Erasítrato de Chios (304-250 A.C.) fue el primero en descubrir que el corazón funcionaba como una bomba natural

RESUMEN

RESUMEN



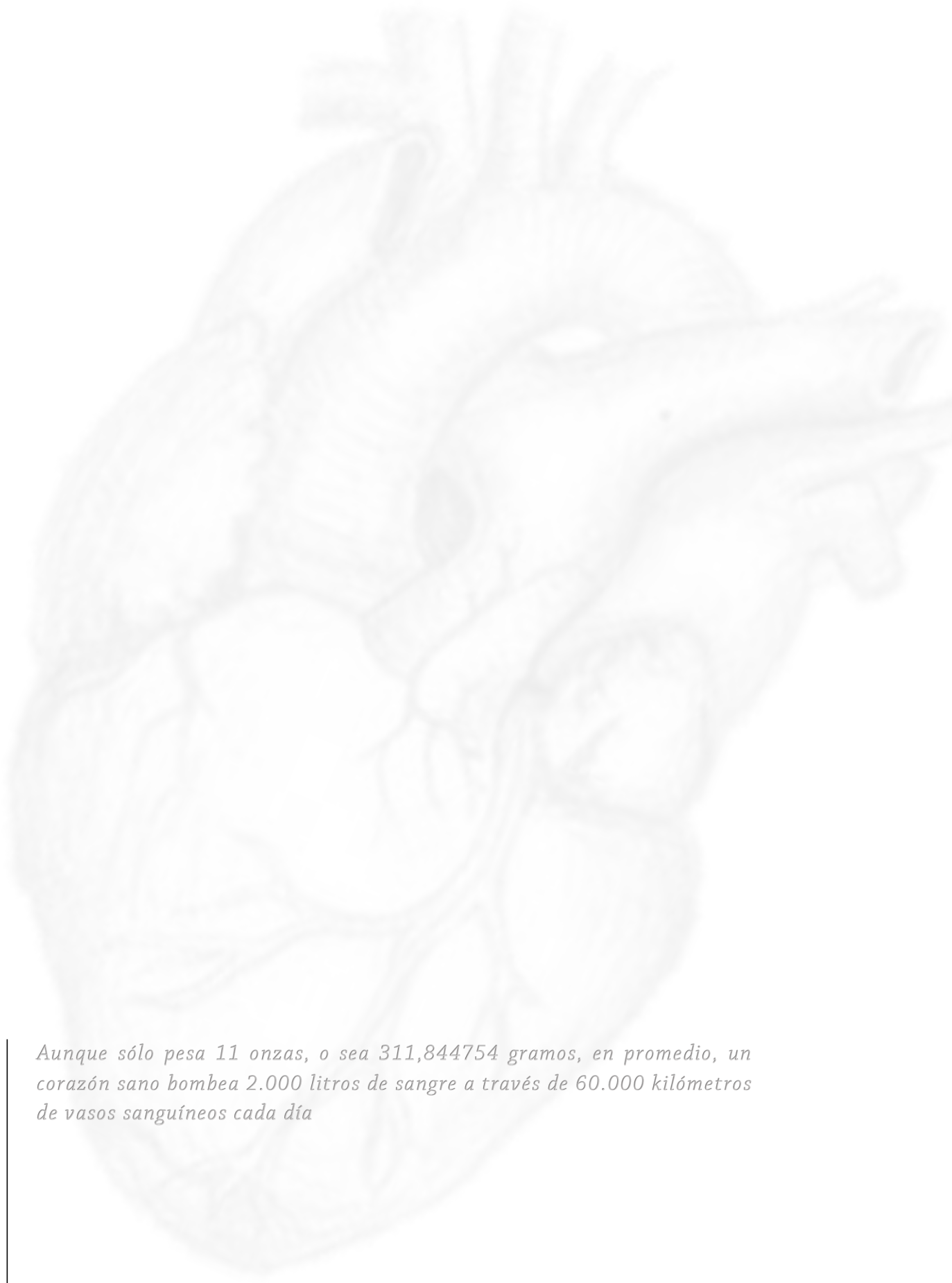
RESUMEN

En la insuficiencia cardíaca humana, se ha observado una disminución en la expresión de los adrenorreceptores β_1 (AR- β_1) junto con un aumento de la expresión/función de la cinasa GRK2, pero los cambios en la expresión de otros AR y GRK no han sido establecidos. Otra cuestión sin resolver es la incidencia de estos mecanismos en función de la etiología y el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. Queda también por determinar la existencia de un patrón transcripcional común que regula los niveles de ARNm de cada isoforma de GRK y los subtipos de AR- β .

Para analizar estas cuestiones, hemos cuantificado la expresión de ARNm y proteína de seis AR (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} , β_1 , β_2 y β_3) y tres GRKs (GRK2, GRK3 y GRK5) en el ventrículo izquierdo (VI) y el ventrículo derecho (VD) y las células mononucleares de sangre periférica (FMLC) de cuatro donantes de corazón, 21 sujetos sanos, 10 pacientes con miocardiopatía isquémica (CI), 17 pacientes con miocardiopatía dilatada (MD), 15 pacientes con cardiopatías no dilatadas no isquémicas (NIND), 17 pacientes con corazón trasplantado y 25 pacientes hipertensos. Un análisis similar se realizó en VI y riñón de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) o ratas con hipertensión inducida por L-NAME y sus controles. Se correlacionaron los cambios en las expresiones de los AR y GRK en muestras humanas, con variables clínicas como la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) y diámetro telesistólico (DTS-VI) y telediastólico (DTD-VI) del VI.

Los principales resultados fueron: 1) la expresión de los AR α_{1A} , β_1 y β_2 en el VI se correlaciona positivamente con FEVI; 2) la expresión de GRK3 y GRK5 correlaciona inversamente con DTS-VI y DTD-VI, apoyando observaciones previas sobre un papel protector para ambas quinasas en corazón insuficiente; 3) la expresión del AR- β_1 disminuye en el VI y VD de CI, en el VI de MD, y en el VD de NIND. Esta diferencia, más que un aumento en la expresión de GRK2 (no observado en CI), determina la FEVI menor en CI y MD *vs.* NIND; 4) En pacientes *vs.* sujetos sanos así como en modelos animales de hipertensión respecto a sus controles, se observaron cambios paralelos en los niveles de ARNm de GRK2 y AR- β_2 o GRK5 y AR- β_1 en cada territorio, así como en las diferentes condiciones fisiopatológicas estudiadas. Por lo tanto, sin excluir otros mecanismos de regulación, el paralelismo observado sugiere un patrón regulador común de los genes AR- β_1 /GRK5 y AR- β_2 /GRK2, que es independiente del tipo celular o la patología; y 5) la correlación observada se produce antes y después del trasplante cardíaco, lo que confirma un patrón común que regula la expresión de cada par de genes y actúa independientemente de la patología.

Podemos concluir que el conocimiento de la expresión y los mecanismos de regulación de los AR- β debe ir acompañado de un análisis similar de las GRK para comprender mejor la implicación del sistema adrenérgico en las patologías cardiovasculares.



Aunque sólo pesa 11 onzas, o sea 311,844754 gramos, en promedio, un corazón sano bombea 2.000 litros de sangre a través de 60.000 kilómetros de vasos sanguíneos cada día

ENGLISH VERSION

ENGLISH VERSION



INTRODUCTION

Human heart failure (HF) is recognized as a major public health problem arising from multiple causes that will affect one in five adults, conferring elevated mortality rates (Liggett *et al.*, 2008). Regardless of the cause, multiple organ systems attempt to compensate for the deteriorating heart and the sympathetic nervous system responds to HF with increased activity, resulting in increased levels of catecholamines, and in an enhanced stimulation of adrenergic receptors (Triposkiadis *et al.*, 2009). Consequently, catecholamines powerfully stimulate the heart function at the expense of overproportional increases in energy consumption (Eschenhagen *et al.*, 2008). This is a nonrigid signaling system that adapts to continuous stimulation by reducing the abundance of β -ARs and increasing the expression and enzymatic activity of G-protein coupled receptor kinases (GRKs), which phosphorylate agonist-occupied receptors and facilitate their endocytosis and desensitization (Noor *et al.*, 2011). As a result of these adaptations, cardiomyocytes in failing hearts lose their responsiveness to catecholamines over time (Eschenhagen *et al.*, 2008).

In spite of this simple scenario, many fundamental questions remain unanswered. The heart expresses different β -ARs (β_1 , β_2 , β_3) and α_1 -ARs (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}), but not α_2 ARs (Brodde *et al.*, 2006; Jensen *et al.*, 2011; 2009; Moniotte *et al.*, 2001; Woodcock, 2007). Most experimental and clinical studies focus on the β_1 -ARs but, what happens with cardiac α_1 -ARs in HF? Furthermore, if elevated levels of catecholamines are the only reason for the previously described down-regulation of β_1 -ARs, is the β_1 -AR subtype the only one that is down-regulated in the failing heart?

The heart also expresses different GRKs (GRK2, GRK3 and GRK5). Differences between the GRKs in subcellular localization, activation mechanism and receptor specificity suggest that they may play nonredundant modulatory roles in the heart (Dorn, 2009; Dzimir *et al.*, 2002; Hata and Koch, 2003; Hendriks-Balk *et al.*, 2008; Metaye *et al.*, 2005). The rapid up- and down-regulation of GRK2 and the less dynamic changes in the GRK5 expression are of particular interest, suggesting that GRK2 may function predominantly in the acute modulation of β -AR signaling, whereas GRK5 may prove more important for chronic modulation (Liggett *et al.*, 2008). Are these GRKs differentially regulated in HF?

Finally, does the regulation of ARs and GRKs differ in the left (LV) and right (RV) ventricle, or depend on HF etiology?

To answer these questions, we quantified mRNA and protein expression of six ARs (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} , β_1 , β_2 , β_3) and three GRKs (GRK2, GRK3, GRK5) in nonfailing hearts and in failing hearts from patients with end-stage HF who had undergone a cardiac transplant. The group included patients with dilated cardiomyopathy or ischemic cardiomyopathy, and patients with other forms of cardiomyopathy (nonischemic, nondilated). We analyzed the functional significance of the changes in the expression of ARs and GRKs by correlating them with the clinical variables related to the cardiac function such as left ventricular ejection fraction, left ventricular end-systolic diameter and left ventricular end-diastolic diameter.

The evidence suggests that the expression of GRKs is strongly controlled at the transcriptional level by several pathways, some of them, as ERK1/2 activation, involved in β -AR signaling pathway (Agüero *et al.*, 2009). However, the existence of a common or different mechanism which regulates the mRNA levels of each GRK isoform and β -AR subtypes (β_1 and β_2) has not been explored yet. Only previous results from our laboratory, working with a reduced group of heart failure patients, have evidenced a correlation between β_1 -AR and GRK2, GRK3 and GRK5 expression in the left ventricle (Huang *et al.*, 2007). In the same way, preliminary experiments in rat aorta and mesenteric resistance arteries showed parallel changes in β_2 -ARs and GRK2 expression in different strains (Iaccarino *et al.*, 2005). Therefore, we believe that studying GRKs gene expression in different tissues and cardiovascular pathologies, whilst comparing with β -ARs expression, may provide information on the mechanisms that regulate them. To this purpose, we performed a quantitative analysis of mRNA levels of β_1 - and β_2 -AR subtypes and the three GRKs (GRK2, GRK3 and GRK5) present in the cardiovascular system in different sites (left and right ventricle, kidney and PBMC). The animal models were normotensive controls and hypertensive (both spontaneous and induced) rats, and the preliminary results obtained in animals were the basis of a more extensive study in patients with different cardiovascular pathologies. The human models studied were healthy controls, patients with systemic hypertension (HT), heart failure (HF) and patients who had undergone heart transplantation.

AIMS

- Analyze differences in RNA expression of α_1 (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}) and β -adrenoceptors (β_1 , β_2 and β_3) and GRKs (GRK2 and GRK5 GRK3) in samples from non-failing, failing and post-transplanted heart, as well as variations of the expression depending on the HF etiology, the clinical variables or the different drug treatments.
- To analyze the usefulness of blood circulating mononuclear cells as potential biomarkers of changes of mRNA levels of ARs and GRKs in heart.
- To analyze the possible existence of a common pattern for the regulation of the expression of ARs and GRKs in human and animal models of cardiovascular disease.

RESULTS

Table legends

Table 1. Fundamental aspects of the physical examination of patients with HF. **Page 57**

Table 2. Definitions and classification of blood pressure levels in office (mmHg). **Page 83**

Table 3. Definitions of hypertension according to the values of blood pressure in and outside office. **Page 84**

Table 4. Stratification of the total cardiovascular risk in categories. **Page 86**

Table 5. Factors other than office blood pressure influencing prognosis; used for stratification of total cardiovascular risk. **Page 86**

Table 6. Peripheral blood mononuclear cell. **Page 104**

Table 7. Heart explants. **Page 105**

Table 8. Type of mortar used according to size of the sample. **Page 114**

Table 9. Taqman Assays used of gene expression. **Page 116**

Table 10. Antibodies used in the study of protein expression. **Page 120**

Table 11. Demographic and anthropometric characteristics of the population. **Page 127**

Table 12. Heart failure etiology. **Page 135**

Table 13. Associated diseases in patients with heart failure. **Page 135**

Table 14. Demographic and anthropometric characteristics of the population included in the PBMC study. **Page 141**

Table 15. Hemodynamic constants in SHR and L-NAME treated rats and their respective controls. **Page 147**

Tables 16. Heart failure treatment. **Page 154**

Table 17. Clinical data of patients with heart failure. **Page 161**

Figure legends

Figure 1. Graphical representation of the linear regression observed between the expression of the two reference genes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and TATA-box binding protein (TBP) in human left ventricle. Data represent the cycle number of GAPDH and TBP in each patient.

Page 118

Figure 2. Expression of ARs and GRKs in the left ventricle (LV) from human non failing heart. A) Bar graph represents mean \pm S.E.M of mRNA level normalized using GAPDH as a housekeeping gene and expressed as $2^{-\Delta C_t}$ of n=4 explants. B) Mean \pm S.E.M of the percentage of AR and GRK expression in each patient.

Page 128

Figure 3. mRNA levels of the different AR and GRK subtypes in biopsies of RV obtained after cardiac transplant. A) Bar graph represents mean \pm S.E.M of mRNA level normalized using GAPDH as a housekeeping gene and expressed as $2^{-\Delta C_t}$ of n=17; B) Mean \pm S.E.M of the percentage of AR and GRK expression in each patient.

Page 129

Figure 4. Expression of α_1 -AR subtypes in failing and non-failing heart. A) Bar graph represents mean \pm S.E.M of mRNA level normalized using GAPDH as a housekeeping gene and expressed as $2^{-\Delta C_t}$ of n=4 LV explants of healthy subjects, n=17 RV biopsies obtained after cardiac transplant, n=42 LV explants of HF and n=31 RV explants of HF. B) Mean \pm S.E.M of the percentage of AR and GRK expression in each patient. In both representations *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 vs. health LV or biopsy RV following the Student's t-test.

Page 130

Figure 5. Expression of β -AR subtypes in failing and non-failing heart. A) Bar graph represents mean \pm S.E.M of mRNA level normalized using GAPDH as a housekeeping gene and expressed as $2^{-\Delta C_t}$ of n=4 LV explants of healthy subjects, n=17 RV biopsies obtained after cardiac transplant, n=42 LV explants of HF and n=31 RV explants of HF. B) Mean \pm S.E.M of the percentage of AR and GRK expression in each patient. In both representations *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 vs. health LV or biopsy RV following the Student's t-test.

Page 132

Figure 6. Relative proportion of AR- α_{1A} , - β_1 and - β_2 in left and right ventricle obtained from non-failing, failing and post-trasplanted heart.

Page 133

Figure 7. Expression of GRKs in failing and non-failing heart. A) Bar graph represents mean \pm S.E.M of mRNA level normalized using GAPDH as a housekeeping gene and expressed as $2^{-\Delta Ct}$ of n=4 LV explants of healthy subjects, n=17 RV biopsies obtained after cardiac transplant, n=42 LV explants of HF and n=31 RV explants of HF. B) Mean \pm S.E.M of the percentage of AR and GRK expression in each patient. In both representations *P < 0.05, **P < 0.01 vs. health LV or biopsy RV following the Student' s t-test.

Page 134

Figure 8. A) mRNA levels for α_1 -AR in the left ventricle or the right ventricle obtained from the three patient groups classified according to ischemic (CI; LV=10 and RV=7), dilated (MD; LV=17 and RV=10), or nonischemic, nondilated cardiomyopathy (NI-ND; LV=15 and RV=9) and in the LV from nonfailing heart (Sano; n=4). B) A representative immunoblot was included in each case. Data represent means \pm SE.

Page 136

Figure 9. mRNA levels for β -AR in the left ventricle or the right ventricle obtained from the three patient groups classified according to ischemic (CI; LV=10 and RV=7), dilated (MD; LV=17 and RV=10), or nonischemic, nondilated cardiomyopathy (NI-ND; LV=15 and RV=9) and in the LV from nonfailing heart (Sano; n=4). B) A representative immunoblot was included in each case. Data represent means \pm SE. One-way ANOVA. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 vs. Sano

Page 137

Figure 10. [3 H]CGP12177 specifically bound in left ventricle from ischemic (CI), dilated (MD) or non- ischemic non-dilated (NI-ND) cardiomyopathy. Data represent means \pm S.E.M of n=3 patients in each group. One-way ANOVA were performed. *P < 0.05 vs. NIND.

Page 138

Figure 11. mRNA levels for GRK in the left ventricle or the right ventricle obtained from the three patient groups classified according to ischemic (CI; LV=10 and RV=7), dilated (MD; LV=17 and RV=10), or nonischemic, nondilated cardiomyopathy (NI-ND; LV=15 and RV=9) and in the LV from nonfailing heart (Sano; n=4). B) A representative immunoblot was included in each case. Data represent means \pm SE. One-way ANOVA. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 vs. Sano.

Page 139

Figure 12. Left ventricle ejection fraction (FEVI) in the different groups of patients classified according to HF etiology . Data represent means \pm S.E.M of n=10 for IC, n=17 for MD and n=15 for NIND. One-way ANOVA were performed. *P < 0.05, **P < 0.01 vs. NIND.

Page 139

Figure 13. Left ventricle end-systolic or end-diastolic diameter (DTS-VI or DTD-VI) in the different groups of patients classified according to HF etiology. Patients NIND n=10, MD n=13 and CI n=14. Data represent means \pm S.E.M. One-way ANOVA were performed. *P<0.05, **P < 0.01, ***P<0.01 vs NIND.

Page 140

Figure 14. mRNA expression levels of the different AR and GRK according to levels of FEVI. Patients with FEVI \leq 25% n=21 and FEVI>25% n=6. Data represent means \pm S.E.M. t-Student were performed. *P < 0.05, **P < 0.01 FEVI \leq 25% vs. FEVI>25%.

Page 140

Figure 15. Expression of AR and GRK in peripheral blood mononuclear cells (FMLC) of healthy patients. A) Bar graph represents mean \pm S.E.M of mRNA level normalized using GAPDH as a housekeeping gene and expressed as $2^{-\Delta Ct}$ of n=21 B) Mean \pm S.E.M of the percentage of AR and GRK expression in each patient.

Page 142

Figure 16. mRNA levels for β -AR in peripheral blood lymphocytes (FMLC) of healthy subjects and patients with cardiovascular diseases. Patient groups classified according to healthy volunteers (Sano; n=21), Hypertension (HT; n=21), Heart Failure (IC; n=14) and Heart transplant (TC; n=17). Data represent means \pm SE. One-way ANOVA. *P < 0.05, ***P < 0.01 vs. Sano.

Page 143

Figure 17. mRNA levels for GRK in peripheral blood lymphocytes (FMLC) of healthy subjects and patients with cardiovascular diseases. Patient groups classified according to healthy volunteers (Sano; n=21), Hypertension (HT; n=21), Heart Failure (IC; n=14) and Heart transplant (TC; n=17). Data represent means \pm SE. One-way ANOVA. *P < 0.05, **P < 0.01 vs. Sano.

Page 144

Figure 18. mRNA levels of the different AR and GRK subtypes in LV and entire heart of Wistar rat. A) Bar graph represents mean \pm S.E.M of mRNA level normalized using GAPDH as a housekeeping gene and expressed as $2^{-\Delta Ct}$ of n=5; B) Mean \pm S.E.M of the percentage of AR and GRK expression in each animal.

Page 146

Figure 19. mRNA levels of α_1 -AR subtypes in LV of SHR / WKY and treated and untreated Wistar rats with L-NAME . A) Bar graph represents mean \pm S.E.M of mRNA level normalized using GAPDH as a housekeeping gene and expressed as $2^{-\Delta Ct}$ of n=3-5 B) Mean \pm S.E.M of the percentage of AR and GRK expression in each animal. t-test were performed. *P < 0.05.

Page 148

Figure 20. mRNA levels of β -AR subtypes in LV of SHR / WKY and treated and untreated Wistar rats with L-NAME. A) Bar graph represents mean \pm S.E.M of mRNA level normalized using GAPDH as a housekeeping gene and expressed as $2^{-\Delta Ct}$ of n=3-5; B) Mean \pm S.E.M of the percentage of AR and GRK expression in each animal. t-test were performed. *P < 0.05, **P < 0.01.

Page 149

Figure 21. mRNA levels of GRK in LV of SHR / WKY in LV of and treated and untreated Wistar rats with L-NAME . A) Bar graph represents mean \pm S.E.M of mRNA level normalized using GAPDH as a housekeeping gene and expressed as $2^{-\Delta Ct}$ of n=3-5; B) Mean \pm S.E.M of the percentage of AR and GRK expression in each animal. t-test were performed. *P < 0.05.

Page 150

Figure 22. mRNA levels of α_1 -AR subtypes in kidney of SHR / WKY and treated and untreated Wistar rats with L-NAME . A) Bar graph represents mean \pm S.E.M of mRNA level normalized using GAPDH as a housekeeping gene and expressed as $2^{-\Delta Ct}$ of n=3-5; B) Mean \pm S.E.M of the percentage of AR and GRK expression in each animal. t-test were performed. *P < 0.05.

Page 151

Figure 23. mRNA levels of β -AR subtypes in kidney of SHR / WKY and treated and untreated Wistar rats with L-NAME . A) Bar graph represents mean \pm S.E.M of mRNA level normalized using GAPDH as a housekeeping gene and expressed as $2^{-\Delta Ct}$ of n=3-5; B) Mean \pm S.E.M of the percentage of AR and GRK expression in each animal. t-test were performed. *P < 0.05, **P < 0.01.

Page 152

Figure 24. mRNA levels of GRKs in kidney of SHR / WKY and treated and untreated Wistar rats with L-NAME . A) Bar graph represents mean \pm S.E.M of mRNA level normalized using GAPDH as a housekeeping gene and expressed as $2^{-\Delta Ct}$ of n=3-5; B) Mean \pm S.E.M of the percentage of AR and GRK expression in each animal. t-test were performed. *P < 0.05, **P < 0.01.

Page 153

Figure 25. NT-pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) levels in patients treated or untreated with carvedilol. Data represent means \pm S.E.M of n=10-12 patients in each group. t-test were performed. *P < 0.05.

Page 155

Figure 26. mRNA levels of the different AR and GRK subtypes in left ventricle obtained from the two patient groups classified according to treatment with or without carvedilol. Data represent means \pm SE of n=18 untreated and n=17 treated. t-test were performed. *P < 0.05, **P < 0.01.

Page 155

Figure 27. mRNA levels of the different AR and GRK subtypes in peripheral blood lymphocytes from the two patient groups classified according to treatment with or without carvedilol. Data represent means \pm SE of n=7 untreated and n=5 treated.

Page 156

Figure 28. mRNA levels of the different AR and GRK subtypes in left ventricle from Wistar rats treated with or without carvedilol. Data represent means \pm SE of n=4. t-test were performed. *P < 0.05, **P < 0.01.

Page 156

Figure 29. mRNA levels of the different AR and GRK subtypes in aorta from Wistar rats treated with or without carvedilol. Data represent means \pm SE of n=4. t-test were performed. *P < 0.05.

Page 157

Figure 30. mRNA levels of the different AR and GRK subtypes in left ventricle from Wistar rats treated with or without carvedilol ex vivo. Data represent means \pm SE of n=4.

Page 157

Figure 31. mRNA levels of the different AR and GRK subtypes in HEK 293 cells treated with or without carvedilol. Data represent means \pm SE of n=4.

Page 158

Figure 32. mRNA levels of the different AR and GRK subtypes in left ventricle obtained from the two patient groups classified according to treatment with or without captopril. Data represent means \pm SE of n=12 untreated and n=23 treated.

Page 158

Figure 33. mRNA levels of the different AR and GRK subtypes in peripheral blood lymphocytes from the two patient groups classified according to treatment with or without captopril. Data represent means \pm SE of n=6 untreated and n=8 treated.

Page 159

Figure 34. mRNA levels of the different AR and GRK subtypes in peripheral blood lymphocytes from patients with hypertension classified according to treatment with or without ACEI. Data represent means \pm SE of n=15 untreated and n=10 treated.

Page 159

Figure 35. mRNA levels of the different AR and GRK subtypes in left ventricle from Wistar rats treated with or without captopril. Data represent means \pm SE of n=4. t-test were performed. *P < 0.05, **P < 0.01.

Page 160

Figure 36. mRNA levels of the different AR and GRK subtypes in aorta from Wistar rats treated with or without captopril. Data represent means \pm SE of n=4. t-test were performed. **P < 0, 01.

Page 160

Figure 37. Graphical representation of the linear regression observed between the expression of AR and GRK in the human failing left ventricle and the left ventricular ejection fraction (FEVI) of each patient. Significant linear regression if P < 0.05.

Page 162

Figure 38. Graphical representation of the linear regression observed between the expression of β_2 -AR in the human failing left ventricle and cardiac output (GC) of each patient. Significant linear regression if P < 0.05

Page 162

Figure 39. Graphical representation of the linear regression observed between the expression of GRK in the human failing left ventricle and the left ventricular end-systolic diameter (DTS-VI) or end-diastolic (DTS-VI). Significant linear regression if P < 0.05.

Page 162

Figure 40. Graphical representation of the linear regression observed between the expression of AR and GRK in the human failing left ventricle and Pulmonary artery pressure (PAPM) and systolic pulmonary artery pressure (PAPS) of each patient. Significant linear regression if P < 0.05.

Page 163

Figure 41. Graphical representation of the linear regression observed between the expression of AR and GRK in the human failing left ventricle and pulmonary capillary wedge pressure (PCP) of each patient. Significant linear regression if P < 0.05.

Page 163

Figure 42. Graphical representation of the linear regression observed between the mRNA levels of each adrenergic receptor (AR) in the left ventricle and right ventricles of the same patient. mRNA levels of each gene were expressed as $2^{-\Delta Ct}$, with GAPDH as the housekeeping gene. Significant linear regression ($P < 0.05$) is represented as a continuous line and nonsignificant regression as a dotted line.

Page 164

Figure 43. Graphical representation of the linear regression observed between the mRNA levels of each adrenergic receptor (AR) in the left ventricle and Peripheral blood mononuclear cell (FMLC) of the same patient. mRNA levels of each gene were expressed as $2^{-\Delta Ct}$, with GAPDH as the housekeeping gene. Significant linear regression ($P < 0.05$) is represented as a continuous line and nonsignificant regression as a dotted line.

Page 165

Figure 44. Graphical representation of the linear regression observed between the mRNA levels of each adrenergic receptor (AR) in the right ventricle of biopsies obtained after cardiac transplant and Peripheral blood mononuclear cell (FMLC) of the same patient. mRNA levels of each gene were expressed as $2^{-\Delta Ct}$, with GAPDH as the housekeeping gene. Significant linear regression ($P < 0.05$) is represented as a continuous line and nonsignificant regression as a dotted line.

Page 165

Figure 45. Graphical representation of the linear regression observed between the mRNA levels of each β -adrenoceptor subtype (β_1 , β_2) and GRK2 or GRK5 in the left ventricle and the right ventricle from failing hearts and biopsies of the right ventricle obtained after cardiac transplant. Significant linear regression ($P < 0.05$) is represented as a continuous line.

Page 166

Figure 46. Graphical representation of the linear regression observed between the mRNA levels of β -adrenoceptor subtype (β_1 , β_2) and GRK2 or GRK5 in peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers, patients with cardiovascular pathologies (hypertension and heart failure) and patients submitted to cardiac transplant. Significant linear regression ($P < 0.05$) is represented as a continuous line.

Page 167

DISCUSSION

Our study describes the expressions of the α_1 and β -AR subtypes and the three GRKs (GRK2, GRK3 and GRK5) involved in their regulation in different types of heart failure, and compare them to the expressions of the same genes in nonfailing hearts in order to answer the following questions:

1. *What happens with cardiac α_1 -ARs in HF?*

The density of human cardiac α_1 -AR is 10 – 15% of that of β -AR (Brodde *et al.*, 2006; Jensen *et al.*, 2009; Woodcock *et al.*, 2007; 2008). Although the present data show no changes in the expression of α_1 -ARs in human HF, a relative increase in its proportion at the expense of a lower β -AR density is observed. Among the three subtypes, α_{1B} predominates in rodents but, and according to Jensen (Jensen *et al.*, 2009), our results demonstrate that the mRNA level for the α_{1A} -subtype in the human myocardium is, by far, the most abundant. In addition, the expression of α_{1A} -AR in the LV but not that of α_{1B} or α_{1D} , significantly correlates with the LVEF, suggesting that α_{1A} -ARs may contribute to maintain cardiac inotropy in the HF. Although β_1 -ARs are not generally considered to be major regulators of the cardiac contractile function under physiological conditions, they are thought to have more influence under pathological conditions, such as HF (Jensen *et al.*, 2011). The correlation found between the LVEF and mRNA levels for α_{1A} -AR in the human ventricle, not previously described, suggests that some degree of α_{1A} activation could be beneficial in this pathology, as previously proposed in mouse (O'Connell *et al.*, 2006) and humans (Skomedal *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2010). In addition, previous data have associated α_{1A} -ARs with cardioprotection, whereas α_{1B} -ARs are associated with cardiac growth and hypertrophy (Jensen *et al.*, 2011; Woodcock *et al.*, 2008). These beneficial effects of α_{1A} -AR activation in failing human hearts could explain the harmful results of β_1 -blockade in clinical trials such as the Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT, 2000).

2. *Is the β_1 -AR the only one to be downregulated in the HF?*

In human NFH, β_1 -AR constitutes 70 – 80% of the total β -ARs, while β_2 -AR constitutes the remaining 20 – 30% with β_3 -AR being poorly expressed (Brodde *et al.*, 2006; Moniotte *et al.*, 2001; Xiang *et al.*, 2003). In HF, the β_1 -to- β_2 ratio decreases to 50/50 or drops even lower (Lowe *et al.*, 2002; Port *et al.*, 2001; Vanderheyden *et al.*, 2008), and this change is attributed to selective β_1 -AR downregulation (Bristow *et al.*, 1993; Brodde *et al.*, 2006; Engelhardt *et al.*, 1996; Lohse *et al.*, 2003). Similar results are found when analyzing the

mRNA levels in end-stage HF (the β_1 -to- β_2 ratio at 40/60), thus confirming the existence of a specific mechanism that dramatically downregulates the β_1 -AR expression in HF.

3. *What could be the reason for this specific downregulation of β_1 -ARs in the HF?*

In patients with end-stage HF who exhibit increased levels of catecholamines, an overactivity of cardiac β_1 -ARs has deleterious consequences for the heart as has been shown in transgenic mice (Xiang *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2004; 2006). Accordingly, the specific decrease in the expression and functionality of β_1 -AR could be a protective mechanism for the damaged heart (Eschenhagen *et al.*, 2008). Moreover, the close correlation found in the expression of the other five adrenoceptors between the LV and RV, not observed for β_1 -AR, corroborates with the existence of a specific regulation for this subtype in each chamber. In this scenario, β_2 -AR could play a predominant functional role and our results show that in HF, LVEF directly correlates not only with β_1 but also with the expression of β_2 - and α_{1A} -AR, indicating that the three subtypes could play a role in regulating cardiac functionality in the failing myocardium.

4. *Are the three GRKs present in the human heart (GRK2, GRK3, and GRK5) differentially regulated in HF?*

Abundance of the three different GRKs characterized in the heart follows the order GRK5 > GRK2 \geq GRK3 and corroborates previous data in the human heart (Liggett *et al.*, 2008; Triposkiadis *et al.*, 2009; Ungerer *et al.*, 1994). A nonsignificant increase in the expression of the three GRKs was observed in HF, but an interesting result not previously evidenced is the higher expression of GRK3 and GRK5 associated with a lower degree of the LVESD or LVEDD, adding new information to previous findings supporting a protective role for GRK3 in the cardiovascular system (Oliver *et al.*, 2010; Vinge *et al.*, 2008) and contributing to a better understanding of the position of the GRK3 gene in a locus on a chromosome associated with LV mass and contractility (Arnett *et al.*, 2001). The inverse correlation found between the GRK5 expression (a kinase that modulates cardiac β_1 activity) and cardiac hypertrophy supports clinical evidence for a protective role of a GRK5 polymorphism in HF that inhibits β_1 -AR signaling more effectively (Liggett *et al.*, 2008). As the present results evidence, the higher expression of both GRK3 and GRK5 correlates with a better clinical status focusing on LVESD, LVEDD or LVEF. A possible explanation stems from the following observation: the Gs/cAMP pathway, which mediates inotropic and chronotropic responses, is stimulated by β_2 -ARs in the heart, but with lower efficiency than β_1 -ARs (Brodde *et al.*, 2001). Unlike β_1 -AR, β_2 -AR also interacts with an inhibitory Gi protein, with the phosphorylated form of β_2 -AR apparently doing so preferentially (Port *et al.*, 2001). The β_2 -AR-Gi signaling pathway plays a crucial role in cardioprotection against apoptotic death

of cardiomyocytes (Xiao *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2005). Thus increased GRK activity could result in an increased phosphorylation of the β_2 -subtype then favoring the cardioprotective mechanism mediated by the β_2 /Gi pathway.

5. *Does the regulation of ARs and GRKs differ depending on HF treatment and/or etiology?*

No significant differences were found in the expression of ARs and GRKs depending on the drug regimen of patients. Only the subgroup treated with the α_1/β -AR antagonist carvedilol exhibits an upregulation of the α_{1A} subtype in the RV, which can be interpreted as consequence of a continuous blockade of this subtype and could be involved in the protective effect of carvedilol on HF patients. No significant differences were found in the expression of β -ARs indicating that carvedilol treatment was not a determinant factor in the changes observed in HF. Among the three subgroups of cardiopathies analyzed, patients with DC, patients with IC, and patients with NINDC, the cardiac explants from patients with NINDC exhibit the greatest β_1 -AR expression in the LV, which is slightly lower but not significantly different to NFH, and could be the reason for the significantly higher LVEF found in this patient subgroup. Interestingly in NINDC, the downregulation of β_1 -AR is greater in the RV. As the NINDC group presents a better ejection fraction than IC or DC, together with a poor therapeutic response to β -blockers, future work to specifically address HF patients with a preserved ejection fraction could determine the clinical implication of the more marked decrease in the expression of the β_1 -ARs in the RV of this patient subgroup and its consequences for the pharmacological management of HF with a preserved ejection fraction. Conversely, patients with DC exhibit a downregulation of the β_1 -AR only in the LV. Finally, the cardiac explants from patients with IC present a lower expression of β_1 -ARs in both LV and RV. Then, a selective downregulation of the β_1 -AR is observed depending on HF etiology. The protective role of the previously discussed β_1 -AR downregulation is further supported by the fact that among the three types of HF analyzed, the IC patients who have had considerable, acute cardiac injury exhibit the lowest β_1 -ARs expression in both LV and RV. In DC and NINDC, an increased expression of the GRK2 is observed, thus corroborating previous studies describing the upregulation of GRK2 in HF (Dorn *et al.*, 2009; Dzimir *et al.*, 2004; Hata *et al.*, 2003; Iaccarino *et al.*, 2005; Ungerer *et al.*, 1993; 1994; Vinge *et al.*; 2001). The rapid up- and downregulation of GRK2 observed in previous studies (Liggett *et al.*, 2008) suggests that GRK2 may function predominantly in the acute modulation of β -AR signaling. In this case, the GRK2 upregulation observed in DC and NINDC could relate to the chronic elevation of the sympathetic nervous system activity in HF (Rengo *et al.*, 2011), to the clinical severity of HF, or to pharmacological treatment (Aguero *et al.*, 2012). Therefore, a more profound analysis of GRK2 expression in relation to circulating catecholamines or treatment with β -blockers or dobutamine, dopamine, and

norepinephrine could be the aim of a future work. Nevertheless, an interesting result is noted in the IC patients group where the expression of the three GRKs is not statistically different to NFH but is lower than DC and NINDC. Therefore, those IC patients with a lower expression of GRK2 and β_1 -ARs exhibit markedly altered cardiac activity, as the LVEF indicates. Thus the downregulation of β_1 -ARs, and not the upregulation of GRK2, appears to be the crucial maladaptive mechanism that determines the characteristic lower ejection fraction in IC patients. The results obtained for NINDC corroborate this hypothesis since this group exhibits a higher expression of β_1 -ARs in the LV together with a higher LVEF, irrespectively of the increased expressions of GRK2 and GRK5 in this chamber.

6. *Does changes in the expression of ARs and GRKs in PBMC mirror changes in the myocardium?*

The pathophysiological significance of the changes in mRNA levels of β_1 , β_2 , GRK2 and GRK5 observed in PBMC need to be determined, but it is remarkable that these changes found in PBMC from patients before heart transplant were reverted after cardiac transplantation.

The studies in hypertensive humans did not permit to determine whether the changes observed in PBMC accurately mirrored those occurring in the heart or the vasculature of hypertensive patients. This question was clarified in spontaneously hypertensive rats and in salt sensitive hypertensive Dahl rats, identifying increased GRK2 protein expression in PBMC and vasculature as a point of convergence in hypertension of different etiology (Gros *et al.*, 2000). These evidences indicate that, in some cases, changes in the expression of β -ARs or GRK2 in heart and vessels were mirrored by expression levels in PBMC (Hata *et al.*, 2006; Iaccarino *et al.*, 2005; Oyama *et al.*, 2005) thus leading to the possibility that PBMC could be used as surrogate readout of myocardial, renal or vascular expression of a given protein. However, present results indicate that changes in the mRNA levels of β -ARs and GRKs found in PBMC not always reflect what occurs in the myocardium from SHR animals: whereas a decrease in β_1 -AR expression was found in PBMC, no changes in β -AR and GRKs expression in heart, and a decrease in β_2 and GRK2 in kidney were observed in hypertensive animals. We have previously studied the expression of β_1 and β_2 -ARs and GRK2 in aorta and mesenteric resistance arteries of the same rat strains and different changes were also observed in each vessel (Oliver *et al.*, 2009; 2014).

The same discrepancy was found between heart and PBMC in HF patients: the well-known decrease in the expression of β_1 -ARs observed in failing heart was accompanied by an increase in the expression of β_1 -ARs in PBMC from the same patients. At the same time, β_2 -AR and GRK2 increases in the failing LV whereas both genes decrease in PBMC of the

same patients. Finally, we found an increased expression of GRK5 in PBMC from HF patients, not observed in heart from these patients.

These observations does not support the general assumption that PBMC could be used as a peripheral marker of myocardial mRNA changes, specially, if these changes are circumscribed to an organ or cell and did not respond to a general pathway.

7. Does the regulation of ARs and GRKs expression in a tissue follow a common pattern?

The present work describes the expression of β_1 and β_2 -AR subtypes, GRK2, GRK3 and GRK5 in: a) heart and PBMC from patients with HF, before and after cardiac transplant; b) PBMC from patients with essential hypertension; c) heart, aorta and kidney from two animal models of hypertension (SHR and LNHR). Our major finding was the existence of a common transcriptomic pattern which regulates these genes and was evidenced by the significant correlation between the mRNA levels of GRK2 and β_2 -ARs, and GRK5 and β_1 -AR found in all of the analyzed territories. In addition, specific regulation of β_1 -AR appeared to be associated to a given pathology, which modulates the β_1 mRNA expression without any similar change in GRKs transcription.

Present data provide the first evidence that, in humans and different rat strains, changes in the mRNA levels of GRK2 in a given tissue are accompanied by a similar change in the expression of β_2 -ARs, and this occurs in different territories as well as in different physiological or pathological cardiovascular conditions. In fact, in all tissues where GRK2 expression was increased, as occurs in LV from HF patients vs healthy donors or LV and kidney from LNHR vs Wistar rats, the expression of β_2 was also increased. In the same way, in kidney from SHR, or PBMC from HF patients, where GRK2 expression was decreased, β_2 -AR expression was also lower than their respective controls. According to present results, parallel changes in β_2 -AR/GRK2 expression has been also described in aorta and small mesenteric arteries from SHR and LNHR animals (Oliver *et al.*, 2014). Moreover, in spite of the particular β_1 -AR down-regulation observed in the failing heart, an increase in GRK5 expression, accompanied by an increase in β_1 expression was observed in other cases (LV from LNHR vs Wistar, human PBMC from HF vs healthy volunteers). These observations suggest the existence of a common regulatory mechanism for GRK2/ β_2 -AR and GRK5/ β_1 -AR genes.

The existence of this common transcriptional pattern for each β -ARs and GRK pair was also supported by the significant correlation found between β_1 -AR and GRK5 mRNA levels, or GRK2 and β_2 -AR, when we analyze their expression in human samples from healthy subjects but also in samples obtained from patients with different cardiovascular diseases, indicating that this pattern operates independently of the pathology. It is remarkable that in human RV, the significant correlation between GRK2/ β_2 -ARs and GRK5/ β_1 -ARs occurs before and after the cardiac transplant, confirming that the common pattern which regulates the expression of each pair of genes in a given tissue, acts independently of the disease.

The same relationship, observed between β_2 -AR and GRK2 expression in all of the studied tissues, was also found when considering changes observed in post-transplant patients as a function of days since the cardiac intervention: in PBMC, both β_2 -AR and GRK2 increased their expression with increasing time since transplant, as has been previously described (Aguero *et al.*, 2009), whereas in RV, no changes in β_2 -AR nor in GRK2 expression were found with increasing time after heart transplant.

Previous evidences proved that GRK isoforms could be quite selective towards a given receptor subtype. In fact, GRK2 can phosphorylate most GPCRs *in vitro* (Pincher *et al.*, 1998) but *in vivo* experiments have shown GRK2 attenuates cardiac β -ARs and Angiotensin II receptor signaling whereas it does not desensitize adenosine receptors or α_1 -ARs (Rockman *et al.*, 1996; Eckhart *et al.*, 2000). *In vivo* GRK5 can desensitize β -ARs and adenosine receptors but does not appear to desensitize Ang II receptors (Brinks and Koch, 2010). Finally, GRK3 could not be currently involved in the regulation of β -ARs, as previous evidences in animal models and *in vitro* studies indicate (Eckhart *et al.*, 2000; Vinge *et al.*, 2008). As an indirect approach, we assume that the existence of significant correlations in the genetic expression of a GRK isoform and a β -AR subtype would indicate a specific activity of a particular GRK on a given AR. On the basis of this assumption, present results showing a significant correlation between β_2 -AR/GRK2, and β_1 /GRK5 in all the territories and conditions analyzed, would be interpreted as GRK2 being mainly responsible for β_2 -AR regulation, while β_1 -AR being mainly dependent on GRK5 phosphorylation.

The preceding observations suggest the existence of a regulatory mechanism which, in parallel, modulates the expression of ARs and GRKs following a common transcriptional pattern (more strongly evidenced in the case of β_2 -AR and GRK2 genes) who accommodate the expression of GRKs to that of β -ARs, and ensure the proper functioning of these signaling pathways. However, this conclusion did not exclude the possibility that a specific regulatory transcriptional mechanism would be also responsible of changes in the expression

of β -ARs and GRKs in the failing LV, and in this case, the regulation is not mirrored by other territories as RV or PBMC from the same subjects.

In the last years, it has become evident that expression of GRKs is altered in pathological conditions. Administration of agonists can increase the level of GRKs (Iaccarino *et al.*, 1998; Hurlé *et al.*, 2001; Diaz *et al.*, 2002; Fan *et al.*, 2002; Oyama *et al.*, 2006; Rubino *et al.*, 2006; Schroeder *et al.*, 2009) whereas administration of antagonists or removal of endogenous agonists decreases it (Hurlé *et al.*, 2001; Diaz *et al.*, 2002; Bezard *et al.*, 2005; Oyama *et al.*, 2006; Ahmed *et al.*, 2008). Alterations in the expression levels of GRKs has been evidenced in different human diseases (Metaye *et al.*, 2005; Penela *et al.*, 2006; Brinks and Koch, 2010; Belmonte and Blaxall, 2011). Cardiac and lymphocytic overexpression and activity of GRK2 or GRK5, were associated with human (Ungerer *et al.*, 1993; 1994; 1996; Dzimiri *et al.*, 2002; 2004; Iaccarino *et al.*, 2005; Agüero *et al.*, 2012; Montó *et al.*, 2012) or experimental models of HF (Ungerer *et al.*, 1996; Rockman *et al.*, 1998; Andersson *et al.*, 1999; Iaccarino *et al.*, 2001; Harding *et al.*, 2001; Vinge *et al.*, 2001; Petrofski *et al.*, 2003; Brinks and Koch, 2010). GRK2 has been also related to cardiac hypertrophy (Choi *et al.*, 1997) and myocardial infarction (Ungerer *et al.*, 1996) and the nuclear localization of GRK5, as well as its gradual expression changes in HF, suggests that this isoform seems to be directly related to myocardial hypertrophic gene transcription through its role as a histone deacetylase kinase (Martini *et al.*, 2008). More interestingly, in patients using left ventricular assist devices increased GRK2 protein level was found prior to overt clinical HF (Andersson *et al.*, 1999) which returns to normal levels when β -AR activity and ventricular function were improved (Hata *et al.*, 2006; Akhter *et al.*, 2010).


Several clinical manifestations of hypertension have been also associated to increased GRK2 expression (Harris *et al.*, 2008; Brinks and Eckhart, 2010). GRK2 is selectively up-regulated in PBMC from young borderline hypertensive vs normotensive patients (Gros *et al.*, 1997; 1999; Cohn *et al.*, 2009). However, the increased protein expression in human PBMC was accompanied (Cohn *et al.*, 2009) or not (Gros *et al.*, 1999) by increased levels of mRNA, suggesting the intervention of regulatory posttranscriptional mechanisms.

According to present results, a significant up-regulation of β_2 -AR was always accompanied by up-regulation of GRK2 and, in failing heart, this could be a protective mechanism that reduces detrimental signaling through β_1 -ARs through Gs proteins (Xiao *et al.*, 2004; 2006; Zhu *et al.*, 2005). Unlike β_1 -ARs, β_2 -ARs interacts with an inhibitory Gi protein, with the phosphorylated form of β_2 -ARs apparently doing so preferentially (Port and Bristow, 2001). The β_2 -AR-Gi signaling pathway plays a crucial role in cardioprotection against apoptotic death of cardiomyocytes (Zhu *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2006). The existence of a common

transcriptomic mechanism implies that increased GRK2 and β_2 -AR expression in HF favors the cardioprotective mechanism mediated by the β_2 /Gi pathway.

CONCLUSIONS

1. α_{1A} -AR is the main expressed α_1 -subtype in human HF, and its expression in the LV positively correlates with LVEF
2. The expression of GRK3 and GRK5 in the LV inversely correlates with LVESD and LVEDD, supporting previous observations about a protective role for both kinases in FH
3. β_1 -ARs expression is downregulated in the LV and RV of IC, in the LV of DC, and in the RV of NINDC. This difference, more than an increased expression of GRK2, not found in IC patients, determines the lower LVEF observed in IC and DC vs. NINDC.
4. Present data provides evidence of a close relationship between β_2 -AR/GRK2 and β_1 -AR/GRK5 mRNA levels in different territories from human and animal models of cardiovascular disease suggesting the existence of a common modulatory mechanism of their expression. This highlights the need to focus, not only on GRKs but also in β_1 - or β_2 -AR changes to completely understand the involvement of β -AR/GRKs pathways in these diseases.



En 1816, el médico francés René Théophile Hyacinthe Laënnec, avergonzado por poner su oreja en el pecho de las damas para escuchar el corazón, creó un cilindro de madera para hacerlo, naciendo así el primer estetoscopio.

ABSTRACT

ABSTRACT




ABSTRACT

Downregulation of β_1 -adrenergic receptors (β_1 -ARs) and increased expression/function of G-protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) have been observed in human heart failure, but changes in expression of other ARs and GRKs have not been established. Another unresolved questions are the incidence of these compensatory mechanisms depending on heart failure etiology and treatment and the existence of a common transcriptional pattern which regulates the mRNA levels of each G-protein coupled receptor kinase (GRK) isoform and β -adrenoceptor subtypes (β -ARs).

To analyze these questions, we quantified the mRNA/protein expressions of six ARs (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} , β_1 , β_2 , and β_3) and three GRKs (GRK2, GRK3, and GRK5) in left (LV) and right ventricle (RV) and peripheral blood mononuclear cells from four heart donors, 21 healthy subjects, 10 patients with ischemic cardiomyopathy (IC), 17 patients with dilated cardiomyopathy (DC), 15 patients with nonischemic, nondilated cardiopathies (NINDC), 17 heart transplanted patients and 25 hypertensive patients. Similar analysis was performed in LV and kidney from spontaneously (SHR) or L-NAME-induced hypertensive rats and their controls. We correlated the changes in the expressions of ARs and GRKs in human samples, with clinical variables such as left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular end-systolic and left ventricular end-diastolic diameter.

The main findings were 1) the expression of the α_{1A} -, β_1 - and β_2 - AR in the LV positively correlate with LVEF; 2) the expression of GRK3 and GRK5 inversely correlates with LVESD and LVEDD, supporting previous observations about a protective role for both kinases in the failing hearts; 3) β_1 -AR expression is down-regulated in the LV and RV of IC, in the LV of DC, and in the RV of NINDC. This difference, better than an increased expression of GRK2 (not observed in IC), determines the lower LVEF in IC and DC vs. NINDC; 4) In diseased *vs* healthy subjects and in the animal models of hypertension, parallel changes in mRNA levels of GRK2 and β_2 -AR or GRK5 and β_1 -AR were observed in each territory as well as physiological or pathological cardiovascular conditions. Therefore, without excluding other regulatory mechanisms, the parallelism observed suggests a common regulatory pattern for the β_1 -AR/GRK5 and β_2 -AR/GRK2 genes, which is independent of cellular type or pathology; and 5) the correlation observed occurs before and after the cardiac transplant, confirming a common pattern which regulates the expression of each pair of genes and acts independently of the pathology.

We can conclude that the knowledge of the expression and regulatory mechanisms of β -ARs must be accompanied by a similar analysis of GRKs to better understand the implication of the adrenergic system in cardiovascular diseases.



En 1929, el cirujano alemán Werner Forssmann examinó el interior de su propio corazón insertando un catéter en la vena de su brazo. Fue el primer cateterismo cardíaco, un procedimiento común en la actualidad.

BIBLIOTECA

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.

Agüero J, Almenar L, D'Ocon P, Oliver E, Montó F, Rueda J, Vicente D, Martínez-Dolz L, and Salvador A. (2009) Myocardial and peripheral lymphocytic transcriptomic dissociation of beta-adrenoceptors and G protein-coupled receptor kinases in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant.* **28**(11):1166-71.

Agüero J, Almenar L, Montó F, Oliver E, Sánchez-Lázaro I, Vicente D, Martínez-Dolz L, D'Ocon P, Rueda J, and Salvador A (2012) Myocardial G protein receptor-coupled kinase expression correlates with functional parameters and clinical severity in advanced heart failure. *J Card Fail.* **18**(1):53-61.

Ahlquist RP (1948) A study of the adrenotropic receptors. *Am.J.Physiol.* **153**:586-600.

Ahmed MR., Gurevich, VV., Dalby, KN., Benovic, JL., and Gurevich, EV (2008). Haloperidol and clozapine differentially affect the expression of arrestins, receptor kinases, and ERK activation. *J Pharmacol Exp Ther.* **325**(1):276-83

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.

Akhter SA, D' Souza KM, Malhotra R, Staron ML, Valeroso TB, Fedson SE, Anderson AS, Raman J, and Jeevanandam V (2010) Reversal of impaired myocardial beta-adrenergic receptor signaling by continuous-flow left ventricular assist device support. *J Heart Lung Transplant.* **29**:603 – 609.

Andersson 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.

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 betaadrenoceptor 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(1)**:27-8.

Baker AJ (2014) Adrenergic signaling in heart failure: a balance of toxic and protective effects. *Pflügers Arch.* **466(6)**:1139-50

Bakris GL, Fonseca V, Katholi RE, McGill JB, Messerli FH, Phillips RA, Raskin P, Wright JT Jr, Oakes R, Lukas MA, Anderson KM, and Bell DS (2004) Metabolic effects of carvedilol vs metoprolol in patients with type 2 diabetes mellitus and hypertension: a randomized controlled trial. *JAMA.* **292**:222-2236.

Beattie K, and Phadke G, Novakovic J (2013). Carvedilol. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol.* **38**:113-57.

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.

Belmonte SL, and Blaxall BC. (2011) G protein coupled receptor kinases as therapeutic targets in cardiovascular disease. *Circ Res.* **109(3)**:309-19.

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.

Berridge MJ (1983) Rapid accumulation of inositol trisphosphate reveals that agonists hydrolyse polyphosphoinositides instead of phosphatidylinositol. *Biochem.J.* **212**:849-858.

Bezard E, Gross CE, Qin L, Gurevich VV, Benovic JL, and Gurevich EV (2005) L-DOPA reverses the MPTP-induced elevation of the arrestin2 and GRK6 expression and enhanced ERK activation in monkey brain. *Neurobiol Dis.* **18(2)**:323-35.

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.

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.

Bono M, Cases A, Calls J, Gaya J, Jiménez 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(5 Pt 1)**:487-93.

Borja J, Cuadripani S, Souto M, and Guindo J (2007) Fármacos inotrópicos, en *Curso de farmacología cardiovascular*. C&AP 2: pp 88-92, J&C Ediciones Médicas, S.L

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.

Brattelid T, Winer LH, Levy FO, Liestøl K, Sejersted OM, and Andersson KB (2010) Reference gene alternatives to Gapdh in rodent and human heart failure gene expression studies. *BMC Mol Biol.* **11**:22

Braunwald E, Colucci WS, and Grossman W (1999) Aspectos clínicos de la insuficiencia cardíaca: insuficiencia cardíaca de alto gasto; edema pulmonar in Braunwald: *Tratado de Cardiología.* pp 479-506. Interamericana-McGraw-Hill, Madrid.

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.

Brinks HL, and Eckhart AD (2010) Regulation of GPCR signaling in hypertension. *Biochim Biophys Acta.* **1802(12)**:1268-75.

Brinks HL, and Koch WJ (2010) Targeting G protein-coupled receptor kinases (GRKs) in heart failure. *Drug Discov Today Dis Mech.* **7**: e129 - 134.

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**:I12-I25.

Bristow MR (1993) Changes in myocardial and vascular receptors in heart failure. *J.Am.Coll.Cardiol.* **22**:61A-71A.

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, Stuka N, Demuth V, Fesel R, Bergerhausen J, Daul A, and Bock KD (1985) Alpha- and betaadrenoceptors in circulating blood cells of essential hypertensive patients: increased receptor density and responsiveness. *Clin.Exp.Hypertens.A.* **7**:1135-1150.

Brodde OE, Kretsch R, Ikezono K, Zerkowski HR, and Reidemeister JC (1986) Human betaadrenoceptors: 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, Bruck H, Leineweber K, and Seyfarth T (2001) Presence, distribution and physiological function of adrenergic and muscarinic receptor subtypes in the human heart. *Basic Res Cardiol* **96**: 528 – 538.
- 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-Gprotein(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 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.
- Buendía F (2013) Reinervacion cardiaca tras trasplante cardiaco. Valoración clínica, funcional e isotópica en el primer año tras trasplante. *Tesis Doctoral.* Universidad de Valencia.
- Bünemann M, Lee KB, Pals-Rylaarsdam R, Roseberry AG, and Hosey MM (1999) Desensitization of Gprotein-coupled receptors in the cardiovascular system. *Annu.Rev.Physiol* **61**:169-192.
- Burt RP, Chapple CR, and Marshall I (1998) Alpha1A-adrenoceptor mediated contraction of rat prostatic vas deferens and the involvement of ryanodine stores and Ca²⁺ influx stimulated by diacylglycerol and PKC. *Br.J.Pharmacol.* **123**:317-325.

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.

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 alpha1b-adrenergic receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **94**:11589-11594.

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 1B- and alpha 1D-adrenoceptor subtypes. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **305**:1045-1053.

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 1-adrenoreceptor subtypes in vitro and in situ. *J.Biol.Chem.* **270**:30980-30988.

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 betaadrenergic receptor signaling precedes the development of dilated cardiomyopathy in transgenic mice with calsequestrin 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.
- 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.
- 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.
- Cohn JN, and Tognoni G (2001) A randomized trial of the angiotensin-receptor blocker valsartan in chronic heart failure. *N Engl J Med.* **345(23)**:1667-75.
- Cros C, and Brette F (2013) Functional subcellular distribution of beta1- and beta2-adrenergic receptors in rat ventricular cardiac myocytes. *Physiol Rep.* **1(3)**:e00038
- 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.
- Danner S and Lohse MJ (1997) Cell type-specific regulation of beta2-adrenoceptor mRNA by agonists. *Eur.J.Pharmacol.* **331**:73-78.

Dambrink JH, Beukema WP, van Gilst WH, Peels KH, Lie KI, and Kingma JH (1994) Left ventricular dilatation and high-grade ventricular arrhythmias in the first year after myocardial infarction. Captopril and Thrombolysis Study. *J Card Fail.* **1**:3-11.

De Champlain J (1990) Pre- and postsynaptic adrenergic dysfunctions in hypertension. *J.Hypertens.Suppl.* **8**:S77-S85.

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.

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.

Díaz A, Pazos A, Flórez J, Ayesta FJ, Santana V, and Hurlé MA (2002) Regulation of mu-opioid receptors, G-protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin 2 in the rat brain after chronic opioid receptor antagonism. *Neuroscience.* **112(2)**:345-53.

Dickstein K, and Kjeksus J; OPTIMAAL Steering Committee of the OPTIMAAL Study Group (2002) Effects of losartan and captopril on mortality and morbidity in high-risk patients after acute myocardial infarction: the OPTIMAAL randomised trial. Optimal Trial in Myocardial Infarction with Angiotensin II Antagonist Losartan. *Lancet.* **360(9335)**:752-60.

Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, Strömberg A, van Veldhuisen DJ, Atar D, Hoes AW, Keren A, Mebazaa A, Nieminen M, Priori SG, and Swedberg K (2008). 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 J Heart Fail.* **10(10)**:933-89.

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 alpha1Adrenergic receptor. *J.Biol.Chem.* **272**:28712-28719.

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.

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, Hotchkin 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.

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.

Dzimiri N, Muiya P, Andres E, and Al-Halees Z (2004) Differential functional expression of human myocardial G protein receptor kinases in left ventricular cardiac diseases. *Eur J Pharmacol.* **489(3)**:167-77.

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(1)**: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.

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.

Eschenhagen T (2008) Beta-adrenergic signalling in heart failure-adapt or die. *Nat Med* **14**: 485 – 487.

Evans JG and Rose G (1971) Hypertension. *Br.Med.Bull.* **27**:37-42.

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.

Fajardo G, Zhao M, Urashima T, Farahani S, Hu DQ, Reddy S, and Bernstein D (2013) Deletion of the beta2-adrenergic receptor prevents the development of cardiomyopathy in mice. *J Mol Cell Cardiol.* **63**:155-64

Falloon BJ and Heagerty AM (1994) In vitro perfusion studies of human resistance artery function in essential hypertension. *Hypertension.* **24**:16-23.

Fan X, Zhang J, Zhang X, Yue W, Ma L (2002) Acute and chronic morphine treatments and morphine withdrawal differentially regulate GRK2 and GRK5 gene expression in rat brain. *Neuropharmacology* **43(5)**:809-16.

Farré A y Macaya C (2009) Insuficiencia Cardíaca Aguda. Causas y Consecuencia, en *Libro de la salud cardiovascular del hospital clínico san Carlos y la fundación BBVA* (Martínez-Sánchez J eds) pp 351-358. Editorial Nerea S.A, España.

Farrukh HM, White M, Port JD, Handwerger D, Larrabee P, Klein J, Roden RA, Skerl L, Renlund DG, and Feldman AM (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-proteincoupled receptor perspective. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* **15**:135-140.
- Félétou M (2009) Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? *Br J Pharmacol.* **156(4)**:545-62.
- Félétou M, Köhler R, and Vanhoutte PM (2010) Endothelium-derived vasoactive factors and hypertension: possible roles in pathogenesis and as treatment targets. *Curr Hypertens Rep.* **12(4)**:267-75.
- Ferguson SS, Downey WE, III, Colapietro AM, Barak LS, Menard L, and Caron MG (1996) Role of betaarrestin 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.
- Feuerstein GZ, Bril A, and Ruffolo RR Jr (1997) Protective effects of carvedilol in the myocardium. *Am J Cardiol.* **80(suppl)**:41L - 45L.
- Flacco N, Segura V, Perez-Aso M, Estrada S, Seller JF, Jiménez-Altayó F, Noguera MA, D'Ocon P, Vila E, and Ivorra MD (2013) Different beta-adrenoceptor subtypes coupling to cAMP or NO/cGMP pathways: implications in the relaxant response of rat conductance and resistance vessels. *Br J Pharmacol.* **169(2)**:413-25.
- 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.

Francis GS, Goldsmith SR, Levine TB, Olivari MT, and Cohn JN. (1984) The neurohumoral axis in congestive heart failure. *Ann Intern med.* **101**: 307-376.

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 Schioth 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.

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.

Frey N & Olson EN (2003) Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol.* **65**: 45 - 79ma

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.

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, 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.

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.

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, 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.

González AF (2005) Insuficiencia Cardíaca: Etiopatología y Fisiopatología I. *Lancet.* **4(1)**

González F, Gómez M, Almenar L, Crespo MG, Arizón JM, Palomo J, Delgado J, Roigi E, Lage E y Manito N (2014) Registro español de Trasplante Cardíaco. XXV Informe Oficial de la Sección de Insuficiencia Cardíaca y Trasplante Cardíaco de la Sociedad Española de Cardiología (1984-2013) *Rev Esp Cardiol.* **67(12)**:1039 – 1051

González I, Gómez JA y González I (2000) Tratamiento médico de la Insuficiencia Cardíaca *Inf Ter Sist Nac Salud* **24**: 92-105

González-Juanatey JR, Iglesias MJ, Alcaide C, Piñeiro R, and Lago F (2003) Doxazosin induces apoptosis in cardiomyocytes cultured in vitro by a mechanism that is independent of alpha1-adrenergic blockade. *Circulation*. **107**(1):127-31.

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.

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.

Granger CB1, McMurray JJ, Yusuf S, Held P, Michelson EL, Olofsson B, Ostergren J, Pfeffer MA, and Swedberg K (2003) Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function intolerant to angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-Alternative trial. *Lancet*. **362**(9386):772-6.

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-Proteincoupled 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.

Guimaraes S and Moura D (2001) Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol.Rev.* **53**:319-356.

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: nonidentical triplets with different dancing partners? *Life Sci.* **74**:411-418.

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.

Hare JM (2001) Oxidative stress and apoptosis in heart failure progression. *Circ Res.* **89(3)**:198-200

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.

Harrison TR (1939). Failure of the Circulation. 2nd ed. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.

Harrison TR, Braunwald E, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Longo D and Jamenson JL (2001) vol. I *Principios de medicina interna*, Sección 3 *Enfermedades del corazón*, Capítulo 231 *Función miocárdica normal y anormal*, 15ª Edición, Ediciones McGraw-Hill.

Hata JA, Koch WJ (2003) Phosphorylation of G protein-coupled receptors: GPCR kinases in heart disease. *Mol Interv.* **3**: 264 – 272.

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) Hypernoradrenergic innervation: its relationship to functional and hyperplastic changes in the vasculature of the spontaneously hypertensive rat. *Blood Vessels* **26**:1-20.

- 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.
- 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.
- Holck MI (1988) Alpha 1-adrenoceptor reserve and effects of a Ca²⁺ entry blocker (Ro 18-3981) on aorta of spontaneously hypertensive rats. *Eur.J.Pharmacol* **148**:9-15.
- 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, 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, Merkwand CL, Baye NL, Liang Q, Simpson PC, and O'Connell TD (2007) An alpha1Adrenergic- extracellular signal-regulated kinase survival signaling pathway in cardiac myocytes. *Circulation* **115**:763-772.
- Huang ZM, Gold JJ, and Koch WJ (2011) G protein-coupled receptor kinases in normal and failing myocardium. *Front Biosci (Landmark Ed).* **16**:3047-60.
- Hubbard KB and Hepler JR (2006) Cell signalling diversity of the Gqalpha family of heterotrimeric G proteins. *Cell Signal.* **18**:135-150.
- Hughes RJ, Mahan LC, and Insel PA (1988) Certain beta-blockers can decrease beta-adrenergic receptor number: II. Down-regulation of receptor number by alprenolol and propranolol in cultured lymphoma and muscle cells. *Circ Res.* **63(2)**:279-85.

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

Hurlé MA (2001) Changes in the expression of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin 2 in rat brain during opioid tolerance and supersensitivity. *J Neurochem.* **77(2)**:486-92.

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.

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) Beta-adrenergic receptor kinase-1 levels in catecholamine-induced myocardial hypertrophy: regulation by beta- but not alpha1-adrenergic stimulation. *Hypertension* **33**:396-401.

Iaccarino G, and Koch WJ. (1999) Therapeutic potential of G-protein coupled receptor kinases in the heart. *Expert Opin Investig Drugs.* **8(5)**:545-54.

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, Keys JR, Rapacciuolo A, Shotwell KF, Lefkowitz RJ, Rockman HA, and Koch WJ (2001) Regulation of myocardial betaARK1 expression in catecholamine-induced cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing alpha1B-adrenergic receptors. *J Am Coll Cardiol.* **38**:534 - 540

Iaccarino G, Barbato E, Cipolletta E, De Amicis 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.

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.

Jahns R, Boivin V, Hein L, Triebel S, Angermann CE, Ertl G, and Lohse MJ (2004) Direct evidence for a beta 1-adrenergic receptor-directed autoimmune attack as a cause of idiopathic dilated cardiomyopathy. *Clin Invest.* **113(10)**:1419-29.

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.

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, O'Connell TD, and Simpson PC (2011) Alpha-1-adrenergic receptors: targets for agonist drugs to treat heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* **51(4)**:518-28.

Johnson M (1998) The beta-adrenoceptor. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **158**:S146-S153.

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.

Kamal FA, Travers JG, and Blaxall BC (2012). G protein-coupled receptor kinases in cardiovascular disease: why "where" matters. *Trends Cardiovasc Med.* **22(8)**:213-9

- Kannan K, Jain SK (2000) Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*. **7(3)**:153-163.
- Kaplan NM (2005) Hypertension in the population at large, in *Kaplan's Clinical Hypertension* pp 1-24, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore.
- 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.
- 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.
- Khandoudi N, Percevault-Albadine J, and Bril A (1998) Comparative effects of carvedilol and metoprolol on cardiac ischemia-reperfusion injury. *J Cardiovasc Pharmacol* **32**:443-451.
- 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 signaling 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.
- 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.

Kong JQ, Taylor DA, and Fleming WW (1991) Mesenteric vascular responses of young spontaneously hypertensive rats. *J.Pharmacol Exp.Ther.* **258**:13-17.

Konstantinou DM, Chatzizisis YS, and Giannoglou GD (2013) Pathophysiology-based novel pharmacotherapy for heart failure with preserved ejection fraction. *Pharmacol Ther.* **140(2)**:156-66

Kopecky SL (2006) Effect of Beta Blockers, Particularly Carvedilol, on Reducing the Risk of Events After Acute Myocardial Infarction. *Am J Cardiol.* **98**:1115 - 1119

Koshimizu TA, Tanoue A, Hirasawa A, Yamauchi J, and Tsujimoto G (2003) Recent advances in alpha1-adrenoceptor pharmacology. *Pharmacol.Ther.* **98**:235-244.

Koshimizu TA, Tsujimoto G, Hirasawa A, Kitagawa Y, and Tanoue A (2004) Carvedilol selectively inhibits oscillatory intracellular calcium changes evoked by human alpha1D- and alpha1B-adrenergic receptors. *Cardiovasc Res.* **63(4)**:662-72.

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.

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.

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.

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, 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 betaadrenoceptor blockade. *Cardiovasc.Res.* **66**:512-519.

Lewis, T. (1933) Diseases of the Heart. Macmillan. New York. p 49.

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.

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 betaadrenergic 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.

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.

Loveland BE, Jarrott B, and McKenzie IF (1981) The detection of beta-adrenoceptors on murine lymphocytes. *Int.J.Immunopharmacol.* **3**:45-55.

- Lowes BD, Gilbert EM, Abraham WT, Minobe WA, Larrabee P, Ferguson D, Wolfel EE, Lindenfeld J, Tsvetkova T, Robertson AD, Quaife RA, and Bristow MR (2002) Myocardial gene expression in dilated cardiomyopathy treated with beta-blocking agents. *N Engl J Med.* **346**: 1357 – 1365.
- 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.
- 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.
- Maggioni AP1, Anand I, Gottlieb SO, Latini R, Tognoni G, and Cohn JN (2002) Effects of valsartan on morbidity and mortality in patients with heart failure not receiving angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J Am Coll Cardiol.* **40(8)**:1414-21.
- Maicas C, Lázaro E, Alcalá J, Hernández P y Rodríguez L (2003) Etiología y fisiopatología de la hipertensión arterial esencial, en *Monocardio* (Sociedad Castellana de Cardiología) pp 141-160, Vol V
- 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.
- Malle M, 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.
- 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, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Böhm M, Christiaens T, Cifkova R, De Backer G, Dominiczak A, Galderisi M, Grobbee DE, Jaarsma T, Kirchhof P, Kjeldsen SE, Laurent S, Manolis AJ, Nilsson PM, Ruilope LM, Schmieder RE, Sirnes PA, Sleight P, Viigimaa M, Waeber B, and Zannad F (2013) European Heart Journal (2013). 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.* **34**:2159 – 2219

Marcy TR and Ripley T (2006). Aldosterone Antagonists in the Treatment of Heart Failure. *Am J Health-Syst Pharm.* **63**(1):49-58.

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.

Martini JS, Raake P, Vinge LE, DeGeorge BR Jr, Chuprun JK, Harris DM, Gao E, Eckhart AD, Pitcher JA, and Koch WJ (2008) Uncovering G protein-coupled receptor kinase-5 as a histone deacetylase kinase in the nucleus of cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**(34):12457-62.

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. and Penela P (2003) Mecanismos de regulación de receptores heptahélicos acoplados a proteínas G. *Receptores para neurotransmisores* (García-Sevilla JA and Pazos A eds) pp 263-279, Ediciones en Neurociencias.

McGrath JC (1982) Evidence for more than one type of post-junctional alpha-adrenoceptor. *Biochem.Pharmacol.* **31**:467-484.

McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Køber L, Lip GY, Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, Rønnevik PK, Rutten FH, Schwitler J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, and Zeiher A (2012) ESC Committee for Practice Guidelines. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart.* **14**(8):803-69

- McMurray JJ, Ostergren J, Swedberg K, Granger CB, Held P, Michelson EL, Olofsson B, Yusuf S, and Pfeffer MA (2003) Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function taking angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-Added trial. *Lancet* **362(9386)**:767-71.
- 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, Brodde OE, and Insel PA (1990) Peripheral adrenergic receptors in hypertension. *Hypertension* **16**:107-120.
- 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, 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.
- 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.

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 Ca²⁺ 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, Chen L, Semmler AB, Parsonage WA, and Kaumann AJ (2007) Human heart betaadrenoceptors: beta1-adrenoceptor diversification through 'affinity states' and polymorphism. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.* **34**:1020-1028.

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.

Moniotte S, Vaerman JL, Kockx MM, Larrouy D, Langin D, Noirhomme P, and Balligand JL (2001) Real-time RT-PCR for the detection of beta-adrenoceptor messenger RNAs in small human endomyocardial biopsies. *J Mol Cell Cardiol.* **33**: 2121 - 2133.

Montó F, Oliver E, Vicente D, Rueda J, Agüero J, Almenar L, Ivorra MD, Baretino D, and D'Ocon P. (2012) Different expression of adrenoceptors and GRKs in the human myocardium depends on heart failure etiology and correlates to clinical variables. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **303**(3):H368-76.

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.

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.

Naunyn Schmiedebergs (1989) Subtype-selective up-regulation of human saphenous vein beta 2-adrenoceptors by chronic beta-adrenoceptor antagonist treatment. *Arch Pharmacol* **339**(4):479-82.

Nava E, Noll G, and Luscher TF (1995) Increased activity of constitutive nitric oxide synthase in cardiac endothelium in spontaneous hypertension. *Circulation* **91**: 2310-3.

- Nava E, Farré AL, Moreno C, Casado S, Moreau P, Cosentino F, and Lüscher TF (1998) Alterations to the nitric oxide pathway in the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens*. **16**: 609-15.
- Nikolaev VO, Moshkov A, Lyon AR, Miragoli M, Novak P, Paur H, Lohse MJ, Korchev YE, Harding SE, and Gorelik J (2010) Beta2-adrenergic receptor redistribution in heart failure changes cAMP compartmentation. *Science* **327(5973)**:1653-7
- Nishioka K, Nakagawa K, Umemura T, Jitsuiki D, Ueda K, Goto C, Chayama K, Yoshizumi M, and Higashi Y (2007) Carvedilol improves endothelium-dependent vasodilation in patients with dilated cardiomyopathy. *Heart* **93(2)**:247-8.
- Nishizuka Y (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* **308**:693-698.
- 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.
- Noor N, Patel CB, and Rockman HA (2011) Beta-Arrestin: a signalling molecule and potential therapeutic target for heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. **51**: 534 – 541.
- 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'Connell TD, Swigart PM, Rodrigo MC, Ishizaka S, Joho S, Turnbull L, Tecott LH, Baker AJ, Foster E, Grossman W, and Simpson PC (2006). Alpha1-adrenergic receptors prevents a maladaptive cardiac response to pressure overload. *J Clin Invest*. **116**: 1005 – 1015.
- 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.

- 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, Martí D, Montó F, Flacco N, Moreno L, Baretino D, Ivorra MD, and D'Ocon P. (2009) The impact of alpha1-adrenoceptors up-regulation accompanied by the impairment of beta-adrenergic vasodilatation in hypertension. *J Pharmacol Exp Ther.* **328**(3):982-90
- Oliver E, Rovira E, Montó F, Valdecabres C, Julve R, Muedra V, Ruiz N, Baretino 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
- Oliver E, Flacco N, Arce C, Ivorra MD, D'Ocon MP, and Noguera MA (2014) Changes in adrenoceptors and G-protein-coupled receptor kinase 2 in L-NAME-induced hypertension compared to spontaneous hypertension in rats. *J Vasc Res.* **51**(3):209-20
- 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.
- Orea A, Colín E, Castillo Lilia, Asensio E, Corzo D, González R, Rebollar V, Narváez R and Dorantes J (2007) Aldosterone receptor antagonists induce favorable cardiac remodeling in diastolic heart failure patients. *Rev. invest. clín.* **59**(2):103-107
- 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.

- Oyama N, Urasawa K, Kaneta S, Sakai H, Saito T, Takagi C, Yoshida I, Kitabatake A, and Tsutsui H (2006) Angiotensin converting enzyme inhibitors attenuated the expression of G-protein coupled receptor kinases in heart failure patients. *Circ J.* **70(3)**:362-3.
- Packer, M. (1988) Survival in patients with chronic heart failure and its potential modification by drug therapy in *Drug Treatment of Heart Failure* (Cohn, J. N. eds) pp 273. Secaucus, ATC International.
- Packer M (1992) Pathophysiology of chronic heart failure. *Lancet.* **340**: 88-92.
- Pabón P, Martín J, Cruz I y Martín C (2013) Tratamiento de la insuficiencia cardiaca crónica *Medicine.* **11**:2146-56
- 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.Comm.* **190**:475- 481.
- Patel CB, Noor N, and Rockman HA (2010) Functional selectivity in adrenergic and angiotensin signaling systems. *Mol Pharmacol.* **78(6)**:983-92.
- 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 (GRK) 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-Aso M, Segura V, Montó F, Baretino D, Noguera MA, Milligan G, and D'Ocon P (2013). The three α 1-adrenoceptor subtypes show different spatio-temporal mechanisms of internalization and ERK1/2 phosphorylation. *Biochim Biophys Acta.* **1833(10)**:2322-33
- Petrofski JA, and Koch WJ. The beta-adrenergic receptor kinase in heart failure (2003) *J Mol Cell Cardiol.* **35**:1167 - 1174.

Pfeffer MA, McMurray JJ, Velazquez EJ, Rouleau JL, Køber L, Maggioni AP, Solomon SD, Swedberg K, Van de Werf F, White H, Leimberger JD, Henis M, Edwards S, Zelenkofske S, Sellers MA, and Califf RM (2003) Valsartan, captopril, or both in myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both. *N Engl J Med.* **349(20)**:1893-906.

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.

Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, and Wittes J. (1999) The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med.* **341(10)**:709-17

- Pitt B (2014) Mineralocorticoid receptor antagonists for the treatment of hypertension and the metabolic syndrome. *Hypertension*. **65**(1):41-2.
- 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.
- 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 alphaadrenergic 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.
- 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.
- Rajagopal S, Kim J, Ahn S, Craig S, Lam CM, Gerard NP, Gerard C, and Lefkowitz RJ (2010) Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the "decoy" receptor CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**(2):628-32.
- 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.
- Reiter MJ, and Reiffel JA (1998) Importance of beta blockade in the therapy of serious ventricular arrhythmias. *Am J Cardiol.* **82**(suppl):9I - 19I

- 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.
- Rengo G, Lympelopoulus A, Leosco D, and Koch WJ (2011) GRK2 as a novel gene therapy target in heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* **50**: 785 – 792.
- Rembold CM (1992) Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. *Hypertension* **20**:129-137.
- 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.
- Rivera M, Taléns-Visconti R, Salvador A, Bertomeu V, Miró V, García de Burgos F, Climent V, Cortés R, Payá R, Pérez-Boscá JL, Mainar L, Jordán A, Sogor F, Cosín J, Mora V, Diago JL, and Marín F (2004) Hipertensión y valores de NT-proBNP. Su importancia en el diagnóstico de insuficiencia cardíaca. *Rev Esp Cardiol.* **57**:396-402.
- 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.
- 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.
- Rubino T, Viganò D, Premoli F, Castiglioni C, Bianchessi S, Zippel R, and Parolaro D (2006) Changes in the expression of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestins in mouse brain during cannabinoid tolerance: a role for RAS-ERK cascade. *Mol Neurobiol.* **33(3)**:199-213.
- 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.
- Sato PY, Chuprun JK, Schwartz M, and Koch WJ (2015) The evolving impact of G protein-coupled receptor kinases in cardiac health and disease. *Physiol Rev.* **95(2)**:377-404.
- 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.
- Sayago-Silva I, García-López F, y Segovia-Cubero J (2013) Epidemiología de la insuficiencia cardiaca en España en los últimos 20 años *Rev Esp Cardiol.* **66**:649-56.
- 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.

Schmechel A, Grimm M, El-Armouche A, Hoppner G, Schwoerer AP, Ehmke H, and Eschenhagen T (2009) Treatment with atorvastatin partially protects the rat heart from harmful catecholamine effects. *Cardiovasc Res.* **82**(1):100-106.

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.

Schroeder JA, McCafferty MR, and Unterwald EM (2009) Regulation of dynamin 2 and G protein-coupled receptor kinase 2 in rat nucleus accumbens during acute and repeated cocaine administration. *Synapse* **63**(10):863-70.

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.

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.

Seeland U, Selejan S, Engelhardt S, Muller P, Lohse MJ, and Bohm M (2007) Interstitial remodeling in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Basic research in cardiology.* **102**(2):183-193.

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.

Segura V, Flacco N, Oliver E, Baretino D, D'Ocon P, and Ivorra MD (2010) Alpha1-adrenoceptors in the rat cerebral cortex: new insights into the characterization of alpha1L- and alpha1D-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol.* **641**(1):41-8.

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.

Skomedal T, Borthne K, Aass H, Geiran O, and Osnes JB (1997) Comparison between alpha-1 adrenoceptor-mediated and beta adrenoceptor-mediated inotropic components elicited by norepinephrine in failing human ventricular muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* **280**: 721 – 729.

Somers RL and Klein DC (1984) Rhodopsin kinase activity in the mammalian pineal gland and other tissues. *Science.* **226**:182-184.

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.

Stehlik J, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Christie JD, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO, and Hertz MI (2011) The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-eighth Adult Heart Transplant Report--2011. *J Heart Lung Transplant.* **30(10)**:1078-94.

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

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.

Streb H, Irvine RF, Berridge MJ, and Schulz I (1983) Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* **306**:67-69.

Stroe AF and Gheorghiade M (2004) Carvedilol: Beta-Blockade and Beyond. *Rev Cardiovasc Med.* **5(Supl.1)**:18-27.

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 rejection1 2. *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.

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.Communic.* **248**:722-727.

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, 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, 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.

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, Esbenschade 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.

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.

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.

Triposkiadis F, Karayannis G, Giamouzis G, Skoularigis J, Louridas G, and Butler J (2009) The sympathetic nervous system in heart failure physiology, pathophysiology, and clinical implications. *J Am Coll Cardiol.* **54**: 1747 - 1762.

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 Gprotein-coupled receptors. *Trends Pharmacol.Sci* **22**:91-96.

Tsao PI and von Zastrow M (2001) Diversity and specificity in the regulated endocytic membranetrafficking 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.

Tzingounis AV, von Zastrow M, and Yudowski GA. (2010) Beta-blocker drugs mediate calcium signaling in native central nervous system neurons by beta-arrestin-biased agonism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107(49)**:21028-33.

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.

Ungerer M, Kessebohm K, Kronsbein K, Lohse MJ, and Richardt G (1996) Activation of beta-adrenergic receptor kinase during myocardial ischemia. *Circ Res.* **79**: 455 - 460

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.

Van Tassell BW, Rondina MT, Huggins F, Gilbert EM, and Munger MA (2008) Carvedilol increases blood pressure response to phenylephrine infusion in heart failure subjects with systolic dysfunction: evidence of improved vascular alpha1-adrenoreceptor signal transduction) *Am Heart J.* **156(2)**:315-21.

Vanderheyden M, Mullens W, Delrue L, Goethals M, Verstreken S, Wijns W, and de Bruyne B, Bartunek J (2008) Endomyocardial upregulation of beta1 adrenoceptor gene expression and myocardial contractile reserve following cardiac resynchronization therapy. *J Card Fail.* **14(2)**:172-8.

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, Taberner 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 alpha1Dadrenoceptors 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 GØ, Ahmed MS, Peppel K, Koch WJ, Freedman NJ, Levy FO, Skomedal T, Osnes JB, and Attramadal H (2007) Substrate specificities of Gprotein-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.

Vizzardi E, D'Aloia A, Giubbini R, Bordonali T, Bugatti S, Pezzali N, Romeo A, Dei Cas A, Metra M, Dei Cas L (2010) Effect of spironolactone on left ventricular ejection fraction and volumes in patients with class I or II heart failure. *Am J Cardiol.* **106(9)**:1292-6

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.

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 GY, Yeh CC, Jensen BC, Mann MJ, Simpson PC, and Baker AJ (2010) Heart failure switches the RV alpha1-adrenergic inotropic response from negative to positive. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **298(3)**:H913-20.

Wang W, Zhu W, Wang S, Yang D, Crow MT, Xiao RP, and Cheng H (2004) Sustained beta1-adrenergic stimulation modulates cardiac contractility by Ca²⁺/calmodulin kinase signaling pathway. *Circ.Res.* **95**:798-806.

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.

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.

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.

Wisler JW, DeWire SM, Whalen EJ, Violin JD, Drake MT, Ahn S, Shenoy SK, and Lefkowitz RJ (2007) A unique mechanism of beta-blocker action: carvedilol stimulates beta-arrestin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104(42)**:16657-62

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.

Wood, P. Diseases of the Heart and Circulation. 2nd. ed. Eyre & Spottiswoode, London. p 370.

Woodcock EA (2007) Roles of alpha1A- and alpha1B-adrenoceptors in heart: insights from studies of genetically modified mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **34**: 884 – 888, 2007.

Woodcock EA, Du XJ, Reichelt ME, and Graham RM (2008) Cardiac alpha 1-adrenergic drive in pathological remodelling. *Cardiovasc.Res.* **77**:452-462.

Wright PT, Nikolaev VO, O'Hara T, Diakonov I, Bhargava A, Tokar S, Schobesberger S, Shevchuk AI, Sikkil MB, Wilkinson R, Trayanova NA, Lyon AR, Harding SE, Gorelik J (2014) Caveolin-3 regulates compartmentation of cardiomyocyte beta2-adrenergic receptor-mediated cAMP signaling. *J Mol Cell Cardiol.* **67**:38-48.

Wring CD (2008) Nuclear α_1 -AR receptor signal activated ERK localitation to caveole in adult cardiac myocytes. *Circ Res.* **103(9)**:992-1000.

Wring CD (2012) Nuclear localitation drive alpha1-AR oligomerization and signaling in cardiac myocyte. *Cell Signal.* **24(3)**:794-802.

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.

Xiang Y, and Kobilka BK. Myocyte adrenoceptor signalling pathways (2003) *Science* **300**: 1530 – 1532.

Xiao RP, Ji X, and Lakatta EG (1995) Functional coupling of the beta 2-adrenoceptor to a pertussistoxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. *Mol.Pharmacol.* **47**:322-329.

Xiao RP, Zhu W, Zheng M, Chakir K, Bond R, Lakatta EG, and Cheng H (2004) Subtype-specific betaadrenoceptor 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.

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.

Yan L, Vatner SF, Vatner DE (2014) Disruption of adenylyl cyclase prevents beta-adrenergic receptor cardiomyopathy: A novel approach to beta-adrenergic receptor blockade. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **307(10)**:1521-1528

Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE Jr, Drazner MH, Fonarow GC, Geraci SA, Horwich T, Januzzi JL, Johnson MR, Kasper EK, Levy WC, Masoudi FA, McBride PE, McMurray JJ, Mitchell JE, Peterson PN, Riegel B, Sam F, Stevenson LW, Tang WH, Tsai EJ, Wilkoff BL (2013) ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* **62(16)**:e147-239

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.

Yasunari K, Maeda K, Nakamura M, Watanabe T, Yoshikawa J, and Asada A (2004) Effects of carvedilol on oxidative stress in polymorphonuclear and mononuclear cells in patients with essential hypertension. *Am J Med.* **116**:460 – 465.

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 betaadrenergic 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 delta C isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ.Res.* **92**:912-919.

Zhu W, Zeng X, Zheng M, and Xiao RP (2005) The enigma of beta2-adrenergic receptor Gi signaling in the heart: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res.* **97(6)**:507-509

Zhu W, Zheng M, Cao C, Zhang Y, Lakatta EG, and Han Q (2006) Subtype-specific alpha1- and beta-adrenoceptor signalling in the heart. *Trends Pharmacol Sci.* **27**: 330 – 337.

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 Ca²⁺/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.



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

