

Respuesta de los receptores α_1 adrenérgicos del lecho vascular mesentérico de ratón expuesto a hipertermia

Tte. Frag. SSN MCN Daniel **Tejeda-Quiroz**,* Tte. Cor. M.C. Sergio Gabriel **Martínez-Salas**,**
Cap. 1/o. Q.B. Virginia **Sánchez-Monroy**,*** Dr. en C. Maximiliano **Ibarra-Barajas******

Escuela Militar de Graduados de Sanidad. Ciudad de México.

RESUMEN

Introducción. La exposición prolongada a elevadas temperaturas puede suponer una agresión importante para el organismo cuando no puede adaptarse a altas temperaturas y es incapaz de rehidratarse.

Las manifestaciones neurológicas que acompañan al aumento de la temperatura corporal son las que pueden eludir un diagnóstico temprano de golpe de calor y provocar la muerte si no se toman las medidas iniciales oportunas.

Poco sabemos sobre la morbilidad por exposición a temperaturas extremas y sus consecuencias, los datos no son precisos debido a que se encuentra subdiagnosticada o a que la variabilidad en la definición de este padecimiento.

Cuando aumenta la temperatura central, el centro termorregulador activa fibras eferentes del sistema nervioso autónomo que aumentan la pérdida de calor al producir vasodilatación cutánea (convección) y aumento de la sudoración (evaporación).

La capacidad para mantener una vasoconstricción a alta temperatura corporal (42 °C) se puede perder, lo que marca el inicio del colapso circulatorio. El mecanismo subyacente de la marcada vasodilatación en la arteria mesentérica es desconocido, esta pérdida de la vasoconstricción compensatoria no parece ser debido a la reducción de la conducción nerviosa eferente a la región, ya que la actividad nerviosa simpática esplénica y los niveles plasmáticos de catecolaminas están elevados durante la hipertermia moderada y severa.

Los α_1 -adrenérgicos post-sinápticos vasculares desempeñan un papel primordial en el mantenimiento de la resistencia vascular periférica y, por lo tanto, en el control de la presión arterial sistémica; hay tres subtipos de receptores funcionales α_1 -adrenérgicos α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} ¹⁸, que median la vasoconstricción simpática y así modulan la resistencia vascular.

En los estudios previos no se menciona la acción específica, ni los niveles de expresión de los receptores α_1 adrenérgicos durante la hipertermia, que puedan llevarnos a una respuesta específica de

Response adrenergic receptors α_1 of the mesenteric vascular bed of rats exposed to hyperthermia

SUMMARY

Introduction. Prolonged exposure to high temperatures can pose a major assault to the body when it can not adapt to high temperatures and is unable to rehydrate.

Neurologic manifestations accompanying increase in body temperature is most likely to avoid an early diagnosis of heat stroke and cause death if not taken the initial steps necessary.

Little is known about the morbidity and mortality from exposure to extreme temperatures and their consequences, the data are not precise because it is underdiagnosed or variability in the definition of this condition.

When the core temperature increases, the center active thermoregulatory efferent fibers of the autonomic nervous system that increases heat loss by producing cutaneous vasodilation (convection) and increased sweating (evaporation).

The ability to maintain a high body temperature vasoconstriction (42 °C) may be lost, marking the onset of circulatory collapse. The mechanism underlying the marked vasodilation in the mesenteric artery is unknown, the loss of compensatory vasoconstriction does not appear to be due to the reduction of efferent nerve conduction to the region, since the splenic sympathetic nerve activity and plasma catecholamine levels are elevated for moderate and severe hyperthermia.

The α_1 -adrenergic vascular postsynaptic play a role in the maintenance of peripheral vascular resistance and therefore in control of systemic arterial pressure, there are three subtypes of α_1 -adrenergic receptor functional α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} ¹⁸, which mediates vasoconstriction and so modulate vascular resistance.

In the previous studies did not mention the specific action or expression levels of α_1 adrenergic receptors during hyperthermia,

* Egresado de la Maestría de Ciencias Biomédicas en el Área de Fisiología Humana de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad.

** Subdirector de Investigación de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad. *** Escuela Militar de Graduados de Sanidad. **** Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México.

Correspondencia:

Dr. Daniel Tejeda-Quiroz

Escuela Militar de Graduados de Sanidad Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, Cda. de Palomas S/N Esq. Periférico, Col. Lomas de San Isidro, C.P. 11200, México, D.F. Correo electrónico: danielteqrotmail.com

Recibido: Octubre 19, 2010.

Aceptado: Julio 9, 2011.

qué es lo que lleva al organismo a un estado de choque, en donde la falla cardiovascular es un punto clave para su tratamiento, por lo que se hace importante el tratar de explicar cuál es la posible respuesta a esta patología que en un futuro pueda ser mejor estudiada.

Objetivo. El objetivo de este estudio fue determinar la respuesta y la expresión de los receptores α_1 -adrenérgicos del lecho vascular mesentérico de ratón expuesto a Hipertermia.

Material y métodos. Se utilizaron dos grupos de ratones para el desarrollo de los estudios fisiológicos y moleculares, los cuales en el caso de los estudios fisiológicos se subdividió en un grupo control a 37 °C y cuatro grupos experimentales que fueron expuestos a 38, 39 40 y 41 °C utilizando un modelo de órgano aislado para la realización de Curvas Concentración Respuesta, en el caso de los estudios moleculares se subdividió en un grupo control a 37 °C y dos grupos experimentales a 39 y 41 °C a los cuales se les realizó PCR en tiempo real para analizar la expresión de los receptores α_1 adrenérgicos al encontrarse expuestos a diferentes temperaturas utilizando el método del $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y cols. 2001). El análisis estadístico de los datos y los gráficos se realizaron utilizando los programas Sigma STAT 2.03 y Sigma Plot versión 10.0. Se usó ANOVA y Tukey para comparar los cambios de expresión de los receptores α_1 adrenérgicos en el Lecho Vascular Mesentérico de ratón expuesto a 37, 39 y 41 °C.

Resultados. En ambos grupos disminuye la respuesta de los receptores α_1 adrenérgicos en las Curvas de Concentración dosis respuesta apreciamos disminución de la respuesta al estímulo con agonista no selectivo y selectivo para α_1 adrenérgico, así como disminución de la respuesta máxima generada por la administración del fármaco conforme se aumentaba la temperatura, al realizar la PCR en tiempo real observamos un aumento en la expresión de los receptores α_{1A} y α_{1B} adrenérgicos a 39 y 41 °C, lo que ocurre en las α_{1D} adrenérgicos de manera más importante, ya que su expresión aumenta en 500 veces con respecto al control a 37 °C disminuyendo a cero al exponerse a 41 °C.

Palabras clave: Receptores α_1 adrenérgicos, curvas concentración respuesta, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, hipertermia.

Introducción

La exposición prolongada a elevadas temperaturas puede suponer una agresión importante para el organismo cuando no puede adaptarse a altas temperaturas y es incapaz de rehidratarse.

Las manifestaciones neurológicas que acompañan al aumento de la temperatura corporal son las que pueden eludir un diagnóstico temprano de golpe de calor y provocar la muerte si no se toman las medidas iniciales oportunas.^{1,2}

La mortalidad puede ser superior a 70%, generalmente por situaciones de fracaso multiorgánico (FMO).³ El golpe de calor puede incluirse entre los que se conocen como síndromes de lesión por calor inducidos por el ambiente, junto con los calambres y agotamiento por calor.⁴ Las manifestaciones clínicas de los tres se solapan y es habitual la progresión hasta golpe de calor después de haber pasado por los dos anteriores. El porqué en ciertos sujetos la exposición al calor desencadena una situación de agotamiento por calor, mientras que en otros la evolución es hacia golpe de calor sigue siendo desconocida. Lo que sí parece claro es que

which can lead to a specific response that is what drives the body into a state of shock, where failure CVD is a key point for treatment, so it is important to try to explain what the possible answer to this disease in the future can be better studied.

Objective. The aim of this study was to determine the response and the expression of α_1 -adrenergic receptors of mouse mesenteric vascular bed exposed to hyperthermia.

Material and methods. Two groups of mice to the development of physiological and molecular, which in the case of physiological studies was divided into a control group at 37 °C and four experimental groups were exposed to 38, 39 40 and 41 °C using a model of isolated organ for the implementation of Curves Concentration response in the case of molecular studies was divided into a control group at 37 °C and two experimental groups at 39 and 41 °C to which they perform PCR real time to analyze the expression of α_1 adrenergic receptors to be exposed to different temperatures using the method of $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y cols. 2001). Statistical analysis of data and graphs were performed using Sigma STAT software Sigma Plot version 2.03 and 10.0. ANOVA and Tukey was used to compare changes in expression of α_1 adrenergic receptors in mouse mesenteric vascular bed exposed to 37, 39 and 41 °C.

Results: Both groups reduced the response of α_1 adrenergic receptors in dose-response curves for concentration decreased appreciate the response to stimulation with non-selective and selective agonist for α_1 adrenergic as well as reduction of the maximum response generated by the drug under Increasing the temperature, when performing real-time PCR we observed an increase in receptor expression α_{1A} and α_{1B} adrenergic 39 and 41 °C, which occurs in α_{1D} adrenergic more important because its expression increases 500 times compared to the control at 37 °C decreasing to zero when exposed to 41 °C.

Key words: Adrenergic receptors α_1 , concentration response curves, Chain Reaction Real-time polymerase, hyperthermia.

hay cierta predisposición genética que determina una susceptibilidad al calor. Estos genes incluyen citocinas, proteínas de coagulación y proteínas de shock térmico implicadas en la adaptación al calor,⁵ que es una respuesta compleja e inespecífica mediada por mecanismos neuroendocrinos, inmunológicos, autonómicos y conductuales, que representa un reajuste al alza del centro termorregulador, lo cual se debe a un desequilibrio entre la producción y eliminación de calor por un aumento de la primera o una disminución de la segunda, por aumento del metabolismo, excesivo, calor ambiental o alteraciones de los mecanismos de disipación del calor; en cualquiera de estas circunstancias, el termostato hipotalámico está correctamente ajustado.⁶

La patología asociada a la exposición a temperaturas ambientales elevadas es relativamente frecuente en nuestro medio, sobre todo en los meses de verano, amplios sectores de la población son susceptibles a los efectos del calor, bien por realizar actividades físicas intensas en circunstancias ambientales adversas, o por algún factor predisponente a los trastornos por calor, en donde se dificulta la disipación de calor por radiación y convección; además, de que la ele-

vacación de la humedad relativa interrumpe la disipación por evaporación, conduciendo a las lesiones por calor. Se presenta más en los estados del norte del país, al exponerse los migrantes a condiciones climáticas extremas, afecta tanto a jóvenes que realizan actividades físicas en condiciones ambientales de altas temperaturas y concentración de humedad, como a ancianos, con o sin enfermedades concomitantes, durante intensas oleadas de calor.

Poco sabemos sobre la morbilidad por exposición a temperaturas extremas y sus consecuencias, los datos no son precisos debido a que se encuentra subdiagnosticada o a que la variabilidad en la definición de este padecimiento.

Cada año, los niños mueren a causa de golpe de calor tras haber sido dejados solos en un vehículo. De 1998 a 2002, el promedio fue de 29 niños por año, aumentando a 42 en 2003 a 35 en 2004,⁷ datos del Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades mostraron 7,000 muertes por esta causa de 1979 a 1997, con una variación de 17.6 a 26.5 casos por 100,000 habitantes. En Arabia Saudita la tasa bruta de mortalidad asociada a golpe de calor se estima en 50%, la incidencia de agotamiento por calor, va de 450 a más de 1,800 casos por 100,000 habitantes.¹² El año pasado en el Reino Unido se produjeron 1,000 defunciones durante sólo una semana, cuando las temperaturas eran especialmente altas, y más de 10,000 en Francia.⁸ En México, 1998 es uno de los años más calurosos de las últimas décadas, mostrando un incremento de las muertes por esta causa.

El centro encargado del control térmico se encuentra en grupos neuronales del núcleo preóptico del hipotálamo anterior, que reciben información de los receptores térmicos cutáneos, de los situados en grandes vasos, vísceras abdominales y médula espinal, y de la sangre que perfunde el hipotálamo.

Cuando aumenta la temperatura central, el centro termorregulador activa fibras eferentes del sistema nervioso autónomo que aumentan la pérdida de calor al producir vasodilatación cutánea (convección) y aumento de la sudoración (evaporación). El hipotálamo envía otras señales a la corteza cerebral, que ponen en marcha respuestas conductuales complejas.⁹

El sistema cardiovascular es incapaz de mantener un adecuado gasto cardíaco para incrementar el flujo sanguíneo periférico (en la piel) a expensas del central (fundamentalmente esplácnico y renal).

La presión arterial se mantiene durante la hipertermia por una serie de ajustes hemodinámicos que equilibran la vasodilatación en las regiones cutáneas con la vasoconstricción en las vísceras. Durante las primeras etapas de la hipertermia, la vasoconstricción en la región esplénica está bien mantenida.

La aclimatación se desarrolla generalmente después de una semana de exposición prolongada al calor y se asocia con un aumento sustancial en el volumen de sudor y con una reducción en el contenido de sodio en el sudor de 6-7%. Se activa el eje renina-angiotensina-aldosterona con expansión del volumen plasmático y conservación de sal, produ-

ciéndose una mejora en la función cardiovascular y un incremento en la adaptación a rabdomiólisis.¹⁰

La respuesta de fase aguda es una reacción coordinada que involucra a las células endoteliales, leucocitos y células epiteliales, que protege contra el daño tisular y promueve la reparación¹¹. Se produce una variedad de citocinas en respuesta al calor endógeno o ambiental que median la fiebre, leucocitosis, aumento de la síntesis de proteínas de fase aguda, el catabolismo muscular, estimulación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal, y la activación de los leucocitos y las células endoteliales.

La interleucina-1 fue el primer mediador conocido de la inflamación sistémica inducida por el ejercicio extenuante, la interleucina-6 producida durante el estrés térmico modula la respuesta inflamatoria aguda local¹² y sistémica mediante el control de los niveles de citocinas inflamatorias, también estimula la producción hepática de proteínas antiinflamatorias de fase aguda, que inhiben la producción de especies reactivas del oxígeno y la liberación de las enzimas proteolíticas de los leucocitos activados.

Otras proteínas de fase aguda estimulan la adhesión, proliferación y angiogénesis de células endoteliales, lo que contribuye a la reparación y la curación. El incremento en la expresión del gen que codifica la interleucina-6 en las células musculares humanas, pero no en los monocitos, durante la respuesta de fase aguda al ejercicio sugiere la aparición de inflamación local. La progresión sistémica de la respuesta inflamatoria secundaria consiste en otras células, como los monocitos, en secuencia similar a los que se producen en sepsis. Este mecanismo puede acarrear una alteración de la mucosa y barrera inmunológica intestinal con aumento en los niveles de endotoxinas circulantes y consiguiente exageración en la producción de citocinas inflamatorias que inducen activación celular endotelial.^{13, 14} Es posible que la lesión de la mucosa y la alteración de la permeabilidad intestinal provoquen un aumento de los niveles de endotoxinas que son las desencadenantes en la progresión de estrés por calor a golpe de calor.

La capacidad para mantener una vasoconstricción a alta temperatura corporal (42 °C) se puede perder, lo que marca el inicio del colapso circulatorio. El mecanismo subyacente de la marcada vasodilatación en la arteria mesentérica es desconocido, esta pérdida de la vasoconstricción compensatoria no parece ser debido a la reducción de la conducción nerviosa enfrente a la región, ya que la actividad nerviosa simpática esplénica y los niveles plasmáticos de catecolaminas están elevados durante la hipertermia moderada y severa. Aunque la actividad del nervio esplénico y los niveles plasmáticos de catecolaminas se incrementan durante la hipertermia, se pierde el tono vasoconstrictor, por lo que es posible especular que la hipertermia altera la función del receptor adrenérgico o la vía de señalización vinculada a estos receptores produciéndose el colapso circulatorio.

En la respuesta de shock térmico la expresión de proteínas de shock térmico es lo que determina la tolerancia o susceptibilidad individual a la lesión por calor.²¹ El incremento prote-

ge a las células del daño por calor y un descenso en la expresión de estas proteínas, por alteración en la transcripción genética, conlleva una gran sensibilidad celular al calor.¹⁵

En la progresión de estrés por calor a golpe de calor intervienen: el fallo del sistema termorregulador, exageración de la fase de respuesta aguda y alteración en la expresión de proteínas de shock térmico.

La patogénesis del golpe de calor es desconocida, por lo que se han propuesto varios posibles mecanismos, incluyendo una pérdida de control de la función termorreguladora del sistema nervioso central y una falla fisiológica. El resultado final en ambos casos es la incapacidad para mantener la homeostasis de la presión arterial y la producción posterior de un síndrome similar al choque.⁷ El daño primario en el golpe de calor es debido a la toxicidad celular directa producida por el incremento de la temperatura por encima de 42 °C. Por encima de esta temperatura (definida como temperatura máxima crítica) se deteriora la función celular debido al cese de la actividad mitocondrial, alteraciones en los enlaces químicos implicados en reacciones enzimáticas e inestabilidad en la membrana celular.⁸ Este efecto tóxico de la temperatura desencadena el fallo orgánico. Estudios en células lesionadas y modelos animales sugieren que el calor induce directamente daño de tejidos,¹⁶ y que la temperatura máxima crítica en humanos es una temperatura corporal de 41.6-42 °C durante 45 minutos a 8 horas. En temperaturas extremas (49-50 °C) son suficientes cinco minutos para que todas las estructuras celulares se destruyan y ocurra la necrosis celular. La deshidratación, acidosis metabólica e hipoxia local potencian el daño.

La influencia fisiológica a los correspondientes aumentos en la temperatura por encima de 37 °C sobre la reactividad vascular a los agentes vasoactivos no está aún clara. Uno de los principales ajustes a la hipertermia en las ratas durante el estado de estrés es un aumento en la resistencia vascular mesentérica mediado simpáticamente, y la redistribución concomitante del gasto cardíaco de las vísceras a las regiones cutáneas para la disipación de calor.

A pesar de un continuo aumento de la actividad nerviosa simpática esplácnica, la resistencia mesentérica muestra una respuesta trifásica a la hipertermia. La resistencia aumenta durante las primeras etapas de la hipertermia, alcanza una meseta, y luego disminuye durante las últimas etapas de la hipertermia cuando la temperatura corporal se aproxima a 41-42 °C. Este patrón sugiere que la capacidad de respuesta vascular a los impulsos nerviosos en esta región cambia al aumentar la temperatura, sobre todo a temperaturas superiores a 40 °C.

Además de la reducción de la capacidad de respuesta vascular a los agonistas adrenérgicos, la disminución de la resistencia durante las últimas etapas de la hipertermia también podría ser debido a un aumento en la liberación y la sensibilidad al óxido nítrico. Así, la respuesta hemodinámica en la arteria mesentérica implica que la reactividad vascular a agentes vasoconstrictores y vasodilatadores se altere durante la hipertermia.¹⁷

Los α_1 -adrenérgicos post-sinápticos vasculares desempeñan un papel primordial en el mantenimiento de la resistencia vascular periférica y, por lo tanto, en el control de la presión arterial sistémica; hay tres subtipos de receptores funcionales α_1 -adrenérgicos α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} ,¹⁸ que median la vasoconstricción simpática y así modulan la resistencia vascular, otros estudios funcionales evidencian la existencia de un cuarto receptor α_1 adrenérgico el α_{1L} .¹⁹

Cuatro variantes en la unión de carbono terminal de los α_{1A} -adrenérgicos se han encontrado. La estimulación de los tres subtipos resulta en la activación de la vía de señalización $G_{q/11}$, implicando la activación de la fosfolipasa C, la generación de segundos mensajeros inositol^{1,4,5} trifosfato y diacilglicerol, y la movilización de calcio intracelular.²⁰

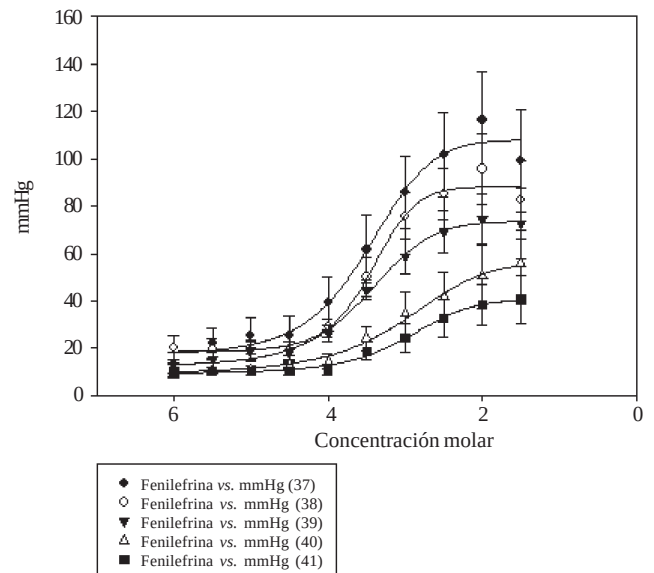


Figura 1. Efecto de la fenilefrina en la respuesta contractil de la arteria de lecho mesentérico de ratón a 37, 38, 39, 40 y 41 °C.

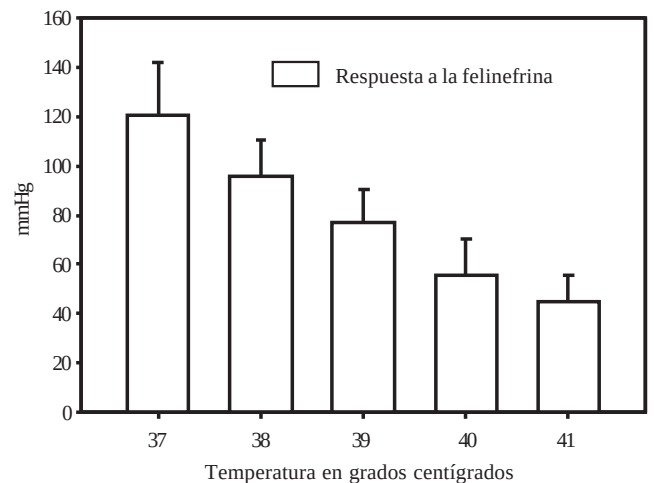


Figura 2. Eficacia máxima de la fenilefrina en la respuesta contractil de la arteria de lecho mesentérico de ratón a 37, 38, 39, 40 y 41 °C.

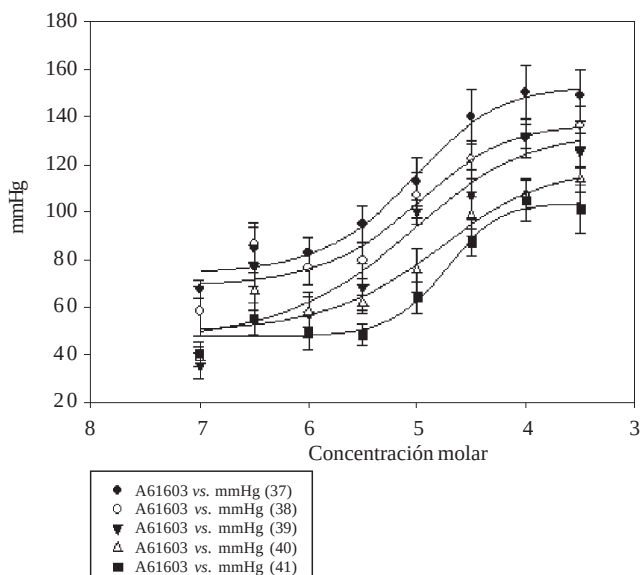


Figura 3. Curva respuesta concentración *A61603 n = 5. Efecto del A61603 en la respuesta contráctil de la arteria de lecho mesentérico de ratón a 37, 38, 39, 40 y 41 °C.

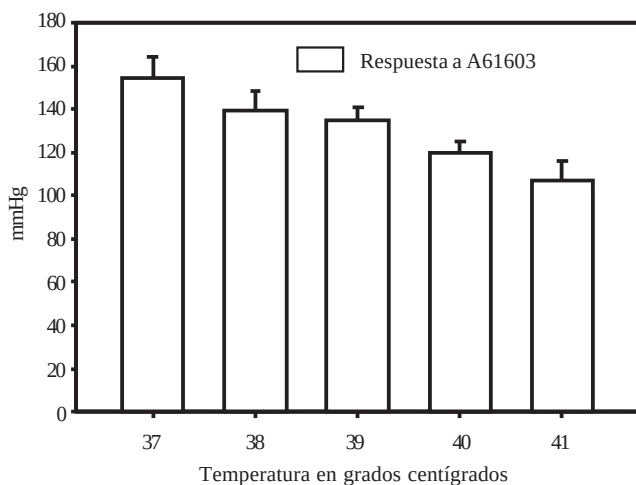


Figura 4. Eficacia máxima del A61603 en la respuesta contráctil de la arteria de lecho mesentérico de ratón a 37, 38, 39, 40 y 41 °C.

Existe información limitada sobre los subtipos de α_1 adrenérgicos en los vasos sanguíneos humanos, éstos muestran la presencia de mRNAs de los tres subtipos (Shibata y cols., 1998; Rudner y cols. 1999; Moriyama y cols. 2000), pero no todos ellos actúan juntos, ya que las respuestas contráctiles a los agonistas esta mediada sólo por $\alpha_{1A/L}$ en la arteria renal (Moriyama y cols. 2000), la α_{1A} en la arteria mesentérica (Shibata y cols. 1998), α_{1A} y α_{1D} en la arteria mamaria (Rudner y cols., 1999) y α_{1B} en la arteria ilíaca interna (Hatan y col., 1994).²¹

En otro estudio se identificó que los α_{1A} adrenérgicos están envueltos en la respuesta contráctil de lechos vasculares de diferentes especies y son los subtipos predomi-

nantes en la resistencia vascular en roedores, conejos y humanos.²²

En los estudios previos no se menciona la acción específica, ni los niveles de expresión de los receptores α_1 adrenérgicos durante la hipertermia, que puedan llevarnos a una respuesta específica de que es lo que lleva al organismo a un estado de choque, en donde la falla cardiovascular es un punto clave para su tratamiento, por lo que se hace importante el tratar de explicar cuál es la posible respuesta a esta patología que en un futuro pueda ser mejor estudiada.

Material y métodos

Para nuestro estudio se utilizaron ratones Balb-C, de 30-35 g, de ocho semanas de edad, alimentados con dieta Land

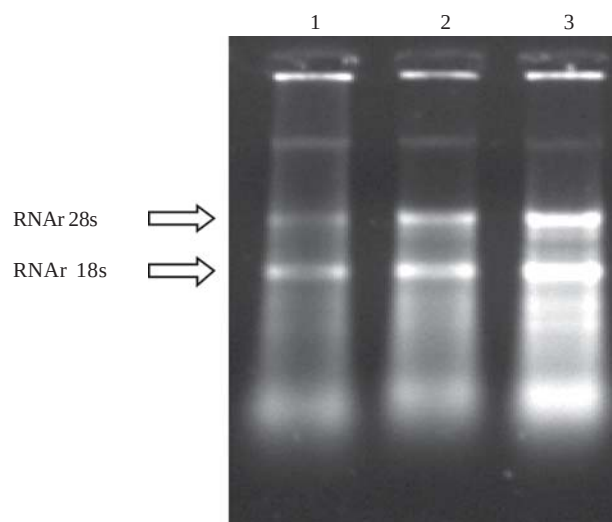


Figura 5. Pureza e integridad del RNA del Lecho Vascular Mesentérico de Ratón. El RNA fue obtenido utilizando el método descrito por Chomezynski y cols., (1987) con Trizol y su integridad fue evaluada por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Carril 1, RNA de LVM de ratón obtenido a 37 °C, carril 2 RNA de LVM de ratón expuesto y obtenido a 39 °C y carril 3 LVM de ratón expuesto y obtenido a 41 °C, como se mencionó en materiales y métodos.

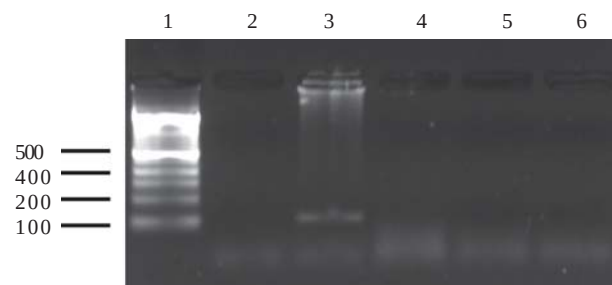


Figura 6. Amplificación de un fragmento del gen de *gapdh* a partir de RNA tratado con DNasa. El RNA fue tratado con DNasa y posteriormente utilizado como templado para amplificar un fragmento de aproximadamente 100 pb del gen de *gapdh*; los productos de PCR se presentan en gel de agarosa al 2%. Carril 1, marcador de tamaño molecular 100 pb (Invitrogen); carril 2, control negativo de la PCR sin DNA templado; carril 3 control positivo de la PCR en el que se adicionó 10 µg DNA de Rata como templado; carriles 4, 5 y 6 RNA de LVM de ratón expuestos a temperaturas de 41 °C, 39 °C y 37 °C, respectivamente.

Chow y agua ad Libitum, los cuales se mantuvieron hasta el desarrollo del experimento en condiciones similares de luz-oscuridad, dentro del Bioterio de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad.

Los animales de experimentación se dividieron en dos grupos: el primero para la realización de estudios fisiológicos ($n = 25$) y el segundo para realizar estudios moleculares ($n = 15$).

Estudios fisiológicos para determinar el efecto de la hipertermia sobre la contracción inducida por la Fenilefrina (FE) en la vasculatura de lecho mesentérico de ratones expuestos a 37, 38, 39, 40 y 41 °C.

Estudios moleculares para evaluar la expresión relativa de los receptores α_1 adrenérgicos.

Todos los procedimientos se apegaron a las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio de la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, y fueron aprobados por el Comité para el uso de animales.

Preparación de los tejidos de estudio

Para obtener los tejidos de estudio, los ratones se anestesiaron Pentobarbital sódico (50 mg/kg de peso corporal) vía intraperitoneal, se realizó la extracción del tejido de estudio, mediante una incisión en la línea media abdominal disecando piel y tejido subcutáneo, hasta localizar y canalizar la arteria mesentérica principal, con un catéter de plástico amarillo 24 GA (BD Insyte™), manteniéndola con una perfusión continua a 3 mL/min con una bomba peristáltica (Masterflex™, Cole Palmer) con solución Krebs-Henseleit, oxigenada con carbógeno (oxígeno 95%, anhídrido carbónico 5%).

El lecho vascular mesentérico se extrajo y se disecó el tejido adiposo y conjuntivo adyacente, así como el intestino, quedando sólo la vasculatura, la cual se conectó a un transductor de presión TCI (Biopac Systems, Inc., Santa Barbara, CA, USA), acoplado a un analizador MP100A (Biopac) con un software acknowledge™, permitiendo su estabilización por 1 hora a 37 °C.

Estudios fisiológicos

En este estudio se evaluó la respuesta de los receptores adrenérgicos a la fenilefrina (agonista α_1 -adrenérgico) en la respuesta contráctil de la vasculatura mesentérica de ratones expuestos a hipertermia determinando el efecto de la hipertermia sobre la contracción inducida por la Fenilefrina (FE) en la vasculatura de lecho mesentérico de ratones expuestos a 37, 38, 39, 40 y 41 °C por lo que se realizaron curvas concentración-respuesta con volúmenes de 10 μ L de fenilefrina (FE), en un rango de concentraciones acumulativas de [1 X 10^{-6.0}, 3 X 10^{-6.0}, 1 X 10^{-5.0}, 3 X 10^{-5.0}, 1 X 10^{-4.0}, 3 X 10^{-4.0}, 1 X 10^{-3.0}, 3 X 10^{-3.0}, 1 X 10^{-2.0}, 3 X 10^{-2.0} y 1 X 10^{-1.0} M], para lo cual se formaron grupos independientes, cada uno con cinco tejidos, utilizando el modelo de órgano aislado perfundido, por lo que se utilizó un modelo en donde se integra un circuito con dos bombas y dos líquidos circulantes. Para mantener la temperatura deseada en los tejidos utiliza-

mos material de doble fondo, lo que nos permite el flujo de agua bidestilada a través de un circuito externo, utilizando una bomba termostática cicladora tipo analógico de marca HAAKE™, modelo E-1 (Figura 6), la cual a través de un botón giratorio permite el control de una temperatura constante durante el desarrollo del experimento, seleccionando en cada experimento la temperatura deseada.

En el circuito interno en los matraces de doble fondo se agregó la solución de Krebs (NaCl, 118; NaHCO₃ 2.5, KCl, 4.7; MgSO₄, 1.2; KH₂PO₄, 1.17; glucosa, 11.1 y EDTA, 0.026 mM; con un pH 7.4 y oxigenada en burbujeo constante de una mezcla de 95/5% de O₂/CO₂) semejante a las condiciones fisiológicas de la sangre, la cual se mantiene a un flujo constante de 3.0 mL/min a través de una bomba peristáltica Marca Masterflex™ (Cole Parmer Instrument Co. Chicago Illinois 60648) transportando el Krebs desde el matraz hasta una serpentina de doble cámara (Figura 8), donde de nueva cuenta es recalentado para asegurar la temperatura, de ahí fluye hasta un tubo donde un extremo desemboca en el sensor de presión acoplado a un transductor de presión TCI (Biopac Systems™ MP100, Inc., Santa Barbara, CA, USA), otro extremo se encuentra conectado a un dispositivo para aplicación de fármacos (el cual se obtuvo de un equipo para venoclisis) y en el otro extremo se conecta con el catéter donde se monta el tejido aislado en este caso el lecho vascular mesentérico de ratón (Figura 10).

El sistema Biopac™ MP100, consta de un Hardware y un software; El Hardware conformado en este caso por el transductor de presión TCI (Biopac™ Systems MP100, Inc., Santa Bárbara, CA, USA) nos permite registrar los cambios en la Tensión arterial obtenidos, mediante la transducción de los cambios en la tensión mecánica originados por la contracción o relajación del músculo liso del lecho vascu-

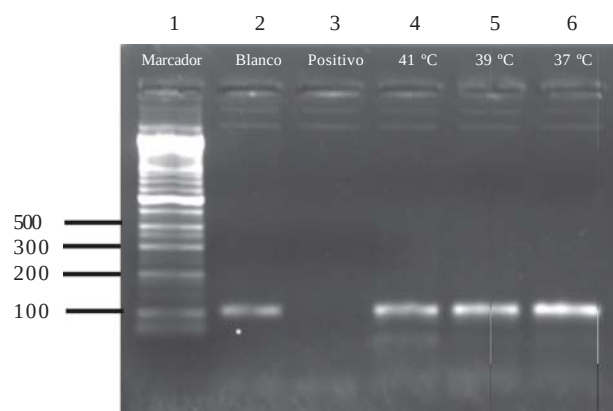


Figura 7. Amplificación de un fragmento del gen de *gapdh* a partir de la síntesis de cDNA con el RNA tratado. El cDNA fue sintetizado y posteriormente se utilizó como template para amplificar un fragmento del gen de *gapdh*; los productos de PCR se presentan en gel de agarosa al 2%. Carril 1, marcador de tamaño molecular 100 pb (Invitrogen); carril 2, control negativo de la PCR sin DNA templado; carril 3 control positivo de la PCR en el que se adicionó 10 μ g de DNA de rata como template; carril 4, 5, 6, amplificado para el gen de *gapdh* en el que se utilizó como template cDNA de LVM de ratón a 41, 39 y 37 °C, respectivamente.

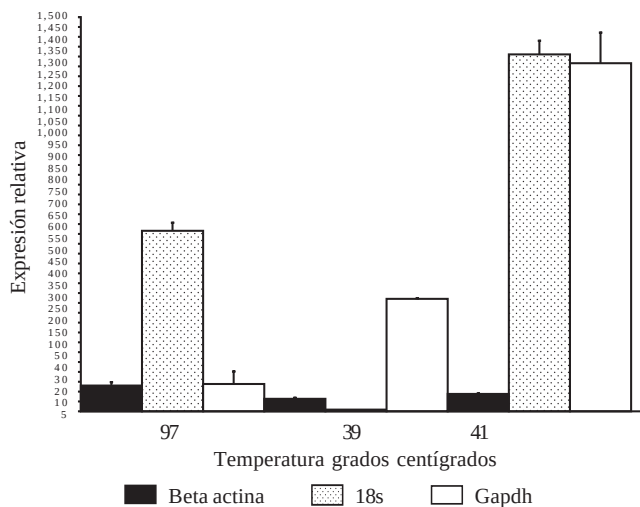


Figura 8. Aplicación del método $2^{-\Delta C_T}$ para la selección del control endógeno. Para validar el efecto del tratamiento en la expresión de los genes candidatos a ser utilizados como endógeno, se determinó la cantidad relativa de los genes *beta actina*, *18s* y *gapdh* correspondientes a cada RNA extraído de Lecho Vascular Mesentérico de Ratón extraído tras ser expuesto a 37, 39 y 41° C. La cantidad relativa se determinó usando la ecuación $2^{-\Delta C_T}$ donde $\Delta C_T = (C_{T \text{ temperatura } X} - C_{T \text{ temperatura } 37^\circ \text{ C}})$. El cambio en la cantidad relativa se observa en la gráfica.

lar mesentérico al aplicar el estímulo, cuando inyectamos en el sistema de aplicación de medicamentos 10 μL de Fenilefrina a concentraciones acumulativas [1×10^{-6} a 1×10^{-1}] con intervalos de $\frac{1}{2}$ logarítmico] en cambios de corriente eléctrica los cuales son aumentados por un amplificador al que se encuentra conectado, en donde se realiza este primer acondicionamiento de la señal, éste se acopla en cascada a un módulo universal que permite la comunicación entre este y el módulo de adquisición el cual se encuentra conectado al PC para poder visualizar el registro mediante el software de BIOPAC™, *AcqKnowledge* versión 3.9.0 como un mensaje digital en que se transformó la señal eléctrica para el ordenador.

Una vez que se conecta el catéter con el tejido aislado, se determina la función del músculo liso vascular de lecho mesentérico del ratón, después de permitir un periodo de estabilización (en el cual la tensión basal del tejido no presentó cambios), de 60 minutos se aplicaron dos estímulos con Fenilefrina ($3 \times 10^{-4.0} \text{ M}$) a los 30 y 60 minutos, y finalmente, a los 90 minutos se realizó una curva de concentración respuesta a 37 °C mediante la administración de concentraciones acumulativas de Fenilefrina [1×10^{-6} a 1×10^{-1} con intervalos de $\frac{1}{2}$ logarítmico].

Una vez comprobada la funcionalidad de los tejidos, de manera independiente se les realizaron Curvas de Concentración respuesta a agonistas de los receptores α_1 adrenérgicos en presencia de antagonistas específicos, permitiendo que el tejido se estabilizara por 30 minutos a una perfusión continua de 3 mL/min con una nueva solución de Krebs a la que se adicionó Propanolol [1×10^{-7}], con la fina-

lidad de controlar el efecto de la activación inespecífica de la fenilefrina (FE) a los receptores β_1 -adrenérgicos y β_2 -adrenérgicos, y Rauwalscina [1×10^{-7}], para bloquear el efecto de los α_2 -adrenérgicos.

Curvas de concentración respuesta a agonista de los receptores α_1 adrenérgicos. A un grupo de cinco tejidos extraídos, de manera independiente se les realizaron curvas con concentraciones acumulativas de Fenilefrina [1×10^{-6} a 1×10^{-1} con intervalos de $\frac{1}{2}$ logarítmico] a 37, 38, 39, 40, y 41 °C para lo cual, al final de cada curva se restableció la tensión de reposo por 15 minutos antes de elevar la

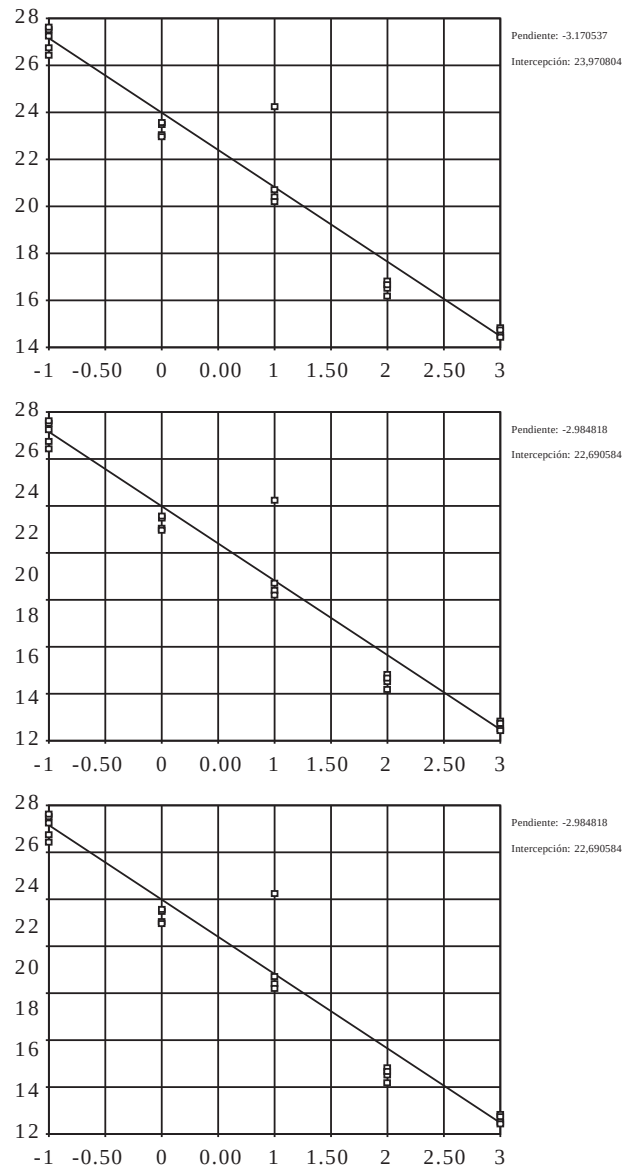


Figura 9. Determinación de la eficiencia de amplificación para los genes analizados. Los valores de C_T obtenidos de la amplificación por PCR en tiempo real de cada uno de los genes analizados se graficaron contra el logaritmo de la concentración del cDNA utilizado para la amplificación. La figura muestra las gráficas obtenidas para los genes α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} adrenérgicos, respectivamente.

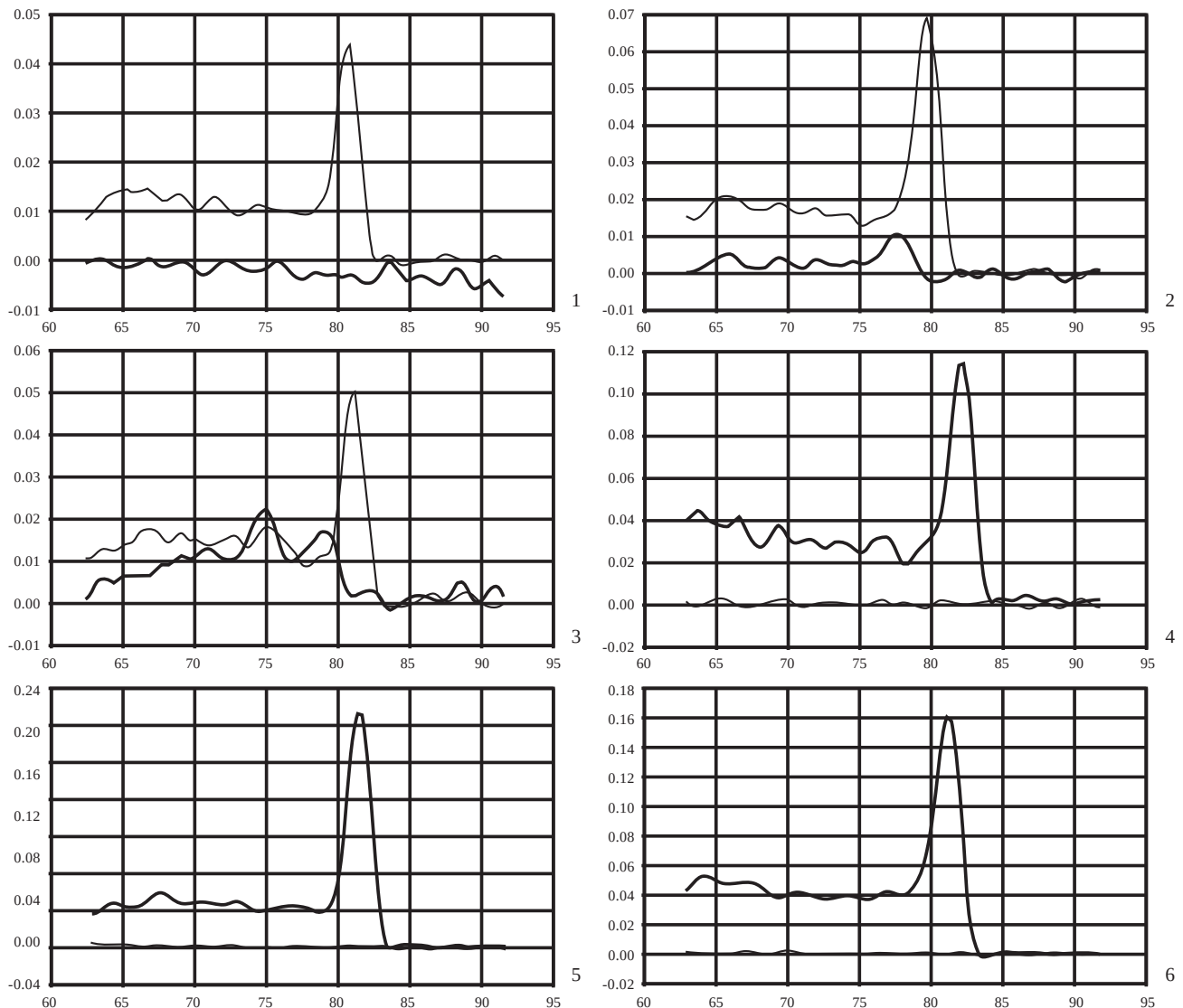


Figura 10. Curvas de disociación para los genes analizados. La valoración de la especificidad de los iniciadores en la PCR para (1) beta actina, (2) 18s, (3) *gapdh* y los genes estudiados (4) α_{1A} , (5) α_{1B} , (6) α_{1D} adrenérgicos, se muestra en las curvas de disociación que se obtienen de graficar la derivada negativa de la fluorescencia contra la temperatura para los genes en la PCR tiempo real con el SYBR Green.

temperatura al siguiente grado, permitiendo que el tejido se equilibrara a esta temperatura durante 30 minutos antes de la realización de la siguiente curva de concentración respuesta, realizando esto entre grado y grado hasta los 41 °C.

Curvas de concentración respuesta a agonista específico de los receptores α_{1A} adrenérgicos. Para determinar la participación de los receptores α_{1A} adrenérgicos se utilizó otro grupo de cinco tejidos extraídos, de forma independiente, una vez estabilizados, se les realizaron curvas con concentraciones acumulativas de A61603 [1×10^{-7} a 1×10^{-3} con intervalos de 1/2 logarítmico], el cual es un agonista específico α_{1A} adrenérgico, a 37, 38, 39, 40, y 41 °C, por lo que al final de cada curva se restableció la tensión de reposo por 15 minutos antes de elevar la temperatura al siguiente grado, permitiendo que el tejido se equilibrara a esta temperatura durante 30 minutos antes de la realización de la si-

guiente curva de concentración respuesta. Repitiendo éste procedimiento entre grado y grado hasta los 41 °C.

Estudios moleculares

Cuantificación relativa de los receptores α_1 adrenérgicos por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Se realizó con la finalidad de investigar los niveles de expresión de los receptores adrenérgicos al exponer el tejido a diferentes grados de temperatura. Para esto se cuantificó su expresión relativa mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Tiempo Real, para lo cual se exploraron tres temperaturas diferentes: 37, 39 y 41 °C.

Los oligonucleótidos para estos ensayos se diseñaron utilizando el programa Primer Express 2.0™, de Applied Biosystems™. La secuencia de todos los oligonucleótidos utilizados como cebadores, previamente diseñados (Martí-

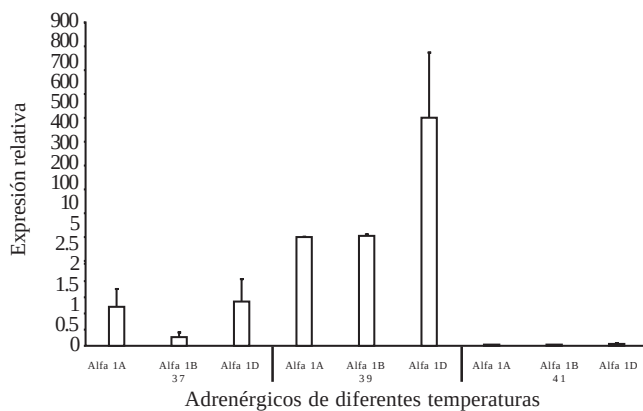


Figura 11. Expresión relativa de los genes analizados a 37, 39 y 41° C. Las graficas muestran la expresión relativa de los genes seleccionados durante la inducción de Hipertermia. 1 representa la expresión relativa de los genes en el tejido obtenido a 37, 39 y 41° C respectivamente.

nez Salas y cols.), para la PCR, así como la de los genes endógenos se muestran en el *cuadro 2*.

La preparación de los tejidos para este estudio se realizó de la misma forma que para los estudios fisiológicos. Se formaron tres grupos en cada uno de los cuales se analizaron cinco lechos vasculares mesentéricos, extraídos y tratados de forma independiente, los cuales se perfundieron con solución Krebs a 37 °C, se conectó el tejido con el catéter al transductor TCI (Biopac System Inc., MP100 CA, USA) y a una computadora, permitiendo medir los cambios en la presión de perfusión arterial a un

flujo constante de 3.0 mL/min, para determinar la tensión basal del músculo liso vascular de lecho mesentérico y comprobar la funcionalidad del tejido, una vez que se estabilizó su amplitud y frecuencia a los 60 min con base en lo observado en los estudios fisiológicos, sin sobrepasar encima de los 50 mmHg y sin realizar ningún estímulo se mantuvo la temperatura por 30 min más para permitir su equilibrio.

Para la obtención de los tejidos a 37 °C se desmontó el catéter con el tejido del transductor al término de este lapso y se lavó en cápsula de Petri con solución Krebs y posteriormente con solución Hartman a 37 °C, se retiró el catéter del tejido y se introdujeron en un tubo de Eppendorf con 1 mL de Trizol® (Invitrogen™), realizando el mismo procedimiento con cada uno de los cinco tejidos de forma independiente, al término de la extracción de éstos, el tubo se almacenó a -70° C hasta ser procesada la muestra.

Para determinar los niveles de expresión de los receptores adrenérgicos al exponer el tejido a 39 °C después de que el tejido se estabilizó a 37 °C se elevó la temperatura a 38 °C, permitiendo que se equilibrara por 15 minutos y se estabilizara por 30 minutos, elevándose la temperatura al término a 39° C permitiendo se equilibrara por 15 minutos y se estabilizara por 30 minutos para posteriormente desmontar el catéter con tejido del transductor, lavarlo en cápsula de Petri con solución Krebs y posteriormente con solución Hartman a 39 °C, retirarle el catéter al tejido e introducirlo en un tubo de Eppendorf con 1 mL de Trizol® (Invitrogen™), realizando el mismo procedimiento con cada uno de los cinco tejidos de forma independiente, al término

Cuadro 1. Resumen del Análisis de CTs para la selección del control endógeno.

Temperatura	C _T	Promedio del control	ΔC _T	2 ^{Δ(-ΔCT)}
Actina				
Control 37	30.5534	30.9153667	-0.36196667	1.28517664
Control 37	30.5856	30.9153667	-0.32976667	1.25681009
Control 37	31.6071	30.9153667	0.69173333	0.61910957
39	32.2959	30.9153667	1.38053333	0.38407678
39	32.6844	30.9153667	1.76903333	0.29340527
39	32.1933	30.9153667	1.27793333	0.41238583
41	34.8168	30.9153667	3.90143333	0.06691932
41	34.1616	30.9153667	3.24623333	0.10538684
41	34.6258	30.9153667	3.71043333	0.07639207
Gapdh				
Control 37	36.1562	36.93175	-0.77555	1.71184253
Control 37	37.7073	36.93175	0.77555	0.58416588
39	32.4243	36.93175	-4.50745	22.744566
39	31.9859	36.93175	-4.94585	30.8211759
41	26.4608	36.93175	-10.47095	1419.28637
41	26.8308	36.93175	-10.10095	1098.21895
18S				
Control 37	22.1789	30.9153667	-8.73646667	426.519138
Control 37	22.6501	30.9153667	-8.26526667	307.675694
Control 37	22.1756	30.9153667	-8.73976667	427.495868
39	35.8301	30.9153667	4.91473333	0.03315262
39	35.7688	30.9153667	4.85343333	0.03459163
39	35.0723	30.9153667	4.15693333	0.0560581
41	20.4374	30.9153667	-10.4779667	1426.206
41	20.7032	30.9153667	-10.2121667	1186.22886
41	20.5633	30.9153667	-10.3520667	1307.02106

Cuadro 2. Eficiencia de los genes analizados.

Gen	Adrenérgicos Pendiente	Eficiencia (%)
α_{IA}	-3.170537	100
α_{IB}	-2.984818	96.6
α_{ID}	-2.984818	96.6

no de la extracción de éstos, el tubo se almacenó a -70 °C hasta ser procesada la muestra.

Para determinar los niveles de expresión de los receptores adrenérgicos al exponer el tejido a 41 °C después de que el tejido se estabilizó a 37 °C se elevó la temperatura a 38 °C, permitiendo que se equilibrara por 15 minutos y se estabilizara por 30 min, elevándose la temperatura al término a 39 °C repitiendo el mismo procedimiento entre grado y grado hasta alcanzar los 41 °C, permitiendo que se equilibrara por 15 min y se estabilizara por 30 min para posteriormente desmontar el catéter con tejido del transductor, lavarlo en cápsula de Petri con solución Krebs y posteriormente con solución Hartman a 41 °C, retirarle el catéter al tejido e introducirlo en un tubo de Eppendorf con 1 mL de Trizol® (Invitrogen™), realizando el mismo procedimiento con cada uno de los cinco tejidos de forma independiente, al término de la extracción de éstos, el tubo se almacenó a -70° C hasta ser procesada la muestra.

Extracción de RNA

Las muestras extraídas de Lecho Vascular Mesentérico (LVM) a temperaturas de 37, 39 y 41° C se procesaron para extraer RNA total según el método de Chomczynski y Sacchi, 1987

Para cuantificar el RNA extraído se tomaron lecturas a longitudes de onda de 260 nm en un espectrofotómetro (Na-

noDrop 1000 spectrophotometer, Thermo SCIENTIFIC). Posteriormente, se realizó el cálculo de la concentración según la siguiente fórmula:

Concentración de RNA en $\mu\text{g/mL}$ = 40 X absorbancia a 260 nm.

La integridad del RNA se evaluó en geles de agarosa (Invitrogen) al 1%, teñidos con Bromuro de Etidio.

Todas las muestras se trataron con DNasa RQ1 (DNase Promega™) para eliminar el DNA genómico, con la finalidad de verificar la ausencia de DNA de la muestra de RNA previamente extraído se realizó una PCR para amplificar el gen endógeno GAPDH (gliceraldehído-3-fostato deshidrogenasa), del producto de las PCR, se tomaron 4 μL y fueron separados en un gel de agarosa teñido con Bromuro de Etidio en una cámara de electroforesis horizontal (horizon 58, life technologies) a un voltaje constante de 80 volts durante 20-30 minutos. Posteriormente, el gel fue visualizado y fotodocumentado con un equipo Kodak EDAS 290.

Una vez verificada la ausencia de DNA en el RNA se procedió a sintetizar el cDNA utilizando el Kit GeneAmp RNA PCR siguiendo el protocolo de Applied Biosystem. Con la finalidad de verificar la presencia de cDNA de la muestra tratada se realizó nuevamente una PCR para amplificar el gen endógeno GAPDH (gliceraldehído-3-fostato deshidrogenasa), utilizando un control positivo y uno negativo.

Amplificación de genes por PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real se realizó en un equipo ABI PRISM 7000 Sequence Detection System-SDS versión del programa 1.1 PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA, utilizando SYBR Green como sistema de detección y el Kit SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosyste-

Cuadro 3. Resumen de los valores de expresión relativa en los genes estudiados.

Alfa α_{IA} adrenérgicos			
	Control		Hipertermia
37° C	39° C	41° C	
Expresión relativa	1.21529661	10.9244434	0.0237251
Error estándar	0.55169429	3.248076999	0.005080935
p =	0.001		
Alfa α_{IB} adrenérgicos			
	Control		Hipertermia
37° C	39° C	41° C	
Expresión relativa	0.26018871	14.4593109	0.0174752
Error estándar	0.159097425	7.261479087	0.004954022
p =	0.023		
Alfa α_{IC} adrenérgicos			
	Control		Hipertermia
37° C	39° C	41° C	
Expresión relativa	1.36213726	505.270634	0.05395403
Error estándar	0.718479326	271.2781729	0.015268875
p =	0.035		

ms). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 12.5 µL, los cuales contenían 6.25 mL, del Master Mix SYBR Green, 1.75 mL de agua, 2.5 mL del templado y 1.25 mL de cada uno de los iniciadores a concentraciones de 3 µM previamente estandarizadas para obtener la mejor amplificación (para amplificar los genes GAPDH, β -actina y 18s se utilizaron concentraciones equimolares de 3 µM para cada iniciador; y antisentido, respectivamente).

Finalizada la PCR, las reacciones se sometieron a incrementos de temperatura desde 60 °C a 95 °C para construir una curva de disociación de cada gen amplificado.

Nosotros utilizamos el método de cuantificación relativa en que se compara el C_T de la muestra desconocida contra una muestra calibradora que sirve como referencia fisiológica (muestras provenientes de rata en condiciones normales).

El método del $2^{-\Delta C_T}$ (Livak y cols. 2001) es un método conveniente para analizar los cambios de expresión relativa, por lo que fue seleccionado debido a que es sencillo, fácil de manejar y de análisis rápido. Las ecuaciones que se consideraron para calcular ΔC_T para el método de cuantificación relativa fueron:

$$\begin{aligned} C_{T \text{ gen Pb}} - C_{T \text{ g3pdh}} &= \Delta C_{T \cdot} \\ \Delta C_{T \text{ de la muestra}} - \Delta C_{T \text{ del calibrador}} &= \Delta \Delta C_{T \cdot} \\ \text{Cantidad relativa} &= 2^{-\Delta \Delta C_T} \end{aligned}$$

El análisis de un control endógeno se determina para normalizar las diferencias en la extracción del RNA y la eficiencia de la reacción de síntesis de cDNA, nosotros determinamos la cantidad relativa de los genes β -actina y GAPDH en cDNA correspondiente a cada RNA extraído de los tejidos de Lecho Vascular mesentérico de ratón expuestos a 37, 39 y 41 °C, por amplificación con PCR en tiempo real y la cantidad relativa de cada uno de estos genes, se determinó con la fórmula:

$$\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ tiempo x}} - \Delta C_{T \text{ tiempo 0}}$$

Finalmente elegimos como gen endógeno aquel que no mostraba una relación estadísticamente significativa entre el tratamiento a lo largo del tiempo y la cantidad relativa el cual fue la beta actina.

Para determinar esta eficiencia de amplificación, se realizaron cinco diluciones decuples seriadas del producto de PCR, previamente cuantificado a 260 nm, el cual contenía el fragmento esperado para cada gen, posteriormente estas diluciones se amplificaron por triplicado para obtener los valores de C_T . Éstos, fueron graficados contra el logaritmo de la concentración total de fragmento de PCR y se calculó la regresión lineal. El valor de la pendiente fue utilizada para calcular la eficiencia (Rasmussen 2001) con la ecuación siguiente:

$$E = 10^{(-1/\text{pendiente})} - 1$$

El análisis estadístico de los datos y los gráficos se realizaron utilizando los programas Sigma STAT 2.03 y Sigma

Plot versión 10.0. Se usó ANOVA y Tukey para comparar los cambios de expresión de los receptores α_1 adrenérgicos en el Lecho Vascular Mesentérico de ratón expuesto a 37, 39 y 41 °C.

Resultados

En las curvas de concentración respuesta realizadas para la evaluación de la respuesta contráctil de la arteria principal de lecho vascular mesentérico en los estudios fisiológicos observamos la disminución en la respuesta para Fenilefrina a medida que se aumentó la temperatura a la que se expusieron los tejidos la cual fue de 37, 38, 39, 40 y 41 °C (Figura 1).

En la figura 2 se observa la disminución en la respuesta contráctil producida tras el estímulo con el agonista, en donde la eficacia máxima, de la Fenilefrina disminuye progresivamente de 120.31 mmHg a 37 °C, 95.55 mmHg a 38 °C, 76.79 a 39 °C, 55.83 mmHg a 40 °C y finalmente de 44.87 a 41 °C, teniendo una diferencia de 75.435 mmHg entre la eficacia a 37 y 41 °C.

Se realizaron curvas de respuesta concentración en tejidos expuestos *in vitro* a las mismas temperaturas que los estudiados con Fenilefrina obteniendo respuestas similares en donde hay una disminución notable en cuanto a las respuestas de los tejidos conforme se aumenta la temperatura (Figura 3).

En la figura 4 se observa la disminución en la respuesta contráctil producida tras el estímulo con el agonista, en donde la eficacia máxima al A61603 disminuye progresivamente de 150.36 mmHg a 37 °C, 136.04 mmHg a 38 °C, 131.82 a 39 °C, 113.63 mmHg a 40 °C y finalmente de 101.26 a 41 °C, teniendo una diferencia de 49.1 mmHg entre la eficacia a 37 y 41 °C.

En la segunda estrategia experimental se determino la expresión génica de los receptores α_1 adrenérgicos mediante la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (rtPCR) en el lecho vascular mesentérico (LVM) de ratón obtenido de animales de los tres grupos experimentales: Controles (37 °C), y expuestos a hipertermia utilizando los expuestos a 39 y 40 °C.

Los resultados mostraron que el RNA estaba íntegro, como se observa en la figura 5, en donde se aprecia en todos los carriles una señal difusa a lo largo de todo el gel, que corresponde al RNAm, dos bandas superiores bien definidas correspondientes al RNA ribosomal 28S y 18S y unas bandas inferiores difusas que podrían corresponder a RNA ribosomal 5S y/o a RNA de transferencia.

Como se puede observar en la figura 6, el tratamiento con DNasa se verificó al observar la ausencia de amplificación después de hacer una PCR para un fragmento del gen de *gapdh*.

Tratado el RNA con DNAsas se procedió a sintetizar el cDNA, verificando la eficiencia de la síntesis al observar los productos de amplificación de un fragmento del gen de *gapdh* en todas las muestras (Figura 7).

Para seleccionar el control endógeno analizamos tres de los genes más utilizados: *beta actina*, *18 S* y *gapdh*, para los cuales determinamos la cantidad relativa correspondiente a

cada RNA de tejido de LVM de ratón extraído tras exponerlo a diferentes temperaturas. La cuadro 1 resume los resultados de los C_T obtenidos de la amplificación de los genes probados para ser utilizados como endógenos y los cálculos realizados para la determinación de la cantidad relativa aplicando el método del $2^{-\Delta C_T}$.

La *figura 8* muestra los resultados obtenidos en una gráfica, en la que se observa que la beta actina no mostró diferencias significativas en la cantidad relativa de amplificado en las distintas condiciones experimentales, a diferencia del 18s o el *gapd* que modificaron su cantidad relativa después de estar expuestos a 37 y 41 °C de temperatura, a 39° el 18s disminuye su expresión para luego incrementarla a 41 °C; y el *gapdh* incrementa gradualmente a 39 y 41 °C; por lo que estos genes se descartaron para ser utilizados como el gen endógeno.

En la *figura 9* se muestran los gráficos de los genes analizados, los transcritos analizados mostraron alta eficiencia como se observa en el *cuadro 2*.

En cada uno de los gráficos se observan las ecuaciones de la recta y los valores de la pendiente con que se calcularon las eficiencias, los cuales fueron muy similares para los genes analizados, lo que permitió validar los resultados de expresión relativa.

La *figura 10* muestra las curvas de disociación para los genes analizados con su respectivo control que contiene todos los reactivos que se utilizan en la PCR, sin el cDNA. Como se observa estas curvas mostraron un solo producto (un solo pico); las temperaturas de disociación fueron: 81 °C para *beta actina*, 73.5 °C para *18s*, 81.5 °C para *gapdh*, 82 °C para *alfa_{1A}*, 81.5 °C para *alfa_{1B}* y 81.2 °C para *alfa_{1D}* adrenérgicos. Estos resultados nos confirmaron que las reacciones presentaron productos únicos puros.

Una vez estandarizado y validado el procedimiento de la PCR en tiempo real, se evaluaron los cambios de expresión para los genes que codifican para los receptores *alfa_{1A}*, *alfa_{1B}* y *alfa_{1D}* adrenérgicos durante la hipertermia inducida en el LVM de ratón. El *cuadro 3* resume valores de la expresión relativa y el error estándar calculado con las réplicas realizadas para el RNA de los tejidos extraídos utilizando como control el expuesto a normotermia (37 °C) y los expuestos a hipertermia (29 y 41 °C), así como el valor de “p” para cada uno de los genes analizados.

La *figura 11* muestra el nivel de expresión relativa del RNA del tejido extraído en normotermia (37 °C) y el extraído tras ser expuesto a hipertermia (39 y 41 °C). La expresión relativa de *alfa_{1A}* adrenérgicos incremento 10.92 veces a 39 °C misma que disminuyó hasta valores de 0.02 veces al exponerse a 39 °C, respectivamente, en relación con el control. Los *alfa_{1B}* adrenérgicos incrementaron su expresión 14.45 veces más que el control al incremento de la temperatura a 39° C y posteriormente los valores de expresión relativa bajaron hasta 0.01 (0.25 veces menos que el control). Los *alfa_{1D}* adrenérgicos al exponerse a una temperatura de 39 °C incrementaron su expresión más de 503,90 veces que los valores de expresión del control, dis-

minuyendo a valores de 0.05, 1.30 veces menos respecto al control (37 °C).

Discusión

En la parte experimental en que se realizó PCR en tiempo real, observamos los niveles de expresión de RNA mensajero (RNAm) interpretado como DNA complementario (DNAc, el cual generamos por transcripción inversa del RNAm); esta cuantificación relativa se sustenta en la comparación entre el nivel de expresión del gen a estudiar en este caso los α_1 adrenérgicos contra un gen control (también llamado endógeno, de referencia, interno o normalizador o, gen housekeeping, y sus resultados son comparables entre múltiples experimentos de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (RT-Q-PCR). observamos que la *beta actina*, la cual forma parte de la estructura celular, ya sea en el citoplasma como en el núcleo, no mostró diferencias significativas en la cantidad relativa de amplificado en las distintas condiciones experimentales, lo que nos sugiere que estas condiciones no modifican la actividad que realiza en la célula, pese a encontrarse en órganos que resultan ser blanco en este estudio, no presentado alteración en el tejido utilizado, determinando su eficiencia de amplificación, la cual de acuerdo con nuestros resultados fue alta, lo que es importante para poder hacer las comparaciones entre el gen endógeno con los que estamos investigando.

Una vez que confirmamos que nuestras reacciones presentaron productos puros y únicos mediante curvas de disociación, lo que nos permite identificar nuestros fragmentos amplificados de DNA concretos a partir de sus temperaturas de fusión, siendo éste necesario, ya que es específica para el fragmento amplificado que estamos buscando, verificando que nuestros controles no mostraran amplificación.

Ahora es posible cuantificar la expresión génica en términos relativos en los que comparamos la expresión de nuestros genes en estudio con los endógenos, es por esto que era importante seleccionar como gen estándar aquel que cuya expresión no tuviera variaciones cuando sometimos al tejido a 39 y 41 °C cuyo efecto en la transcripción se desea estudiar.

En estos resultados vemos que a 39 °C la expresión relativa de *alfa_{1A}* adrenérgicos incrementó 10.92 veces para posteriormente disminuir valores de 0.02 veces al exponerse a 39 °C, respectivamente, en relación con el control.

Los *alfa_{1B}* adrenérgicos incrementaron su expresión 14.45 veces más que el control a 39 °C y bajaron hasta 0.01 (0.25 veces menos que el control) a 41 °C. Los *alfa_{1D}* adrenérgicos al exponerse a una temperatura de 39 °C incrementaron su expresión más de 503.90 veces que los valores de expresión del control, disminuyendo a 0.05, 1.30 veces menos respecto al control (37 °C) al exponerse a 41 °C, con lo que vemos que aparentemente, la respuesta de fase aguda en la patología provocada por calor la compensan los receptores *alfa_{1D}* adrenérgicos, ya que de acuerdo con la bibliografía revisada el LVM es rico en *alfa_{1A}* adrenérgicos, la

expresión de los α_{1D} adrenérgicos es la que se modifica en respuesta a la exposición a 39 °C, para finalmente verse disminuida a 41 °C, en lo que describe comienza la actuación de otros mecanismos compensadores.

Como podemos observar en nuestros resultados el hecho de exponer un tejido in vitro a altas temperaturas nos genera modificaciones en el patrón de comportamiento, lo que produce cambios en este caso en la expresión de los receptores α_1 adrenérgicos, que se encargan de modular la contracción vascular, el seleccionar este tejido fue debido a que se encuentra rico en receptores α_{1A} que son los directos responsables de modular la resistencia vascular y hemos podido constatar que se modifica su comportamiento ante la exposición a altas temperaturas, sin embargo, en la etapa de fase aguda es mayor la respuesta de los receptores α_{1D} adrenérgicos, en lo cual observamos la diferencia en los resultados obtenidos, los cuales normalmente se expresan en menor cantidad en el lecho vascular mesentérico. Hasta el momento no existen trabajos similares en los que se hayan medido los cambios de expresión de los receptores durante la exposición a altas temperaturas, se han realizado estudios sobre este comportamiento realizando mediciones de otras sustancias participantes en el mantenimiento del flujo vascular, así como de mantener el tono y la permeabilidad, modulando la presión sanguínea en estas condiciones, en nuestro trabajo podemos observar que hay una elevación en la expresión relativa de estos receptores, lo que nos podría reflejar de una respuesta compensatoria de éstos, la cual finalmente disminuye a la temperatura en la que el organismo estaría en lo que conocemos como golpe de calor, que se compone de tres fases la primera en donde se incluye un mecanismo de termorregulación, una respuesta de fase aguda y finalmente la producción de proteínas de shock térmico y otros componentes compensatorios, las cuales podríamos relacionar con los resultados obtenidos.

El comportamiento fisiológico de los receptores α_1 adrenérgicos difiere de lo encontrado en los niveles de expresión génica, al realizar la PCR en tiempo real, ya que se observa una clara elevación al encontrarse el tejido expuesto a 39 °C en donde observamos una clara elevación, misma que pareciera apegarse a los datos descritos anteriormente como de respuesta aguda, en donde hay una compensación vascular por mantener la resistencia vascular, hasta perderse finalmente a 41 °C en donde la respuesta de éstos disminuye, lo que se apegaría a la respuesta dada por otras sustancias entre ellas las proteínas de choque térmico.

Conclusiones

La respuesta contráctil del lecho vascular mesentérico disminuye progresivamente a medida que aumenta la temperatura a la que se expone al tejido.

La eficacia máxima de la Fenilefrina y del A61603 se ve disminuida al exponer al tejido a 39 y 41 °C.

La expresión de los receptores α_1 adrenérgicos en general se ve aumentada al exponer el tejido a 39 °C, siendo

predominante el aumento de los α_{1D} adrenérgicos, disminuyendo finalmente al aumentar la temperatura a 41 °C.

Referencias

1. Petersdorf RG. Hypothermia and hyperthermia. In: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci JB, Kasper DL (eds.). *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 13th Ed. New York: McGraw-Hill; 1994, p. 2473-9.
2. Batscha CL. Heat stroke. Keeping your clients cool in the summer. *J Psychosoc Nurs Ment Health Serv* 1997; 35: 12-7.
3. Dixit SN, Bushara KO, Brooks BR. Epidemic heat stroke in a midwest community: risk factors neurological complications and sequelae. *Wis Med J* 1997; 96: 39-41.
4. Chain-Castro T de J, Haro-García L. Golpe de calor. Informe de siete casos ocurridos en trabajadores agrícolas. *Rev Med IMSS* 1997; 35: 347-51.
5. Gelfand JA, Dinarello ChA. Fever and hyperthermia. In: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL (eds.). *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 14th Ed. New York: McGraw-Hill; 1998, p. 84-90.
6. Lizarralde Palacios E, Gutiérrez Macías A, Martínez Ortiz de Zárate M. Alteraciones de la termorregulación. *Emergencias* 2000; 12: 192-207.
7. Haines A, Epstein PR, McMichael AJ. Global health watch: monitoring impacts of environmental change. *Lancet* 1993; 342: 1464-9.
8. Abderrezack B, Nochel JPK: Heat stroke. *N Engl J Med* 2002; 346 (25): 1979-88.
9. Wang CX, Stroink JM, Casto, Kattner K: Hyperthermia exacerbates ischaemic brain injury. *J Stroke* 2009; 4: 274-84.
10. Woodrow G, Brownjohn AM, Turney JH. The clinical and biochemical features of acute renal failure due to rhabdomyolysis. *Ren Fail* 1995; 17: 467-74.
11. Shieh SD, Lin YF, Lin SH, Lu KC. A prospective study of calcium metabolism in exertional heat stroke with rhabdomyolysis and acute renal failure. *Nephron* 1995; 71: 428-32.
12. Bouchama A, Bridey F, Hammami MM, Lacombe C, al-Shail E, al-Ohali Y, et al. Activation of coagulation and fibrinolysis in heat stroke. *Thromb Haemost* 1996; 76: 909-15.
13. Romanovsky AA, Blatteis CM. Heat stroke: opioid-mediated mechanism. *J Appl Physiol* 1996; 81: 2565-70.
14. Kao TY, Lin MT. Brain serotonin depletion attenuates heatstroke-induced cerebral ischemia and cell death in rats. *J Appl Physiol* 1996; 80: 680-4.
15. Lin MT, Kao TY, Jin YT, Chen CF. Interleukin-1 receptor antagonist attenuates the heat stroke-induced neuronal damage by reducing the cerebral ischemia in rats. *Brain Res Bull* 1995; 37: 595-8.
16. Bourdon L, Canini F. On the nature of the link between malignant hyperthermia and exertional heatstroke. *Med Hypotheses* 1995; 45: 268-70.
17. Jarajapu YP, Johnston F, Berry C, Renwick A, McGrath JC, McDonald A, Hillier C: Functional Characterization of α_1 -Adrenoceptor Subtypes in Human Subcutaneous Resistance Arteries. *The Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics* 2001; 299(2): 729-34.
18. Martí D, Miquel R, Ziani K, Gisbert R, Ivorra MD, Anselmi E, Moreno L, Villagrasa V, et al. Correlation between mRNA levels and functional role of α_1 adrenoceptor subtypes in arteries: evidence of α_{1L} as a functional isoform of the α_{1A} -adrenoceptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: 1923-31.
19. Chen ZJ, Minneman KP. Recent progress in α_1 adrenergic receptor research. *Acta Pharmacologica Sinica* 2005; 26(11): 1281-7.
20. Riojas RH, Hurtado DM, Idrovo VJ, Vazquez GH. Estudio diagnóstico sobre los efectos del cambio climático en la salud humana de la población en México. Instituto Nacional de Salud Pública 2006; 10-12.
21. Jarajapu YP, Coats P, McGrath JC, Hillier C, McDonald A. Functional Characterization of α_1 -Adrenoceptor Subtypes in Human Skeletal Muscle Resistance Arteries. *BJ Pharmacol* 2001; 133: 679-86.
22. Martinez SSG, Campos PJM, Pares HJ, Gallardo OIA, Ibarra M, Villalobos MR. α_{1A} Adrenoceptors predominate in the control of blood pressure in mouse mesenteric vascular bed. *Autonomic & Autacoid Pharmacology* 2007; 27: 137-42.