



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD DEL DEPARTAMENTO DE
SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

Química Medicinal

**“EFECTO VASOCONSTRICTOR DEL INDORRENATO (TR3369) A TRAVÉS DE LOS
RECEPTORES 5-HT_{2A} EN EL MODELO DE RATA DESCEREBRADA Y
DESMEDULADA”**

ÍDONEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

PRESENTA

Q. F. B. MIRIAM TORRES GUTIÉRREZ

MATRÍCULA: 2162800199

COMITÉ TUTORAL:

Tutor: Dr. Enrique Hong Chong

Asesor: Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda

Asesor: Dr. Santiago Villafaña Rauda

Ciudad de México

Julio 2018

**“EFECTO VASOCONSTRICCIÓN DEL INDORRENATO (TR3369) A TRAVÉS DE LOS
RECEPTORES 5-HT_{2A} EN EL MODELO DE RATA DESCEREBRADA Y
DESMEDULADA”**

Comité tutorial

Tutor: Dr. Enrique Hong Chong

Vo. Bo. _____

Asesor: Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda

Vo. Bo. _____

Asesor: Dr. Santiago Villafaña Rauda

Vo. Bo. _____

Q. F. B. Miriam Torres Gutiérrez

Matrícula: 2162800199

**“EFECTO VASOCONSTRICCIÓN DEL INDORRENATO (TR3369) A TRAVÉS DE LOS
RECEPTORES 5-HT_{2A} EN EL MODELO DE RATA DESCEREBRADA Y
DESMEDULADA”**

Jurado del Examen de Grado

Presidente: Dr. David Centurión Pacheco

Vo. Bo. _____

Vocal: Dra. María del Carmen Castillo Hernández

Vo. Bo. _____

Secretario: Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda

Vo. Bo. _____

1. RESUMEN

El indorrenato (TR3369), una molécula con potencial antihiperglicemiante, es un agonista serotoninérgico que a nivel central produce disminución de la presión arterial y en la periferia incrementa la contractilidad vascular. En un modelo de rata descerebrada y desmedulada, mediante curvas dosis – respuesta se confirmaron las respuestas presoras del indorrenato y se comparó con la quipazina, otro agonista serotoninérgico que produce respuestas contractiles de forma similar a la serotonina. En este estudio se pretendió dilucidar el mecanismo de acción por el cual se desencadena esta respuesta para evitar alguna posible reacción adversa si se llegará a usar como tratamiento antihiperglicemiante. Para ello, se usaron diferentes antagonistas: pelanserina (5-HT₂), ketanserina (5-HT_{2A}) y WAY 100635 (5-HT_{1A}). Se evaluó la respuesta presora de indorrenato en ratas cepa Wistar o SHR, así como en ratas anestesiadas (con pentobarbital e isoflurano) o descerebradas y desmeduladas. Se obtuvieron los valores de glucosa plasmática al inicio y al final de la curva dosis – respuesta. En los resultados se obtuvo que se requiere una dosis mucho mayor (DE50=1.4 mg/kg) para generar la mitad del máximo efecto presor del indorrenato que se obtiene con la quipazina (DE50=0.04 mg/kg) y que esta produce un incremento mayor (111 mmHg a 1.0 mg/kg i.v.) en la variación de la presión arterial media que el indorrenato (77.5 mmHg a 10 mg/kg). La pelanserina (1.0 y 0.31 mg/kg i.v.) y la ketanserina (0.31 mg/kg i.v.) bloquean por completo el incremento de la variación de presión del indorrenato, a la dosis de 0.1 y 0.031 mg/kg i.v. la respuesta a ambos antagonistas disminuye con respecto al indorrenato solo. No hubo diferencia significativa con el uso del WAY 100635. Tampoco se mostraron cambios en los valores de glucosa plasmática en las curvas dosis – respuesta con o sin antagonista. En las ratas SHR se produce un incremento significativamente menor de Δ PAM a dosis mayores de indorrenato (3.1 y 10 mg/kg i.v.) comparado con las ratas Wistar. El isoflurano bloquea la respuesta presora del indorrenato, en contraste con el pentobarbital. En conclusión se puede decir que el indorrenato incrementa la variación de presión arterial en la periferia a través de los receptores 5-HT_{2A}, sin participación de los receptores 5-HT_{1A}. El isoflurano influye en la respuesta presora en este modelo posiblemente por disminución de la contractilidad miocárdica.

2. ABREVIATURAS

AC	Adenilato ciclasa	GTP	Guanosín trifosfato
AM	Adrenomodulina	g	Gramos
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico	GMPc	Monofosfato de guanosina cíclico
an	Anestesiada	GDP	Guanosín difosfato
ANOVA	Anova de dos vías de medias repetidas	h	Horas
MR		Hz	Hertz
AP	Potencial de acción	IMTE	Instituto Miles de Terapéutica Experimental
°C	Grados Celcius	Indo	Indorrenato o TR3369
ca	Columna de agua	IPC-17	Inhibidor potenciado por proteína C
Ca⁺²	Calcio	Iso	Isoflurano
CaM	Calmodulina	i.v.	Vía Intravenosa
Cl⁻	Cloruro	i.p.	Vía intraperitoneal
CLM₂₀	Cadena ligera de miosina de 20-kDa	IP₃	Inositol-1,4,5-trifosfato
cm	Centímetros	K⁺	Potasio
CTGO	Curva de tolerancia a la glucosa oral	KCLM	Cinasa de la cadena ligera de miosina
DAG	Diacilglicerol	Ket	Ketanserina
dd	Descerebrada y desmedulada	kg	Kilogramo
DE50	Dosis efectiva 50	L	Litros
dL	Decilitro	lat	Latidos
FC	Frecuencia cardiaca		

MAO	Monoamino oxidasa	RAPG	Receptores acoplados a proteínas G
mg	Miligramos	RE	Retículo endoplasmico
mL	Mililitros	RPT	Receptores de potencial transitorio
MLV	Músculo liso vascular	RVS	Resistencia vascular sistémica
mM	Milimolar	S.E.M.	Error estándar de la media
mmHg	Milímetros de mercurio	SHR	Rata espontáneamente hipertensa
NA	Noradrenalina	SNC	Sistema nervioso central
Na⁺	Sodio	SS	Solución salina
NO	Óxido nítrico	TVMA	Transportador principal vesicular de monoaminas
PA	Presión arterial	v.o.	Vía oral
PeI	Pelanserina o TR2515	W	Rata cepa Wistar
Pento	Pentobarbital	5-HT	Serotonina
PIP₂	Fosfatidilinositol-4,5-difosfato	5-HIAA	Ácido acético 5-hidroxi indol
PKC	Proteína cinasa C	ΔPA	Variación de la presión arterial media
PKG	Proteína cinasa G	ΔFC	Variación de la frecuencia cardíaca
PLC	Fosfolipasa C	°	Grados
PLC-β	Fosfolipasa C - β		
PMLC	Fosfatasa de la cadena ligera de miosina		
Quip	Quipazina o MA1291		

3. AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES



Agradezco a mi casa abierta al tiempo, la UAM Xochimilco quien me ha brindado los conocimientos a través de un sistema modular efectivo, la valiosa y correcta guía de mis profesores, la comisión de maestría en Ciencias Farmacéuticas y comité tutorial (**Dr. Luis Camilo Rios Castañeda, Dr. Enrique Hong Chong y Santiago Villafaña Rauda**), así como el espacio para poder desempeñar mis actividades.

A mis sinodales externos **Dra. María del Carmen Castillo Hernández y Dr. David Centurión Pacheco** y nuevamente a mi sinodal interno **Dr. Luis Camilo Rios Castañeda** por su aceptación a conformar parte del jurado en mi examen de grado, sugerencias y asistencia al mismo.

CINVESTAV, la institución que me ha dado un gran recibimiento y acoso, de la cual e aprendido que la parte humana y profesional están estrechamente relacionadas. El tener una disciplina y responsabilidad constante con la sociedad, así como la visión de ser una persona comprometida. Fundamentalmente agradezco al **Doctor Enrique Hong** y su equipo de trabajo (**M. en C. Miguel Ángel Rosas Lezama**) por la confianza y permitir el desarrollo de mis habilidades... por sus sugerencias, correcciones, entusiasmo, y que con su amplia experiencia en el campo de la farmacología cardiovascular me proveen la mejor guía para mi desempeño.

Agradezco a **María del Pilar Quinteros Carrillo** por el apoyo en la obtención de artículos sin libre acceso e indispensables para llevar a cabo la redacción de la tesis.

De antemano le agradezco a CONACYT por el financiamiento brindado durante la maestría, que me ha permitido continuar con mis logros y estudios. Con número (CVU/becario): 763139/600410.

4. AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A DIOS:

Quien me dio la oportunidad de estar en esta vida y que su presencia me acompaña en cada paso que doy, mi protector y guía en los obstáculos que he tenido que lidiar y me bendice con su gracia, como su hija y seguidora.

Mi Familia:

A mi mamá ***Maria Margarita Gutiérrez Aguilar*** y mi papá ***David Torres López***, ustedes que son la parte esencial de mi ser, que me han dado mucho AMOR, los valores, mi educación, el apoyo, es sostén, el hogar y todo lo que ha estado dentro sus posibilidades con mucho esfuerzo. A mis hermanos ***Arturo Torres Gutiérrez y Alma Liliana Torres Gutiérrez***, mi cuñado ***Jose Guadalupe Heras Sostenes*** y mis sobrinitos ***Diego David Heras Torres y Karol Heras Torres***, por su presencia y ánimos, su cariño, apoyo, consejos, diversión, compañía, los días de desestrés y las platicas de los buenos momentos vividos y recordarme lo que soy, de donde vengo y también para donde voy. También agradezco a ***Emerson Antonio Lara Segura*** que en esta etapa de mi vida ha aparecido a brindarme su compañía, aliento, amor y apoyo para concluir con esté objetivo. Y ahora también agradezco a la luz que viene dentro de mi, que viene con el sol, que me ilumina y me motiva día con día, ***a ti bebé (Samara)***. Ustedes son la base de mi vida y parte de ella por siempre.

Amigos:

Por su compañía, apoyo constante, escucharme y darme su entendimiento, por todos los momento que me han brindado y que han permanecido cerca de mí cuando más lo he requerido, también por los días de diversión y risas que pasamos. Agradezco haber coincidido con ustedes en esta etapa de superación y aspiraciones.

5. ÍNDICE

1. RESUMEN.....	<i>iv</i>
2. ABREVIATURAS	<i>v</i>
3. AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES.....	<i>vii</i>
4. AGRADECIMIENTOS PERSONALES	<i>viii</i>
6. INTRODUCCIÓN.....	10
7. ANTECEDENTES O MARCO DE REFERENCIA.....	11
8. MARCO TEÓRICO.....	14
8.1. Músculo Liso Vascular	14
8.2. Mecanismo de contracción y relajación del MLV	15
8.3. La 5-HT y su participación en la contracción y relajación periférica	16
8.4. Receptores 5-HT ₁	18
8.5. Vía de señalización de los receptores 5-HT _{1A}	20
8.6. Receptores 5-HT ₂	20
8.7. Vía de señalización de los receptores 5-HT _{2A}	20
9. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
10. HIPÓTESIS.....	22
11. OBJETIVOS	22
11.1. Objetivo general	22
11.2. Objetivos específicos	22
12. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
12.1. Fármacos empleados.....	23
12.2. Animales.....	23
12.3. Diseño experimental.....	24
12.3.1. Modelo de rata anestesiada.....	24
12.3.2. Modelo de rata descerebrada y desmedulada.	24
12.4. Protocolo experimental.....	26
12.5. Diseño estadístico	29
13. RESULTADOS	30
14. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	41
15. CONCLUSIÓN.....	50
16. PERSPECTIVAS	51
17. BIBLIOGRAFÍA.....	52

6. INTRODUCCIÓN

En las líneas siguientes les mencionaré acerca de lo que trata mi proyecto de investigación de maestría. Desde hace años se investiga fármacos que tengan propiedades terapéuticas para el tratamiento a enfermedades que tienen un impacto en la sociedad, de manera económica, política, social, psicológica, entre otros aspectos. El IMTE (Instituto Miles de Terapéutica Experimental) un instituto que sintetizó principios activos y caracterizó sus efectos benéficos y tóxicos, desarrolló algunos que han sido de gran interés para esta investigación. El *indorrenato* es uno de ellos y se sabe por estudios previos y bien conocidos que tiene propiedades antihipertensivas, y actualmente se ha encontrado que también posee efectos antihiperlipemiantes, lo cual incrementa aún más la curiosidad del conocimiento sobre este ingrediente activo farmacéutico. Es común que un principio activo tenga afinidad por varios receptores y desencadene diferentes vías de señalización produciendo diferentes efectos terapéuticos o reacciones adversas a medicamentos, por lo anterior se realizó un estudio experimental para evaluar el efecto que tiene el indorrenato sobre la presión arterial en la periferia del organismo, utilizando como control positivo a la *quipazina*, un agente que es capaz de incrementar significativamente la presión arterial en la periferia. Se evaluó el mecanismo de acción probable que podría intervenir en el incremento de la presión arterial mediante el uso de antagonistas que bloqueen la respuesta. Uno de los antagonistas usados es la *pelanserina* para evaluar si los receptores serotoninérgicos $5HT_2$ están involucrados en el efecto y un antagonista más selectivo (ketanserina, receptores $5HT_{2A}$). La evaluación de la glucosa plasmática durante la curva dosis – respuesta también se realizó. Se ha descrito que agonistas de la serotonina producen un efecto contractil a través de receptores $5HT_1$ y surge la idea de que los receptores $5HT_{1A}$ (el indorrenato tiene elevada afinidad a estos receptores en el sistema nervioso central) también podrían causar el efecto presor del indorrenato, para comprobarlo se utilizó un antagonista selectivo de estos receptores, el WAY 100635.

7. ANTECEDENTES O MARCO DE REFERENCIA

La serotonina o 5-Hidroxitriptamina (5-HT) es una amina biogénica que participa en diversos procesos fisiológicos incluyendo acciones en el aparato cardiovascular. La 5-HT puede disminuir la presión arterial por acción sobre los receptores 5-HT_{1A} centrales o incrementarla al estimular receptores 5-HT₂ en el músculo liso vascular (MLV) (1). Los receptores 5-HT_{2A} median las respuestas presoras evocadas por serotonina i.v., marcadamente reproducibles y dosis dependiente en ratas descerebradas y desmeduladas (2). Otro compuesto con actividad contráctil en varios tipos de músculo liso incluido el MLV es un derivado de la piperazina conocido como quipazina o MA1291 (maleato de (2-(1-piperazinil) quinolina), su acción sobre el útero de ratas fue suprimido por completo por un agente antiserotoninico, la metisergida (3). En preparaciones aisladas de anillos aórticos de conejo se encontró que la metisergida antagonizó los efectos de la quipazina se sugiere que ejerce su efecto a través de la estimulación del mismo tipo de receptores de la serotonina (4). También la quipazina (10 mg/100g, i.p.) disminuye la glucemia durante la curva de tolerancia a la glucosa oral con efecto revertido al administrar pelanserina (2.5 mg/kg, i.p.) (5).

Otro fármaco de importancia terapéutica es el indorrenato (clorhidrato de β metil-carboxilato 5-metoxitriptamina o TR3369) el cual es un agonista serotoninérgico (6) que tiene afinidad por receptores 5HT_{1A,1B,2C/2A}. También se ha reportado que tiene efectos cardiovascular (7), ansiolítico (8) y estimula el comportamiento sexual masculino por reducción del número de intromisiones que preceden a la eyaculación (9) y modifica la estimulación discriminatoria de conducta (10).

La administración del TR3369 en la arteria vertebral derecha y ventrículo cerebral lateral en gatos anestesiados, disminuye la presión arterial en aproximadamente 45 mmHg, y fue inefectiva cuando se administro por vía intravenosa. Estos datos sugieren que el efecto antihipertensivo es ejercido a través de la acción del sistema nervioso central (6) por los receptores 5-HT_{1A} (11).

Estudios recientes muestran que la administración de una sola dosis (aguda) de indorrenato (10 mg/kg, v.o.) a ratas Wistar macho, disminuye la concentración de glucosa sanguínea por debajo de su nivel basal comparado con el grupo

que sólo recibió agua (1 mL/100 g, v.o.). En el mismo estudio se realizó una curva de tolerancia a la glucosa oral (CTGO) en ratas pretratadas con indorrenato (10 mg/kg, v.o.) 30 min antes, en la cual se observó que se previenen los incrementos en glucemia durante la curva a diferencia del grupo control que recibió 1 mL/100g v.o. de solución salina (12).

Silva (2015) demostró que ratas WKY sometidas a un modelo de síndrome metabólico con resistencia a la insulina con fructuosa al 10% en el agua de beber, fueron pretratadas 30 min antes con 5 mg/kg v.o de indorrenato en una CTGO, mejoró la sensibilidad a la insulina con el incremento de la captación de glucosa, este efecto se vio abolido por medio de estimulación de los receptores 5-HT₂ con el uso del pelanserina (2.5 mg/kg v.o.) (13).

Por otro lado, la 5-HT produce una potenciación importante del efecto vasoconstrictor inducido por diversos agentes (noradrenalina, angiotensina, temperatura o potasio), dicha potenciación es mediada por los receptores 5-HT₂, ya que se puede antagonizar por la administración de la ketanserina o la pelanserina (1).

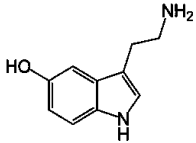
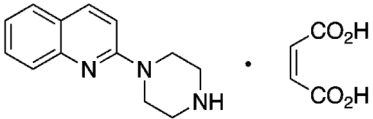
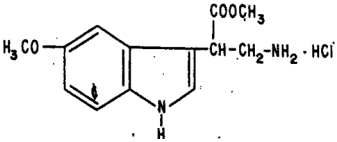
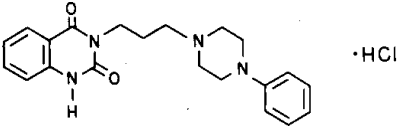
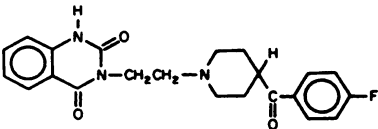
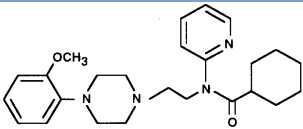
La pelanserina o TR2515 (clorhidrato de 3-[3-(4-fenil-1-piperazinil)propil]-2,4(1H,3H) quinazolidiona) es clasificada como un agente bloqueador α -adrenérgico que posee propiedades hipotensoras por un potente antagonismo serotoninérgico (5-HT₂), y también como un vasodilatador (14) y la ketanserina (3-(2-[4-(4-fluorobenzoil) 1piperidinil]etil)-2,4[1H,3H] quinazolidiona (15) es un fármaco antihipertensivo que tiene afinidad por los receptores 5-HT_{2A} (16) con pKi de 9 (17), ambos son derivados de la quinazolidiona (14,18).

La serotonina y agonistas de la 5-HT inducen contracción del músculo liso de algunos tejidos aislados tales como arteria basilar de perro, primate (19), humano (20) y de conejo (21), arteria mesenterica de conejo (22) y arteria coronaria de perro (23) que es atenuada por estimulación del receptor 5-HT₁ más que por los receptores 5-HT₂. Por lo que la vasoconstricción en la periferia puede atribuirse a la participación de estos receptores, a los cuales el indorrenato como ya se

menciona tiene gran afinidad. El WAY 100635 (trihidroclorhidrato de N-[2-[4-(2-metoxifenil)-1-piperanil]etil]-N-(2-piridinil) ciclohexano carboxamida) es un análogo aquiral de WAY 100135, el cual es significativamente más potente y selectivo para los receptores 5-HT_{1A}, desempeña una actividad antagónica en un rango de modelos funcionales presinápticas (hipocampo) y postinápticos (núcleo dorsal del rafe) *in vitro* e *in vivo* (24).

En la tabla 1 se muestra la serotonina, los agonistas y antagonistas que se utilizaron en este estudio.

Tabla 1: Serotonina, agonistas y antagonistas

Nombre	Nomenclatura	Estructura
Serotonina	5-Hidroxitriptamina	
Quipazina	maleato de (2-(1-piperazinil)quinolina	
Indorrenato	clorhidrato de β metil- carboxilato 5-metoxitriptamina	
Pelanserina	clorhidrato de 3-[3-(4-fenil-1-piperazinil)propil]-2,4(1H,3H)quinazolidiona	
Ketanserina	3-(2-[4-(4-fluorobenzoil)1piperazinil]etil)-2,4[1H,3H]quinazolidiona	
WAY 100635	trihidroclorhidrato de N-[2-[4-(2-metoxifenil)-1-piperanil]etil]-N-(2-piridinil) ciclohexano carboxamida	

8. MARCO TEÓRICO

8.1. Músculo Liso Vascular

La distribución de la sangre a las regiones cruciales del cuerpo depende de grandes arterias y arteriolas. La regulación del flujo periférico es esencial bajo un control dual: centralmente, por el sistema nervioso y localmente en los tejidos por las condiciones en la vecindad inmediata de los vasos sanguíneos (25).

Las pequeñas arterias y arteriolas que regulan el flujo sanguíneo en todo el cuerpo son llamadas vasos de resistencia. Estos vasos ofrecen la mayor resistencia al flujo de bombeo de sangre a los tejidos por el corazón. Por lo que son de importancia para la regulación de la presión arterial sanguínea (25).

Los vasos sanguíneos de gran tamaño comparten en común una estructura con tres capas. En la capa interior, llamada túnica íntima, comprende una monocapa de células endoteliales soportado por tejido conectivo. Desempeñan un papel crucial en el control de la permeabilidad vascular, vasoconstricción, angiogénesis (crecimiento de un nuevo vaso sanguíneo) y regulación de la coagulación. La capa gruesa media (la túnica media) es separada de la íntima por fenestraciones, la lamina elástica interna principalmente compuesta de elastina. La túnica contiene células de músculo liso incrustadas en la matriz extracelular compuesta principalmente por colágeno, elastina y proteoglicanos. Una lamina elástica externa separa la túnica media de la túnica adventicia, esta contiene colágeno tejido que soporta fibroblastos y nervios. En grandes arterias y venas, contiene vasa vasorum, son pequeños vasos sanguíneos los cuales penetran en la porción media y suministra la pared vascular con oxígeno y nutrientes (26).

El MLV es el principal componente de la pared de los vasos de resistencia (25,27) y otros órganos tales como tracto digestivo, vejiga urinaria y útero (27). La luz de los vasos puede variar de una completa obliteración por la fuerte contracción del músculo liso con plegamiento del revestimiento endotelial, a la máxima dilatación por completa relajación del músculo liso. En algún momento dado algunos vasos de resistencia son cerrados por contracción parcial (tono). La vasodilatación disminuye la resistencia vascular y la PA cae. Mientras que la contracción,

aumenta la resistencia vascular y la presión crece (25).

Las células del MLV contienen un gran número de filamentos delgados de actina y un pequeño número de filamentos gruesos de miosina (25,26), estos filamentos tienen un arreglo en forma de espiral y son responsables de actividades involuntarias del cuerpo como la contracción de las arterias (27). Comparado con el músculo esquelético, las contracciones del músculo liso son muy lentas, desarrolla elevadas fuerzas y mantiene la fuerza por periodos largos (25).

8.2. Mecanismo de contracción y relajación del MLV

La interacción entre miosina y actina, la cual permite la contracción esta controlada por la concentración de Ca^{+2} mioplásmico como ocurre en el músculo esquelético y cardiaco, pero el mecanismo molecular por el que ocurre la contracción es diferente (la regulación en la unión del Ca^{+2} no utiliza troponina). Para el músculo liso los puentes cruzados son activados para ciclar, la cadena ligera de miosina de 20-kDa (CLM_{20}) debe ser fosforilada. La CLM_{20} es fosforilada por la cinasa de la cadena ligera de miosina (KCLM) y desfosforilada por la fosfatasa de cadena ligera de miosina (PCLM) que son regulados por cinasas (25,26).

KCLM se activa por el complejo entre 4 Ca^{+2} y la proteína calmodulina (CaM), la concentración de este complejo depende de la cantidad de Ca^{+2} . Los niveles de CLM_{20} esta determinado por PCLM, por lo que su inhibición produce incremento en la contracción, siempre y cuando la concentración de Ca^{+2} citoplasmático no cambie y también hay un incremento a la sensibilidad del Ca^{+2} . PCLM es inhibido por *rho*-cinasa (un regulador del citoesqueleto en muchos tipos de células), y por IPC-17 (inhibidor potenciado por proteína cinasa C (PKC) de 17-kDa). La actividad de PCLM puede ser incrementada por óxido nítrico (NO) a través del monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) y proteína cinasa G (PKG), y por monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), activado a través de la proteína cinasa A (PKA) (26,28). Se lleva a cabo la despolarización de la membrana por: la activación de canales de cloro activados por el Ca^{+2} liberado del retículo endoplasmático que facilita el eflujo de Cl^- , inhibición de la actividad de los canales de K^+ , apertura de los canales receptores de potencial transitorio (RPT) que permiten el flujo de cationes

como el Ca^{+2} y posterior apertura de canales de Ca^{+2} dependientes de voltaje (canales de calcio tipo L) (26,29).

La liberación del óxido nítrico por células endoteliales, y subsecuente estimulación del PCLM en músculo liso, constituye uno de los principales mecanismos por los cuales el endotelio puede causar relajación y dilatación arterial o venosa. La activación del GMPc y AMPc activan las cinasas; PKG y PKA. Altos niveles de AMPc muestran estimulación de PKG (25).

8.3. La 5-HT y su participación en la contracción y relajación periférica

La serotonina o 5-Hidroxitriptamina es una amina biogénica que participa en diversos procesos fisiológicos (1): modula el apetito, las emociones, el sueño y numerosas funciones del comportamiento y fisiológicas (30). La serotonina fue descubierta, en parte, como un vasoconstrictor y esta es una propiedad por la cual la serotonina es mejor conocida en el sistema cardiovascular (1,31)

Por lo que, es importante hacer mención que desde los años 1930, Erspamer comenzó a estudiar la distribución de las células enterocromafines, las cuales fueron teñidas con un reactivo para indoles. Las elevadas concentraciones fueron encontradas en la mucosa gastrointestinal, seguida por las plaquetas y el sistema nervioso central. Por lo tanto, el desconocido indol fue llamado entramina. Page y colaboradores aislaron y caracterizaron una sustancia vasoconstrictora liberada de la sangre coagulada. La sustancia fue llamada serotonina (1948). Rapport dedujo que la molécula activa era 5-Hidroxitriptamina. En 1952 Erspamer y Asero identificaron la entramina como 5-HT (30).

La contracción de las arterias y venas es fundamentalmente modulada por hormonas, autacoides y neurotransmisores que actúan sobre receptores localizados en la membrana plasmática principalmente receptores acoplados a proteínas G (RAPG) (25).

En humanos y en animales la serotonina causa contracción directa, demostrado en una variedad de vasos sanguíneos aislados (basilar, mesentérica superior, aórtica, femoral, entre otros). La contracción no puede ser atribuida a un tipo de

receptor o tamaño de vaso. La vasoconstricción es predominantemente mediada por el receptor 5-HT_{2A}, pero 5-HT_{2B/1D} puede también mediar contracción. En contraste, no todos los vasos sanguíneos pueden relajarse con la serotonina. En la vena yugular, las arterias pulmonares y coronarias de la rata, la serotonina puede causar relajación a través de la activación de los receptores 5-HT_{2B} y 5-HT₇. Así, ambos receptores contráctiles y relajantes están en juego en los vasos sanguíneos, y el balance de sus efectos es diferente en los distintos tipos de vasos y especies (31).

Los efectos de la serotonina en la vasculatura son menos claros cuando se estudia un sistema más complicado que un vaso aislado, probablemente debido a que la 5-HT tiene la habilidad de estimular múltiples receptores dentro de varios tipos de tejidos que pueden actuar en forma aparentemente contradictoria como corresponde al tono del músculo liso (31).

Los RAPG son importantes en la función cardiovascular, se estima que aproximadamente el 40 % de los fármacos actúan sobre ellos en el sistema cardiovascular y en otras partes del cuerpo (25). Importantes proteínas G acopladas a RAPG sobre el músculo liso vascular incluye G_{αq11}, G_{α12/13}, G_{αs}, G_{αi/o}. Estas unidades α y las subunidades βγ, activan moléculas efectoras específicas, tales como cinasas y en muchos casos se generan segundos mensajeros para estimulación de mecanismos celulares (25).

En una neurona serotoninérgica, la hidroxilasa triptófano es la enzima que limita la velocidad en la biosíntesis de la serotonina (5-HT) a partir de triptófano (32) a 5-hidroxitriptófano, que mediante la dopa descarboxilasa se convierte a serotonina (30). Este neurotransmisor es sintetizado principalmente en el citoplasma de las células cromafines y entéricas (30), y almacenada en las vesículas sinápticas por un transportador de protón antiporte, el cual cambia protones que se encuentran dentro de la vesícula por la serotonina a través del transportador vesicular principal de monoaminas (TVMA). Después de una estimulación apropiada, la serotonina es liberada vía exocitosis dentro del espacio sináptico donde puede actuar sobre

receptores sinápticos o presinápticos. La serotonina es inactivada por recaptura vía simporte dependiente de Na^+/Cl^- en las terminales presinápticas, donde este puede ser reempaquetado o degradado por monoamino oxidasas (MAO) a 5 hidroxil indol acetaldehído, el cual a través de deshidrogenasa aldehído se convierte a ácido acético 5-hidroxil indol (5-HIAA) (32). La serotonina también es convertida a N-acetil 5-HT a través de la enzima 5-HT N-acetilasa, que con ayuda de la hidroxil indol c-metil transferasa se convierte a melatonina (30).

Numerosas clases y subclases de receptores acoplados a proteínas G han sido involucrados para transducir señales extracelulares de la serotonina en el medio intracelular. Ellos poseen siete hélices a través de la membrana. Tres bucles intracelulares y tres extracelulares, con un grupo amino terminal extracelular y un grupo carboxilo intracelular (33).

Las seis clases de RAPG incluyen 5-HT₁(5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} y r5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} y 5-HT_{1F}), 5-HT₂ (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C}), 5-HT₄, 5-HT₅ (5-HT_{5A} y 5-HT_{5B}), 5-HT₆ y 5-HT₇, los cuales están divididos en 14 subfamilias. Los receptores 5-HT₃ son canales iónicos de serotonina (33–35). En la tabla 2 se muestran los receptores y efectos la regulación del sistema cardiovascular (31).

8.4. Receptores 5-HT₁

La familia del receptor 5-HT₁ tiene 5 subfamilias, los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} y 5-HT_{1F}. Se acoplan a proteínas G_{i/o} para la inhibición de adenilato ciclasa y muchas otras vías y efectores (33).

El 5-HT_{1A} es el mejor caracterizado, tiene una elevada afinidad para (±)-8-hidroxil-2-(di-N-propilamino)tetralin (8-OH-DPAT), ha estado implicado en diversos procesos tales como regulación neuroendocrina, dolores de cabeza vasoactivos, termorregulación, comportamiento sexual, ingesta de alimentos y apetito, memoria, depresión, agresión, ansiedad, y función inmune (33).

Tabla 2: Receptores a 5-HT, localización y función (Modificado de Watts et al, 2012).

Subtipo	Señal	Ubicación	Función
5-HT_{1A}	Disminuye AC	<ul style="list-style-type: none"> Núcleos de rafe Corteza Hipocampo 	<ul style="list-style-type: none"> Aumenta o disminuye la presión arterial
5-HT_{1B}	Disminuye AC	<ul style="list-style-type: none"> Músculo liso Terminal presináptica simpática Ganglios simpáticos SNC 	<ul style="list-style-type: none"> Contracción Inhibición de liberación de NA Trasmisión inhibitoria Baja y disminuye la presión arterial
r5-HT_{1B}	Disminuye AC	<ul style="list-style-type: none"> No identificado 	<ul style="list-style-type: none"> Contracción Auto/heteroreceptor
5-HT_{1D}	Disminuye AC	<ul style="list-style-type: none"> Musculo liso 	<ul style="list-style-type: none"> Contracción
5-HT_{1E}	Disminuye AC	<ul style="list-style-type: none"> Corteza Cuerpo estriado 	<ul style="list-style-type: none"> No identificado
5-HT_{1F}	Disminuye AC	<ul style="list-style-type: none"> Musculo liso Encéfalo 	<ul style="list-style-type: none"> Contracción Inhibición trigeminal
5-HT_{2A}	Incrementa PLC PLA ₂	<ul style="list-style-type: none"> Plaquetas Músculo liso Corteza cerebral Glándula adrenal Corazón 	<ul style="list-style-type: none"> Agregación y liberación de 5-HT Contracción Excitación neuronal Liberación de adrenalina Taquicardia y contracción
5-HT_{2B}	Incrementa PLC	<ul style="list-style-type: none"> Endotelio Músculo liso Válvulas cardiaca 	<ul style="list-style-type: none"> Relajación Contracción Proliferación
5-HT_{2C}	Incrementa PLC PLA ₂	<ul style="list-style-type: none"> Plexo carideo Hipotálamo 	<ul style="list-style-type: none"> No identificado
5-HT₃	Canal ionico Operado por ligando	<ul style="list-style-type: none"> Nervios parasimpáticos (vago) Ganglios 	<ul style="list-style-type: none"> Bradycardia
5-HT₄	Incrementa AC	<ul style="list-style-type: none"> Cardiomiocito 	<ul style="list-style-type: none"> Contracción
5-HT_{5A}	Disminuye AC	<ul style="list-style-type: none"> Hipocampo 	<ul style="list-style-type: none"> No identificado
5-HT_{5B}	No identificado	<ul style="list-style-type: none"> No identificado 	<ul style="list-style-type: none"> Seudogén
5-HT₆	Incrementa AC	<ul style="list-style-type: none"> Hipocampo Cuerpo estriado Núcleo accumbens 	<ul style="list-style-type: none"> No identificado
5-HT₇	Incrementa AC	<ul style="list-style-type: none"> Musculo liso Cardiomiocito 	<ul style="list-style-type: none"> Relajación Contracción

8.5. Vía de señalización de los receptores 5-HT_{1A}

Los receptores 5-HT_{1A} están acoplados al más amplio panel de segundos mensajeros de cualquiera de los receptores de serotonina. Regula diversos mensajeros y enzimas objetivo, canales y cinasas. Las señales son iniciadas por implicación de las proteínas G_{i/o}, el proceso principal es la inhibición de adenilato ciclasa (AC) (33,36), disminución de AMPc intracelular y promueve un incremento del tono en el MLV (37). El mecanismo exacto por el cual contribuye la proteína G_i a la respuesta contráctil no es completamente clara. En algunos sistemas de músculo liso la activación puede permitir la liberación de considerables cantidades de las subunidades βγ de la proteína G, las cuales son capaces de activar isoformas de la fosfolipasa C y resulta en un incremento de Ca⁺² intracelular similar a los eventos seguidos por la activación de G_q/G₁₁ (28). En el músculo liso G_{i/o} antagoniza el efecto de la proteína G_s, esta activa adenilato ciclasa, incrementa los niveles de AMPc y vía activación de PKA y PKG activa PCLM, la cinasa de las cadenas ligeras de miosina, necesaria para la relajación. Este proceso es el causante de la relajación del músculo liso que producen muchos fármacos que incrementan la síntesis de AMPc en el músculo liso (38).

8.6. Receptores 5-HT₂

Los receptores 5-HT₂ están acoplados principalmente a proteínas G_q, y activa la fosfolipasa C (PLC) como segundo mensajero en tejido nativo y células heterólogas. Sin embargo, pueden acoplarse a otros segundos mensajeros en algunas células específicas (33).

Los receptores 5-HT_{2A} están ampliamente distribuidos en el cerebro (la corteza prefrontal, parietal y somatosensorial, núcleo caudado, hipocampo, núcleo accumbens y tubérculo olfatorio), riñón, músculo esquelético, músculo liso y plaquetas (33).

8.7. Vía de señalización de los receptores 5-HT_{2A}

La principal vía de señalización es la activación de la PLC-β citosólica en casi todos los tejidos y las células en las cuales este se expresa. La activación de esta resulta en la hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-difosfato (PIP₂) para generar dos

señales intracelulares, inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) y el lípido diacilglicerol (DAG) (33,36). El DAG es muy lipófilo y permanece dentro de la membrana (38), este activa de forma directa a la proteína cinasa C (PKC), que cataliza la fosforilación de diversas proteínas intracelulares, por ejemplo: activa IPC-17 que inhibe PCLM (25). El IP_3 es un mediador hidrosoluble que se libera al citosol y difunde hacia el retículo endoplasmico (RE) donde activa a los canales de calcio controlado por ligando en la membrana del RE causando la liberación de calcio (Ca^{+2}) almacenado (33,38).

La liberación de dicho ion de estas reservas intracelulares incrementa las concentraciones de Ca^{+2} en el citoplasma varias veces en el lapso de unos cuantos segundos y activa enzimas sensibles a calmodulina como fosfodiesterasas de AMPc y una familia de proteínas cinasas sensibles a Ca^{+2} /calmodulina (p. ej., fosforilasa cinasa, KCLM y cinasa CaM II y IV). La cinasa de Ca^{+2} /calmodulina produce fosforilación de la subunidad reguladora de la miosina, una proteína contráctil. El AMPc es el mayor o principal vía de señalización de la movilización del Ca^{+2} en la mayoría de las células (33).

9. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha informado que la serotonina puede afectar a la glucemia, por lo tanto se han probado dos agonistas serotoninérgicos, el indorrenato y la quipazina. Ambas sustancias inhiben la hiperglicemia inducida por una carga de glucosa pero también pueden aumentar la presión arterial en algunas condiciones, por lo que se debe dilucidar el mecanismo de acción del efecto hipertensor con el uso de antagonistas que bloqueen el efecto vasopresor que tiene el indorrenato a nivel periférico.

10. HIPÓTESIS

Si se bloquea la respuesta presora del indorrenato a nivel periférico con antagonistas de receptores 5-HT₂ entonces se podrán prevenir los efectos hipertensores, cuando se empiece a utilizar como fármaco antihiper-glucemiante.

11. OBJETIVOS

11.1. Objetivo general

Evaluar las posibles reacciones adversas del indorrenato sobre la presión arterial en un modelo de rata descerebrada y desmedulada, para que pueda ser utilizado como un agente antihiper-glucemiante.

11.2. Objetivos específicos

1. Realizar curvas dosis – respuesta del vehículo i.v. en rata Wistar descerebrada y desmedulada.
2. Realizar curvas dosis – respuesta con la quipazina a las dosis de 0.001 a 1 mg/kg i.v. en rata descerebrada y desmedulada, para evaluar el efecto vasopresor.
3. Realizar curvas dosis – respuesta con el indorrenato en rata Wistar y SHR descerebrada y desmedulada (0.31 a 10 mg/kg i.v.) o anestesiada (0.001 a

- 10 mg/kg, i.v.) para evaluar el efecto vasopresor.
4. Evaluar el efecto de la pelanserina (0.01, 0.031, 0.1, 0.31 y 1.0 mg/kg i.v.) sobre la curva dosis – respuesta de Indorrenato en rata Wistar descerebrada y desmedulada.
 5. Evaluar el efecto de la ketanserina (0.031, 0.1 y 0.31 mg/kg i.v.) sobre la curva dosis – respuesta de indorrenato en rata Wistar descerebrada y desmedulada.
 6. Evaluar el efecto de WAY 100635 (1.0 y 3.1 mg/kg i.v) sobre la curva dosis – respuesta de indorrenato en rata Wistar descerebrada y desmedulada.
 7. Medir la concentración de glucosa arterial inicial y final durante las curvas dosis – respuesta en rata Wistar descerebrada y desmedulada.

12. MATERIALES Y MÉTODOS

12.1. Fármacos empleados

Los fármacos empleados fueron:

- quipazina (MA1291, IMTE)
- indorrenato (TR3369, IMTE)
- pelanserina (TR2515, IMTE)
- tartrato de ketanserina (SIGMA)
- WAY 100635 (SIGMA)
- isoflurano (VET ONE)
- pentobarbital sódico (PiSA)

12.2. Animales

Se emplearon ratas macho Wistar normotensas de un peso entre 250 a 300 g y ratas macho espontáneamente hipertensas (SHR) de 11 semanas. Los animales se ubicaron en el bioterio del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. en condiciones controladas de temperatura de 22 ± 2 °C con 50° de humedad relativa y con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas respectivamente, se les proporcionó comida y agua *ad libitum*. Este estudio se llevó a cabo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para el Uso y el Bienestar de los Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio en E.U. Se minimizó el número de animales

empleados y el sufrimiento de los mismos.

12.3. Diseño experimental

12.3.1. Modelo de rata anestesiada.

Los animales se anestesiaron con pentobarbital a una dosis de 65 mg/kg o isoflurano con un consumo de 1.5 cm.ca (columna de agua) y 2 L/min O₂ a 22°C por administración constante durante el periodo experimental, después se realizó una traqueostomía, que consiste en hacer una incisión en cuello y tráquea, para la inserción posterior de una cánula en tráquea.

Los animales anestesiados con pentobarbital se ventilaron artificialmente con aire ambiental usando una bomba de Searle Bioscience; a 56 respiraciones/min y con volumen de respiración de 20 ml/kg para mantener la respiración constante.

Se colocaron catéteres en: (i) la vena femoral derecha (ii) la arteria carótida izquierda y (iii) arteria femoral derecha. La arteria carótida se conectó al transductor de presión GOULD P231D, U. S. A. junto a un polígrafo Grass Instrument CO., model 7, Quincy MASS, U. S. A. para registrar la presión arterial sanguínea (PA) directamente y la frecuencia cardiaca (FC) por medio de un tacógrafo capaz de medir el intervalo entre dos ondas de presión sistólica.

Después de alcanzar una condición hemodinámica estable por al menos 30 minutos, se determinaron los valores basales de presión arterial media (PAM) y la frecuencia cardiaca y se comenzó con la curva dosis – respuesta.

12.3.2. Modelo de rata descerebrada y desmedulada.

Los animales se anestesiaron con isoflurano con un consumo de 2.5 cm.ca (columna de agua) y 2 L/min O₂ a 22°C, a los cuales se realizó una traqueostomía, que consiste en hacer una incisión en cuello y tráquea, para la inserción posterior de una cánula de polietileno en la tráquea. Las ratas fueron descerebradas y desmeduladas por introducción de un estilete de acero inoxidable a través de la órbita ocular y el foramen magnum en el canal vertebral (fig. 1) (Shipley R y Tilden J, 1947).

Inmediatamente, los animales se ventilaron artificialmente con aire ambiental usando una bomba de Searle Bioscience; a 56 respiraciones/min y con volumen de respiración de 20 mL/kg para mantener la respiración constante.

Después de realizar una vagosimpatectomía bilateral a nivel cervical, se colocaron catéteres de polietileno en: (i) la vena femoral derecha, (ii) la vena femoral izquierda (iii) la arteria carótida izquierda y (iiii) la arteria femoral derecha (fig. 2). La arteria carótida se conectó al transductor de presión GOULD P231D, U. S. A. junto a un polígrafo Grass Instrument CO., model 7, Quincy MASS, U. S. A. para registrar la PA directamente y la FC por medio de un tacógrafo capaz de medir el intervalo entre dos ondas de presión sistólica.

Después de alcanzar una condición hemodinámica estable por al menos 30 min, se determinaron los valores basales de PAM y la FC y se comenzó con la curva dosis – respuesta.

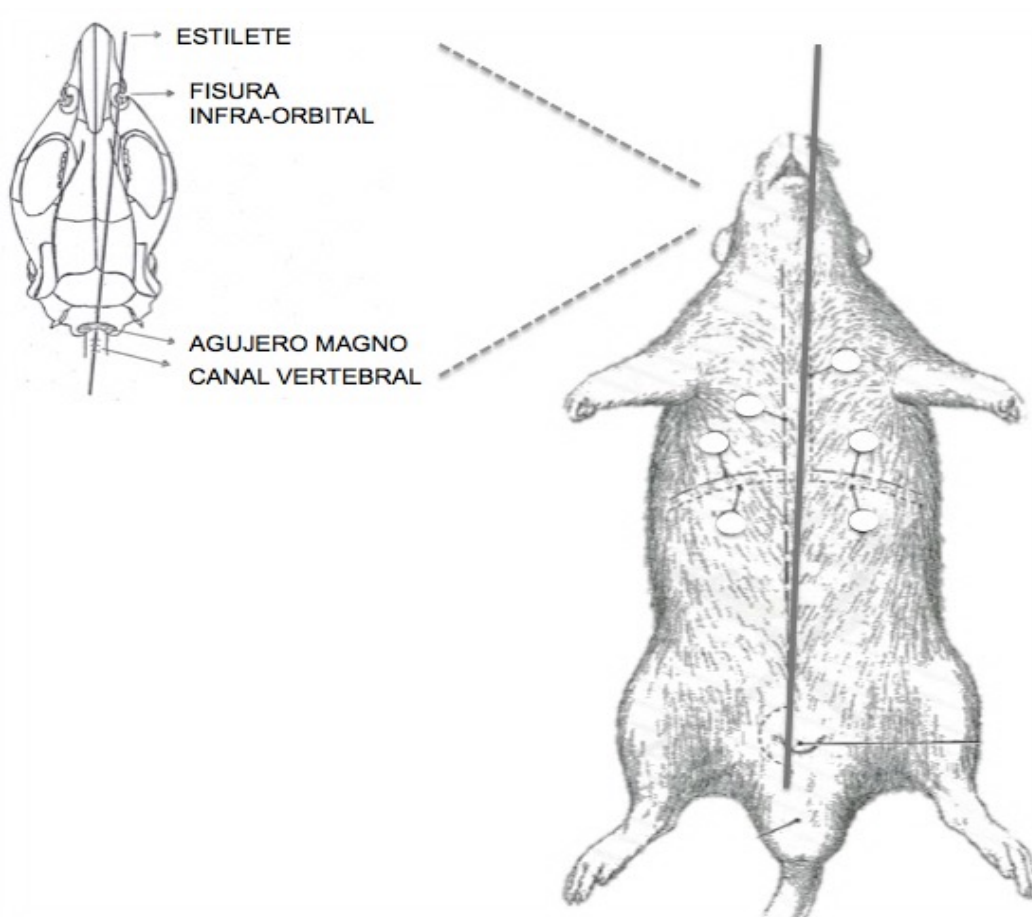


Figura 1. Modelo de rata descerebrada y desmedulada

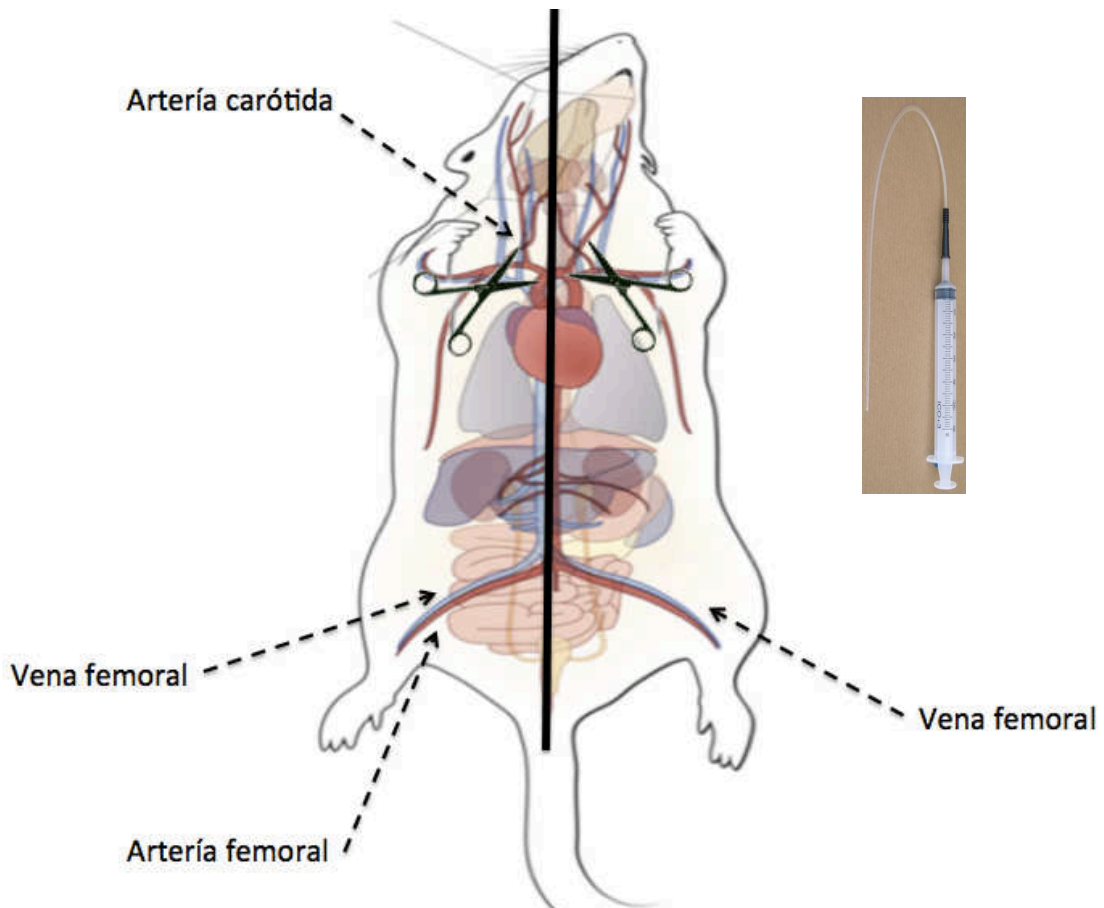


Figura 2. Vagosimpatectomía bilateral y canulación

12.4. Protocolo experimental

Los grupos se dividieron de la siguiente manera:

- quipazina (Quip): curva dosis – respuesta con quipazina en la rata descerebrada y desmedulada en rata Wistar
- solución salina o SS (Vehículo): curva dosis – respuesta con solución salina en la rata descerebrada y desmedulada en rata Wistar
- indorrenato en rata descerebrada y desmedulada (Indo dd): curva dosis – respuesta con indorrenato en la rata Wistar descerebrada y desmedulada
- indorrenato en rata anestesiada (Indo an): curva dosis – respuesta con indorrenato en la rata Wistar anestesiada
- rata descerebrada y desmedulada (dd): curva dosis – respuesta en la rata Wistar descerebrada y desmedulada

- pelanserina (Pel): curva dosis – respuesta de indorrenato con previa administración de pelanserina en la rata Wistar descerebrada y desmedulada
- ketanserina (Ket): curva dosis – respuesta de indorrenato con previa administración de ketanserina en la rata Wistar descerebrada y desmedulada
- WAY 100635 (WAY100635): curva dosis – respuesta de indorrenato con previa administración de WAY 100635 en la rata Wistar descerebrada y desmedulada
- pentobarbital (Indo Pento): curva dosis – respuesta de indorrenato en la rata Wistar anestesiada con pentobarbital
- isoflurano (Indo Iso): curva dosis – respuesta de indorrenato en la rata Wistar anestesiada con isoflurano
- cepa wistar (Indo W): curva dosis – respuesta en rata Wistar
- cepa rata espontáneamente hipertensa (Indo SHR): se realizó una curva dosis – respuesta en rata SHR

El número de animales por grupo fue variable.

A animales con 12 h de ayuno se les realizó la medición de glucosa basal en la parte distal de la cola y registro de peso basal, se anestesió para después comenzar el modelo de la rata descerebrada y desmedulada o rata anestesiada, una vez que ya se encuentren estables la presión y la frecuencia cardiaca se inició con la dosis baja, seguida de la administración de dosis mayores en forma creciente, con intervalos variables dependiendo de la dosis que fue administrada. Cuando la presión arterial y la frecuencia cardiaca regresan a sus niveles basales, se administra la siguiente dosis hasta completar la curva. Se administró 0.1mL/100g de peso del animal y se lavó con 0.2 mL de solución salina. Al intentar usar la mínima cantidad de ratas para obtener una segunda curva de dosis repetida con indorrenato o quipazina, la segunda curva resultó menor probablemente por taquifilaxia, aún cuando se dejó reposar a la rata por tiempo de una hora después de la dosis más alta de la primera curva. Por lo tanto, se compararon las curvas dosis – ²⁷ respuesta de indorrenato o quipazina

con otras realizadas en animales distintos, con administración previa de antagonista.

Se tomaron los niveles de glucosa antes de iniciar la curva dosis – respuesta y al término de la misma. En las curvas en las que se empleó el antagonista, se administró 15 min antes de comenzar la curva dosis – respuesta de indorrenato y de la misma manera se tomó la glucosa antes de su administración (fig. 3).

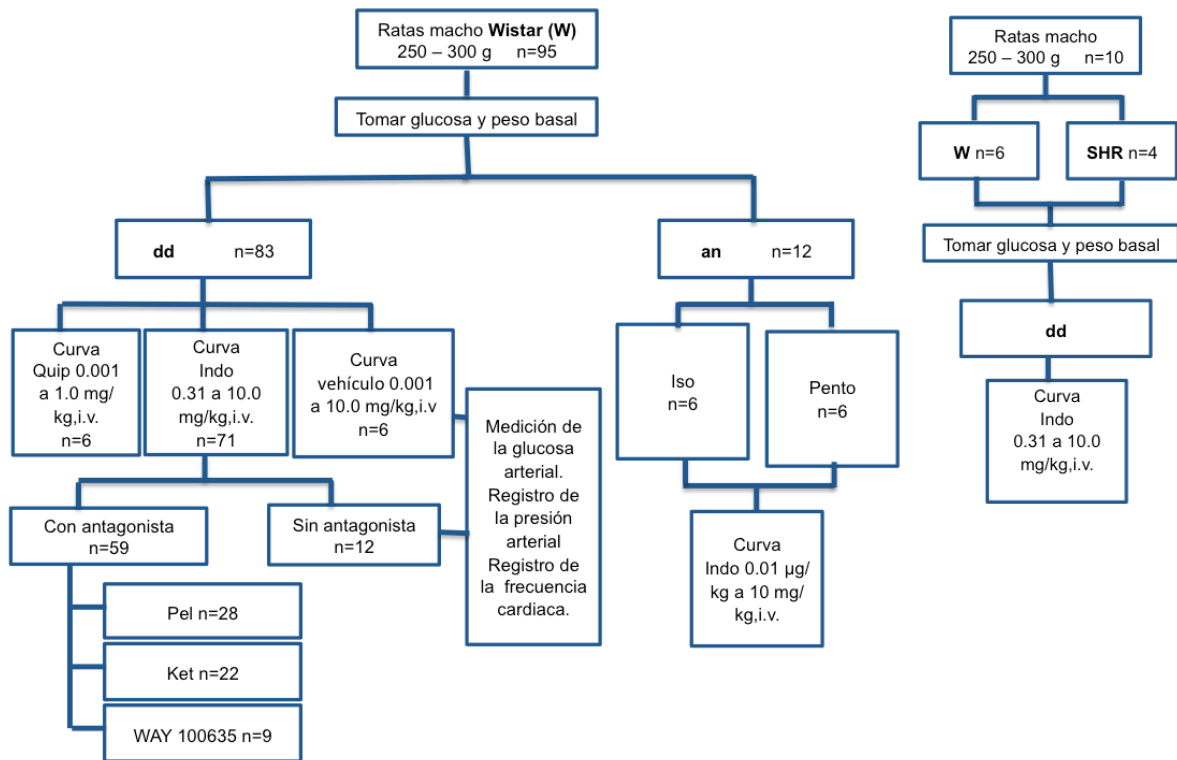


Figura 3: Protocolo experimental

Donde: dd, descerebrada y desmedulada; an, anestesiada; W, wistar; SHR, ratas espontáneamente hipertensas; Quip, quipazina; Indo, indorrenato; Pel, pelanserina; Ket, ketanserina; Iso, isoflurano; Pento, pentobarbital.

12.5. Diseño estadístico

Se obtuvieron parámetros descriptivos para el peso, la glucosa basal, la presión arterial media basal y la frecuencia cardiaca basal de todos los animales utilizados, representados como la media \pm el error estándar de la media (S.E.M.). El ajuste de las curvas dosis – respuesta a una sigmoidea se llevó a cabo por regresión no lineal usando el software GraphPad Prism 6. Se obtuvieron estimadores por intervalo de confianza del 95 % para las dosis efectivas 50 (DE50) en función del 50 % del efecto máximo, usando la ecuación de Hill para los datos de PAM. Para la comparación de las curvas dosis – respuesta de los diferentes grupos con o sin antagonista, anestesiada o descerebrada y desmedulada, rata SHR o rata Wistar, se realizó un ANOVA de dos vías con medidas repetidas (ANOVA MR) con prueba de Tukey, también se hizo para los valores de glucosa en la comparación de todos los grupos con el software SigmaPlot 12. La comparación de la PAM basal de la rata Wistar vs SHR se realizó mediante una prueba de hipótesis de varianza desconocida (t de student).

13. RESULTADOS

Los animales utilizados se pesaron justo antes de realizar el protocolo experimental obteniendo una media de 286 gramos para los animales utilizados en la técnica de descerebración y desmedulación (dd) y para los animales anestesiados (an) el peso promedio fue de 294 gramos, de la misma manera se la concentración de glucosa plasmática basal en la cola de los roedores con valor promedio de 85 mg/dL y 79 mg/dL en animales descerebrados-desmedulados y anestesiados respectivamente. La media de los valores basales de presión arterial media y frecuencia cardiaca fue de 59 mmHg y 261 lat/min respectivamente para animales sometidos a descerebración y desmedulación, mientras que para los que sólo fueron anestesiados tenían valores basales de presión arterial media y frecuencia cardiaca de 104 mmHg y 343 lat/min respectivamente (tabla 3).

Tabla 3: Estadística descriptiva para los parámetros basales medidos a los animales utilizados

Parámetro	media ± S.E.M.	
	Intervalo de confianza, 95%	
	dd	an
Peso (g)	*286 ± 2.2 (281.5 - 290.5)	^a 294 ± 5 (283.1 - 304.9)
Glucosa (mg/dL)	^{&} 85 ± 1.8 (81.4 - 88.6)	^a 79 ± 3.2 (71.7 - 86.3)
PAM (mmHg)	*59 ± 1.1 (56.8 - 61.2)	^a 104 ± 4.2 (94.6 - 113.4)
FC (lat/min)	*261 ± 6.3 (330.4 - 355.6)	^a 343 ± 11.1 (318.5 - 367.5)

*núm. animales de 83, núm. animales [&] 63 y ^anúm. animales de 12.

an: rata Wistar anestesiada y dd: rata Wistar descerebrada y desmedulada

En la tabla 4 se muestra la comparación de los valores basales (valores presentados antes de comenzar las curvas dosis – respuesta) de las ratas Wistar (W) con las ratas SHR utilizadas para las curvas dosis – respuesta del indorrenato (fig. 10). Se obtuvieron valores muy similares entre ambos grupos, sin embargo, para la glucosa, PAM y FC son ligeramente menores en las ratas SHR que en las ratas W pero no hay diferencia significativa entre las medias.

Tabla 4: Estadística descriptiva para los parámetros basales medidos a los animales utilizados

Parámetro	media ± S.E.M.	
	Intervalo de confianza, 95%	
	W	SHR
Peso (g)	*273 ± 2.9 (265.4 – 979)	^a 275 ± 18.2 (217.15 - 332.8)
Glucosa (mg/dL)	*81 ± 3.3 (72.5 - 89.5)	^a 78 ± 3.9 (65.7 - 90.3)
PAM (mmHg)	*63 ± 2.6 (56.3 - 69.7)	^a 52 ± 3.7 (40.3 - 63.7)
FC (lat/min)	*351 ± 15.2 (311.9 - 390.1)	^a 296 ± 32.9 (191.4 - 400.6)

*núm. animales de 6. y ^anúm. animales de 4.

W: rata Wistar descerebrada y desmedulada y SHR: rata espontáneamente hipertensa descerebrada y desmedulada.

Se pueden observar en la figura 4 las mediciones de la variación de la PAM y FC de los grupos del vehículo, de la quipazina (0.001 mg/kg a 1 mg/kg) y del indorrenato (0.31 mg/kg a 10 mg/kg) en el modelo de rata descerebrada y desmedulada. En donde, las dosis repetidas de solución salina no modifican la presión arterial basal. La presión arterial de la rata va en incremento en el grupo al cual se le administra el indorrenato con respecto al grupo control, de 7.5 mmHg a 77.5 mmHg para la Δ PAM (fig.4a). En contraste, la Δ FC a las primeras tres dosis (0.31, 1 y 3.1 mg/kg) no hay modificación con indorrenato, y en la última dosis (10 mg/kg) hay una disminución de 1.7 a -34.2 lat/min (fig.4b). Se puede apreciar que la quipazina tiene un incremento mayor de 12.2 mmHg a 111 mmHg en la Δ PAM, comparado con el indorrenato y que la Δ FC de la dosis más baja (0.001 mg/kg) en la quipazina disminuye a -24.2 mmHg, alcanzando un incremento de 60 lat/min en la dosis de 1 mg/kg.

La DE50 para la Δ PAM del Indorrenato es de 1.4 mg/kg, mientras que para la quipazina es de 0.04 mg/kg. El coeficiente de Hill obtenido en la Δ PAM es de 1.3 en la quipazina y de 1.7 para el indorrenato.

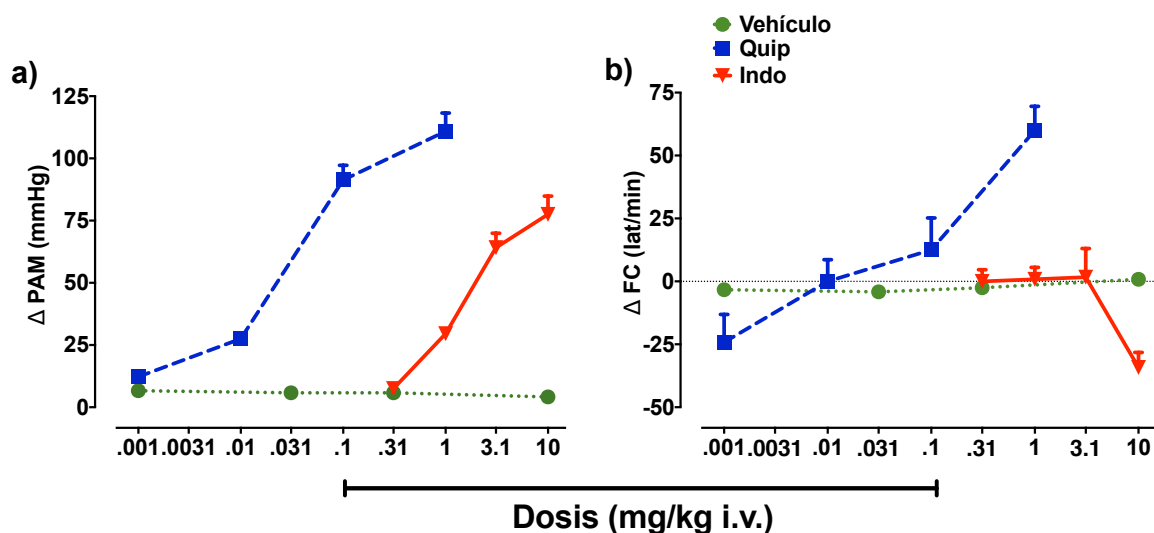


Figura 4. Curva dosis - respuesta de la a) Δ PAM y b) Δ FC en rata Wistar descerebrada y desmedulada del vehículo (SS), el indorrenato (0.31 a 10 mg/kg) y la quipazina (0.001 a 1 mg/kg). La DE50 para la Δ PAM del Indo es de 1.4 mg/kg y de la Quip es de 0.04 mg/kg. Los resultados son expresados en media \pm S.E.M. de seis experimentos por grupo, se obtuvo una curva dosis - respuesta sigmoideal y estimadores de la ecuación de Hill.

En la figura 5 se muestran los valores de la variación de glucosa obtenidos durante el experimento. La primera fase (F1) es la variación de la toma de glucosa de la arteria femoral, posterior a la cirugía e inmediatamente antes de administrar el primer bolo de la dosis más baja del compuesto o vehículo (5 min.). La tercera fase (F3) fue la última medición de glucosa al término del experimento, es decir, 5 minutos después de haber suministrado la dosis más alta de la curva dosis – respuesta, expresado en la variación con respecto al valor de glucosa antes de iniciar la curva. De acuerdo al análisis estadístico realizado no se obtuvieron diferencias significativas entre los tres grupos.

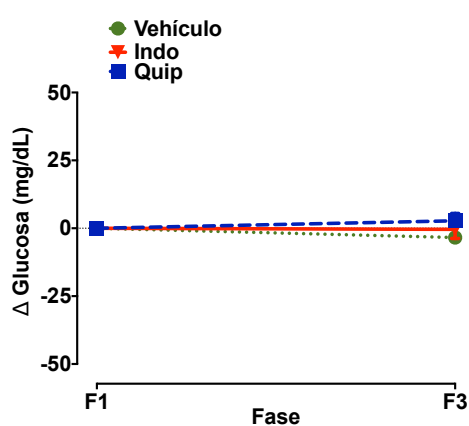


Figura 5. Efecto del indorrenato i.v. (n=5), la quipazina i.v. (n=4) y la solución salina i.v. (n=5) sobre los valores de glucosa durante dos fases en la rata Wistar descerebrada y desmedulada. Los resultados son expresados en media \pm S.E.M. de la Δ Glucosa (mg/dL), ninguno de los valores de la quipazina y del indorrenato fue diferente del vehículo, ANOVA MR.

En la figura 6 se puede observar el efecto que produce la pelanserina a las dosis de 0.01 mg/kg a 1 mg/Kg en la curva dosis – respuesta del indorrenato. La dosis de 1 y 0.31 mg/Kg bloquearon por completo el aumento de la variación de la presión arterial. Para las dosis de 0.1 y 0.031 mg/kg hay una disminución de la Δ PAM, siendo mayor la disminución con la pelanserina de 0.1 mg/kg. La dosis de 0.01 mg/Kg no modifica los valores de Δ PAM ($DE_{50} = 2.0$) del indorrenato (fig.6a). Por otro lado, ninguna de las dosis de pelanserina modifican la Δ FC y tienen el mismo comportamiento que la curva dosis – respuesta del indorrenato solo (fig.6b).

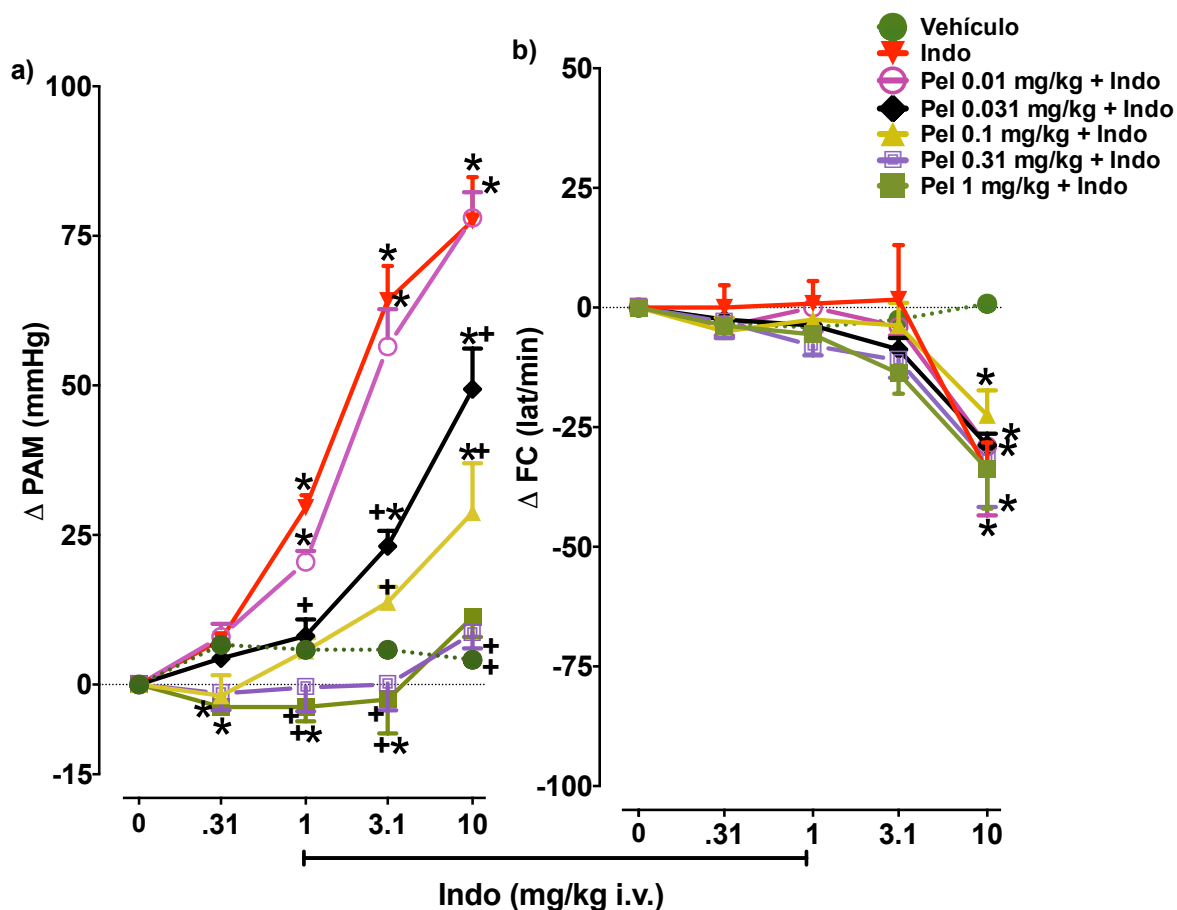


Figura 6. Efecto de la pelanserina (0.01 mg/kg, n=5; 0.031 mg/kg, n=4; 0.1 mg/kg, n=4; 0.31 mg/kg, n=5; 1.0 mg/kg, n=4) sobre los valores de a) Δ PAM y b) Δ FC durante la curva dosis – respuesta del indorrenato (0.31 a 10 mg/kg, n=6) en la rata Wistar descerebrada y desmedulada. Los resultados son expresados en media \pm S.E.M., * $P < 0.05$ vs vehículo y + $P < 0.05$ vs Indo, ANOVA MR.

En el caso de la ketanserina (fig.7) ocurre el mismo efecto que la pelanserina en donde se muestra que la administración intravenosa de este antagonista bloquea por completo el efecto del indorrenato a la dosis de 0.31 mg/kg, pero en la dosis de 0.1 y 0.031 mg/kg se observa una disminución de la respuesta en la curva del indorrenato (fig.7a). No hay cambios en la ΔFC con las dosis de la ketanserina en comparación con el indorrenato (fig.7b).

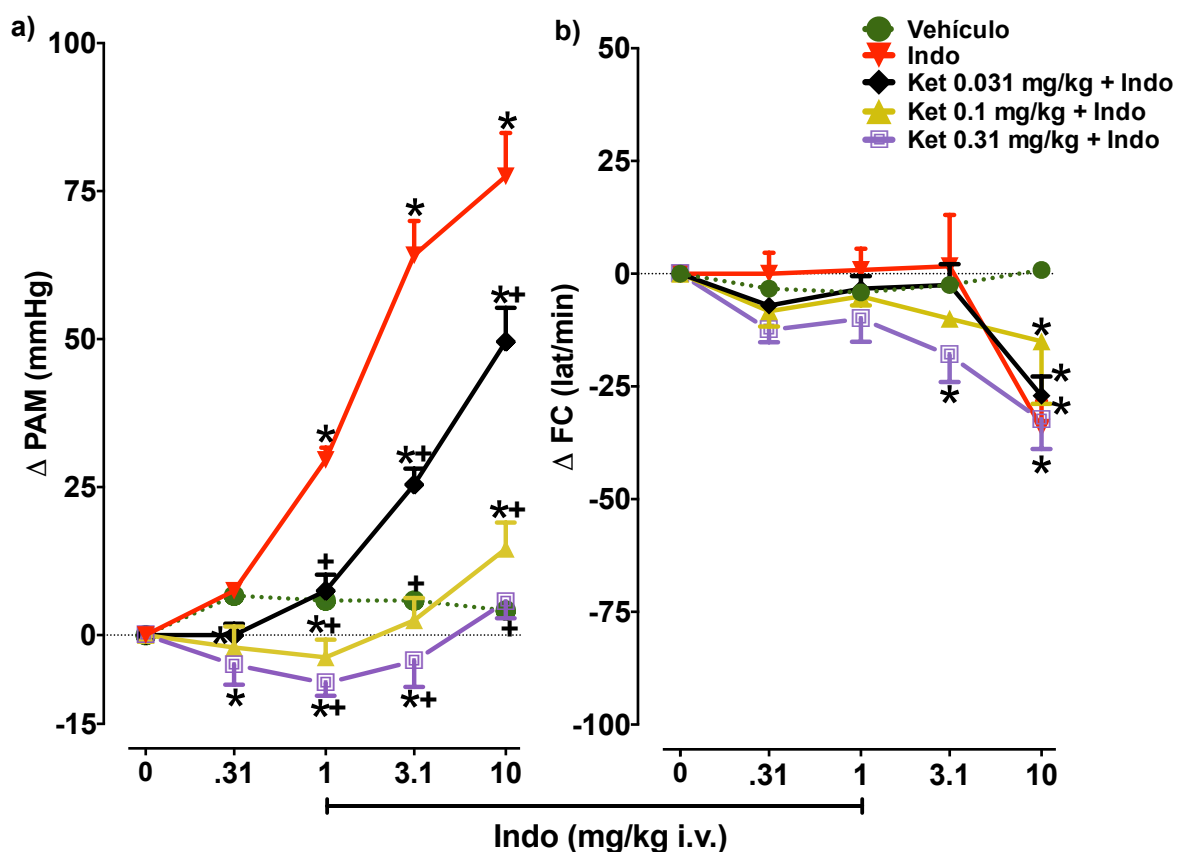


Figura 7. Efecto de la ketanserina (0.031mg/kg, n=6; 0.1mg/kg, n=6; 0.31mg/kg, n=4) sobre los valores de a) ΔPAM y b) ΔFC durante la curva dosis – respuesta del indorrenato (0.31 a 10 mg/kg, n=6) en la rata Wistar descerebrada y desmedulada. Los resultados son expresados en media \pm S.E.M., *P<0.05 vs vehículo y ⁺P<0.05 vs Indo, ANOVA MR.

En la comparación de las dosis de 0.031 mg/Kg de pelanserina (DE50=3.9) y ketanserina (DE50=3.1) no se obtuvieron cambios significativos de la Δ PAM (fig.8a) excepto a la dosis de 10 mg/kg donde el bloqueo es más evidente con pelanserina. Tampoco de la Δ FC (fig.8b). El coeficiente de Hill obtenido en la Δ PAM es de 1.4 para el TR3369, de 2.4 para la pelanserina y 2.2 para la ketanserina. A dosis de 31 mg/kg hay una caída repentina de la Δ PAM.

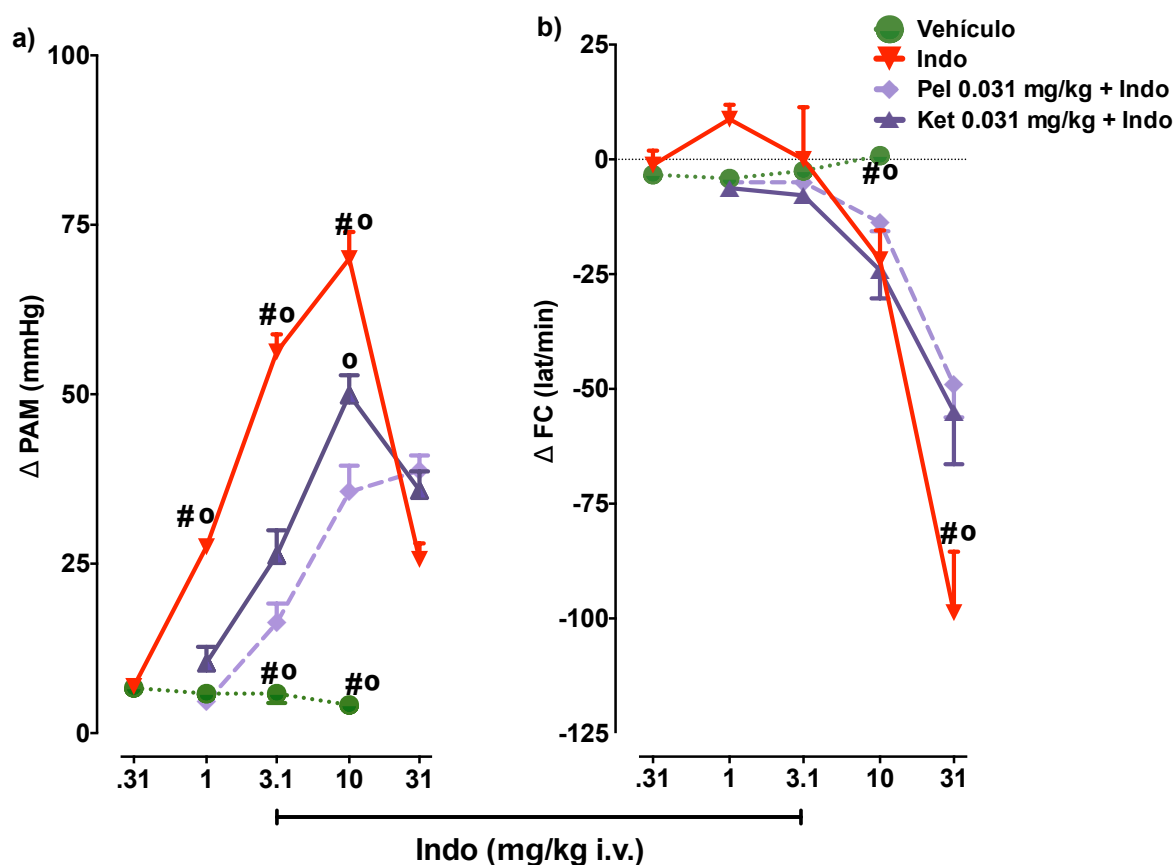


Figura 8. Comparación de las curvas dosis – respuesta para la pelanserina (0.031mg/kg; n=6) y la ketanserina (0.031mg/kg; n=6) sobre los valores de a) Δ PAM y b) Δ FC durante la curva dosis – respuesta del indorrenalato (0.31 a 31 mg/kg, n=4) en la rata Wistar descerebrada y desmedulada. La DE50 es de 1.0, 3.9 y 3.1 mg/Kg para Indo, Pel y Ket respectivamente. Se obtuvo una curva dosis – respuesta sigmoideal y estimadores de la ecuación de Hill. Los resultados son expresados en media \pm S.E.M., *P<0.05 vs Ket y #P<0.05 vs Pel, ANOVA MR.

El gráfico siguiente (fig. 9) muestra el efecto del antagonista WAY 100635 a las dosis de 1 mg/Kg y 3.1 mg/kg en la curva (0.31 a 31 mg/kg) de indorrenato. No hay diferencia significativa en la presión arterial y en la frecuencia cardiaca.

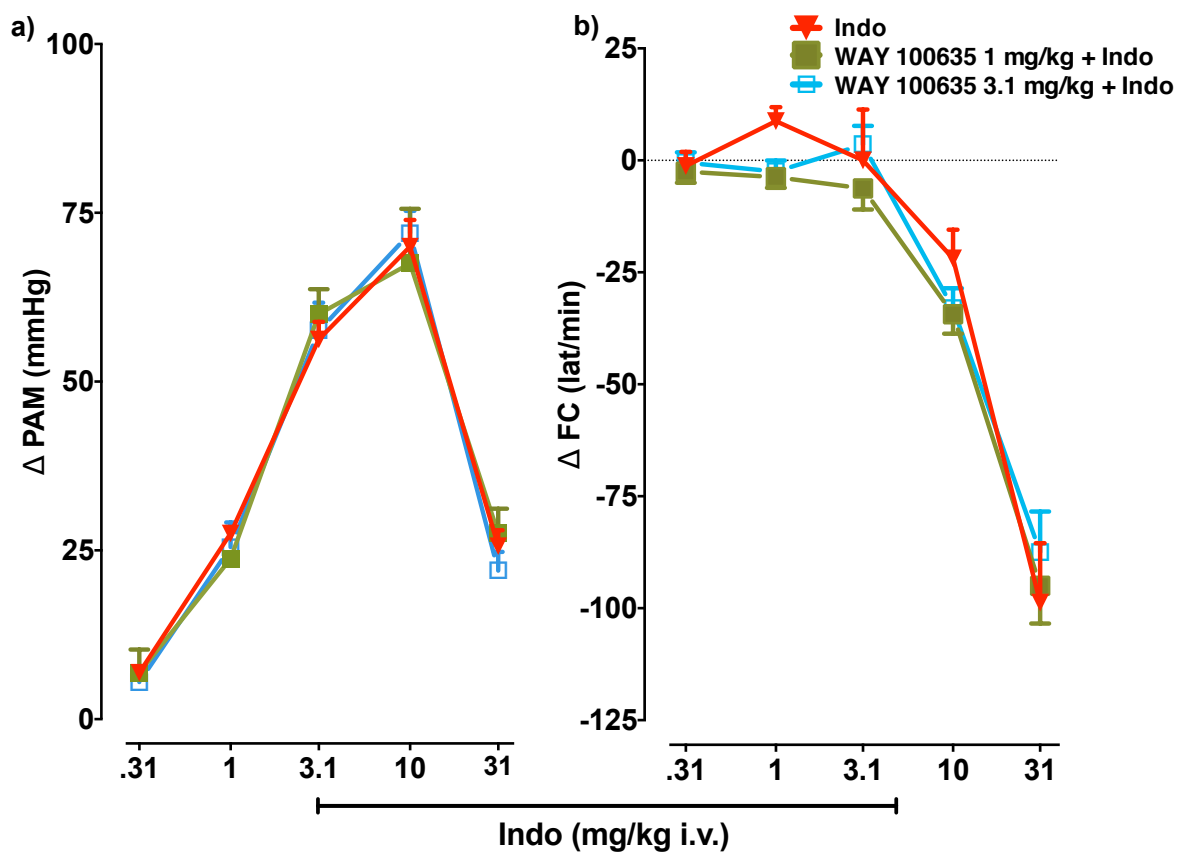


Figura 9. Efecto del WAY 100635 (1.0mg/kg, n=4; 3.1mg/kg, n=5) sobre los valores de a) ΔPAM y b) ΔFC durante la curva dosis – respuesta del indorrenato (0.31 a 31 mg/kg, n=4) en la rata Wistar descerebrada y desmedulada. Los resultados son expresados en media ± S.E.M., ninguno de los valores del antagonista fue diferente del Indo *P<0.05 vs Indo, ANOVA MR.

En la figura 10 se muestran los gráficos de toma de muestra de la glucosa plasmática durante el experimento. Se llevaron a cabo 3 muestreos: en F1 los valores de glucosa se tomaron al término de la cirugía, cinco minutos antes de iniciar con la administración del antagonista directamente de la arteria femoral. El valor de glucosa en la fase dos (F2) es la toma de muestra en la arteria 10 minutos después de la administración del antagonista y cinco minutos antes del inicio de la curva dosis – respuesta. La última fase (F3) se realizó por toma de muestra arterial al finalizar la curva dosis – respuesta (5 min después de la última administración). Se puede observar en los gráficos la variación de glucosa (a, b y c) de pelanserina, ketanserina y WAY 100635 con respecto a la curva dosis – respuesta de indorrenato solo, no tienen una diferencia significativa de los valores de glucosa en las fases uno, dos y tres. Por lo que ninguno de los antagonistas modifica los valores de glucosa durante la curva dosis – respuesta del indorrenato en el experimento.

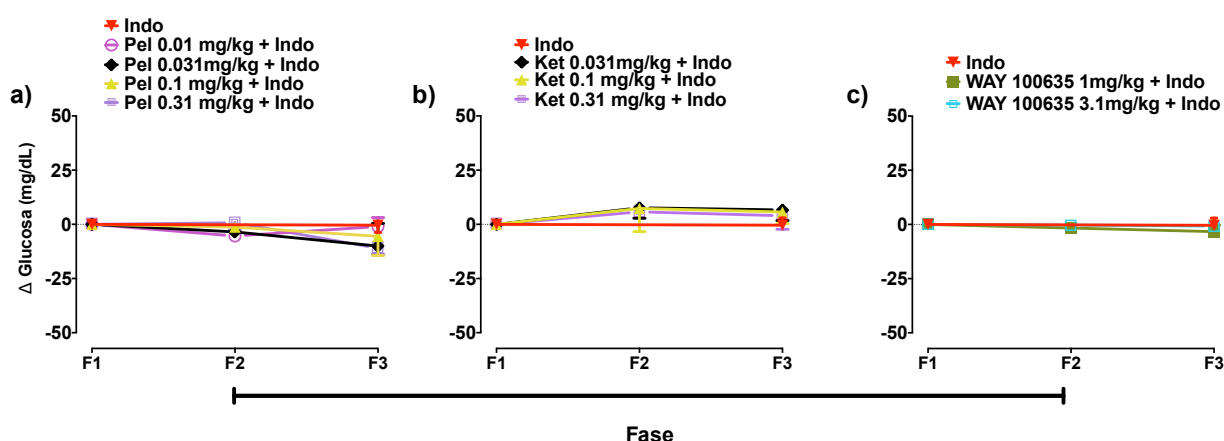


Figura 10. Efecto de la pelanserina i.v. (0.01 mg/kg, n=5; 0.031 mg/kg, n=4; 0.1 mg/kg, n=4; 0.31 mg/kg, n=4) (a y d), la ketanserina i.v. (0.031 mg/kg, n=6; 0.1 mg/kg, n=3; 0.31 mg/kg, n=4) (b y e) y el WAY 100635 i.v. (1 mg/kg, n=3; 3.1 mg/Kg, n=4) (c y f) sobre los valores de glucosa durante la curva dosis – respuesta de indorrenato i.v. (n=5) en la rata Wistar descerebrada y desmedulada. Los resultados son expresados en media \pm S.E.M. de la Δ Glucosa (mg/dL). Ninguno de los valores de pelanserina, ketanserina y WAY 100635 fue diferente del indorrenato, ANOVA MR.

Por los resultados observados con ratas Wistar sobre el aumento de la Δ PAM (fig.4) se decidió también realizar una curva dosis – respuesta del indorrenato con las ratas espontáneamente hipertensas (fig.11). En donde se puede observar gráficamente que no hay diferencia en la Δ FC (fig.11b). Sin embargo, en la presión arterial (fig.11a) hay una disminución de la presión arterial en las últimas dosis de indorrenato (3.1 y 10 mg/Kg), en donde se requiere una dosis mayor (DE50 de 1.6 mg/kg) en las ratas SHR para obtener la mitad de aumento en la presión arterial en comparación a las ratas Wistar. El coeficiente de Hill obtenido en la Δ PAM es de 1.7 para el Indo Wistar y para el Indo SHR.

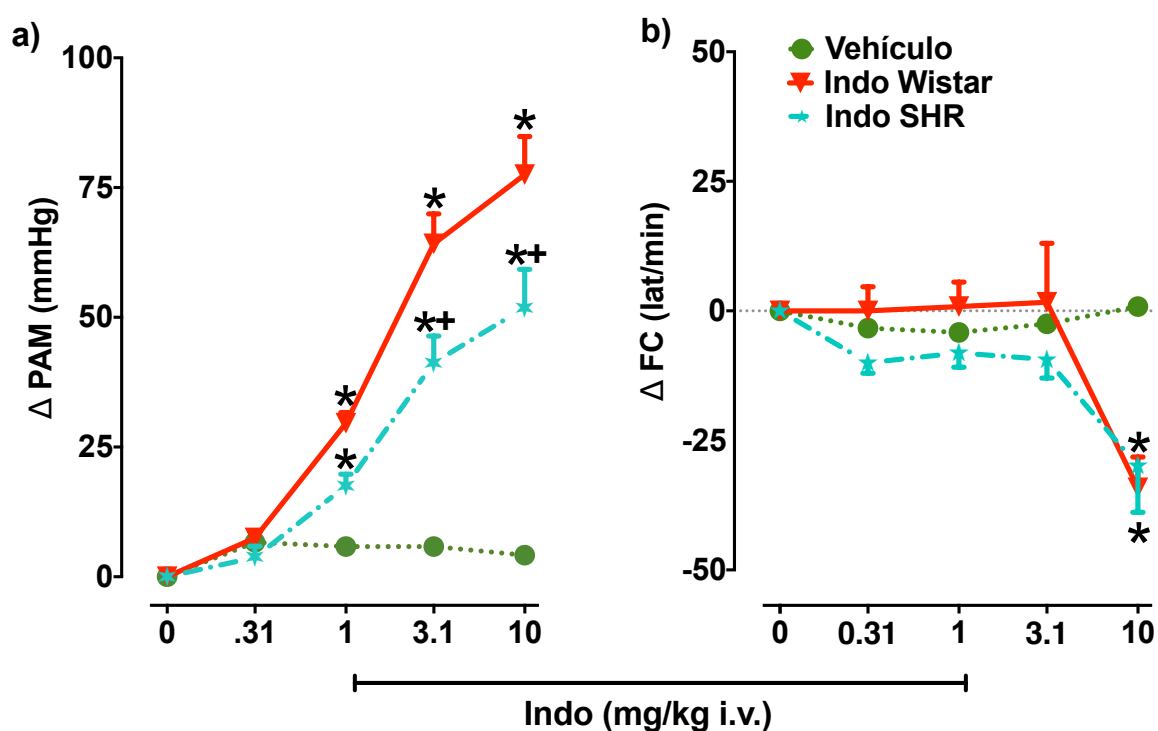


Figura 11. Curva dosis - respuesta del indorrenato (0.31 a 10 mg/kg i.v.) en la rata Wistar (n=6) y SHR (n=4) descerebrada y desmedulada. La DE50 para la Δ PAM del Indo Wistar es de 1.4 mg/kg y del Indo SHR es de 1.6 mg/kg. Se obtuvo una curva dosis – respuesta sigmoideal y estimadores de la ecuación de Hill. Los resultados son expresados en media \pm S.E.M. de Δ PAM y de la Δ FC * $P < 0.05$ vs Control y † $P < 0.05$ vs Indo, ANOVA MR.

Se observaron respuestas vasopresoras durante las curvas dosis - respuesta con indorrenato en el modelo de la rata anestesiada. En la figura 12 se puede ver el aumento de la variación de presión arterial de la rata anestesiada con isoflurano y pentobarbital en comparación con el grupo de rata descerebrada y desmedulada (Indo dd). Se usaron dos anestésicos el isoflurano con un consumo de 1.5 cm.ca (columna de agua) y 2 L/min O₂ a 22°C de administración constante (Indo Iso) y pentobarbital a una dosis de 65 mg/kg de peso del animal (Indo Pento).

El incremento que se produce en la rata anestesiada con isoflurano en la curva dosis – respuesta del indorrenato fue de 8.3 mmHg en la dosis de 10 mg/Kg de Indorrenato y es significativamente diferente a Indo dd e Indo pento. Con el pentobarbital se obtuvo una respuesta vasopresora mayor (de 7.5 a 58.3 mmHg) que con el isoflurano, pero menor a la que se obtiene en la rata descerebrada y desmedulada (de 7.5 a 77.5 mmHg). Solamente se observa diferencia significativa en la última dosis de indorrenato entre el grupo Indo Pento e Indo dd.

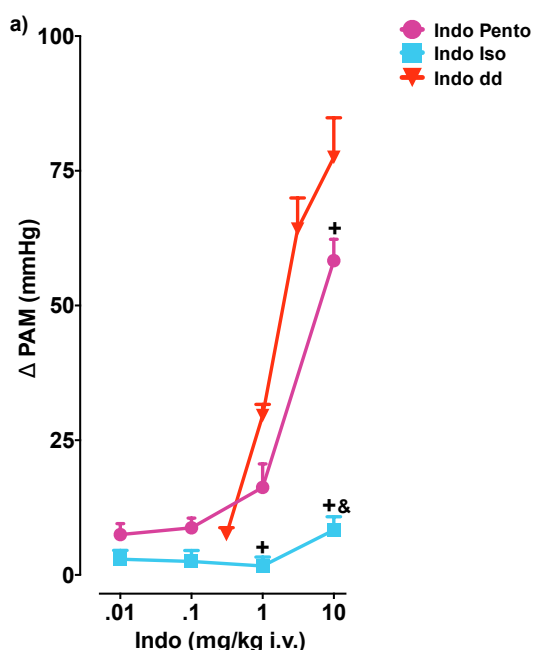


Figura 12. Respuestas vasopresoras de la Δ PAM en una curva dosis – respuesta del indorrenato en la rata Wistar descerebrada y desmedulada (0.31 a 10 mg/kg) o anestesiada (0.01 a 10 mg/kg) con isoflurano (2.5 cm.ca y 2 L/min O₂ a 22°C) o pentobarbital (65 mg/kg). Se obtuvo una curva dosis – respuesta sigmoideal. Los resultados son expresados en media \pm S.E.M. de seis experimentos por grupo, [&]P<0.05 vs Indo pento y ⁺P<0.05 vs Indo dd, ANOVA MR.

14. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los valores basales de la concentración de glucosa de los animales se encuentran dentro del intervalo normal (39). Previamente se realizaron experimentos pilotos donde se llevaron a cabo curvas dosis – respuesta con animales que se sometieron a un ayuno de 12 horas y otro grupo sin ayuno, los incrementos de glucosa en la curva dosis – respuesta de quipazina fue menor en los animales que habían sido sometidos a un ayuno de 12 horas, por ello se decidió trabajar en estas condiciones. Por otra parte, existen estudios en los que se determinan los niveles de glucosa y usualmente son 12 horas de ayuno (40), aunque en la mayoría de los casos varía el tiempo de ayuno de acuerdo al objetivo del estudio.

Posiblemente los valores de glucosa basales sean menores que en los demás tiempos de toma de muestra debido a que los valores a partir de la cola de la rata son más bajos que la toma directa de la arteria (41).

Estudios preliminares permitieron la selección de isofluorano para anestésiar a la rata descerebrada y desmedulada en las curvas dosis – respuesta, esto fue porque no incrementa significativamente los valores de glucosa como otros anestésicos (42). Además, la inducción de la anestesia es más rápida y la mortalidad de animales es nula.

Referente al modelo de la rata descerebrada y desmedulada, los animales se encuentran en una presión promedio de 59 mmHg, dentro de los valores reportados por Shipley R y Tilden J en 1947 (43) y la frecuencia cardiaca de 261 lat/min. Considerando que se destruye el encéfalo y la médula espinal, de esta forma se elimina la intervención del sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso simpático en la regulación de la presión arterial y frecuencia cardiaca. La no participación del SNC permitió la evaluación del efecto que tiene el indorrenato sobre la presión arterial a nivel periférico.

En lo que concierne a la medición de glucosa durante el experimento no se observan diferencias significativas en los grupos a los que se les administró la quipazina y el indorrenato con respecto al grupo de solución salina, por lo que se puede decir que estos principios activos no modifican los valores de

glucosa plasmática al ser administrados por esta vía y a las dosis utilizadas en este modelo experimental. Existió un incremento de glucosa para los tres grupos en el valor basal en la F1 de experimentación que puede deberse al anestésico (42), al estrés al que es sometido el animal durante la cirugía y a la toma de muestra sanguínea podrían incrementar los valores de glucosa en el animal. Sin embargo, los valores que se alcanzan al final del experimento se encuentran dentro del intervalo de los niveles basales promedio de las ratas en ayuno antes de iniciar el experimento y no se modifican por la administración intravenosa del indorrenato, debido a que no se realiza administración de carga de glucosa (13). Un efecto similar puede ser observado con la administración de los antagonistas ketanserina, pelanserina y WAY 100635, que tampoco que tampoco provocan una variación en los valores de la glucosa plasmática durante la curva del indorrenato.

Los valores de variación de la presión arterial media de las ratas con el indorrenato y con la quipazina incrementan significativamente comparadas con la curva de solución salina. Este incremento en la variación de la PAM indica que los dos fármacos se unen a receptores que activan vías de señalización que incrementan la presión arterial como ocurre y se ha reportado con la serotonina (1).

Shin Y. y col. en 1983 estudiaron en la rata descerebrada y desmedulada los efectos presores de la quipazina (0.003 – 1 mg/kg i.v.), un agonista no selectivo de la serotonina y observaron un aumento abrupto de la PA, cuyo aumento fue reducido con fentolamina y fenoxibenzamina (antagonistas α -drenérgicos), así como con reserpina (depleciona las catecolaminas) y metisergida (agente antiserotonérgico), sus resultados sugieren que la quipazina libera NA y produce un efecto directo sobre los receptores 5-hidroxitriptaminérgicos que parecen estar interconectados con los α -adrenoreceptores (44).

Otro estudio menciona que la quipazina (0.025 mg) se une a receptores 5-HT₂ del SNC en el área presora ventrolateral de la medula (área Schlaefke's) de gato y aumenta de manera sostenida la PA, y se antagoniza el efecto simpato-excitatorio con LY 53857, 1 mg (45), pero cuando ésta se administra de manera sistémica (3

mg/kg) a ratas puede activar los receptores 5-HT₂ vasculares, aumentar adicionalmente la PA y disminuir el flujo sanguíneo renal, este efecto es bloqueado por los antagonistas de los receptores 5-HT₂: LY 53857 (0.1 mg/kg i.v.) y Xylamidina (0.1 mg/kg i.v.) (46). También se ha demostrado que la quipazina aumenta la actividad de la renina plasmática en ratas, incrementando de esta forma la PAM y la respuesta es atenuada con el uso del antagonista LY 53857 (47).

Otros estudios más detallados indican que la estimulación con la quipazina (0.9µg/50 nL) de los receptores 5-HT_{2/1C} del núcleo subretrofacial en la médula de gato produce hipertensión y una leve taquicardia asociada con un aumento de la actividad nerviosa simpática renal, mientras que la estimulación de los receptores 5-HT_{2/1C} en la médula ventrolateral caudal y en el núcleo del tracto solitario produce hipotensión, bradicardia e inhibición simpática, que se vio atenuada por LY 53857, 0.5 µg en 100 nL y BW 501C, 1 µg en 100 nL (antagonistas 5-HT₂) (48). En cambio, los receptores 5-HT_{1A} disminuyen la presión por acción central del agonista indorrenato (49) cuya eficacia antihipertensiva ya ha sido confirmada clínicamente (50).

Por otra parte, la DE50 del cambio de presión arterial media de la quipazina obtenida en este estudio fue mucho menor que la DE50 del indorrenato, lo que indica que la quipazina tiene una mayor potencia que el indorrenato para producir el aumento de la presión arterial.

Acerca del coeficiente de Hill podemos decir que la inclinación de la curva aumenta a medida que aumenta la dosis ya que el valor es de signo positivo, por lo que es dosis dependiente, esto para ambos fármacos. Debido a que el valor de la pendiente de Hill es mayor que 1 para indorrenato la sigmoide de la variación de la presión arterial media se muestra de forma más pronunciada que en la curva de la quipazina.

De forma similar se ha informado un incremento en la presión sanguínea causada por el indorrenato a dosis única, que es atribuido a la activación de los receptores 5-HT₂ periféricos y que el grupo carbometoxi es de importancia para efectuar esta

respuesta. Los cambios de presión arterial media y frecuencia cardiaca fueron 75 ± 4 mm Hg y 18.31 ± 2.8 lat/min respectivamente (49). En este estudio se obtuvieron aumentos de 77.5 mmHg en la Δ PAM muy cercano al descrito anteriormente, en contraste con el estudio de Pérez V. y col., se obtuvo una disminución de -34.2 lat/min en la Δ FC a la misma dosis de 10 mg/Kg i.v. ya que la dosis fue acumulativa. Este efecto de disminución de la FC quizá se presente por estimulación a otros receptores que no son 5-HT₂. A dosis de 31 mg/kg de indorrenato produce una caída repentina de la Δ PAM que puede ser debido perdida de su selectividad a receptores que aumenten la presión arterial y unirse a receptores serotoninérgicos que median hipotensión en MLV como los 5-HT₇ (51).

Los receptores 5-HT₂ han sido encontrados en musculo liso, en trombocitos, en miocitos, y sobre diferentes especies de neuronas centrales y periféricas (52). Se sabe que la serotonina produce un efecto vasoconstrictor al estimular los receptores 5-HT₂ que se encuentran en el músculo liso vascular y puede ser antagonizado por la administración de ketanserina y pelanserina (1). Villalobos R y col. en 1991 confirmaron que la contracción de la serotonina en anillos aórticos de conejo se lleva a cabo mediante la estimulación de receptores 5-HT₂ por su antagonismo con pelanserina, ketanserina y metisergida (53). En este estudio se obtuvo que la pelanserina y la ketanserina disminuyen las respuestas presoras del indorrenato de forma dosis – dependiente, inclusive a dosis de 0.31 y 1 mg/Kg bloquean el efecto, sin cambios en la variación de la frecuencia cardiaca.

Otros resultados obtenidos con ketanserina (10 mg/Kg i.v) en la rata descerebrada y desmedulada sugiere que los receptores 5-HT₂ están involucrados en las respuestas presoras del 5-fluoro éster que es un análogo del indorrenato, ya que claramente fue inhibido por la presencia de la ketanserina que es un bloqueador 5-HT₂, a la dosis de 0.1 mg/kg. En contraste, los receptores α_1 adrenérgicos no están relacionados a este efecto, ya que la prazosina (0.1 mg/kg) no cambio significativamente la actividad presora observada (54).

En las curvas dosis – respuesta de indorrenato donde se utilizo tanto la ketanserina (0.031 mg/Kg) como la pelanserina (0.031 mg/Kg) como antagonista,

no tuvieron diferencias significativas en el bloqueo de las respuesta presoras del indorrenato, excepto a la dosis de 10 mg/Kg entre los dos antagonistas. La pelanserina tiene una DE50 de 3.9 mg/Kg, la ketanserina de 3.1 mg/Kg y el indorrenato de 1.4 mg/Kg, lo que indica que el incremento de la presión arterial es a causa de la unión a receptores serotoninérgicos como ocurre con la serotonina por el bloqueo total o disminución del efecto y en ésta investigación ambos antagonistas tienen una potencia muy cercana, siendo mayor con la pelanserina.

Castillo C y col. en 1995 demostraron que la ketanserina a dosis de 0.1 y 0.031 mg/Kg disminuyen las respuestas vasopresoras del indorrenato (0.31 a 1 mg/kg). En el mismo estudio la prazosina (1 mg/Kg) provoca una leve inhibición del efecto presor del indorrenato, el cual no fue convincentemente asociado a receptores adrenérgicos (55).

En la figura 13 se observa el mecanismo posible por el cuál se estaría realizando la vasoconstricción en el musculo liso vascular a través de la estimulación de receptores 5-HT_{2A}.

Como se ha descrito, el principal mecanismo implicado en la vasoconstricción inducida por la serotonina es la estimulación directa de los receptores 5-HT₂ localizados en las células del musculo liso vascular (56). Sin embargo, se ha reportado que algunos agentes serotoninérgicos tienen selectividad para los receptores 5-HT₁ y también inducen vasoconstricción en algunos tejidos aislados de musculo liso vascular. Podría pensarse que el indorrenato actúa de manera similar a la 5-HT. Sin embargo, por los resultados obtenidos en este estudio, el WAY 100365 no produce ningún efecto sobre las respuestas del indorrenato, por lo que los receptores 5-HT_{1A} periféricos no se encuentran involucrados en las respuestas vasopresoras y tampoco los receptores α_1 adrenérgicos.

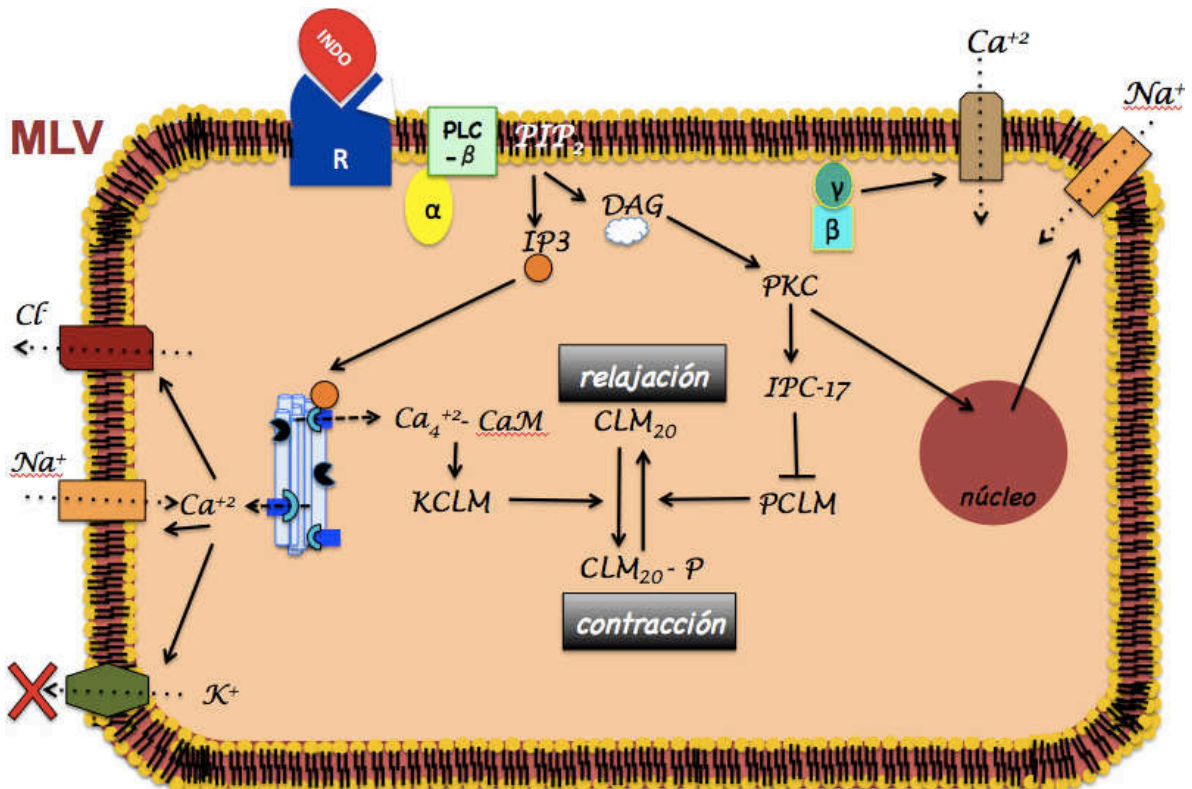


Fig.13. Respuesta contractil del indorrenato a través del receptor 5-HT_{2A} en el músculo liso vascular. La activación de PLC-β por un agonista (Indo) es mediada a través de la proteína G_q. El acoplamiento de la subunidad α a un receptor (R) ocupado por un agonista (causa que el enlace GDP cambie por GTP intracelular; el complejo GTP-α es dissociado del receptor y del complejo βγ. Este complejo puede activar canales de Ca⁺². La subunidad α interacciona con PLC-β que escinde el fosfatidilinositol-4,5-difosfato (PIP₂) en inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El papel principal del IP₃ es el control del Ca⁺² intracelular mediante un canal de calcio activado por ligando en el retículo endoplásmico, por lo que incrementa la concentración de Ca⁺² intracelular. Cuatro moléculas de Ca⁺² forman un complejo con la calmodulina (Ca₄⁺²-CaM) que activa la cinasa de la cadena ligera de miosina (KCLM) encargada de fosforilar la CLM₂₀. Una segunda enzima, la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (PCLM) revierte la fosforilación y causa relajación. El Ca⁺² intracelular es capaz de activar canales de Ca⁺² y Cl, así como bloquear canales de K⁺. Por su parte, el principal efecto del DAG es activar la proteína cinasa C (PKC) que activa el inhibidor potenciado por proteína C-17 (IPC-17), que inhibe a la fosfolipasa de la cadena ligera de miosina (PCLM), también PKC es capaz de catalizar la fosforilación de una variedad de proteínas intracelulares que permiten que el núcleo envíe una señal de apertura de canales de Na⁺. Modificado de Pappano AJ y col., 2013.

En la serotonina, la vasoconstricción inducida en ratas descerebradas y desmeduladas es debida a receptores 5-HT₂ por el antagonismo de LY 53857 y una respuesta inefectiva con el uso del antagonista 5-HT₁ espiroxatrina (57). También se conoce que el WAY 100635 tiene una elevada afinidad por los receptores α_1 adrenérgicos, según Villalobos R. que en el 2002 realizó un experimento en rata descerebrada y desmedulada donde obtuvo que la dosis de WAY 100365 (1 mg/Kg) desplazo la curva dosis – respuesta de la fenilefrina (agonista α_1 adrenérgico) (1 a 1000 μ g/kg i.v.) a la derecha, lo cual sugiere que la hipotensión evocada por el antagonista podría estar relacionada con el bloqueo de los α_1 adrenoreceptores (58).

En las ratas espontáneamente hipertensas el incremento de la presión arterial es menor en las dosis más altas que en las ratas Wistar en cuya DE50 es mayor. La frecuencia cardiaca es la misma para ambas. Por lo que se necesita mayor dosis en las ratas SHR para producir el incremento en la presión arterial que en las ratas Wistar, posiblemente se deba a que existan menor cantidad de receptores en la cepa SHR.

Hay una diferencia clara en las respuestas vasopresoras en los grupos de animales donde el isoflurano no presenta un aumento en la Δ PAM como las ratas anestesiadas con pentobarbital. El pentobarbital sólo es diferente de la curva del grupo de ratas descerebradas y desmeduladas en la dosis de 10 mg/Kg. Ya que el isoflurano afecta varios parámetros hemodinámicos, podría evitar el aumento de la presión arterial en la rata anestesiada por algún mecanismo alterno. Otros estudios muestran que la inhalación de isoflurano disminuye la frecuencia cardiaca, la presión arterial y la contractilidad muscular de forma dosis – dependiente al incrementar la cantidad de isoflurano suministrado en ratas Sprague Dawley (59).

El efecto de 1%, 2% y 4% de isoflurano sobre el potencial de acción (AP) y desarrollo de tensión en el musculo papilar del corazón fue estimulado con 0.3 Hz; se observa una disminución en la tensión del pico dosis – dependiente

(73,53 y 37mN) y se prolongo la duración del AP. También se observo que deprime la tensión del pico significativamente a menores frecuencias de estimulación (0.1-0.25 Hz) y causa una disminución en la duración de la respuesta a 2 y 3 Hz. Se sugiere que esto se debe a la acumulación de Ca^{+2} dentro del retículo sarcoplásmico durante el potencial de acción, que produce una prolongación del AP y que esta asociado a un profundo efecto inotrópico negativo (disminuye la contractilidad) (60). En miocitos atriales y ventriculares aislados de cobayo se comparo el efecto del isoflurano sobre los canales de calcio tipo L y los canales de calcio tipo T. El anestésico deprime a ambos canales pero con mayor sensibilidad a los tipo T atrial, seguido de los tipo L atrial y por último los tipo T ventricular (61). Con la técnica de patch clamp se evaluaron miocitos ventriculares aislados de corazón de cobayo y se obtuvo que el isoflurano produce a una inhibición concentración-dependiente (0.6, 1 y 1.8 mM), es decir, hay una disminución del potencial de acción y reducción en la conductancia por el canal de Ca^{+2} tipo L, así como la velocidad de inactivación del canal fue acelerada con isoflurano, lo que resulta en un acortamiento del AP. La prolongación del AP en la concentración más baja se debe en parte al efecto sobre la inhibición del canal de potasio. La inhibición en la conductancia fue mayor sobre el canal rectificador retardado de potasio que para el canal de calcio tipo L (62). De la misma manera, estudios previos determinaron que el isoflurano bloquea los canales de sodio cardiacos con la consecuente velocidad de conducción y excitabilidad (63).

Otro estudio realizado en ratas descerebradas y desmeduladas determinó que el isoflurano produce inhibición en la reducción de la PAM y la resistencia vascular sistémica (RVS) inducida por adrenomodulina (AM); esto sugiere que elevadas concentraciones de isoflurano inhiben ambos efectos vasodilatadores y efecto inotrópico inducidos por AM a través de la vía Gs por un mecanismo todavía desconocido (64). Con base en los resultados obtenidos en este estudio, podría comprobarse que la inhibición de las respuestas contractiles del indorrenato no es a través de receptores acoplados a proteínas Gs en endotelio y músculo liso vascular periféricos.

La quipazina sirve efectivamente como herramienta para comparar el efecto vasopresor del indorrenato y posiblemente para la búsqueda de otro tipo de principios farmacéuticos activos nuevos, con mayor selectividad.

El indorreato sigue siendo una molécula prometedora en su uso como agente antihipertensivo ya que en ratas hipertensas no anestesiadas (65,66) disminuye la presión arterial y en estudios realizados recientemente tiene un efecto antihiperlicemiantes después de la administración de una carga de glucosa (12,13).

15. CONCLUSIÓN

Es importante conocer más acerca de la farmacología del indorrenato y no solamente los efectos favorables sino también de aquellos efectos no deseados. Entre más información se obtenga de este fármaco y el mecanismo por el que produce dicho efecto se podría prevenir alguna reacción adversa mediante alguna modificación en la estructura de la molécula, la administración de un antagonista hacia estos receptores que producen la respuesta presora, un cambio de vía de administración y dosis o algunas otras alternativas.

En este estudio el modelo de rata descerebrada y desmedulada permitió evaluar el efecto del indorrenato en la periferia. Se determinó que el TR3369 incrementa la variación de la presión arterial, pero no se alcanzan valores tan altos como con la quipazina, un fármaco que fue de utilidad como herramienta de comparación. Así mismo, las dosis requeridas para producir el incremento de la presión arterial del indorrenato son mayores que con la quipazina, aún cuando el efecto máximo de la quipazina es más elevado. De manera similar en las ratas SHR se incrementan las respuestas presoras pero la potencia del indorrenato es menor que en las ratas Wistar. Se encontró que las respuestas contráctiles del indorrenato fueron bloqueadas con el uso de isoflurano en la rata anestesiada en comparación con el uso de pentobarbital.

Considerando que la respuesta presora del indorrenato en la rata descerebrada y desmedulada fue bloqueada por ketanserina un antagonista de los receptores 5-HT_{2A}, se puede afirmar que la contracción se lleva a cabo por estimulación de los receptores 5-HT_{2A} y no a través de los receptores 5-HT_{1A} localizados en la periferia.

Por otro lado, el indorrenato administrado por vía intravenosa no modifica los valores de glucosa plasmática a las dosis hipertensoras en el modelo utilizado.

16. PERSPECTIVAS

El Indorrenato tiene la capacidad de producir respuestas vasopresoras en la periferia y la respuesta vasopresora se bloquea mediante receptores serotoninérgicos del tipo 5HT₂, que de acuerdo a los resultados obtenidos participan los receptores 5HT_{2A}. Por lo que se propone utilizar antagonistas 5HT_{2B} y 5HT_{2C} para evaluar si estos receptores también contribuyen en la obtención de respuestas presoras en la periferia.

17. BIBLIOGRAFÍA

1. Hong E, Castillo C, Flores E, Mercedes F. Receptores Serotoninérgicos y Enfermedades Cardiovasculares. *Gac Med Mex.* 1994;130(3):131–3.
2. Dabiré H, Chaouche-Teyara K, Cherqui C, Fournier B, Schmitt H. Pharmacological analysis of the cardiac effects of 5-HT and some 5-HT receptor agonists in the pithed rat. *FundamClinPharmacol.* 1992;6(6):237–45.
3. Hong E, Pardo EG. On the Pharmacology of 2-(1-piperaziny)quinoline. *J Pharmacol Exp Ther.* 1966;153(2):259–65.
4. Hong E, Sancilio LF, Vargas R, Pardo EG. Similarities Between the Pharmacological Actions of Quipazine and Serotonin. *Eur J Pharmacol.* 1969;6(3):274–80.
5. De la Rosa I. Estructura-actividad sobre la sensibilidad a la insulina de una serie de análogos de la Quipazina. CINVESTAV sede Sur; 2014.
6. Hong E. A Serotonergic Antihypertensive Agent. In: Singer, Ondarza, editors. *Molecular Basis of Drug Action.* North Holland: Elsevier Inc.; 1981. p. 247–52.
7. Hong E, Rión R, Vidrio H. Stimulation of Central Serotonin Receptors as a Novel Mechanism of Antihypertensive Activity. In: *Vascular Neuroeffector Mechansms: 4th International Symposium.* New York: Raven Press; 1983. p. 273–7.
8. Fernández-Guasti A, López-Rubalcava C. Evidence for the involvement of the 5-HT_{1A} receptor in the anxiolytic action of indorenate and ipsapirone. *Psychopharmacology (Berl).* 1990;101(3):354–8.
9. Fernández-Guasti A, Escalante A, Hong E, Agmo A. Behavioural actions of the serotonergic anxiolytic indorenate. *Pharmacol Biochem Behav.* 1990;37(1):83–8.
10. Miranda F, Hong E, Sanchez H, Velazquez-Martinez DN. Further evidence that the discriminative stimulus properties of indorenate are mediated by 5-HT_{1A/1B/2C} receptors. *Pharmacol Biochem Behav.* 2003;74(2):371–80.
11. Benítez-King G, Chavéz J, Martínez I, Antón-Tay F, Hong E. Further evidence that indorenate is a 5-HT₁ agonist. *Proc West Pharmacol Soc.* 1991;34:433–7.
12. Medina J. Participación de los receptores serotoninérgicos 5-HT₂ en la sensibilidad de la insulina. CINVESTAV sede Sur; 2012.
13. Silva A. Efecto antihiper glucemiante e hipoglucemiante de un análogo de la serotonina en ratas Wistar Kyoto alimentadas con fructosa. CINVESTAV sede Sur; 2015.
14. Hong E, Schut EN. TR-2515. *Drugs Future.* 1985;10(11):929–30.

15. Van Nueten JM, Janssen PAJ, Van Beek J, Xhonneux R, Verbeuren TJ, Vanhoutte PM. Vascular Effects of Ketanserin (R 41 468), A novel Antagonist of 5-HT₂ Serotonergic Receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1981;218(1):217–30.
16. Kingma R, Jan GS, TenVoorde BJ, Wesseling KH, De Lange JJ. Effects of Ketanserin on Heart Rate and Blood Pressure Variability: Implications for the Effect on the Baroreflex Mechanisms. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1995;26(3):445–52.
17. Centurion D, Ortiz MI, Saxena PR, Villalon CM. The atypical 5-HT₂ receptor mediating tachycardia in pithed rats : pharmacological correlation with the 5-HT_{2A} receptor subtype. *Br J Pharmacol.* 2002;135(6):1531–9.
18. Hong E, Rion R, Rojas G. Mechanism of the Antihypertensive Effect of TR2515, a Potent Serotonin Antagonist. *Proc West Pharmacol Soc.* 1984;27:1–4.
19. Connor HE, Feniuk W, Humphrey PPA. Characterization of 5-HT receptors mediating contraction of canine and primate basilar artery by use of GR43175, a selective 5-HT₁-like receptor agonist. *Br J Pharmacol.* 1989;96(2):379–87.
20. Parsons AA, Whalley ET, Feniuk W, Connor HE, Humphrey PPA. 5-HT₁-like receptors mediated 5-hydroxytryptamine-induced contraction of human isolated basilar artery. *Br J Pharmacol.* 1989;96:434–49.
21. Parsons AA, Whalley ET. Evidence for the presence of 5-HT₁-like receptors in rabbit isolated basilar arteries. *Eur J Pharmacol.* 1989;174(2–3):189–96.
22. Choppin A, O'Connor SE. Presence of vasoconstrictor 5HT₁???like receptors revealed by precontraction of rabbit isolated mesenteric artery. *Br J Pharmacol.* 1995;114(2):309–14.
23. Parsons AA, Stutchbury C, Raval P, Kaumann AJ. Sumatriptan contracts large coronary arteries of beagle dogs through 5-HT₁-like receptors. *NaunynSchmiedebergs Arch Pharmacol [Internet].* 1992;346:592–6. Available from: <http://springerlink.metapress.com/openurl.asp?genre=article&id=doi:10.1007/BF00169200>
24. Forster EA, Cliffe IA, Bill DJ, Dover GM, Jones D, Reilly Y, et al. A pharmacological profile of the selective silent 5-HT_{1A} receptor antagonist, WAY-100635. *Eur J Pharmacol.* 1995;281(1):81–8.
25. Pappano AJ, Gil Wier W, Pappano AJ, Gil Wier W. The Peripheral Circulation and its Control. In: *Cardiovascular Physiology.* 10^a. Philadelphia: Elsevier Mosby; 2013. p. 171–94.
26. Aaronson P, Ward J, Wiener C, Schulman S, Gill J. *The Cardiovascular System at a Glance.* Oxford: Blackwell Science; 1999. 1-126 p.
27. Hill JA, Olson EN. An *53* Introduction to Muscle. In: *Muscle:*

- Fundamental Biology and Mechanisms of Disease [Internet]. First Edit. Elsevier Inc.; 2012. p. 1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-381510-1.00001-6>
28. Wirth A, Offermanns S. G-protein-coupled receptors in smooth muscle [Internet]. First Edit. Vol. 2, Muscle. Elsevier Inc.; 2012. 1145-1153 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-381510-1.00085-5>
 29. Thakali KM, Pathan AR, Kharade S V., Rusch NJ. Potassium, sodium, and chloride channels in smooth muscle cells [Internet]. First Edit. Vol. 2, Muscle. Elsevier Inc.; 2012. 1133-1143 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-381510-1.00084-3>
 30. Pithadia AB, Jain SM. 5-Hydroxytryptamine Receptor Subtypes and their Modulators with Therapeutic Potentials. J Clin Med Res [Internet]. 2009;1(2):72–80. Available from: <http://www.jocmr.org/index.php/JOCMR/article/view/61>
 31. Watts SW, Morrison SF, Davis RP, Barman SM. Serotonin and blood pressure regulation. Pharmacol Rev [Internet]. 2012;64(2):359–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22407614>
 32. Hoffman BJ. Molecular Biology of Serotonin Uptake Sites. In: Vanhoutte P, Saxena P, Paoletti R, Brunello N, Jackson A, editors. Serotonin from Cell Biology to Pharmacology and Therapeutics. Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 1993. p. 9–10.
 33. Kroeze WK, Roth BL. Molecular Biology and Genomic Organization of G-Protein-Coupled Serotonin Receptors. In: Roth BL, editor. The Serotonin Receptors. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2006. p. 1–41.
 34. Sánchez-López A, Centurión D, Lozano-Cuenca J, Muñoz-Islas E, Cobos-Puc LE, Villalón Herrera CM. Receptores de la serotonina que inhiben el tono simpático vasopresor en la rata descerebrada y desmedulada. Arch Cardiol Mex. 2009;79(Suppl 2):83–94.
 35. Brunton L, Chabner B, Knollman B. Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la Terapéutica. 12^a. México: McGraw-Hill Inc.; 2012. 1-2035 p.
 36. Cornfield LJ, Nelson DL. Biochemistry of 5-Hydroxytryptamine Receptor Subtypes: Coupling to Second Messenger Systems. In: Peroutka SJ, editor. Serotonin Receptors Subtypes. New York: Wiley-Liss Inc; 1991. p. 81–102.
 37. De Vivo M, Maayani S. 5-HT Receptors Coupled to Adenylate Cyclase. In: Sanders-Bush E, editor. The Serotonin Receptors. United States of America: The Humana Press; 1988. p. 160–4.
 38. Rang H, Ritter J, Flower R, Henderson G. Farmacología. 8^a. Barcelona, España: Elsevier; 2016. 1-724 p.
 39. Wolfensohn S, Lloyd M. Handbook of laboratory animal management and

welfare. Second. Oxford: Blackwell, Science; 1998.

40. Antunes LC, Elkfury JL, Jornada MN, Foletto KC, Bertoluci MC. Validation of HOMA-IR in a model of insulin-resistance induced by a high-fat diet in Wistar rats. *Arch Endocrinol Metab* [Internet]. 2016;60(2):138–42. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2359-39972016000200138&lng=en&tlng=en
41. Wang Z, Yang Y, Xiang X, Zhu Y, Men J, He M. Estimation of the normal range of blood glucose in rats. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2010;39(2):133–7,142.
42. Saha JK, Xia J, Grondin JM, Jakubowski JA. Acute Hyperglycemia Induced by Ketamine/Xylazine Anesthesia in Rats: Mechanisms and Implications for Preclinical Models. *Exp Biol Med*. 2005;230(10):777–84.
43. Shipley R, Tilden JH. A Pithed Rat Preparation Suitable for Assaying Pressor Substances. *Pro Soc Exp Biol Med*. 2016;64(4):453–5.
44. Shin Y, Svinareff P, Schmitt-Jubeau H, Schmitt H. Effects of Quipazine on Blood Pressure in Pithed Rats. *Arch int Pharmacodyn Ther*. 1983;264(1):73–81.
45. Vayssettes-Courchay C, Bouysset F, Verbeuren TJ, Laubie M, Schmitt H. Quipazine-induced hypertension in anaesthetized cats is mediated by central and peripheral 5-HT₂ receptors: role of the ventrolateral pressor area. *Eur J Pharmacol*. 1991;192(3):389–95.
46. Zink MH, Pergola PE, Doane JF, Sved AF, Alper RH. Quipazine Increases Renin Release by a Peripheral Hemodynamic Mechanism. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1990;15(1):1–9.
47. Alper RH, Snider JM. Activation of serotonin₂ (5-HT₂) receptors by quipazine increases arterial pressure and renin secretion in conscious rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 1987;243(3):829–33.
48. Vayssettes-Courchay C, Bouysset F, Verbeuren TJ, Schmitt H, Laubie M. Cardiovascular effects of microinjections of quipazine into nuclei of the medulla oblongata in anaesthetized cats: comparison with L-glutamate. *Eur J Pharmacol*. 1992;211(2):243–50.
49. Pérez-Alvarez V, Morales-Ríos MS, Hong E, Joseph-Nathan P. Synthesis of 3-Amino-2-(3-indolyl)propanol and propanoate derivatives and preliminary cardiovascular evaluation in rats. *J Pharm Pharmacol*. 1997;49(3):246–52.
50. Huape-Arreola M, Herrera- Abarca J, Ruiz-Vega H, Hong E. Clinical safety and effectiveness of indorenate in essential hypertension. In: *Proc West Pharmacol Soc*. 2002. p. 197–8.
51. Centurion D, Glusa E, A S-L, Valdivia LF, Saxena PR, Villalo CM. 5-HT₇, but not 5-HT_{2B}, receptors mediate hypotension in vagosympathectomized rats. *Eur J Pharmacol*. 2004;502(3):239–42.
52. Göthert M, Schlicker E. Classification of Serotonin Receptors.

- J Cardiovasc Pharmacol. 1987;10(Suppl 3):S3–7.
53. Villalobos-Molina R, Castillo C, Hong E. Pelanserin Inhibition of Serotonin-Induced Phosphatidylinositol Turnover and Contraction in Rabbit Aorta. *Drug Dev Res.* 1991;23(3):281–7.
 54. Pérez-Alvarez V, Bobadilla R, Hong E. Direct effects of new indorenate analogs on blood pressure of pithed rats. *Proc West Pharmacol Soc.* 1998;41:95–7.
 55. Castillo C, Bobadilla R, Ibarra M, Castillo E, Hong E. A Comparative Study of the Effects of Some 5-HT_{1A} Receptor Agonists on the Blood Pressure of Pithed Rats. *Arch Med Res.* 1995;26(3):251–5.
 56. Vanhoutte PM, Cohen RA. The elusory role of serotonin in vascular function and disease. *Biochem Pharmacol.* 1983;32(24):3671–4.
 57. Dabiré H, Cherqui C, Fournier B, Schmitt H. Vascular postsynaptic effects of some 5-HT₁-like receptor agonists in the pithed rat. *Eur J Pharmacol.* 1988;150(1–2):143–8.
 58. Villalobos-Molina R, López-Guerrero JJ, Gallardo-Ortíz IA, Ibarra M. Evidence that the hypotensive effect of WAY 100635, a 5-HT_{1A} receptor antagonist, is related to vascular α ₁-adrenoceptor blockade in the adult rat. *Auton Autacoid Pharmacol.* 2002;22(3):171–6.
 59. Yang CF, Yu-Chih Chen M, Chen TI, Cheng CF. Dose-dependent effects of isoflurane on cardiovascular function in rats. *Tzu Chi Med J* [Internet]. 2014;26(3):119–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcmj.2014.07.005>
 60. Lynch C. Differential Depression of Myocardial Contractility by Halothane and Isoflurane In Vitro. *Anesthesiology.* 1986;64(5):620–31.
 61. Camara AK, Begic Z, Kwok W-M, Bosnjak ZJ. Differential modulation of the cardiac L- and T-type calcium channel currents by isoflurane. *Anesthesiology* [Internet]. 2001;95(2):515–24. Available from: http://journals.lww.com/anesthesiology/Abstract/2001/08000/Differential_Modulation_of_the_Cardiac_L__and.38.aspx%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11506128
 62. Suzuki A, Aizawa K, Gassmayr S, Bosnjak ZJ, Kwok W-M. Biphasic Effects of Isoflurane on the Cardiac Action Potential. *Anesthesiology* [Internet]. 2002;97(5):1209–17. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00000542-200211000-00026>
 63. Weigt HU, Kwok W-M, Rehmert GC, Turner LA, Bosnjak ZJ. Voltage-Dependent Effects of Volatile Anesthetics on Cardiac Sodium Current. *Anesth Analg.* 1997;84(2):1507–16.
 64. Kuroda M, Yoshikawa D, Koizuka S, Nishikawa K, Saito S, Goto F. The effects of isoflurane on *56* adrenomedullin-induced

haemodynamic responses in pithed rats. Eur J Anaesthesiol. 2008;25(7):544–9.

65. Hong E, Nava-Félix P. On the central mechanism of action of 5-methoxytryptamine, β - methylcarboxylato (TR3369) a new antihypertensive agent. In: 7th International Congress of Pharmacology. Paris, France; 1978. p. 977.
66. Antonaccio MJ, Kerwin L. On the effects and mechanism of action of the antihypertensive agent TR3369 (5 - metoxytryptamine β - methylcarboxylate) in spontaneously hypertensive rats. J Cardiovasc Pharmacol. 1981;3(6):1306–11.