



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**SEDE SUR
DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA**

**“Análisis farmacológico de la inhibición producida por la
oxitocina sobre las respuestas vasodepresoras por
estimulación del tono sensorial perivascular CGRPérgico en
la rata descerebrada y desmedulada”**

T E S I S

Que presenta:

Med. Cir. Amairani Ruiz Díaz

Para obtener el Grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS EN
NEUROFARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA EXPERIMENTAL**

Directores de Tesis:

Dr. Carlos Miguel Villalón Herrera

Dr. Abimael González Hernández

Este proyecto fue desarrollado en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Sede Sur, en el laboratorio 5 de Farmacología cardiovascular del departamento de Farmacobiología, bajo la dirección del Dr. Carlos Miguel Villalón Herrera y el Dr. Abimael González Hernández.

Este proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, a través de la beca del programa 000294-Maestría en Neurofarmacología y Terapéutica Experimental, registrada con el número de CVU 781259.

AGRADECIMIENTOS

No hay palabras suficientes para expresar todo mi agradecimiento a quienes confiaron en mí y me acompañaron a lo largo de este proceso de formación. Siempre tuve apoyo por parte de mis profesores y seres queridos, incluso en los momentos adversos.

Antes que nada, quiero agradecer al Dr. Carlos Miguel Villalón Herrera, quien me brindó su apoyo y confianza en los momentos más difíciles, al aceptarme como parte del laboratorio 5 me permitió recuperar la seguridad en mí misma y tener una nueva visión durante mi proceso de formación. También quiero agradecer al Dr. Abimael González Hernández por sus enseñanzas, tiempo y paciencia. Al Dr. José Antonio Arias Montaña y al Dr. Emilio Javier Galván Espinosa quienes formaron parte de mi sínodo, siendo parte fundamental en el desarrollo de este proyecto y en mi formación académica. Así mismo, quiero agradecer al Dr. Emilio Galván que durante su gestión como coordinador de maestría me brindó su apoyo en todo momento. Al laboratorio 5 por todas sus enseñanzas y apoyo durante este proyecto. Sin ellos el desarrollo de este trabajo no habría sido posible.

También quiero agradecer a mi mamá Araceli porque siempre confió en mí y me brindó su apoyo de manera incondicional en todas las etapas de mi formación, siempre impulsándome a seguir adelante e inspirándome día a día con su ejemplo. A Camilo quien siempre tuvo la disposición de ayudarme y orientarme en todo momento. A Romelia Martínez, mis hermanos y mi papá, quienes siempre me brindaron seguridad y apoyo emocional.

A mis profesores, cuyas enseñanzas aportaron conocimiento invaluable durante mi formación de maestría. Por último, agradezco a mis compañeros de maestría y doctorado, quienes siempre estuvieron de manera incondicional durante los momentos difíciles.

ÍNDICE

RESUMEN	9
ABSTRACT.....	10
ABREVIATURAS.....	11
MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL.....	12
1.1 Sistema Nervioso Autónomo.....	12
1.2 Reflejo barorreceptor	15
1.3 Neurotransmisión no adrenérgica, no colinérgica	17
PÉPTIDO RELACIONADO AL GEN DE LA CALCITONINA (CGRP).....	19
2.1 Generalidades.....	19
2.2 Receptor de CGRP	20
2.3 Regulación del tono vascular	22
2.4 Implicaciones terapéuticas	25
2.5 Regulación de la liberación de CGRP.....	26
OXITOCINA	28
3.1 Generalidades.....	28
3.2 Receptor a oxitocina OTR y vasopresina V_{1A} (V_{1AR})	30
UBICACIÓN DEL PROYECTO.....	33
4.1 Justificación	33
4.2 Hipótesis	33
OBJETIVOS.....	34
5.1 Objetivo general	34

5.2	Objetivos particulares.....	34
MATERIALES Y MÉTODOS.....		35
6.1	Respuestas vasodepresoras en ratas descerebradas y desmeduladas.....	35
6.1.1	Procedimiento general.....	35
6.1.2	Protocolo experimental.....	37
6.1.3	Protocolo experimental para determinar respuestas vasodepresoras CGRPérgicas inducidas eléctricamente bajo la administración de infusiones i.v. continuas de metoxamina. 37	
6.1.4	Efecto de la administración de bolos i.v. de oxitocina sobre la presión arterial sistémica.....	38
6.1.5	Efecto de la administración i.v. de los antagonistas L-368,899 o SR 49059 sobre las respuestas inducidas por la administración de bolos i.v de oxitocina	38
6.1.6	Efecto de la infusión i.v. continua de oxitocina sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación del tono sensorial perivascular CGRPérgico.....	38
6.1.7	Efecto <i>per se</i> de la administración i.v. de los antagonistas L-368,899 o SR 49059 sobre las respuestas vasodepresoras inducidas eléctricamente.....	39
6.1.8	Efecto de la administración i.v. de los antagonistas L-368,899 o SR 49059 sobre las respuestas vasodepresoras inducidas eléctricamente bajo una infusión continua de oxitocina	39
6.1.9	Efecto de la infusión continua de oxitocina sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por α -CGRP exógeno.....	40
6.2	Fármacos.....	41
6.3	Análisis estadístico	41
RESULTADOS.....		42
7.1	Variables hemodinámicas	42

7.2 Efecto de la administración de bolos i.v. de oxitocina sobre la presión arterial sistémica en presencia de L-368,899 y SR 49059	.43
7.3 Respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación eléctrica del tono sensorial CGRPérgico o por la administración de bolos i.v. de α -CGRP45
7.4 Efecto de la infusión continua de oxitocina sobre las respuestas vasodepresoras, inducidas por estimulación eléctrica del tono sensorial CGRPérgico48
7.5 Efecto de la infusión continua de oxitocina sobre las respuestas vasodepresoras, inducidas por administración de bolos i.v. de α -CGRP51
7.6 Efecto <i>per se</i> de la administración de antagonistas L-368,899 y SR 49059 sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación del tono sensorial CGRPérgico52
7.7 Efecto inhibitor de la infusión continua con oxitocina sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación del tono sensorial CGRPérgico en presencia de los antagonistas L-368899 y SR 4905954
DISCUSIÓN57
8.1 General57
8.2 Efectos hemodinámicos sistémicos producidos por la administración de bolos i.v. de oxitocina58
8.3 Efecto inhibitor de la infusión continua de oxitocina sobre las respuestas vasodepresoras, inducidas por estimulación eléctrica del tono sensorial CGRPérgico o la administración de bolos i.v. de α -CGRP59
8.4 Efecto inhibitor de la infusión continua de oxitocina sobre las respuestas vasodepresoras, inducidas por estimulación eléctrica del tono sensorial CGRPérgico en presencia de los antagonistas al OTR (L-368,899) o al V _{1A} R (SR 49059)61
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS63
REFERENCIAS64

RESUMEN

El péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP) es un potente vasodilatador que se localiza de manera abundante en fibras sensoriales A δ y C. Existen diversos mecanismos que se encargan de la modulación de la liberación de CGRP, incluyendo la presencia de heterorreceptores en las fibras sensoriales. Estudios recientes sobre la fisiopatología de la migraña sugieren que la oxitocina inhibe la liberación de CGRP; sin embargo, este efecto no ha sido estudiado a nivel de la vasculatura sistémica. En este estudio, usando ratas descerebradas y desmeduladas se analizó el perfil farmacológico de infusiones i.v. continuas de oxitocina sobre: i) las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación eléctrica (0.56-5.6 Hz) selectiva del tono sensorial CGRPérgico en la médula espinal (a nivel de T₉-T₁₂); o ii) mediante la administración de bolos i.v. de α -CGRP (0.1-1 μ g/kg). La oxitocina (0.1-10 μ g/kg.min) inhibió de forma dependiente de la dosis las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación eléctrica. De igual forma, la oxitocina mostró una tendencia a inhibir las respuestas vasodepresoras inducidas por la administración de bolos i.v. de α -CGRP, lo cual sugiere que el efecto inhibitor de la oxitocina puede tener un efecto dual a nivel preunional y a nivel vascular. Adicionalmente, se evaluó el efecto inhibitor de la oxitocina sobre las respuestas vasodepresoras CGRPérgicas en presencia del: i) L-368,899, un antagonista selectivo del receptor a oxitocina (OTR); o ii) SR 49059, un antagonista selectivo del receptor a vasopresina V_{1A} (V_{1AR}). El efecto inhibitor sensorial inducido por la oxitocina, el cual se mantuvo sin cambios significativos después de la administración del L-368,899, fue revertido después de la administración del SR 49059. Estos datos sugieren que el efecto inhibitor de la oxitocina sobre las respuestas vasodepresoras de origen sensorial está mediado por el V_{1AR}. Sin descartar la posibilidad de que otros receptores estén involucrados en su efecto inhibitor sobre las respuestas sensoriales vasodepresoras CGRPérgicas.

ABSTRACT

Calcitonin gene-related peptide (CGRP) is a potent vasodilator that is found abundantly in A δ and C sensory fibers. There are many mechanisms that are responsible for the modulation of CGRP release, including the presence of heteroreceptors in sensory fibers that inhibit the CGRP release. Recent studies have linked the inhibitory effect of oxytocin on CGRP release with the pathophysiology of migraine; however, this effect has not been studied on the systemic vasculature. In this study, the pharmacological profile of oxytocin administered as a continuous infusion was analyzed on the vasodepressor responses induced by selective electrical stimulation (0.56-5.6 Hz) of the CGRPergic sensory vascular tone (at the level of the spinal T₉-T₁₂ segments) or by the i.v. administration of α -CGRP (0.1-1 μ g/kg) in the pithed rat model. The administration of different doses of continuous infusions of oxytocin (0.1-10 μ g/kg.min) produced a dose-dependent inhibitory effect of the vasodepressor responses induced by electrical stimulation. Oxytocin also produced (particularly at higher doses) an inhibitory effect on the vasodepressor responses induced by exogenous α -CGRP. This finding suggests that the inhibitory effect of oxytocin may involve a dual effect at the prejunctional and vascular levels. Additionally, the inhibitory effect of oxytocin on the sensory CGRPergic vasodepressor responses was evaluated in the presence of: i) a selective antagonist of the oxytocin receptor (L-368,899); or ii) a selective antagonist of the V_{1A} vasopressin receptor (SR 49059). The inhibitory effect induced by oxytocin, which remained practically unchanged after administration of L-368,899, was reversed after administration of SR 49059. These data, taken together, suggest that the inhibitory effect of oxytocin on the vasodepressor sensory responses is mainly mediated by the vasopressin V_{1A} receptor. However, we cannot discard the possibility that other receptors are also involved in this inhibitory effect on the CGRPergic sensory outflow.

ABREVIATURAS

5-HT: Serotonina	NPY: Neuropeptido Y
ACh: Acetilcolina	NTS: Núcleo del tracto solitario
AMPc: Adenosín monofosfato cíclico	OTR: Receptor a oxitocina
ATP: Adenosín trifosfato	PAN: Péptido atrial natriurético
C6: Hexametonio	PGs: Prostaglandinas
CGRP: Péptido relacionado al gen de la calcitonina	PKA: Proteína cinasa A
CRL: Receptor similar al receptor a calcitonina	PKC: Proteína cinasa C
CTR: Receptor a calcitonina	RAMP1: Proteína modificadora de la actividad del receptor 1
CVLM: Médula caudal ventrolateral	RCP: Proteína componente delreceptor
DAG: Diacilglicerol	RVLM: Médula rostro ventrolateral
GMPc: Guanosín monofosfato cíclico	SNA: Sistema nervioso autónomo
IP₃: Inositol trifosfato	SNC: Sistema nervioso central
NA: Noradrenalina	SP: Sustancia P
NANC: No adrenérgica, no colinérgica	TRPV1: Receptor de potencialtransitorio vaniloide 1
NOS: Sintasa del óxido nítrico	V_{1A}R: Receptor a vasopresina V _{1A}
NO: Óxido nítrico	VIP: Péptido intestinal vasoactivo
	VPAC1: Receptor del péptido intestinal vasoactivo 1

CAPÍTULO 1

MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL

1.1 Sistema Nervioso Autónomo

El sistema cardiovascular está encargado de mantener la homeostasis en el organismo, la cual se puede definir cómo el mantenimiento de las propiedades físicas y químicas del líquido extracelular en todos los tejidos (Dampney, 2016). Para mantener esta homeostasis existen diversos mecanismos locales y neurológicos que permiten conservar una presión arterial adecuada.

La presión arterial está regulada por el gasto cardíaco y la resistencia vascular periférica, la cual es mediada por mecanismos endócrinos, autonómicos y locales (Guyton y Hall, 2011). En condiciones homeostáticas, el sistema nervioso autónomo (SNA) a través de sus componentes simpáticos y parasimpáticos se encarga de regular la función cardiovascular, mantener la homeostasis del organismo y efectuarlas respuestas de adaptación ante cambios en el ambiente externo e interno. En este sentido, el SNA se activa en regiones localizadas en la médula espinal, tallo cerebral y el hipotálamo modulando la actividad cardiovascular a través de las ramas autonómicas simpática y parasimpática. Sin embargo, su activación también depende de señales sensitivas, enviando aferencias hacia los ganglios autonómicos, tallo cerebral o hipotálamo; provocando una respuesta refleja hacia dicho estímulo (Guyton y Hall, 2011).

El sistema nervioso parasimpático (SPN) se deriva de los pares craneales III, VII, IX y X. El décimo par craneal (nervio vago) representa el 75% de la inervación parasimpática, siendo el encargado de la inervación cardíaca, a través de las fibras nerviosas que inervan el nodo sinoauricular y el nodo auriculoventricular (Figura 1 y 2). Las neuronas preganglionares del SNP tienen su origen en el sistema nervioso central (SNC), liberan acetilcolina (ACh) (Figura 3) e inducen disminución de la frecuencia cardíaca a través de la estimulación de los receptores muscarínicos M₂ (Douglas et al., 2019).

SISTEMA NERVIOSO AUTÓNOMO

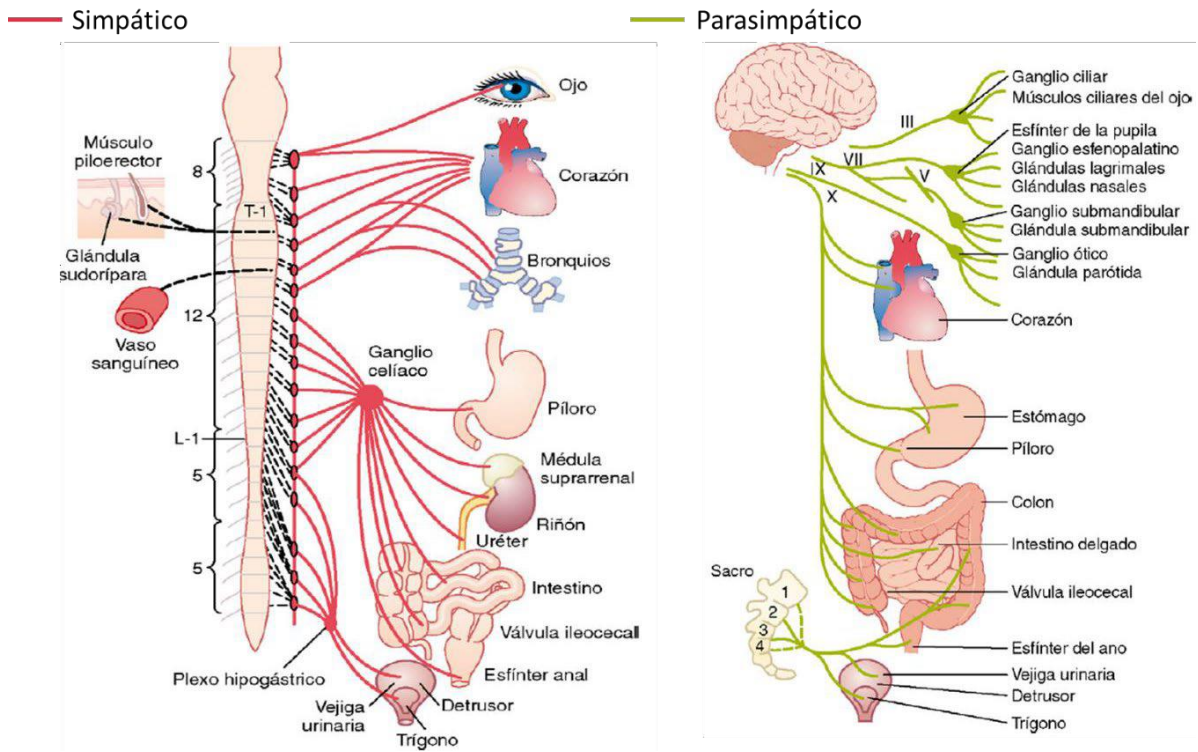


Figura 1. Esquema representativo de la división del sistema nervioso autónomo. Las líneas rojas representan la inervación simpática cuya neurona preganglionar se encuentra a nivel tóraco-lumbar y la neurona postganglionar se sitúa en la cadena ganglionar paravertebral. Las líneas verdes representan la división parasimpática cuya neurona preganglionar se encuentra a nivel cráneo-sacro y la neurona postganglionar se ubica en el órgano efector (Modificado de Guyton y Hall, 2011).

Por otro lado, el sistema nervioso simpático (SNS) tiene su origen a nivel tóraco-lumbar, entre los segmentos medulares T₁ a L₂ (Figura 1). Las neuronas preganglionares se localizan en el asta intermedio lateral, la cual proyecta sus axones hacia los ganglios de la cadena simpática paravertebral liberando ACh (Figura 3). Este neurotransmisor estimula a las neuronas postganglionares localizadas en la cadena simpática. Los axones de las neuronas postganglionares, inervan a los órganos efectores donde liberarán principalmente noradrenalina (NA), (excepto en glándulas sudoríparas y músculo piloerector, donde liberan ACh). El SNS está encargado de la inervación tanto del corazón como de los vasos

sanguíneos (Figura 2A). La estimulación simpática a nivel cardíaco aumenta la frecuencia cardíaca y la fuerza de contracción.

La liberación de NA de la neurona posganglionar simpática estimula a los receptores β_1 -adrenérgicos generando aumento en la fuerza y en la velocidad de contracción y de relajación (Duglas et al., 2019). Por otro lado, la estimulación de los receptores α_1 -adrenérgicos localizados en el músculo liso vascular aumenta la resistencia vascular periférica, incrementando la presión arterial (Figura 2B).

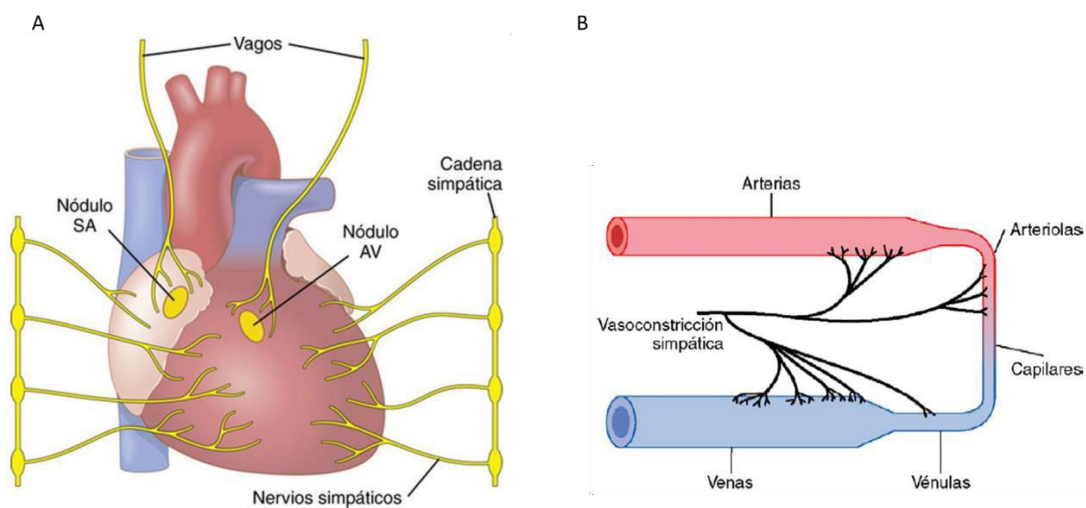


Figura 2. Inervación autónoma del sistema cardiovascular. A. Inervación cardíaca simpática y parasimpática (nervio vago). B. Inervación simpática de los vasos sanguíneos, la cual genera vasoconstricción, los vasos sanguíneos de resistencia carecen de inervación parasimpática (Modificado de Guyton y Hall, 2011).

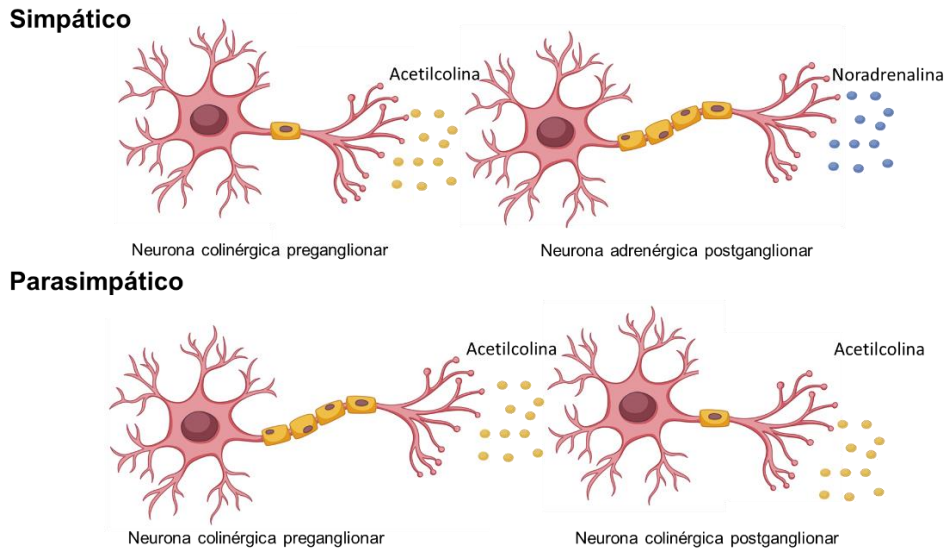


Figura 3. Liberación de neurotransmisores de las neuronas pre y postganglionares, del sistema nervioso simpático y parasimpático.

1.2 Reflejo barorreceptor

Este mecanismo participa de manera central en el control de la frecuencia cardíaca y regulación de la presión arterial. Las fibras aferentes primarias de los barorreceptores se localizan en el seno carotídeo y el arco aórtico. Estas fibras se proyectan al nervio glossofaríngeo (IX par craneal) y al nervio vago (X par craneal), terminando en el núcleo del tracto solitario en la región rostromedial del bulbo raquídeo (Figura 4). Las neuronas del núcleo del tracto solitario tienen una proyección glutamatérgica hacia las motoneuronas vagales cardíacas en el núcleo ambiguo (NA) y a las interneuronas del área caudal ventrolateral (CVLM por sus siglas en inglés) del bulbo. Las neuronas del CVLM, a través de interneuronas GABAérgicas, inhiben a las neuronas simpáticas del área rostro ventrolateral (RVLM por sus siglas en inglés). El circuito aquí descrito posee actividad tónica dependiente de la activación de los barorreceptores, la cual es indispensable para el mantenimiento del tono simpático vasomotor y de la presión arterial, incluso en estados de reposo (Dampney, 2016; Stauss, 2002).

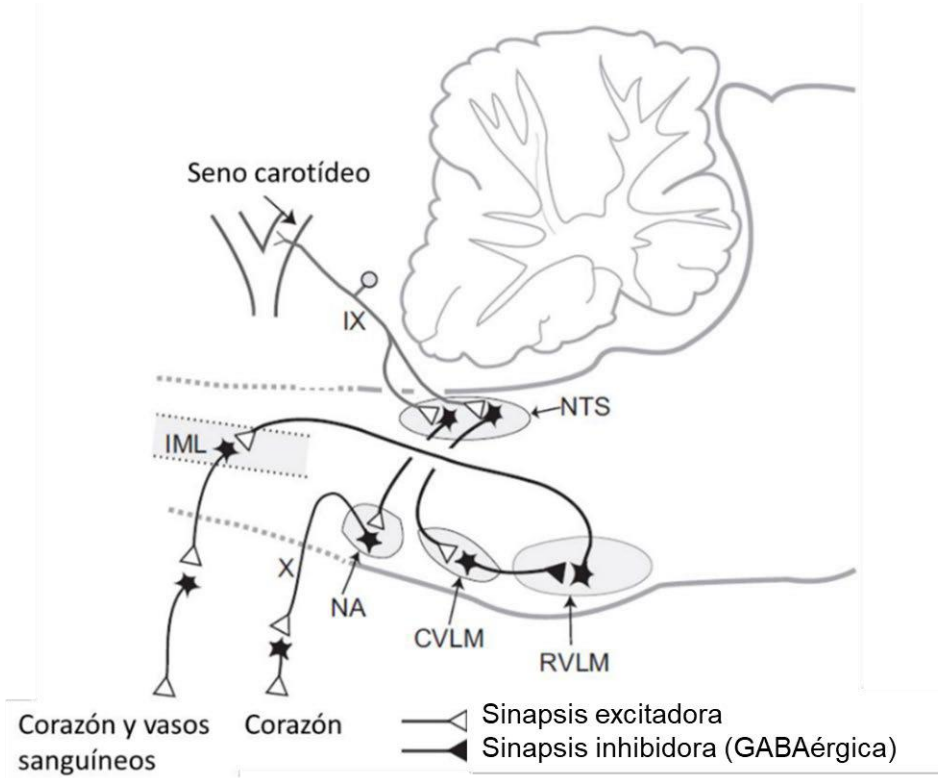


Figura 4. Esquema de la vía de transmisión del reflejo barorreceptor a nivel de tallo cerebral, el cual tiene control del tono simpático y parasimpático del sistema cardiovascular. NTS, núcleo del tracto solitario; NA, núcleo ambiguo; CVLM, área caudal ventrolateral del bulbo raquídeo; RVLM, área rostro ventrolateral del bulbo (Modificado de Dampney, 2016).

Los barorreceptores detectan los cambios en los niveles de presión arterial. Un decremento de la presión arterial disminuye la frecuencia de disparo de las fibras aferentes de los barorreceptores, induciendo un aumento de la actividad vasomotora simpática (aumentando la resistencia vascular) y en la función cardíaca al inhibir la función de las neuronas GABAérgicas que controlan el tono simpático; mientras que a nivel parasimpático disminuye la actividad vagal, resultando en conjunto en la elevación de la presión arterial (Dampney, 2016).

Por otro lado, el aumento de la presión arterial aumenta la frecuencia de disparo de las fibras aferentes de los barorreceptores, resultando en un aumento de la transmisión GABAérgica y por lo tanto en la inhibición del tono simpático. A nivel del núcleo ambiguo, el aumento de su estimulación permite un predominio de

inervación vagal lo que disminuye la frecuencia cardiaca y la resistencia vascular para producir decrementos de los niveles de presión arterial (Figura 4) (Dampney, 2016).

Los efectos del reflejo barorreceptor se han descrito mediante la administración exógena de fármacos que modifican la presión arterial. Miki y colaboradores en 2003, describieron los efectos de los cambios de la presión arterial media sobre la actividad del nervio simpático renal y su efecto en la frecuencia cardiaca en animales. La administración de fenilefrina exógena aumentó la presión arterial media, disminuyendo la frecuencia de disparo del nervio simpático renal y por lo tanto disminución de la frecuencia cardiaca. La administración de nitroprusiato de sodio redujo la presión arterial media en los animales, aumentando la actividad del reflejo barorreceptor como mecanismo compensador (Miki et al., 2003).

1.3 Neurotransmisión no adrenérgica, no colinérgica

El sistema cardiovascular se encuentra innervado por distintos tipos de fibras nerviosas, provenientes del sistema nervioso autónomo y del sistema nervioso sensorial (neurotransmisión no adrenérgica no colinérgica). En el caso de las fibras sensoriales, las fibras C peptidérgicas y A δ tipo II han sido asociadas a la regulación de la actividad tanto cardiaca, como del tono vascular a través de la liberación de distintos neuropéptidos (Lundberg *et al.*, 1996; Rubino y Burnstock, 1996; Julius y Basbaum, 2001).

La neurotransmisión NANC involucra la liberación de una amplia variedad de neuromediadores tanto por neuronas autonómicas como por neuronas sensoriales. Aun cuando las fibras sensoriales nociceptivas A δ y C han sido asociadas de manera tradicional como fibras receptoras de estímulos, la estimulación antidrómica de estas fibras es capaz de provocar una respuesta vasodilatadora la cual no está asociada a una respuesta autonómica (Richardson y Vasko, 2002). Estas neuronas sensoriales liberan diversos neuropéptidos, los cuales son químicamente distintos, exhiben una determinada distribución en el organismo y tienen la capacidad de

estimular diversas acciones biológicas. En este sentido, se han descrito diversos neuromediadores que producen vasodilatación (Tabla 1), siendo los más importantes el péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP por sus siglas en inglés), sustancia P (SP), óxido nítrico (ON) y trifosfato de adenosina (ATP) (González-Hernández et al., 2016). De esta manera, actualmente se considera a este sistema no sólo como un sistema aferente, sino también como eferente (Brain y Cox, 2006).

Tabla 1. Neuromediadores involucrados en la transmisión no adrenérgica no colinérgica (Tomado y modificado de González-Hernández et al., 2016).

Neuromediador	Localización	Receptor	Segundos mensajeros	Respuesta funcional
CGRP Adrenomedulina Amilina	Fibras aferentes primarias	CGRP	AMPc	Vasodilatación, taquicardia
ATP	Neuronas postganglionares simpáticas	P ₂ X P ₂ Y	Ca ²⁺ IP ₃ , Ca ²⁺ ON	Contracción de músculo liso
VIP	Neuronas parasimpáticas	VPAC ₁	AMPc K ⁺	Vasodilatación broncodilatación
NPY	Neuronas postganglionares simpáticas	Y ₁ Y ₂	Ca ²⁺ AMPc	Vasoconstricción
SP	Neuronas sensoriales entéricas	NK ₁	IP ₃ Ca ²⁺	Extravasación vascular, despolarización de fibras aferentes primarias, vasodilatación
ON	Neuronas parasimpáticas	—	GMPc PGs	Vasodilatación

CGRP, péptido relacionado con el gen de la calcitonina; ATP, adenosina de trifosfato; VIP, péptido intestinal vasoactivo; NPY, neuropéptido Y; SP, sustancia P; ON, óxido nítrico.

CAPÍTULO 2

PÉPTIDO RELACIONADO AL GEN DE LA CALCITONINA (CGRP)

2.1 Generalidades

El CGRP es un potente vasodilatador que está formado por 37 aminoácidos miembro de la familia de la calcitonina, en la cual se incluyen también la calcitonina, la amilina y la adrenomedulina (Brain et al., 1985; Ramos Romero y Sobrino Mejía, 2016). Dentro de sus funciones se encuentran la regulación del sistema cardiovascular, participa como mediador de la inflamación neurogénica y modulador de los impulsos nociceptivos (Russo, 2015).

En términos generales, se han descrito dos isoformas del CGRP: α -CGRP y β -CGRP. Estas dos isoformas dependientes del cromosoma 11, son codificadas por dos genes diferentes. El α -CGRP se deriva del gen de la calcitonina CALC1, mientras que el β -CGRP está codificado por el gen CALC2. Se diferencian uno de otro por 3 aminoácidos, pero su actividad biológica parece ser la misma. El α -CGRP se encuentra principalmente en el sistema nervioso central y periférico, mientras que la isoforma β -CGRP se localiza en el sistema nervioso entérico y en la hipófisis (Brain y Grant, 2004).

El α -CGRP tiene una distribución amplia en el sistema nervioso central (SNC) y periférico (Adams et al., 1987). En el SNC, el α -CGRP se expresa altamente en la corteza cerebral, giro dentado, sustancia nigra y, en menor proporción, en la neocorteza, globo pálido, hipocampo, amígdala, tálamo, hipotálamo y ganglios simpáticos. A nivel vascular, las fibras sensoriales CGRPérgicas se encuentran en todas las capas del tejido vascular liso (Hagner et al., 2002; Tschopp et al., 1985). Los vasos sanguíneos de resistencia están ampliamente inervados por fibras sensoriales peptidérgicas que contienen CGRP y Sustancia P. El CGRP está expresado principalmente en fibras amielínicas de pequeño calibre llamadas fibras C, y en menor proporción en fibras A δ y fibras A α y A β (Figura 5).

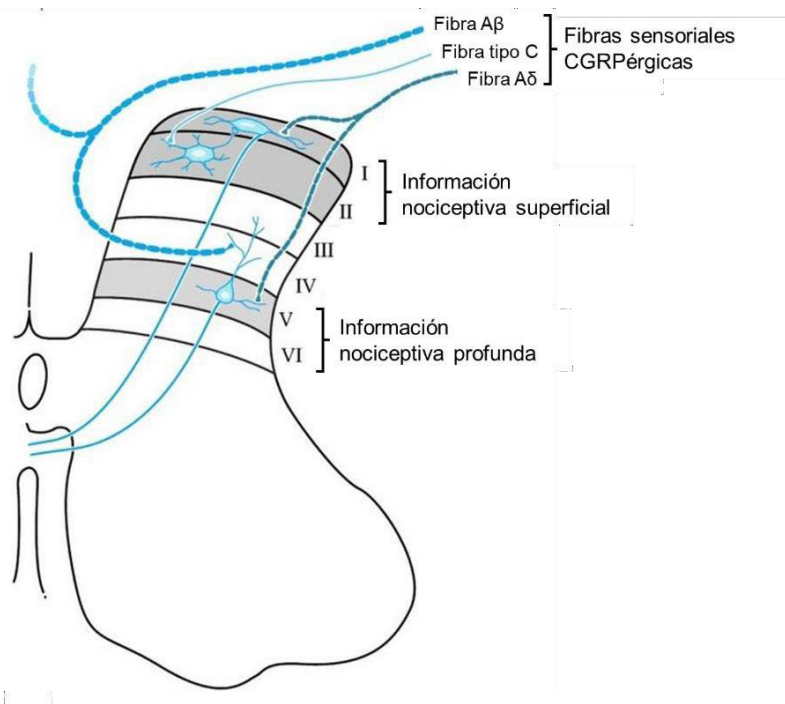


Figura 5. El CGRP está localizado en diferentes tipos de fibras aferentes primarias (Aβ, Aδ y tipo C), de manera clásica están relacionadas a la transmisión de la nocicepción superficial (placas I-II) y profunda (placas V-VI) en el asta dorsal de la médula espinal. Sin embargo, la activación de estas fibras primarias aferentes a nivel vascular promueve la vasodilatación mediante la liberación de CGRP.

2.2 Receptor al CGRP

El receptor a CGRP forma parte de los receptores acoplados a proteína G, es un receptor heteromérico que consta de tres subunidades: i) receptor similar al receptor a calcitonina (CRL, por sus siglas en inglés), ii) proteína modificadora 1 de la actividad del receptor (RAMP 1, por sus siglas en inglés) y iii) una proteína componente del receptor (RCP, por sus siglas en inglés) (Figura 6) (Russo, 2015). El CRL es un homólogo del receptor a calcitonina (CTR) y son miembros de la familia de secretina (familia B) de los receptores acoplados a proteínas G, los cuales se caracterizan por tener 7 dominios transmembranales y un dominio N-terminal extracelular de gran longitud. Por otro lado, la RAMP1 es una proteína con un solo dominio transmembranal que cuenta con un dominio N-terminal extracelular. El CGRP activa al receptor por medio de la unión de las porciones N-terminal del CRL

y RAMP1, esta unión, favorece un cambio conformacional en el receptor, lo que promueve la disociación de la subunidad α de las subunidades β/γ (McLatchie et al., 1998). La proteína componente del receptor (RCP) se encuentra en el espacio intracelular y facilita el acoplamiento de la subunidad $G_{\alpha s}$ (Ramos Romero y Sobrino Mejía, 2016).

Músculo liso vascular

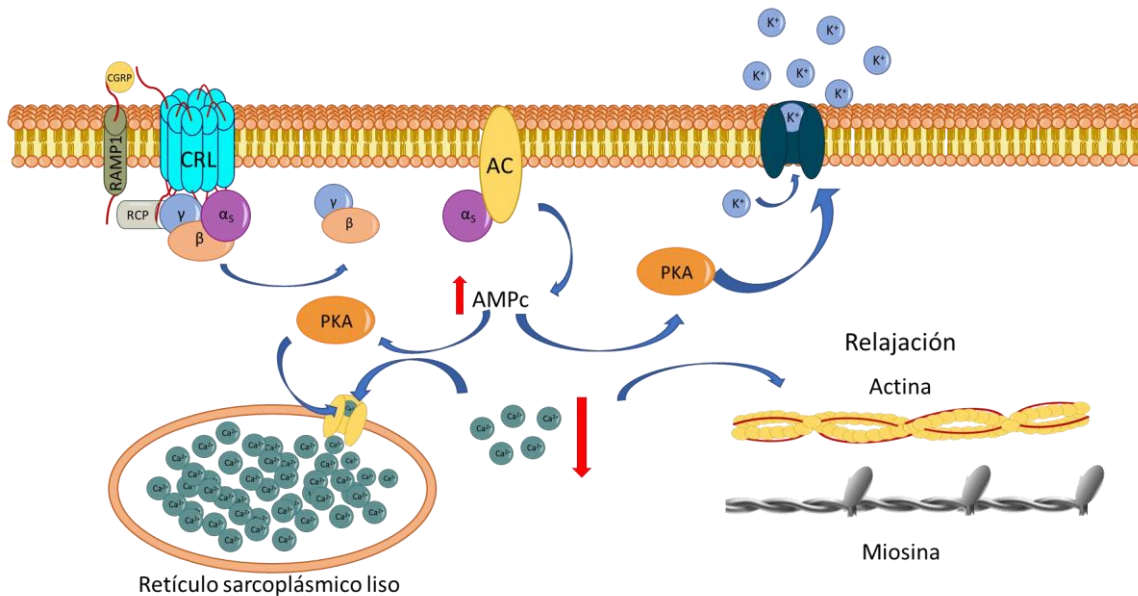


Figura 6. Receptor a CGRP y sistema transduccional. El receptor CGRPérgico está conformado por la subunidad CRL, la cual consta de 7 dominios transmembranales; la subunidad RAMP1 con 1 dominio transmembranal y la subunidad RCP. El CGRP se une en conjunto a la porción N-terminal de CRL y RAMP1 para su activación (Russo, 2015). La unión del CGRP con su receptor, promueve la activación de la adenilato ciclasa a través de la proteína $G_{\alpha s}$, esta activación promueve el aumento en la concentración de AMPc y por lo tanto, aumenta la actividad de la PKA, esta proteína fosforiladora promueve la disminución de la concentración de calcio y favorece un estado de hiperpolarización mediante la activación de canales de potasio sensibles a ATP. Estos mecanismos promueven separación de la cabeza de miosina con los filamentos de actina generando relajación del músculo liso vascular.

La respuesta que genera la unión de CGRP con su receptor acoplado a proteína G_s es el aumento del monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), y la activación de la proteína cinasa A (PKA). Los efectos vasodilatadores inducidos por la liberación de CGRP están mediados por 2 mecanismos: i) vasodilatación directa en el músculo liso vascular y ii) vasodilatación dependiente de endotelio. Ambos

mecanismos son dependientes del aumento en la actividad de la PKA. Esta proteína tiene diversos sitios de fosforilación a nivel del músculo liso vascular como los canales de potasio sensibles a ATP (Figura 6), lo que genera un estado de hiperpolarización en la membrana; activación de cinasas relacionadas a señalización extracelular (ERK) y factores de transcripción, como la proteína de unión a elementos de respuesta al AMPc (CREB) (González-Hernández et al., 2016). Estas proteínas están relacionadas con las propiedades protectoras del CGRP al atenuar la proliferación celular de músculo liso vascular, inhibición de hiperplasia y estimulación de la proliferación de células endoteliales (Li et al., 1997; Wang, Sun, y Wang, 2004). A nivel endotelial, la activación de la PKA promueve la activación de la sintasa del óxido nítrico endotelial, el aumento en la síntesis de óxido nítrico. Otros de los sitios de fosforilación es la sintasa del óxido nítrico (NOS), esta activación aumenta la síntesis de óxido nítrico, el cual difunde a través de la membrana hacia el músculo liso vascular, posteriormente el óxido nítrico aumenta las concentraciones de GMPc a través de la activación de la guanilato ciclasa. El GMPc activa los canales de potasio dependientes de ATP y, por lo tanto, induce la relajación del músculo liso vascular (Ramos Romero y Sobrino Mejía, 2016).

2.3 Regulación del tono vascular

Los vasos sanguíneos de resistencia están inervados tanto por fibras simpáticas como por nervios sensoriales, los cuales se encargan de la modulación del tono vascular mediante la contracción y relajación del músculo liso vascular. (Figura 7). Los nervios simpáticos perivasculares liberan de forma tónica noradrenalina promoviendo la vasoconstricción. Este efecto produce aumento en la presión arterial. Por otro lado, los vasos sanguíneos periféricos, también tienen inervación proveniente de nervios sensoriales e inducen vasodilatación vía la liberación de CGRP. Esta vasodilatación dependiente de fibras sensoriales puede inducirse mediante un reflejo axonal y por el reflejo del ganglio de la raíz dorsal, el cual induce una conducción antidrómica a la fibra aferente primaria (Bayliss, 1901).

El CGRP tiene diversos efectos en el sistema cardiovascular y es un vasodilatador potente. Se estima que este neuropéptido es de 100 a 1,000 veces más potente que la adenosina, SP o ACh. Como se mencionó anteriormente, el CGRP puede ser liberado por las fibras A δ y tipo C (Russell et al., 2014). En este sentido, la respuesta vasodepresora mediada por el CGRP se ha descrito en distintos modelos animales, en donde, las respuestas vasodepresoras inducidas tanto por estimulación eléctrica como por la administración exógena de CGRP son bloqueadas al administrar un antagonista CGRPérgico (*i.e.* olcegepant) (Avilés-Rosas et al., 2017).

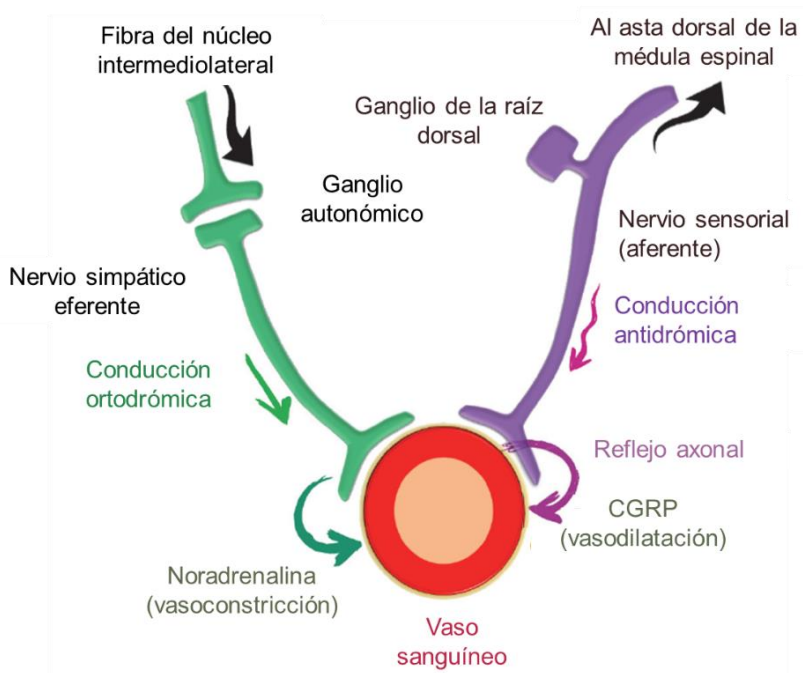


Figura 7. Los vasos sanguíneos de resistencia están inervados tanto por fibras simpáticas como por fibras sensoriales para modular la vasoconstricción y la vasodilatación, respectivamente. La liberación de CGRP puede ser mediada por el reflejo axonal o mediante conducción antidrómica al ser estimulado en nervio sensorial aferente (Tomado de González-Hernández et al., 2016).

La importancia del CGRP como un neuromediador en las respuestas vasodepresoras sensoriales fue demostrada en 1992, cuando Taguchi y colaboradores, apoyado por distintos estudios previos *in vitro* e *in situ* (Mulder et

al., 1985; Kawasaki et al., 1988; Gardiner et al., 1989; Han et al., 1990a; 1990b; Kawasaki et al., 1990b), sugieren la participación del CGRP endógeno liberado desde las fibras sensoriales sensibles a capsaicina. Dichos experimentos por Taguchi et al. (1992) demuestran que la inducción de las respuestas vasodepresoras por estimulación eléctrica de la médula espinal (T₉-T₁₂) y bloqueo ganglionar en el modelo de la rata descerebrada y desmedulada es mediada por la liberación de CGRP (Figura 8).

Estas respuestas vasodepresoras por estimulación eléctrica fueron inhibidas por la administración i.v. (infusión continua) de un antagonista selectivo del receptor al CGRP (CGRP8-37), así como por la tetrodotoxina, mas no por la administración de propranolol (antagonista β adrenérgico), atropina (antagonista muscarínico) o pirilamina más cimetidina (antagonistas de los receptores a histamina H₁ y H₂, respectivamente) (Taguchi et al., 1992). Estos datos indicaron que dichas respuestas son de carácter neurogénico, y que en este caso involucra la participación del sistema sensorial, ya que el pretratamiento con capsaicina inhibe las respuestas vasodepresoras (Taguchi et al., 1992), como había sido propuesto previamente (Fisher et al., 1983; Kawasaki et al., 1988; Kawasaki et al., 1990a; Han et al., 1990a).

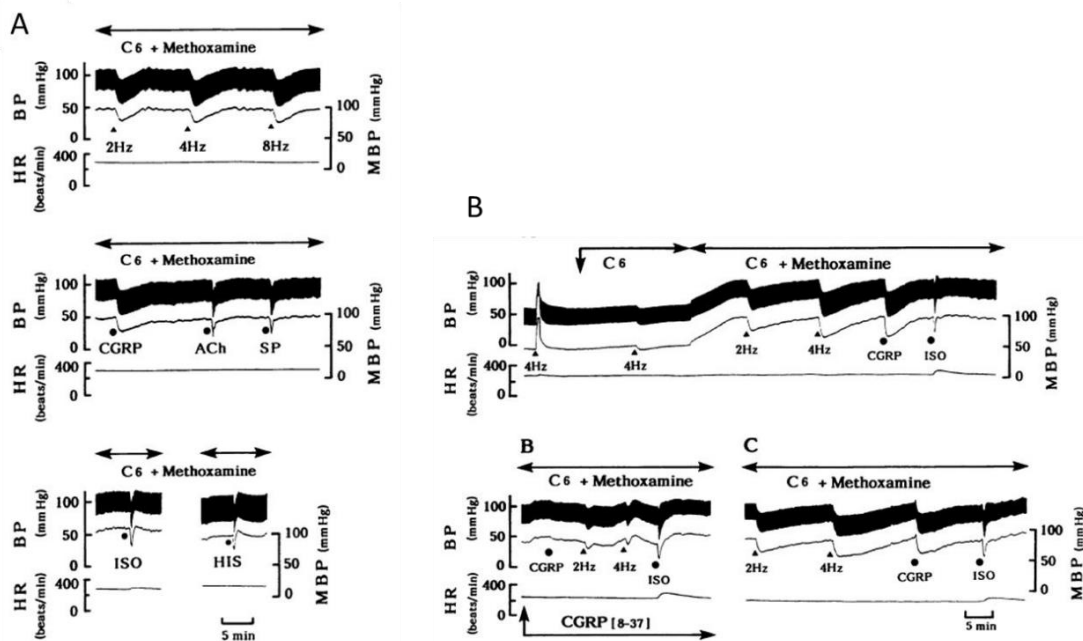


Figura 8. A. Registro de las respuestas vasodepresoras durante la estimulación eléctrica de la médula espinal y durante la administración intravenosa de diversas sustancias vasodepresoras. **B.** Registro del efecto vasodepresor durante la estimulación eléctrica de la médula espinal, en presencia de un antagonista de CGRP (CGRP8-37). ACh, acetilcolina; C6, hexametonio; CGRP, péptido relacionado al gen de la calcitonina; His, histamina; Iso, isoproterenol; SP, sustancia P (Tomado de Taguchi et al., 1992).

2.4 Implicaciones terapéuticas

Los mecanismos involucrados en las acciones vasodilatadoras del CGRP ya han sido analizados en algunas preparaciones vasculares tales como: i) las arterias coronarias (Bell y McDermott, 1996; Wimalawansa, 1996; Shen et al., 2001); ii) los vasos sanguíneos craneales (De Vries, 1999; Williamson y Hargreaves, 2001; Goadsby et al., 2002); iii) el lecho arterial carotídeo y sus anastomosis arteriovenosas (Arulmani, 2004); así como iv) en ratas descerebradas y desmeduladas (Avilés-Rosas et al., 2017; Taguchi et al., 1992; Villalón et al., 2008). En este punto, se considera que el CGRP no sólo desempeña un papel importante en la fisiopatología de la migraña (Edvinsson et al., 2002; Arulmani et al., 2004; Akerman et al., 2002), sino que también está involucrado en otras acciones en el

sistema cardiovascular, incluyendo el tejido cardiaco (Bell y McDermott, 1996; Kaygisiz et al., 2003), la vasculatura coronaria (Bell y McDermott, 1996; Hasbak et al., 2005) y la vasculatura sistémica (Wimalawansa, 1996). Por lo tanto, la identificación de los receptores que pueden modular la liberación de CGRP desde las fibras perivasculares es de interés científico (González-Hernández et al., 2016). Ciertamente los fármacos que son capaces de inhibir la vasodilatación por efectos directos sobre los vasos sanguíneos craneales (Saxena y Ferrari, 1989; Ferrari y Saxena, 1993) o capaces de interferir con la liberación de CGRP son una estrategia terapéutica para el tratamiento de la migraña (De Vries et al., 1999; Villalón et al., 2002; González-Hernández et al., 2018, 2021).

2.5 Regulación de la liberación de CGRP

Como se mencionó anteriormente, se han descrito dos isoformas del CGRP: α -CGRP y el β -CGRP. Una vez que el CGRP se sintetiza, este es almacenado en vesículas de núcleo denso, en la terminal del nervio sensorial. Cuando este nervio es estimulado, se produce una despolarización de la membrana, se acumula el calcio intracelular y se libera el CGRP. Uno de los mecanismos involucrados en la liberación de CGRP es mediante el uso de capsaicina, cuya administración, induce la activación del canal iónico TRPV1 el cual promueve la liberación de CGRP. Otro mecanismo implicado en la liberación de este péptido fue es a través del sulfuro de hidrógeno, el cual promueve la liberación de CGRP mediado por el TRPA1, en donde, se describió un aumento en el flujo sanguíneo cutáneo (Pozsgai et al., 2012).

A nivel sistémico, usando el modelo de la rata descerebrada y desmedulada, nuestro grupo de investigación ha descrito diversos receptores involucrados en la modulación de la liberación del CGRP de las fibras sensoriales que inervan la vasculatura sistémica (responsables de producir respuestas vasodepresoras). A la fecha, se sabe que la activación preunional de receptores adrenérgicos $\alpha_{2A/2C}$,

serotonérgicos 5-HT_{1B/1F}, dopaminérgicos D₃ e histaminérgicos H₃ inhiben a la neurotransmisión perivascular CGRPérgica en este modelo (Villalón et al., 2008; Lozano-Cuenca et al., 2009; González-Hernández et al., 2010, 2011, 2018, 2019; Manrique-Maldonado 2014; 2015; 2019).

Más recientemente, se ha propuesto que la oxitocina interviene en la modulación de la liberación de CGRP. Esto ha sido demostrado en diversos estudios en donde se evidencia el efecto antinociceptivo de la oxitocina. Por ejemplo, Gong y colaboradores (2015) describieron efectos antinociceptivos de la oxitocina en neuronas del ganglio de la raíz dorsal, en donde demostraron que la oxitocina promueve hiperpolarización membranar; este mecanismo ocurre por la liberación de Ca²⁺ del retículo endoplásmico liso promoviendo la activación de la sintasa de óxido nítrico y por lo tanto aumentando las concentraciones de óxido nítrico (NO). Este incremento de NO es inhibido por la administración de atosiban (antagonista del receptor OTR). El aumento de la síntesis de NO activa la vía de la guanilato ciclasa favoreciendo un incremento de las corrientes de K⁺ sensibles a la glibenclamida (bloqueador de canales de K_{ATP}). De forma similar, en estudios de liberación de CGRP inducida por capsaicina en la vasculatura meníngea, se demostró que la oxitocina inhibe la liberación de este neuropéptido (Tzabazis et al., 2016), y, por lo tanto, se ha propuesto su probable relevancia como un agente antimigrañoso (González-Hernández et al., 2021). Por otro lado, se demostró que el efecto antinociceptivo de la oxitocina también se presenta a nivel de las fibras sensoriales periféricas, en donde, la administración de oxitocina disminuye la frecuencia de disparo de las fibras sensoriales de tipo C y Aδ; dicho efecto, es revertido con la administración de un antagonista selectivo a OTR (L-368,899) (González-Hernández et al., 2017). Es importante destacar que el CGRP se encuentra en las fibras sensoriales tipo C y Aδ, y estas inervan la vasculatura sistémica; sin embargo, el efecto de la oxitocina sobre la modulación en la liberación de CGRP en la vasculatura sistémica, no ha sido descrito.

CAPÍTULO 3

OXITOCINA

3.1 Generalidades

La oxitocina es un neuropéptido de 9 aminoácidos (Figura 9). Este nonapéptido se sintetiza principalmente en las neuronas magnocelulares del núcleo supraóptico y paraventricular del hipotálamo y se almacena en vesículas de gran tamaño como un complejo oxitocina-neurofisina en los cuerpos de Herring en los axones terminales de la neurohipófisis (Figura 10). Algunas neuronas del núcleo paraventricular tienen proyecciones directas al asta dorsal de la médula espinal, así como proyecciones en el tallo cerebral dorsal, una región crucial en la regulación cardiovascular (Gutkoswska y Antunes-Rodrigues, 2014; Wiegand y Gimpl, 2012)

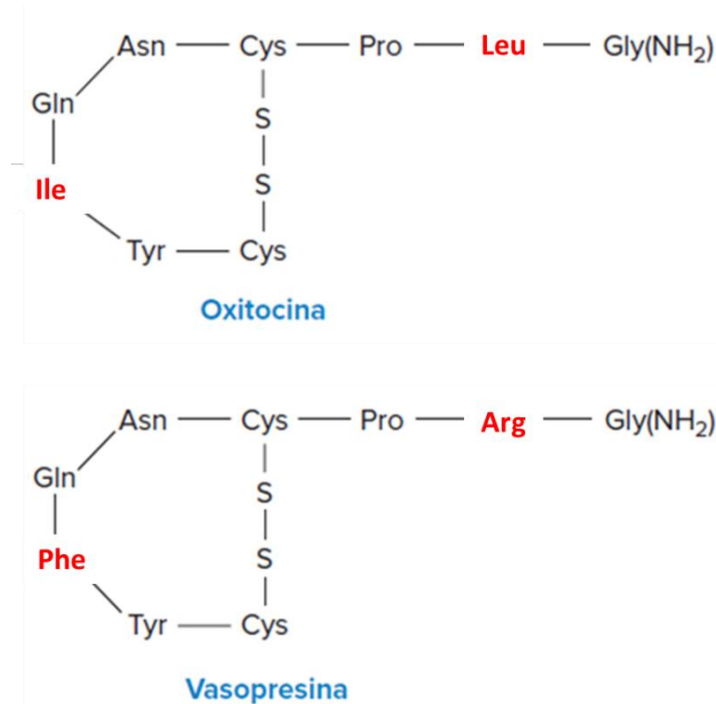


Figura 9. Esquema que muestra la homología estructural de la oxitocina y la vasopresina, las cuales cuentan con un puente disulfuro y solo difieren en 2 aminoácidos (letras rojas) (Brunton et al., 2019).

Todas las hormonas de la neurohipófisis son nonapéptidos que cuentan con un puente disulfuro entre los residuos de cisteína 1 y 6 (Figura 9). Estos neuropéptidos están clasificados en dos familias: i) familia de oxitocina, contiene un aminoácido neutro en la posición 8 (leucina, isoleucina, glicina, valina o triptófano); y ii) familia de vasopresina contiene un aminoácido en la posición 8 (arginina o lisina) (Tabla 2). La isoleucina en la posición 3 es esencial para la estimulación de los receptores de oxitocina, mientras que la presencia de Arginina o Lisina en la posición 8 estimula los receptores de vasopresina (Gimpl y Fahrenholz, 2001; Stoop, 2012).

Tabla 2. Aminoácidos presentes en los diferentes neuropéptidos pertenecientes a la familia de oxitocina y vasopresina (Tomado de Gimpl y Fahrenholz, 2001).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Oxitocina	Cys	Tyr	Ile	Gln	Asn	Cys	Pro	Leu	Gly(NH ₂)
Mesotocina	*	*	*	*	*	*	*	Ile	*
Isotocina	*	*	*	Ser	*	*	*	Ile	*
Glumitocina	*	*	*	Ser	*	*	*	Gln	*
Valitocina	*	*	*	*	*	*	*	Val	*
Aspargotocina	*	*	*	Asn	*	*	*	*	*
Asvatocina	*	*	*	Asn	*	*	*	Val	*
Fasvatocina	*	*	Phe	Asn	*	*	*	Val	*
Cefalotocina	*	*	Phe	Arg	*	*	*	Ile	*
Anetocina	*	Phe	Val	Arg	*	*	*	Thr	*
Vasotocina	*	*	*	*	*	*	*	Arg	*
Vasopresina	*	*	Phe	*	*	*	*	Arg	*
Lisipresina	*	*	Phe	*	*	*	*	Lys	*
Fenipresina	*	Phe	Phe	*	*	*	*	Arg	*
Locupresina	*	Leu	*	Thr	*	*	*	Arg	*
Arg-conopresina	*	Ile	*	Arg	*	*	*	Arg	*
Lys-conopresina	*	Phe	*	Arg	*	*	*	Lys	*

3.2 Receptor a oxitocina (OTR) y vasopresina V_{1A} (V_{1AR})

El receptor a oxitocina (OTR) y vasopresina V_{1A} (V_{1AR}) tienen semejanza estructural, lo cual permite la interacción de la oxitocina no solo con su receptor; sino también, con el receptor a vasopresina. Ambos receptores pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G, con 7 dominios transmembranales. Estos receptores están acoplados a proteína G_{q11}, y la unión del ligando a estos receptores activa la vía de la fosfolipasa C. Esta activación promueve la hidrólisis del fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂) y la formación de dos segundos mensajeros: el inositol trifosfato (IP₃) y el diacilglicerol (DAG). El IP₃ activa canales de calcio localizados en el retículo sarcoplásmico liso y, por lo tanto, la movilización de calcio del retículo sarcoplásmico al citoplasma (Wiegand y Gimpl, 2012, Japundžić-Žigon, et al. 2020) (Figura 11). La activación del OTR permite la contracción uterina y el aumento en la producción de NO, el cual puede generar cardiomiogénesis. Mientras que la activación del V_{1AR}, induce la contracción del músculo liso vascular, promueve la gluconeogénesis, adhesión plaquetaria y la secreción de angiotensina II (Japundžić-Žigon, et al. 2020). A pesar de que, el receptor a oxitocina se relaciona con la unión a proteína G_{q11}, se ha descrito que el OTR se acopla y activa a proteínas G_{i/o}. Esta heterogeneidad en las proteínas G que pueden ser activadas por el OTR favorece diversos efectos, dentro de los que se encuentran la inhibición de la adenilato ciclasa y la estimulación de canales de potasio (Chatterjee et al., 2016; Pierce, et al. 2019; Alberi, Dreifuss, y Raggenbass, 1997; Gravati, et al., 2010).

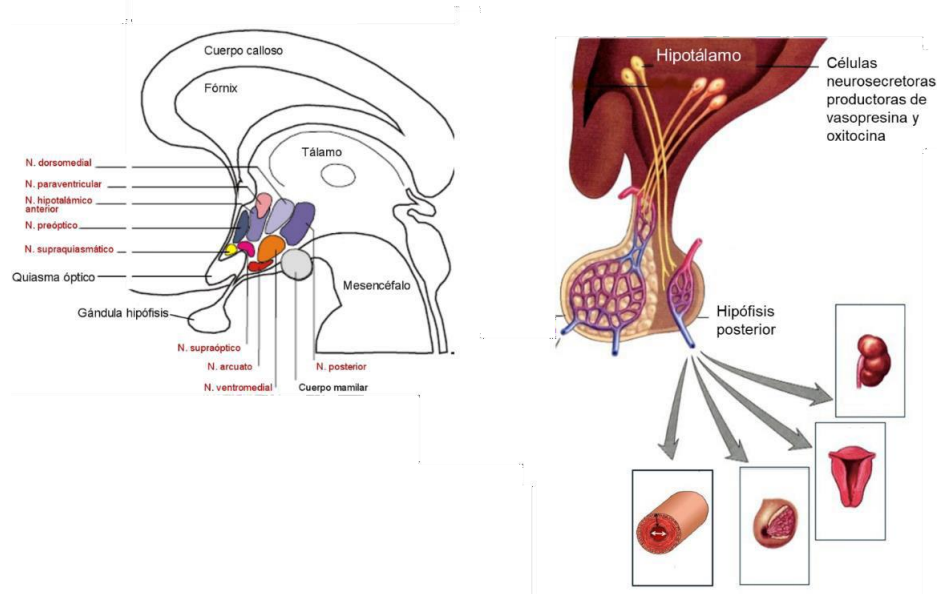


Figura 10. Núcleos hipotalámicos. Los núcleos paraventricular y supraóptico son los encargados de la síntesis de oxitocina y vasopresina. Posteriormente, la oxitocina se almacena a la neurohipófisis y libera en el sistema portal hipofisiario para ejercer su función endócrina en órganos como glándulas mamarias, útero, sistema cardiovascular y riñón (vasopresina).

Como se mencionó anteriormente, la principal función de la oxitocina está relacionada con el parto y la lactancia y, más recientemente, se ha asociado con funciones prosociales (Tzabazis et al., 2016). Adicionalmente, la oxitocina inhibe de forma selectiva la activación de neuronas aferentes primarias nociceptivas (fibras A δ y c) y, por lo tanto, se ha propuesto que tiene un efecto antinociceptivo probablemente mediado por la activación del receptor OTR (González-Hernández et al., 2017); sin embargo, la probable participación del receptor a vasopresina V_{1A} (V_{1AR}) no se ha descartado (González-Hernández et al., 2014). Asimismo, estudios *ex vivo* han demostrado que la oxitocina inhibe la nocicepción en neuronas sensibles a capsaicina del ganglio de la raíz dorsal, al generar hiperpolarización de la membrana celular; esto sugiere un mecanismo dependiente de Ca²⁺ (Hobo et al., 2012).

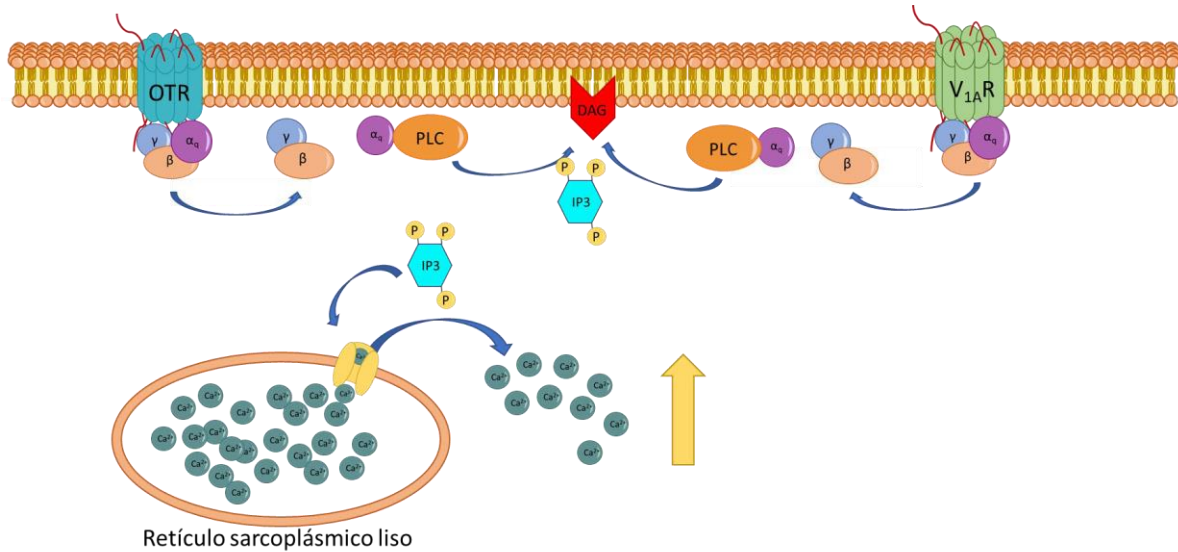


Figura 11. El receptor de oxitocina puede estar asociado a diferentes tipos de proteínas G ($G_{q/11}$, $G_{i/o}$ y G_s). La activación de la proteína $G_{q/11}$ activa la vía de la fosfolipasa $C\beta$, permitiendo la salida de calcio al citoplasma. Este receptor está asociado a la proteína β -arrestina que, en conjunto con la clatrina, producen la internalización del receptor cuando éste es estimulado. Este proceso no ocurre en los receptores acoplados a proteínas $G_{i/o}$ y G_s . Los receptores de vasopresina tienen homología estructural con el receptor de la oxitocina, lo que produce la interacción de la oxitocina con los receptores de vasopresina.

CAPÍTULO 4

UBICACIÓN DEL PROYECTO

4.1 Justificación

Aun cuando se considera que el CGRP liberado de las fibras sensoriales no sólo es relevante en las respuestas vasodepresoras, sino también en la regulación de distintas funciones cardiovasculares y sensoriales, no se conocen del todo los mecanismos que participan en la modulación de la liberación de este péptido. Hay evidencia de que la oxitocina inhibe la neurotransmisión sensorial nociceptiva (González-Hernández et al., 2017; Tzabazis et al., 2016). Sin embargo, no existen reportes que hagan referencia al efecto de la oxitocina sobre la neurotransmisión sensorial CGRPérgica a nivel de la vasculatura sistémica (i.e., sobre el tono sensorial vasodepresor CGRPérgico). Por lo tanto, resulta de interés el determinar si la oxitocina se encuentra involucrada en la modulación de la liberación de CGRP a nivel neurovascular sistémico en las respuestas vasodepresoras CGRPérgicas (Taguchi et al., 1992; Villalón et al., 2008; Avilés-Rosas et al., 2017). En caso de que este neuropéptido inhibiera dicha neurotransmisión, sería importante identificar la naturaleza farmacológica de los receptores involucrados.

4.2 Hipótesis

En la rata descerebrada y desmedulada, las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación eléctrica del tono sensorial CGRPérgico serán inhibidas por una infusión i.v. continua de oxitocina. Por lo tanto, la administración i.v. del antagonista selectivo al OTR (L-368,899) bloqueará la inhibición inducida por la oxitocina.

CAPÍTULO 5

OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Analizar el efecto farmacológico de la oxitocina sobre las respuestas vasodepresoras producidas por la estimulación del tono sensorial perivascular CGRPérgico.

5.2 Objetivos particulares

En ratas descerebradas y desmeduladas:

Objetivo particular 1

Evaluar farmacológicamente el efecto de bolos i.v. de oxitocina antes y después de los antagonistas L-368,899 (OTR) o SR 49059 ($V_{1A}R$) sobre la presión arterial diastólica.

Objetivo particular 2

Investigar si la infusión i.v. continua de oxitocina es capaz de inhibir las respuestas vasodepresoras inducidas por:

- i. La estimulación eléctrica del tono sensorial perivascular CGRPérgico.
- ii. La administración de α -CGRP exógeno.

Objetivo particular 3

Identificar el perfil farmacológico de los receptores (OTR vs. $V_{1A}R$) involucrados en el posible efecto inhibitor de la infusión i.v. continua de oxitocina, mediante el análisis de:

- i. El efecto per se de la administración de los antagonistas L-368,899 (OTR) o SR 49059 ($V_{1A}R$) sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por la estimulación del tono sensorial CGRPérgico.
- ii. El efecto de la administración i.v. de los antagonistas L-368,899 o SR 49059 sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por la activación del tono CGRPérgico durante una infusión i.v. continua de oxitocina.

CAPÍTULO 6

MATERIALES Y MÉTODOS

En este proyecto se utilizó un total de 96 ratas Wistar (380-420 g). Todos los animales fueron mantenidos con alimento y agua *ad libitum* en ciclos de luz oscuridad de 12:12 h a una temperatura de 22 ± 2 °C y una humedad relativa del 50%.

En este punto, es importante mencionar que, en los modelos en los que se caracterizaron los receptores involucrados en la inhibición de las respuestas vasodepresoras, no se midió la actividad CGRPérgica directamente. En el caso específico del modelo de la rata descerebrada y desmedulada, la liberación de neurotransmisores (principalmente CGRP) fue estimada indirectamente al medir las respuestas vasodepresoras producidas por estimulación eléctrica de la médula espinal a nivel T₉-T₁₂, como se ha descrito con anterioridad (Taguchi *et al.*, 1992; Villalón *et al.*, 2008; González-Hernández *et al.*, 2010, 2011; Avilés-Rosas *et al.*, 2017).

6.1 Respuestas vasodepresoras en ratas descerebradas y desmeduladas

6.1.1 Procedimiento general

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (60 mg/kg, i.p.). Posteriormente, se realizó una traqueotomía y se insertó un catéter de polietileno. Bajo estas condiciones se procedió a la descerebración y desmedulación que consiste en insertar un estilete de acero inoxidable a través de la órbita ocular y el *foramen magnum*, hasta el *foramen* vertebral (Shiple y Tilden, 1947). Inmediatamente después, los animales fueron asistidos con respiración artificial mediante una bomba de presión positiva Ugo Basile modelo 7025 con una frecuencia de 56 respiraciones/min y un volumen de aire de 20 ml/kg (Kleinman y Radford, 1964).

Subsecuentemente, se realizó una vagotomía bilateral a nivel cervical y se procedió a la canulación con catéteres de polietileno en: i) las venas femorales y yugulares, para la administración de agonistas y antagonistas, respectivamente; ii) la arteria carótida izquierda, la cual se conectó a un transductor de presión Grass (P23XL) para el registro de la presión arterial sanguínea (PA). La frecuencia cardiaca (FC) fue determinada mediante un tacógrafo (7P4, Grass Instruments Co., Quincy, MA, USA) que mide el intervalo entre dos ondas consecutivas de la presión arterial sistólica. Las variables hemodinámicas (PA y FC) se registraron en un polígrafo Grass modelo 7.

Posteriormente, el estilete fue reemplazado por un electrodo de estimulación esmaltado excepto por 1.5 cm de longitud que se localiza a 10.5 cm. de la punta, de tal forma que el segmento no esmaltado se sitúe a nivel de los segmentos torácicos T₉-T₁₂ de la médula espinal para estimular de manera selectiva las fibras sensoriales CGRPérgicas que inervan a la vasculatura sistémica (Gillespie *et al.*, 1970; Taguchi *et al.*, 1992; Villalón *et al.*, 2008).

Previo a la estimulación eléctrica, los animales recibieron: i) galamina (25 mg/kg, i.v.) para evitar los espasmos musculares que resultan de la estimulación de las fibras motoras en las raíces ventrales (Villalón *et al.*, 1995a; 1995b); y ii) y una infusión continua de hexametonio (2 mg/kg.min, i.v.) para bloquear las respuestas vasopresoras simpáticas inducidas por la estimulación eléctrica (Villalón *et al.*, 1998). La presión arterial diastólica (PAD) se incrementó y mantuvo a un nivel de aproximadamente 100-130 mmHg mediante la administración de una infusión i.v. continua de metoxamina (15 µg/kg.min). La temperatura de cada animal se mantuvo a 37 °C por medio de una lámpara y monitoreada con un termómetro rectal.

Bajo estas condiciones experimentales, se llevó a cabo la estimulación eléctrica de las fibras sensoriales perivasculares a nivel de los segmentos medulares T₉-T₁₂, aplicando trenes de descarga de 10 s de duración y con las siguientes

características: *i*) pulsos eléctricos de 2 ms; *ii*) voltaje de 50 V y *iii*) con una frecuencia de estimulación de 0.56 – 5.6 Hz (Villalón *et al.*, 2008; González-Hernández *et al.*, 2010, 2011).

6.1.2 Protocolo experimental

Después de que los animales alcanzaron una estabilidad hemodinámica de por lo menos 30 min, se registraron los valores basales de la presión arterial diastólica y la frecuencia cardiaca. Posteriormente, se estimuló eléctricamente el tono sensorial perivascular CGRPérgico para producir las respuestas vasodepresoras aplicando trenes de descarga de 10 s (pulsos rectangulares monofásicos de 2 ms de duración y 50 V) e incrementos de la frecuencia de estimulación (0.56, 1.0, 1.8, 3.1 y 5.6 Hz).

Cuando la presión arterial diastólica retornó a los niveles basales, se aplicó la siguiente frecuencia de estimulación; esto se realizó sistemáticamente hasta completar la curva estímulo-respuesta. En la estimulación eléctrica perivascular, así como también en la administración i.v. de α -CGRP exógeno, se usó un esquema de administración secuencial en incrementos de 0.25 unidades logarítmicas a intervalos de 5-10 min.

Para alcanzar los objetivos antes señalados se plantearon los siguientes protocolos experimentales, siguiendo las condiciones de estimulación eléctrica previamente estandarizadas en el laboratorio (Villalón *et al.*, 2008; González-Hernández *et al.*, 2010, 2011) (Figura 12).

6.1.3 Protocolo experimental para determinar respuestas vasodepresoras CGRPérgicas inducidas eléctricamente bajo la administración de infusiones i.v. continuas de metoxamina.

Para determinar el efecto del vehículo (solución salina al 0.9%) de la oxitocina sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación eléctrica, se utilizó un grupo de animales (n=12) y se analizaron los efectos vasodepresores inducidos por

estimulación eléctrica en ratas pretratadas con una infusión i.v. continua de hexametonio (2 mg/kg.min) y de: *i*) metoxamina (15 µg/kg.min) (grupo control; n=6); y *ii*) metoxamina (15 µg/kg.min) + solución de NaCl al 0.9% (0.02 ml/min; n=6). Debe destacarse que las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación sensorial CGRPérgica o por bolos i.v. de CGRP exógeno son altamente taquifilácticas; consecuentemente, sólo se pudo realizar una curva estímulo-respuesta o dosis-respuesta (Villalón et al., 2008; González-Hernández et al., 2010, 2011).

6.1.4 Efecto de la administración de bolos i.v. de oxitocina sobre la presión arterial sistémica

Para determinar el efecto sobre la presión arterial, inducido por la administración de bolos i.v. de oxitocina en rata descerebrada y desmedulada, se utilizó un grupo de animales (n=6) y se realizaron 3 curvas dosis-respuesta (0.1, 0.3, 1, 3 y 10 µg/kg), se analizaron los efectos sobre la presión arterial y su reproducibilidad.

6.1.5 Efecto de la administración i.v. de los antagonistas L-368,899 o SR49059 sobre las respuestas inducidas por la administración de bolos i.v de oxitocina

Para analizar el efecto de los antagonistas L-368,899 (antagonista al OTR) y SR 49059 (antagonista al V_{1A}R) sobre las respuestas inducidas por la administración de bolos i.v. de oxitocina (0.1-10 µg/kg), se utilizó un grupo de ratas (n=6).

6.1.6 Efecto de la infusión i.v. continua de oxitocina sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación del tono sensorial perivascular CGRPérgico

Durante las infusiones continuas de metoxamina (15 µg/kg.min, i.v.), se determinó el efecto de la oxitocina (en infusión continua) sobre las respuestas vasodepresoras CGRPérgicas inducidas por estimulación eléctrica. En este caso, se usó una n=24,

dividida en 4 grupos experimentales (oxitocina a dosis de 1, 1.8, 3 y 10 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ i.v.; n=6 para cada dosis).

6.1.7 Efecto *per se* de la administración i.v. de los antagonistas L-368,899 o SR 49059 sobre las respuestas vasodepresoras inducidas eléctricamente

Para analizar el efecto *per se* de los antagonistas L-368,899 y SR 49059 sobre las respuestas vasodepresoras CGRPérgicas bajo una infusión continua de metoxamina, se utilizó un grupo de ratas (n=12), que fue dividido en dos subgrupos (n=6, cada uno).

Las respuestas vasodepresoras CGRPérgicas inducidas por estimulación eléctrica fueron evaluadas en animales pretratados con infusiones i.v. continuas de hexametonio (2 mg/kg.min) y metoxamina (15 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$), seguidas por la administración de un bolo i.v. de: i) L-368,899; o ii) SR 49059.

6.1.8 Efecto de la administración i.v. de los antagonistas L-368,899 o SR 49059 sobre las respuestas vasodepresoras inducidas eléctricamente bajo una infusión continua de oxitocina

Para determinar el perfil farmacológico involucrado en la inhibición por oxitocina de las respuestas vasodepresoras CGRPérgicas inducidas por estimulación eléctrica, se utilizó un grupo de animales (n=12). Este grupo fue dividido en 2 subgrupos (n=6, cada uno). Bajo la infusión i.v. continua de hexametonio (2 mg/kg.min), metoxamina (15 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$) u oxitocina se evaluaron las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación eléctrica bajo la administración de los siguientes bolos i.v.: i) L-368,899; o ii) SR 49059.

6.1.9 Efecto de la infusión continua de oxitocina sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por α -CGRP exógeno

Para alcanzar el objetivo de determinar si el efecto inhibitor de las respuestas vasodepresoras observadas por la administración de oxitocina es mediada por receptores a nivel preunional o postunional, se utilizó otro grupo de animales (n=12), el cual fue dividido en dos subgrupos (n=6, cada uno) en donde se determinaron los efectos vasodepresores inducidos por la administración de bolos i.v. de α -CGRP exógeno (0.1, 0.18, 0.31, 0.56 y 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.) en ratas pretratadas con una infusión i.v. continua de metoxamina (15 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$), seguidas de una infusión continua de: i) vehículo (0.02 ml/min); u ii) oxitocina.

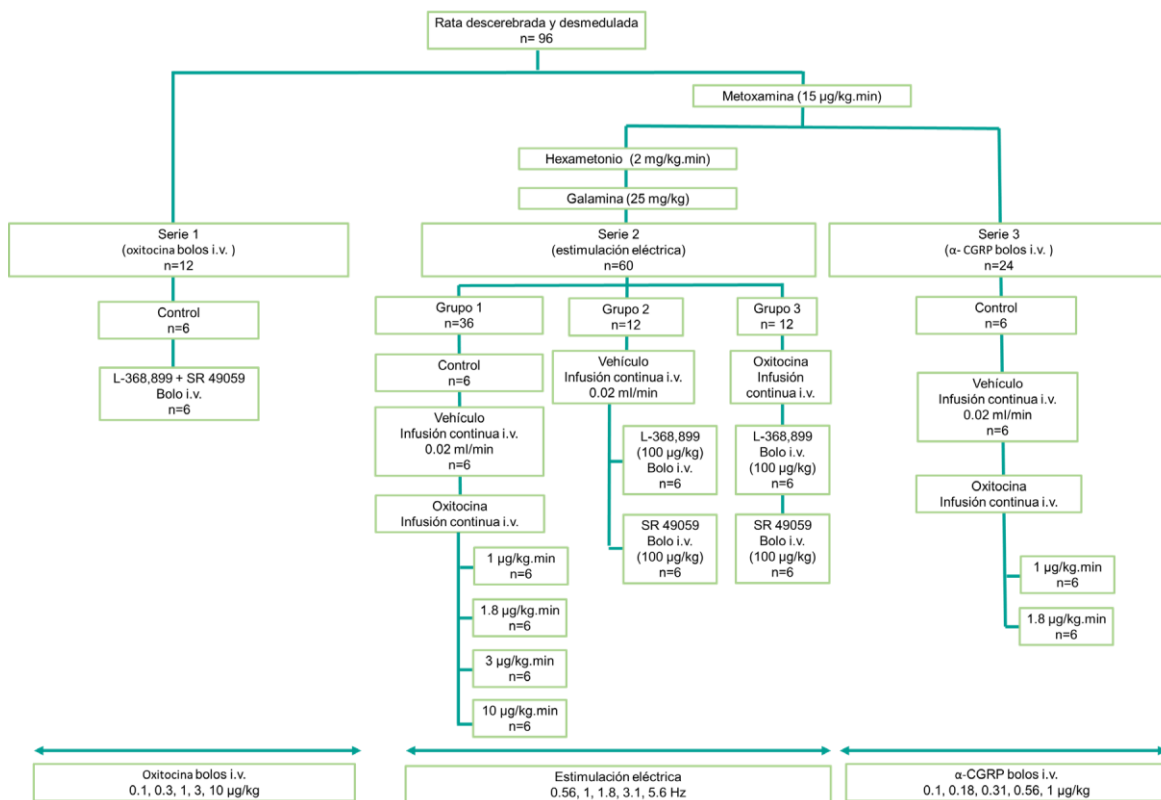


Figura 12. Diseño experimental para la evaluación del efecto de la oxitocina sobre el tono sensorial vasodepresor CGRPérgico.

6.2 Fármacos

Además del pentobarbital sódico utilizado para la anestesia, los fármacos empleados en el presente proyecto fueron: triyoduro de galamina, clorhidrato de metoxamina, cloruro de hexametonio, CGRP de rata (α -CGRP) (Sigma Chemical, Co., St. Louis, MO, USA), Hidrato de sal de acetato de oxitocina (Sigma-Aldrich, no. Catálogo O6379), L-368,899 clorhidrato (Tocris, no. Catálogo 2641), SR 49059 (Tocris, no. Catálogo 2310). Todos los compuestos fueron disueltos con solución salina, excepto el SR 49059 el cual fue disuelto con DMSO al 6.6%. Todas las soluciones de estos fármacos fueron preparadas en el mismo día del experimento.

6.3 Análisis estadístico

Los resultados experimentales que se obtuvieron fueron expresados como la media \pm el error estándar de la media de los decrementos máximos de las respuestas vasodepresoras, expresados como porcentaje de cambio de la PAD con respecto a la basal (Villalón et al., 2008; González-Hernández et al., 2010, 2011). Los resultados obtenidos en cada subgrupo de animales fueron analizados para determinar una diferencia estadísticamente significativa aplicando un análisis de variancia (ANOVA) de dos vías seguido por una prueba *post hoc* de Student-Newman-Keuls cuando los resultados del análisis indiquen que se trata de muestras poblacionales distintas. En todos los casos se considerará un cambio significativo cuando $p < 0.05$.

CAPÍTULO 7

RESULTADOS

7.1 Variables hemodinámicas

Los resultados obtenidos de la evaluación de los niveles basales de la presión arterial diastólica en ratas descerebradas y desmeduladas se muestran en la figura 2, corresponden al valor promedio \pm error estándar de la media. Las ratas descerebradas y desmeduladas en ausencia de infusión continua con metoxamina, mostraron niveles basales de presión arterial diastólica de 34 ± 3 mmHg, mientras que, en presencia de infusión continua con metoxamina o infusión continua de metoxamina + vehículo, fue de 134 ± 10 y 115 ± 3 mmHg respectivamente. Es importante destacar que, los valores basales de presión arterial diastólica en las ratas descerebradas y desmeduladas son significativamente menores en comparación con las ratas descerebradas y desmeduladas con infusión continua con metoxamina o metoxamina + vehículo con una $p < 0.05$ (Figura 13). La presión arterial diastólica entre los grupos de metoxamina y metoxamina + vehículo, no mostró diferencia entre ellos ($p > 0.05$).

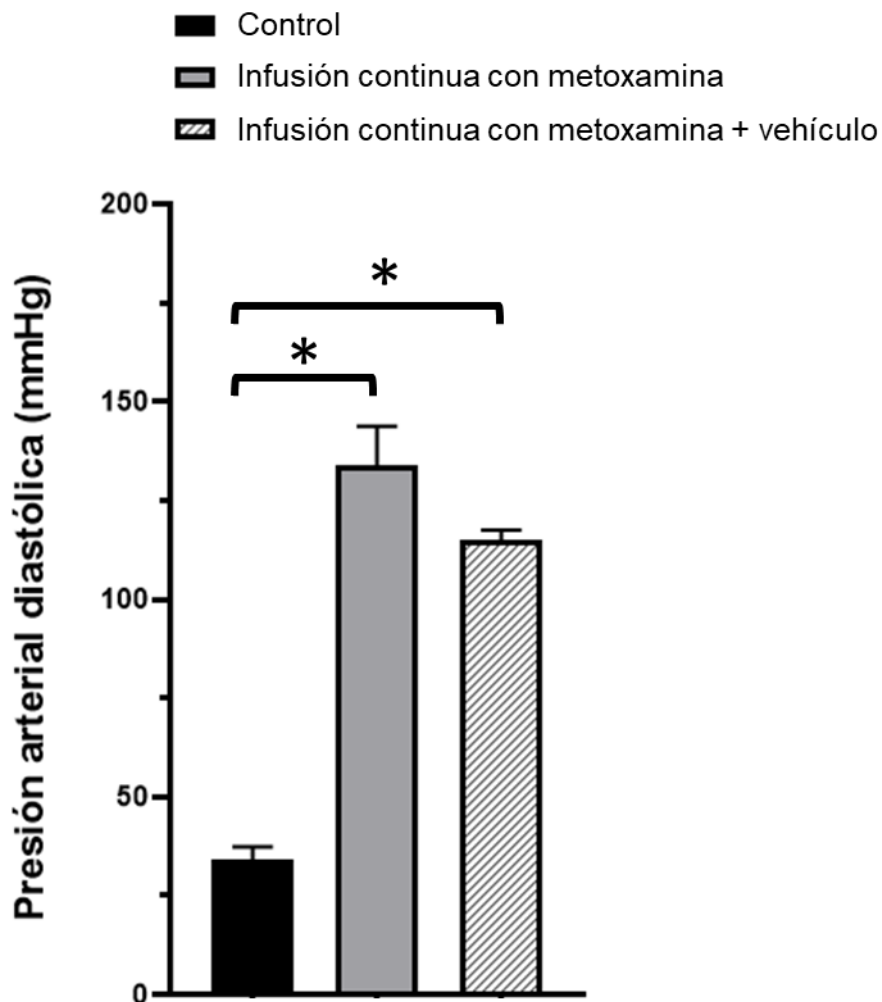


Figura 13. Incrementos en la presión arterial diastólica inducidos antes (control) y después de una infusión continua con: (i) metoprolol (15 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$); y (ii) metoprolol (15 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$) + vehículo (0.02 ml/min); en ratas descerebradas y desmeduladas $p < 0.05$ (*). Kruskal-Wallis. No hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) entre metoprolol y metoprolol + vehículo.

7.2 Efecto de la administración de bolos i.v. de oxitocina sobre la presión arterial sistémica en presencia de L-368,899 y SR 49059

Los efectos de la oxitocina sobre la presión arterial sistémica inducida por la administración de bolos i.v. fue analizada mediante 3 curvas dosis-respuesta. En la figura 14A se observa el efecto vasopresor inducido por oxitocina, el cual es dependiente de la dosis; este efecto persiste durante las 3 curvas dosis respuesta. Al no haber diferencias significativas entre ellas ($p > 0.05$), estos datos sugieren: (i) la

reproducibilidad del efecto de la oxitocina; y que (ii) bajo estas condiciones experimentales la oxitocina no genera una respuesta taquifiláctica (Figura 15A). Este efecto vasopresor no se modifica en presencia de los vehículos de L-368,899 o SR 49059 (S.S y DMSO al 6.6%, respectivamente) ($p>0.05$) (Figura 14B y 15B).

Por otro lado, el efecto vasopresor de la oxitocina se bloquea por el SR 49059 (antagonista $V_{1A}R$) en todas las dosis de la curva dosis-respuesta ($p<0.05$) (Figura 14C y 15C). En contraste, la respuesta vasopresora inducida por oxitocina no se revierte por el L-368,899 ($p>0.05$); estos datos sugieren que el efecto presor de la oxitocina es mediado por la activación del $V_{1A}R$ y no por el OTR.

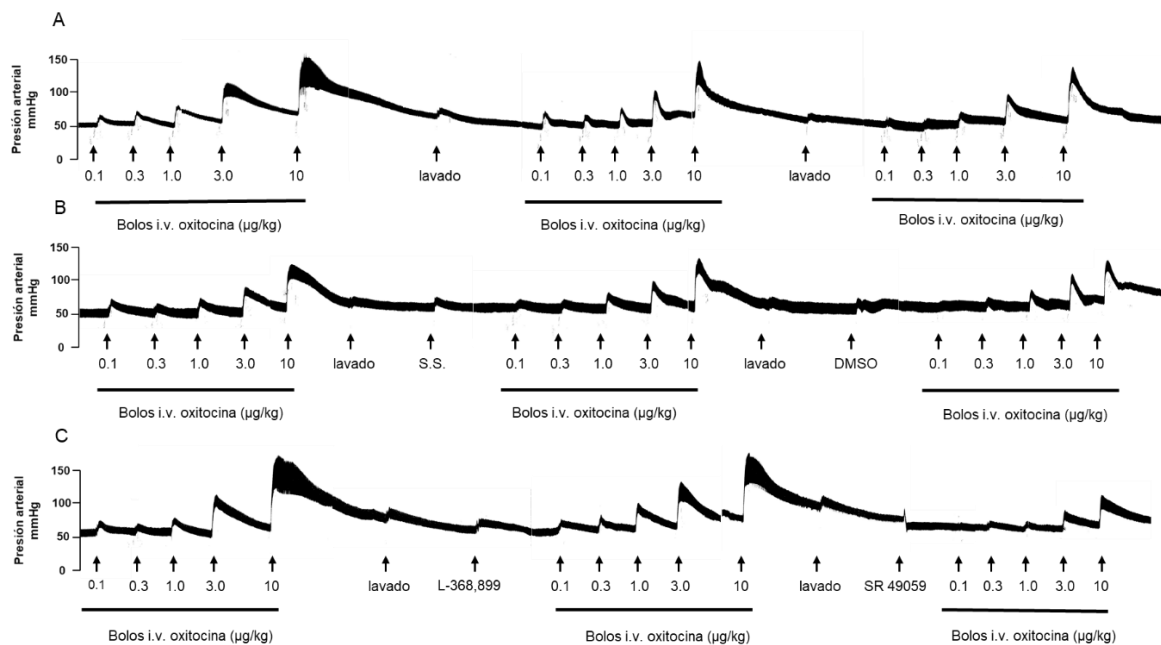


Figura 14. Respuestas vasopresoras producidas por bolos i.v. de: oxitocina (A), oxitocina + vehículos de los antagonistas L-368,899 o SR 49059 (S.S. y DMSO respectivamente) (B) y oxitocina + antagonista del OTR (L-368,899) o antagonista del $V_{1A}R$ (SR 49059) (C). Nótese la reproducibilidad de las respuestas vasopresoras en las 3 curvas dosis-respuesta a oxitocina en presencia de los vehículos, mientras que la respuesta vasopresora producida por la oxitocina se ve atenuada en presencia del SR 49059 más no por el L-368,899.

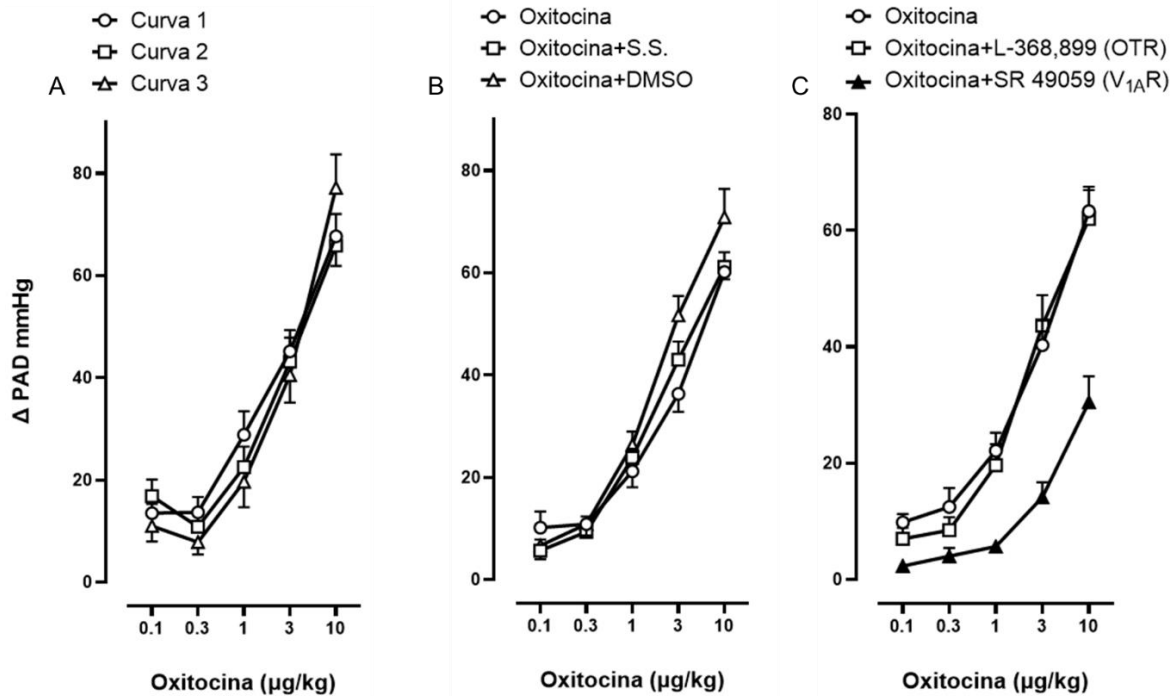


Figura 15. Análisis diferencial de los efectos producidos durante bolos i.v. de oxitocina (A) y en presencia de: (B) vehículos de los antagonistas L-368,899 y SR 49059 (S.S. y DMSO al 6.6% respectivamente) y (C) oxitocina en presencia del antagonista al OTR (L-368,899, 100 μg/kg) o al antagonista del V_{1A}R (SR 49059, 100 μg/kg). Nótese la reproducibilidad de la administración de bolos i.v. de oxitocina en las 3 curvas dosis-respuesta (A). Por otro lado, no hubo diferencias significativas en las respuestas vasopresoras producidas por bolos i.v. de oxitocina en presencia de los vehículos $p > 0.05$ (B), mientras que hay diferencia con la administración del SR 49059 $p < 0.05$ (símbolos oscuros) con relación al grupo control (oxitocina), pero no en presencia del L-368,899 $p > 0.05$. ANOVA de dos vías de medidas repetidas seguido por una prueba post hoc de Student-Newman-Keuls.

7.3 Respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación eléctrica del tono sensorial CGRPérgico o por la administración de bolos i.v. de α-CGRP

En la figura 16 se muestran los registros originales de las respuestas vasodepresoras producidas por estimulación eléctrica del tono sensorial CGRPérgico (T₉-T₁₂) (Figura 16A y B) o por la administración de bolos i.v. de α-CGRP (Figura 16C y D) en presencia de infusiones continuas con metoxamina (Figura 16A y C) o metoxamina + vehículo (Figura 16B y D). Estos decrementos en la presión arterial diastólica son dependientes de la frecuencia de estimulación

(0.56-5.6 Hz) y de la dosis (0.1-1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de $\alpha\text{-CGRP}$) (Figura 17).

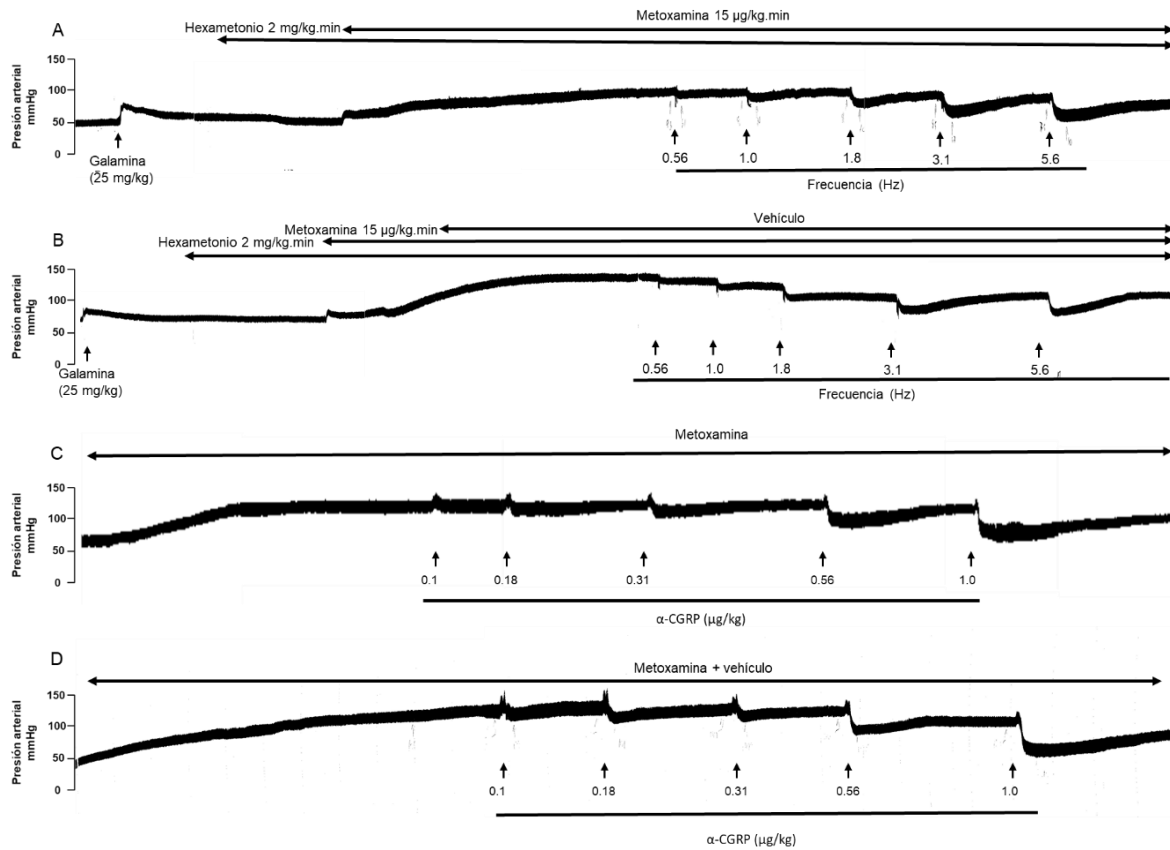


Figura 16. Respuestas vasodepresoras producidas por: **(A)** estimulación eléctrica del tono sensorial vasodepresor CGRPérgico durante una infusión continua de metoxamina. **(B)** metoxamina + vehículo; y **(C)** bolos i.v. de $\alpha\text{-CGRP}$ durante una infusión continua de metoxamina o **(D)** metoxamina + vehículo.

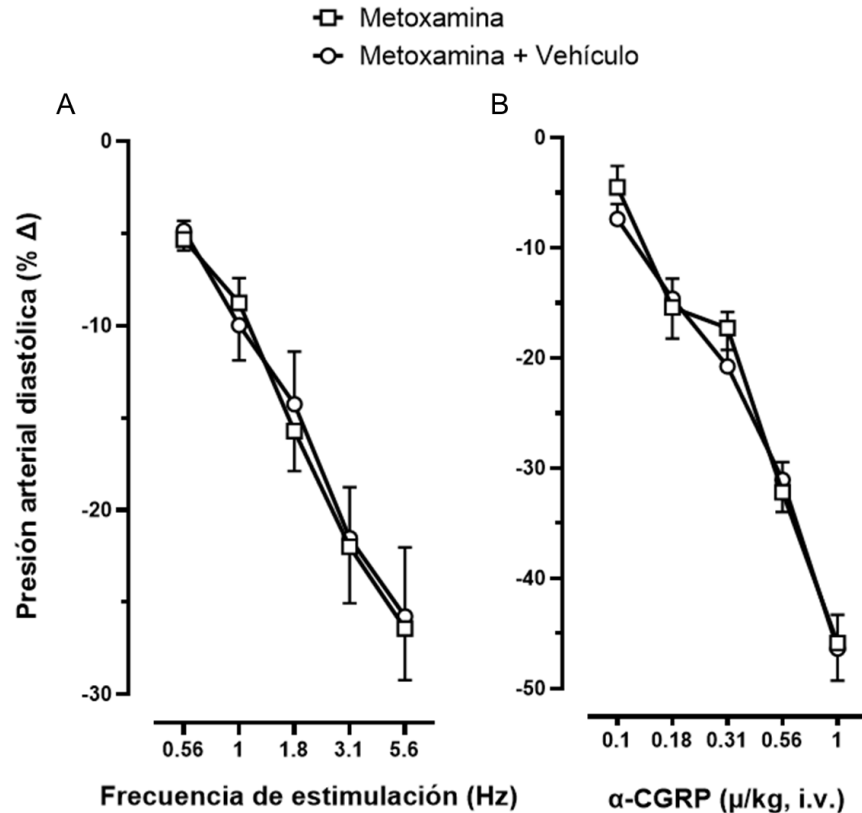


Figura 17. Análisis diferencial de los efectos producidos durante: **(A)** una infusión continua con metoprolol o metoprolol + vehículo sobre las respuestas vasodepresoras producidas por estimulación eléctrica sensorial ($n=6$) o **(B)** bolos i.v. de α -CGRP ($n=6$). No hubo diferencias significativas en las respuestas producidas en los diferentes grupos de animales. $p>0.05$ ANOVA de dos vías de medidas repetidas seguido por una prueba post hoc de Student-Newman-Keuls.

Las respuestas vasodepresoras generadas por estimulación eléctrica o por bolos de α -CGRP no mostraron diferencias entre el grupo de metoprolol ($n=6$) y metoprolol + vehículo ($n=6$) ($p>0.05$). Estos resultados demuestran que el vehículo (Solución Salina) no modifica las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación eléctrica o por bolos de α -CGRP (Figura 17A, 17B).

7.4 Efecto de la infusión continua de oxitocina sobre las respuestas vasodepresoras, inducidas por estimulación eléctrica del tono sensorial CGRPérgico.

En la figura 18 se muestran los registros originales de las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación del tono sensorial CGRPérgico, durante una infusión continua de: i) metoxamina (control) (Figura 18A), ii) metoxamina + vehículo (Figura 7B), iii) metoxamina + oxitocina 1 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ (Figura 18C), iv) metoxamina + oxitocina 1.8 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$, (Figura 18D), v) metoxamina + oxitocina 3 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ (Figura 18E) y vi) oxitocina 10 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ (Figura 18F). La oxitocina muestra un efecto inhibitor desde la dosis más baja (1 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$) con respecto al grupo control y al grupo con infusión de vehículo ($p < 0.05$) (Figura 19). Por otro lado, las dosis de 1.8-10 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ muestran un mayor efecto inhibitor en comparación con la dosis de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$; sin embargo, las dosis incrementan la presión arterial sistólica (Figura 18D-F) por lo que, el efecto inhibitor que se muestra, a pesar de ser mayor, puede deberse al predominio de la presión arterial sistólica, generando un antagonismo fisiológico. Desde este punto de vista, la dosis de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$, parece ser la mejor dosis para generar inhibición de las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación eléctrica del tono sensorial CGRPérgico.

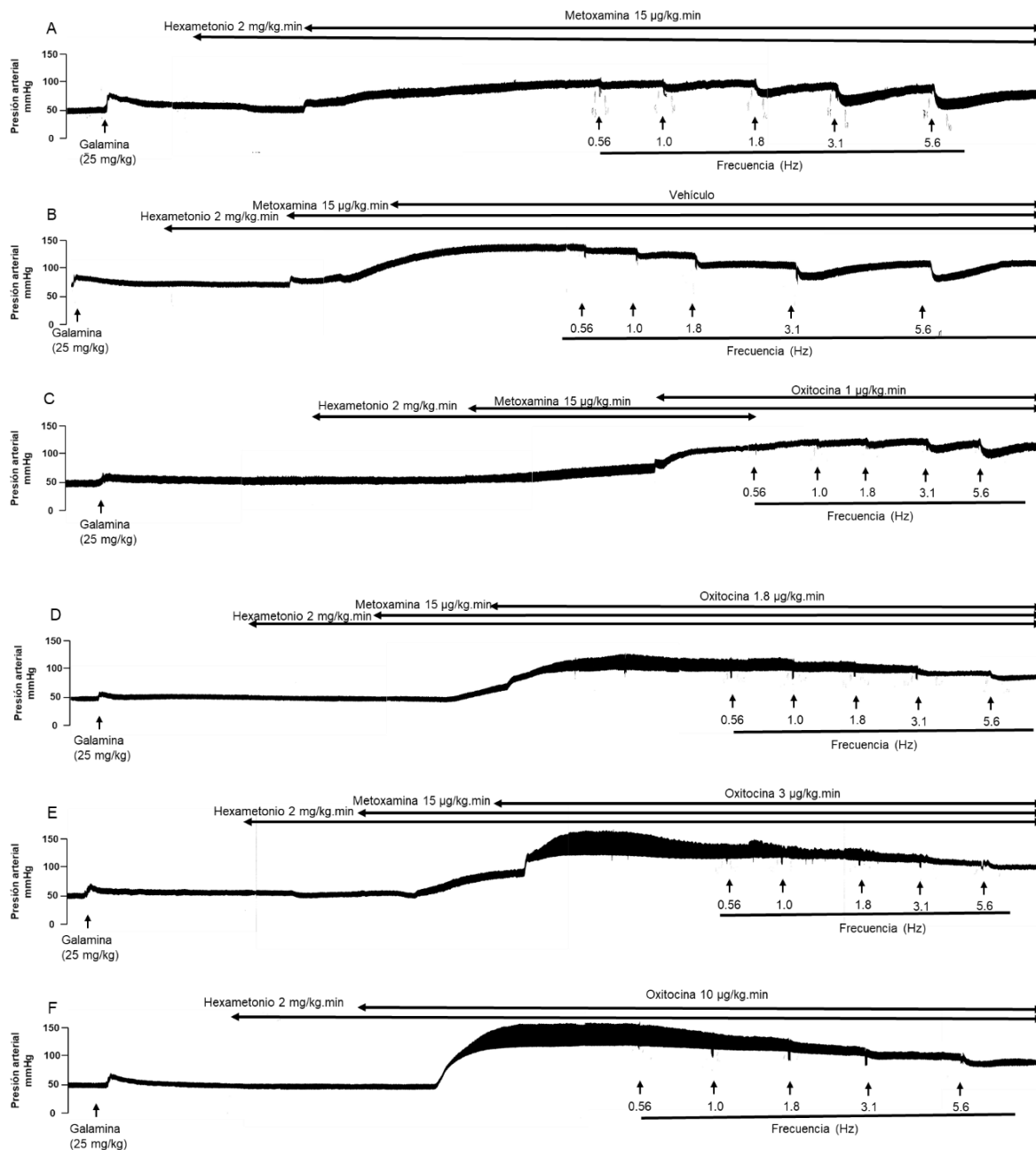


Figura 18. Respuestas vasodepresoras producidas por estimulación eléctrica del tono sensorial CGRPérgico durante una infusión de: **(A)** metoxamina (control), **(B)** metoxamina + vehículo, **(C)** metoxamina + oxitocina 1 µg/kg.min, **(D)** metoxamina + oxitocina 1.8 µg/kg.min, **(E)** metoxamina + oxitocina 3 µg/kg.min y **(F)** oxitocina 10 µg/kg.min. Nótese el aumento de la presión arterial sistólica en presencia de infusión continua con oxitocina a 1.8, 3 y 10 µg/kg.min, mientras que, la dosis de 1 µg/kg.min no presenta efecto durante la sístole.

- Metoxamina
- Metoxamina + Vehículo
- △ Metoxamina + oxitocina 1 µg/kg.min
- ▽ Metoxamina + oxitocina 1.8 µg/kg.min
- ◇ Metoxamina + oxitocina 3 µg/kg.min
- Oxitocina 10 µg/kg.min

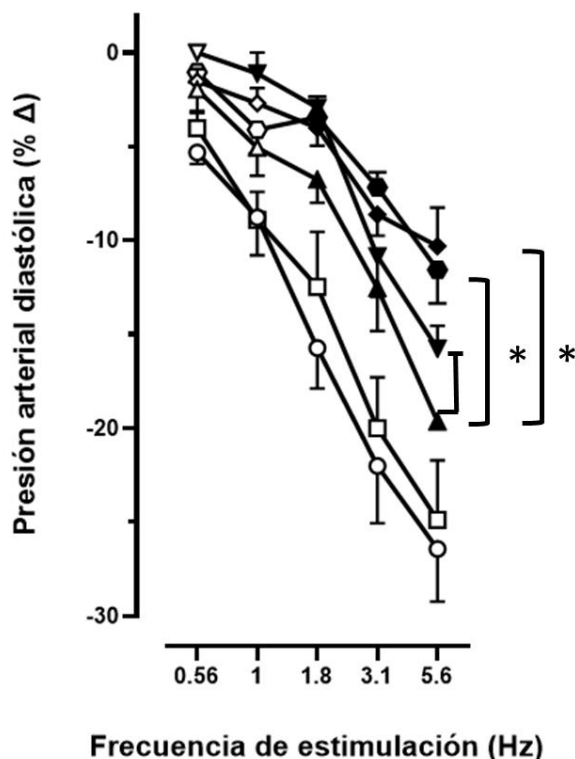


Figura 19. Curva estímulo-respuesta del tono sensorial CGRPérgico durante una infusión de: i) metoxamina (control), ii) metoxamina + vehículo de oxitocina (S.S), iii) metoxamina + oxitocina 1 µg/kg.min, iv) metoxamina + oxitocina 1.8 µg/kg.min, v) metoxamina + oxitocina 3 µg/kg.min y vi) oxitocina 10 µg/kg.min (n=6 por grupo). Los símbolos oscuros representan que hay disminución significativa de las respuestas vasodepresoras producidas por estimulación eléctrica del tono sensorial CGRPérgico durante una infusión continua de oxitocina con las dosis de 1, 1.8, 3 y 10 µg/kg.min con relación al grupo control (p<0.05), siendo la dosis de 3 y 10 µg/kg.min las que producen un mayor efecto inhibitor. Por otro lado, existen diferencias significativas en el efecto inhibitor producido por la infusión continua con oxitocina entre las diferentes dosis con la frecuencia de estimulación de 5.6 Hz (*). ANOVA de dos vías de medidas repetidas seguido por una prueba post hoc de Student-Newman-Keuls.

7.5 Efecto de la infusión continua de oxitocina sobre las respuestas vasodepresoras, inducidas por administración de bolos i.v. de α -CGRP

La figura 20 muestra registros de las repuestas vasodepresoras inducidas por la administración de bolos i.v. de α -CGRP durante una infusión continua de: i) metoxamina + vehículo (Figura 20A), ii) metoxamina + oxitocina 1 μ g/kg.min (Figura 20B) y iii) metoxamina + oxitocina 1.8 μ g/kg.min (Figura 20C). Las respuestas vasodepresoras inducidas por α -CGRP no se ven afectadas en presencia de 1 μ g/kg.min de oxitocina ($p < 0.05$). En contraste, la dosis de 1.8 μ g/kg.min de oxitocina atenuó el efecto vasodepresor inducido por α -CGRP (Figura 21). Sin embargo, hay que tomar en cuenta que, la dosis de 1.8 μ g/kg.min provoca un efecto inotrópico positivo, lo cual puede generar este efecto inhibitor.

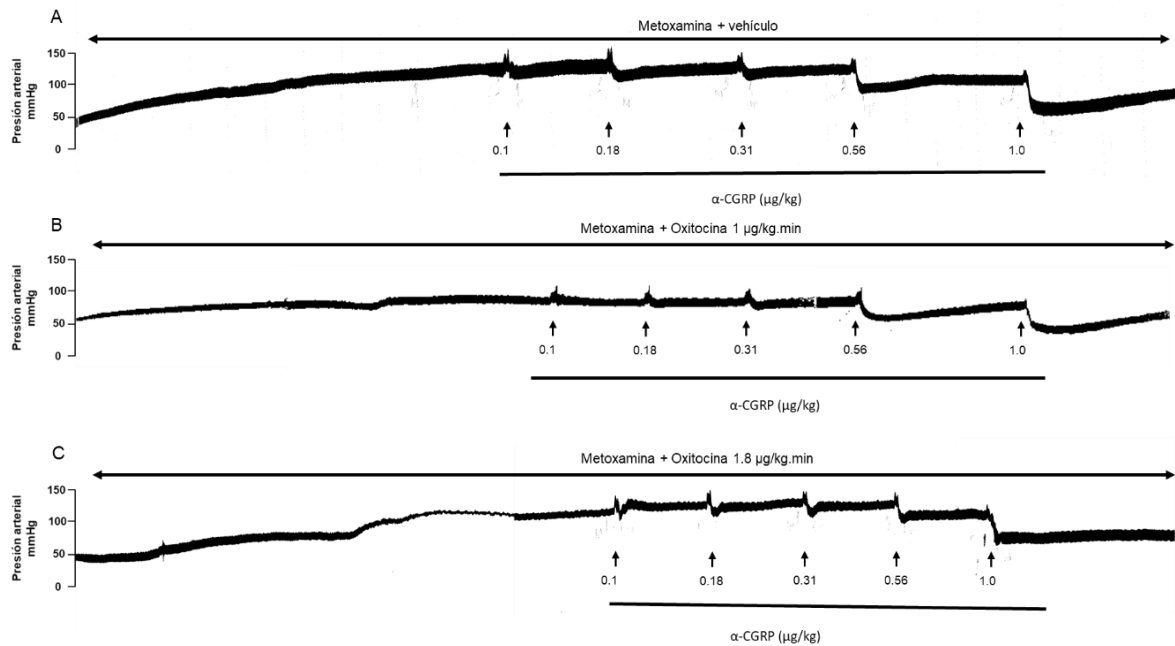


Figura 20. Registros que muestran las respuestas vasodepresoras inducidas por la administración de bolos i.v de α -CGRP durante una infusión continua de: **(A)** metoxamina + vehículo, **(B)** metoxamina + oxitocina 1 μ g/kg.min y **(C)** metoxamina + oxitocina 1.8 μ g/kg.min ($n = 6$ por grupo).

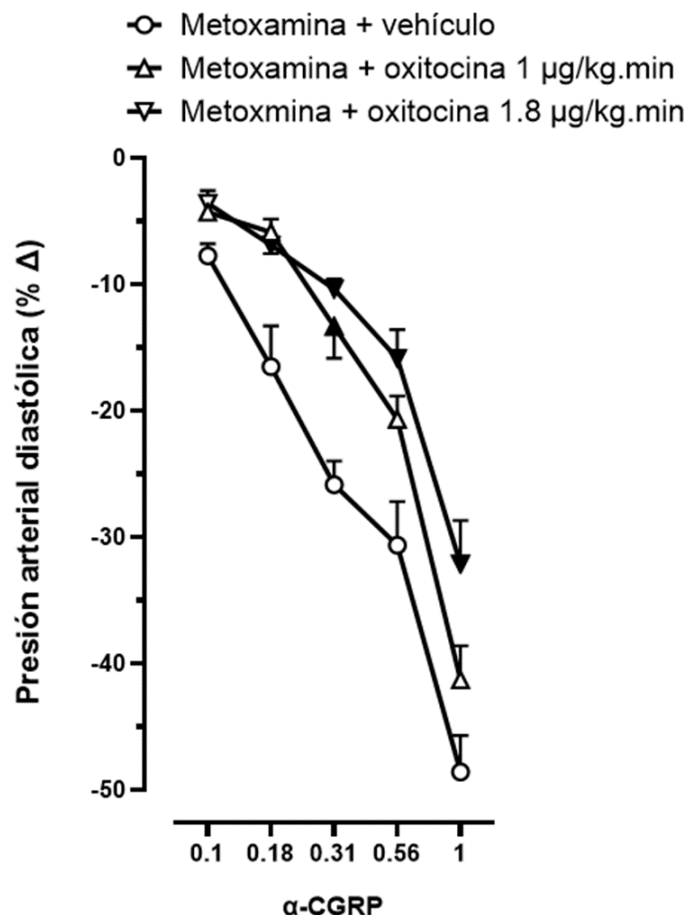


Figura 21 Análisis diferencial de los efectos producidos durante bolos i.v. de α -CGRP en presencia de una infusión continua de: (i) metoxamina + vehículo, (ii) metoxamina + oxitocina 1 $\mu\text{g/kg.min}$ y (iii) metoxamina + oxitocina 1.8 $\mu\text{g/kg.min}$ ($n=6$ por grupo). Los símbolos oscuros representan diferencias significativas ($p<0.05$) con relación al grupo con metoxamina + vehículo. ANOVA de dos vías de medidas repetidas seguido por una prueba post hoc de Student-Newman-Keuls.

7.6 Efecto *per se* de la administración de antagonistas L-368,899 y SR 49059 sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación del tono sensorial CGRPérgico

La figura 22 muestra los registros originales de las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación eléctrica del tono sensorial CGRPérgico en presencia del antagonista al OTR (L-368,899, 100 $\mu\text{g/kg}$) (Figura 22A) y con la administración de SR 49059 (antagonista $V_{1A}R$, 100 $\mu\text{g/kg}$) (Figura 22B), durante una infusión continua con hexametonio (2 mg/kg.min) y metoxamina (15 $\mu\text{g/kg.min}$). La

presencia de los antagonistas no muestra inhibición de las respuestas vasodepresoras, al no haber diferencias significativas entre estos con relación al grupo control ($p > 0.05$) (Figura 12).

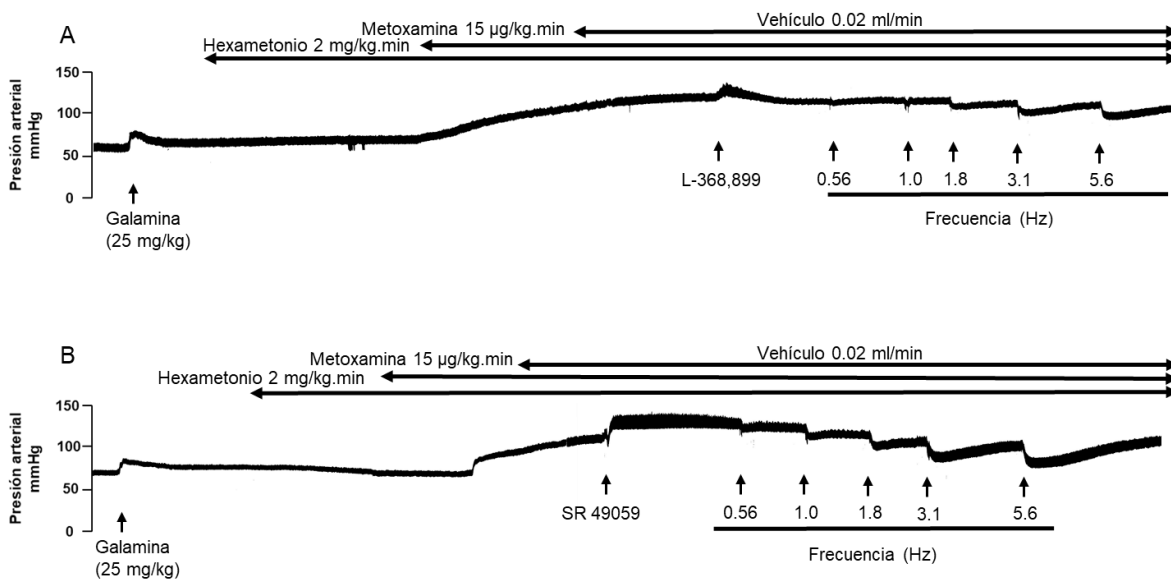


Figura 22. Respuestas vasodepresoras producidas por: estimulación eléctrica del tono sensorial vasodepresor CGRPérgico durante una infusión continua de metoxamina + vehículo en presencia de: (A) antagonista al OTR (L-368,899) o (B) al $V_{1A}R$ (SR 49059).

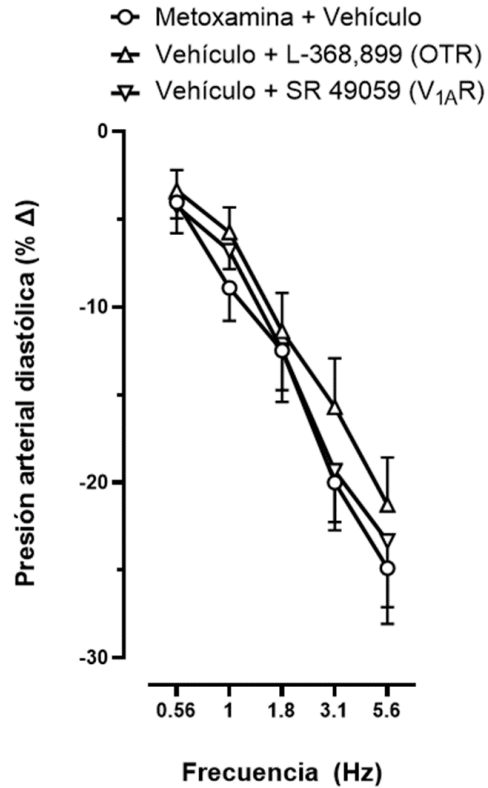


Figura 23. Análisis diferencial de los efectos producidos durante una infusión continua con metoxamina + vehículo en presencia de L-368,899 (antagonista OTR, $n=6$) y SR 49059 (antagonista V_{1A}R, $n=6$) sobre las respuestas vasodepresoras producidas por estimulación eléctrica sensorial CGRPérgica. Nótese que no hubo diferencias significativas en las respuestas producidas en los diferentes grupos. $p>0.05$ ANOVA de dos vías de medidas repetidas seguido por una prueba post hoc de Student-Newman-Keuls, utilizando los valores logarítmicos del % Δ .

7.7 Efecto inhibitor de la infusión continua con oxitocina sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación del tono sensorial CGRPérgico en presencia de los antagonistas L-368,899 y SR 49059

La figura 24 muestra los registros originales de las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación eléctrica del tono sensorial CGRPérgico durante una infusión continua de oxitocina 1 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ (Figura 24A) en presencia del: i) antagonista al OTR (L-368,899) (Figura 24B) o al V_{1A}R (SR 49059) (Figura 24C). Se puede observar que el efecto inhibitor de la oxitocina se mantiene en presencia del antagonista OTR ($p>0.05$), mientras que, este efecto es revertido en presencia del antagonista V_{1A}R ($p<0.05$ con relación al grupo con infusión continua con oxitocina). Adicionalmente, se puede observar

que la administración del SR 49059 produce un importante descenso en la presión arterial (Figura 24C), por otro lado, el porcentaje de cambio de la presión arterial diastólica es mayor en comparación con el grupo con metoxamina (15 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$) +vehículo ($p<0.05$) (Figura 25).

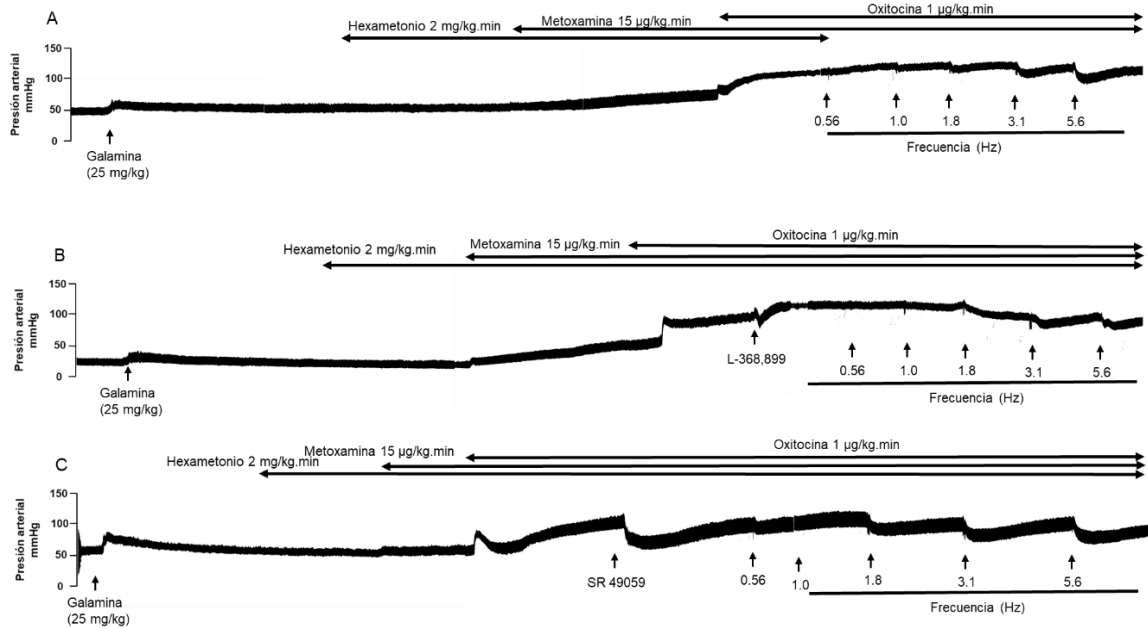


Figura 24 Registros originales que muestran las respuestas vasodepresoras producidas por: estimulación eléctrica del tono sensorial vasodepresor CGRPérgico durante: una infusión continua de oxitocina 1 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ en: (A) ausencia de antagonistas y en presencia de antagonista (B) del receptor OTR (L-368,899) o (C) del $V_{1A}R$ (SR 49059).

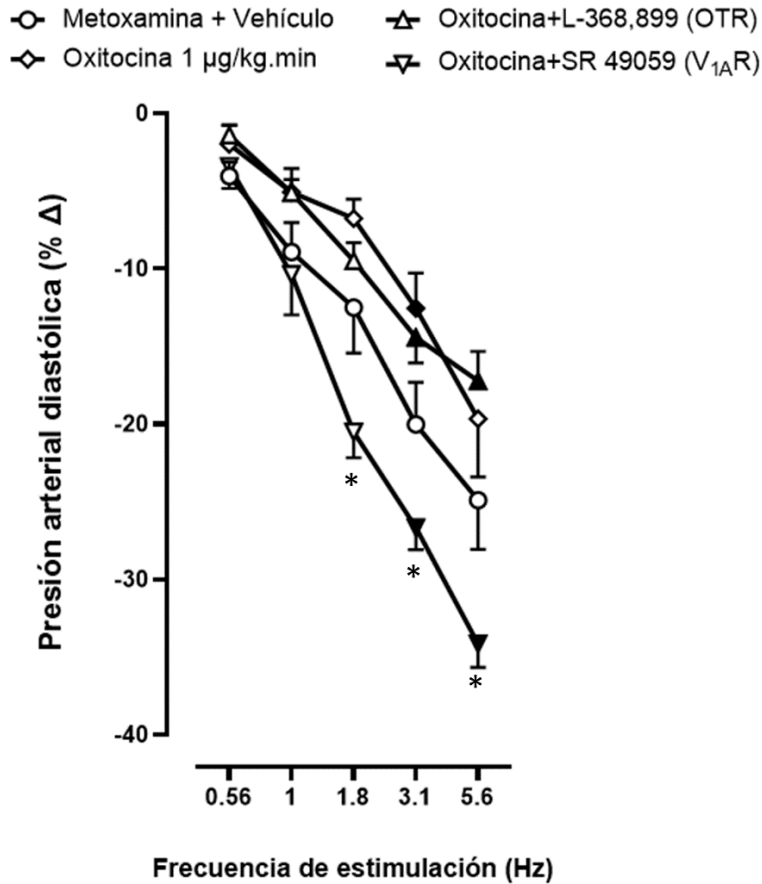


Figura 25 Análisis diferencial de los efectos producidos durante una infusión continua con: i) metoxamina + vehículo, ii) oxitocina 1 μg/kg.min iii) oxitocina 1 μg/kg.min + L-368,899 (antagonista OTR, n=6) y iv) oxitocina 1 μg/kg.min + SR 49059 (antagonista V_{1A}R, n=6) sobre las respuestas vasodepresoras producidas por estimulación eléctrica sensorial CGRPérgica. Los símbolos oscuros representan diferencias significativas en relación con el grupo metoxamina + vehículo ($p < 0.05$). Nótese que hubo diferencias significativas en las respuestas vasodepresoras producidas por la administración de SR 49059 con relación al grupo con oxitocina 1 μg/kg.min (*). $p < 0.05$ ANOVA de dos vías de medidas repetidas seguido por una prueba post hoc de Student-Newman-Keuls.

CAPÍTULO 8

DISCUSIÓN

8.1 General

El modelo experimental de la rata descerebrada y desmedulada es utilizado para el estudio de las respuestas cardiovasculares. En nuestro estudio este modelo se empleó para evaluar el efecto del sistema sensorial sobre la presión arterial ya que excluye los mecanismos de regulación a nivel central (*i.e.* mecanismos barorreflejos compensatorios) y de la influencia del sistema nervioso autónomo para la regulación de la presión arterial (Avilés-Rosas et al., 2017; Gillespie *et al.*, 1970). El proceso de descerebración y desmedulación produce descenso en los niveles basales de presión arterial (Figura 2); por lo tanto, para observar las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación eléctrica o bolos i.v de α -CGRP, se administra una infusión continua de metoxamina (agonista α_1 -adrenérgico), lo que mantiene de manera artificial niveles elevados de presión arterial. (Strosberg, 1993; Taguchi et al., 1992).

Los vasos sanguíneos están inervados por fibras autonómicas simpáticas localizadas en la región de T₇-T₉. La colocación de fibras simpáticas y sensoriales a nivel de T₉, produce activación simultánea durante la estimulación eléctrica. Por tal motivo, se administró una infusión continua de hexametonio(2 mg/kg.min; bloqueador de los receptores nicotínicos ganglionares) que abole las respuestas simpáticas por liberación de catecolaminas.

Bajo estas condiciones experimentales se llevó a cabo la estimulación selectiva de las fibras sensoriales que regulan respuestas vasodepresoras. Sin embargo, durante la estimulación eléctrica de la médula espinal se activan vías eferentes que se dirigen hacia el músculo esquelético lo que resulta en contracciones musculares. Para evitar este tipo de respuestas motoras se administró un bolo i.v. de galamina

(25 mg/kg), un bloqueador no despolarizante de receptores nicotínicos musculares.

Es importante mencionar que no se midió la actividad CGRPérgica directamente, pero la liberación de neurotransmisores (principalmente CGRP) por estimulación eléctrica es estimada indirectamente al medir las respuestas vasodepresoras (Taguchi et al., 1992; Villalón et al., 2007).

En este estudio, se describe el perfil farmacológico de la oxitocina sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por la estimulación eléctrica del tono sensorial CGRPérgico y la administración de bolos i.v de α -CGRP, el cual demuestra que la oxitocina es capaz de inhibir la liberación de CGRP a nivel preunional, esto es debido a la inhibición de las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación eléctrica selectiva del tono sensorial CGRPérgico a nivel de T₉-T₁₂ (Gillespie et al., 1970; Taguchi et al., 1992; Villalón et al., 2008). Durante la administración de bolos i.v de α -CGRP, la oxitocina tiene tendencia inhibidora lo cual sugiere que la oxitocina podría tener efectos en el músculo liso vascular.

8.2 Efectos hemodinámicos sistémicos producidos por la administración de bolos i.v. de oxitocina

Los cambios en la presión arterial sistémica observada durante la administración de bolos i.v de oxitocina (0.1, 0.3, 1, 3 y 10 μ g/kg) muestran incrementos de la presión, los cuales son dependientes de la dosis (Figura 5 y 6). El efecto vasopresor inducido por la administración de bolos i.v. de oxitocina, no se ve afectado por la administración de los vehículos de los antagonistas del OTR (L-368,899) o V_{1A}R (SR 49059) (solución salina al 0.9% y DMSO al 6.6% respectivamente). Sin embargo, el efecto vasopresor mediado por oxitocina es inhibido de manera significativa en presencia del SR 49059, mientras que las respuestas vasopresoras no se modificaron en presencia del L-368,899 (Figura 6).

Estos datos, sugieren que el efecto vasopresor de la oxitocina está mediado por la

unión al V_{1A}R y no al OTR.

Se ha descrito que la oxitocina y la vasopresina son péptidos de 9 aminoácidos cuya estructura es similar entre sí y solo difieren en 2 aminoácidos en las posiciones 3 y 9 (Gimpl y Fahrenholz, 2001). Esta similitud estructural permite la interacción de la oxitocina con el receptor a vasopresina V_{1A}R, el cual se encuentra a nivel de músculo liso vascular (Yazawa et al., 1996).

El receptor V_{1A}R está acoplado a proteínas G_{q11}; la unión del ligando con este receptor desencadena mecanismos transduccionales mediados por la activación de la fosfolipasa C. Esto promueve la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) a inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol, que a su vez activa la cinasa C de proteínas (PKC). La apertura de canales Ca²⁺ localizados en el retículo sarcoplásmico liso promueve la liberación de Ca²⁺ aumentando la concentración de este ion a nivel citoplasmático. El incremento en el Ca²⁺ activa diversas cinasas que generan la contracción del músculo liso vascular (McKay y Counts, 2020) e incrementan la resistencia vascular periférica.

8.3 Efecto inhibitorio de la infusión continua de oxitocina sobre las respuestas vasodepresoras, inducidas por estimulación eléctrica del tono sensorial CGRPérgico o la administración de bolos i.v. de α -CGRP.

Las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación eléctrica T₉-T₁₂ son mediadas por la liberación de CGRP presente en neuronas sensoriales que inervan los vasos sanguíneos (Taguchi *et al.*, 1992). De acuerdo con nuestros resultados, la oxitocina inhibe las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación eléctrica desde la dosis más baja (1 μ g/kg.min) mostrando un efecto inhibitorio dependiente de la dosis (1-10 μ g/kg.min, Figura 8). Sin embargo, durante la infusión continua con oxitocina, con las dosis de 1.8, 3 y 10 μ g/kg.min se observa una elevación de la presión arterial sistólica (Figura 7). Por este motivo, el efecto inhibitorio de las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación eléctrica,

puede deberse no solo a mecanismos que involucran la liberación de CGRP, sino, por aumento en la fuerza de contracción del músculo cardíaco.

El efecto inotrópico positivo observado en nuestros resultados puede deberse a la localización del OTR a nivel cardíaco (Petersson, 2002). Al igual que el V_{1A}R, el OTR está acoplado a proteínas G_{q11} (Gimpl y Fahrenholz, 2001) cuya activación permite el incremento de la concentración intracelular de Ca²⁺ en los cardiomiocitos, lo que permitiría: (i) la unión de este ion a la troponina C de la actina, lo que permite que las cabezas de miosina formen puentes cruzados de unión fuertes con las moléculas de actina; y (ii) la interacción de la cabeza de miosina con la actina permitiendo el acortamiento del sarcómero y generando la contracción del músculo cardíaco (Douglas *et al.*, 2019).

Este efecto inotrópico positivo no se produjo durante la infusión continua de oxitocina con la dosis de 1 µg/kg.min (Figura 7). En este sentido, la inhibición de las respuestas vasodepresoras durante la estimulación eléctrica selectiva del tono sensorial CGRPérgico, puede deberse a la presencia de receptores sensibles a oxitocina a nivel preunional; y, durante la administración de bolos i.v de α-CGRP, la infusión continua con oxitocina mostró una tendencia inhibidora con la dosis de 1 µg/kg.min (Figura 21). Además, durante la administración de una infusión continua con 1.8 µg/kg.min de oxitocina, el efecto inhibitor fue mayor. Por lo tanto, la atenuación de las respuestas vasodepresoras podría generarse a nivel preunional como en músculo liso vascular.

8.4 Efecto inhibidor de la infusión continua de oxitocina sobre las respuestas vasodepresoras, inducidas por estimulación eléctrica del tono sensorial CGRPérgico en presencia de los antagonistas al OTR (L-368,899) o al V_{1A}R (SR 49059).

Como se mencionó anteriormente, la oxitocina administrada en infusión continua tiene efecto inhibidor sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación eléctrica selectiva del tono sensorial CGRPérgico. Nuestros resultados mostraron que el efecto inhibidor de la oxitocina es dependiente de la dosis (Figura 19), en donde, las dosis de 1.8, 3 y 10 µg/kg.min presentaron un importante aumento de la presión arterial sistólica, mientras que con la dosis de 1 µg/kg.min este efecto no se presentó. Por tal razón, se utilizó la dosis 1 µg/kg.min de oxitocina para el análisis farmacológico de los receptores involucrados en dicha inhibición. Durante el análisis de los efectos inhibidores de la oxitocina sobre las respuestas vasodepresoras CGRPérgicas en presencia de antagonistas a OTR y V_{1A}R, se observó que el efecto inhibidor se mantenía en presencia del antagonista al OTR (L-368,899), mientras que, fue revertido por el antagonista SR 49059 (V_{1A}R). Estos datos indican que el efecto inhibidor de la oxitocina se debe a activación del V_{1A}R.

Como se mencionó anteriormente, la oxitocina tiene homología estructural con la vasopresina que permite la unión de la oxitocina con el V_{1A}R (Yazawa et al., 1996). Nuestros registros muestran un importante descenso de los niveles de presión arterial diastólica al administrar el SR 49059. Esto puede deberse a que el efecto vasopresor de la oxitocina es inhibido al producir antagonismo del V_{1A}R (Wiegand y Gimpl, 2012, Japundžić-Žigon, et al. 2020). Adicionalmente, el hecho de que en presencia del SR 49059 se produjeron respuestas vasodepresoras mayores (en comparación con el grupo de metoxamina + vehículo) sugiere que el SR 49059 produce una potenciación de las respuestas vasodepresoras en presencia de la infusión con oxitocina. Este efecto vasodepresor aumentado puede deberse al antagonismo producido por el SR 49059 sobre los V_{1A}R; esto evitaría el efecto

vasoconstrictor sistémico de la oxitocina (1 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$) (mediado por $V_{1A}R$; Figura 15) e incluso, a la vasopresina endógena y facilitaría las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación del tono sensorial vasodepresor CGRPérgico. Serradeil-Le Gal y cols (1993) describieron el efecto de la administración del SR 49059 sobre la presión arterial. Los autores demostraron que la administración del antagonista $V_{1A}R$ en ratas normotensas produce descenso de la presión arterial diastólica. El efecto sobre la presión arterial diastólica durante la administración de una infusión continua con vasopresina también fue descrito en el modelo de rata descerebrada y desmedulada. Estos resultados sugieren que el efecto inhibitor de la oxitocina puede ejercerse a nivel preunional, así como en el músculo liso vascular, sin embargo, los efectos de la oxitocina son poco específicos debido a que no están mediados por la interacción con su propio receptor.

CAPÍTULO 9

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo, se describe por primera vez el efecto de la oxitocina sobre la modulación en la liberación de CGRP de las fibras sensoriales perivasculares a nivel sistémico. El análisis del perfil farmacológico de la oxitocina sugiere la presencia de receptores sensibles a oxitocina a nivel preunional que son capaces de modular la liberación de CGRP de las fibras sensoriales perivasculares. Sin embargo, nuestros resultados también nos permiten plantear que el efecto inhibitor de la oxitocina no sólo es a nivel preunional, sino también a nivel del músculo liso vascular con el uso de dosis crecientes de oxitocina. Los experimentos aquí mostrados sugieren que la oxitocina es capaz de interactuar con el receptor a $V_{1A}R$, produciendo no sólo una inhibición de las respuestas vasopresoras inducidas por la oxitocina, sino también una inhibición de las respuestas vasodepresoras CGRPérgicas. Por otro lado, la inhibición en la liberación de CGRP y la interacción con los receptores $V_{1A}R$ son mecanismos que sugieren que la oxitocina puede tener un efecto prohipertensivo a nivel de la vasculatura sistémica. Finalmente, este estudio amplía el conocimiento sobre los efectos de la oxitocina sobre la modulación de CGRP a nivel de la vasculatura sistémica. Sin embargo, los mecanismos involucrados en esta modulación aún deben ser dilucidados de manera más profunda; por ejemplo, investigar la participación de otros mecanismos a nivel preunional como la participación de canales TRPV1, así como el estudio de los mecanismos involucrados en el efecto inhibitor a nivel de músculo liso vascular.

REFERENCIAS

- Adams, J. C., Mroz, E. A., y Sewell, W. F. (1987). A possible neurotransmitter role for CGRP in a hair-cell sensory organ. *Brain Research*, 419(1–2), 347–351.
- Alberi, S., Dreifuss, J. J., y Raggenbass, M. (1997). The oxytocin-induced inward current in vagal neurons of the rat is mediated by G protein activation but not by an increase in the intracellular calcium concentration. *European Journal of Neuroscience*, 9(12), 2605–2612.
- Akerman, S., Williamson, D.J. y Goadsby, P.J. (2002). Nitric oxide synthase inhibitors can antagonize neurogenic and calcitonin gene-related peptide induced dilation of dural meningeal vessels. *British Journal of Pharmacology* 137(1),62-68.
- Arulmani, U. (2004). Calcitonin gene-related peptide and migraine: Implications for therapy. Ph.D. Thesis, Erasmus University, Rotterdam. Holanda.
- Arulmani, U., MaassenVanDenBrink, A., Villalón, C.M. y Saxena, P.R. (2004). Calcitonin gen-related peptide and its role in migraine pathophysiology. *Eur J Pharmacol* 500(1-3),315-330.
- Avilés-Rosas, V. H., Rivera-Mancilla, E., Marichal-Cancino, B. A., Manrique-Maldonado, G., Altamirano-Espinoza, A. H., Maassen Van Den Brink, A., y Villalón, C. M. (2017). Olcegepant blocks neurogenic and non-neurogenic CGRPergic vasodepressor responses and facilitates noradrenergic vasopressor responses in pithed rats. *British Journal of Pharmacology*, 174(13), 2001–2014.
- Bayliss, W. M. (1901). On the origin from the spinal cord of the vaso-dilator fibres of the hind-limb, and on the nature of these fibres. *The Journal of Physiology*, 26(3–4), 173–209.
- Bell, D. y McDermott, B.J. (1996). Calcitonin gene-related peptide in the cardiovascular system: characterization of receptor populations and their (patho) physiological significance. *Pharmacological Reviews* 48(2), 253-288.
- Brain, S. D., Williams, T. J., Tippins, J. R., Morris, H. R., y MacIntyre, I. (1985). Calcitonin

gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature*, 313(5997), 54–56.

Brain, Susan D., y Grant, A. D. (2004). Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. *Physiological Reviews*, 84(3), 903–934.

Brain, S.D. y Cox, H.M. (2006). Neuropeptides and their receptors: innovative science providing novel therapeutic targets. *British Journal of Pharmacology* 147(Suppl 1),S202- S211.

Brunton, Laurence; Hilal Dandan, Randa; Knollman, B. (2019). Bases Farmacológicas de la Terapeutica. In *Goodman y Gilman Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica* (décimatercera edición), McGRAW-HILL, 782-785.

Chatterjee, O., Patil, K., Sahu, A., Gopalakrishnan, L., Mol, P., Advani, J., ... Prasad, T. S. K. (2016). An overview of the oxytocin-oxytocin receptor signaling network. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 10(4), 355–360.

Dampney, R. A. L. (2016). Central neural control of the cardiovascular system: Current perspectives. *Advances in Physiology Education*, 40(3), 283–296.

De Vries, P., Villalón, C.M. y Saxena, P.R. (1999). Pharmacological aspects of experimental headache models in relation to acute antimigraine therapy. *European Journal of Pharmacology* 375(1-3):61-74.

Douglas P. Zipes, Peter Libby, Robert O. Bonow, Douglas L. Mann y Gordon F. Tomaselli (2019). Braunwald. Tratado de cardiología. Texto de medicina cardiovascular, 11.^a edición, Elsevier, 418-435.

Edvinsson, L., Alm, R., Shaw, D., Rutledge, R.Z., Koblan, K.S., Longmore, J. y Kane, S.A. (2002). Effect of the CGRP receptor antagonist BIBN4096BS in human cerebral, coronary and omental arteries and in SK-N-MC cells. *European Journal of Pharmacology* 434(1-2),49-53.

Ferrari, M.D. y Saxena, P.R. (1993). On serotonin and migraine: a clinical and pharmacological review. *Cephalalgia* 13(3),151-165.

Fisher, L.A., Kikkawa, D.O., Rivier, J.E., Amara, S.G., Evans, R.M., Rosenfeld, M.G.,

- Vale, W.W. y Brown, M.R. (1983). Stimulation of noradrenergic sympathetic outflow by calcitonin gene-related peptide. *Nature* 305(5934),534-536.
- Gardiner, S.M., Compton, A.M. y Bennett, T. (1989). Regional hemodynamic effects of calcitonin gene-related peptide. *American Journal of Physiology* 256(2 Pt 2), R332-R338.
- Gillespie, J.S., MacLaren, A. y Pollock, D. (1970). A method of stimulating different segments of the autonomic outflow from the spinal column to various organs in the pithed cat and rat. *British Journal of Pharmacology* 40(2),257-267.
- Gimpl, G., y Fahrenholz, F. (2001). The oxytocin receptor system: Structure, function, and regulation. *Physiological Reviews*, 81(2), 629–683.
- Goadsby, P.J., Lipton, R.B. y Ferrari, M.D. (2002). Migraine-current understanding and treatment. *New England Journal of Medicine* 346(4),257-270.
- Gong, L., Gao, F., Li, J., Li, J., Yu, X., Ma, X., ... Liu, C. Y. (2015). Oxytocin-induced membrane hyperpolarization in pain-sensitive dorsal root ganglia neurons mediated by Ca²⁺/nNOS/NO/KATP pathway. *Neuroscience*, 289, 417–428.
- González-Hernández, A., Muñoz-Islas, E., Lozano-Cuenca, J., Ramírez-Rosas, M. B., Sánchez-López, A., Centurión, D., ... Villalón, C. M. (2010). Activation of 5-HT_{1B} receptors inhibits the vasodepressor sensory CGRPergic outflow in pithed rats. *European Journal of Pharmacology*, 637(1–3), 131–137.
- González-Hernández, A., Manrique-Maldonado, G., Lozano-Cuenca, J., Muñoz-Islas, E., Centurión, D., Maassen VanDenBrink, A., y Villalón, C. M. (2011). The 5-HT₁ receptors inhibiting the rat vasodepressor sensory CGRPergic outflow: Further involvement of 5-HT_{1F}, but not 5-HT_{1A} or 5-HT_{1D}, subtypes. *European Journal of Pharmacology*, 659(2–3), 233–243.
- González-Hernández, A., Rojas-Piloni, G., y Condés-Lara, M. (2014). Oxytocin and analgesia: Future trends. *Trends in Pharmacological Sciences*, 35(11), 549–551.
- González-Hernández, A., Marichal-Cancino, B. A., Lozano-Cuenca, J., López-Canales, J. S., Muñoz-Islas, E., Ramírez-Rosas, M. B., y Villalón, C. M. (2016).

Heteroreceptors Modulating CGRP Release at Neurovascular Junction: Potential Therapeutic Implications on Some Vascular-Related Diseases. *BioMed Research International*, 2016, 1-17.

González-Hernández, A., Manzano-García, A., Martínez-Lorenzana, G., Tello-García, I. A., Carranza, M., Arámburo, C., y Condés-Lara, M. (2017). Peripheral oxytocin receptors inhibit the nociceptive input signal to spinal dorsal horn wide-dynamic-range neurons. *Pain*, 158 (11), 2117-2128.

González-Hernández, A., Lozano-Cuenca, J., Marichal-Cancino, B. A., MaassenVanDenBrink, A., y Villalón, C. M. (2018). Dihydroergotamine inhibits the vasodepressor sensory CGRPergic outflow by prejunctional activation of α 2-adrenoceptors and 5-HT₁ receptors. *Journal of Headache and Pain*, 19(1),40.

González-Hernández, A., Espinosa De Los Monteros-Zuñiga, A., Martínez-Lorenzana, G., y Condés-Lara, M. (2019). Recurrent antinociception induced by intrathecal or peripheral oxytocin in a neuropathic pain rat model. *Experimental Brain Research*, 237(11), 2995–3010.

González-Hernández, A., Condés-Lara, M., García-Boll, E., y Villalón, C. M. (2021). An outlook on the trigeminovascular mechanisms of action and side effects concerns of some potential neuropeptidergic antimigraine therapies. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 17(2),179-199.

Gravati, M., Busnelli, M., Bulgheroni, E., Reversi, A., Spaiardi, P., Parenti, M., ... Chini, B. (2010). Dual modulation of inward rectifier potassium currents in olfactory neuronal cells by promiscuous G protein coupling of the oxytocin receptor. *Journal of Neurochemistry*, 114(5), 1424–1435.

Gutkoswska, M. J., y Antunes-Rodrigues, J. (2014). The Role of Oxytocin in Cardiovascular Protection. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 47(3), 206–214.

Guyton y Hall. (2011). Tratado de fisiología médica (decimosegunda edición).

Elsevier,91-104.

Hagner, S., Stahl, U., Knoblauch, B., McGregor, G., y Lang, R. (2002). Calcitonin receptor-like receptor: Identification and distribution in human peripheral tissues. *Cell and Tissue Research*, 310(1), 41–50.

Han, S.P., Naes, L. y Wesfall, T.C. (1990a). Calcitonin gene-related peptide is the endogenous mediator of nonadrenergic-noncholinergic vasodilation in rat mesentery. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 255(2),423-428.

Han, S.P., Naes, L. y Wesfall, T.C. (1990b). Inhibition of periarterial nerve stimulation-induced vasodilation of the mesenteric arterial bed by CGRP (8-37) and CGRP receptor desensitization. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 168(2),786-791.

Hasbak, P., Eskesen, K. y Edvinsson, L. (2005). Increased α CGRP potency and CGRP-receptor antagonist affinity in isolated hypoxic porcine intramyocardial arteries. *British Journal of Pharmacology* 145(5),646-655.

Hobo, S., Hayashida, K. I., y Eisenach, J. C. (2012). Oxytocin inhibits the membrane depolarization-induced increase in intracellular calcium in capsaicin sensitive sensory neurons: A peripheral mechanism of analgesic action. *Anesthesia and Analgesia*, 114(2), 442–449.

Japundžić-Žigon, N., Lozić, M., Šarenac, O., y Murphy, D. (2020). Vasopressin y Oxytocin in Control of the Cardiovascular System: An Updated Review. *Current Neuropharmacology*, 18(1), 14–33.

Julius, D. y Basbaum, A.I. (2001). Molecular mechanism of nociception. *Nature* 413(6852),203-210.

Kawasaki, H., Tkasaki, K., Saito, A. y Goto, K. (1988). Calcitonin gene-related peptide acts as a novel vasodilator neurotransmitter in mesenteric resistance vessels of the rat. *Nature* 335(6186),164-167 .

Kawasaki, H., Nuki, C., Saito, A. y Takasaki, A. (1990a). Adrenergic modulation of

calcitonin gene-related peptide (CGRP)-containing nerve-mediating vasodilation in the rat mesenteric resistance vessel. *Brain Research* 506(2),287-290.

Kawasaki, H., Saito, A. y Takasaki, K. (1990b). Age-related decrease of calcitonin gene-related peptide-containing vasodilator innervation in the mesenteric resistance vessel of the spontaneously hypertensive rat. *Circulation research* 67(3),733-743.

Kaygisiz, Z., Erksap, N., Uyar, R., Kabadere, S., Kabadere, T.E., Dernek, S. (2003). The effect of adrenomedullin, amylin fragment 8-37 and calcitonin gene related peptide on contractile force, heart rate and coronary perfusion pressure in isolated rat hearts. *Acta Physiologica Hungarica* 90(2),133-146.

Kleinman, L.I. y Radford, E.P. Jr. (1964). Ventilation standards for small mammals. *Journal of Applied Physiology* 19,360-362.

Li, Y., Fiscus, R. R., Wu, J., Yang, L., y Wang, X. (1997). The antiproliferative effects of calcitonin gene-related peptide in different passages of cultured vascular smooth muscle cells. *Neuropeptides*, 31(5), 503–509.

Lozano-Cuenca, J., González-Hernández, A., Muñoz-Islas, E., Sánchez-López, A., Centurión, D., Cobos-Puc, L. E., y Villalón, C. M. (2009). Effect of some acute and prophylactic antimigraine drugs on the vasodepressor sensory CGRPergic outflow in pithed rats. *Life Sciences*, 84(5–6), 125–131.

Lundberg, J.M. (1996). Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. *Pharmacological Reviews* 48(1),113-178.

McKay, E. C., y Counts, S. E. (2020). Oxytocin Receptor Signaling in Vascular Function and Stroke. *Frontiers in Neuroscience*, 14(September), 1–18.

McLatchie, L. M., Fraser, N. J., Main, M. J., Wise, A., Brown, J., Thompson, N., ... Foord, S. M. (1998). RAMPS regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature*, 393(6683), 333–339.

Manrique-Maldonado, G., González-Hernández, A., Altamirano-Espinoza, A. H., Marichal-Cancino, B. A., Ruiz-Salinas, I., y Villalón, C. M. (2014). The Role of Pre-

junctional D2-like Receptors Mediating Quinpirole-Induced Inhibition of the Vasodepressor Sensory CGRPergic Out-flow in Pithed Rats. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 114(2), 174–180.

Manrique-Maldonado, G., Altamirano-Espinoza, A. H., Marichal-Cancino, B. A., Rivera-Mancilla, E., Avilés-Rosas, V., y Villalón, C. M. (2015). Pharmacological evidence that histamine H3 receptors inhibit the vasodepressor responses by selective stimulation of the rat perivascular sensory CGRPergic outflow. *European Journal of Pharmacology*, 754, 25–31.

Manrique-Maldonado, G., Altamirano-Espinoza, A. H., Rivera-Mancilla, E., Hernández-Abreu, O., y Villalón, C. M. (2019). Activation of Dopamine D3 Receptor Subtypes Inhibits the Neurogenic Systemic Vasodilation Induced by Stimulation of the Perivascular CGRPergic Discharge. *ACS Chemical Neuroscience*, 10(8), 3751–3757.

Miki, K., Yoshimoto, M., y Tanimizu, M. (2003). Acute shifts of baroreflex control of renal sympathetic nerve activity induced by treadmill exercise in rats. *Journal of Physiology*, 548(1), 313–322.

Mulderry, P.K., Ghatei, M.A., Rodrigo, J., Allen, J.M., Rosenfeld, M.G., Polak, J.M. y Bloom, S.R. (1985). Calcitonin gene-related peptide in cardiovascular tissues of the rat. *Neuroscience* 14(3),947-954.

Petersson, M. (2002). Cardiovascular effects of oxytocin. *Progress in Brain Research*, 139, 281–288.

Pierce, M. L., Mehrotra, S., Mustoe, A. C., French, J. A., y Murray, T. F. (2019). A comparison of the ability of Leu8- And pro8-oxytocin to regulate intracellular Ca²⁺ and Ca²⁺-activated K⁺ channels at human and marmoset oxytocin receptors S. *Molecular Pharmacology*, 95(4), 376–385.

Pozsgai, G., Hajna, Z., Bagoly, T., Boros, M., Kemény, Á., Materazzi, S., ... Pintér, E. (2012). The role of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptor activation in hydrogen-sulphide-induced CGRP-release and vasodilation. *European Journal of Pharmacology*, 689(1–3), 56–64.

- Ramos Romero, M. L., y Sobrino Mejía, F. E. (2016). Péptido relacionado con el gen de la calcitonina: un neuropéptido clave en la migraña. *Revista de Neurología*, 63(10), 460.
- Richardson, J.D. y Vasko, M.R. (2002). Cellular mechanism of neurogenic inflammation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 302(3):839-845.
- Rubino, A. y Burnstock, G. (1996). Capsaicin-sensitive sensory-motor neurotransmission in the peripheral control of cardiovascular function. *Cardiovascular Research* 31(4),467-479.
- Russell, F. A., King, R., Smillie, S. J., Kodji, X., y Brain, S. D. (2014). Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, 94(4), 1099–1142.
- Russo, A. F. (2015). Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP): A New Target for Migraine. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 55, 533–552.
- Saxena, P.R. y Ferrari, M.D. (1989). 5-HT(1)-like receptor agonist and the pathophysiology of migraine. *Trends in Pharmacological Sciences* 10(5),200-204.
- Serradeil-Le Gal, C., Wagnon, J., Garcia, C., Lacour, C., Guiraudou, P., Christophe, B., ... Jard, S. (1993). Biochemical and pharmacological properties of SR 49059, a new, potent, nonpeptide antagonist of rat and human vasopressin V(1a) receptors. *Journal of Clinical Investigation*, 92(1), 224–231.
- Shen, Y.T., Pittman, T.J., Buie, P.S., Bolduc, D.L., Kane, S.A., Koblan, K.S., Gould, R.J. y Lynch Jr. J.J. (2001). Functional role of α -calcitonin gene-related peptide in the regulation of the cardiovascular system. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 298(2),551-558.
- Shipley, R.E. y Tilden, J.H. (1947). A pithed rat preparation suitable for assaying pressor substances. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 64(4),453-455.
- Stauss, H. M. (2002). Baroreceptor reflex function. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 283(2),R284-6.

- Stoop, R. (2012). Neuromodulation by Oxytocin and Vasopressin. *Neuron*, 76(1), 142–159.
- Strosberg, A. D. (1993). Structure, function, and regulation of adrenergic receptors. *Protein Science*, 2(8), 1198–1209.
- Taguchi, T., Kawasaki, H., Imamura, T., y Takasaki, K. (1992). Endogenous calcitonin gene-related peptide mediates nonadrenergic noncholinergic depressor response to spinal cord stimulation in the pithed rat. *Circulation Research*, 71(2), 357–364.
- Tschopp, F. A., Henke, H., Petermann, J. B., Tobler, P. H., Janzer, R., Hökfelt, T., ... Fischer, J. A. (1985). Calcitonin gene-related peptide and its binding sites in the human central nervous system and pituitary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(1), 248–252.
- Tzabazis, A., Mechanic, J., Miller, J., Klukinov, M., Pascual, C., Manering, N., ... Yeomans, D. C. (2016). Oxytocin receptor: Expression in the trigeminal nociceptive system and potential role in the treatment of headache disorders. *Cephalalgia*, 36(10), 943–950.
- Villalón, C.M., Contreras, J., Ramírez-San Juan, E., Castillo, C., Perusquia, M. y Terrón, J.A. (1995a). Characterization of prejunctional 5-HT receptors mediating inhibition of sympathetic vasopressor responses in the pithed rat. *British Journal of Pharmacology* 116(8),3330-3336 .
- Villalón, C.M., Contreras, J., Ramírez-San Juan, E., Castillo, C., Perusquia, M., López-Muñoz, F.J. y Terrón, J.A. (1995b). 5-hydroxytryptamine inhibits pressor responses to preganglionic sympathetic nerve stimulation in pithed rats. *Life Sciences* 57(8),803-812.
- Villalón, C.M., Centurión, D., Rabelo, G., De Vries, P., Saxena, P.R. y Sánchez-López, A. (1998). The 5-HT₁-like receptors mediating inhibition of sympathetic vasopressor outflow in the pithed rats: operacional correlation with 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} subtypes. *British Journal of Pharmacology* 124(5),1001-1011.
- Villalón, C.M., Centurión, D., Valdivia, L.F., DeVries, P. y Saxena, P.R. (2002). An

introduction to migraine: from ancient treatment to functional pharmacology and antimigraine therapy. *Proceedings of the Western Pharmacology Society* 45,199-210.

Villalón, C.M., Albarrán-Juárez, J.A., Lozano-Cuenca, J., Pertz, H.H., Görnemann, T. y Centurión, D. (2008). Pharmacological profile of the clonidine-induced inhibition of vasodepressor sensory outflow in pithed rats: correlation with α 2A/2C-adrenoceptors. *British Journal of Pharmacology*.154(1), 51-59.

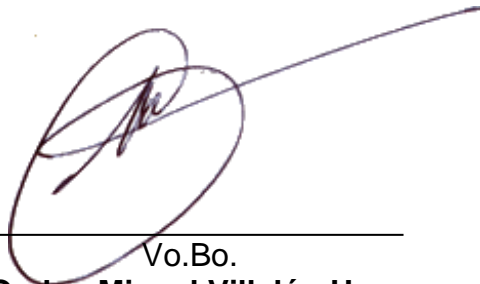
Wang, W., Sun, W., y Wang, X. (2004). Intramuscular gene transfer of CGRP inhibits neointimal hyperplasia after balloon injury in the rat abdominal aorta. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 287(4),H1582–1589.

Wiegand, V., y Gimpl, G. (2012). Specification of the cholesterol interaction with the oxytocin receptor using a chimeric receptor approach. *European Journal of Pharmacology*, 676(1–3), 12–19.

Williamson, D.J. y Hargreaves, R.J. (2001) Neurogenic inflammation in the context of migraine. *Microscopy Research and Technique* 53(3),167-178.

Wimalawansa, S.J. (1996). Calcitonin gene-related peptide and its receptors: molecular genetics, physiology, pathophysiology, and therapeutic potentials. *Endocrine Reviews* 17(5),533-585.

Yazawa, H., Hirasawa, A., Horie, K., Saita, Y., Iida, E., Honda, K., y Tsujimoto, G. (1996). Oxytocin receptors expressed and coupled to Ca²⁺ signalling in a human vascular smooth muscle cell line. *British Journal of Pharmacology*, 117(5), 799–804.



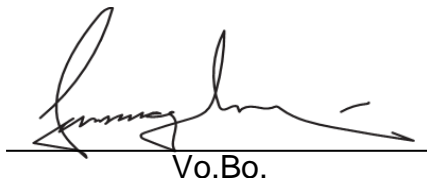
Vo.Bo.

Dr. Carlos Miguel Villalón Herrera
Investigador Cinvestav "3F"
Departamento de Farmacobiología
Director interno



Vo.Bo.

Dr. Abimael González Hernández
Investigador Titular "A" UNAM
Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología
Co-director



Vo.Bo.

Dr. Emilio Javier Galván Espinosa
Investigador Cinvestav "3C"
Departamento de Farmacobiología
Sinodal interno



Vo.Bo.

Dr. José Antonio Arias Montaña
Investigador Cinvestav "3E"
Departamento de Fisiología y Biofísica y Neurociencias
Sinodal externo