



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

SEDE SUR

Departamento de Farmacobiología

Perfil farmacológico de los receptores purinérgicos P2Y que modulan, en respuesta al ADP β S, el tono sensorial vasodepresor CGRPérgico en la rata

Tesis que presenta:

Med. Cir. y Psic. Alejandro Daniel Miguel Martínez

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias

en

Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Director de Tesis:

Dr. Carlos Miguel Villalón Herrera

Ciudad de México

Octubre, 2022



La presente tesis fue realizada bajo la dirección del Dr. Carlos Miguel Villalón Herrera, haciendo uso de las instalaciones correspondientes al laboratorio 5 perteneciente al Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Sede sur), con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) mediante la beca de maestría con número de CVU 1077191.

AGRADECIMIENTOS

Ante todo, quiero hacer un reconocimiento de gratitud a las personas que intervinieron directa e indirectamente en este momento tan importante en mi vida.

A mi familia.

- A mis padres la Dra. Ma. del Carmen Martínez Lira y Dr. Abel Miguel Soriano por su comprensión, cariño y apoyo en todo momento.
- A mi hermana la Dra. Sandra Elizabeth Miguel Martínez, a la cual considero mi gran confidente, mi gran amiga y cuyo apoyo desinteresado ha sido muy importante para mí.
- A mi sobrino Ian Rendón Miguel quien se desarrolló, nació y crece en medio de una pandemia que puso en peligro su vida desde antes de nacer, pero que con cada día que pasa me demuestra los retos a los cuales nos debemos de enfrentar y ahora se ha convertido en una inspiración para mí.

A mis amigos.

- A Ricardo Valencia Martínez, más que un amigo un hermano, muchas gracias por tu apoyo y por esos grandes consejos.
- En memoria a mi gran amigo el Dr. Jorge Alberto López Ávila por la confianza, los consejos y las expectativas puestas en mí; jamás olvidaré todo lo que aprendí de ti.
- Dr. Agustín Melo Carrillo quien ha puesto la confianza en mí y por todo su apoyo.
- A Alejandro Rivera Martínez, Brenda Betancourt y Frida Cervantes.

AGRADECIMIENTOS

A mis compañeros de laboratorio.

- Al Dr. Carlos Miguel Villalón Herrera (jefe del laboratorio 5), por brindarme sus conocimientos, comprensión, consejos tanto a nivel profesional como a nivel personal, así como la confianza puesta en mí, le reitero mi admiración.
- A la M. en C. Belinda Villanueva Castillo (auxiliar de investigación del laboratorio 5) por todo el apoyo brindado tanto a distancia como de forma presencial, por sus buenos consejos y la convivencia amena durante mi estancia en el laboratorio.
- Al Sr. Mauricio Villasana (técnico del laboratorio 5), por todo el apoyo brindado para la realización de los experimentos.
- Al Dr. Eduardo Rivera Mancilla por todo el tiempo que ha dedicado para la revisión de mis escritos, así como sus comentarios durante nuestros seminarios.
- A la Dra. Norma Leticia Gómez Viquez y al Dr. Guillermo Manuel Ceballos Reyes quienes amablemente aceptaron fungir como mis sinodales, por sus comentarios, consejos, su apoyo y todo su conocimiento el cual ha enriquecido mi trabajo.
- A mi compañero de laboratorio, Q.F.B. Juan Linares Bedolla, y a todos mis compañeros de generación por todo su apoyo, consejos y la buena convivencia.
- A todos los investigadores del Departamento de Farmacobiología, quienes nos han brindado conocimientos que han contribuido a nuestra formación profesional.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los receptores purinérgicos.....	22
Tabla 2. Porcentaje de cambio de la PAD por estimulación eléctrica en grupos control.....	35
Tabla 3. PAD pre-post tratamiento con infusión <i>i.v.</i> continua de vehículo o ADPβS.....	37
Tabla 4. Porcentaje de cambio de la PAD por estimulación eléctrica en grupos con infusión <i>i.v.</i> continua de ADPβS.....	38
Tabla 5. Porcentaje de cambio de la PAD por la administración de α-CGRP exógeno.....	39
Tabla 6. Porcentaje de cambio de la PAD por estimulación eléctrica en grupos con administración de bolos <i>i.v.</i> de antagonistas P2Y.....	41
Tabla 7. Porcentaje de cambio de la PAD por estimulación eléctrica en grupos con administración de bolos <i>i.v.</i> de antagonistas P2Y + infusión <i>i.v.</i> continua de ADPβS.....	43
Tabla 8. Afinidades de ligandos P2Y por los receptores P2Y ₁ , P2Y ₁₂ y P2Y ₁₃	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Papel del sistema circulatorio en la difusión de moléculas en los tejidos.....	13
Figura 2 - Flujo sanguíneo a través de un vaso sanguíneo.....	14
Figura 3 – Liberación de CGRP a través de las fibras nerviosas sensoriales Aδ y C.....	16
Figura 4 – Mecanismos transduccionales del CGRP.	18
Figura 5 – Modulación de la liberación preunional de CGRP.	19
Figura 6 – Mecanismos transduccionales de los receptores purinérgicos P2.	21
Figura 7 – Relación de los receptores purinérgicos con el sistema cardiovascular.....	25

Figura 8 - Procedimiento experimental para evaluar el efecto farmacológico del ADPβS sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por la estimulación del tono sensorial CGRPérgico.	32
Figura 9 - Procedimiento experimental para evaluar el efecto farmacológico del ADPβS sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por bolos i.v. de α-CGRP exógeno.....	33
Figura 10- Efecto de la estimulación eléctrica selectiva de los nervios sensoriales CGRPérgicos sobre la presión arterial diastólica	36
Figura 11 - Efecto inhibitorio de la administración de infusiones i.v. continuas de (A) ADPβS (3 μg/kg·min) (B) ADPβS 5.6 μg/kg·min y (C) ADPβS 10 μg/kg·min sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación eléctrica del tono sensorial vasodepresor CGRPérgico.	39
Figura 12 – Efecto de una infusión i.v. de vehículo (agua bidestilada, 0.02 ml/min;) o ADPβS (5.6 μg/kg·min), sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por bolos i.v. de α-CGRP	40
Figura 13 - Efecto per se del vehículo o de los antagonistas P2Y sobre las respuestas vasodepresoras por estimulación eléctrica de los nervios sensoriales CGRPérgicos medulares.....	42
Figura 14 - Efecto de los antagonistas P2Y sobre el efecto inhibitorio del ADPβS sobre la respuesta vasodepresora CGRPérgica dada por estimulación de los nervios sensoriales.	44
Figura 15 – Efecto de la infusión continua de ADPβS sobre la PAD basal y sobre las respuestas vasodepresoras sensoriales.....	47
Figura 16 – Inhibición del efecto vasodepresor de la infusión continua de ADPβS por el MRS2500.....	55

ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN.....	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1. Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP).....	15
1.2. Regulación del tono vascular por las fibras sensoriales CGRPérgicas	17
1.3. Purinas, pirimidinas y mecanismos transduccionales purinérgicos.....	19
1.4. Modulación del tono vascular por el ADP β S	26
2. JUSTIFICACIÓN	27
3. HIPÓTESIS	28
4. OBJETIVOS.....	28
4.1. Objetivo general.....	28
4.2. Objetivos particulares.....	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
5.1. Animales.....	29
5.2. Diseño experimental.....	29
5.2.1. Anestesia y procedimiento de descerebración y desmedulación.....	29
5.2.2. Procedimientos para evaluar las respuestas vasodepresoras CGRPérgicas inducidas por estimulación eléctrica.....	30
5.2.3. Procedimientos para evaluar de las respuestas vasodepresoras inducidas por bolos i.v. de α -CGRP exógeno.....	33
5.3. Análisis estadístico	34

6. RESULTADOS.....	34
6.1. Efecto de la administración de vehículo (infusión i.v. continua y bolo i.v.) sobre las respuestas neurogénicas vasodepresoras CGRPérgicas.	34
6.2. Efecto de la infusión i.v. continua de ADPβS sobre la presión arterial diastólica.	36
6.3. Efecto de la infusión i.v. continua de ADPβS sobre las respuestas neurogénicas vasodepresoras CGRPérgicas.	37
6.4. Efecto de la infusión continua de vehículo o ADPβS sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por bolos i.v. de CGRP exógeno.	39
6.5. Efecto per se de la administración de los antagonistas P2Y ₁ , P2Y ₁₂ y P2Y ₁₃ sobre las respuestas neurogénicas vasodepresoras CGRPérgicas.	40
6.6. Efecto de la administración de los antagonistas P2Y ₁ , P2Y ₁₂ y P2Y ₁₃ sobre la inhibición por ADPβS de las respuestas neurogénicas vasodepresoras CGRPérgicas.	42
7. DISCUSIÓN	45
7.1. General.....	45
7.2. Efecto de la administración de la infusión i.v. continua de ADPβS sobre las respuestas vasodepresoras CGRPérgicas en la rata.....	46
7.3. Efecto de la administración de bolos i.v. de antagonistas de los receptores purinérgicos P2Y sobre las respuestas vasodepresoras CGRPérgicas.....	50
7.4. Papel de los receptores P2Y ₁ , P2Y ₁₂ y P2Y ₁₃ en el efecto inhibitorio del ADPβS sobre las respuestas vasodepresoras CGRPérgicas.....	52
8. CONCLUSIONES	56
9. PERSPECTIVAS.....	58
10. REFERENCIAS	59

ABREVIATURAS

5-HT₃ – Receptor de serotonina tipo 3

ΔP – Diferencia de presión

% ΔPAD – Porcentaje de cambio de la presión arterial diastólica

ADP – Adenosín difosfato

ADP βS - Adenosin-5'-(β -tio)-difosfato

AMPc – Adenosín monofosfato cíclico

ATP – Adenosín trifosfato

B2 - Receptores a bradicinina B2

CGRP – Péptido relacionado con el gen de la calcitonina

CGRPR – Receptor del péptido relacionado con el gen de la calcitonina

CLR – Receptor similar al receptor de la calcitonina

Ecto-NTPDasa - ectonucleótido trifosfato difosfohidrolasa

eNOS – Sintasa de óxido nítrico endotelial

EPR - Receptores a prostaglandinas E₂

F – Flujo sanguíneo

FC – Frecuencia cardiaca

GC – Guanilato ciclasa

GTP – Guanosín trifosfato

GMPc – Guanosín monofosfato cíclico

I.v. – Intravenosa

NO – Óxido nítrico

PA – Presión arterial

PAD – Presión arterial diastólica

PAR2 - Receptores activados por proteasa 2

PKA – Proteína cinasa A

PLC – Fosfolipasa C

R - Resistencia vascular

RAMP₁ - Proteína modificadora de la actividad del receptor

SNA – Sistema nervioso autónomo

SNC – Sistema nervioso central

SNP – Sistema Nervioso periférico

T₉-T₁₂ – Segmentos torácicos medulares T₉ a T₁₂

TRPA1 - Receptor de potencial transitorio de anquirina 1

TRPV1 – Receptor de potencial transitorio vanilloide 1

RESUMEN

El péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) es un neuropéptido endógeno liberado de nervios sensoriales perivasculares (*i.e.* fibras A δ y C), que ejerce un potente efecto vasodilatador en las arterias cerebrales, meníngeas y de resistencia. Dentro de este contexto, nuestro grupo ha estudiado la modulación monoaminérgica de la liberación de CGRP a nivel preunional en la vasculatura sistémica de la rata descerebrada y desmedulada. Adicionalmente: (i) el adenosín trifosfato (ATP) estimula la liberación de CGRP a través de su receptor heterodimérico P2X_{2/3}; y (ii) el ADP β S (un análogo estable del ADP) produce respuestas vasodepresoras vía la activación de los receptores P2Y₁ endoteliales. Sin embargo, no se ha reportado el posible papel del ADP en la modulación preunional del tono sensorial vasodepresor CGRPérgico. Con estas bases, se propone que la infusión *i.v.* continua de ADP β S podría inhibir este tono estimulado eléctricamente.

Para este propósito, se utilizaron 108 ratas Wistar macho descerebradas y desmeduladas cuya presión arterial diastólica fue mantenida en un rango de 100 a 115 mmHg mediante una infusión *i.v.* continua de metoxamina (15-20 μ g/kg·min). Estos animales fueron divididos en dos series principales (n = 90 y 18).

En la serie 1 (n = 90), la infusión *i.v.* continua de ADP β S (5.6 y 10 μ g/kg·min), mas no de vehículo (0.02 ml/min), inhibió las respuestas vasodepresoras CGRPérgicas inducidas por estimulación eléctrica sensorial (T₉-T₁₂). Esta inhibición producida por el ADP β S (5.6 μ g/kg·min) fue revertida tras la administración *i.v.* de los antagonistas purinérgicos MRS2500 (300 μ g/kg; P2Y₁) o MRS2211 (3000 μ g/kg; P2Y₁₃), pero no por los antagonistas PSB0739 (300 μ g/kg; P2Y₁₂) o MRS2211 (1000 μ g/kg; P2Y₁₃).

En la serie 2 (n=18), la infusión *i.v.* continua de ADP β S (5.6 μ g/kg·min) o de vehículo (0.02 ml/min) no modificó las respuestas vasodepresoras inducidas por la administración de bolos *i.v.* de α -CGRP exógeno (comparadas con experimentos control sin infusión).

En conclusión, el ADP β S induce un efecto inhibitorio sobre la liberación de CGRP a nivel preunional en los nervios sensoriales perivasculares de la vasculatura sistémica, mas no interfiere con las acciones postunionales (vasculares) del CGRP. Dicho efecto inhibitorio involucra al receptor purinérgico P2Y₁, mas no a los receptores P2Y₁₂ o P2Y₁₃.

ABSTRACT

Calcitonin gene-related peptide (CGRP) is an endogenous neuropeptide released from perivascular sensory nerves (*i.e.* A δ y C fibers), and exerts a powerful vasodilator effect on cerebral, meningeal and resistance arteries. Within this context, our group has studied the monoaminergic modulation of CGRP release at prejunctional level in the systemic vasculature of pithed rats. In addition: (i) adenosine triphosphate (ATP) stimulates the release of CGRP via the activation of the P2X_{2/3} heterodimeric receptor; and (ii) ADP β S (a stable and non-hydrolysable analog of ADP) produces vasodepressor responses via the activation of endothelial P2Y₁ receptors. Nevertheless, the possible role of ADP in the prejunctional modulation of the vasodepressor sensory CGRPergic tone has not yet been reported. On this basis, we propose that an i.v. continuous infusion of ADP β S could inhibit the vasodepressor sensory CGRPergic tone induced by electrical stimulation.

For this purpose, 108 male Wistar rats were pithed and maintained with a diastolic blood pressure of 100-115 mmHg by an i.v. continuous infusion of methoxamine (15-20 μ g/kg·min). Then, the animals were divided into two main sets (n=90 and 18).

In set 1 (n=90), the i.v. continuous infusion of ADP β S (5.6 and 10 μ g/kg·min), but not of vehicle (0.02 ml/min), inhibited the vasodepressor responses induced by electrical stimulation of the vasodepressor sensory CGRPergic tone (spinal T₉-T₁₂ segment). This inhibition induced by ADP β S (5.6 μ g/kg·min) was reverted after i.v. administration of the purinergic antagonists MRS2500 (300 μ g/kg; P2Y₁) or MRS2211 (3000 μ g/kg; P2Y₁₃), but not by the antagonists PSB0739 (300 μ g/kg; P2Y₁₂) or MRS2211 (1000 μ g/kg P2Y₁₃).

In set 2 (n=18), the i.v. continuous infusion of either ADP β S (5.6 μ g/kg·min) or vehicle (0.02 ml/min) failed to modify the vasodepressor responses induced by administration of i.v. bolus injections of exogenous α -CGRP (compared to control experiments with no infusion).

In conclusion, ADP β S induces an inhibitory effect on CGRP release at the prejunctional level on the perivascular sensory nerves that innervate the systemic vasculature, but does not interfere with CGRP postjunctional (vascular) actions. This inhibitory effect involves the purinergic P2Y₁ receptor, but not P2Y₁₂ or P2Y₁₃ receptors.

1. INTRODUCCIÓN

La función más importante del sistema circulatorio es distribuir los gases y otras moléculas para nutrición de diversas células, órganos y tejidos. Además, cumple funciones secundarias que incluyen: contribuir a la señalización química celular rápida mediante la liberación y el transporte de hormonas y neurotransmisores, la disipación del calor corporal, la mediación de las respuestas inflamatorias y la defensa contra microorganismos (Figura 1) (Boron & Boulpaep, 2017).

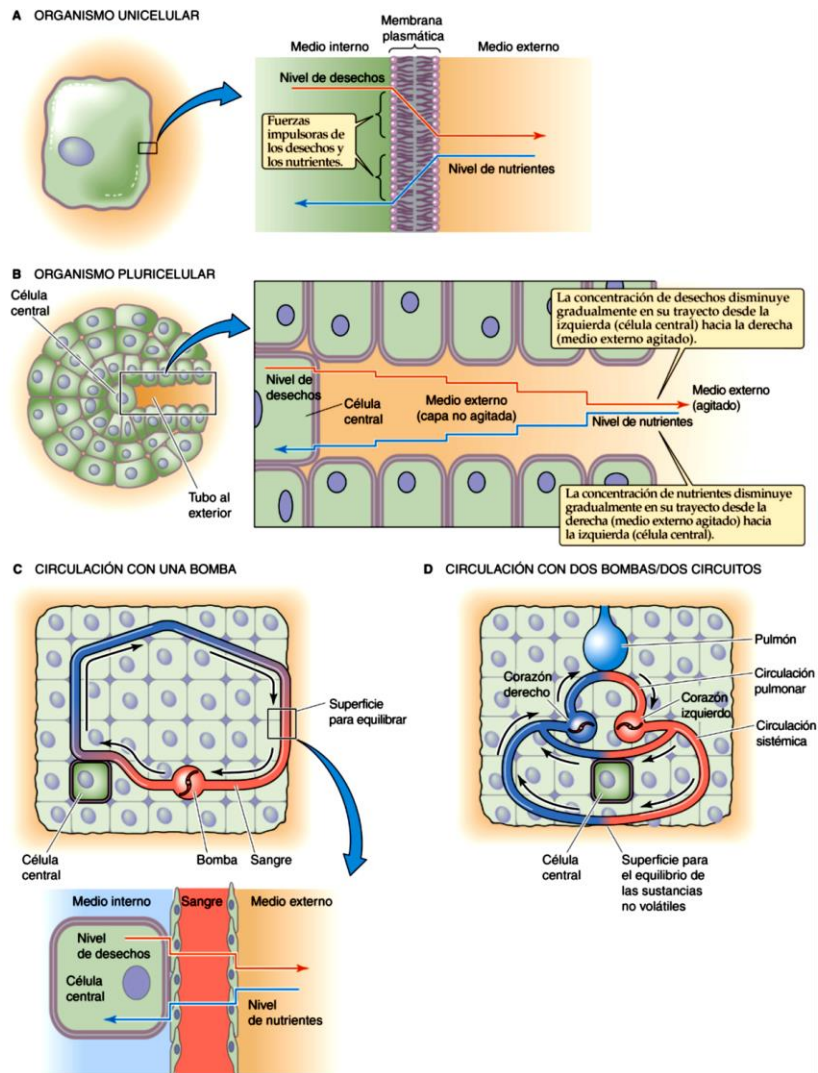


Figura 1 - Papel del sistema circulatorio en la difusión de moléculas en los tejidos. En A y B se muestra el intercambio de los desechos celulares y los nutrientes entre el medio interno y el externo en un organismo unicelular y pluricelular respectivamente. En C y D se ilustra un sistema de 3 barreras (espacio interno, espacio intravascular y medio externo), poniendo de manifiesto la eficiencia al usar un circuito para intercambiar con el medio externo y otro circuito para intercambiar nutrientes y productos de desecho no gaseosos. Tomado de Boron & Boulpaep, 2017.

Adicionalmente, el sistema vascular tiene puede modular el flujo sanguíneo dependiendo de las demandas de una región en particular, modificando dos variables: (i) la diferencia de presión (ΔP); y (ii) la resistencia vascular (R) de acuerdo con la ley de Ohm ($F = \frac{\Delta P}{R}$) (Figura 2). De esta manera, la resistencia de los vasos sanguíneos puede modificarse gracias a la contracción o relajación del músculo liso vascular, produciendo el aumento o disminución del diámetro del vaso sanguíneo y, por consecuencia, la disminución o aumento de la presión arterial, respectivamente (Boron & Boulpaep, 2017).

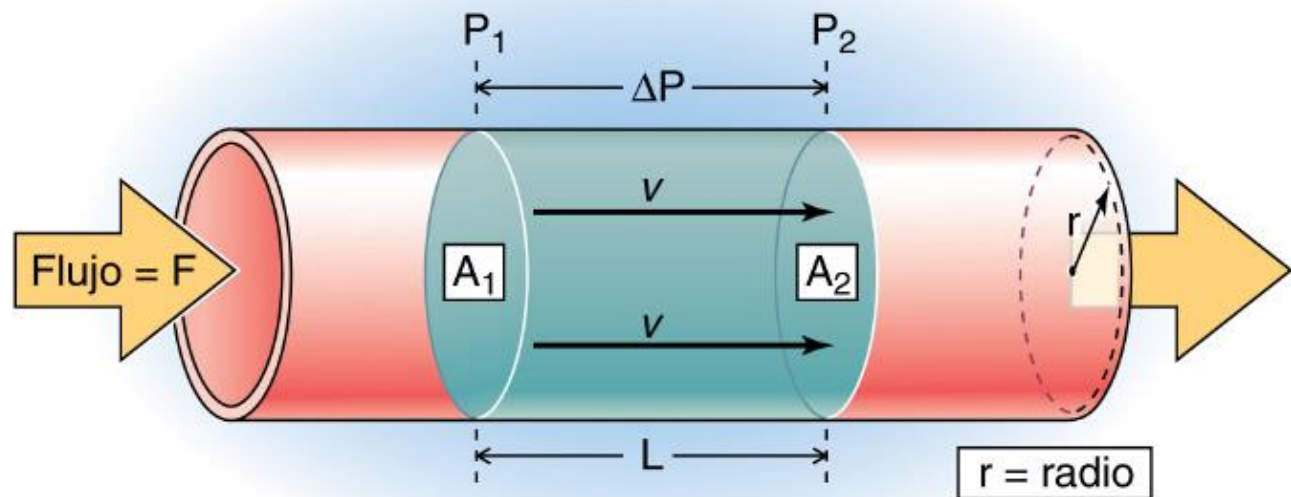


Figura 2 - Flujo sanguíneo a través de un vaso sanguíneo. El flujo está determinado por la diferencia de presiones (ΔP) entre un punto de alta presión (P_1), otro de baja presión (P_2) y la resistencia vascular (R); la cual está determinada por el área de sección transversal en estos dos puntos (A_1 y A_2). De acuerdo con la ley de Ohm, el flujo de sangre en el vaso sanguíneo está determinado por la ΔP y la R , esta última puede ser modificada por cambios en el diámetro del vaso sanguíneo. Asimismo, los cambios en el diámetro del vaso también modifican la velocidad (v) de la columna de sangre que se desliza dentro del mismo (Boron & Boulpaep, 2017).

La modificación del diámetro vascular y la presión arterial (PA) es regulada por diversas moléculas, las cuales pueden ser sintetizadas y liberadas de neuronas provenientes del sistema nervioso autónomo (simpático y parasimpático), por nervios sensoriales A δ y C capaces de generar vasodilatación al actuar a nivel local (músculo liso vascular o endotelio), e incluso mediante hormonas sintetizadas por el sistema endocrino (Boron & Boulpaep, 2017). En este sentido, los vasos sanguíneos de resistencia se

encuentran inervados por dos tipos de nervios perivasculares; los primeros son los nervios simpáticos noradrenérgicos, los cuales producen vasoconstricción vía la activación de receptores α adrenérgicos (Boron & Boulpaep, 2017). El segundo sistema de control nervioso perivascular en un inicio fue llamado sistema no adrenérgico no colinérgico (Taguchi *et al.*, 1992). Posteriormente se identificó que este sistema proviene de nervios que emergen directamente de la médula espinal, principalmente de las fibras A δ y C, los cuales se encargan de la síntesis y liberación, entre otros, del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP, por sus siglas en inglés), el cual es un potente neuropéptido vasodilatador (Ando *et al.*, 1990; Kubota *et al.*, 1985; Nelson *et al.*, 1990). Ambos tipos de nervios tienen como función la modulación del tono vascular sistémico y el mantenimiento de la presión arterial (Hay *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2019; Russell *et al.*, 2014).

1.1 Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP).

El CGRP es un miembro de una familia de péptidos endógenos formado por 37 aminoácidos, que es transcrito a partir del gen de la calcitonina localizado en el cromosoma 11 tanto en humanos como en ratas (Amara *et al.*, 1982; Kumar *et al.*, 2019). En los años 80, este péptido fue localizado en el plasma de pacientes con carcinoma medular de tiroides. Posteriormente, el CGRP fue identificado en la médula espinal tanto en el humano como en numerosas especies (Morris *et al.*, 1984) y fue asociado con un potente efecto vasodilatador, especialmente en la microcirculación, causando una reducción en la presión arterial. Este efecto fue identificado en la microvasculatura periférica en humanos que recibieron una inyección con una dosis femtomolar intradérmica de CGRP, induciendo eritema y aumento del flujo sanguíneo local por varias horas en comparación de otros vasodilatadores locales más débiles, como la sustancia P o las prostaglandinas (Brain *et al.*, 1985). Desde el descubrimiento de la actividad vasodilatadora periférica del CGRP (Brain *et al.*, 1985; Taguchi *et al.*, 1992), fue aumentando el entendimiento del CGRP como mediador de los fenómenos vasodilatadores vasculares vía mecanismos tanto dependientes como independientes del endotelio. En este sentido, se ha estudiado el efecto de la liberación del CGRP por fibras nerviosas A δ y C (Figura 3) que emergen del ganglio de la raíz dorsal en los segmentos torácicos T₉-T₁₂, así como por neuronas del ganglio vagal, ganglio trigeminal y neuronas heterogéneas de pequeño y mediano tamaño (Gibson

et al., 1984; Goadsby *et al.*, 1988, 1990). Asimismo, como se mencionó anteriormente, el CGRP puede coliberarse con la sustancia P de los nervios sensoriales y, de esta manera, modular respuestas inflamatorias, e incluso se ha sugerido que el CGRP puede ser sintetizado y liberado por células no-vasculares (Russell *et al.*, 2014).

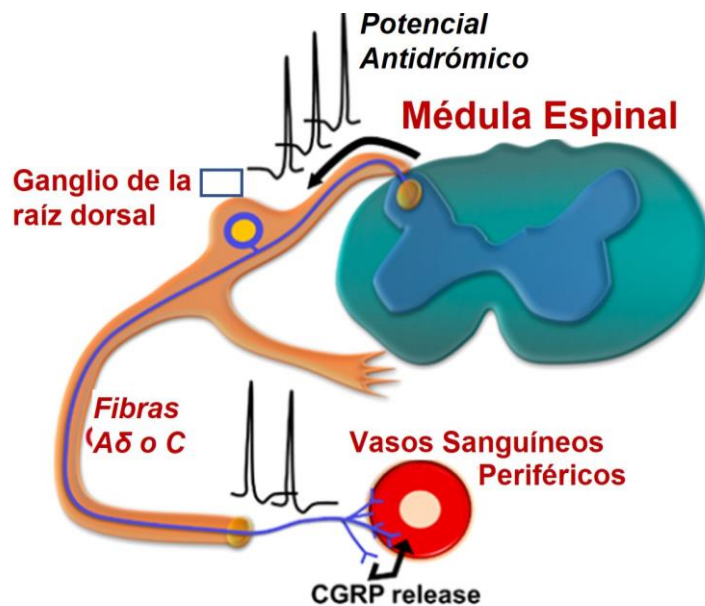


Figura 3 – Liberación de CGRP a través de las fibras nerviosas sensoriales Aδ y C. Las fibras nerviosas sensoriales capaces de liberar CGRP provienen de los segmentos medulares torácicos a nivel de T₉-T₁₂; estos inervan a los vasos sanguíneos periféricos generando vasodilatación (González-Hernández *et al.*, 2019; Taguchi *et al.*, 1992).

Este neuropéptido se distribuye ampliamente en humanos y otros mamíferos en dos isoformas: (i) el α -CGRP, localizado principalmente en el sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso periférico (SNP); y (ii) el β -CGRP, localizado principalmente en el sistema entérico, la hipófisis y el sistema inmunológico (Kumar *et al.*, 2019; Russell *et al.*, 2014). Es importante mencionar que la similitud estructural entre estas dos isoformas del CGRP no se limita a la calcitonina, sino también a otros péptidos como la amilina, adrenomedulina y la intermedina (o adrenomedulina 2) (Russell *et al.*, 2014). Debe destacarse que el α -CGRP se considera una molécula relativamente estable, la cual tiene una vida media de 7 minutos en plasma y es degradada por endopeptidasas. En resumen, este neuropéptido puede ser sintetizado y liberado por fibras sensoriales Aδ y C en respuesta a la liberación de angiotensina II y noradrenalina por activación directa de los nervios perivasculares, y modula las funciones cardiovasculares, metabólicas e inflamatorias (Russell *et al.*, 2014; Sohn *et al.*, 2020).

1.2 Regulación del tono vascular por las fibras sensoriales CGRPérgicas

El receptor del CGRP (CGRPR) pertenece a la familia de receptores de la calcitonina. En este sentido, el CGRP se une canónicamente a su receptor, pero también puede unirse a otros receptores con menor afinidad, como los de adenomedulina y amilina (Hay *et al.*, 2018; Rivera-Mancilla *et al.*, 2020). Este receptor forma parte de la familia de receptores acoplados a proteínas G, cuyo sitio de unión al CGRP está formado por dos proteínas: (i) receptor similar al receptor de la calcitonina (CLR); y (ii) una proteína modificadora de la actividad del receptor (RAMP₁) (Flühmann *et al.*, 1995; McLatchie *et al.*, 1998).

Al unirse el CGRP a su receptor, se activa la vía de señalización dependiente de G_{αs} estimulando a la adenilato ciclasa e incrementando el adenosin monofosfato cíclico (AMPc). Este efecto en el músculo liso vascular tiene como consecuencia la activación de la proteína cinasa A (PKA), que induce la apertura de canales de K⁺ sensibles al adenosin trifosfato (ATP), produciendo vasodilatación (Figura 4) (Kubota *et al.*, 1985; Nelson *et al.*, 1990; Taguchi *et al.*, 1992).

Por otro lado, se ha propuesto una segunda vía de transducción de señales activada por el CGRP que ocurre, principalmente, a nivel endotelial. Esto sugiere que la unión del CGRP a su receptor lleva a la activación de la subunidad G_{αs} estimulando a la adenilato ciclasa e incrementando el AMPc, lo que activa a la PKA. Sin embargo, en esta vía también aumenta la producción de óxido nítrico (NO) vía la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS). Este gas difunde al músculo liso vascular, produciendo vasodilatación por activación de la guanilato ciclasa (GC). Dicho fenómeno se ha observado principalmente en las arterias cerebrales (Gray & Marshall, 1992; Hong *et al.*, 1996; Smillie *et al.*, 2014).

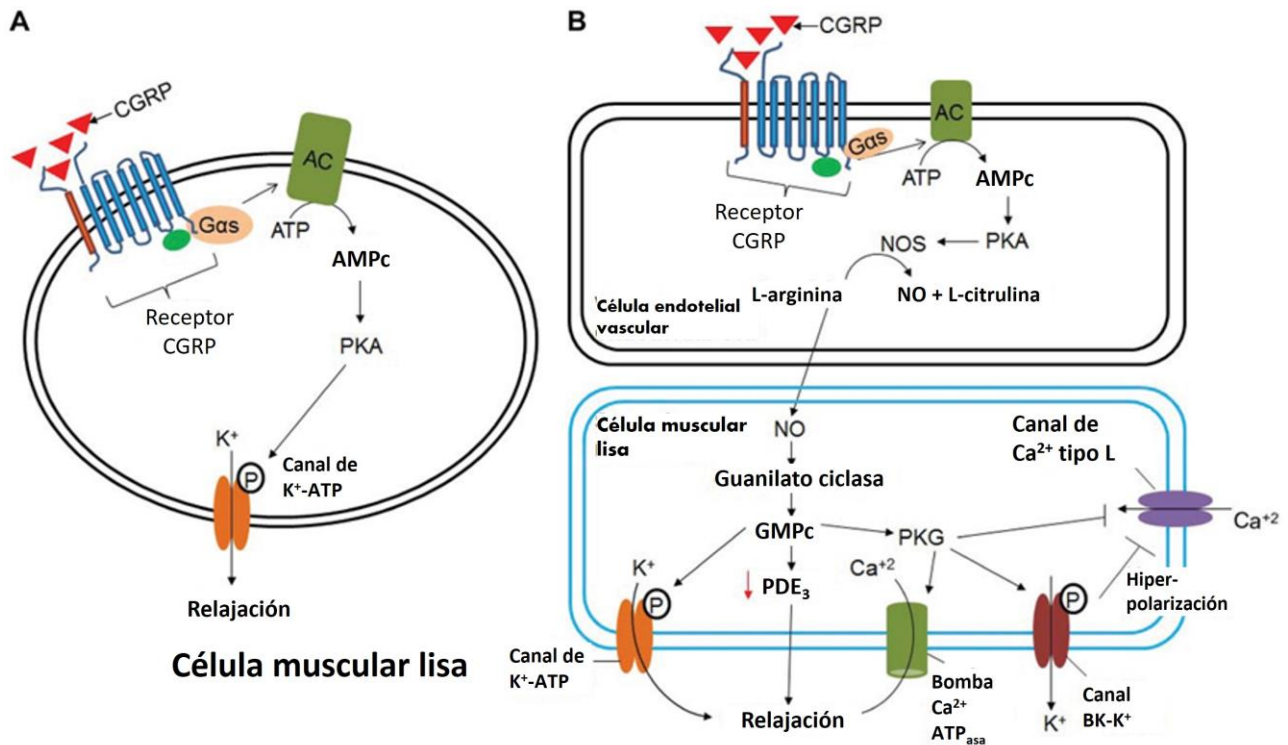


Figura 4 – Mecanismos transduccionales del CGRP. Diversas investigaciones han encontrado que el CGRP tiene 3 blancos de acción a nivel post-unional: una directamente en el músculo liso vascular y dos en el endotelio (Sohn et al., 2020). En A se muestra el mecanismo transduccional a nivel del músculo liso vascular, y en B se esquematiza el mecanismo transduccional a nivel endotelial. En ambos casos, el efecto de la activación de estas vías transduccionales es la relajación del vaso sanguíneo (Kumar et al., 2019).

El potente efecto vasodilatador del CGRP ha sido estudiado ampliamente. En este sentido, se ha demostrado que la administración sistémica de CGRP en ratas produce un descenso en la presión arterial tanto en animales normotensos como en hipertensos (Ando et al., 1990; Avilés-Rosas et al., 2017; Gangula et al., 1999; Itabashi et al., 1988; Taguchi et al., 1992; Wimalawansa, 1996). Asimismo, se han encontrado resultados similares en estudios en humanos tanto en individuos sanos como en pacientes con patologías cardiovasculares, en donde la administración *i.v.* de CGRP tiene un efecto vasodilatador, además de inducir respuestas inotrópicas y cronotrópicas positivas en corazón (Gennari & Fischer, 1985; Preibisz, 1993). Adicionalmente, y dada la importancia patofisiológica que tiene el CGRP, nuestro grupo de investigación ha analizado farmacológicamente los mecanismos involucrados en la liberación del CGRP. Hasta el momento, mediante el uso de herramientas farmacológicas, se sabe que la liberación del CGRP puede ser inhibida a

nivel preunional vía la activación de los receptores histaminérgicos H₃, serotoninérgicos 5-HT_{1B/1D}, dopaminérgicos D₂-like (principalmente vía la activación del subtipo D₃) y adrenérgicos α₂ (González-Hernández *et al.*, 2019; Manrique-Maldonado *et al.*, 2015, 2019) (Figura 5).

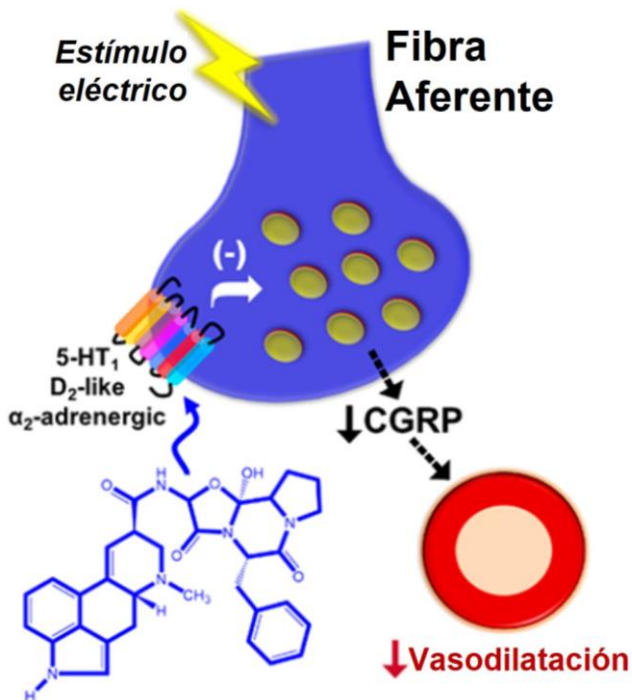


Figura 5 – Modulación de la liberación preunional de CGRP. Diversas investigaciones han encontrado, mediante el uso de herramientas farmacológicas, que la liberación de CGRP de nervios sensoriales a nivel preunional puede ser modulada vía la activación de receptores a diferentes monoaminas biogénicas. Entre algunos de los receptores involucrados se incluye a los histaminérgicos H₃, serotoninérgicos 5-HT_{1B/1D}, dopaminérgicos D₂-like y adrenérgicos α₂. Imagen tomada de (González-Hernández *et al.*, 2019).

Por otra parte, también existen receptores que promueven la liberación de CGRP en la terminal neuroefectora, tales como los receptores activados por proteasa 2 (PAR2), receptores a bradicinina B₂, receptores a prostaglandinas E₂, los canales TRPA1 y TRPV1, el receptor serotoninérgico 5-HT₃, así como el heterodímero formado por los receptores purinérgicos P2X_{2/3} sensibles al nucleótido ATP. La activación de estos receptores incrementa las concentraciones intracelulares de Ca²⁺ y promueve la liberación de CGRP en las neuronas trigeminales hacia la unión neuroefectora (Brain & Geppetti, 2019).

1.3 Purinas, pirimidinas y mecanismos transduccionales purinérgicos

Las purinas y pirimidinas son compuestos orgánicos heterocíclicos, las cuales están formadas por una base nitrogenada púrica (adenina, guanina) o pirimídica (citosina, timina y uracilo). Las purinas y pirimidinas son necesarias para la transferencia de información

genética, además, debido a los enlaces de alta energía del fosfato, son los mayores almacenes de energía en forma de ATP o GTP. Además, juegan un papel importante como moléculas de señalización (AMPc y GMPc) (Chitrakar *et al.*, 2017).

Desde 1976 se sabe que el ATP puede actuar como un neurotransmisor liberado por terminales nerviosas no adrenérgicas y no colinérgicas, o bien puede actuar como un co-transmisor al ser liberado junto con otros neurotransmisores a partir de terminales simpáticas y parasimpáticas (Burnstock, 1972, 1976). En términos generales el ATP así como otros nucleótidos pueden ser liberados por diferentes tipos celulares a través de hemicanales de conexinas, hemicanales de panexinas, transportadores dependientes de ATP y canales aniónicos (Burnstock & Ralevic, 2014). Una vez liberado el ATP es hidrolizado a adenosín difosfato (ADP) en la superficie celular por la ectonucleotidasa 5'-trifosfohidrolasa (ENTPDasa), a su vez esta misma enzima se encarga de hidrolizar al ADP en AMPc, finalmente la ecto-5'nucleotidasa o (CD73) se encarga de hidrolizar el AMPc en adenosina (Burnstock & Ralevic, 2014; Zimmermann, 2021). En este sentido, la actividad fisiológica que tiene el ATP y de otros nucleótidos como el ADP, UTP, UDP o adenosina, tanto en el sistema nervioso central como en el sistema nervioso periférico y en el sistema cardiovascular, se da mediante el acople y activación de una familia de receptores acoplados a proteínas G así como canales iónicos; los receptores purinérgicos (Burnstock, 1972, 1976, 2017c).

Existen 2 familias de receptores purinérgicos: (i) los receptores purinérgicos P1, los cuales reconocen a la adenosina; y (ii) los receptores purinérgicos P2, los cuales reconocen al ATP y al ADP así como algunos análogos estables no hidrolizables de estos como el ADPβS (Burnstock, 2007) (Tabla 1). Esta familia de receptores a su vez se clasifica en dos tipos de receptores, los receptores P2X y los receptores P2Y. Los primeros son canales iónicos ligando-dependientes y los segundos son receptores acoplados a proteínas G (*i.e.* proteínas G_q y G_{i/o}) (Burnstock, 2007, 2017b, 2017a, 2017c). Dentro de los receptores acoplados a proteínas G_q se encuentran los subtipos de receptores P2Y_{1,2,4,6,11}; mientras que los subtipos de receptores P2Y_{12,13,14} se acoplan a proteínas G_{i/o}. Adicionalmente, se ha reportado que el subtipo de P2Y₁₁ también puede activar proteínas G_s (Burnstock, 2014) (figura 6).

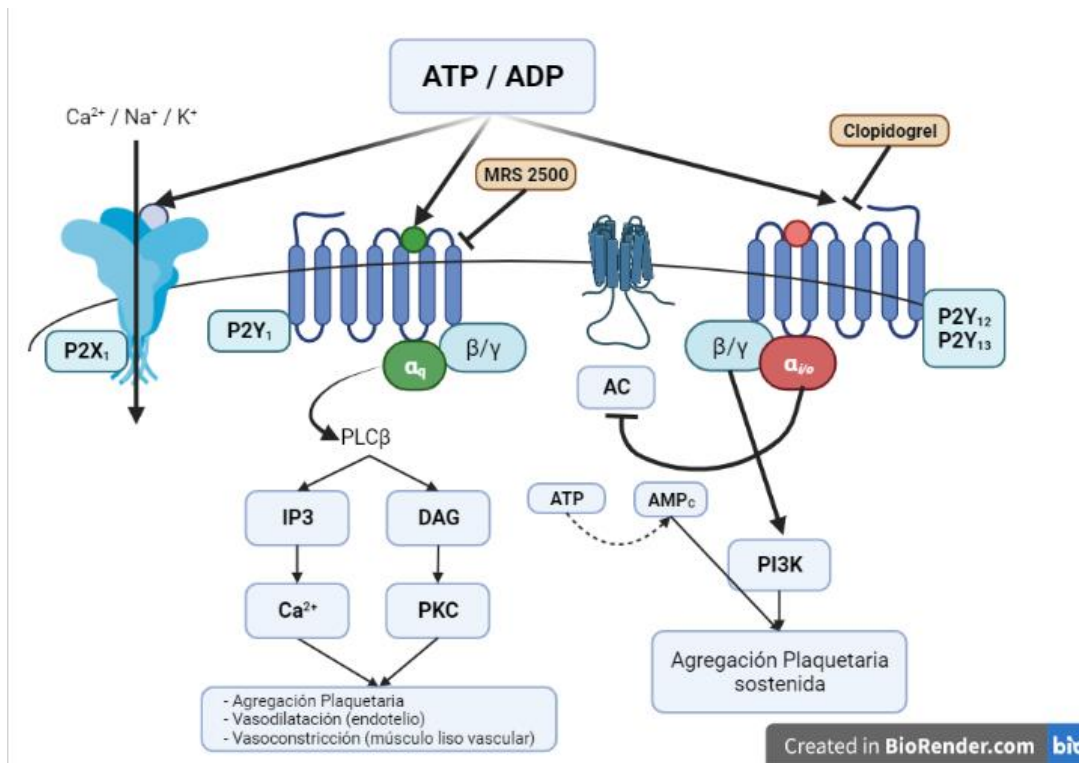


Figura 6 – Mecanismos transduccionales de los receptores purinérgicos P2. La familia de receptores purinérgicos P2 se caracteriza por su sensibilidad a ciertos nucleótidos como el ATP, ADP, UTP y UDP. A su vez, esta familia se subdivide en receptores P2X (canales iónicos) y P2Y (receptores metabotrópicos). La imagen resume algunas de las principales vías de señalización explicadas en el texto (Burnstock, 2017b, 2017c).

Los efectos biológicos más relevantes de las purinas y pirimidinas en el sistema cardiovascular son: la contracción del músculo liso, la agregación plaquetaria, la modulación de la frecuencia cardíaca y la regulación de las respuestas vasopresoras y vasodepresoras (Burnstock, 2017). Dichos efectos responden al ATP como un importante neurotransmisor o cotransmisor, en tanto que la adenosina actúa como neuromodulador (Ralevic & Burnstock, 1998). En este sentido, en el tejido vascular humano, los receptores P2Y₁, P2Y₂ y P2Y₄ se expresan principalmente en células endoteliales, mientras que los receptores P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ y P2Y₆ se expresan en células de músculo liso vascular (Burnstock, 2014, 2017c; Ralevic & Burnstock, 1998) (figura 7).

Tabla 1. Características de los receptores purinérgicos.

Receptor		Distribución	Agonistas	Antagonistas	Mecanismo transduccional
P1	A ₁	Cerebro, médula espinal, testículo, terminales nerviosas autónomas	CCPA, CPA, S-ENBA, CVT-510	DPCPX, N-0840, MRS1754, N-0840, WRC-0571	G _{i/o} ↓cAMP
	A _{2A}	Cerebro, corazón, pulmón, bazo.	CGS 21680, HE-NECA, CVT-3146	KF17837, SCH58261, ZM241385, KW 6002	G _s ↑cAMP
	A _{2B}	Intestino, vejiga	NECA	Eprofylline, MRE2029-F20, MRS17541, MRS 1706	G _s ↑cAMP
	A ₃	Pulmón, hígado, cerebro, testículo, corazón	IB-MECA, 2-CI-IB-MECA, DBXRM, VT160	MRS1220, L-268605, MRS1191, MRS1523, VUF8504	G _{i/o} G _{q/11} ↓cAMP ↑IP ₃
P2X	P2X ₁	Músculo liso, plaquetas, cerebelo, neuronas del hasta dorsal.	ATP	TNP-ATP, IP5I, NF023, NF449	Canal catiónico intrínseco (Ca ²⁺ y Na ⁺)
	P2X ₂	Músculo liso, SNC, retina, células cromafines, ganglios autónomos y sensoriales	ATP	Suramin, isoPPADS, RB2, NF770, NF279	Canal iónico (Ca ²⁺)
	P2X ₃	Neuronas sensoriales, núcleo del tracto solitario, neuronas simpáticas	ATP	TNP-ATP, PPADS, A317491, NF110, Ip5I, Fenol rojo	Canal iónico

	P2X ₄	SNC, testículo, colon	ATP	TNP-ATP, BBG,	Canal iónico (Ca ²⁺)
	P2X ₅	Piel, intestino, vejiga, timo, médula espinal	ATP	Suramin, PPADS, BBG	Canal iónico
	P2X ₆	SNC, neuronas motoras espinales	ATP	-----	Canal iónico
	P2X ₇	Células apoptóticas	ATP	KN62, KN04, MRS2427, OATP	Canal catiónico intrínseco
P2Y	P2Y ₁	Células epiteliales y endoteliales, plaquetas células inmunes, osteoclastos	2-MeSADP = ADPβS > 2-MeSATP = ADP>ATP, MRS2365	MRS2179, MRS2500, MRS2279, PIT	G _q /G ₁₁ ; activación de PLC-β
	P2Y ₂	Células inmunes, células epiteliales y endoteliales, túbulos renales, osteoblastos	UTP = ATP	Suramin > RB2, ARC126313	G _q /G ₁₁ y posiblemente G _i ; activación de PLC-β
	P2Y ₄	Células endoteliales	UTP ≥ ATP	RB2 > Suramin	G _q /G ₁₁ y posiblemente G _i ; activación de PLC-β
	P2Y ₆	Células epiteliales, placenta, células T, timo	UDP>UTP>>A TP, UDPβS	MRS2578	G _q /G ₁₁ ; activación de PLC-β
	P2Y ₁₁	Bazo, intestino, granulocitos	ARC67085MX > BzATP ≥ ATPγS > ATP	Suramin > RB2, NF157, 5'-AMPS	G _q /G ₁₁ y G _s ; activación de PLC-β
	P2Y ₁₂	Plaquetas, células gliales	2-MeSADP ≥ ADP >> ATP	CT50547, AR-C69931MX, INS49266, AZD6140, PSB0413, ARL66096, 2-MeSAMP	G _{1/0} ; inhibición de la adenilato ciclasa

P2Y ₁₃	Bazo, cerebro, nódulos linfáticos, médula ósea	ADP = 2- MeSADP >> ATP = 2- MeSATP	MRS2211, 2-MeSAMP	G _{i/o}
P2Y ₁₄	Placenta, adipocitos, estómago, intestino, cerebro	UDP glucosa = UDP- galactosa	-----	Gq/G ₁₁

Tomado y modificado de (Burnstock, 2007).

En cuanto a su sistema transduccional, los subtipos P2Y_{1,2,4,6} se encuentran acoplados a proteínas G_q, los cual produce activación de la fosfolipasa C (Burnstock, 2014, 2017b) (Figura 6). Es decir, la activación de los subtipos P2Y predominantes en las células endoteliales generan un aumento de calcio citoplasmático, el cual a su vez induce un incremento en la actividad enzimática de la eNOS, aumentando la producción y la liberación de óxido nítrico, el cual genera relajación del músculo liso vascular, dando lugar a la dilatación del vaso sanguíneo (Raqeeb *et al.*, 2011; Shalev *et al.*, 1999). Además de este proceso de relajación por liberación de óxido nítrico, también se ha descrito que la activación de los receptores P2Y en las células endoteliales provoca vasodilatación por liberación de prostaglandinas y del factor hiperpolarizante derivado del endotelio (Malmsjö *et al.*, 1999; Wihlborg *et al.*, 2003) (Figura 7).

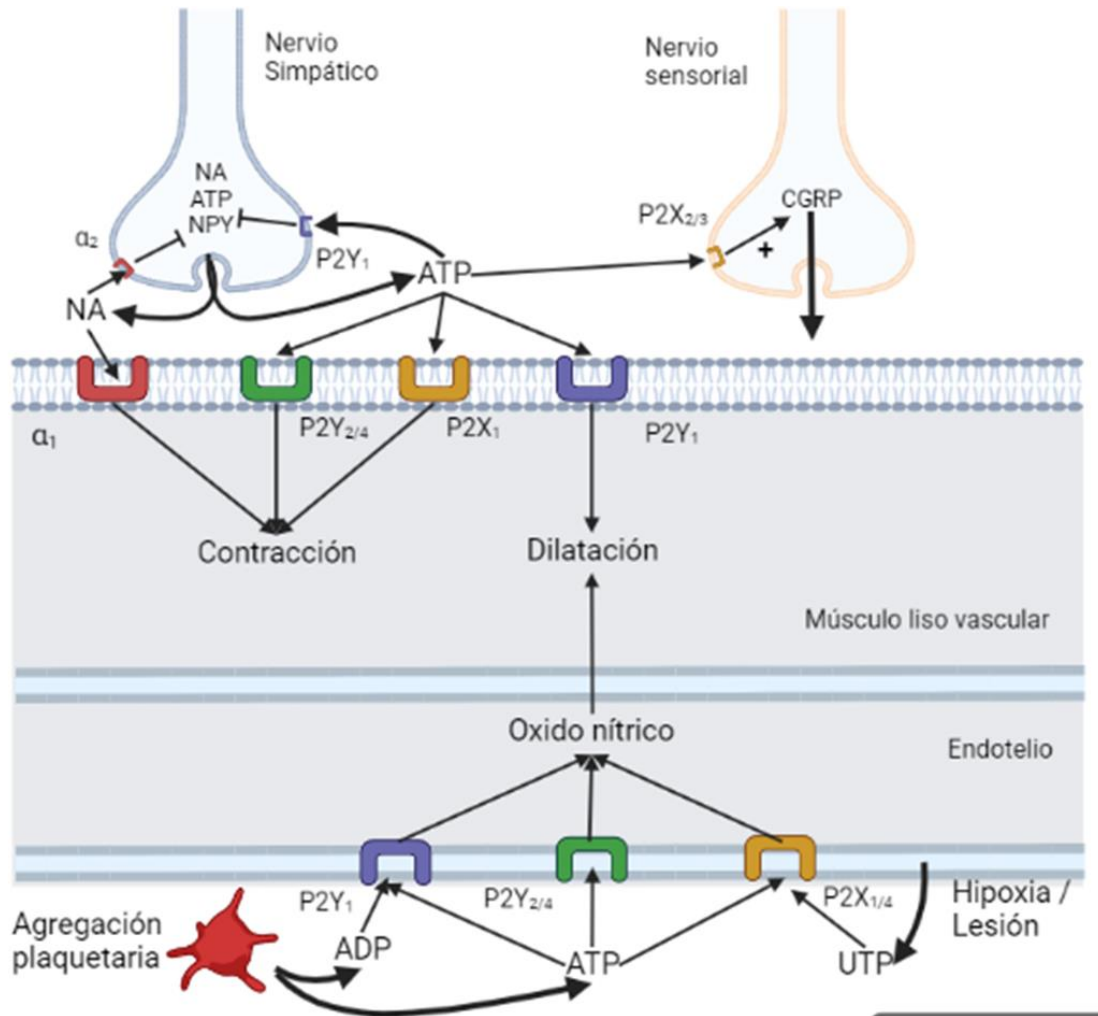


Figura 7 – Relación de los receptores purinérgicos con el sistema cardiovascular. Investigaciones realizadas por Burnstock han encontrado que los receptores purinérgicos se encuentran distribuidos a nivel de endotelio (P2Y₁, P2Y_{2/4} y P2X_{1/4}), a nivel del músculo liso vascular (P2Y₁, P2Y_{2/4} y P2X₁) y a nivel preunional en la terminal simpática (P2Y₁) así como, en la terminal sensorial CGRPérgica (P2X_{2/3}) (imagen modificada de Burnstock, 2017c).

Por otra parte, la familia de receptores purinérgicos P2Y₁₂-like (*i.e.* P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₄) están acoplados a una proteína G_{i/o} induciendo la inhibición de la adenilato ciclasa y reducción del AMPc intracelular. Tanto para los receptores P2Y₁, P2Y₁₂ y P2Y₁₃ (receptores explorados en el presente trabajo de investigación), los principales ligandos son los nucleótidos ATP y ADP, así como sus análogos estables como el ADPβS (Burnstock, 2020; tabla 1). Finalmente, el grupo de receptores purinérgicos P2X (P2X₁₋₇) representa a canales iónicos sensibles a ATP y permeables a Ca²⁺, Na⁺ y K⁺ (Burnstock, 2020; Figura 6).

1.4 Modulación del tono vascular por el ADPβS

El adenosin 5'-(β-tio) difosfato (ADPβS) es un análogo estable no hidrolizable del ADP utilizado ampliamente para el estudio de los mecanismos fisiológicos subyacentes a la activación de los receptores purinérgicos (Zizzo *et al.*, 2008). También ha ayudado a la caracterización de los receptores purinérgicos P2Y, en particular los P2Y₁, P2Y₁₁, P2Y₁₂ y P2Y₁₃, los cuales han demostrado ser sensibles tanto al ATP como al ADPβS (von Kügelgen, 2006). Además, los receptores purinérgicos P2Y tienen una participación importante en numerosas enfermedades cardiovasculares, como en el caso de la disfunción endotelial, que se caracteriza por vasoconstricción, incremento en la permeabilidad vascular y un estado protrombótico y proinflamatorio (Strassheim *et al.*, 2020).

Adicionalmente, nuestro grupo ha reportado que el ADPβS ejerce un efecto inhibitorio sobre las respuestas cardioaceleradoras producidas por la estimulación eléctrica simpática en el modelo de rata descerebrada y desmedulada (Villanueva-Castillo *et al.*, 2020). En cuanto a su papel sobre la regulación del tono vascular, se ha demostrado que el ADP es el nucleótido con el mayor efecto vasodepresor (aproximadamente 147 veces más potente que la adenosina y 45 veces más potente que el AMP y ATP) (Bennet & Drury, 1931; Drury & Szent-Györgyi, 1929; Gordon & Hesse, 1961). Además, Haanes *et al.* (2019) demostraron que una sola dosis *i.v.* de 330 μg/kg de ADPβS en ratas anestesiadas sin vagotomía, induce respuestas bifásicas caracterizadas por una respuesta vasopresora seguida de una respuesta vasodepresora de larga duración, siendo esta última bloqueada tras la administración de MRS2211 (antagonista del receptor P2Y₁₃). Estos datos indican que el ADP podría ser un potente regulador de la respuesta cardioaceleradora a nivel del corazón, y de las respuestas vasopresoras a nivel vascular.

2. JUSTIFICACIÓN

El CGRP ha sido ampliamente estudiado por sus potentes efectos vasodilatadores a nivel local, ya que incrementa el flujo sanguíneo y modula la respuesta inflamatoria desencadenada por estímulos térmicos, mecánicos o químicos (Sohn *et al.*, 2020). Además, la liberación de este neuropéptido tiene un efecto vasodilatador sobre: (i) las arterias coronarias contribuyendo a la angiogénesis (Sohn *et al.*, 2020); y (ii) en las arterias meníngeas desencadenando un ataque de migraña (Russell *et al.*, 2014). Por otro lado el CGRP también tiene efectos vasodilatadores a nivel sistémico, es decir sobre los vasos de resistencia manteniendo el tono vascular en un equilibrio dinámico junto con las fibras simpáticas noradrenérgicas (Russell *et al.*, 2014).

Debido a su importante efecto vasodilatador, el CGRP desempeña un papel importante como mediador fisiológico protector; por deducción, la interferencia con mecanismos CGRPérgicos puede desencadenar numerosas patologías neurovasculares, por ejemplo: la hipertensión arterial sistémica, insuficiencia cardiaca, hipertensión pulmonar, migraña, aterosclerosis, así como patologías metabólicas (*i.e.* diabetes y obesidad) y enfermedades inflamatorias (*i.e.* artritis, sepsis, etc.) (Kumar *et al.*, 2019; Nelson *et al.*, 1990; Rivera-Mancilla *et al.*, 2020; Russell *et al.*, 2014; Sohn *et al.*, 2020).

En nuestro grupo de investigación se han analizado, con el uso de herramientas farmacológicas, los mecanismos involucrados en la modulación de la liberación del CGRP en la vasculatura sistémica de la rata (Avilés-Rosas, *et al.*, 2017; González-Hernández, *et al.*, 2011; González-Hernández *et al.*, 2019; Manrique-Maldonado *et al.*, 2015, 2019). Dentro de este contexto, diversas investigaciones han destacado la importancia de los nucleótidos (*i.e.* ATP, ADP y adenosina) como moduladores de las respuestas cardioaceleradoras y de las respuestas vasodepresoras a nivel vascular, así como en la regulación de la respuesta simpática (Burnstock, 2017c; Burnstock & Ralevic, 2014; Haanes *et al.*, 2019; Silva Velasco, 2021; Villanueva-Castillo, *et al.*, 2020). Sin embargo, hasta el momento no existen trabajos que hayan explorado un posible papel modulador sobre el tono sensorial vasodepresor CGRPérgico, así como los posibles receptores implicados en dicha modulación a nivel preunional.

3. HIPÓTESIS

Las infusiones *i.v.* continuas de ADP β S (agonista de los receptores P2Y) podrían inhibir las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación eléctrica del tono sensorial vasodepresor CGRPérgico, mas no las respuestas vasodepresoras producidas por bolos *i.v.* de α -CGRP exógeno en el modelo de la rata descerebrada y desmedulada.

La actividad agonista del ADP β S sobre los receptores P2Y₁, P2Y₁₂ y P2Y₁₃ permitirá investigar si la inhibición de la respuesta vasodepresora CGRPérgica está mediada por estos receptores purinérgicos a nivel preunional.

4. OBJETIVOS

4.1. *Objetivo general*

Investigar el efecto inhibitorio del ADP β S sobre las respuestas vasodepresoras CGRPérgicas y determinar el perfil farmacológico de los receptores purinérgicos P2Y involucrados en la inhibición del tono sensorial vasodepresor CGRPérgico en el modelo de la rata descerebrada y desmedulada.

4.2. *Objetivos particulares*

Analizar en el modelo de rata descerebrada y desmedulada con infusión *i.v.* continua de metoxamina y de hexametonio:

- a) El efecto de la infusión continua *i.v.* del vehículo (agua bidestilada; 0.02 ml/min) o de un bolo *i.v.* del vehículo (agua bidestilada; 1 ml/kg) sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación eléctrica del tono sensorial vasodepresor CGRPérgico (T₉-T₁₂) o por bolos *i.v.* de α -CGRP exógeno.
- b) El efecto de la infusión continua *i.v.* de ADP β S (3, 5.6 y 10 μ g/kg.min) sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación eléctrica del tono sensorial vasodepresor CGRPérgico o por la administración de bolos *i.v.* de α -CGRP exógeno.
- c) El efecto *per se* de la administración de bolos *i.v.* de los antagonistas P2Y₁ (MRS2500; 300 μ g/kg); P2Y₁₂ (PSB0739; 300 μ g/kg); y P2Y₁₃ (MRS2211; 1000 y

3000 µg/kg) sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación eléctrica del tono sensorial vasodepresor CGRPérgico.

- d) El efecto de la administración de bolos *i.v.* de los antagonistas P2Y₁ (MRS2500; 300 µg/kg); P2Y₁₂ (PSB0739; 300 µg/kg); y P2Y₁₃ (MRS2211; 1000 y 3000 µg/kg) sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación eléctrica del tono sensorial vasodepresor CGRPérgico durante una infusión *i.v.* continua de ADPβS (5.6 µg/kg.min).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Animales

Para la realización del presente proyecto de investigación se utilizaron un total de 108 ratas Wistar macho (380-420 g) normotensas. Los animales se mantuvieron bajo una temperatura ambiente de 22±2 °C, con una humedad relativa del 50%, bajo un ciclo de luz/oscuridad 12/12 h, mantenidas con acceso a alimento y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos y protocolos experimentales de esta investigación se realizaron considerando los lineamientos establecidos por el Comité de Ética Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL Cinvestav; Protocolo No. 0139-15) y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

5.2. Diseño experimental

5.2.1. Anestesia y procedimiento de descerebración y desmedulación

Todos los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (60 mg/kg; *i.p.*), siguiendo el protocolo previamente reportado por nuestro grupo (Villanueva-Castillo, *et al.*, 2020). Posteriormente, se realizó una traqueostomía insertando una cánula de polietileno, fijándola y manteniendo a la rata mediante ventilación artificial con una bomba de presión positiva Ugo Basile modelo 7025 (56 ciclos/min, a un volumen de 20 ml/kg) (Kleinman & Radford, 1964). Adicionalmente, se mantuvo la temperatura corporal a 37 °C con la ayuda de una lámpara y se monitoreó con un termómetro rectal. A continuación, se llevó a cabo la descerebración y desmedulación mediante la inserción de un estilete de acero inoxidable a través de la órbita ocular y el foramen *magnum* y hasta el foramen vertebral (Shipley &

Tilden, 1947). Inmediatamente después, se realizó una vagotomía bilateral a nivel cervical y se procedió a la canulación con catéteres de polietileno de las venas yugulares y femorales izquierda y derecha para la administración de fármacos. Además, se colocó un catéter en la arteria carótida izquierda conectado a un transductor de presión Grass (P23XL) para el registro de la presión arterial y la frecuencia cardíaca (FC) mediante un tacógrafo (7P4F, Grass Instruments Co., Quincy, MA, EE.UU.). Tanto la presión arterial diastólica (PAD) como la FC fueron registradas simultáneamente con un polígrafo Grass modelo 7D (Grass Instrument Co., Quincy, MA, EE.UU.).

5.2.2. Procedimientos para evaluar las respuestas vasodepresoras CGRPérgicas inducidas por estimulación eléctrica

Una vez que las ratas se encontraron descerebradas y desmeduladas, se procedió a reemplazar el estilete de acero inoxidable por un electrodo esmaltado ($n = 90$), cuyo segmento no esmaltado se situaron entre los segmentos torácicos T₉-T₁₂ de la médula espinal, con el fin de estimular selectivamente los nervios sensoriales perivasculares CGRPérgicos que inervan a la vasculatura sistémica, *i.e.* el tono sensorial vasodepresor CGRPérgico (Avilés-Rosas *et al.*, 2017; Gillespie *et al.*, 1970; Taguchi *et al.*, 1992; Villalón *et al.*, 2008). Previo a la estimulación eléctrica, los animales recibieron un bolo *i.v.* de galamina (25 mg/kg), un antagonista competitivo no despolarizante de los receptores nicotínicos a nivel de la placa neuromuscular, con la finalidad de evitar las respuestas espásticas generadas por la estimulación eléctrica del asta ventral (Villalón *et al.*, 1995, 1998). Asimismo, recibieron una infusión *i.v.* continua de hexametonio (2 mg/kg·min), un antagonista de los receptores nicotínicos a nivel de los ganglios autonómicos, con la finalidad de bloquear las respuestas vasopresoras simpáticas generadas por la estimulación eléctrica, particularmente a nivel T₉ (Avilés-Rosas *et al.*, 2017; Taguchi *et al.*, 1992; Villalón *et al.*, 1995, 1998).

Para la obtención de las respuestas vasodepresoras en el modelo de la rata descerebrada y desmedulada, la presión arterial diastólica (PAD) fue inicialmente incrementada y mantenida alrededor de 100-115 mmHg mediante una infusión *i.v.* continua de metoxamina (15 µg/kg·min), como se ha establecido previamente por nuestro grupo (Avilés-Rosas *et al.*, 2017; González-Hernández, A., *et al.*, 2011; González-Hernández, A.,

et al., 2010; Villalón *et al.*, 2008). Una vez que los animales alcanzaron estabilidad hemodinámica durante por lo menos 10 min, se determinaron los valores basales de la PAD y la FC. Posteriormente, se procedió a estimular eléctricamente los segmentos medulares T₉-T₁₂, aplicando trenes de descarga de 10 seg para estimular selectivamente el tono sensorial vasodepresor CGRPérgico; con pulsos monofásicos rectangulares con una duración de 2 ms, a 50 V y con frecuencias crecientes de estimulación (0.56, 1.0, 1.8, 3.1 y 5.6 Hz). Cada una de estas frecuencias se aplicaron cada 5 minutos, una vez que la PAD regresó a los valores basales, hasta completar una curva estímulo-respuesta (González-Hernández, A., *et al.*, 2011; González-Hernández, A., *et al.*, 2010; Villalón *et al.*, 2008).

Es importante destacar que las respuestas vasodepresoras CGRPérgicas producidas en la rata (por estimulación eléctrica o por α -CGRP exógeno) son altamente taquifilácticas (González-Hernández, A., *et al.*, 2010, 2011; Villalón *et al.*, 2008). Además, a diferencia de lo que ocurre con las respuestas vasopresoras noradrenérgicas (Villalón *et al.*, 1995, 1998), no es posible realizar más de una curva estímulo-respuesta o dosis-respuesta con las respuestas vasodepresoras CGRPérgicas (González-Hernández, A., *et al.*, 2011; González-Hernández, A., *et al.*, 2010; Villalón *et al.*, 2008). Como consecuencia, los animales de la serie 1 (n = 90) fueron divididos en los siguientes 5 grupos experimentales (Figura 8), previa determinación de la PAD y FC basal:

- Grupo 1 (n = 18): Se dividió en 3 subgrupos: (i) sin tratamiento farmacológico (grupo control; n = 6), (ii) aquel que recibió una infusión continua *i.v.* de agua bidestilada (0.02 ml/min; n = 6) y (iii) aquellos que recibieron un bolo *i.v.* de agua bidestilada (1 ml/kg) seguido de una infusión continua *i.v.* de agua bidestilada (0.02 ml/min; n = 6)
- Grupo 2 (n = 24): Este grupo se dividió en 4 subgrupos (n = 6 cada uno) para determinar el efecto de dosis crecientes de ADP β S, a saber: (i) ADP β S (3 μ g/kg·min); (ii) ADP β S (5.6 μ g/kg·min), (iii) ADP β S (10 μ g/kg·min) y (iv) bolo *i.v.* de agua bidestilada (1 ml/kg) más ADP β S (5.6 μ g/kg·min).
- Grupo 3 (n = 12): Se dividió en 2 subgrupos (n = 6 cada uno) para evaluar el efecto de un bolo *i.v.* del antagonista P2Y₁: (i) MRS2500 (300 μ g/kg) seguido de una infusión continua *i.v.* de agua bidestilada (0.02 ml/min); y (ii) MRS2500 (300 μ g/kg) seguido de una infusión continua *i.v.* de ADP β S (5.6 μ g/kg·min).

- Grupo 4 (n = 12): Se dividió en 2 subgrupos (n = 6 cada uno) en los que se evaluó el efecto de un bolo *i.v.* del antagonista P2Y₁₂: (i) PSB0739 (300 µg/kg) seguido de una infusión continua *i.v.* de agua bidestilada (0.02 ml/min); y (ii) PSB0739 (300 µg/kg) seguido de una infusión continua *i.v.* de ADPβS (5.6 µg/kg·min).
- Grupo 5 (n = 24): Se dividió en 4 subgrupos (n = 6 cada uno) para analizar el efecto de bolos *i.v.* de: (i) MRS2211 (1000 µg/kg) seguido de una infusión continua *i.v.* de agua bidestilada (0.02 ml/min); (ii) MRS2211 (1000 µg/kg) seguido de una infusión continua *i.v.* de ADPβS (5.6 µg/kg·min); (iii) MRS2211 (3000 µg/kg) seguido de una infusión continua *i.v.* de agua bidestilada (0.02 ml/min); y (iv) MRS2211 (3000 µg/kg) seguido de infusión continua *i.v.* de ADPβS (5.6 µg/kg·min).

Diez minutos después de la administración de los compuestos, se realizó una curva estímulo-respuesta como se mencionó anteriormente.

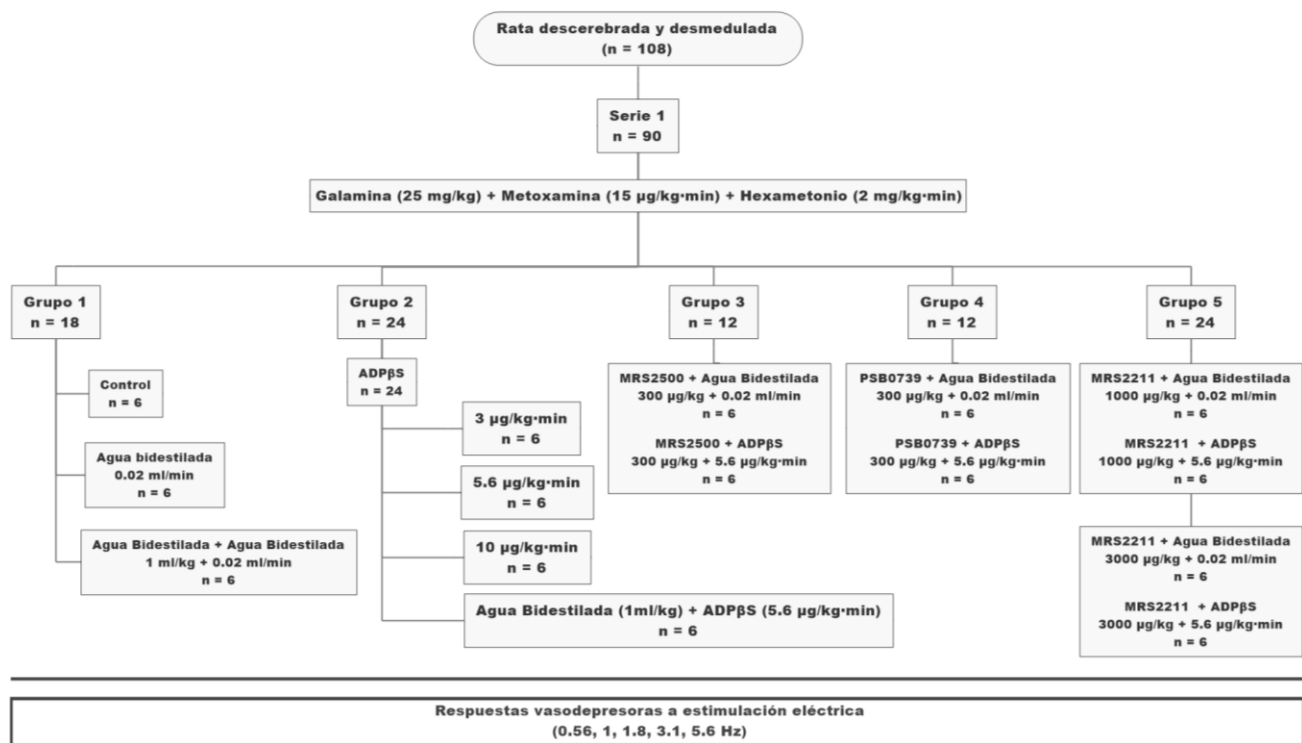


Figura 8 - Procedimiento experimental para evaluar el efecto farmacológico del ADPβS sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por la estimulación del tono sensorial CGRPérgico.

5.2.3. Procedimientos para evaluar de las respuestas vasodepresoras inducidas por bolos *i.v.* de α -CGRP exógeno

A la segunda serie de ratas descerebradas y desmeduladas ($n = 18$) se le dio un periodo de estabilización de 10 min. A continuación, la PAD se incrementó y mantuvo alrededor de 100-115 mmHg mediante una infusión *i.v.* continua de metoxamina ($15 \mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$). Una vez que los animales alcanzaron una estabilidad hemodinámica durante por lo menos 10 min, se tomó registro de los valores basales de la PAD y la FC, mientras que la administración de galamina y hexametonio fue omitida como se ha reportado anteriormente (González-Hernández *et al.*, 2019). Una vez que las variables hemodinámicas se encontraron estables, esta serie de animales fue dividida en 3 grupos ($n = 6$ cada uno) (ver Figura 9):

- Grupo 1: Sin tratamiento farmacológico (grupo control).
- Grupo 2: Recibió una infusión *i.v.* continua de agua bidestilada ($0.02 \text{ ml}/\text{min}$).
- Grupo 3: Recibió una infusión *i.v.* continua de ADP β S ($5.6 \mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$).

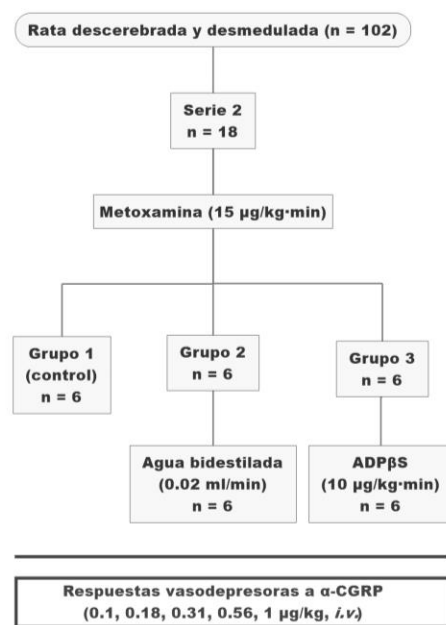


Figura 9 - Procedimiento experimental para evaluar el efecto farmacológico del ADP β S sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por bolos *i.v.* de α -CGRP exógeno.

Después de 10 min, se evaluaron las repuestas vasodepresoras de bolos *i.v.* de α -CGRP exógeno (0.1, 0.18, 0.31, 0.56, and $1 \mu\text{g}/\text{kg}$) (González-Hernández *et al.*, 2019).

5.3. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación son presentados como la media \pm el error estándar de la media. Los cambios máximos de la PAD (respuestas vasodepresoras) bajo las diferentes condiciones experimentales son expresados como porcentaje de cambio con respecto a la PAD basal (Avilés-Rosas *et al.*, 2017; González-Hernández, A., *et al.*, 2011; González-Hernández, A., *et al.*, 2010; Villalón *et al.*, 2008).

Las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación eléctrica o α -CGRP exógeno en los diferentes subgrupos de animales fueron comparadas mediante un análisis de varianza de dos vías (diseño de bloques aleatorios); seguido de una prueba *post hoc* de Student-Newman-Keuls. En tanto que el análisis de los resultados de los cambios en la presión arterial diastólica antes y después de la administración de ADP β S, fue realizado mediante un análisis de varianza de una vía (diseño de bloques aleatorios); seguido de una prueba *post hoc* de Student-Newman-Keuls. En todos los casos se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando la $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1. Efecto de la administración de vehículo (infusión *i.v.* continua y bolo *i.v.*) sobre las respuestas neurogénicas vasodepresoras CGRPérgicas.

En la figura 10 se muestran los cambios en la PAD expresados como porcentaje de cambio con respecto a la PAD basal tras la estimulación eléctrica del tono sensorial CGRPérgico con frecuencias crecientes de estimulación (0.56, 1.0, 1.8, 3.1 y 5.6 Hz) comparando al grupo control, grupo de infusión *i.v.* continua de vehículo (agua bidestilada; 0.02 ml/min) y el grupo de bolo *i.v.* de vehículo (agua bidestilada; 1 ml/kg) + infusión *i.v.* de vehículo (agua bidestilada; 0.02 ml/min) (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de cambio de la PAD por estimulación eléctrica en grupos control					
Grupo	0.56 Hz	1.0 Hz	1.8 Hz	3.1 Hz	5.6 Hz
Control	-4.0 ± 0.3	-8.5 ± 0.9	-14.0 ± 1.6	-23.8 ± 2.1	-32.6 ± 2.5
Vehículo (0.02 ml/min)	-4.9 ± 1.3	-10.7 ± 1.3	-16.7 ± 1.4	-24.4 ± 2.7	-30.4 ± 2.4
Vehículo (1 ml/Kg) + Vehículo (0.02 ml/min)	-3.2 ± 0.4	-6.4 ± 1.4	-13.6 ± 1.8	-22.0 ± 2.5	-28.7 ± 3.0.

En esta tabla se presentan los datos del porcentaje de cambio con respecto a la PAD basal expresados como media ± error estándar en cada una de las frecuencias de estimulación (0.56, 1.0, 1.8, 3.1 y 5.6 Hz)

La estimulación eléctrica selectiva del tono sensorial vasodepresor CGRPérgico produjo decrementos en la presión arterial diastólica los cuales fueron dependientes de la frecuencia de estimulación y no tuvieron diferencias estadísticamente sdignificativas en el grupo que recibió una infusión *i.v.* continua de vehículo, aquel que recibió un bolo *i.v.* de vehículo más una infusión *i.v.* continua de vehículo al ser comparados con el grupo control (Figura 10).

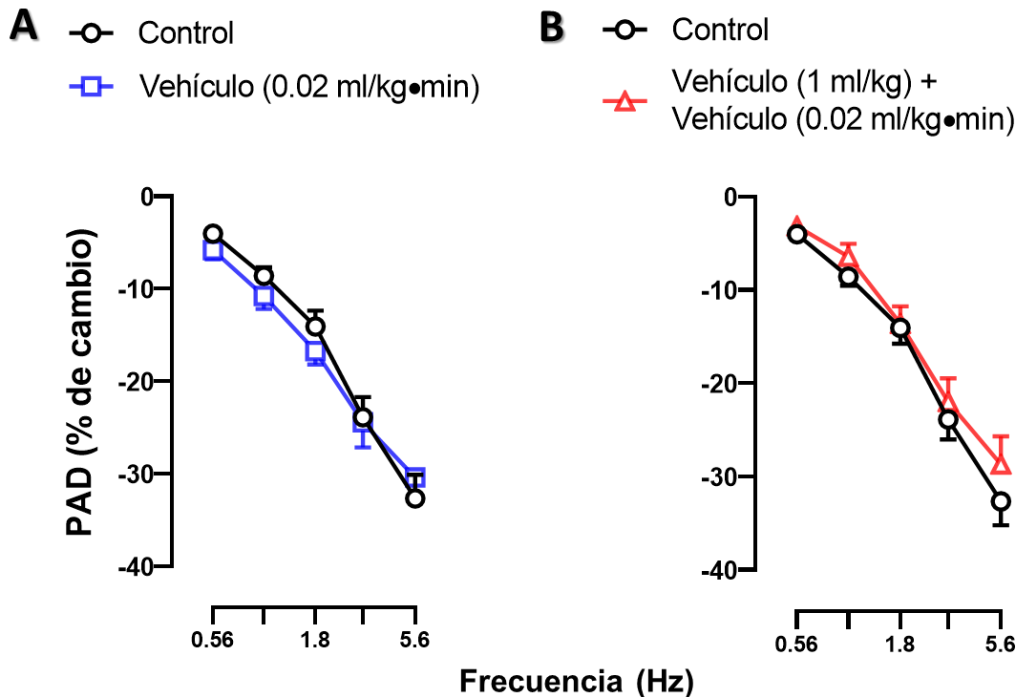


Figura 10- Efecto de la estimulación eléctrica selectiva de los nervios sensoriales CGRPérgicos sobre la presión arterial diastólica antes (grupo control), durante la infusión *i.v.* de vehículo (0.02 ml/min), y después de la administración de un bolo *i.v.* de vehículo (1 ml/kg) + infusión *i.v.* vehículo (0.02 ml/min) ($n = 6$ cada uno). Los símbolos vacíos representan las respuestas control (○) o respuestas no significativas (□, △) versus grupo control ($p > 0.05$).

6.2. Efecto de la infusión *i.v.* continua de ADPβS sobre la presión arterial diastólica.

Como ya se ha mencionado en la metodología, 10 minutos después de la infusión *i.v.* continua con hexametonio se determinaron los valores basales de PAD, así como la PAD 10 minutos después del tratamiento con una infusión *i.v.* continua de vehículo (0.02 ml/min) o de ADPβS a dosis de 3, 5.6 y 10 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$, según sea el grupo, esto previo a la realización de la curva estímulo-respuesta.

Cuantificando para el grupo que recibió una Infusión *i.v.* continua de vehículo (0.02 ml/min) una PAD basal se mantuvo sin cambios 10 minutos después de la administración del vehículo. El grupo que recibió una infusión *i.v.* continua de ADPβS (3 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$) presentó una disminución de la PAD de 8 ± 3 mmHg con respecto a su PAD basal, lo cual en términos del porcentaje de cambio de la PAD con respecto a la basal representa un -6 ± 2 %. Por otra parte, el grupo que recibió una infusión *i.v.* continua de ADPβS (5.6 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$) presentó una disminución de la PAD de 20 ± 3 mmHg con respecto a su

valor basal y un porcentaje de cambio con respecto a la PAD basal de $-18 \pm 3 \%$. Finalmente, el grupo tratado con una infusión *i.v.* continua de ADP β S (10 μ g/kg·min) mostró una disminución de su PAD de 30 ± 4 mmHg con respecto a su PAD basal con un porcentaje de cambio con respecto a su PAD basal de $-27 \pm 3 \%$.

Por lo tanto, la administración de ADP β S en infusión *i.v.* continua produce una disminución de la PAD *per se*, además dicho efecto es dependiente de la dosis; no siendo significativo al comparar la infusión *i.v.* continua de vehículo contra 3 μ g/kg·min de ADP β S, pero si es significativa al comparar las dosis de 5.6 y 10 μ g/kg·min de ADP β S frente al vehículo (Tabla 3).

Tabla 3. PAD pre-post tratamiento con infusión <i>i.v.</i> continua de vehículo o ADPβS			
Grupo	PAD (mmHg) Basal	PAD (mmHg) 10 min después	% de cambio con respecto a la PAD basal
Infusión <i>i.v.</i> continua de vehículo (0.02 ml/min)	105 \pm 4	104 \pm 4	-1 \pm 1
Infusión <i>i.v.</i> continua de ADP β S (3 μ g/kg·min)	116 \pm 5	108 \pm 4	-6 \pm 2
Infusión <i>i.v.</i> continua de ADP β S (5.6 μ g/kg·min)	109 \pm 3	89 \pm 4	-18 \pm 3 (Δ)(\diamond)
Infusión <i>i.v.</i> continua de ADP β S (10 μ g/kg·min)	112 \pm 6	82 \pm 4	-27 \pm 3 (Δ)(\diamond)(\square)

(Δ) Representa una diferencia estadísticamente significativa contra el vehículo ($p < 0.05$)

(\diamond) Representa una diferencia estadísticamente significativa contra 3 μ g/kg·min de ADP β S ($p < 0.05$)

(\square) Representa una diferencia estadísticamente significativa contra 5.6 μ g/kg·min de ADP β S ($p < 0.05$)

6.3. Efecto de la infusión *i.v.* continua de ADP β S sobre las respuestas neurogénicas vasodepresoras CGRPérgicas.

En la figura 11 se muestran los cambios en la PAD expresados como porcentaje de cambio con respecto a la PAD basal tras la estimulación eléctrica del tono sensorial CGRPérgico con frecuencias crecientes de estimulación (0.56, 1.0, 1.8, 3.1 y 5.6 Hz) comparando al grupo de infusión *i.v.* continua de vehículo (agua bidestilada; 0.02 ml/min), el grupo de infusión *i.v.* continua de ADP β S (3 μ g/kg·min), ADP β S (5.6 μ g/kg·min) y ADP β S (10 μ g/kg·min) (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentaje de cambio de la PAD por estimulación eléctrica en grupos con infusión <i>i.v.</i> continua de ADPβS					
Grupo	0.56 Hz	1.0 Hz	1.8 Hz	3.1 Hz	5.6 Hz
Infusión de vehículo	-4.9 ± 1.3	-10.7 ± 1.3	-16.7 ± 1.4	-24.4 ± 2.7	-30.4 ± 2.4
ADPβS (3 µg/kg·min)	-3.5 ± 0.4	-9.2 ± 1.7	-14.5 ± 1.5	-23.9 ± 2.3	-31.2 ± 2.8
ADPβS (5.6 µg/kg·min)	-2.4 ± 0.7	-4.1 ± 0.5	-6.4 ± 0.6	-12.2 ± 0.9	-19.1 ± 1.0
ADPβS (10 µg/kg·min)	-1.1 ± 1.1	-4.1 ± 1.3	-8.2 ± 1.1	-14.3 ± 1.2	-20.4 ± 1.2

En esta tabla se presentan los datos del porcentaje de cambio con respecto a la PAD basal expresados como media ± error estándar en cada una de las frecuencias de estimulación (0.56, 1.0, 1.8, 3.1 y 5.6 Hz).

La estimulación del tono sensorial vasodepresor CGRPérgico resultó en decrementos en la presión arterial diastólica (expresados como porcentaje de cambio), los cuales permanecieron sin cambios durante la infusión *i.v.* continua de ADPBS 3 ug/kg·min frente a la infusión *i.v.* continua de vehículo (Figura 11-A). En contraste, dichas respuestas vasodepresoras fueron inhibidas durante la infusión *i.v.* continua de ADPBS 5.6 ug/kg·min (Figura 11-B) o ADPBS 10 ug/kg·min (Figura 11-C) al ser comparadas con las respuestas vasodepresoras obtenidas por el grupo de infusión *i.v.* continua de vehículo (agua bidestilada; 0.02 ml/min), dicha inhibición de las respuestas vasodepresoras se encontraron en las frecuencias de estimulación de 1.8, 3.1 y 5.6 Hz con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

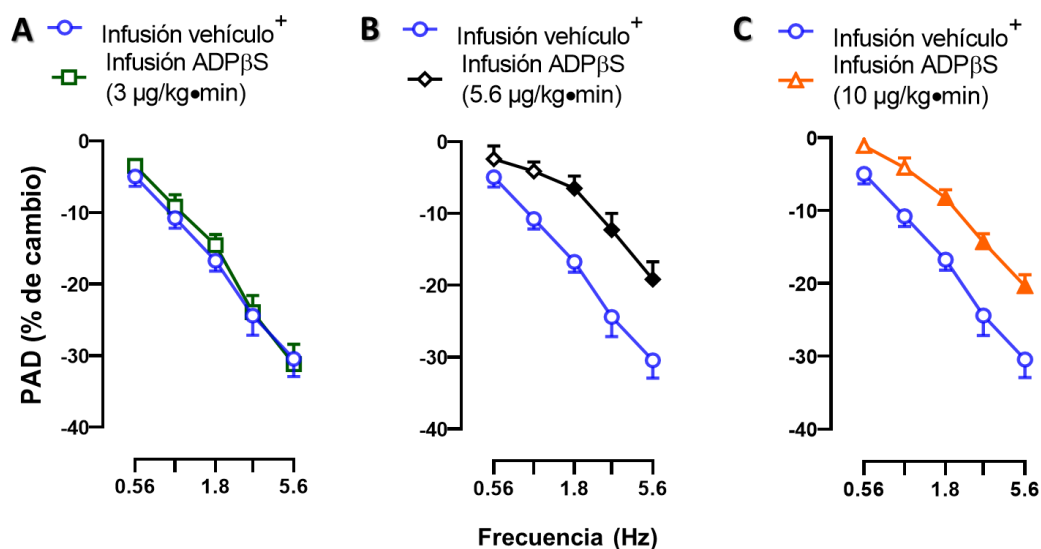


Figura 11 - Efecto inhibitorio de la administración de infusiones *i.v.* continuas de (A) ADPβS (3 µg/kg·min) (B) ADPβS 5.6 µg/kg·min y (C) ADPβS 10 µg/kg·min sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación eléctrica del tono sensorial vasodepresor CGRPérgico ($n = 6$ cada subgrupo). Los símbolos sólidos indican diferencia estadísticamente significativa $p < 0.05$ con respecto al grupo de infusión *i.v.* continua de vehículo.; agua bidestilada; 0.02 ml/min (+).

6.4. Efecto de la infusión continua de vehículo o ADPβS sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por bolos *i.v.* de CGRP exógeno.

En la figura 12 se muestran los cambios en la PAD expresados como porcentaje de cambio con respecto a la PAD basal tras la administración de bolos *i.v.* de α-CGRP en dosis crecientes (0.1, 0.18, 0.31, 0.56 y 1.0 µg/kg) comparando al grupo control, grupo de infusión *i.v.* continua de vehículo (agua bidestilada; 0.02 ml/min) y al grupo que recibió una infusión *i.v.* continua de ADPβS (5.6 µg/kg·min) (Tabla 5).

Tabla 5. Porcentaje de cambio de la PAD por la administración de α-CGRP exógeno					
Grupo	0.1 µg/kg	0.18 µg/kg	0.31 µg/kg	0.56 µg/kg	1.0 µg/kg
Control	-3.4 ± 1.2	-8.4 ± 2.8	-19.7 ± 2.2	-31.1 ± 2.0	-45.6 ± 2.4
Vehículo (0.02 ml/min)	-3.0 ± 0.9	-8.9 ± 0.3	-19.7 ± 1.6	-27.7 ± 2.2	-39.5 ± 1.3
ADPβS (5.6 µg/kg·min)	-3.3 ± 1.0	-8.6 ± 0.7	-19.6 ± 1.6	-27.6 ± 1.8	-40.4 ± 1.6

En esta tabla se presentan los datos del porcentaje de cambio con respecto a la PAD basal expresados como media ± error estándar en cada una de las dosis de α-CGRP usadas (0.1, 0.18, 0.31, 0.56 y 1.0 µg/kg).

En este sentido tras la administración de bolos *i.v.* de α -CGRP se encontró una disminución en el porcentaje de cambio de presión arterial diastólica dependientes de la dosis, en este sentido no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los grupos; (i) control, (ii) infusión *i.v.* continua de vehículo (0.02 ml/min) e (iii) infusión *i.v.* continua de ADP β S (5.6 μ g/kg·min) (Figura 12).

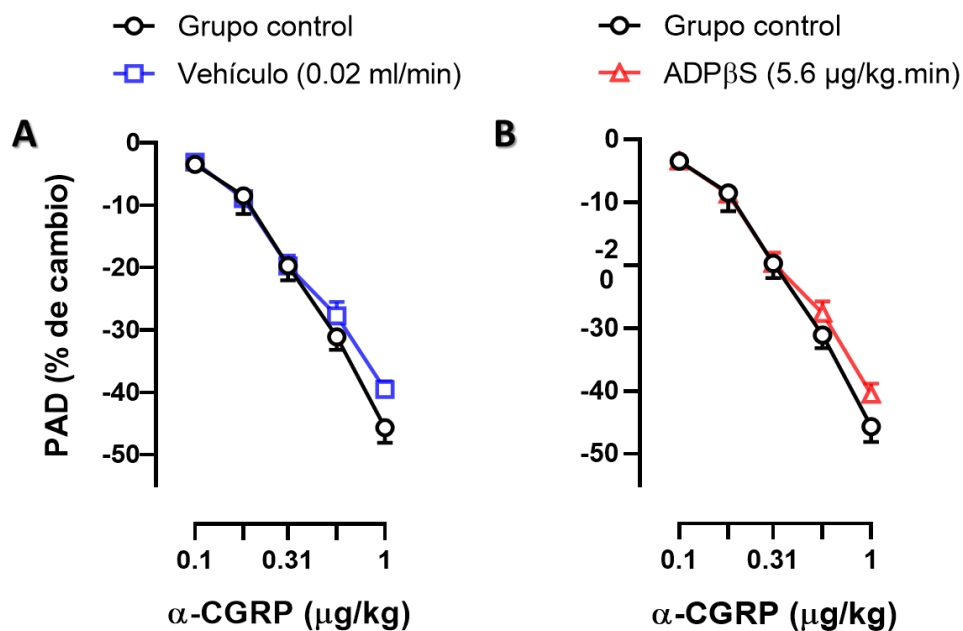


Figura 12 – Efecto de una infusión *i.v.* de vehículo (agua bidestilada, 0.02 ml/min;) o ADP β S (5.6 μ g/kg·min), sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por bolos *i.v.* de α -CGRP ($n = 6$ cada subgrupo). Los símbolos vacíos representan las respuestas control (\circ) o respuestas no significativas (\square , \triangle) versus grupo control ($p > 0.05$).

6.5. Efecto *per se* de la administración de los antagonistas P2Y₁, P2Y₁₂ y P2Y₁₃ sobre las respuestas neurogénicas vasodepresoras CGRPérgicas.

En la figura 13 se muestran los resultados obtenidos con respecto al efecto *per se* de la administración de bolos *i.v.* de los antagonistas P2Y₁, P2Y₁₂ y P2Y₁₃ sobre la respuesta vasodepresora CGRPérgica por estimulación eléctrica, como porcentaje de cambio con respecto a la PAD basal, con frecuencias de estimulación crecientes (0.56, 1.0, 1.8, 3.1 y 5.6 Hz) comparando los siguientes grupos: grupo control, bolo *i.v.* de vehículo (agua bidestilada; 1 ml/kg) + infusión *i.v.* continua de vehículo (agua bidestilada; 0.02 ml/min), bolo *i.v.* de MRS2211 (1000 μ g/kg) + infusión *i.v.* continua de vehículo (agua bidestilada; 0.02 ml/min), bolo *i.v.* de MRS2211 (3000 μ g/kg) + infusión *i.v.* continua de vehículo (agua

bidestilada; 0.02 ml/min), bolo *i.v.* de PSB0739 (300 µg/kg) + infusión *i.v.* continua de vehículo (agua bidestilada; 0.02 ml/min) y bolo *i.v.* de MRS2500 (300 µg/kg) + infusión *i.v.* continua de vehículo (agua bidestilada; 0.02 ml/min) (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentaje de cambio de la PAD por estimulación eléctrica en grupos con administración de bolos <i>i.v.</i> de antagonistas P2Y					
Grupo	0.56 Hz	1.0 Hz	1.8 Hz	3.1 Hz	5.6 Hz
Control	-4.0 ± 0.3	-8.5 ± 0.9	-14.0 ± 1.6	-23.8 ± 2.1	-32.6 ± 2.5
Vehículo (1 ml/Kg) + Vehículo (0.02 ml/min)	-3.2 ± 0.4	-6.4 ± 1.4	-13.6 ± 1.8	-22.0 ± 2.5	-28.7 ± 3.0.
MRS2500 (300 µg/kg) + Vehículo (0.02 ml/min)	-3.9 ± 0.4	-8.1 ± 1.0	-14.4 ± 1.1	-24.0 ± 0.5	-31.5 ± 0.8
PSB0739 (300 µg/kg) + Vehículo (0.02 ml/min)	-1.6 ± 0.5	-5.2 ± 0.2	-11.0 ± 1.2	-18.3 ± 1.1	-27.2 ± 0.7
MRS2211 (1000 µg/kg) Vehículo (0.02 ml/min)	-1.3 ± 0.4	-5.0 ± 0.3	-13.4 ± 0.6	-19.0 ± 0.7	-27.7 ± 1.1
MRS2211 (3000 µg/kg) Vehículo (0.02 ml/min)	-1.8 ± 0.3	-4.6 ± 0.1	-12.5 ± 1.1	-20.2 ± 0.7	-28.0 ± 1.0

En esta tabla se presentan los datos del porcentaje de cambio con respecto a la PAD basal expresados como media ± error estándar en cada una de las frecuencias de estimulación (0.56, 1.0, 1.8, 3.1 y 5.6 Hz).

Al comparar el porcentaje de cambio con respecto a la PAD basal entre los grupos control, bolo de vehículo + infusión de vehículo, MRS2211 (1000 µg/kg) + infusión de vehículo, MRS2211 (3000 µg/kg) + infusión de vehículo, PSB0739 (300 µg/kg) + infusión de vehículo y MRS2500 (300 µg/kg) + infusión de vehículo en cada una de las frecuencias de estimulación, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre estos grupos ($p > 0.05$); (Figura 13), por lo que el efecto *per se* de los antagonistas P2Y sobre la

respuesta vasodepresora CGRPérgica por estimulación eléctrica es similar a la obtenida por el grupo control.

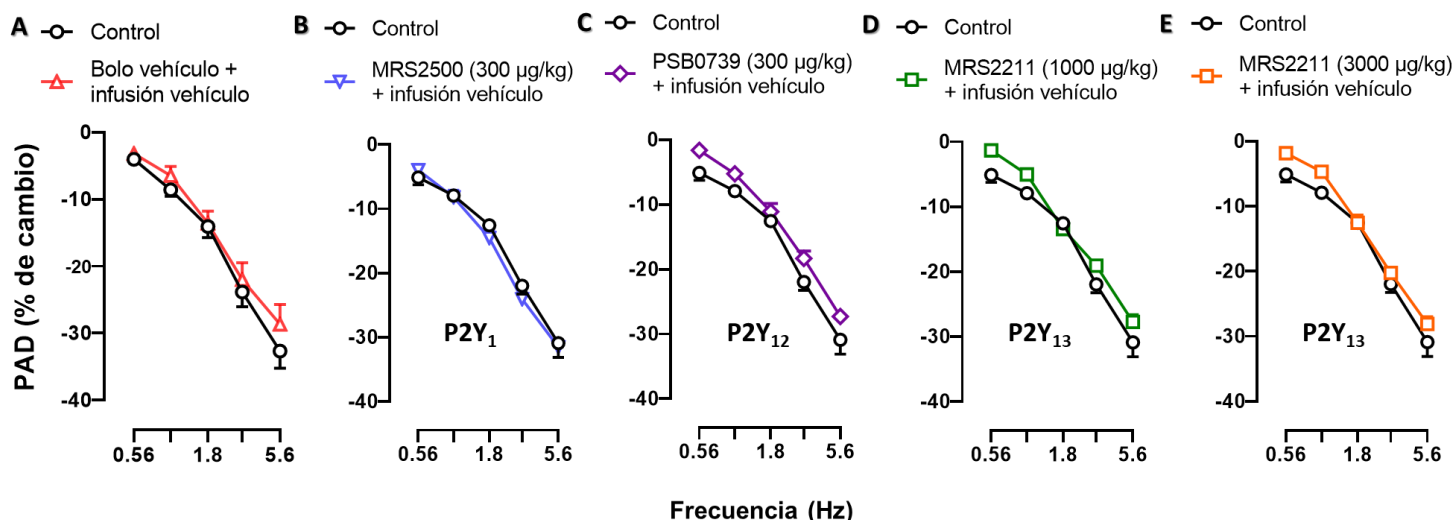


Figura 13 - Efecto per se del vehículo o de los antagonistas P2Y sobre las respuestas vasodepresoras por estimulación eléctrica de los nervios sensoriales CGRPérgicos medulares (T_9 - T_{12}). La administración de (A) vehículo o los antagonistas (B) MRS2500 (300 $\mu\text{g}/\text{kg}$), (C) PSB0739 (300 $\mu\text{g}/\text{kg}$), (D) MRS2211 (1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) o MRS2211 (3000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) no modificaron por sí mismo los decrementos de la presión arterial diastólica producidos por estimulación del tono sensorial vasodepresor CGRPérgico en presencia de una infusión i.v. continua de agua bidestilada (0.02 ml/min) ($n = 6$ cada subgrupo). Los símbolos vacíos representan las respuestas control (O) o respuestas no significativas (\square , Δ , ∇ , \diamond) versus grupo control ($p > 0.05$).

6.6. Efecto de la administración de los antagonistas P2Y₁, P2Y₁₂ y P2Y₁₃ sobre la inhibición por ADPβS de las respuestas neurogénicas vasodepresoras CGRPérgicas.

La figura 14 representa el efecto de la administración de un bolo i.v. de los antagonistas P2Y₁, P2Y₁₂ y P2Y₁₃ sobre la inhibición de la respuesta neurogénica vasodepresora CGRPérgica causada por la infusión continua de ADPβS comparando los grupos:

- Control
- Bolo i.v. de vehículo (agua bidestilada; 1 ml/kg) + infusión i.v. continua de vehículo (agua bidestilada; 0.02 ml/min)
- Bolo i.v. de vehículo (agua bidestilada; 1 ml/kg) + infusión i.v. continua de ADPβS (5.6 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$)
- Bolo i.v. de MRS2500 (300 $\mu\text{g}/\text{kg}$) + infusión i.v. continua de ADPβS (5.6 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$)
- Bolo i.v. de PSB0739 (300 $\mu\text{g}/\text{kg}$) + infusión i.v. continua de ADPβS (5.6 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$)

- Bolo *i.v.* de MRS2211 (1000 µg/kg) + infusión *i.v.* continua de ADPβS (5.6 µg/kg·min)
- Bolo *i.v.* de MRS2211 (3000 µg/kg) + infusión *i.v.* continua de ADPβS (5.6 µg/kg·min).

Como se muestra en la Tabla 7, se produjo una inhibición significativa de la respuesta vasodepresora generada por la estimulación eléctrica en el grupo que recibió un bolo *i.v.* de vehículo + infusión *i.v.* continua de ADPβS (5.6 µg/kg·min) al ser comparado con el grupo control en las frecuencias de 1.8, 3.1 y 5.6 Hz (Figura 14-A). Este mismo resultado se encontró en el grupo que recibió un bolo *i.v.* de vehículo + infusión *i.v.* continua de ADPβS (5.6 µg/kg·min) frente al grupo que recibió un bolo *i.v.* de vehículo + infusión *i.v.* continua de vehículo (Figura 14-A).

Tabla 7. Porcentaje de cambio de la PAD por estimulación eléctrica en grupos con administración de bolos <i>i.v.</i> de antagonistas P2Y + infusión <i>i.v.</i> continua de ADPβS					
Grupo	0.56 Hz	1.0 Hz	1.8 Hz	3.1 Hz	5.6 Hz
Control	-4.0 ± 0.3	-8.5 ± 0.9	-14.0 ± 1.6	-23.8 ± 2.1	-32.6 ± 2.5
Vehículo (1 ml/Kg) + ADPβS (5.6 µg/kg·min)	-2.4 ± 0.7	-4.1 ± 0.5	-6.4 ± 0.6	-12.2 ± 0.9	-19.1 ± 1.0
MRS2500 (300 µg/kg) + ADPβS (5.6 µg/kg·min)	-3.2 ± 0.3	-6.0 ± 0.4	-11.5 ± 1.0	-23.8 ± 0.6	-32.9 ± 0.8
PSB0739 (300 µg/kg) + ADPβS (5.6 µg/kg·min)	-0.7 ± 0.4	-5.2 ± 0.3	-8.4 ± 0.8	-13.0 ± 0.6	-17.9 ± 0.4
MRS2211 (1000 µg/kg) + ADPβS (5.6 µg/kg·min)	-1.8 ± 0.5	-5.6 ± 0.2	-8.0 ± 0.4	-12.0 ± 0.9	-17.7 ± 0.8
MRS2211 (3000 µg/kg) + ADPβS (5.6 µg/kg·min)	-1.2 ± 0.4	-5.4 ± 0.2	-11.5 ± 0.8	-17.4 ± 0.7	-27.3 ± 1.2

En esta tabla se presentan los datos del porcentaje de cambio (%) con respecto a la PAD basal expresados como media ± error estándar en cada una de las frecuencias de estimulación (0.56, 1.0, 1.8, 3.1 y 5.6 Hz).

Por el contrario, se observó una reversión del efecto inhibitorio del ADPβS (5.6 µg/kg·min) en el grupo de animales que recibieron MRS2500 (300 µg/kg) + infusión *i.v.* continua de ADPβS (5.6 µg/kg·min), los cuales no mostraron diferencias

estadísticamente significativas ($p > 0.05$) en ninguna de las frecuencias de estimulación evaluadas (0.56, 1.0, 1.8, 3.1, 5.6 Hz) al ser comparado con el grupo control (Figura 14-B).

El grupo que recibió un bolo *i.v.* de PSB0739 (300 $\mu\text{g}/\text{kg}$) + infusión *i.v.* continua de ADP β S (5.6 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$) mostró una inhibición de la respuesta vasodepresora CGRPérgica dada por la estimulación eléctrica al compararse contra el grupo control en las frecuencias de estimulación; 1.8 Hz, 3.1 Hz y 5.6 Hz (Figura 14-C). Lo mismo se encontró al comparar el porcentaje de cambio de la PAD encontrado en el grupo que recibió un bolo *i.v.* MRS2211 (1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) + infusión *i.v.* continua de ADP β S (5.6 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$) contra el grupo control en las frecuencias de estimulación: 1.8 Hz, 3.1 Hz y 5.6 Hz; figura 14-D. Por otra parte, el grupo que recibió un bolo *i.v.* de MRS2211 de 3000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ + infusión *i.v.* continua de ADP β S (5.6 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$) no presentó un efecto inhibitorio significativo sobre la respuesta vasodepresora CGRPérgica por estimulación eléctrica al compararlo contra el grupo control ($p > 0.05$); (Figura 14-E).

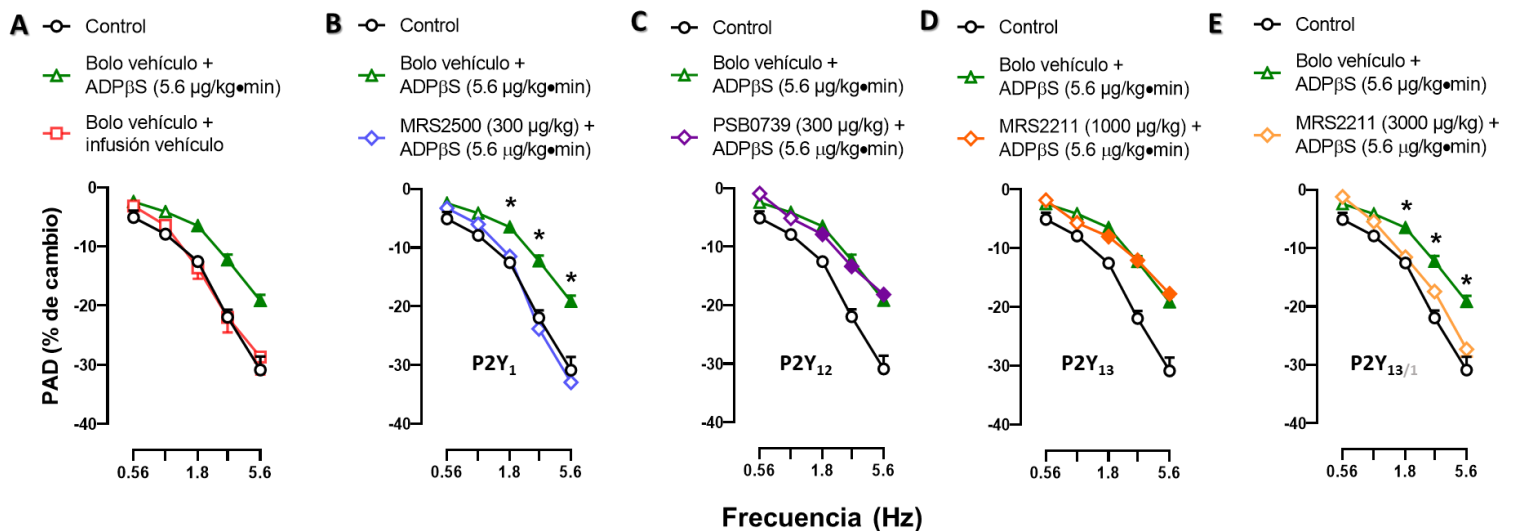


Figura 14 - Efecto de los antagonistas P2Y sobre el efecto inhibitorio del ADP β S de la respuesta vasodepresora CGRPérgica producida por estimulación eléctrica. Los símbolos vacíos representan las respuestas control (○) o respuestas no significativas (□, △, ▽, ◇) versus grupo control ($p > 0.05$). Los (*) representan una diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al grupo que recibió bolo *i.v.* de antagonista + infusión *i.v.* continua de ADP β S.

7. DISCUSIÓN

7.1. General

En el presente trabajo se investigó el efecto que produce una infusión *i.v.* continua de ADP β S sobre las respuestas vasodepresoras CGRPérgicas, a nivel preunional o postunional en un modelo de rata descerebrada y desmedulada con una infusión *i.v.* continua de metoxamina de 15 μ g/kg.min. Para esto se realizaron dos series principales en las que se evaluaron las respuestas vasodepresoras CGRPérgicas producidas por: (i) estimulación eléctrica del segmento vertebral torácico T₉-T₁₂, para confirmar acciones a nivel preunional; y (ii) la administración *i.v.* de CGRP exógeno, para confirmar acciones a nivel postunional.

Posteriormente, se realizó la identificación farmacológica del o los receptores purinérgicos P2Y responsables de los cambios en las respuestas CGRPérgicas dadas por la administración de una infusión *i.v.* continua de ADP β S (en particular los P2Y₁, P2Y₁₂ y P2Y₁₃), utilizando los siguientes antagonistas; MRS2500 (P2Y₁), PSB0739 (P2Y₁₂) y/o MRS2211 (P2Y₁₃).

En este sentido, el uso de un modelo de rata descerebrada y desmedulada nos permite evaluar los cambios en las respuestas vasodepresoras CGRPérgicas dadas por la infusión continua de ADP β S sin la intervención del reflejo barorreceptor o del sistema nervioso central. De esta manera pueden observarse los cambios nivel de la unión neurovascular (Gillespie et al., 1970; Taguchi et al., 1992). El ADP β S fue usado en el presente trabajo ya que al ser un análogo estable del ADP, este compuesto es capaz de acoplarse a los receptores purinérgicos P2Y₁, P2Y₁₂ y P2Y₁₃ de forma selectiva (Malmsjö et al., 1999; Saïag et al., 1996; Villanueva-Castillo et al., 2020; Zizzo et al., 2008). Hasta el momento sólo se ha demostrado que la administración de bolos *i.v.* ADP β S producen: (i) respuestas vasodepresoras agudas en modelos *in vivo* tanto de rata anestesiada como de rata descerebrada y desmedulada (Haanes et al., 2019; Silva Velasco, 2021); y (ii) simpato-inhibición administrando el ADP β S en forma de infusión *i.v.* continua, la cual está mediada principalmente por la activación de los receptores purinérgicos P2Y₁₂, y en menor grado de participación, por el subtipo P2Y₁₃ (Villanueva-Castillo et al., 2020).

7.2. Efecto de la administración de la infusión *i.v.* continua de ADPβS sobre las respuestas vasodepresoras CGRPérgicas en la rata.

Para el presente trabajo de investigación, se usó como vía de administración del ADPβS una infusión *i.v.* continua con dosis de 3, 5.6 y 10 μg/kg·min. Se encontró que: (i) 3 μg/kg·min de ADPβS no modificó las respuestas vasodepresoras ($p > 0.05$) al compararlas con el grupo control y el grupo que recibió una infusión *i.v.* de vehículo (agua bidestilada, 0.02 ml/min) (Figura 11-A); y (ii) 5.6 y 10 μg/kg·min de ADPβS produjeron inhibición de dichas respuestas vasodepresoras (Figura 11-B y C) estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en las frecuencias de estimulación de 1.8, 3.1 y 5.6 Hz.

Es importante destacar que, aproximadamente 10 minutos después de iniciar la infusión *i.v.* continua de ADPβS, se produjo una disminución dosis-dependiente de la PAD basal (Tabla 3), y que se mantuvo así a lo largo del experimento (Figura 15). Este efecto vasodepresor sostenido *per se* del ADPβS es consistente con lo reportado previamente. En este sentido: (i) la administración de ADPβS a concentración de 10^{-6} y 10^{-5} M causa hiperpolarización del músculo liso vascular (Malmsjö et al., 1999); (ii) la administración de bolos *i.v.* con dosis crecientes de ADPβS (0.3-10 μg/kg) produce respuestas vasodepresoras (*i.e.* disminución en la PAD) en el modelo de rata descerebrada y desmedulada (Silva Velasco, 2021); y (iii) una dosis supramáxima de 330 μg/kg (bolo *i.v.*) de ADPβS produce respuestas bifásicas, caracterizadas por un efecto vasopresor seguido por un vasodepresor (Haanes *et al.*, 2019), dicho efecto podría estar mediado por la activación de los receptores P2Y₁ endoteliales.

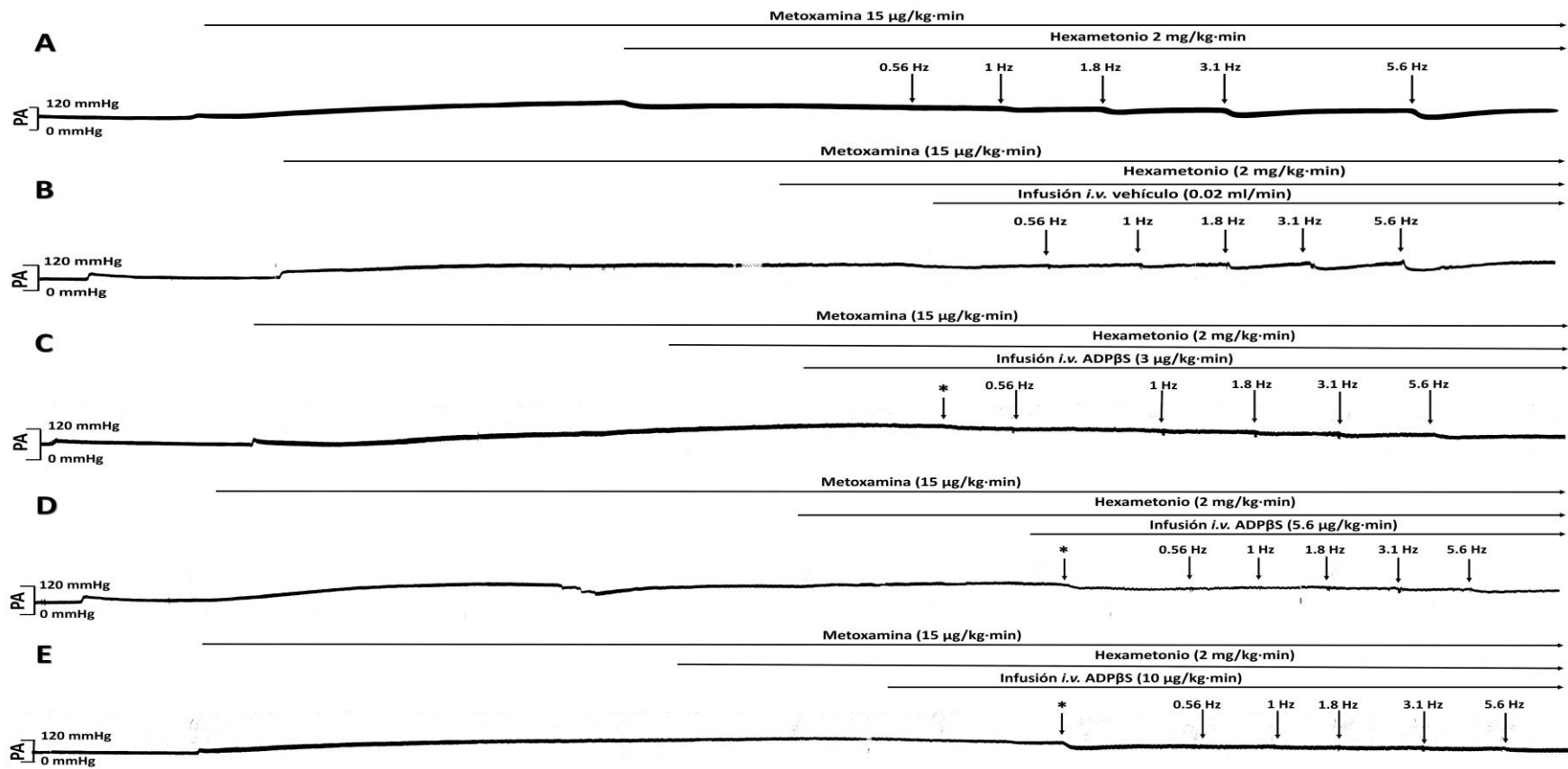


Figura 15 – Efecto de la infusión continua de ADPβS sobre la PAD basal y sobre las respuestas vasodepresoras sensoriales. Registros originales que ilustran las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación eléctrica (Hz) del tono sensorial CGRPérgico en ratas descerebradas y desmeduladas en ausencia (A) grupo control o presencia de: (B) infusión i.v. continua de vehículo; (C) infusión i.v. continua de ADPβS de 3 μg/kg·min; (D) infusión i.v. continua de ADPβS de 5.6 μg/kg·min; (E) infusión i.v. continua de ADPβS de 10 μg/kg·min. Nótese, que tras 5 a 7 minutos de iniciar la infusión i.v. continua de ADPβS (A, B, C) se observa una disminución de la PA aproximada de 10-15 mmHg con respecto a la PA basal (*), dicho efecto no se observa tanto en el grupo control como en aquel que recibió una infusión i.v. continua de vehículo (A y B).

Cabe mencionar que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) al comparar el porcentaje de cambio de la PAD de los grupos con ADP β S de 5.6 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ y ADP β S de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ en ninguna de las frecuencias de estimulación. Por lo tanto, la dosis de 5.6 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ de ADP β S fue utilizada para el análisis farmacológico de los receptores P2Y involucrados en la inhibición de las respuestas vasodepresoras. En contraste, las respuestas vasodepresoras inducidas por bolos *i.v.* de α -CGRP exógeno no fueron modificadas significativamente ($p > 0.05$) durante la infusión continua de 5.6 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ de ADP β S (Figura 12).

El hecho de que la infusión *i.v.* continua de ADP β S produjera inhibición de las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación eléctrica, mas no de las inducidas por bolos *i.v.* de α -CGRP exógeno, sugiere que el efecto inhibitorio del ADP β S es vía la activación de receptores purinérgicos preunionales, mas no vía la activación de receptores postunionales. Adicionalmente, estos hallazgos nos permiten inferir mediante herramientas farmacológicas la existencia de receptores purinérgicos P2Y sensibles a ADP en la terminal sensorial CGRPérgica, además de los P2X_{2/3}.

El CGRP es liberado por neuronas sensoriales perivasculares A δ y C (Russell *et al.*, 2014). En este sentido, diversas investigaciones en nuestro grupo de trabajo han identificado el perfil farmacológico de diversos receptores que poseen la facultad de inhibir la liberación de dicho péptido a nivel preunional; entre estos, destacan los receptores histaminérgicos H₃, serotoninérgicos 5-HT_{1B/(1D)}, dopaminérgicos D₂-like (subtipo de receptor D₃) y α ₂-adrenérgicos (González-Hernández *et al.*, 2019; Manrique-Maldonado *et al.*, 2015, 2019).

La evidencia sobre la relación entre los nucleótidos y la modulación del tono vasodepresor CGRPérgico se dirigían hacia un papel potenciador del efecto vasodepresor CGRPérgico a nivel preunional. En este sentido, Holton en 1959 reportó que la estimulación antidrómica de los nervios sensoriales de la piel del conejo inducía la liberación de ATP, lo que resultaba en efectos vasodepresores (Holton, 1959). Posteriormente, se encontró que dicho efecto estaba mediado por el receptor heterodimérico P2X_{2/3}, el cual se expresa en la terminal preunional de las neuronas sensoriales CGRPérgicas y al ser activado por su agonista promueve la liberación de CGRP (Dunn *et al.*, 2000; Lewis *et al.*, 1995; Ralevic &

Burnstock, 1998). Hasta el momento, sólo se ha descrito la acción del ATP y la adenosina sobre la terminal preunional a través de receptores de las familias P2X y A₁, respectivamente. En este sentido, el ATP es liberado de la fibra simpática noradrenérgica hacia la unión neuroefectora promoviendo la liberación de CGRP de las fibras sensoriales A δ y C (Burnstock, 1972, 2007, 2017a; Drury & Szent-Györgyi, 1929; Dunn et al., 2000; Holton, 1959; Ralevic & Burnstock, 1998).

Por otra parte, el presente trabajo demuestra farmacológicamente que otros nucleótidos, tales como el ADP, a través de su análogo estable ADP β S pueden modular la respuesta vasodepresora CGRPérgica a nivel preunional, así como la existencia de otros receptores purinérgicos a nivel preunional. Estos hallazgos contrastan con lo reportado anteriormente, en donde se sugiere que la actividad del ADP β S es a nivel endotelial y a nivel del músculo liso vascular, ejerciendo diferentes efectos que incluyen: (i) decrementos en la presión arterial; (ii) aumento de la permeabilidad endotelial; (iii) actividad protrombótica; y (iv) actividad proinflamatoria (Gordon & Hesse, 1961; Saïag *et al.*, 1996; Strassheim *et al.*, 2020; Zizzo *et al.*, 2008). En cuanto al efecto vasodepresor producido por el ADP en ratas anestesiadas con vagotomía bilateral, se sabe que este nucleótido es 147 veces más potente que la adenosina y 45 veces más potente que el ATP. Esto fue comprobado por Gordon y Hesse (1961), quienes demostraron que un bolo *i.v.* de ADP (0.7 μ g/kg) producía una disminución en la presión arterial de 30 mmHg, mientras que 1 μ g/kg de ADP producía un descenso de la presión arterial de hasta 50 mmHg (Gordon & Hesse, 1961).

De manera similar, Haanes *et al.* (2019) encontró en el mismo modelo de rata anestesiada que tras la administración de un bolo *i.v.* de ADP β S (330 μ g/kg) se producían respuestas bifásicas sobre la presión arterial, las cuales se caracterizan por un efecto vasopresor de corta duración seguido por una respuesta vasodepresora de larga duración. Además, Silva Velasco (2021) encontró una disminución de la PAD dependiente de la dosis después de la administración de ADP β S (0.3-10 μ g/kg, *i.v.*) en el modelo de rata descerebrada y desmedulada con infusión *i.v.* continua de metoxamina. En congruencia con lo reportado anteriormente, nuestros resultados indican que una infusión *i.v.* continua de ADP β S (5.6 μ g/kg·min) produce una disminución de la PAD de 20 ± 3 mmHg (Figura 15),

lo que resulta en la inhibición de las respuestas neurogénicas CGRPérgicas. Considerando el peso de los animales utilizados (280-300 g) y el volumen sanguíneo circulante (aproximadamente 25 ml), podemos sugerir que la concentración de ADPβS circulante es de 0.3 nmol/min, concentración suficiente para tener efectos a nivel preunional sobre la neurona sensorial CGRPérgica Aδ y C.

7.3. Efecto de la administración de bolos i.v. de antagonistas de los receptores purinérgicos P2Y sobre las respuestas vasodepresoras CGRPérgicas.

Tras encontrar un efecto inhibitorio del ADPβS sobre las respuestas vasodepresoras CGRPérgicas dadas por estimulación eléctrica (Figura 11), se realizó la identificación farmacológica de los receptores purinérgicos P2Y involucrados en dicho efecto. Considerando que el ADPβS puede activar a los receptores purinérgicos P2Y₁, P2Y₁₂ y P2Y₁₃ (Burnstock, 2007, 2020; Strassheim *et al.*, 2020; von Kügelgen, 2006; Zizzo *et al.*, 2008), decidimos usar los siguientes antagonistas comercialmente disponibles: MRS2500 (P2Y₁), PSB0739 (P2Y₁₂) y MRS2211 (P2Y₁₃).

Es importante mencionar que las dosis utilizadas de estos antagonistas se fundamentaron en su afinidad (pK_i) por cada subtipo de receptor (Tabla 8), y que son dosis lo suficientemente altas para bloquearlos por completo (Villanueva-Castillo, *et al.*, 2020). Ciertamente, estos autores han demostrado con anterioridad que dicho cálculo es aplicable para cualquier tipo o subtipo de receptor; incluyendo a los purinérgicos.

Por lo tanto, se sugiere que compuestos con afinidades (valores de pK_i) entre 6 y 7, requieren de dosis i.v. entre 1000 (para $pK_i = 7$) y 3000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (para $pK_i = 6$) para bloquear por completo a sus respectivos receptores. Siguiendo este mismo razonamiento, compuestos con afinidades entre 7 y 8 requerirán dosis i.v. entre 300 y 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Villanueva-Castillo, *et al.*, 2020).

Por último, las afinidades entre 8 y 9 requerirán dosis i.v. entre 100 y 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$, y afinidades entre 9 y 10 requerirán 30 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$; dicho argumento deriva a partir de trabajos previamente realizado por este laboratorio desde hace 35 años hasta la actualidad. Sin embargo, no existen publicaciones donde se deduzca este razonamiento el cual está fundamentado en la experiencia previa.

Tabla 8. Afinidades de ligandos P2Y por los receptores P2Y₁, P2Y₁₂ y P2Y₁₃

Fármacos		Receptores		
		P2Y ₁	P2Y ₁₂	P2Y ₁₃
Agonista	ADPβS	5.6	7.5	7.5
Antagonistas	MRS2500	9.1	4 ^a	4 ^a
	PSB0739	6 ^b	7.6	6 ^b
	MRS2211	5 ^c	5 ^c	6.3

Valores presentados como $pK_i/pEC_{50}/pIC_{50}$ en receptores humanos.

No se observó efecto hasta: ^a 100 μM; ^b 1 μM; ^c 10 μM

(tomado y modificado de Villanueva-Castillo *et al.*, 2020; von Kügelgen, 2006)

Teniendo en cuenta el razonamiento anteriormente mencionado, las dosis *i.v.* usadas de los antagonistas para el presente trabajo de investigación fueron de: (i) 300 μg/kg MRS2500 (P2Y₁); (ii) 300 μg/kg PSB0739 (P2Y₁₂); y (iii) 1000 y 3000 μg/kg MRS2211 (P2Y₁₃). Dichas dosis se basan en las constantes de afinidad (valores de pK_i) de cada uno de estos antagonistas (Tabla 2) y en diferentes trabajos previamente publicados los cuales han validado y demostrado que estas dosis son suficientes para bloquear por completo a su receptor (Haanes *et al.*, 2019; Silva Velasco, 2021; Villanueva-Castillo, *et al.*, 2020).

Para este proyecto fue importante inicialmente descartar los posibles efectos *per se* de cada uno de estos antagonistas sobre las respuestas vasodepresoras CGRPérgicas dadas por estimulación eléctrica. Por esta razón, se administraron seguidos de una infusión *i.v.* continua de vehículo (agua bidestilada); al no encontrar diferencias estadísticamente significativas con respecto a los grupos control, se refuerza la idea de que estos antagonistas carecen de efectos *per se* sobre la PAD y sobre las respuestas neurogénicas vasodepresoras CGRPérgicas (Figura 13).

7.4. Papel de los receptores P2Y₁, P2Y₁₂ y P2Y₁₃ en el efecto inhibitorio del ADPβS sobre las respuestas vasodepresoras CGRPérgicas.

Nuestros resultados sugieren que el ADPβS, administrado como una infusión *i.v.* continua, produce inhibición de las respuestas neurogénicas vasodepresoras CGRPérgicas sólo a nivel preunional. Además, dicha respuesta inhibitoria no es dependiente de la dosis; siendo ADPβS 3 µg/kg·min una dosis infraumbral, ADPβS 5.6 µg/kg·min una dosis máxima y ADPβS 10 µg/kg·min una dosis supramáxima en el modelo de rata descerebrada y desmedulada con vagotomía bilateral (Figura 11).

Resulta de interés destacar que la inhibición del tono vasodepresor CGRPérgico por el ADPβS sólo fue revertida por un bolo *i.v.* de MRS2500 (300 µg/kg; antagonista P2Y₁) o de MRS2211 (3000 µg/kg; antagonista P2Y₁₃), mas no por el PSB0739 (300 µg/kg; antagonista P2Y₁₂) o por el MRS2211 (1000 µg/kg; antagonista P2Y₁₃). En particular, el hecho de que 300 µg/kg MRS2500 haya abolido la inhibición producida por el ADPβS (Figura 16) guarda relación con lo reportado por Silva-Velasco (2021), quien encontró que la administración de MRS2500 (300 µg/kg, *i.v.*) fue suficiente para abolir el efecto vasodepresor generado por bolos *i.v.* de ADPβS a dosis de 0.3-10 µg/kg (Silva-Velasco, 2021). Por lo tanto, se pone de manifiesto la acción a nivel endotelial de los receptores P2Y₁, los cuales, mediante la activación de sintasa de ON endotelial, promueven la relajación del músculo liso vascular vía la activación de canales de Ca²⁺ dependientes de ATP (Burnstock, 2017a, 2017c, 2020; Malmjö *et al.*, 1999; Raqeeb *et al.*, 2011; Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2009; Strassheim *et al.*, 2020; Zizzo *et al.*, 2008).

Con base en lo anterior, se sugiere que el receptor P2Y₁ es responsable de dicho efecto inhibitorio sobre la liberación de CGRP a nivel preunional en las terminales sensoriales perivasculares, pero no los receptores P2Y₁₂ ni P2Y₁₃. Esto último aun considerando que la dosis alta del antagonista MRS2211 logró revertir el efecto inhibitorio del ADPβS sobre las repuestas vasodepresoras CGRPérgicas. No obstante, como se muestra en la Tabla 2, el MRS2211 también presenta afinidad por los receptores P2Y₁ y P2Y₁₂ (Villanueva-Castillo *et al.*, 2020), aunque en mucho menor grado. Esto explica porque este antagonista a una dosis baja no revirtió la respuesta inhibitoria dada por la infusión continua ADPβS sobre las respuestas vasodepresoras CGRPérgicas (es decir a menor

dosis mayor selectividad por el receptor P2Y₁₃). De esta manera, al aumentar la dosis se logra revertir la respuesta inhibitoria del ADPβS sobre las respuestas vasodepresoras CGRPérgicas, debido a que dicho antagonista interactuó tanto con los receptores P2Y₁ y P2Y₁₂, y no sólo con el P2Y₁₃.

Los resultados anteriores están reforzados por lo encontrado por Silva Velasco (2021), ya que en un modelo de rata descerebrada y desmedulada con infusión *i.v.* continua de metoxamina no se encontró inhibición del efecto vasodepresor por la administración de bolos *i.v.* de ADPβS por los antagonistas P2Y₁₂ (PSB0739; 300 µg/kg) así como por los P2Y₁₃ (MRS2211; 1000 µg/kg y 3000 µg/kg). Por lo tanto, se podría sugerir que no existe relevancia fisiológica de los receptores P2Y₁₂ y P2Y₁₃ en los nervios sensoriales perivasculares CGRPérgicos, ya que en el caso de los receptores P2Y₁₂, estos se encuentran altamente expresados en plaquetas y megacariocitos y tienen una función protrombótica. Por otra parte, los receptores P2Y₁₃ se encuentran altamente expresados en placenta, hígado, corazón, pulmón monocitos, células T y cerebro (Burnstock, 2007, 2017c). Sin embargo, en situaciones patológicas como hipoxia, insuficiencia cardiaca, hipertensión, sepsis, aterosclerosis, daño tisular e inflamación (entre otras) cobran relevancia los receptores P2Y₁₂₋₁₃ generando (a nivel endotelial) incremento de la permeabilidad, trombosis y angiogénesis (Strassheim *et al.*, 2020).

Finalmente, nuestros datos permiten sugerir la existencia de receptores P2Y₁ a nivel preunional en una neurona sensorial CGRPérgica, y que estos receptores tengan como función la reducción de la liberación de CGRP. Hasta el momento, se sabe que en la neurona sensorial CGRPérgica existen sólo receptores purinérgicos P2X_{2/3} y A₁, cuya activación por su agonista genera un incremento de la liberación de CGRP por parte de la neuronasensorial (Burnstock, 2007, 2017c; Ralevic & Burnstock, 1998). Esto contrasta con las terminales postganglionares simpáticas, donde se ha documentado la existencia de receptores P2Y₁ (Burnstock, 2017c). Estos hallazgos sugieren que los receptores purinérgicos modulan la liberación de CGRP; de esta manera, consecutivamente: (i) al activarse la terminal simpática, esta colibera NA y ATP; (ii) el ATP, al acoplarse al receptor P2X_{2/3}, incrementa la liberación de CGRP por parte de la neurona sensorial perivascular. A su vez, el ATP en la unión neuroefectora es hidrolizado a ADP por medio de las ecto-

nucleosido trifosfato difosfohidrolasas (ecto-NTPDasa 2,3,8) (Zimmermann, 2021), con lo cual el ADP puede acoplarse a receptores P2Y₁ y de esta manera disminuir la liberación de CGRP por la terminal sensorial a nivel preunional.

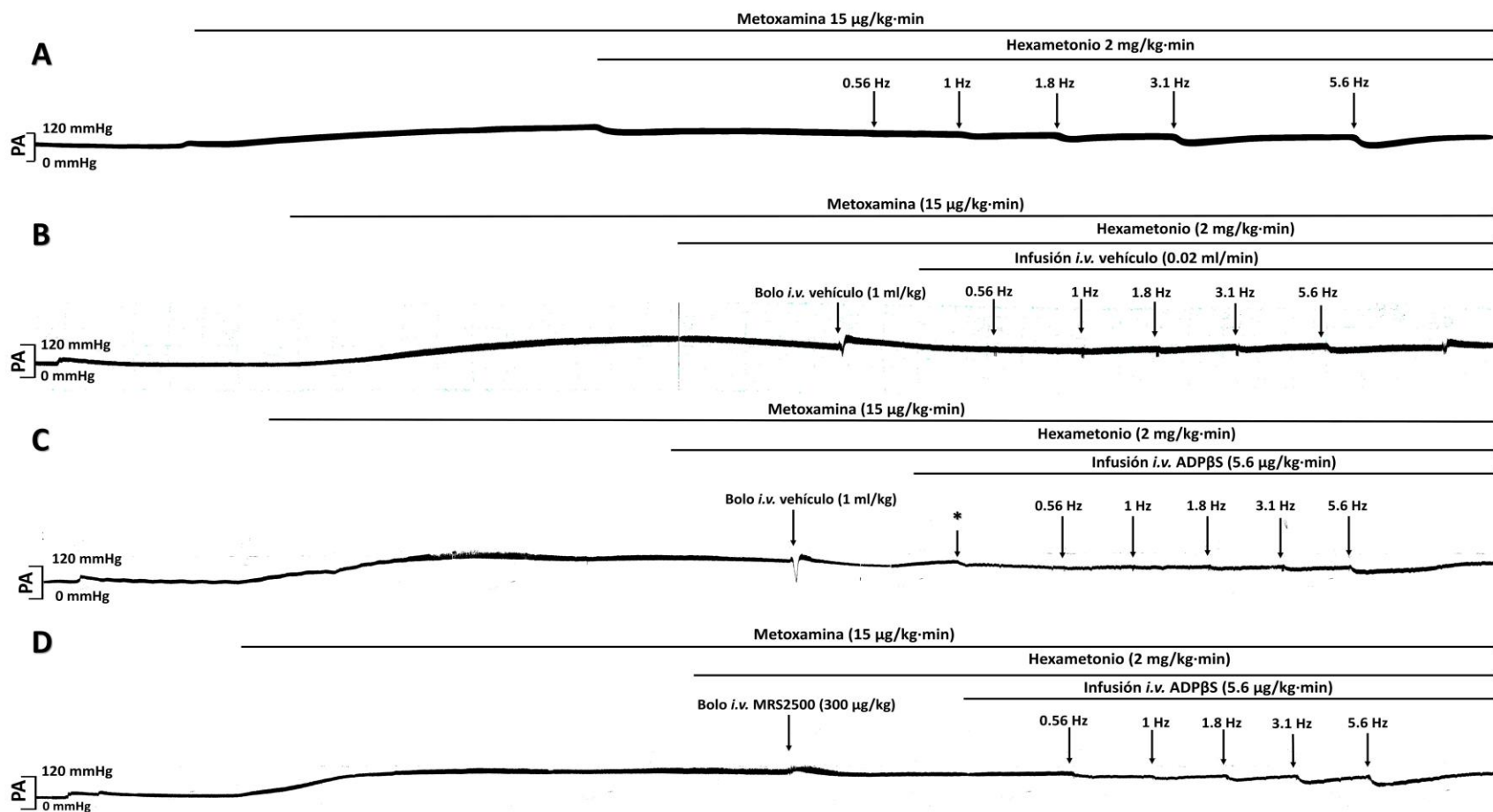


Figura 16 – Inhibición del efecto vasodepresor de la infusión continua de ADPβS por el MRS2500. Registros experimentales originales del set de ratas descerebradas y desmeduladas que recibieron trenes de estimulación eléctrica. Donde (A) es el grupo control, (B) el grupo que recibió un bolo i.v. de vehículo + infusión i.v. continua de vehículo, (C) el grupo de bolo i.v. de vehículo + infusión i.v. continua de ADPβS de 5.6 µg/kg·min y (D) el grupo que recibió un bolo i.v. de MRS2500 de 300 µg/kg + infusión i.v. continua de ADPβS de 5.6 µg/kg·min. Se puede observar en (C) que tras 5 a 7 min de haber iniciado la infusión de ADPβS se presenta una disminución en la PAD aproximada de 10-15 mmHg con respecto a la PAD basal (*). En tanto en (D) tras la administración del antagonista P2Y₁ (MRS2500), es suprimido por completo el efecto vasodepresor dado por la infusión continua de ADPβS.

8. CONCLUSIONES

Con base en los objetivos planteados en el presente trabajo de investigación, se puede concluir que:

- a) El efecto de la infusión *i.v.* continua del vehículo (agua bidestilada; 0.02 ml/min) o de un bolo *i.v.* del vehículo (agua bidestilada; 1 ml/kg), no tienen efecto sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación eléctrica del tono sensorial vasodepresor CGRPérgico (T₉-T₁₂; figura 10) o por la administración de bolos *i.v.* de α -CGRP exógeno (figura 12). Por lo tanto, los vehículos usados en el presente trabajo permiten la inducción de respuestas vasodepresoras (neurogénicas y no neurogénicas) altamente reproducibles con respecto al grupo control.
- b) La infusión *i.v.* continua de ADP β S a dosis de 5.6 y 10 μ g/kg·min inhibieron las respuestas vasodepresoras CGRPérgicas inducidas por estimulación eléctrica únicamente a las frecuencias de 1.8, 3.1 y 5.6 Hz (figura 11). Esta inhibición, sin embargo, no fue dependiente de la dosis. De esta manera, podemos considerar que 5.6 μ g/kg·min de ADP β S representa la dosis umbral y que 10 μ g/kg·min de ADP β S fue una dosis supraumbral.
- c) La dosis de 5.6 μ g/kg·min de ADP β S carece de efectos a nivel vascular (*i.e.* post-unional), ya que no modificó las respuestas vasodepresoras al α -CGRP exógeno (figura 12).
- d) La administración de un bolo *i.v.* de los antagonistas P2Y₁ (MRS2500; 300 μ g/kg), P2Y₁₂ (PSB0739; 300 μ g/kg) y P2Y₁₃ (MRS2211; 1000 y 3000 μ g/kg), no modificó *per se* el tono sensorial vasodepresor CGRPérgico (figura 13). Por lo tanto, cualquier efecto producido por estos antagonistas sobre la inhibición sensorial producida por el ADP β S debe atribuirse a su interacción con sus respectivos receptores (ver Tabla 2).
- e) Puesto que el antagonista selectivo del receptor P2Y₁ (MRS2500; 300 μ g/kg) es capaz de revertir la inhibición sensorial perivascular producida por el ADP β S (5.6 μ g/kg·min), se refuerza el papel modulador de dicho receptor sobre el tono sensorial vasodepresor CGRPérgico. Esto es congruente con el hecho de que los

antagonistas P2Y₁₂ (PSB0739; 300 µg/kg) y P2Y₁₃ (MRS2211; 1000 µg/kg) no revirtieron el efecto inhibitorio de ADPβS (figura 14), en dosis más que suficientes para bloquear por completo a sus respectivos receptores (Villanueva-Castillo, *et al.* 2020).

- f) El hallazgo de que 3000 µg/kg de MRS2211 haya revertido la inhibición sensorial perivascular producida por el ADPβS es atribuible, más que al bloqueo P2Y₁₃, a su capacidad de interactuar (con baja afinidad; Tabla 2) con los receptores P2Y₁.

9. PERSPECTIVAS

- Dilucidar los mecanismos transduccionales involucrados en el efecto inhibitorio del tono sensorial CGRPérgico por el ADPβS, por ejemplo: la participación de los canales de K⁺ dependientes de ATP. Por lo tanto, se propone evaluar el efecto de la glibenclamida sobre el efecto inhibitorio del ADPβS en la respuesta vasodepresora CGRPérgica dada por estimulación de los nervios sensoriales T₉ a T₁₂, así como por la administración de α-CGRP exógeno.
- Evaluar el papel de los receptores P2Y₁ como posible blanco terapéutico en procesos fisiopatológicos de enfermedades neurovasculares. Por ejemplo, en el caso de la migraña, patología en la cual el CGRP desempeña un papel muy importante (Rivera-Mancilla *et al.*, 2020; Russel *et al.*, 2014).

10. REFERENCIAS

- Amara, S. G., Jonas, V., Rosenfeld, M. G., Ong, E. S., & Evans, R. M. (1982). Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature*, 298(5871), 240–244. <https://doi.org/10.1038/298240a0>
- Ando, K., Pegram, B. L., & Frohlich, E. D. (1990). Hemodynamic effects of calcitonin gene-related peptide in spontaneously hypertensive rats. *The American Journal of Physiology*, 258(2 Pt 2), R425-9. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1990.258.2.R425>
- Avilés-Rosas, V. H., Rivera-Mancilla, E., Marichal-Cancino, B. A., Manrique-Maldonado, G., Altamirano-Espinoza, A. H., Maassen Van Den Brink, A., & 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. <https://doi.org/10.1111/bph.13799>
- Bennet, D. W., & Drury, A. N. (1931). Further observations relating to the physiological activity of adenine compounds. *The Journal of Physiology*, 72(3), 288–320. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1931.sp002775>
- Boron, W. F., & Boulpaep, E. L. (2017). *Medical Physiology* (3ed.). Elsevier.
- Brain, S. D., & Geppetti, P. (Eds.). (2019). *Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) Mechanisms* (Vol. 255). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-21454-8>
- Brain, S. D., Williams, T. J., Tippins, J. R., Morris, H. R., & MacIntyre, I. (1985). Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature*, 313(5997), 54–56. <https://doi.org/10.1038/313054a0>
- Burnstock, G. (1972). Purinergic nerves. *Pharmacological Reviews*, 24(3), 509–581.
- Burnstock, G. (1976). Purine nucleotides. *Advances in Biochemical Psychopharmacology*, 15, 225–235.
- Burnstock, G. (2007). Purine and pyrimidine receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 64(12), 1471–1483. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-6497-0>

- Burnstock, G. (2014). *Purines and Purinoceptors: Molecular Biology Overview* ☆. Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.04741-3>
- Burnstock, G., & Ralevic, V. (2014). Purinergic signaling and blood vessels in health and disease. *Pharmacological Reviews*, 66(1), 102–192. <https://doi.org/10.1124/pr.113.008029>
- Burnstock, G. (2017a). Purinergic Signalling: Therapeutic Developments. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 661. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00661>
- Burnstock, G. (2017b). Purinergic Signalling and Neurological Diseases: An Update. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 16(3), 257–265. <https://doi.org/10.2174/1871527315666160922104848>
- Burnstock, G. (2017c). Purinergic Signaling in the Cardiovascular System. *Circulation Research*, 120(1), 207–228. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309726>
- Burnstock, G. (2020). Introduction to purinergic signaling. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2041, pp. 1–15). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9717-6_1
- Chitrakar, I., Kim-Holzappel, D. M., Zhou, W., & French, J. B. (2017). Higher order structures in purine and pyrimidine metabolism. *Journal of Structural Biology*, 197(3), 354–364. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2017.01.003>
- Drury, A. N., & Szent-Györgyi, A. (1929). The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *The Journal of Physiology*, 68(3), 213–237. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1929.sp002608>
- Dunn, P. M., Liu, M., Zhong, Y., King, B. F., & Burnstock, G. (2000). Diinosine pentaphosphate: an antagonist which discriminates between recombinant P2X(3) and P2X(2/3) receptors and between two P2X receptors in rat sensory neurones. *British Journal of Pharmacology*, 130(6), 1378–1384. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703404>
- Flühmann, B., Muff, R., Hunziker, W., Fischer, J. A., & Born, W. (1995). A human orphan calcitonin receptor-like structure. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 206(1), 341–347. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1047>

- Gangula, P. R., Zhao, H., Supowit, S., Wimalawansa, S., DiPette, D., & Yallampalli, C. (1999). Pregnancy and steroid hormones enhance the vasodilation responses to CGRP in rats. *The American Journal of Physiology*, 276(1), H284-8. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1999.276.1.H284>
- Gennari, C., & Fischer, J. A. (1985). Cardiovascular action of calcitonin gene-related peptide in humans. *Calcified Tissue International*, 37(6), 581–584. <https://doi.org/10.1007/BF02554909>
- Gibson, S. J., Polak, J. M., Bloom, S. R., Sabate, I. M., Mulderry, P. M., Ghatei, M. A., McGregor, G. P., Morrison, J. F. B., Kelly, J. S., Evans, R. M., & Rosenfeld, M. G. (1984). Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the spinal cord of man and of eight other species. *Journal of Neuroscience*, 4(12), 3101–3111. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.04-12-03101.1984>
- Gillespie, J. S., Maclaren, A., & 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. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1970.tb09919.x>
- Goadsby, P. J., Edvinsson, L., & Ekman, R. (1988). Release of vasoactive peptides in the extracerebral circulation of humans and the cat during activation of the trigeminovascular system. *Annals of Neurology*, 23(2), 193–196. <https://doi.org/10.1002/ana.410230214>
- Goadsby, P. J., Edvinsson, L., & Ekman, R. (1990). Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache. *Annals of Neurology*, 28(2), 183–187. <https://doi.org/10.1002/ana.410280213>
- González-Hernández, A., Manrique-Maldonado, G., Lozano-Cuenca, J., Muñoz-Islas, E., Centurión, D., Maassen VanDenBrink, A., & Villalón, C. M. (2011). No T₁ 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., 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., Marichal-Cancino, B. A., Lozano-Cuenca, J., MaassenVanDenBrink, A., & Villalón, C. M. (2019). Functional Characterization of the Prejunctional Receptors Mediating the Inhibition by Ergotamine of the Rat Perivascular Sensory Peptidergic Drive. *ACS Chemical Neuroscience*, 10(7), 3173–3182. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.8b00611>
- Gordon, D. B., & Hesse, D. H. (1961). Blood pressure lowering action of adenosine diphosphate and related compounds. *The American Journal of Physiology*, 201, 1123–1125. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1961.201.6.1123>
- Gray, D. W., & Marshall, I. (1992). Human alpha-calcitonin gene-related peptide stimulates adenylate cyclase and guanylate cyclase and relaxes rat thoracic aorta by releasing nitric oxide. *British Journal of Pharmacology*, 107(3), 691–696. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1992.tb14508.x>
- Haanes, K. A., Labastida-Ramírez, A., Blixt, F. W., Rubio-Beltrán, E., Dirven, C. M., Danser, A. H., Edvinsson, L., & MaassenVanDenBrink, A. (2019). Exploration of purinergic receptors as potential anti-migraine targets using established pre-clinical migraine models. *Cephalalgia: An International Journal of Headache*, 39(11), 1421–1434. <https://doi.org/10.1177/0333102419851810>
- Hay, D. L., Garelja, M. L., Poyner, D. R., & Walker, C. S. (2018). Update on the pharmacology of calcitonin/CGRP family of peptides: IUPHAR Review 25. *British Journal of Pharmacology*, 175(1), 3–17. <https://doi.org/10.1111/bph.14075>
- Hay, D. L., Poyner, D. R., & Quirion, R. (2008). International Union of Pharmacology. LXIX. Status of the calcitonin gene-related peptide subtype 2 receptor. *Pharmacological Reviews*, 60(2), 143–145. <https://doi.org/10.1124/pr.108.00372>
- Holton, P. (1959). The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of

- sensory nerves. *The Journal of Physiology*, 145(3), 494–504. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1959.sp006157>
- Hong, K. W., Yoo, S. E., Yu, S. S., Lee, J. Y., & Rhim, B. Y. (1996). Pharmacological coupling and functional role for CGRP receptors in the vasodilation of rat pial arterioles. *The American Journal of Physiology*, 270(1 Pt 2), H317-23. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1996.270.1.H317>
- Itabashi, A., Kashiwabara, H., Shibuya, M., Tanaka, K., Masaoka, H., Katayama, S., & Ishii, J. (1988). The interaction of calcitonin gene-related peptide with angiotensin II on blood pressure and renin release. *Journal of Hypertension. Supplement: Official Journal of the International Society of Hypertension*, 6(4), S418-20. <https://doi.org/10.1097/00004872-198812040-00131>
- Kleinman, L. I., & Radford, E. P. J. (1964). VENTILATION STANDARDS FOR SMALL MAMMALS. *Journal of Applied Physiology*, 19, 360–362. <https://doi.org/10.1152/jappl.1964.19.2.360>
- Kubota, M., Moseley, J. M., Butera, L., Dusting, G. J., MacDonald, P. S., & Martin, T. J. (1985). Calcitonin gene-related peptide stimulates cyclic AMP formation in rat aortic smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 132(1), 88–94. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(85\)90992-1](https://doi.org/10.1016/0006-291x(85)90992-1)
- Kumar, A., Potts, J. D., & DiPette, D. J. (2019). Protective Role of α -Calcitonin Gene-Related Peptide in Cardiovascular Diseases. *Frontiers in Physiology*, 10, 821. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00821>
- Lewis, C., Neidhart, S., Holy, C., North, R. A., Buell, G., & Surprenant, A. (1995). Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature*, 377(6548), 432–435. <https://doi.org/10.1038/377432a0>
- Malmsjö, M., Erlinge, D., Högestätt, E. D., & Zygmunt, P. M. (1999). Endothelial P2Y receptors induce hyperpolarisation of vascular smooth muscle by release of endothelium-derived hyperpolarising factor. *European Journal of Pharmacology*, 364(2–3), 169–173. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(98\)00848-6](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(98)00848-6)

- Manrique-Maldonado, G., Altamirano-Espinoza, A. H., Marichal-Cancino, B. A., Rivera-Mancilla, E., Avilés-Rosas, V., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.02.017>
- Manrique-Maldonado, G., Altamirano-Espinoza, A. H., Rivera-Mancilla, E., Hernández-Abreu, O., & Villalón, C. M. (2019). Activation of Dopamine D(3) Receptor Subtypes Inhibits the Neurogenic Systemic Vasodilation Induced by Stimulation of the Perivascular CGRPergic Discharge. *ACS Chemical Neuroscience*, *10*(8), 3751–3757. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.9b00277>
- McLatchie, L. M., Fraser, N. J., Main, M. J., Wise, A., Brown, J., Thompson, N., Solari, R., Lee, M. G., & Foord, S. M. (1998). RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature*, *393*(6683), 333–339. <https://doi.org/10.1038/30666>
- Morris, H. R., Panico, M., Etienne, T., Tippins, J., Girgis, S. I., & MacIntyre, I. (1984). Isolation and characterization of human calcitonin gene-related peptide. *Nature*, *308*(5961), 746–748. <https://doi.org/10.1038/308746a0>
- Nelson, M. T., Huang, Y., Brayden, J. E., Hescheler, J., & Standen, N. B. (1990). Arterial dilations in response to calcitonin gene-related peptide involve activation of K⁺ channels. *Nature*, *344*(6268), 770–773. <https://doi.org/10.1038/344770a0>
- NOM-062-ZOO-1999. (1999). *Especificaciones Técnicas Para La Producción, Cuidado y Uso de Los Animales de Laboratorio*.
- Preibisz, J. J. (1993). Calcitonin gene-related peptide and regulation of human cardiovascular homeostasis. *American Journal of Hypertension*, *6*(5 Pt 1), 434–450. <https://doi.org/10.1093/ajh/6.5.434>
- Ralevic, V., & Burnstock, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological Reviews*, *50*(3), 413–492.
- Raqeeb, A., Sheng, J., Ao, N., & Braun, A. P. (2011). Purinergic P2Y2 receptors mediate

- rapid Ca(2+) mobilization, membrane hyperpolarization and nitric oxide production in human vascular endothelial cells. *Cell Calcium*, 49(4), 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.02.008>
- Rivera-Mancilla, E., Villalón, C. M., & MaassenVanDenBrink, A. (2020). CGRP inhibitors for migraine prophylaxis: a safety review. *Expert Opinion on Drug Safety*, 19(10), 1237–1250. <https://doi.org/10.1080/14740338.2020.1811229>
- Rodríguez-Rodríguez, R., Yarova, P., Winter, P., & Dora, K. (2009). Desensitization of endothelial P2Y1 receptors by PKC-dependent mechanisms in pressurized rat small mesenteric arteries. *British Journal of Pharmacology*, 158(6), 1609–1620. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00456.x>
- Russell, F. A., King, R., Smillie, S.-J., Kodji, X., & Brain, S. D. (2014). Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, 94(4), 1099–1142. <https://doi.org/10.1152/physrev.00034.2013>
- Sañag, B., Hillaire-Buys, D., Chapal, J., Petit, P., Pape, D., Rault, B., Allain, H., & Loubatières-Mariani, M. M. (1996). Study of the mechanisms involved in adenosine-5'-O-(2-thiodiphosphate) induced relaxation of rat thoracic aorta and pancreatic vascular bed. *British Journal of Pharmacology*, 118(3), 804–810. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb15471.x>
- Shalev, M., Staerman, F., Allain, H., Lobel, B., & Sañag, B. (1999). Stimulation of P2y purinoceptors induces, via nitric oxide production, endothelium-dependent relaxation of human isolated corpus cavernosum. *The Journal of Urology*, 161(3), 955–959.
- Shipley, R. E., & Tilden, J. H. (1947). A pithed rat preparation suitable for assaying pressor substances. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 64(4), 453–455. <https://doi.org/10.3181/00379727-64-15828>
- Silva Velasco, R. C. (2021). *Identificación farmacológica de los subtipos de receptores purinérgicos P2Y involucrados en los cambios de la presión arterial producidos por el ADPβS en la rata* Tesis de maestría. Cinvestav-IPN, Sede Sur.

- Smillie, S.-J., King, R., Kodji, X., Outzen, E., Pozsgai, G., Fernandes, E., Marshall, N., de Winter, P., Heads, R. J., Dessapt-Baradez, C., Gnudi, L., Sams, A., Shah, A. M., Siow, R. C., & Brain, S. D. (2014). An ongoing role of α -calcitonin gene-related peptide as part of a protective network against hypertension, vascular hypertrophy, and oxidative stress. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, *63*(5), 1056–1062. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02517>
- Sohn, I., Sheykhzade, M., Edvinsson, L., & Sams, A. (2020). The effects of CGRP in vascular tissue - Classical vasodilation, shadowed effects and systemic dilemmas. *European Journal of Pharmacology*, *881*, 173205. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173205>
- Strassheim, D., Verin, A., Batori, R., Nijmeh, H., Burns, N., Kovacs-Kasa, A., Umapathy, N. S., Kotamarthi, J., Gokhale, Y. S., Karoor, V., Stenmark, K. R., & Gerasimovskaya, E. (2020). P2Y Purinergic Receptors, Endothelial Dysfunction, and Cardiovascular Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(18). <https://doi.org/10.3390/ijms21186855>
- Taguchi, T., Kawasaki, H., Imamura, T., & 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. <https://doi.org/10.1161/01.res.71.2.357>
- Villalón, C. M., Albarrán-Juárez, J. A., Lozano-Cuenca, J., Pertz, H. H., Görnemann, T., & Centurión, D. (2008). Pharmacological profile of the clonidine-induced inhibition of vasodepressor sensory outflow in pithed rats: correlation with $\alpha(2A/2C)$ -adrenoceptors. *British Journal of Pharmacology*, *154*(1), 51–59. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.49>
- Villalón, C. M., Centurión, D., Rabelo, G., de Vries, P., Saxena, P. R., & Sánchez-López, A. (1998). The 5-HT₁-like receptors mediating inhibition of sympathetic vasopressor outflow in the pithed rat: operational correlation with the 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} subtypes. *British Journal of Pharmacology*, *124*(5), 1001–1011. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701907>

- Villalón, C. M., Contreras, J., Ramírez-San Juan, E., Castillo, C., Perusquía, M., López-Muñoz, F. J., & Terrón, J. A. (1995). 5-hydroxytryptamine inhibits pressor responses to preganglionic sympathetic nerve stimulation in pithed rats. *Life Sciences*, *57*(8), 803–812. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(95\)02008-7](https://doi.org/10.1016/0024-3205(95)02008-7)
- Villanueva-Castillo, B., Rivera-Mancilla, E., Haanes, K. A., MaassenVanDenBrink, A., & Villalón, C. M. (2020). The role of purinergic P2Y₁₂ and P2Y₁₃ receptors in ADPβS-induced inhibition of the cardioaccelerator sympathetic drive in pithed rats. *Purinergic Signalling*, *16*(1), 73–84. <https://doi.org/10.1007/S11302-020-09689-Z>
- Von Kügelgen, I. (2006). Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacology & Therapeutics*, *110*(3), 415–432. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.08.014>
- Wihlborg, A.-K., Malmjö, M., Eyjolfsson, A., Gustafsson, R., Jacobson, K., & Erlinge, D. (2003). Extracellular nucleotides induce vasodilatation in human arteries via prostaglandins, nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarising factor. *British Journal of Pharmacology*, *138*(8), 1451–1458. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705186>
- Wimalawansa, S. J. (1996). Calcitonin gene-related peptide and its receptors: molecular genetics, physiology, pathophysiology, and therapeutic potentials. *Endocrine Reviews*, *17*(5), 533–585. <https://doi.org/10.1210/edrv-17-5-533>
- Zimmermann, H. (2021). Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases and ecto-5'-nucleotidase in purinergic signaling: how the field developed and where we are now. In *Purinergic Signalling* (Vol. 17, Issue 1, pp. 117–125). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s11302-020-09755-6>
- Zizzo, M. G., Mulè, F., & Serio, R. (2008). Activation of P2Y receptors by ATP and by its analogue, ADPβS, triggers two calcium signal pathways in the longitudinal muscle of mouse distal colon. *European Journal of Pharmacology*, *595*(1–3), 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.07.057>