

116
2 ej^o



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DEL INDORRENATO SOBRE LA UNION Y
LIBERACION DE SEROTONINA-(H³) EN EL
CEREBRO DE LA RATA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A :
ISABEL MARTINEZ MATEOS



DIRECTOR DE TESIS: DRA. GLORIA ACACIA BENITEZ KING



1996

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrin Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
**EFEECTO DEL INDORREMATO SOBRE LA UNION Y LIBERACION DE
SEROTONINA-(H³) EN EL CEREBRO DE LA RATA**
realizado por **ISABEL MARTINEZ MATEOS**
con número de cuenta **6453268-0**, pasante de la carrera de **BIOLOGIA**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis **DRA. GLORIA ACACIA BENITEZ KING**
Propietario **DR. LUIS FELIPE JIMENEZ GARCIA**
Propietario **M. EN C. MARIA DE LOS ANGELES AGUILAR SANTAMARIA**
Suplente **DR. FERNANDO ANTON TAY**
Suplente **BIOL. GILBERTO JUAN MATAMOROS TREJO**
FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Departamental de Biología

**COORDINADOR GENERAL
DE BIOLOGIA**

DESIDERATA (LO DESEADO).

Camina plácida entre el ruido y la prisa, y piensa en la paz que se puede encontrar en el silencio.

En cuanto te sea posible y sin rendirte, manten buenas relaciones con todo aquel que te rodea.

Siempre di tu verdad de manera serena y clara.

Escucha a los demás; incluso al torpe e ignorante, también ellos tienen su propia historia.

Evita a las personas ruidosas y agresivas, pues ellas son un fastidio para el espíritu.

Si te llegas a comparar con los demás, te sentirás vana y amargada, pues siempre habrá personas más grandes o más pequeñas que tú.

Disfruta de tus éxitos lo mismo que de tus fracasos.

Manten el interés en tu propia carrera por humilde que esta sea, ya que es un verdadero tesoro en el fortuito cambiar de los tiempos.

Se cauta en los negocios, pues el mundo esta lleno de engaños; sin embargo que ello no te vuelva ciega para la virtud que existe.

Hay muchas personas que se esfuerzan por alcanzar nobles ideales, la vida esta llena de heroísmo.

Se sincera contigo misma y en especial no finjas el afecto y no seas cínica en el amor, pues en medio de todas sus vicisitudes y desengaños, el amor es perenne como la yerba.

Acata dócilmente el consejo de los años, abandonando con donaire las cosas de la juventud.

Cultiva la firmeza del espíritu para que te proteja en las adversidades repentinas.

Muchos de los temores nacen de la fatiga y la soledad, sobre una sana disciplina se benigna contigo misma.

Tú eres una criatura del universo, no menos que las plantas y las estrellas, tienes derecho a existir.

Y sea que te resulte cierto o no, indudablemente el universo marcha como debiera.

Por eso debes estar en paz con Dios, cualquiera que sea tu idea de El, y sean cualesquiera tus trabajos y aspiraciones, conserva la paz de tu alma en la bulliciosa confusión de la vida. Aún con todas sus falsedades, penalidades y sueños fallidos, el mundo es todavía hermoso, se cauta, esfuerzate por ser feliz.

Anónimo (Siglo XVII).

QUIERO DEDICAR ESTA TESIS A MIS PADRES. EL SR PEDRO MARTINEZ OLALDE
Y LA SRA. FRANCISCA MATEOS RESENDIZ, POR SU VALIOSO APOYO.

AGRADECIMIENTOS.

MI PROFUNDO AGRADECIMIENTO A LA DRA. GLORIA BENITEZ KING JEFA DEL LABORATORIO DE NEUROFARMACOLOGIA DEL INSTITUTO MEXICANO DE PSIQUIATRIA QUIEN DIRIGIO EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO, ADEMAS DE PROPORCIONARME EL MATERIAL E INSTALACIONES REQUERIDAS.

ASI TAMBIEN QUIERO AGRADECER A LOS SINODALES QUE AMABLEMENTE ACEPTARON REVISAR EL MANUSCRITO. LA MAESTRA EN CIENCIAS MARIA DE LOS ANGELES AGUILAR SANTAMARIA, DOCTOR LUIS FELIPE JIMENEZ GARCIA, DOCTOR FERNANDO ANTON TAY Y MUY ESPECIALMENTE AL BIOLOGO GILBERTO JUAN MATAMOROS TREJO.

INDICE

	pág.
1.- Resumen	5
2.- Epidemiología.	7
I.- Tipos de sinapsis.	9
II.- Neurotransmisión.	10
a.- Eventos Presinápticos.	10
b.- Eventos postsinápticos.	16
c.- Modulación de la transmisión sináptica.	18
3.- Serotonina.	20
I.- Distribución de la serotonina.	21
II.- Síntesis de la serotonina.	22
III.- Participación de la serotonina en procesos fisiológicos.	24
IV.- Receptores a la serotonina.	24
a.- Clasificación funcional.	25
b.- Clasificación por ligandos.	25
c.- Clasificación bioquímica.	27

	pág.
V.- Drogas que modifican la transmisión serotoninérgica.	28
a.- Inhibidores de la síntesis.	28
b.- Inhibidores del almacenamiento.	28
c.- Inductores de la liberación.	29
d.- Inhibidores de la recaptura.	29
e.- Neurotoxinas que destruyen neuronas serotoninérgicas.	30
f.- Agonistas y antagonistas.	30
VI.- Efecto de la serotonina sobre la presión arterial.	32
4.- Caracterización del indorrenato como antihipertensivo.	32
5.- Objetivos.	37
6.- Hipótesis	39
7.- Diseño Experimental	40
8.- Materiales y Métodos.	41
I.- Cromatografías en papel.	41
II.- Experimentos de unión y desplazamiento de serotonina-H ³ y espiperona-H ³ .	42

	pág.
a.- Preparación de membranas.	42
b.- Determinación de la concentración de proteínas método de Lowry.	43
c.- Determinación de la constante de disociación para espiperona-H ³ .	44
d.- Determinación de la constante de disociación para serotonina-H ³ .	44
e.- Desplazamiento de la unión de espiperona-H ³ en membranas de hipocampo, hipotálamo, cuerpo estriado, corteza y tallo.	45
f.- Desplazamiento de la unión de serotonina-H ³ en membranas de hipocampo.	46
III.- Experimentos de liberación.	46
a.- preparación de las terminales nerviosas (sinaptosomas).	46
b.- Sistema de perfusión.	47
c.- Medios de perfusión.	48
d.- Captación del transmisor marcado.	48
e.- Liberación del transmisor.	49
9.- Resultados.	50
I.- Determinación de la pureza y caracterización de las constantes de disociación de los ligandos utilizados en los experimentos de unión y desplazamiento.	50

	pág.
II.- Determinación de la unión del indorrenato a receptores D ₂ .	54
III.- Efecto del GTP sobre el desplazamiento de la serotonina-H ³ por indorrenato en membranas de hipocampo.	57
IV.- Efecto del indorrenato sobre la liberación de serotonina-H ³ en sinaptosomas de hipocampo.	59
10.- Discusión y conclusiones.	61
11.- Literatura citada.	66

1.- RESUMEN

El indorrenato (IR) (5-metoxitriptamina, β metilester) es un compuesto antihipertensivo que actúa a nivel del Sistema Nervioso Central (SNC). En gatos anestesiados, la inyección de IR en la arteria vertebral izquierda o por vía intracerebroventricular (ICV) causa una caída en la presión arterial similar a la que se obtiene cuando se inyecta serotonina (5HT). La administración intraperitoneal de 10 mg/kg de IR causa un incremento en la concentración de la 5HT y una disminución de su metabolito, el ácido 5-hidroxiindolacético (5HIAA) en el tallo cerebral (TC), la corteza cerebral (CC), el hipotálamo (HI), y el cuerpo estriado (CE), además disminuye significativamente las concentraciones de los metabolitos de la dopamina (DA), el ácido homovanílico (HVA) y el 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), esto último sugiere que el IR puede unirse a los autoreceptores D_2 . Los estudios *in vitro* sugieren que el IR puede unirse a los receptores $5HT_{1A}$ ya que desplaza la unión de $5HT-H^3$ y de ipsapirona- H^3 en membranas de hipocampo (HP). Estos receptores han sido identificados como autoreceptores acoplados a proteínas G, y disminuyen su afinidad en presencia de guanosina trifosfato (GTP). Además, su estimulación es seguida de una inhibición en la liberación de la 5HT en rebanadas de HP. En este trabajo se exploró si el IR se une a los receptores D_2 y a los $5HT_{1A}$ mediante el estudio de el desplazamiento que causa este compuesto sobre la unión de la espiperona- H^3 (antagonista de DA) a membranas de CE, HI, HP, TC y CC, así como mediante la unión

de 5HT a membranas de HP en presencia y ausencia de GTP. Además se estudio el efecto del IR sobre la liberación de 5HT-H³ en una fracción sinaptosomal cruda de HP. Los efectos del IR sobre la unión de 5HT a membranas de HP así como sus efectos sobre la liberación de 5HT se compararon con los de la ipsapirona (IP) y el 8-OH-DPAT dos agonistas serotoninérgicos que se unen a los receptores 5HT_{1A}. En ausencia de GTP, el IR desplazó la unión de 5HT-H³ en membranas de HP con una IC₅₀ de 50 nM. En comparación, el 8-OH-DPAT desplazó la unión de 5HT con una IC₅₀ de 50 nM y con IP una IC₅₀ de 5 nM. La capacidad del IR para desplazar esta unión disminuyó en presencia de 0.1 mM de GTP con una IC₅₀ de 1 μM. Un efecto similar se obtuvo con el 8-OH-DPAT y la IP. En presencia de GTP estos compuestos desplazaron la unión de 5HT con una IC₅₀ de 50 μM y 10 μM respectivamente. La liberación de 5HT-H³ estimulada con cloruro de potasio (55 mM) disminuyó en presencia de IR 1 μM en un 15 ± 2.4 %. De forma semejante 1 μM de IP y 8-OH-DPAT inhibieron la liberación en un 32 ± 3.4 y 18 ± 2 % respectivamente sin afectar la liberación basal. El IR no desplazó la unión de la espiperona-H³ en el CE. Los resultados indican que el IR no se une a los receptores D₂ y señalan que se une a los receptores de 5HT del tipo 5HT₁ a nivel central. Además estos resultados también sugieren que actúa como un agonista serotoninérgico con una potencia semejante a la de el 8-OH-DPAT.

2.- EPIDEMIOLOGIA

La hipertensión arterial constituye el 10% de las enfermedades que afectan a la población mundial (Fröhloch, 1979). La enfermedad no tratada aumenta la mortalidad a edad temprana ya que disminuye el promedio de vida de 10 a 15 años. Los pacientes hipertensos sometidos a tratamiento médico, en los que se controla la presión arterial óptimamente, tienen una incidencia menor de complicaciones cardiovasculares en relación a la observada en los no controlados (J.A.M.A. 1970). Las personas que han padecido de hipertensión arterial durante un periodo largo, frecuentemente sufren una enfermedad terminal incapacitante, como son las secuelas de accidentes vasculares cerebrales, de infartos del miocardio o de insuficiencia cardíaca, aunque tal morbilidad puede disminuirse significativamente con el tratamiento antihipertensivo (J.A.M.A. 1967). Si bien, la hipertensión arterial no produce sintomatología, en cambio, la administración de medicamentos antihipertensivos si se acompaña frecuentemente de efectos colaterales. De tal forma, que aún cuando existen diversos agentes antihipertensivos capaces de controlar la hipertensión arterial, algunos producen tantos efectos colaterales, que los pacientes terminan por suspender el tratamiento. En vista de lo anterior, varios laboratorios han encaminado sus esfuerzos a la búsqueda de nuevos agentes antihipertensivos que no produzcan efectos colaterales. Una forma es estudiando el efecto que causan en el Sistema Nervioso Central (SNC). Este es un tejido de gran complejidad, esta constituido por

neuronas y por un tejido de sostén llamado glía. Las neuronas tienen una gran diversidad de formas y tamaños. Están constituidas por un cuerpo celular del que parten por un lado las dendritas, que conforman la región por la que la neurona recibe preferencialmente la información y, por otro lado, el axón con sus ramificaciones que se encargan de llevar dicha información a las células nerviosas con las que la neurona hace contacto. Los extremos de las ramificaciones de un axón constituyen las terminales sinápticas de una neurona. Las células gliales o neuroglia proporcionan soporte estructural y metabólico a la red neuronal, además de las células de Schwann que se encuentran alrededor de todos los axones. En algunos casos las células de Schwann encierran al axón dentro de una fina capa, en muchos otros, se envuelve alrededor del axón en el transcurso del desarrollo embrionario, dando lugar a las múltiples y densas capas de aislamiento conocidas como mielina. La vaina de mielina está interrumpida a cada milímetro a lo largo del axón por espacios estrechos llamados nódulos de Ranvier. El oxígeno y los nutrientes son suministrados por una densa red de vasos sanguíneos (Stevens, 1981).

La organización, actividad y comunicación que se establece entre las neuronas da lugar a funciones desde las más simple, que están presentes en algunos invertebrados como la locomoción, hasta los procesos más complejos que se encuentran en los vertebrados como las funciones cognoscitivas en el ser humano.

La información que proviene tanto del mundo exterior como del interior del organismo llega al cerebro, ahí es recibida, procesada

y almacenada por las neuronas. Para llegar a comprender estos procesos es necesario conocer cómo se comunican, y cuáles son los fenómenos químicos, bioquímicos, y moleculares relacionados con la transmisión de dicha información (Kandel, 1991).

I.- TIPOS DE SINAPISIS

La zona de comunicación entre las neuronas es la sinapsis Sherrington (1897). Esta constituida por una serie de especializaciones estructurales de la terminal axónica y de la membrana de la neurona con la que hace contacto. La porción correspondiente al axón se considera presináptica e informadora, mientras que la parte que recibe la información se denomina membrana receptora postsináptica. La sinapsis se puede establecer entre el axón de una neurona, con el soma, el axón y las dendritas de otras neuronas (Kandel y col, 1991). En los años treinta, un grupo de fisiólogos encabezados por Eccles, propusieron que el mecanismo universal de transmisión sináptica era eléctrico; mientras que otro grupo con una orientación farmacológica encabezados por Dale, propusieron que el mecanismo era de tipo químico. Posteriormente en 1950, se demostró que las sinapsis no operaban exclusivamente con un sólo mecanismo y que es posible encontrar ambos tipos de sinapsis en el SNC. Estas dos formas funcionales corresponden a dos tipos morfológicos de sinapsis; de unión estrecha ("gap junction" 20 Å) y de hendidura amplia (200

a 300 Å). La primera corresponde al tipo eléctrico y la segunda al químico.

En la sinapsis eléctrica, el área de unión entre las membranas es simétrica en apariencia, mientras que la sinapsis química se caracteriza por la presencia de un gran número de mitocondrias que se utilizan en el catabolismo de los neurotransmisores (NTS); también se encuentran vesículas sinápticas aplastadas en la vecindad de la membrana presináptica. Tanto las mitocondrias como las vesículas sinápticas dan una mayor opacidad cuando se observan en una electromicrografía, contribuyendo así a la apariencia asimétrica entre las porciones pre y postsináptica que conforman la sinapsis química (Bullock y col. 1977).

II.-NEUROTRANSMISION

a.- Eventos presinápticos

La membrana sináptica posee un potencial de reposo dado por la distribución selectiva de los iones K^+ , Na^+ , y Cl^- . En el potencial de reposo, el K^+ se encuentra muy concentrado en el interior de la célula, mientras que el Na^+ y el Cl^- están más concentrados en el exterior. Cuando llega un estímulo a la terminal, se produce un cambio en la permeabilidad de la membrana a los iones Na^+ los cuales se acumulan en el interior de la célula. Invirtiendo la polaridad de la membrana, el potencial de reposo se recupera como

consecuencia de la pérdida de cargas positivas, producidas por la salida de iones K^+ . El cambio transitorio de potencial activa los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje permitiendo el paso de estos iones a través de la membrana presináptica, dentro del botón sináptico, activando los mecanismos de liberación del neurotransmisor (NT) químico (Stevens, 1981). Con respecto al mecanismo de liberación existen dos hipótesis: la vesicular que postula que en el estado de reposo las células nerviosas almacenan los NTS en vesículas sinápticas. Cuando hay una estimulación de la terminal nerviosa se origina la entrada de calcio y las vesículas se fusionan con la membrana plasmática, vaciando su contenido a la hendidura sináptica mediante un proceso de exocitosis.

Por otra parte, la hipótesis citoplasmática establece que un impulso nervioso produce la entrada de calcio a la terminal. Este ión al unirse a proteínasceptoras de calcio produce la formación de canales por donde los NTS son liberados del citoplasma a la hendidura sináptica. Si se prolonga la estimulación eléctrica de una terminal nerviosa, entonces los NTS dentro del citoplasma disminuyen así como los que están almacenados en las vesículas con un mecanismo semejante al descrito en la hipótesis vesicular. Una vez que el estímulo ha cesado, la polaridad de la membrana se restablece, los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje se cierran y el transmisor deja de ser liberado (Kandel, 1991).

Los procesos de secreción y liberación de compuestos en muchos tipos de tejidos glandulares y terminales nerviosas requieren del calcio extracelular e intracelular. Los estudios realizados *in vivo*

demuestran que la liberación de posibles NTS es inhibida por antagonistas de Ca^{2+} como el Mg^{2+} (Hubbard, 1961). Así mismo, los agentes que impiden el flujo de Ca^{2+} a la terminal sináptica como el verapamil y el rojo de rutenio, disminuyen la liberación de los NTS, tanto en condiciones de estimulación fisiológica como en preparaciones *in vitro* (Levy y col, 1974).

En otros estudios se ha descrito la participación de sitios no sinápticos como el soma neuronal y células gliales en la liberación de NTS aminoácidos, después de despolarizar las células mediante concentraciones altas de K^+ extracelular, o por estimulación eléctrica (Gardner, 1981). Una característica de la liberación de células gliales es que no requiere de Ca^{2+} .

La principal característica que distingue a la sinapsis química de la eléctrica (además de la velocidad con que se produce una respuesta y de la estructura fina) es que la sinapsis química, sintetiza, almacena y libera sustancias activas, conocidas con el nombre de neurotransmisores (NTS). Estos no se hallan distribuidos al azar por todo el cerebro, sino que se localizan en grupos específicos de neuronas cuyos axones se proyectan sobre otras regiones cerebrales de alta especificidad (Iversen, 1981). A la fecha se han descrito en el cerebro cerca de 30 NTS. Cada uno de ellos tiene un efecto característico, excitador o inhibidor sobre las neuronas. Los primeros funcionan despolarizando la membrana de la célula postsináptica con la cual hacen contacto mientras que los NTS inhibidores la hiperpolarizan y dificultan la despolarización de la membrana postsináptica por impulsos excitadores simultáneos

o subsecuentes (Iversen, 1981).

Los NTS son de bajo peso molecular, como la acetilcolina, otros son aminoácidos como el ácido gama amino butírico (GABA), la glicina, el ácido aspártico, el ácido glutámico, la taurina; algunos mas son aminas como la dopamina (DA), la norepinefrina (NE), la epinefrina, y la serotonina. También se ha postulado un grupo de péptidos que incluyen a la sustancia P, las encefalinas, la neurotensina y la somatostatina entre otras.

Hay diferentes modelos para la identificación de NTS. Entre las técnicas *in vivo* se encuentran la superfusión de áreas específicas del SNC en animales anestesiados o mediante la implantación de cánulas en el animal despierto y con libertad de movimiento (Ashkenozi, y Holman, 1973). Estos métodos son poco utilizados, ya que la implantación de cánulas en el cerebro daña las células adyacentes, por lo que impide conocer con certeza el estado funcional del área de superfusión.

En los estudios *in vitro* se pueden utilizar rebanadas, (López-Colome y col, 1978) ó sinaptosomas (Gray y Whittaker, 1962), de una estructura cerebral o de cerebro completo. Sin embargo estas preparaciones tienen dificultad para interpretar los resultados, ya que existe una heterogeneidad de la población de terminales sinápticas. Durante la obtención de los sinaptosomas la membrana de la terminal nerviosa se rompe en la zona de mayor adelgazamiento y menor resistencia, aprovechando la propiedad de las membranas biológicas de sellarse al ser parcialmente rotas (Dunkley y col, 1987); esto permite que la terminal se separe de su axón y

conserve en su interior sus organelos y toda la maquinaria bioquímica necesaria para la síntesis, almacenamiento, liberación e inactivación de los NTS que se hallan asociados con ella y puedan ser separadas de los restos celulares y de otros organelos celulares presentes en el homogenado por diferenciación y procedimientos de gradientes de densidad (Bradford, 1975).

Los sinaptosomas presentan un potencial de membrana gracias al cual son capaces de responder a estímulos eléctricos, generando potenciales de acción (Richerds y McIlwain, 1967).

Además regulan la entrada y salida de calcio a través de su membrana (McGraw y col, 1981), manteniendo un nivel de Ca^{2+} citosólico en el reposo similar al encontrado en las células intactas (Nachshem, 1985). También se observa un fuerte acoplamiento entre la liberación del transmisor y la entrada de Ca^{2+} durante la despolarización rápida (Drapeu y Blaustein, 1983).

Bradford en 1969 demostró que los sinaptosomas mantenidos a 37° C y en presencia de sustratos adecuados pueden respirar con un consumo lineal de O_2 durante varias horas después de su aislamiento. Nachshem y Drapeu en 1988 demostraron que la membrana plasmática conserva sus características de sensibilidad osmótica, y con una gran capacidad amortiguadora para regular el pH citosólico.

La terminal presináptica tiene la propiedad de "recapturar" a los NTS que han sido liberados al espacio sináptico por medio de un sistema de transporte activo de alta afinidad, dependiente de sodio y de la temperatura (Cooper, y cols 1991).

Esta propiedad, se conserva en los sinaptosomas de tal manera, que si son incubados en un medio que contiene a un NT marcado radioactivamente en bajas concentraciones para activar los sistemas de remoción de alta afinidad, lo captan y es posible seguir su liberación en diferentes condiciones experimentales. Además como los sitios de captura para un NT están localizados en las neuronas que normalmente lo sintetizan, almacenan y liberan, les da la propiedad de captar selectivamente al NT que fisiológicamente liberan (Fonnum y col, 1981). Esto representa una ventaja experimental ya que, a partir de una población heterogénea de sinaptosomas de cerebro completo, sólo aquéllos que cuenten con los sitios de captura para el NT marcado radioactivamente, serán capaces de captarlo y liberarlo en las condiciones que lo propicien (Bradford, 1975).

Algunas metodologías utilizadas para estudiar la estimulación neuronal y que simulan a la estimulación fisiológica en el SNC son:

a.- La estimulación eléctrica a través de electrodos implantados *In vivo*. Con este tipo de estímulos se ha demostrado la liberación dependiente de Ca^{2+} de gaba, glutamato, acetilcolina y serotonina de terminales nerviosas aisladas (Foster, y Roberts, 1980). Además promueve en muchos casos la secreción de algunos transmisores aminoácidos de manera independiente de Ca^{2+} (Redburn, y Cotman, 1974).

b.- Otro método utilizado en preparaciones sinaptosomales y rebanadas, es la despolarización por exposición a agentes químicos tal como concentraciones altas de K^+ que modifican el potencial

electroquímico. Otros poseen mecanismos de acción menos específicos como la ouabaina que inhibe la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ y, de esta manera, acumula Na^+ en la terminal. Actualmente se considera que la veratrina es el que más cercanamente simula el estímulo fisiológico, ya que permite la apertura selectiva de canales de Na^+ sensibles a voltaje, los que son activados durante la despolarización fisiológica (Redburn, y Cotman. 1974).

b.- Eventos postsinápticos.

Una vez que la neurona presináptica ha liberado al NT, éste cruza el espacio sináptico y se une a sitios específicos en la membrana postsináptica (receptores).

El concepto de que drogas, hormonas y NTS producen su efecto biológico por interacción con sustancias receptoras en las células fue introducido por Langley (1905).

Los receptores postsinápticos se han estudiado desde un punto de vista fisiológico (Bennet, 1978); son proteínas integrales de la membrana (Slotking, 1978), y poseen un sitio activo, semejante al de las enzimas, en donde se unen los NTS. Esta unión constituye el paso inicial de activación del receptor. Esta interacción produce la excitación o la inhibición de las neuronas, dependiendo del transmisor químico que la célula presináptica elabore y de la química de la membrana de la célula postsináptica (Hubel, 1981).

Existen fármacos que modifican este proceso bloqueando la unión del receptor sin producir ningún efecto fisiológico (efecto antagonista) o mimetizando los efectos del NT (efecto agonista).

Con la unión del ligando, se altera la conformación tridimensional de la proteína receptora, desencadenando una secuencia de acontecimientos, que se inician con un movimiento lateral del complejo ligando-receptor hasta encontrar a una molécula efectora, que puede estar regulando un canal iónico en la membrana (Changeous y Bennedetti, 1983), una ciclasa de nucleótidos (Orly y Scham, 1976) o algún otro sistema de amplificación de señales que puede ser o no parte integral de la molécula receptora.

En 1980 Strange propuso clasificar a los receptores en dos clases: Clase I (rápidos) y Clase II (lentos). Los receptores rápidos están directamente acoplados a un canal iónico y su respuesta se produce en milisegundos, cuando el receptor es activado por el transmisor. La clase II (lentos): están acoplados a proteínas G, además pueden estar acoplados directamente a canales iónicos o vinculados a sistemas de segundos mensajeros.

En este último caso, las proteínas G están unidas al nucleótido de guanidina; su estructura consiste en tres subunidades alfa, beta y gama. Estas proteínas reguladoras son activadas por la hidrólisis de GTP a GDP y pueden ser clasificadas en cuatro grupos: Gs estimula la adenilato ciclasa; Gi inhibe a la adenilato ciclasa; Gt traduce la señal mediante la rodopsina que activa una fosfodiesterasa acoplada a GMP cíclico y proteínas Go las cuales comprenden un grupo grande de proteínas G, una de las cuales puede

estar acoplada al fosfoinositol (Cooper, y cols. 1991).

Uno de los mecanismos de segundos mensajeros que más se ha estudiado es el de la adenilato ciclasa. De acuerdo a la hipótesis de Sutherland, el receptor de muchos transmisores está acoplada a la enzima adenilato ciclasa que cataliza la conversión del adenosintrifosfato (ATP), en 3' 5' adenosin mononucleótido cíclico (AMPC). La adenilato ciclasa suele estar inactiva pero cuando un neurotransmisor se une al receptor postsináptico, la enzima se activa y empieza una rápida conversión de ATP en AMPC en el interior de la célula, el AMPC actúa fosforilando la maquinaria bioquímica de la célula, iniciando la respuesta fisiológica característica del transmisor (Iversen, 1981).

La capacidad de unión que muestran los neurotransmisores a las membranas sinápticas es de alta afinidad lo que permite reconocer su unión a la membrana postsináptica y distinguirla de la unión del transmisor al sistema de transporte presináptico, además este último requiere de la presencia de Na^+ en el medio de incubación (Fags y Lane, 1979), mientras que la unión al receptor postsináptico es independiente de Na^+ (Bennet, 1978).

c.- Modulación de la transmisión sináptica

Cuando un neurotransmisor ha terminado su acción debe ser rápidamente inactivado, pues de lo contrario, actuaría durante un tiempo excesivo y se perdería la precisión en el control de la

transmisión (Iversen, 1981).

Esta regulación puede darse a través de mecanismos presinápticos que involucran a un autoreceptor, el cual responde al transmisor controlando la síntesis del mismo; esto último puede ocurrir a nivel de la enzima limitante de la síntesis o de los cofactores de la misma. Otro mecanismo es la inactivación de los neurotransmisores, mediante su transformación por enzimas localizadas en la hendidura sináptica, o bien mediante su difusión en el líquido extracelular. Además de los mecanismos enzimáticos existen sistemas de acumulación de alta afinidad para las sustancias neuroactivas presentes en el líquido extracelular. Estos sistemas se han descrito tanto en neuronas como en células gliales (Hamberger, y Nystrom. 1970).

Existen varios mecanismos postsinápticos que modulan la transmisión sináptica: 1.- modificando el número de receptores. La regulación hacia arriba "up-regulation" y la regulación hacia abajo "down regulation", se relacionan respectivamente con un aumento y una baja en el número de los receptores. 2.- Otra manera en que se regulan los receptores es a través de la capacidad de respuesta o sensibilidad; esta capacidad se evalúa por la modificación de los mecanismos efectorios es decir de segundos mensajeros. Así tenemos una hipersensibilización y una desensibilización en función de su respuesta.

3.- SEROTONINA.

La serotonina ha sido ampliamente estudiada. Su existencia como una sustancia con propiedades vasoconstrictoras en el suero fue demostrada por Janeway y cols (1918). En 1948 Rapport y cols, al tratar de demostrar la participación de algún mecanismo humoral en procesos hipertensivos, describió el método más adecuado de aislamiento de este agente vasoconstrictor. El mismo, en 1949, describió su estructura química como una 5-hidroxitriptamina (5HT) con una cadena lateral probablemente etilaminica. Señalando que el nombre trivial de **SEROTONINA** podría ser usado para la base indólica farmacológicamente activa. A conclusiones similares llegaron Erspamer y Testini en 1952, cuando lograron aislar una sustancia que se encontraba en concentraciones elevadas en las células cromafines de la mucosa intestinal del conejo y que además le confería propiedades histofluorescentes, a este compuesto le dieron el nombre de *Enteramina*. La síntesis química de esta indolamina realizada por Hamlin y Fischer (1951), permitió confirmar que el principio activo de la serotonina o enteramina de Erspamer, es el 3-(beta amino etil)-5-hidroindol. Este compuesto (-HT) es de color blanco cristalino, muy soluble en agua pero con un marcado poder reductor, tiene un peso molecular de 176.2 M. En solución ácida emite cuantos fluorescentes y posee tres centros de alta densidad electrónica, ubicados en el grupo hidroxilo de la posición 5, el anillo anular y el amino de la cadena lateral.

I. - DISTRIBUCION DE LA SEROTONINA

Detalladas recopilaciones han sido elaboradas sobre las diferencias en la concentración de 5HT en diversas especies y áreas anatómicas (Garattini y Valzelli, 1965). Erspamer (1966), hizo una amplia revisión que reúne las diferentes especies de plantas y animales donde se ha demostrado la existencia de 5HT, señalando su presencia en algunos géneros animales de los phyla Mollusca, Cnidaria y subphylum Urochordata, así como en todas las clases del subphylum Vertebrata. También se encuentra en numerosas ponzoñas y venenos como los de avispas y alacranes. Entre las plantas, se incluyen aquellas empleadas como nutrientes por el hombre, sobresaliendo frutas y semillas tales como la piña, el plátano, las nueces, etc.

La cantidad de 5HT corporal en el ser humano es de aproximadamente 10 mg/kg y se distribuye de la siguiente manera: 50 % en el tracto gastrointestinal que es la fuente más importante de 5HT, de 8 al 10 % en plaquetas sanguíneas y de 1 a 2 % en el SNC. (Resnick, y Greg, 1961). En los mamíferos se encuentra principalmente en el sistema de células enterocromafines, particularmente del antro pilórico y en el duodeno, en el plexo mientérico, y en el tejido fetal. Un gran porcentaje de la 5HT liberada de la mucosa gastrointestinal es captada por las plaquetas a su paso a través de los capilares del plexo mientérico, encontrándose en la sangre en forma libre sólo el 3 %; la concentración plaquetaria en el humano se ha estimado de 0.2 a

0.4 µg/ml. (Salcia, y Sampietro, 1967).

La serotonina liberada a sangre portal tiene una vida media de 2 minutos, entre el 10 y 80 % de la que pasa por el hígado es degradada y, aproximadamente, del 92 al 98 % de la amina es retenida por el sistema vascular pulmonar. (Pickett, 1975).

En el cerebro humano se encuentra especialmente, en los cuerpos celulares y varicosidades neuronales del núcleo del Rafé los cuales se sitúan dorsalmente cerca de la línea media del tallo cerebral inferior. Algunos grupos de células serotoninérgicas se localizan más lateralmente en el núcleo paragigantocelular y en la zona ventral del área postrema. Los somas de las fibras ascendentes se localizan en el núcleo de Rafé dorsal e inervan la formación reticular pontomesencefálica, el hipocampo, el hipotálamo anterior, el área preóptica y la corteza, los somas de las fibras descendentes se encuentran en los núcleos de Rafé ventral y bajan por la médula espinal. (Fuxe, y Jonsson, 1974).

II.- SINTESIS DE LA SEROTONINA

Sólo 1-2 % de la serotonina corporal se encuentra en el cerebro, ya que la serotonina no puede cruzar la barrera hematoencefálica resulta claro que las neuronas también deben sintetizarla (Cooper, y cols 1991). El primer paso es la captura del triptófano, aminoácido esencial, que no es de los más abundantes en la dieta, por lo que se puede manipular en las fuentes de ingesta para

modificar los niveles de 5HT; sin embargo, sólo 1 % del triptófano ingerido se destina a la síntesis de este neurotransmisor. (Knott, y Curzon, 1972).

Existen variaciones en los niveles plasmáticos del triptófano durante las 24 horas del día, lo cual se traduce en las fluctuaciones circadianas de la 5HT en el SNC. Se sabe que existe un sistema de alta afinidad para la captura del triptófano en las sinapsis serotoninérgicas y un sistema de baja afinidad en la glia y en preparaciones sinaptosomales.

Una vez que el triptófano entra a la célula es hidroxilado por la triptófano hidroxilasa, esta enzima es limitante de la síntesis de la 5HT, y requiere como cofactores a la tetrahidrobiopterina y al oxígeno molecular y agrega un grupo hidroxilo al anillo indol del triptófano en la posición 5 y forma así el 5-hidroxitriptofano (5HTP). El siguiente paso es una descarboxilación; el grupo carboxilo del carbón es removido por la 5-hidroxitriptofano descarboxilasa (5HTP-D), que tiene como factor el fosfato de piridoxal (vit. B₆), formándose así la serotonina. La serotonina se cataboliza por acción de la enzima monoaminoxidasa (MAO) que se localiza en las mitocondrias y que por su acción oxidante desamina a la serotonina formando así a su principal metabolito, el ácido 5-hidroxiindolacético (5HIAA). (Anthony, 1984).

III.- PARTICIPACION DE LA SEROTONINA EN PROCESOS FISIOLÓGICOS

Existen evidencias sobre la participación de la serotonina como neurotransmisor en procesos fisiológicos. La serotonina participa en el control de la temperatura corporal (Gorgnia, 1975), en el ciclo sueño-vigilia (Jouvet, 1968), en la integración del dolor (Sicuteri y col 1973), en la conducta sexual (Greene y Grahame-Smith, 1975). Entre los estados patológicos que la apuntan como probable agente patogénico están, el síndrome carcinoide (Adamson y col 1971), la fibrosis (Boucek, 1971), los estados de hipermotilidad intestinal (Reichle y col 1970), a nivel del SNC se le han atribuido implicaciones en la esquizofrenia (Goodwin, 1975) y en alteraciones de la conducta como la depresión y ansiedad (Bradley, 1987).

IV.- RECEPTORES A LA SEROTONINA

Se ha descrito que la serotonina se une a receptores específicos. En los últimos 30 años se han desarrollado tres clasificaciones distintas. (1) una clasificación funcional basada en estudios farmacológicos, (2) una clasificación por ligandos basada en sitios de unión, y (3) una clasificación bioquímica basada en segundos mensajeros.

a.- Clasificación funcional

La primera sugerencia de que podría existir más de un tipo de receptor para la 5HT fue descrita por Goodwin, (1975) que observó que los derivados del ergot, tales como la dietilamina del ácido lisérgico (LSD) y la dihidroergotamina, son antagonistas potentes de la acción de la 5HT en el músculo liso del útero de la rata, pero no fueron tan potentes en la preparación de cobayo.

Gaddumm y Picarelli (1957), publicaron una descripción más detallada de esta discrepancia farmacológica y propusieron dividir los receptores a la 5HT en dos tipos: "M" y "D". Al primero se le definió como un receptor neuronal localizado en los ganglios o en las fibras nerviosas de los nervios parasimpáticos: este receptor es bloqueado por la cocaína y morfina (llamado así por la inicial de la morfina). El receptor tipo "D" (llamado así por la inicial de la dibenzilina) se localiza en la musculatura lisa y su efecto es bloqueado por la dibenzilina. Esta división no se pudo sostener, primero porque la dibenzilina no es un antagonista selectivo del receptor "D" y segundo, porque la morfina ejerce sus efectos de bloqueo inhibiendo la liberación de acetilcolina y no por bloqueo del receptor (Bonate, 1991).

b.- Clasificación por ligandos

Peroutka y Snyder (1979), utilizando la técnica de unión ligando-

receptor, describieron dos tipos de receptores para la serotonina en el SNC: los 5HT₁ y 5HT₂. Estos receptores difieren entre sí por su afinidad a la espiperona (antagonista serotoninérgico) y a la serotonina marcada. Los receptores 5HT₁ tienen una alta afinidad del orden de nanomoles (nM) por 5HT-H³ y los 5HT₂ exhiben una baja afinidad del orden de micromoles (µM) y están considerados como los equivalentes a los 5HT D de Gaddum y Picarelli (1957), pero con una alta afinidad por espiperona y otras drogas bloqueadoras clásicas del receptor de 5HT tales como la metisergida y la ciproheptadina.

Péridigo y cols, en 1981 demostraron la existencia de dos sitios distintos de unión para 5HT-H³ en el cerebro de la rata: en un experimento de competencia por espiperona con 5HT-H³, obtuvieron una curva con un desplazamiento bifásico; la alta y baja afinidad a los sitios de unión a 5HT-H³, fueron llamados 5HT_{1a} (nM) y 5HT_{1b} (µM) respectivamente.

La 8-Hidroxí-2-(di-n-propilamino-tetralin) 8-OH-DPAT fue determinada como altamente selectiva y afín por el sitio 5HT_{1a} (Middlemiss y Fozar, 1983). Otro marcador para este subtipo es la ipsapirona-H³ (clasificado como TVXQ 7821) (Dompert y col, 1985). Los receptores 5HT_{1a} están localizados en gran concentración en el hipocampo y en el núcleo del Rafe. El RU-24969 es un agonista selectivo del receptor 5HT_{1a} (Sills y cols, 1984), también es marcado con iodocianopindolol-I²⁵ (CYP) en presencia de 30 µM de isoprenalina para excluir la unión a beta-adrenoceptores (Pazos y cols, 1985). Este subtipo se encuentra en gran concentración en el

globo pálido y en la sustancia negra.

Basándose en estudios de autoradiografía Pazos y cols (1985) describieron un tercer subtipo al que llamaron $5HT_{1A}$. Este fue encontrado en el plexo coroideo del cerdo y de la rata. Este receptor es marcado por la mesulergina (agonista serotoninérgico). Heuring y Peroutka en 1987 describieron otro subtipo para $5HT_1$ marcado con $5HT-H^3$; fue identificado en membranas de cerebro de bovino y lo llamaron $5HT_{1A}$. Recientemente se identificó el receptor $5HT_2$ (considerado el equivalente al receptor M de Gaddum y Picarelli 1957), para su identificación se marco con quipasina- H^3 .

c.- Clasificación bioquímica.

Los receptores serotoninérgicos también se han clasificado de acuerdo al sistema de transducción al que están acoplados. Un grupo está acoplado a proteínas G y vinculados a un sistema de segundos mensajeros los cuales comprenden, los receptores $5HT_1$, $5HT_2$, los subtipos del receptor $5HT_1$, el $5HT_{1A}$ (De Vivo y Maayani 1986), los $5HT_{1B}$ (Schoeffter y Hoyer 1989), los $5HT_{1A}$ (Schoeffter, y col 1988) y los receptores $5HT_4$ (Dumuis y col 1988) están vinculados a la adenilato ciclasa. Los receptores $5HT_2$ (Doyle y col 1986) y el subtipo $5HT_{1A}$ (Hoyer, 1988) están vinculados a la fosfolipasa C. El otro grupo incluye los que están asociados directamente a canales iónicos. A este grupo pertenecen los receptores $5HT_3$ (Hartig, 1989).

V.- DROGAS QUE MODIFICAN LA TRANSMISIÓN SEROTONINÉRGICA.

La neurotransmisión química requiere de una serie de pasos: la síntesis del neurotransmisor, su almacenamiento, su liberación, su acoplamiento a un receptor específico y la terminación de sus acciones. Cada uno de estos pasos ha sido estudiado con todo detalle y se han descubierto fármacos que los favorecen o los bloquean selectivamente. Algunos fármacos que tienen acciones sobre las diferentes etapas en la neurotransmisión serotoninérgica se detallan a continuación.

a.- Inhibidores de la síntesis

Existen compuestos que interfieren con la síntesis de la serotonina. La p-clorofenilalanina (PCPA), bloquea a la enzima triptófano hidroxilasa, que hidroxila al triptófano. La PCPA compete con el triptófano y se une irreversiblemente a la enzima, disminuyendo las concentraciones centrales de 5HT (Kuhn, 1980).

b.- Inhibidores del almacenamiento

La reserpina es el fármaco depletor de 5HT más importante. Su efecto se observa claramente en las plaquetas, en donde disminuye sus niveles durante 3 a 5 semanas con una dosis de 1 a 10 mg

administrados sistémicamente por vía oral o intramuscular (Bein, 1956). La tetrabenezina es otro fármaco que interrumpe el almacenamiento de serotonina en gránulos, dejandola libre en el citoplasma donde la MAO la metaboliza.

c.- Inductores de la liberación.

Dentro de este grupo estan las anfetaminas (paracloroanfetamina y fenfluramina) y a algunos antidepresivos tricíclicos (dorimipramina y la amitriptilina). Estos fármacos además de facilitar la liberación inhiben la captura de la serotonina.

d.- Inhibidores de la recaptura.

Algunos viejos antidepresivos tricíclicos en la inhibición de la recaptura *in vitro* de la serotonina-H² son la amitriptilina, la imipramina y la clomopramina (Braian, 1988). Estos fármacos aumentan la concentración de serotonina en el espacio sináptico. En la tabla # 1 se muestran algunos nuevos inhibidores de la recaptura de serotonina-H² *in vitro*.

TABLA # 1
Potencia de algunos nuevos antidepresivos inhibidores
de la recaptura *in vitro* de Serotonina-H² (Braian, 1988).

Antidepresivo	(IC ₅₀ µM)
paroxetina	0.004
sertralina	0.013
citalopran	0.07
femoxetina	0.08
fluoxetina	0.15
zimehidina	3.00

e.- Neurotoxinas que destruyen neuronas serotoninérgicas.

Estas neurotoxinas destruyen preferencialmente las neuronas que contienen serotonina, por ejemplo 5,6 dihidroxitriptamina (5,6-DHT) y 5,7 dihidroxitriptamina (5,7-DHT) (Kuhn, 1980).

f.- Agonistas y antagonistas.

Se han descrito fármacos que modifican la unión de los NTS con su receptor ya sea bloqueando la unión al receptor, sin producir ningún efecto fisiológico (efecto antagonista), o bien mimetizando los efectos del NT (efecto agonista). En la tabla # 2 se muestra algunos de los principales agonistas y antagonistas para los diferentes tipos de receptores de la serotonina así como los sitios de alta densidad y radioligandos utilizados para determinarlos.

TABLA # 2

Agonistas, antagonistas y ligandos utilizados para determinar a los receptores 5-HT (Peroutka. 1988, Göthert. y Schlicker. 1987, Bradley, y col. 1986, Anthony. 1984).

Receptor	Radioligando	Agonista	Antagonista	Alta densidad
5-HT _{1a}	³ H 8-OH-DPAT	8-OH-DPAT	Espiperona	septum lateral
	³ H 5-MeO-3-DPAC	Ipsapirona	(-)propranolol	Núcleo de Rafe
	³ H Ipsapirona	Gepirone	(-)pindolol	dorsal y medio
	³ H WB 4101	Buspirona	penbutolol	corteza frontal
	³ H Spiroxantrina		cianopindolol	y amígdala central
³ H PAPP				
5-HT _{1b}	³ H 5-HT ¹²⁵ I-CYP	RU-24969 5-CT	(-)-21009	sustancia negra Globo pálido
5-HT _{1c}	³ H Mesulergina	5-HT	mesulergina mianserina	Plexus coróideo
5-HT _{1d}	³ H 5-HT	5-HT 5-CT	metitepina metisergida	ganglio basal
5-HT ₂	³ H Espiperona	espiperona	ketanserina	cuarta capa de la corteza cerebral y caudal.
	³ H Mesulergina	5-HT	ritanserina	
	³ H Ketanserina	5-CT	mesulergina	
	¹²⁵ I-LSD		metisergida	
5-HT ₃	³ H Quipasina ³ H 5-HT	2-metil-5-hidroxitriptamina	Cocaína MDL 72222 ICS 205-930	área postrema
5-HT ₄	³ H 5-HT	5-MeOt	ICS 205-930	

VI.- EFECTO DE LA SEROTONINA SOBRE LA PRESION ARTERIAL

Bhargava y Tangri en 1959 encontraron que la serotonina regula la presión arterial a nivel central ya que su administración ICV disminuye la presión arterial, la frecuencia cardiaca y la respuesta a la oclusión bilateral de las arterias carótidas. Esta amina no atraviesa la barrera hematoencefálica, por lo tanto su administración sistémica no produce hipotensión, aunque la administración endovenosa de 5-hidroxi-triptófano (5HTP) (precursor de la serotonina), si disminuye la presión arterial en gatos (Flórez y Armijo, 1974) y en perros (Antonaccio y Robson, 1973) tratados previamente con un inhibidor de la MAO. Además el pretratamiento de los animales con el inhibidor central de la descarboxilasa, el RO4-4602, impide la hipotensión inducida por el 5HTP, pero la administración previa del MK-486, un inhibidor periférico de la descarboxilasa, no antagoniza el efecto hipotensor del precursor de la serotonina (Flórez y Armijo, 1974), indicando que el 5HTP primero debe penetrar en el SNC y ser convertido ahí en serotonina para que se lleve a cabo su efecto hipotensor.

4.- CARACTERIZACION DEL INDORRENATO COMO ANTIHIPERTENSIVO

La búsqueda de nuevos agentes antihipertensivos que no produzcan efectos colaterales severos o desagradables es una actividad que se

ha realizado en muchos laboratorios de investigación farmacológica, entre los que se encuentran los laboratorios Miles de México. En estos laboratorios se hizo el cernimiento ciego de varios análogos químicos derivados de la serotonina, entre ellos el indorrenato (IR) (Rac-clorhidrato de 5-metoxitriptamina, beta-metil carboxilato y número clave TR3369, con un peso de 284.75 M), el cual se encontró que es un agente antihipertensivo eficaz. Su acción antihipertensiva se probó en gatos anestesiados con una dosis de 1 mg/kg produciéndose una disminución de la presión arterial, sin que se bloquearan las respuestas de la membrana nictitante provocadas por epinefrina, acetilcolina, o por estimulación de las fibras preganglionares simpáticas del ganglio cervical superior. Además, el IR tampoco antagonizó las respuestas sobre la presión arterial o la frecuencia cardíaca inducida por epinefrina, acetilcolina o estimulación de las fibras vagales eferentes.

En un experimento complementario, el IR se administró a través de la arteria vertebral izquierda a gatos anestesiados en dosis de 0.01 mg/kg/min durante 5 minutos, produciendo una rápida y duradera hipotensión de cerca de 40 mm Hg, que fue suficiente para indicar que el compuesto era probablemente un antihipertensivo central (Hong, y col 1978).

El hecho de que la administración ICV o su inyección en la arteria vertebral izquierda del gato disminuyera la presión arterial a dosis que no la modifican al ser administradas por vía endovenosa, constituyen una prueba de que su efecto es primordialmente central. También, el que su efecto se observara con

una latencia mínima cuando se administró en la arteria vertebral y claramente mayor después de la inyección ICV, sugiere que el sitio en donde actúa probablemente se encuentra en el tallo cerebral o en la parte alta de la medula espinal, ya que tales estructuras son irrigadas por la arteria vertebral izquierda en el gato (Hoyer y Zwieten, 1971).

Además al ser administrado por vía oral produce un efecto antihipertensivo en ratas con hipertensión experimental debido a la administración de desoxicorticoesterona y cloruro de sodio en el agua de beber o bien por ligadura en forma de ocho en un riñón, seguida de nefrectomía contralateral 15 días después. Este efecto guardó relación con la dosis administrada y tuvo una duración de aproximadamente 6 horas (Hong y col, 1983).

En perros hipertensos renales, la administración oral del IR disminuye las presiones arteriales sistólicas y diastólicas de manera proporcional a la dosis administrada y de larga duración (Hong y Riñón, 1979). El tratamiento crónico (0.31 ó 1.0 mg/kg/Día), repartiendo la dosis diaria en 2 porciones, también disminuyó la presión arterial aún cuando esta fue medida aproximadamente 15 horas después de la última dosis. El efecto máximo se observó después de 2 ó 3 semanas de tratamiento (Hong, y col. 1983). Si se administra en una dosis única diaria de 1.0 mg/kg se establece un efecto gradual antihipertensivo residual (medido 24 horas después de la última administración) y alcanza su máximo después de 3 semanas de tratamiento (Hong, 1982). La magnitud del efecto antihipertensivo observada en este experimento fue similar a la

obtenida cuando se administró a la misma dosis diaria, pero fraccionada en 2 porciones; después de 3 semanas de tratamiento, se observó que la presión arterial se mantenía por debajo de los niveles controles y que las fluctuaciones de la presión arterial después de la administración del IR eran mínimas (Hong, 1982).

El efecto hipotensor del IR no se antagoniza con la administración previa de yohimbina o fentolamina y sólo se previene parcialmente por la administración ICV de quipazina y se bloquea por la tolazolina (Hong, y col 1983). Esto es similar a lo observado con el efecto hipotensor que sigue a la inyección ICV de serotonina (Nava-Felix, 1979), lo que sugiere que las dos sustancias probablemente actúen en el mismo sitio. De acuerdo a lo anterior, se ha postulado que el sitio de acción del efecto antihipertensivo del IR probablemente corresponda a los receptores descritos como 5HT₁ (Safdy y col, 1982) ya que éstos son los que poseen gran afinidad por la serotonina y no por sus antagonistas (Peroutka, y Snyder, 1979).

En apoyo a que el IR actúa como un agonista de la 5HT se ha demostrado que la administración de 10 mg/kg causa un incremento en las concentraciones de serotonina y una disminución de su metabolito el ácido 5-hidroxiindolacético (5HIAA) en el tallo, la corteza cerebral, el hipotálamo y el estriado entre 1.5 y 3 horas después de su administración.

Además, causa una disminución significativa en la concentración del ácido homovanílico (HVA) y del 3-4-dihidroxifenilacético (DOPAC) después de 1.5 horas de una inyección, recobrándose los

valores controles 24 horas después de la administración.

Estos resultados indican un efecto transitorio pero claro de este compuesto sobre el metabolismo dopaminérgico. Este efecto puede deberse a una acción agonista del IR sobre receptores dopaminérgicos semejante a lo que se ha descrito para otros agonistas serotoninérgicos tales como el lesuride, el butaciamol y la buspirona (Enna y Snyder, 1976) o a su acción sobre los receptores 5-HT presinápticos que inhiben la liberación de dopamina en el estriado.

5.- OBJETIVO GENERAL

Las evidencias anteriores sugieren que el indorrenato puede actuar a nivel central sobre receptores serotoninérgicos y que podría modificar el metabolismo de dopamina por unión a los autoreceptores dopaminérgicos en el cuerpo estriado, o bien por unión a los receptores 5HT presinápticos. Los autoreceptores serotoninérgicos están acoplados a las proteínas G y su afinidad por los agonistas 5HT se reduce en presencia de GTP. Además, la estimulación de este tipo de receptores es seguida por una inhibición en la liberación de serotonina- H^3 en rebanadas de cerebro.

El objetivo general del presente trabajo fue caracterizar el tipo de receptores a los cuales se une el indorrenato estudiando el desplazamiento que produce este compuesto sobre la liberación de serotonina en terminales nerviosas aisladas (sinaptosomas crudos).

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Determinar si el indorrenato se une a los receptores D_2 en el cuerpo estriado de la rata.
- 2.- Estudiar el efecto en la unión de serotonina- H^3 del GTP sobre el desplazamiento producido por el indorrenato a membranas de hipocampo de la rata.
- 3.- Comparar los efectos producidos por el indorrenato con los que produce la ipsapirona y la 8-OH-DPAT que son dos agonistas $5HT_1$.
- 4.- Estudiar el efecto del indorrenato sobre la liberación de serotonina en sinatosomas crudos de hipocampo de la rata.

6.- HIPOTESIS

El presente trabajo tiene como hipótesis el que el indorrenato se une a receptores serotoninérgicos del tipo $5HT_1$ en el Sistema Nervioso Central.

7.- DISEÑO EXPERIMENTAL

Para lograr los objetivos de esta tesis se siguió la siguiente estrategia: 1.- se realizaron experimentos de desplazamiento con indorrenato sobre la unión de espiperona-H³ a membranas del cuerpo estriado. La espiperona es un ligando con alta afinidad por receptores a dopamina del tipo D₂. Se ha descrito que las membranas del cuerpo estriado tienen una gran densidad de receptores D₂. 2.- Además se hizo un estudio comparativo de este desplazamiento en corteza cerebral, hipotálamo, hipocampo y tallo cerebral del cerebro de la rata, estas regiones tienen poca densidad de receptores D₂. Como control se usó el haloperidol un antagonista selectivo de los receptores D₂. 3.- Para explorar si el indorrenato se une a los receptores 5HT_{1A} se prepararon membranas de hipocampo de la rata. Esta estructura es rica en este tipo de receptores, por lo que se realizaron curvas de desplazamiento sobre la unión de 5HT-H³. Para estos ensayos se usó serotonina fría como control. 4.- Se estudió el efecto del GTP sobre el desplazamiento causado por el indorrenato a membranas de hipocampo, ya que está descrito que los receptores 5HT_{1A} están acoplados a proteínas G. 5.- También se prepararon sinaptosomas crudos de hipocampo de la rata para determinar si el indorrenato disminuía la liberación de serotonina estimulada con cloruro de potasio (55 mM). 6.- Los efectos obtenidos en los ensayos de GTP y de liberación se compararon con los de la ipsapirona y el 8-OH-DPAT dos agonistas selectivos de receptores 5HT_{1A}.

8.- MATERIALES Y METODOS

I.- CROMATOGRAFIAS EN PAPEL

Con el fin de conocer y probar la pureza de los ligandos utilizados, se hizo una cromatografía en papel.

Para la serotonina- H^3 (25.2 Ci/mMol Nen-Dupont), se utilizó como fase móvil; n-butanol, ácido acético y agua, en una proporción (12:3:5). Se cortó un papel Whatman No. 1 de 20 x 20 cm, que se dividió en tres carriles por duplicado. En dos carriles se corrió 1 μ l de serotonina fría (10 μ M), en otros dos carriles se corrió 1 μ l de serotonina marcada. Para comparar la velocidad de corrimiento de cada una de las serotoninas por separado, además de dos carriles con una mezcla de serotonina marcada y serotonina fría. El frente de corrida se verificó con una lámpara de luz ultravioleta. La cromatografía se corrió en oscuridad para evitar la oxidación de la serotonina.

Para la espiperona- H^3 (19.0 Ci/mMol Nen-Dupont), la fase móvil fue cloroformo y metanol (9:1). Esta se corrió sola y por duplicado. Al finalizar la cromatografía, el papel fue cortado en tiras de 1 cm y cada fracción se colocó en un vial con 5 ml de líquido de centelleo y se contaron por 2 minutos en un contador de centelleo líquido Beckman (LS 7800).

II.- EXPERIMENTOS DE UNION Y DESPLAZAMIENTO DE SEROTONINA-H¹ Y ESPIPERONA-H³

a.- Preparación de membranas.

Un grupo de 20 ratas macho de la cepa Wistar de 200 a 250 g se sacrificó por decapitación. Los cerebros se removieron y se disecaron las siguientes estructuras: tallo, corteza, hipocampo, hipotálamo y cuerpo estriado. Cada estructura se pesó y colocó en una solución amortiguadora que contenía Tris (Tris [hidroximetil] aminometano) 25 mM, MgCl₂ 5 mM, y NaCl 100 mM, pH 7.4 y se homogeneizaron con un homogeneizador de tejidos (Tissumizer de Tekmar) a razón de 1 g/10 ml. Los homogenados se centrifugaron a 35000 x g durante 30 minutos; el sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió en el volumen inicial y se centrifugó a 35000 x g por 30 minutos de acuerdo con Leysen y col (1978). Finalmente el precipitado se resuspendió en 2.5 ml por cada 100 mg de tejido homogenado y se separó en alícuotas que se congelaron a -70° C para posteriormente realizar los ensayos de desplazamiento de la unión al receptor. De este precipitado se tomaron 100 µl para determinar la concentración de proteínas por el método de Lowry, (1951).

b.- Determinación de la concentración de proteína

Método de Lowry.

Se diluyó 1 mg de proteína sérica bovina (BSA) en 1 ml de agua desionizada. Con esta solución se preparó una curva estándar con las siguientes concentraciones: 5,10,15,20,40,60,80 y 100 µg en un volumen final de 150 µl. Las alícuotas de cada estructura (100 µl) se diluyeron 1:20, y se tomaron 150 µl para la determinación de proteínas por triplicado.

Realizada la curva y diluidas las muestras, se determinó la concentración de proteínas según la técnica de Lowry que consiste en agregar 50 µl de NaOH 0.4 N y 1 ml de reactivo alcalino de cobre (50 ml de Na₂CO₃ al 2 % en NaOH 0.10 N, 0.5 ml de CuSO₄ al 1 % y 0.5 ml de tartrato de sodio y potasio al 2 %). Los tubos se incubaron y agitaron durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Después se les agregó el reactivo de Folin-Ciocalteus, 100 µl a cada tubo, se agitaron e incubaron 30 minutos a temperatura ambiente. La densidad óptica se midió a 700 nm en un espectrofotómetro Baush & Lomb Spectronic 1001. Los valores de las muestras fueron calculados por interpolación con las concentraciones conocidas del estándar de albúmina bovina.

**c.- Determinación de la constante de disociación para
espiperona-H⁺**

La unión específica de la espiperona se determinó en membranas obtenidas del cuerpo estriado de la rata incubando 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, y 3.5 nM de espiperona-H⁺ (19 Ci/mmol), con 400 µg de proteína de membranas y aforados a 1 ml con una solución amortiguadora Tris 50 mM y un pH de 7.4.

La unión inespecífica se determinó en presencia de 10 µM de haloperidol. Las mezclas se incubaron 30 minutos en un baño de agitación a 37° C. La reacción se detuvo por filtración de las membranas a través de filtros Whatman GF/B (Brandel) y aspiración en un cosechador de células (Cell Harvester M-24 R).

Los filtros se lavaron 5 veces con 3 ml de solución amortiguadora (Tris 50 mM) a 4° C y se contaron durante dos minutos en un contador Beckman en viales con 5 ml de líquido de centelleo, el cual se preparó en la siguiente proporción 1 litro de tolueno, 0.1 g de Popop [1,4-bis-2-(5-phenyloxazolyl)-benceno] y 5 g de PPO (2,5-Diphenyloxazole).

**d.- Determinación de la constante de disociación para
serotonina-H⁺ .**

La unión específica de la serotonina se determinó en presencia de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 2.0,

2.5, y 3.0 nM de serotonina- H^3 (25 Ci/mMol).

La reacción se llevó a cabo en 1 ml de Tris 50 mM, pH 7.4, que contenía 150 μ g de proteínas de membranas de hipocampo de rata. La unión inespecífica se determinó en presencia de 10 μ M de serotonina fría. Las mezclas se incubaron durante 30 minutos en un baño de agitación a 37° C. La reacción se detuvo mediante filtración de las membranas en filtros Whatman GF/B y aspiración en cosechador de células. Los filtros fueron lavados 5 veces con 3 ml de solución amortiguadora fría y contados en 5 ml de líquido de centelleo en un contador de centelleo líquido Beckman.

e.- Desplazamiento de la unión de espiperona- H^3 a membranas de hipocampo, hipotálamo, cuerpo estriado, corteza y tallo.

Las membranas previamente descongeladas (400 μ g de proteína/ml) se incubaron con 1.2 nM de espiperona- H^3 (19 Ci/mMol) en Tris 50 mM a pH de 7.4, en un volúmen final de 1 ml, durante 30 minutos en un baño de agitación a 37° C. La unión inespecífica se determinó en presencia de 10 μ M de haloperidol. El desplazamiento de la unión de espiperona- H^3 por indorrenato se probó en un margen de concentraciones de 10^{-8} M a 10^{-5} M. La reacción se detuvo por filtración, los filtros se lavaron y contaron en las condiciones mencionadas anteriormente.

f.- Desplazamiento de la unión de serotonina-H³ a membranas de hipocampo.

Una vez descongeladas las membranas, se resuspendieron a una concentración de 250 µg de proteína/ml y se incubaron durante 40 minutos a 37° C con 50 mM de Tris-HCl pH 7.4, 5.7 mM de ácido ascórbico, 10 µM de pargilina y 0.75 nM de 5HT-H³ (25 Ci/mMol) y varias concentraciones de indorrenato, ipsapirona y 3-OH-DPAT en un rango de concentraciones de 10⁻¹² a 10⁻² M. La incubación se llevó a cabo en presencia y ausencia de 0.1 mM de GTP.

La unión inespecífica fue determinada en presencia de 10 µM de serotonina fría. Las reacciones fueron detenidas por filtración y aspiración en un cosechador de células. Los filtros fueron lavados y sumergidos en líquido de centelleo. Para ser medidos en un contador de centelleo líquido (Beckman).

La concentración requerida para desplazar el 50 % de 5HT-H³ de unión específica (valores de IC₅₀) fue calculado por análisis de Log-Logit.

III.- EXPERIMENTOS DE LIBERACION

a.- Preparación de las terminales nerviosas (sinaptosomas)

Se sacrificaron 2 ratas macho de la cepa Wistar de 200 a 250

g, por decapitación. El cerebro se extrajo y se disecó el hipocampo que fue homogenizado en 10 ml de sacarosa 0.32 M por gramo de tejido, en un homogeneizador con pestle de teflón, el cual estaba acoplado a un taladro (8 golpes/800 rpm), a 4° C . El homogenado se centrifugó a 1000 x g durante 10 minutos y el precipitado se descartó. El sobrenadante, se centrifugó a 15000 x g durante 20 minutos de acuerdo con Sherman y col (1978). El precipitado constituye la fracción sinaptosomal cruda conocida como P₂ ó fracción de Whittaker P₂ que contiene sinaptosomas y mitocondrias (Gray y Whittaker, 1962).

b.- Sistema de perfusión

El sistema de perfusión continua consistió en cuatro cámaras colocadas en paralelo con una base multiperforada. En ella se colocaron filtros (Millipore) de 0.65 µm de tamaño de poro, con el fin de retener a los sinaptosomas. Las cámaras sirvieron como reservorio para contener los diferentes medios de perfusión para bañar la preparación. En su parte inferior se conectaron a una tubería de tygon, de 0.32 mm de diámetro, que pasaba a través de los rodillos de la bomba peristáltica Bushler, que regulaba el flujo del líquido a través del sistema (0.5 ml/min).

Esta tubería salía por el extremo opuesto de cada "Cassette", y terminaba en los recipientes colectores.

c.- Medios de perfusión.

La liberación basal, se observó empleando una solución fisiológica Krebs Henseleit (Drescher y Hetey, 1988) con un pH de 7.3 gaseado con una mezcla de CO₂/O₂ (5 %/95 %) a 37° C.

Este ringer contenía NaCl 119.0 mM, KCl 4.6 mM, CaCl₂ 1.25 mM, KH₂PO₄ 0.85 mM, MgSO₄ 0.84 mM, NaHCO₃ 24.8 mM, Glucosa 10.0 mM, EDTA ácido 0.05 mM, ácido ascórbico 0.56 mM, y Pargilina 0.02 mM como inhibidor de la MAO, para evitar el catabolismo de la serotonina.

A este ringer se le adiciono el indorrenato, la ipsapirona, el 8-OH-DPAT (1 µm) y cloruro de potasio 55 mM que fue el agente estimulante para la despolarización de la membrana sinaptosomal.

d.- Captación del transmisor marcado

Para marcar los sinaptosomas con el neurotransmisor radioactivo, el precipitado de la última centrifugación se preincubó a 37° C durante 6 minutos con 6 ml de ringer Krebs Henseleit. Posteriormente se añadió la serotonina marcada (25.2 Ci/mMol) a una concentración final de 4×10^{-8} M de acuerdo a Drescher y Hetey (1988). La preparación se incubó durante 8 minutos a la misma temperatura con el objeto de que los sistemas de alta afinidad dependientes de Na⁺ y de la temperatura, captaran al neurotransmisor.

e.- Liberación del neurotransmisor

Para determinar la liberación, se depositaron alícuotas de 800 μg de proteína sinaptosomal marcadas con el neurotransmisor radioactivo sobre los filtros microporosos de 0.65 μm . Para eliminar la radioactividad que no se incorporó a la preparación, se hizo un lavado con solución amortiguadora a un flujo rápido (1ml/min) durante 14 minutos. Después, se modificó la velocidad del flujo para obtener 500 μl por minuto; y con esta velocidad se procedió a coleccionar cada minuto el perfusado proveniente de cada cámara, durante 4 minutos para obtener la liberación basal. Al cabo de este tiempo al medio de perfusión se le adiciono 1 μM de indorrenato, ipsapirona, ó 8-OH-DPAT a 2 de las cámaras; a las 2 restantes se les añadió solución fisiológica y se perfundieron durante 5 minutos y despues se les añadió una solución de 55 mM de cloruro de potasio para inducir una despolarización durante 4 minutos. Finalmente la perfusión se continuó por 8 minutos para recuperar la liberación basal.

Terminada la perfusión, se procedió a medir la radioactividad liberada en cada una de las fracciones coleccionadas por minuto, así como la contenida en los sinaptosomas, con la adición de 5 ml de líquido de centelleo (300 ml de triton, 700 ml de tolueno, 5.5 g de PPO y 0.188 g de POPOP por litro), en un contador Beckman

9.- RESULTADOS

I.- Determinación de la pureza y caracterización de las constantes de disociación de los ligandos utilizados en los experimentos de unión y desplazamiento.

Antes de realizar los ensayos se verificó la pureza de los ligandos, y se determinó su constante de afinidad. En la gráfica No. 1 se muestra la cromatografía de la espiperona- H^3 que mostro un r_f de 0.88 y de la serotonina- H^3 que mostro un r_f de 0.7. Como control se corrió una mezcla de serotonina marcada mas fría. Ambas corrieron la misma distancia.

En la gráfica No. 2 se muestra la curva de saturación de la espiperona- H^3 . Este ligando se incubó en un margen de concentraciones de 0.5 a 3.5 nM con membranas del cuerpo estriado de la rata. La saturación de los sitios de unión de la espiperona en este tejido se alcanzó en la concentración de 3 nM. La unión específica fue de 76 % con respecto a la radioactividad total. Los datos se transformaron con el método de Scatchard. Este análisis reveló una constante de disociación (K_d) de 1.2 nM y un número de sitios de unión (B_{max}) de 14.7 pmol/g de proteína.

La curva de saturación de serotonina- H^3 se obtuvo incubando a la serotonina- H^3 en un margen de concentraciones entre 0.1 y 3 nM con membranas de hipocampo de la rata. El análisis de Scatchard reveló una constante de disociación de 0.75 nM y una capacidad de unión de 243 pmol/g de proteína. (gráfica No 3)

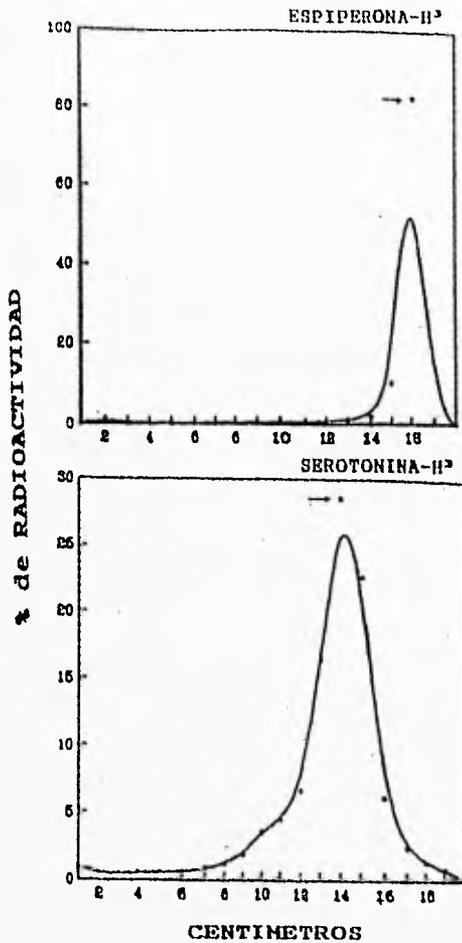


Figura No. 1 La gráfica muestra el frente de corrida de la cromatografía en papel de la Espiperona-H³ y Serotonina-H³. La flecha señala el sitio de mayor radioactividad. Los resultados son el promedio de un experimento por duplicado.

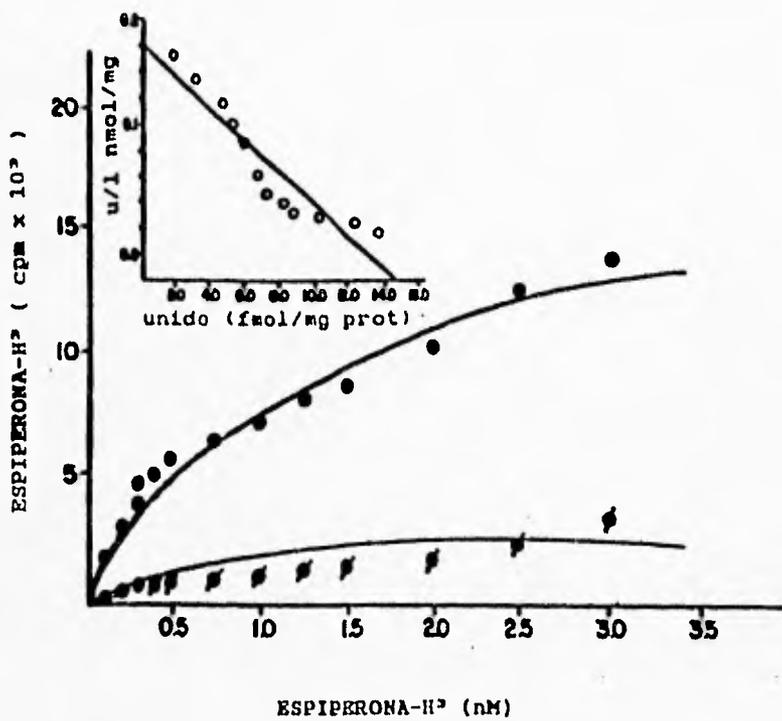


Figura No. 2 Curva de Saturación de Espiperona-H³. La unión inespecífica se determinó en presencia de 10 μ m de haloperidol, la unión específica se graficó con la transformación de Scatchard y se muestra en la gráfica superior. Los resultados son la media de 3 experimentos por duplicado.

Unión Total (•) Unión Inespecífica (x)

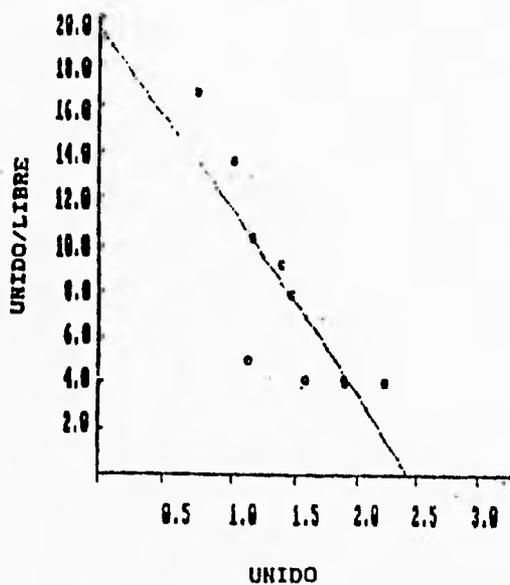


Figura No. 3 Transformación de la curva de saturación de Serotonina- H^+ mediante el método de Scatchard. Los resultados son la media de 2 experimentos por duplicado.

II.- Determinación de la unión de indorrenato a receptores D₂.

Para determinar si el indorrenato se une a los receptores D₂ se hicieron curvas de desplazamiento de la unión de espiperona-H³ a membranas del cuerpo estriado; Se ha descrito que esta estructura es rica en receptores D₂. Como control se utilizó el haloperidol que se une con alta afinidad a los receptores D₂ y actúa como un antagonista dopaminérgico. Además, se hizo un estudio comparativo, del desplazamiento de espiperona-H³ por indorrenato en membranas del hipocampo, hipotálamo, tallo cerebral y corteza cerebral.

En la gráfica No. 3 se muestra el efecto del indorrenato sobre la unión de espiperona-H³ en el tallo cerebral, hipotálamo, e hipocampo respectivamente. En el tallo cerebral y el hipotálamo se tiene un ligero desplazamiento por haloperidol mientras que el indorrenato no tiene ningún efecto. Ambos compuestos no alcanzan una IC₅₀ con las concentraciones probadas. En el hipocampo tanto el indorrenato como el haloperidol no tienen ningún efecto.

La gráfica No.4 muestra el efecto del indorrenato sobre la unión de espiperona-H³ a membranas de corteza cerebral y cuerpo estriado. En la corteza cerebral el indorrenato desplazó la unión de espiperona-H³ entre un 10 y 20 % sin embargo no hubo una relación dosis-respuesta. En cambio el haloperidol, desplazó la unión con una IC₅₀ de 1×10^{-8} M, en el cuerpo estriado el indorrenato no desplazó este ligando en el margen de concentraciones probadas (10^{-8} y 10^{-6} M). En cambio el haloperidol desplazó a la unión con una IC₅₀ de 1 nM.

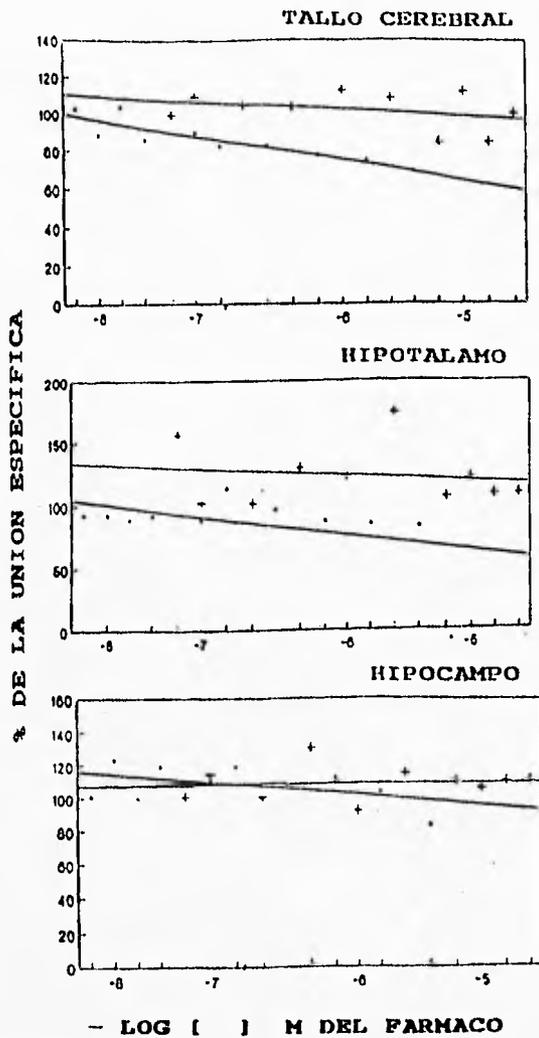


Figura No. 4 Efecto del indorrenato sobre la unión de Espiperona-H³ en membranas de Tallo cerebral, Hipotalamo e Hipocampo. La gráfica muestra el desplazamiento de Espiperona-H³ (1.2 nM) por diferentes concentraciones de indorrenato (+), utilizando haloperidol como control (*). Los resultados son la media de 3 experimentos por duplicado.

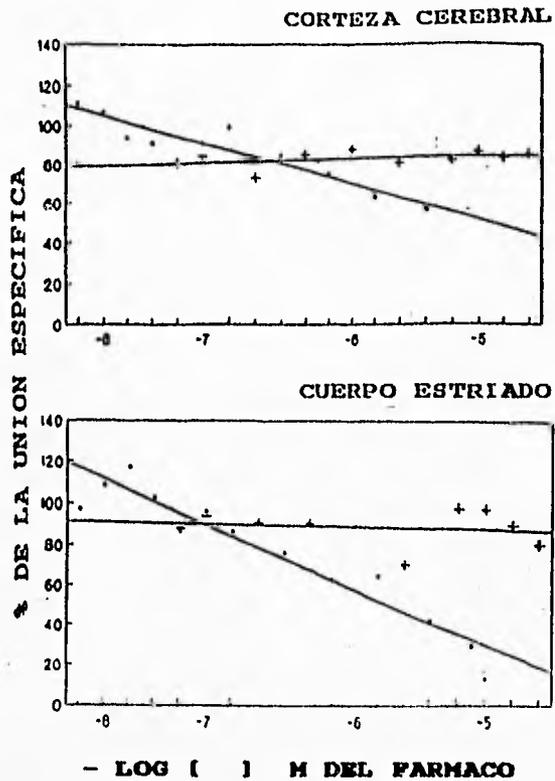


Figura No. 5 Efecto del indorrenato sobre la unión de Espiperona-H² en membranas de corteza cerebral y cuerpo estriado. La gráfica muestra el desplazamiento de Espiperona-H² (1.2 nM) por diferentes concentraciones de indorrenato (+), usando haloperidol como control (•). Los resultados son la media de 3 experimentos por duplicado

III.- Efecto del GTP sobre el desplazamiento de la serotonina- H^3 por indorrenato en membranas de hipocampo.

Como ya se mencionó, el hipocampo es una estructura rica en terminales serotoninérgicas del tipo $5HT_{1A}$ (Middlesmiss y Pozar, 1983). El indorrenato se une a receptores $5HT_{1A}$ y se ha descrito que este tipo de receptores están acoplados al sistema de la adenilato ciclasa modulada por una proteína G. Para caracterizar el tipo de receptores a los cuales se une el indorrenato se estudió el efecto del GTP sobre el desplazamiento de la serotonina- H^3 en membranas de hipocampo y se comparó con el efecto que produce el GTP sobre el desplazamiento por dos compuestos que se sabe se unen a receptores $5HT_{1A}$, el 8-OH-DPAT y la ipsapirona. En la gráfica No. 6 se muestra las curvas de desplazamiento de serotonina- H^3 por indorrenato, 8-OH-DPAT e ipsapirona en presencia y en ausencia de GTP. La curva de desplazamiento de serotonina- H^3 por indorrenato muestra una IC_{50} de 50 nM. En comparación 8-OH-DPAT e ipsapirona, ambos potentes agonistas $5HT_{1A}$, muestran una IC_{50} de 50 nM y 5 nM, respectivamente. La capacidad del indorrenato para desplazar la unión de serotonina- H^3 a membranas de hipocampo disminuyó en presencia de 0.1 mM de GTP (IC_{50} 1 μ M). Un efecto similar se observó sobre la capacidad de desplazamiento de la serotonina- H^3 por 8-OH-DPAT e ipsapirona en presencia de GTP fueron de 50 μ M y 10 μ M respectivamente. El cien por ciento de unión fue de 250 fentomolas/mg de proteína.

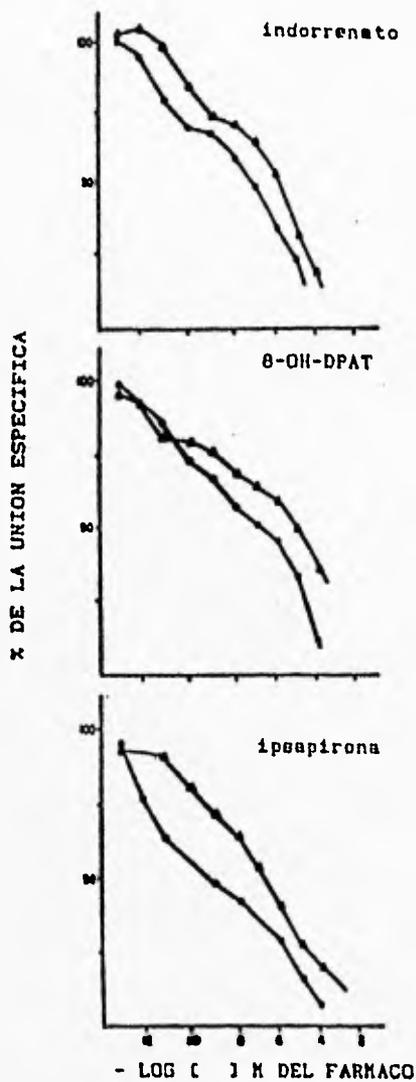


Figura No. 6 Efecto de GTP sobre el desplazamiento de Serotonina-H³ por indorrenato. La unión específica de Serotonina-H³ fué medida en presencia de indorrenato, 8-OH-DPAT o ipsapirona con (•) y sin GTP (▲). Los resultados son la media de 3 experimentos por duplicado.

IV.- Efecto del indorrenato sobre la liberación de serotonina- H^3 en membranas de hipocampo.

Se ha descrito que la ipsapirona (Domper y col 1985) y el 8-OH-DPAT (Middlemiss y Fozar, 1983) se unen a los receptores $5HT_{1A}$ e inhiben la liberación de serotonina. Como evidencia adicional para apoyar el que el indorrenato era capaz de inhibir la liberación de serotonina en sinaptosomas del hipocampo de la rata se comparó con los efectos producidos por la ipsapirona y el 8-OH-DPAT.

Con concentraciones altas de cloruro de potasio (55 mM) se produce un marcado incremento en la liberación de serotonina- H^3 dependiente de calcio, en una fracción sinaptosomal cruda (fracción P_2) proveniente de hipocampo de rata (Gráfica No. 7).

El indorrenato añadido 4 minutos después de haber iniciado la perfusión, no cambia la liberación basal. Sin embargo este compuesto con una concentración de $1 \mu M$ fue capaz de reducir la liberación de serotonina- H^3 estimulada con concentraciones altas de potasio en un $15 \pm 2.4 \%$. De manera semejante $1 \mu M$ de ipsapirona y 8-OH-DPAT inhibieron la liberación de serotonina- H^3 estimulada con concentraciones altas de potasio en un 32 ± 3.4 y $10.5 \pm 2 \%$ respectivamente sin afectar la liberación basal.

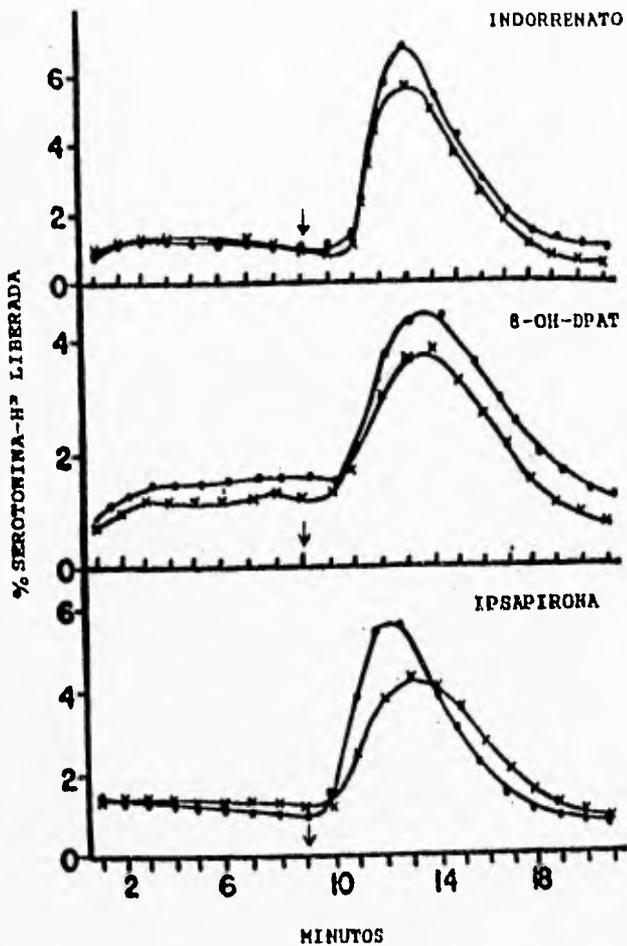


Figura No. 7 Efecto del indorrenato sobre la liberación de Serotonina-H³ evocada con cloruro de potasio 55 mM. En una fracción sinaptosomal cruda de membranas de hipocampo que fueron perfundidas con (x) y sin (•) indorrenato, 8-OH-DPAT o ipsapirona (1 μ m). La flecha indica el momento de la despolarización. Los resultados son la media de 3 experimentos por duplicado.

10.- DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los estudios *in vitro* han sugerido que el indorrenato se une a los receptores 5HT_{1A} ya que es capaz de desplazar la unión de serotonina-H³ y de ipsapirona-H³ en membranas de hipocampo. En este trabajo encontramos que el indorrenato es capaz de desplazar la unión de serotonina-H³ en membranas de hipocampo y de corteza, que se ha descrito son ricas en terminales serotoninérgicas. Estos resultados apoyan el planteamiento de que el indorrenato es capaz de unirse a los receptores de serotonina.

En estudios acerca de la unión ligando-receptor, la ipsapirona ha mostrado tener una alta afinidad y selectividad por los sitios de unión de serotonina marcada en membranas de hipocampo (Glaser y Traber, 1985) donde la mayor proporción de receptores de serotonina son del tipo 5HT_{1A} (Schnellman y col, 1984). Estos resultados fueron corroborados por estudios autoradiográficos (Glaser y col, 1987) donde el desplazamiento de serotonina marcada se obtiene preferentemente en regiones ricas en receptores 5HT_{1A} (hipocampo, septum etc), pero no en regiones ricas en receptores 5HT_{1B} (Subuculum dorsal, sustancia negra, globo pálido, etc).

Hoyer y col (1985) y Domper y col (1985) encontraron diferencias en la afinidad al receptor 5HT_{1A} por parte del indorrenato y la ipsapirona. Mostrando este último compuesto una mayor afinidad por los receptores dopaminérgicos que el indorrenato. En este trabajo

se encontro que el indorrenato tiene una alta afinidad por los receptores de serotonina ya que fue capaz de desplazar a la serotonina fria en el rango nanomolar con una potencia semejante a la de la ipsapirona y de el 8-OH-DPAT. La curva de desplazamiento de serotonina- H^3 por indorrenato mostró una IC_{50} de 50 nM en comparación 8-OH-DPAT e ipsapirona, ambos potentes agonistas 5HT, muestran una IC_{50} de 50 nM y 5 nM, respectivamente.

Además, se encontro en este estudio que el desplazamiento por indorrenato de 5HT- H^3 unida a membranas de hipocampo fue sensible a GTP, lo cuál apoya la hipótesis de que este compuesto se une a los receptores serotoninérgicos, ya que se ha demostrado que los autoreceptores 5HT₁ están acoplados a una proteína G (Jacobs y col 1981). La sensibilidad en el desplazamiento por GTP obtenida para indorrenato fue semejante a la obtenida por el 8-OH-DPAT y la ipsapirona. La capacidad del indorrenato para desplazar la unión de serotonina- H^3 a membranas de hipocampo disminuyó en presencia de 0.1 mM de GTP obteniendose una IC_{50} de 1 μ M. Un efecto similar se observó en la capacidad de desplazamiento de la serotonina- H^3 por 8-OH-DPAT e ipsapirona en presencia de GTP. Los valores de IC_{50} para 8-OH-DPAT e Ipsapirona en presencia de GTP fuerón de 50 μ M y 10 μ M respectivamente.

Los autoreceptores de serotonina somatodendriticos se han identificado como del tipo 5HT₁ y su estimulación es seguida de una inhibición en la liberación de serotonina en rebanadas de corteza cerebral. En este trabajo se encontró que el indorrenato es capaz de inhibir la liberación de la serotonina en una preparación de

sinaptosomas de hipocampo de rata.

En concentraciones altas de cloruro de potasio (55 mM) se produce un marcado incremento en la liberación de serotonina- H^3 dependiente de calcio, en una fracción sinaptosomal cruda (fracción P_2) proveniente de hipocampo de la rata. El indorrenato con una concentración de 1 μM fue capaz de reducir la liberación de serotonina- H^3 estimulada con concentraciones altas de potasio en un $15 \pm 2.4 \%$. De manera semejante 1 μM de ipsapirona y 8-OH-DPAT inhibieron la liberación de serotonina- H^3 estimulada con concentraciones altas de potasio en un $32 \pm 3.4 \%$ y $18 \pm 2 \%$ respectivamente sin afectar la liberación basal.

La inhibición de la liberación de serotonina en sinaptosomas crudos de hipocampo se obtuvo con concentraciones semejantes a las concentraciones a las cuales la ipsapirona y el 8-OH-DPAT inhiben la liberación de la serotonina.

Estos resultados apoyan que el indorrenato se une a los receptores de serotonina en el Sistema Nervioso Central y sugieren que posiblemente sean del tipo $5HT_1$.

Se ha sugerido que el indorrenato además de modificar el metabolismo serotoninérgico, también modifica el metabolismo dopaminérgico. (Benitez-King y col 1991). Una posible explicación para este efecto podría ser que el indorrenato se une a los receptores dopaminérgicos, o bien que a través de la unión a receptores serotoninérgicos se modifica el metabolismo de la dopamina. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el indorrenato no se une a los receptores D_2 ya que en el cuerpo

estriado que es una de las estructuras en las cuales existe gran cantidad de receptores D_2 (Creese, 1982) el indorrenato no desplazó la unión de espiperona marcada. Además, en membranas del tallo cerebral, hipotálamo e hipocampo que son estructuras con pocos receptores dopaminérgicos el indorrenato tampoco desplazó a la espiperona- H^3 .

La corteza cerebral se ha descrito que tiene receptores a dopamina, el indorrenato desplazó la unión de espiperona- H^3 entre un 10 % y 20 % sin que existiera una relación dosis respuesta, en cambio el haloperidol que es un ligando que tiene alta afinidad por los receptores D_2 (Aghajanian, y Vandermaelen. 1986) fue capaz de desplazar la unión de la espiperona marcada a membranas del cuerpo estriado con una IC_{50} de 1×10^{-9} M.

Estos resultados sugieren que las modificaciones observadas en el metabolismo de dopamina después de su administración podrían ser debidas a su acción sobre receptores a 5HT que inhiben la liberación de dopamina en el cuerpo estriado como se ha reportado para otros agentes serotoninérgicos.

De los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que el indorrenato que es un fármaco usado en el control de la hipertensión arterial se une a los receptores a serotonina del tipo 5HT $_1$, a nivel central y que actúa como un agonista serotoninérgico con una potencia semejante a la de el 8-OH-DPAT.

Nuestros resultados también sugieren que el efecto agonista del indorrenato posiblemente se ejerza a nivel de los receptores 5HT $_1$, los cuales pueden estar involucrados en el efecto antihipertensivo

producido por este compuesto.

Finalmente se sugiere continuar con los estudios que permitan caracterizar farmacológicamente mejor a los fármacos para disminuir los efectos colaterales que se presentan. Una forma es mediante el estudio de los efectos sobre los sistemas de neurotransmisión como el serotoninérgico, esto ayudaría a conocer y evitar los efectos nosivos para los pacientes.

11.- LITERATURA CITADA

- 1.- Adamson, A.R., Grahame-Smith, D.G., Peart, W.S., y Starr, M. (1971). Pharmacological blockade of carcinoid flushing provoked by catecholamines and alcohol. *Amer. Heart. J.* 81:141-142
- 2.- Aghajanian, G.K., y Vandermaelen, C.P. (1986). Specific Systems of the reticular core: In F.E. Bloom (ed.), *Handbook of Physiology, Section 1: The Nervous System, Vol IV Intrinsic Regulatory Systems of the Brain.* Bethesda, Md: American Physiological Society. 237-256.
- 3.- Antonaccio, M. J. y Robson, R.D. (1973). Cardiovascular effects of 5-hydroxytryptophan in anesthetized dogs. *J. Pharm. Pharmacol.* 25:495-497
- 4.- Anthony, M. (1984). Serotonin antagonists. *J. Med.* 14:888-895
- 5.- Ashkenozi, R. y Holman, R. B. (1973). Release of transmitters into the perfused third cerebral ventricle of the cat. *J. Physiol* 195-209
- 6.- Bein, H.J. (1956). The pharmacology of rauwolfia. *Pharmacol Rev.* 8:435-483.
- 7.- Benitez-King, G., Antón-Tay, F., y Hong, E. (1991). Characterization of indorenate effects on brain monoamine metabolism. *Drug Dev. Res.* 23:325-331.
- 8.- Bennett, J.P. (1978). *Neurotransmitter receptor binding: methods in binding studies.* Raven Press. New York, USA.
- 9.- Bhargava, K.P. y Tangri, K.K. (1959). The central vasomotor effect of 5-hydroxytryptamine. *Brit. J. Pharmacol.* 14:411-414
- 10.- Bonate, P.L. (1991). Serotonin receptor subtypes: functional, physiological, and clinical correlates clinical neuropharmacology. 14(1):1-16
- 11.- Boucek, R.J. (1971). Increased fibroblasts survival by 5-hidroxytryptamine. *Nature.* 229:61

- 12.- Bradford, H. (1975). Isolated nerve terminals as an in vitro preparation for the study of dynamic aspects of transmitter metabolism and release. Handbook of Psychopharmacology. (eds. Iversen, L, Iversen. S y Snyder. S) Plenum Pres, New York, USA. 3:191-252.
- 13.- Bradford, H. (1969). Respiration in vitro of synaptosomes from mammalian cerebral cortex. J. of Neurochemistry 16:675-684.
- 14.- Bradley, P.B., Engel, G., Feniuk, W., y col (1986). Proposals for the classification and nomenclature of functional receptors for 5-hydroxytryptamine. Neuropharmacology. 25:563-576
- 15.- Bradley, P. B. (1987). 5-HT₃ receptors in the brain. Nature. 330:24-31.
- 16.- Brian, E. L (1988). Pharmacological effects of serotonin reuptake inhibitors. J. Clin. Psychiatry 49:12-17
- 17.- Bullock, T., Orkand, R., y Grinell, A. (1977). Introduction to nervous system. W.H. Freeman, San Fco USA. 9-96.
- 18.- Changeous, J. P. y Bennedetti, L. (1983). Some structural properties of the cholinergic receptor protein in its membrane environment relevant to its function as a pharmacological receptor. Cold Spring Symp Quant Biol. 40:211-230
- 19.- Cooper, J.R., Bloom F. E. y Roht, R.H. (1991). The Biochemical Basis of Neuropharmacology. Oxford University Press. New York, USA. pp 454
- 20.- Creese, I. (1982). Dopamine Receptors Explained. Trends Neurosci. 5:40-43.
- 21.- De Vivo, M., y Maayani, S. (1986). Characterization of the 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor-mediated inhibition of forskolin-stimulated adenylate cyclase activity in guinea pig and rat hippocampal membranes. J. Pharmacol Exp. Ther. 238:248-253
- 22.- Dompert, W.U., Glaser, T. y Trabel, J. (1985). ³H-TVXQ 7821: Identification of 5-HT₁ Binding sites as target for a novel putative anxiolytic. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 328(35):467-470.
- 23.- Doyle, V.M., Creba, J.A., Ruegg, U.T., Hoyer, D. (1986). Serotonin increases the production of inositol phosphates and mobilizes calcium via the 5-HT₂ receptor in A 7rs smooth muscle cells. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 333:98-103
- 24.- Drapeau, P. y Blaustein, M.P. (1983). Initial release of ³H- Dopamine from rat striatal synaptosomes: correlation with calcium entry. J. Neurosci. 3:703-713.

- 25.- Drescher, K. y Hetey, L. (1988). Influence of Antipsychotics and serotonin antagonists on presynaptic receptors modulating the release of serotonin in synaptosomes of the nucleus accumbens of rats. *Neuropharmacology*. 27(1):31-36
- 26.- Dumuis, A., Bouhelal, R., Sebben, M., Cory, R., y Bockaert, J. (1988). A nonclassical 5-Hydroxytryptamine receptor positively coupled with adenylyl cyclase in the central nervous system. *Mol. Pharmacol.* 34:880-87.
- 27.- Dunkley, P.R., Rostas, J.A.P., Heath, J.W. y Powls, D.A. (1987). The preparation and use of synaptosomes for studying secretion of catecholamines. En: *In vitro methods for studying secretion*. (eds, Poisner y Trifaro). Elsevier Science Publishers 315-334.
- 28.- Enna, S. J. y Snyder, S.H. (1976). A simple sensitive radio receptor assay for endogenous GABA in brain tissue. *J. Neurochem.* 270:221-224
- 29.- Erspamer, V (1966). Occurrence of indolealkylamines in Nature *Hand. Exp. Pharmacol.* XIX Springer-Verlag, New York, USA.
- 30.- Erspamer, V., y Aseron, R. (1952). Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature* 169:800-801
- 31.- Fags, G.F. y Lane, J.O. (1979). The uptake and release of putative aminoacid neurotransmitter. *Neurosci.* 21:1015-1036
- 32.- Flórez, J. y Armijo, J.A. (1974). Effect of central inhibition of the l-aminoacid decarboxylase on the hypotensive action of 5-HT precursors in the cat. *Eur. J. Pharmacol.* 26:108-110.
- 33.- Foster, A. C., y Roberts, P. J. (1980). Endogenous aminoacid release from rat cerebellum in vitro. *J. Neurochem.* 35:517-519
- 34.- Fonnum, F., Malte-Sorensen, D., Kviale, I., Soreide, A., Skrede, K., y Walas, I., (1981). Glutamergic neurons: Localization and release of the transmitter en: *Regulatory mechanisms of synaptic transmission* (eds. Tapia, R. y Cotman, C.) Plenum Press New York, USA. 59-70
- 35.- Fröhlich, E. D.: (1979). Review of the who expert committee report on arterial hypertension. *Hypertension* 1:547-548.
- 36.- Fuxe, K., y Jonsson, G. (1974). Further mapping of central 5-hydroxytryptamine nerves: Studies with the neurotoxic dihydroxytryptamines. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 10:1-12.
- 37.- Gaddum, J.H. y Picarelli, S.P. (1957). Two kinds of tryptamine receptor *Brit. J. Pharmacol.* 12:323-328

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 38.- Garattini, S. y Valzelli, L. (1965). Serotonin. Elsevier, Amsterdam.
- 39.- Gardner, A.R. (1981). Posibles roles of vertebrate neuroglia in potassium dynamics, spreading depression and migraine. J. Exp. Biol. 95:111-127
- 40.- Glaser, T., Domper, W.V., Schuurman, D.G., Spencer Jr, y Traber, J., (1987). Differential pharmacology of the novel 5-HT_{1A} receptor ligands 8-OH-DPAT, BAY R 1531 and ipsapirone En: Brain 5-HT_{1A} receptors (Dourish C.T., Ahlenius, S. y Hutson Plt eds) Ellis Horwood, England pp 106-119.
- 41.- Glaser, T., y Traber, J., (1985). Binding of a putative anxiolytic TVXQ 7821 to hippocampal 5-hydroxytryptamine (5-HT). Recognition sites. Naunym-Schmied Arch Pharmacol 329:211-215.
- 42.- Goodwin, F.K. (1975). Studies of amino metabolites in affective illness and in schizophrenia: a comparative analysis. Res. Publ. Assoc. Rev. Nerv. Ment. Dis 54:299-332
- 43.- Gorgnia, K. (1975). Effect of repeated 5-hydroxytryptamine injection on temperature regulation in the rat. Acta. Biol. Med. Ger. 34(1):53-65.
- 44.- Göther, M. y Schlicker, E. (1987). Classification of serotonin receptors. J. Cardiovasc. Pharmacol. 10:S3-S7.
- 45.- Gray, F. y Whittaker, V. (1962). The isolation of nerve endings from brain: An electron microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. J. Anat 96:79-87
- 46.- Greene, A.A., Grahame-Smith, D.G. (1975). Serotonin Hand. Psychopharmacology vol 3. Plenum Press, New York USA.
- 47.- Guchhait, R.B. (1976). Biogenesis of 5-methoxy-N, N-dimethyltryptamine in the human pineal gland. J. Neurochem. 26:187-190.
- 48.- Hamlin, K.E. y Fischer, F.E. (1951). The synthesis of 5-hydroxytryptamine J. Am. Chem. Soc. 73:5007-5008.
- 49.- Hamberger, A. y Nystrom. (1970). Amino acid transport phenomena in the nervous system. Levi, G., Battistin, L., y Lajtha, A. Plenum Pub. Co. New York, USA 221-236.
- 50.- Hartig, P.R. (1989). Molecular biology of 5-HT receptors. Trends Pharmacol Sci 10:64-69
- 51.- Heuring, R.E., Peroutka, S.J. (1987). Characterization of ³H-5-HT binding in bovine caudate. J. Neurosci. 7:894-903

- 52.- Hong, E., Nava-Felix, P., y Vidrio, H. (1978). On the central antihypertensive effects of a new tryptamine derivatives. *Pharmacologist* 20:188.
- 53.- Hong, E., y Ri6n, R. (1979). Blockade of α_2 receptors an explanation for the limited blockade of responses to sympathetic stimulation by some α -adrenergic antagonist En: Presynaptic receptors. Eds. S. Z. Langer, K. Starke y M. L. Dubocovich, Pergamon Press, 67-71.
- 54.- Hong, E. (1982). Characterization of the antihypertensive effect of indorenate in renal hypertensive dogs. Proceedings of the ninth scientific meeting of the international society of hypertension. M6xico, D.F.
- 55.- Hong, E., Ri6n, R. y Vidrio, H. (1983). Stimulation of central serotonin receptors as a novel mechanism of antihypertensive activity. En: Vascular neuroeffector mechanisms: 4th International Symposium eds., J.A. Bevan, R. A. Maxwell. M., Fujiwara, S. Shibata, N. Toda. y Mohri, Raven Press, New York USA. 133-187
- 56.- Hong, E., Ri6n, R., Aceves, J., Benitez-King, G., y Ant6n-Tay, F., (1987). Further evidence for a central antihypertensive effect of indorenate. *Proc. West. Pharmacol Soc.* 30:1-3.
- 57.- Hoyer, D. (1988). Functional correlates of serotonin 5-HT₁ recognition sites *J. Recept. Res* 8:59-81
- 58.- Hoyer, D., Engel, G., Kalkman, H.O. (1985). Characterization of the 5-HT_{1B} recognition site in rat brain: Binding studies with (-) [¹²⁵I] iodocyanopindolol. *Eur J. Pharmacol* 118:1-12
- 59.- Hoyer, I. y Van Zwieten, P.A. (1971). The centrally induced fall in blood pressure after the infusion of amphetamine and related drugs into the vertebrate artery of the cat. *J. Pharm. Pharmacol.* 23:892-893.
- 60.- Hubbard, J.J. (1961). The effect of calcium and magnesium on the transmitter from mammalian motor endings, *J. Physiol*, 159:507-517
- 61.- Hubel, D.H. (1981). El cerebro En: Libros de Investigaci6n y ciencia., Editorial Labor, Barcelona. 11-21.
- 62.- Iversen, L.L. (1981). Quimica del cerebro En: Libros de Investigaci6n y ciencia, Editorial Labor, Barcelona Espa6a. 85-96.
- 63.- Jacobs, B.L. y Gelperin, A. (1981). Serotonin Neurotransmission and Behaviour. Cambridge, Mass: MIT Press.
- 64.- Janeway, T.C., Richardson, H. B., Park, A. (1918). Experiments on the vasoconstrictor action of blood serum. *Arch. Int. Med.* 21:565-603.

- 65.- Jouvett, M. (1968). Insomnia and decrease of cerebral 5- hydroxitryptamine after destruction on the raphe system in the cat. *Adv. Pharmacol.* 6B:265-279.
- 66.- Kandel, E.R., Schwartz, J.H y Jessell, T.M. (1991). Principles of neural science third edition Elsevier Science Publishing Co., Inc. New York, USA.
- 67.- Knott, P.J., Curzon, G. (1972). Free tryptophan in plasma an brain tryptophan metabolism. *Nature.* 239:452-453.
- 68.- Kuhn, D.M. (1980). Review of the role of the central serotonergic neuronal system in blood pressure regulation. *Hypertension* 2:243-255.
- 69.- Levy, W.R. Haycock, J.M. y Cotman, C. W. (1974). Effect of polyvalent cations on stimulous coupled secretion of ¹⁴C- aminobutiric acid from isolated brain synaptosomes., *Molec. Pharm.* 10:438-449
- 70.- Leysen, J.E., Niemegeers, C.J.E., Tolenaere, J.P., Laduro, P.M. (1978). Serotonergic component of neuroleptic receptors. *Nature* 272:163-166.
- 71.- Lopéz-Colome, A.M., Tapia, R., R. Salceda y Pasantez, M. (1978). K⁺-Stimulated release of labeled Gaba, Glicine and Taurine in slices of several regions of rat central nervous system. *Neurosci.* 3:1069-1074
- 72.- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr. A. L., y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193:263-275.
- 73.- McGraw, C.F., Nachshen, D. A. y Blaustein, M.P. (1981). Calcium movement and regulation in presynaptic nerve terminals. In: Calcium and cell function. W.y Cheung, ed Academic Press. Inc. New York, USA. 2:81-110
- 74.- Middlemiss, D.N. y Fozard, J.R. (1983). 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin discriminates between subtypes of the 5-HT₁ recognition site. *Eur. J. Pharmac.* 90:151-153.
- 75.- Nachshem, D.A (1985). Regulation of cytosolic calcium concentration in presynaptic nerve endings isolated from rat brain. *J. Physiol.* 365:87-101
- 76.- Nachshem, D.A. y Drapeau, P. (1988). The regulation of cytosolic pH in isolated presynaptic nerve terminals from rat brain. *J. Gen. Physiol.* 91:289-303

- 77.- Nava-Félix, P. y Hong, E. (1979). Nature of the central serotonin receptors mediating hypotension J. Cardiovasc. Pharmacol 1:461-466.
- 78.- Orly, J. Scham, J. (1976). Coupling of catecholamine receptor from one cell with adenilate cyclase from another cell fussion. Proc. Nat. Acad. Sci. 73:4410-4471.
- 79.- Pazos, A. Engel, G. Palacios, J.M. (1985). Beta-adrenoceptor blocking agents recognize a subpopulation of serotonin receptors in brain. Brain Res 343:403-408.
- 80.- Peroutka, S.J. (1988). 5-hydroxytryptamine receptor subtypes. Ann Rev. Neurosci. 11:45-60.
- 81.- Peroutka, S. J y Snyder, S.H. (1979). Multiple serotonin receptors: diferencial binding of [³H] Spiroperidol. Mol. Pharmacol. 16:687-699.
- 82.- Perdigo, N.W., Yamamura, H.I., y Nelson, D.L. (1981). Discrimination of multiple [³H] 5-hydroxytryptamine binding sites by the neuroleptic spiperone in rat brain. J. Neurochem 36:220-226
- 83.- Pickett, J. (1975). The pharmacodynamics of 5-hydroxytryptamine uptake and metabolism of isolated perfused rabbit lung. J. Pharmacol. Exp. Ther. 194(3):545-553.
- 84.-Rapport, M.M., Green, A.A., y Page, I. H. (1948). Serum vasoconstrictor (serotonin) J. Biol. Chem. 176:1243-1251.
- 85.- Rapport, M.M., (1949). Serum vasoconstrictor (Serotonin).J. Biol. Chem. 180:961-969.
- 86.- Redburn. D. A y Cotman. C. W., (1974). Calcium-dependent release of ¹⁴C-GABA from vinblastine and colchicine treated synaptosomes Brain Res.
- 87.- Reichle, F.A., Goodman, P.M., Prince Brigham, M., Reichle, R. M., Labinsky, L. y Rosemond, G.P. (1970). Intestinal serotonin content following gastric resection or pyloroplasty with vagotomy. Arch. Surg. 101:205-210.
- 88.- Resnick, R. A., y Greg, S. J. (1961). Distribution of 5-hydroxytryptamine in the human gastrointestinal tract. Gastroenterol. 41:119-125.
- 89.- Richards, C.D. y McIlwain, H. (1967). Electrical response in brain slices. Nature 215:704-707
- 90.- Safdy, M.E., Kurchacova, E. , Schut, R.N., Vidrio, H. y Hong, E. (1982). Tryptophan analogues. 1. Synthesis and antihypertensive activity of positional isomers. J. Med. Chem. 25:723-730

- 91.- Salcia, E., Sampietro, R. (1967). Indole nature of entero chromaffin cells. *Nature*. 214:196-197
- 92.- Schnellman, R. G., Water, S.J., y Nelson, D. L. (1984). 5-hydroxytryptamine binding sites: species and tissue variation *J. Neurochem* 42:65-70.
- 93.- Schoeffter, P., y Hoyer, d. (1989) Who selective is GR 43175? interaction with functional 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1C} and 5-HT_{1D} receptors. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 340:135-138.
- 94.- Schoeffter, P., Waeber, C., Palacios, J. M., Hoyer, D. (1988). The 5-hydroxytryptamine 5-HT_{1A} receptor subtype is negatively coupled to adenylate cyclase in calf substantia nigra. *Naunyn-Schmiederbergs Arch. Pharmacol.* 337:602-608
- 95.- Sicuteri, F., Anselmi, B., DelBianco, P. L. (1973). 5-hidroxytryptamine supersensitivity as a new theory of headache and central pain. *Psychopharmacol (Berl)*. 29:347-356.
- 96.- Sills, M.A., Wolfe, B.B., y Fraser, A. (1984). Determination of selective and nonselective compounds for the 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptor subtypes in rat front cortex, *J.Pharmacol Exp. ther.* 231, 480.
- 97.- Slotkin, T. A (1978). Rat brain synaptic vesicles; uptake specificities of ³H-Norepinefrine and ³H-Serotonine in preparations from whole brain and brain regions. *J Neurochem.* 31:961-968.
- 98.- Stevens, Ch. F. (1981). La neurona En: *Libros de investigación y ciencia*. Editorial Labor, Barcelona, España. 11-21 25-36.
- 99.- Veterans administration cooperative study groups on antihypertensive agents: Effect of treatment on morbidity in hypertension. II. Results in patients with diastolic blood pressure averaging 90 through 114 mm Hg. *J.A.M.A.* 213:1143-1152 (1970).
- 100.- Veterans administration cooperative study group on antihypertensive agents: Effect of treatment on morbidity in hypertension. Result in patients with diastolic blood pressures averaging 115 Through 129 mm Hg *J.A.M.A.* 202:116-122. (1967).