



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Iztacala
Carrera de Biología

**“Efecto sobre la presión arterial de un derivado de
Dioxoisindolina en un modelo de rata descerebrada y
desmedulada y su posible interacción con la enzima
convertidora de angiotensina (ECA)”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO**

P R E S E N T A

MARCO ANTONIO BAUTISTA GONZÁLEZ

DIRECTORA DE TESIS

DRA. JESSICA EDITH RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México, 2020



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.

Este trabajo de tesis se realizó en el laboratorio 7 de la Unidad de Biomedicina de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala- UNAM, a cargo del Dr. Rafael Villalobos Molina.

A mis padres, que me han dado todo y más, para poder estar aquí, ser incondicionales en las buenas y malas decisiones que he tomado, y el apoyo en los tropiezos.

A mis amigos Roy, Frida, Lalo, Leo y algunos otros, que fueron un importante apoyo durante toda carrera, y por ese gran número de anécdotas que han pasado en estos años.

AGRADECIMIENTOS

Dra. Jessica Rodríguez, no sabría como agradecerle todo lo que ha hecho por mí durante todo este tiempo que me permitió trabajar con usted, el apoyo y paciencia en los proyectos, aun cuando fui necio; por ayudarme a corregir los errores que cometía, por compartir su conocimiento, y motivarme a dar el siguiente paso, espero ser el primero de muchos alumnos que tengan el gusto y el honor de tenerla como tutora.

Dr. Rafael Villalobos, gracia por permitirme trabajar durante esta, un poco larga estancia, en su laboratorio, el apoyo, enseñanza y paciencia en los proyectos.

Dra. Itzell Gallardo, por las múltiples enseñanzas, conocimientos y anécdotas que ha compartido.

Dr. Rafael Jiménez, le agradezco el apoyo en los proyectos de investigación, aun cuando no resultaron como se esperaba.

Dr. Erick Andrade, te agradezco ya que gran parte de este proyecto no se hubiera podido realizar sin tu ayuda.

Agradezco el financiamiento otorgado por DGAPA-PAPIIT- IN223519 (RVM) y PAPIIT- IN226819 (IAGO) utilizado para la elaboración de este proyecto.

Contenido

ÍNDICE DE TABLAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ABREVIATURAS	9
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1. MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA PA	12
1.1.1. LIBERACIÓN DE SUSTANCIAS DEL ENDOTELIO VASCULAR.....	12
1.1.2. REGULACIÓN NEUROHUMORAL	15
1.2. HIPERTENSIÓN ARTERIAL (HA).....	19
1.3. FARMACOTERAPIA DE LA HA.....	21
1.3.1. DIURÉTICOS.....	22
1.3.2. BLOQUEADORES DE CANALES DE CA ²⁺	22
1.3.3. ANTAGONISTAS AT ₁ R.....	23
1.3.4. B-BLOQUEADORES	25
1.3.5. INHIBIDORES DE ECA.....	25
1.4. 2-(2-(3,4-DIMETOXIFENIL)ETIL) ISOINDOLINA-1,3-DIONA.....	30
2. ANTECEDENTES	31
3. JUSTIFICACIÓN	32
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
5. OBJETIVOS	33
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	33
5.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	33
6. HIPÓTESIS	33
7. MATERIALES Y MÉTODOS	34
7.1. ANIMALES.....	34
7.2. CURVAS DOSIS-RESPUESTA (ENSAYO <i>IN VIVO</i>)	34
7.3. ACOPLAMIENTO MOLECULAR <i>DOCKING</i> (ENSAYO <i>IN SILICO</i>).....	36
7.4. CINÉTICA ENZIMÁTICA (ENSAYO <i>IN VITRO</i>)	37
8. RESULTADOS	38
8.1. ANÁLISIS DEL ENSAYO <i>IN VIVO</i>	38

8.2.	ANÁLISIS DEL ENSAYO <i>IN SILICO</i>	41
8.3.	ANÁLISIS DE LOS DATOS <i>IN VITRO</i>	44
9.	DISCUSIÓN	46
10.	CONCLUSIONES	49
11.	REFERENCIAS	50

Índice de tablas

Tabla 1. Factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares en pacientes con HA	20
Tabla 2. Valores de PAS y PAD para el diagnóstico de HA.....	21
Tabla 3. Energía libre de Gibbs (ΔG), constante de disociación (K_d) y pK_a de la interacción entre el Dx-FEA con la ECA.....	41
Tabla 4. Residuos de aminoácidos involucrados en la interacción de ECA con Dx-FEA y captopril.....	41
Tabla 5. Clasificación y distancias de las interacciones de Dx-FEA con los residuos de aminoácidos.....	42

Índice de Figuras

Figura 1. Secuencia de eventos de la contracción muscular.....	14
Figura 2. Regulación de la contracción por la estimulación de los β -AR en el cardiomiocito	17
Figura 3. Esquema del Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona	18
Figura 4. Estructuras de algunos fármacos utilizados como diuréticos	22
Figura 5. Estructura de fármacos utilizados como bloqueadores de los canales de calcio..	23
Figura 6. Estructuras de los ARAs más utilizados	24
Figura 7. Propranolol, fármaco utilizado como β -bloqueador, en el tratamiento de la HA	25
Figura 8. Estructuras de algunos IECA	26
Figura 9. Esquemización del mecanismo de acción de los IECA	27
Figura 10. Hidrólisis de Ang I por la acción de la ECA, para formar Angio II.....	28
Figura 11. Estructura de la Bradicinina	28
Figura 12. Estructura tridimensional de la enzima convertidora de Angiotensina (ECA)..	29
Figura 13. Mecanismo de reacción para obtener la Dioxoisindolina de Feniletilamina (Dx- FEA).....	30
Figura 14. Modelo de la rata descerebrada y desmedulada.....	35
Figura 15. Curva dosis respuesta de Dx-FEA.....	39
Figura 16. Representación gráfica del cálculo de la DE_{50} DxFEA.....	40
Figura 17. Docking	43
Figura 19. Cinética enzimática de la inhibición de la actividad de ECA con Captopril.	44
Figura 20. Gráfica que muestra el porcentaje de actividad de ECA en presencia de Dx-FEA en la cinética enzimática.	45

Abreviaturas

PA	Presión Arterial	CSQ	Proteína Calsequestrina
PAS	Presión Arterial Sistólica	NCX	Intercambiador de Na ⁺ /Ca ²⁺
PAD	Presión Arterial Diastólica	SERCA2a	ATPasa tipo 2 de Ca ²⁺ del RE
HA	Hipertensión Arterial	ET-1	Endotelina
	Sistema Renina-Angiotensina-		
SRAA	Aldosterona	SNS	Sistema Nervioso Simpático
DX-FEA	Dioxoisindolina Feniletilamina	SNP	Sistema Nervioso Parasimpático
NA	Noradrenalina	AC	Adenilato-ciclasa
	Enzima Convertidora de		
ECA	Angiotensina	PKA	Proteína Cinasa
MLV	Músculo Liso Vascular	Ang I	Angiotensina I
ON	Óxido Nítrico	Ang II	Angiotensina II
			Receptor de Angiotensina II tipo
GC	Guanilato Ciclasa	AT ₁ R	1
			Receptor de Angiotensina II tipo
PKG	Proteína Cinasa G	AT ₂ R	2
			Antagonista de receptores de
RE	Retículo Endoplásmico	ARAs	angiotensina II
			Inhibidores de la Enzima
TnC	Troponina C	IECA	Convertidora de Angiotensina
CaM	Cadmodulina	BK	Bradicinina
PKC	Proteína Cinasa C	HHL	Hipuiril-histidil-leucina
RyR	Receptor de Rianodina	DMSO	Dimetilsulfóxido
PLN	Fosfolambano	AcP	Ácido pocrilsulfónico
PGI ₂	Prostaciclina		

Resumen

La presión arterial (PA) es el resultado del gasto cardiaco por la resistencia vascular periférica, la cual se determina mediante valores de la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD); al aumento constante de estos valores se le conoce como Hipertensión Arterial (HA). La HA puede originarse por el mal funcionamiento en los mecanismos de regulación de la PA, que combinado con factores ambientales y el estilo de vida, pueden generar enfermedades cardiovasculares.

Se ha reportado que las moléculas derivadas de Dioxoisindolinas tienen diversas propiedades farmacológicas; debido a su estructura, es probable que puedan tener efecto sobre alguno de los mecanismos de regulación de la PA, como el Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA). Por esta razón, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto *in vivo* de la Dioxoisindolina Feniletilamina (Dx-FEA) y su posible mecanismo de acción mediante estudios *in silico* e *in vitro*. Para alcanzar estos objetivos se llevó a cabo una curva dosis-respuesta a noradrenalina (NA) en un modelo de rata descerebrada y desmedulada; se realizó un estudio de acercamiento molecular del fármaco con la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y su actividad inhibitoria cinética enzimática.

Los resultados mostraron que el Dx-FEA disminuyó de manera dosis dependiente la vasoconstricción producida por NA en el modelo *in vivo*; el análisis *in silico* mostró que el compuesto tiene afinidad por el sitio activo de la ECA; sin embargo, la prueba *in vitro* reveló que no hay inhibición de la actividad enzimática. Con estos resultados se concluyó que el compuesto Dx-FEA aunque si tiene un efecto sobre la PA, es probable que su mecanismo de acción no sea mediante la inhibición de la ECA.

ABSTRACT

Blood pressure (BP) is the result of cardiac output and peripheral vascular resistance, which is determined by systolic (SBP) and diastolic (DBP) blood pressure values; the sustained increase in these values is known as Hypertension (HA).

HA can be caused by the impairment in the mechanisms that regulate BP, which combined with environmental factors and lifestyle, can lead to cardiovascular disease.

Because of their structure, it has been reported that molecules derived from Dioxoisindolines have several pharmacological properties, among them, they are likely to have an effect on the mechanisms of BP regulation, such as the Renin-Angiotensin-Aldosterone System (RAAS).

For this reason, the aim of this work was to evaluate the *in vivo* effect of Dioxoisindoline Phenylethylamine (Dx-FEA) and its possible mechanism of action through *in silico* and *in vitro* studies. To achieve these objectives, a dose-response curve for noradrenaline (NA) in a pithed rat model; and a study of the molecular approach of the drug with the angiotensin-converting enzyme (ACE) and its inhibitory activity by enzyme kinetics were developed.

The results showed that Dx-FEA decreased the response to NA in a dose-dependent fashion; the *in silico* analysis showed that Dx-FEA has affinity for the active site of ACE; however, the *in vitro* assay revealed that Dx-FEA did not produce inhibition of enzyme activity. With these results, it was concluded that although Dx-FEA influences BP, probably its mechanism of action is not by ACE inhibition.

1. Introducción

La PA es una medición del estado cardiovascular, esta es el resultado de la contracción ventricular, el volumen de sangre que eyecta el ventrículo y la resistencia vascular periférica. Cuando el ventrículo izquierdo eyecta sangre a la aorta, la presión aumenta a su valor máximo, este valor es el de la presión arterial sistólica (PAS); pero cuando el ventrículo izquierdo se relaja, la presión en la aorta disminuye a su valor más bajo, este es el valor de la presión arterial diastólica (PAD) (Morelli & Backer, 2017).

1.1. Mecanismos de regulación de la PA

En la regulación neurohumoral de la PA participan el sistema nervioso central y periférico, el corazón, el riñón y las sustancias vasoconstrictoras o vasodilatadoras derivadas del endotelio que actúan sobre el músculo liso vascular (MVL) (Touyz, 2014).

1.1.1. Liberación de sustancias del endotelio vascular

Las células del endotelio son efectoras del control del tono vascular, en los vasos sanguíneos se sintetiza óxido nítrico (ON), por la isoforma endotelial de la enzima sintasa de ON al transformar su sustrato, la L-arginina; el ON se difunde fácilmente de las células endoteliales hacia las células del músculo liso, en donde activa a la enzima guanilato ciclasa (GC), aumentando el GMP_c intracelular y activando a la proteína cinasa G (PKG), esto provoca vasodilatación por

disminución de la concentración de Ca^{2+} , es decir, inhibe a los canales de Ca^{2+} membranales y también la liberación de Ca^{2+} por el retículo endoplásmico (RE), así como la activación de los canales de K^+ (Godfraind, 1994).

El Ca^{2+} es un factor importante para el control de la PA, ya que la asociación y disociación de este ion con los miofilamentos activan la contracción y relajación del músculo liso. La Troponina C (TnC) es el principal objetivo del Ca^{2+} para activar la maquinaria contráctil; en el músculo, el Ca^{2+} activa a la calmodulina (CaM). La CaM es ubicua en todas las células, en donde el complejo Ca^{2+} -CaM regula proteínas involucradas en el transporte de Ca^{2+} , canales iónicos, contracción, metabolismo celular, proteínas cinasas, expresión de genes y proliferación celular. La proteína cinasa dependiente de Ca^{2+} (PKC) activa a la CaM pero también fosforila otras moléculas transportadoras de Ca^{2+} , como el receptor de rianodina (RyR) y fosfolambano (PLN) (Fig. 1); el endotelio también produce otras sustancias vasodilatadoras como la prostaciclina (PGI_2) que también aumenta el AMP_c de las células del MVL (Maier & Bers, 2002).

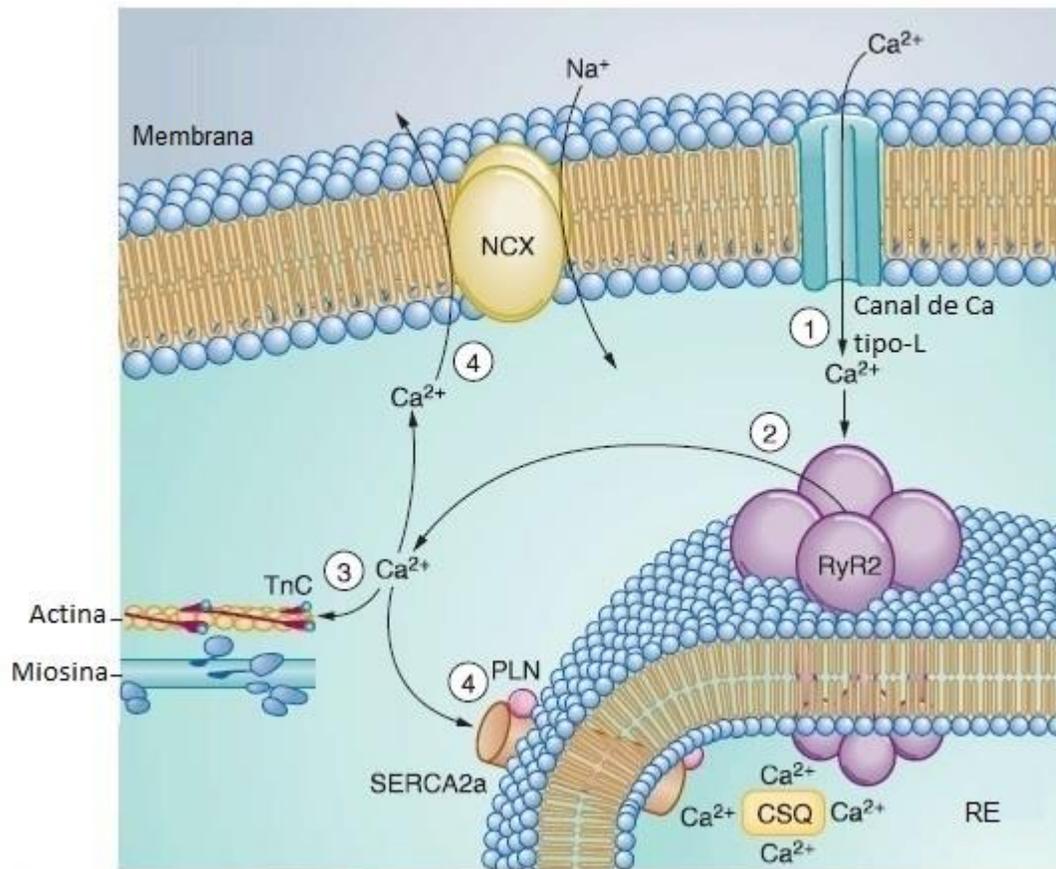


Figura 1. Secuencia de eventos de la contracción muscular. 1. La despolarización de la membrana permite la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} tipo-L. 2. El Ca^{2+} se une al receptor de rianodina (RyR) en el RE e induce la liberación de una gran cantidad de Ca^{2+} almacenado unido a la proteína calsecuestrina (CSQ). 3. Ya en el citoplasma, el Ca^{2+} liberado se une a la TnC , para producir la contracción. 4. El Ca^{2+} citoplasmático es expulsado de la célula por el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) o recuperado por la ATPasa tipo 2 de Ca^{2+} del RE (SERCA2a); su actividad es regulada por el fosfolambano. (Modificado de Assaad et al., 2019).

Por otra parte, entre los factores vasoconstrictores producidos por el endotelio, el más importante es la endotelina (ET-1) la cual activa dos receptores: ET_A y ET_B localizados en las células del MLV; la unión con estos receptores provoca un rápido aumento en la entrada y liberación de Ca²⁺ y estimulan a las fosfolipasas PLD y PLA₂, cambios en el metabolismo del ácido araquidónico. Se ha observado que existen interacciones cruzadas entre las vías vasoconstrictoras y vasodilatadoras, por ejemplo, la expresión de RNA_m de la ET-1 se modifica por incremento de factores vasodilatadores como ON o PGI₂ (Sears & Casadel, 2002).

1.1.2. Regulación Neurohumoral

En este mecanismo de regulación participa el sistema nervioso autónomo, el cual está dividido en Sistema Nervioso Simpático (SNS) y Sistema Nervioso Parasimpático (SNP); este sistema es coordinado por el hipotálamo y el sistema límbico, tiene particularidades autónomas en su vía eferente, es decir, la sinapsis pasa por el ganglio autonómico, compuesto por dos células neuronales: los axones de las neuronas preganglionares que se originan del cuerno lateral de la espina dorsal y los axones de las neuronas postganglionares que salen de los ganglios que cruzan con los efectores del músculo liso, glándulas sudoríparas, células de músculo cardiaco, células glandulares secretoras y células del sistema inmune. Este sistema trabaja en forma coordinada para regular funciones viscerales, respiratorias, cardiovasculares, digestivas y algunas funciones endócrinas (Catala & Kubis, 2013).

La regulación rápida de la PA se debe a un reflejo de los baroreceptores, inervados en las paredes de los vasos sanguíneos, estos receptores responden a los cambios de la PA. Las señales aferentes de los baroreceptores son transmitidas vía nervios vagos (Par Craneal X) y los nervios glosofaríngeos al núcleo del tracto solitario, parte de la médula oblonga y a los centros vasomotores. La inervación produce la liberación de noradrenalina (NA) que, por una parte estimula a los receptores β -adrenérgicos que predominan en el corazón y que están acoplados a proteínas Gs, las cuales activan a la adenilato-ciclasa (AC) y aumentan el AMP_c intracelular que estimula a la proteína cinasa A dependiente de AMP_c (PKA) y fosforila los canales K⁺, promueve la activación de los canales de Ca²⁺ tipo-L y por ende su liberación del RS; el Ca²⁺ se une a la TnC, generando la contracción de los cardiomiocitos (Fig.2); por otra parte, la NA activa a los receptores α_1 -adrenérgicos que se encuentran en los vasos sanguíneos y están acoplados a proteínas Gq; por lo que su estimulación promueve el aumento en la liberación de Ca²⁺ y la contracción del MLV (Ghosh & Pandit, 2019).

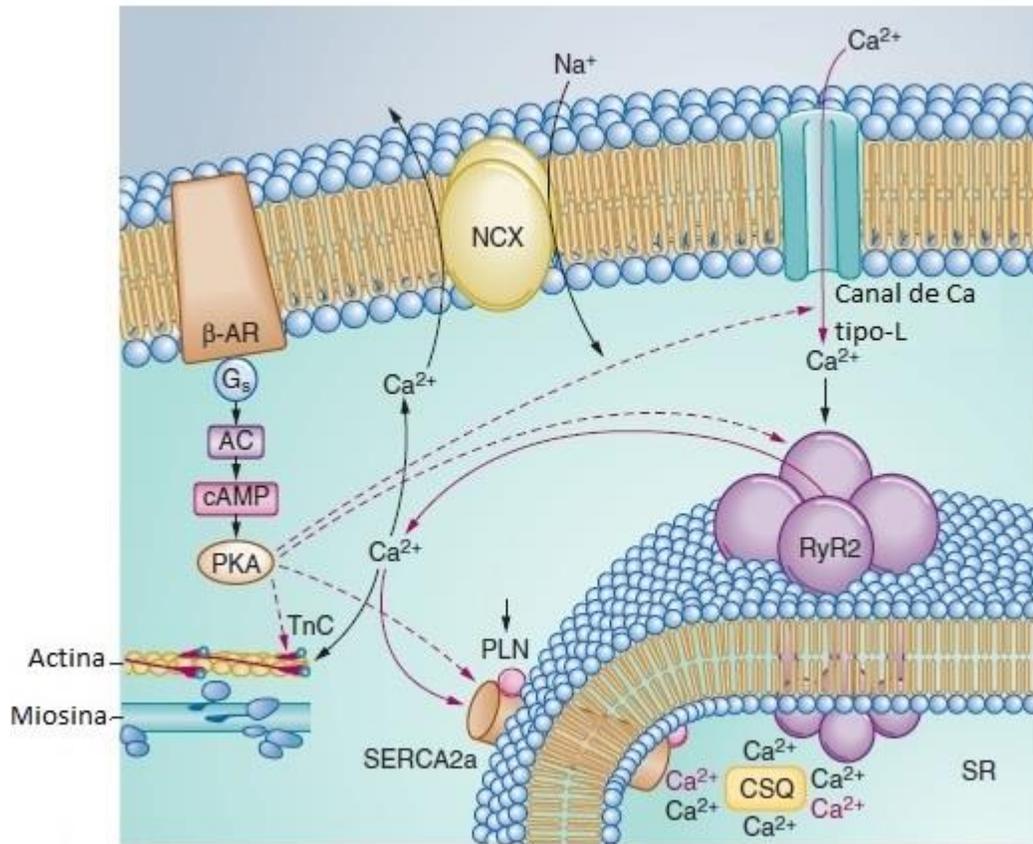


Figura 2. Regulación de la contracción por la estimulación de los β -AR en el cardiomiocito (flechas rojas discontinuas). La formación de AMP_c y la activación de la PKA permiten la fosforilación de los canales de Ca²⁺ tipo-L, RyR, proteínas contráctiles y SERCA2a, que incrementan la entrada de Ca²⁺, aumenta la liberación de Ca²⁺ del RS, alteran la afinidad de TnC por el Ca²⁺, y aumentan la recaptación en el RS por SERCA2a. (Modificado de Assaad et al., 2019).

Otro de los mecanismos en la regulación de la PA es el Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA) en donde participan los nervios renales relacionados con la actividad del SNS y otros sistemas vasculares (Osborn & Foss, 2017).

De manera sistémica, la vía del SRAA comienza en las células yuxtaglomerulares de la arteriola aferente renal, las cuales secretan renina, enzima de tipo aspartil-proteasa que hidroliza el angiotensinógeno formando angiotensina I (Ang I), sustrato de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y forma angiotensina II (Ang II). La Ang II es la principal molécula vasoactiva en la regulación de la PA. El incremento de la Ang II puede ser responsable de provocar el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, como hipertensión arterial e insuficiencia cardíaca. El efecto vasoconstrictor de Ang II es mediante la unión con el receptor de angiotensina tipo I, el cual es un receptor acoplado a proteínas G (Sayer & Bhat, 2014).

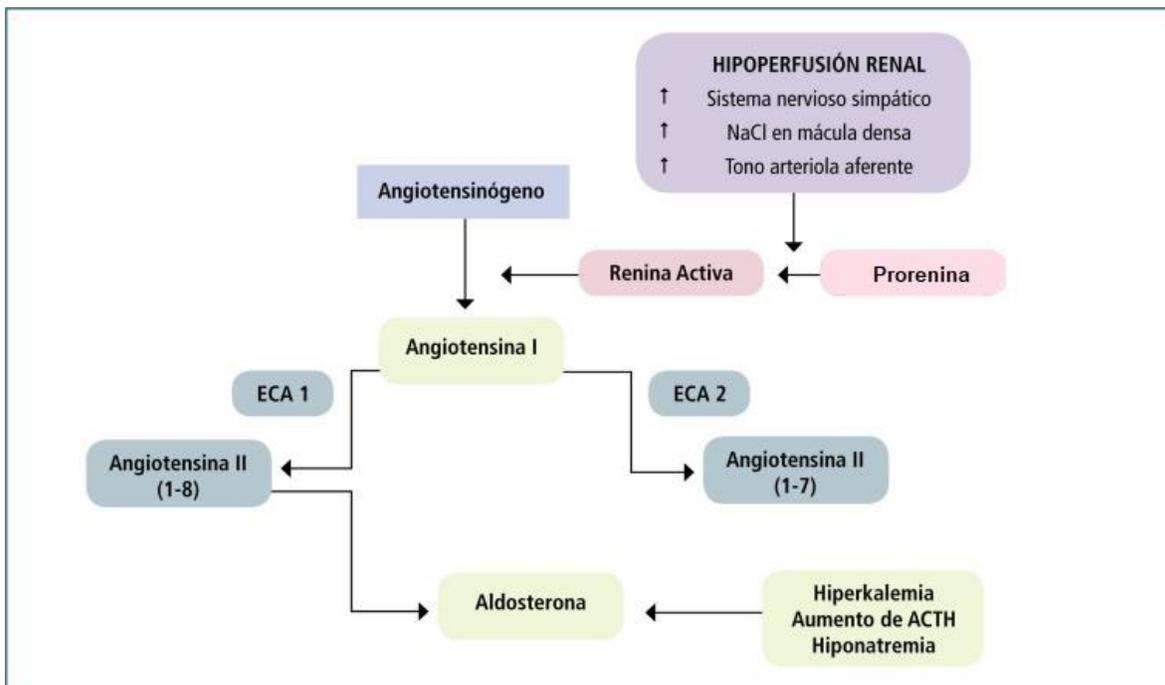


Figura 3. Esquema del Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona. (Tomado de Benavente et al., 2010).

El SRAA es dividido en una vía clásica y una no clásica. La primera vía comprende a la ECA, Ang II y al receptor de angiotensina II tipo 1 (AT₁R) y tipo 2 (AT₂R). La vía no clásica tiene varios componentes: Ang II/Ang III/Ang IV/AT₂R, y ECA2/Ang 1-7/alamandina/MasR/MrdG. La formación de Ang III mediante la acción de la aminopeptidasa A, que posteriormente forma Ang IV, puede interactuar con los receptores AT₄R y AT₂R, lo cual inhibe la actividad del receptor AT₁R. Ang 1-7 puede ser formada por la acción de ECA2, y actuar sobre el receptor Mas en el MLV. La Ang 1-7 en el sistema nervioso puede inhibir la liberación y síntesis de NA, a nivel vascular puede tener efecto vasodilatador contrarrestando el efecto de Ang II mediante la unión con MasR, AT₂R y MrdG (Natajara et al., 2019).

1.2. Hipertensión Arterial (HA)

La HA es una enfermedad crónica común en personas de todo el mundo, la cual trae consecuencias como daños cerebrovasculares, insuficiencia cardíaca y daños renales, entre otras (Tabla 1), por esta razón el estudio de la HA es de suma importancia para la salud pública, ya que su prevalencia en la población mundial es del 30-45%, cifra que incrementa con la edad (Kallikazaros, 2013). Se proyecta que para 2025, una tercera parte de la población adulta mundial padecerá HA; además, se estima que en economías desarrolladas el 25% de la población la presenta; donde la mitad de estos pacientes controlan su PA con algún tratamiento (Bhagani et al., 2018).

Tabla 1. Factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares en pacientes con HA.

Tomado de 2017 Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults del Journal of the America College (Whelton et al., 2018)

Factores de riesgo modificables	Factores de riesgo relativamente fijos
<ul style="list-style-type: none">• Fumador (Activo o pasivo)• Diabetes mellitus• Dislipidemia/hipercolesterolemia• Sobrepeso/obesidad• Inactividad física• Dieta no saludable	<ul style="list-style-type: none">• Enfermedad renal crónica• Herencia familiar• Aumento de edad• Bajo nivel socioeconómico/nivel educativo• Sexo masculino• Apnea obstructiva del sueño• Estrés psicosocial

Los síntomas asociados a la HA son cansancio, confusión, cambios en la visión, dolor de pecho, sangre en la orina, hemorragia nasal, arritmias y ruidos o zumbidos en los oídos, pueden tener como consecuencia insuficiencia cardiaca, sangre en la orina, hemorragia nasal, infartos, insuficiencia renal, ceguera y deterioro cognitivo (WHO, 2015).

De acuerdo con los datos del JACC los valores de PA para el diagnóstico de la HA se presentan en la tabla 2 (Wheton et al., 2018).

Tabla 2. Valores de PAS y PAD para el diagnóstico de HA.

Presión Sanguínea	Sistólica	Diastólica
Clasificación	mmHg	mmHg
Normal	<120	<80
Prehipertensión	120-139	80-89
Hipertensión Estado 1	140-159	90-99
Hipertensión Estado 2	≥160	≥100

La HA se puede clasificar en hipertensión arterial esencial o primaria y no esencial o secundaria. La HA primaria se cree que está relacionada con la suma de rasgos genéticos que generan cambios en la PA, lo cual se complementa con el ambiente y el estilo de vida, el consumo de medicamentos, drogas, alcohol, la obesidad y el sedentarismo. Mientras que la HA secundaria se atribuye a algún tipo de daño renal, vascular, endócrino y neural (Kapil & Lobo, 2014; Bhagani et al., 2018)

1.3. Farmacoterapia de la HA

Para la regulación y el control de la PA se han desarrollado fármacos con diferentes mecanismos de acción y efectos secundarios. Existen 5 tipos básicos de antihipertensivos: diuréticos, bloqueadores de los canales de Ca^{2+} , antagonistas de receptores de angiotensina, β bloqueadores e inhibidores de la ECA.

1.3.1. Diuréticos

Los diuréticos son fármacos que modifican el volumen de sangre al inhibir la reabsorción de Cl^- y Na^+ , reducen la reabsorción de agua aumentando la diuresis. Los medicamentos más utilizados en la HA son las Tiazidas en dosis bajas, estas tienen efectos secundarios como hiperglicemia y alteraciones hidroelectrolíticas (Charlton & Thompson, 2015).

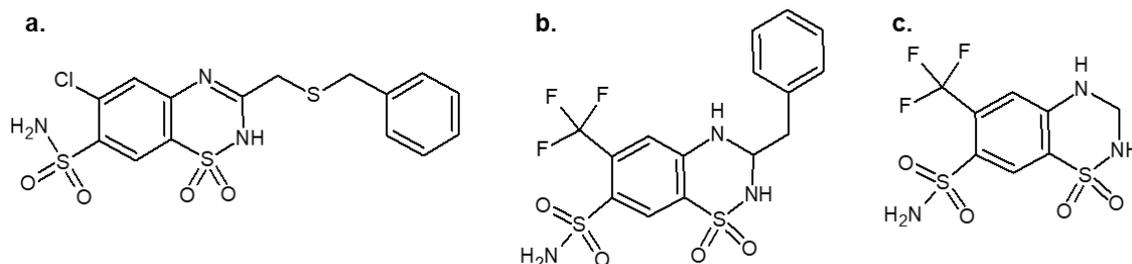


Figura 4. Estructuras de algunos fármacos utilizados como diuréticos. a. Benzotiazida b. Bendroflumetiazida c. Hidroflumetiazida.

1.3.2. Bloqueadores de canales de Ca^{2+}

Los bloqueadores de los canales de Ca^{2+} bloquean la entrada del ion por los canales de Ca^{2+} tipo-L. Tienen efecto inotrópico negativo en el miocardio, reducen la excitabilidad de las células nodales y producen la vasodilatación periférica. Existen diferentes tipos de bloqueadores de acuerdo con su estructura y su efecto, las fenilalquilaminas actúan sobre el tejido cardiaco, las dihidropiridinas tienen

efecto vasodilatador, las benzodiazepinas actúan sobre los vasos coronarios, los efectos secundarios de estos bloqueadores son taquicardia, dolor de cabeza, enrojecimiento y potencian el efecto de los bloqueadores neuromusculares (Al-Hashimi & Thompson, 2012).

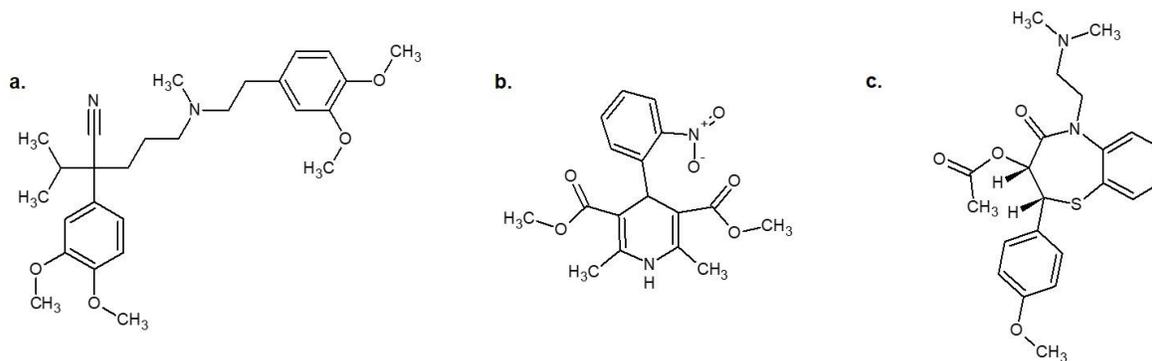


Figura 5. Estructura de fármacos utilizados como bloqueadores de los canales de calcio a. Verapamil (Fenilalquilamina), b. Nifedipina (Dihidropiridina) c. Diltiazem (Benzodiazepina).

1.3.3. Antagonistas AT₁R

Los antagonistas del AT₁R, también conocidos como antagonistas de receptores de angiotensina II (ARAs), son fármacos importantes en el tratamiento de la HA. Se utilizan también como nefro-protectores y en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca congestiva. Los ARAs tienen estructuras químicas variantes que se unen a diferentes sitios del receptor, estas estructuras variables también afectan la farmacocinética, la absorción e incluso el transporte a través de la barrera hematoencefálica. Los ARAs son altamente selectivos, pero se ha reportado que en

dosis altas pueden interactuar con los canales de K^+ , inhibir P-Glicoproteínas y transportadores de ácido úrico (Michel *et al.*, 2016). Los fármacos más utilizados clínicamente para disminuir la PA y reducir el riesgo de infarto son losartán, valsartán, candesartán, ibesartán, telmisartán y olmesartán (Ferrario & Mullick, 2017).

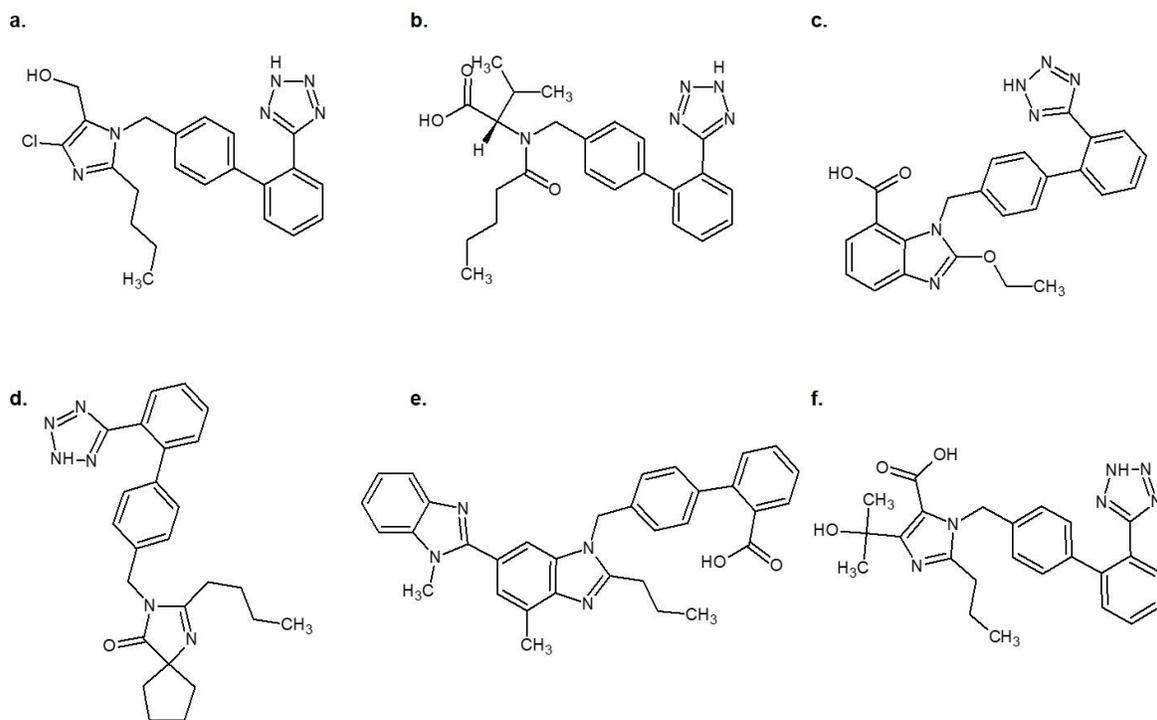


Figura 6. Estructuras de los ARAs más utilizados. a. losartán; b. valsartán; c. candesartán; d. ibesartán; e. telmisartán; f. olmesartán.

1.3.4. β -Bloqueadores

Los β -bloqueadores son usados para el tratamiento de padecimientos cardiacos, estos medicamentos reducen la PA, controlan las arritmias cardiacas y funcionan también como cardioprotectores después de un infarto. Como su nombre lo dice, los β -bloqueadores se unen a los β -AR, por lo que impiden la interacción con la NA y la adrenalina, que regulan la frecuencia y contracción cardiacas, por lo tanto, su inhibición disminuye la PA (Hackney, 2018).

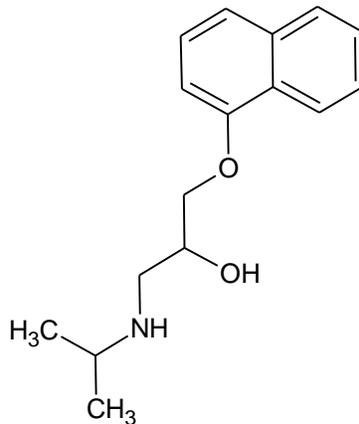


Figura 7. Propranolol, fármaco utilizado como β -bloqueador, en el tratamiento de la HA.

1.3.5. Inhibidores de ECA

Los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) son el pilar de la farmacoterapia para el tratamiento de la insuficiencia renal, insuficiencia cardiaca y HA, entre otras. El potencial de efectividad de los IECA está influenciado por la afinidad del fármaco para interactuar con el zinc (Zn^{2+}), que es uno de los principales componentes del sitio activo de la ECA. Los IECA se pueden clasificar

por su composición química en 3 tipos: los primeros tienen un sulfhidrilo que interacciona fuertemente con el Zn^{2+} , como el captopril; otro grupo tiene un carboxilo que también interacciona con el Zn^{2+} , y un último el grupo que tiene fósforo (Ferrario & Mullik, 2017).

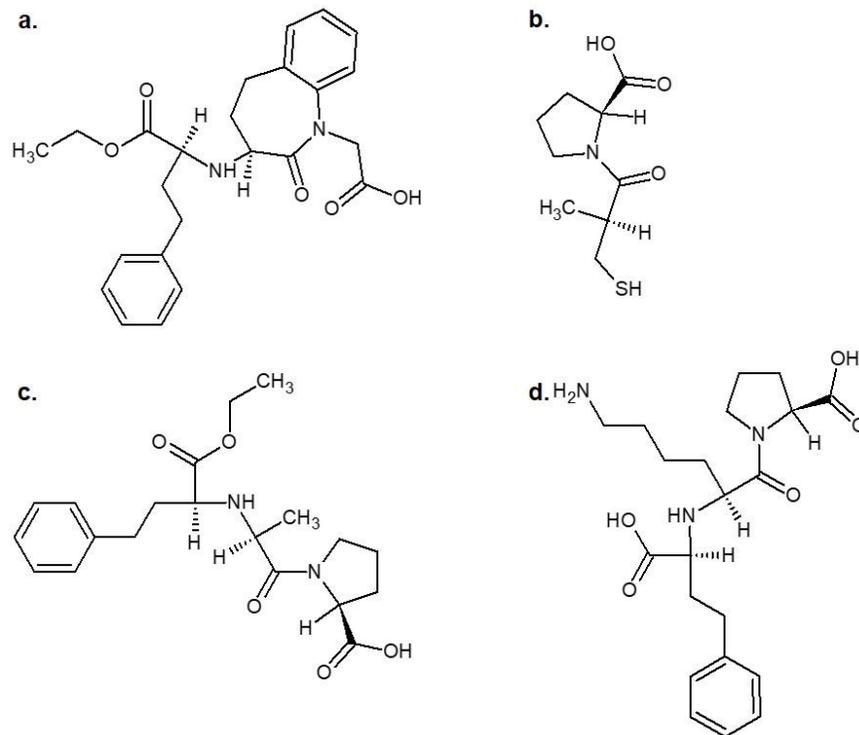


Figura 8. Estructuras de algunos IECA. a. Benazepril; b. Captopril; c. Enalapril; d. Lisinopril.

Captopril fue el primer IECA disponible desde 1981 para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares, el captopril inhibe la conversión de Ang I a Ang

II y evita la desactivación de la bradicinina (BK) por la inhibición de ECA (Fig. 9) (Messerli et al., 2018).

La ECA convierte la Ang I en Ang II hidrolizando el sitio de unión del dipeptido L-histidina y L-leucina con la L-fenilalanina en la cadena de 10 aminoácidos de la Ang I; la ECA también actúa sobre BK hidroliza en los sitios de unión de la fenilalanina en la cadena de 9 aminoácidos que la forman para desactivarlo (Fig. 10; Fig. 11) (De Mello, 2017; Kaplan & Ghebrehiwet, 2010).

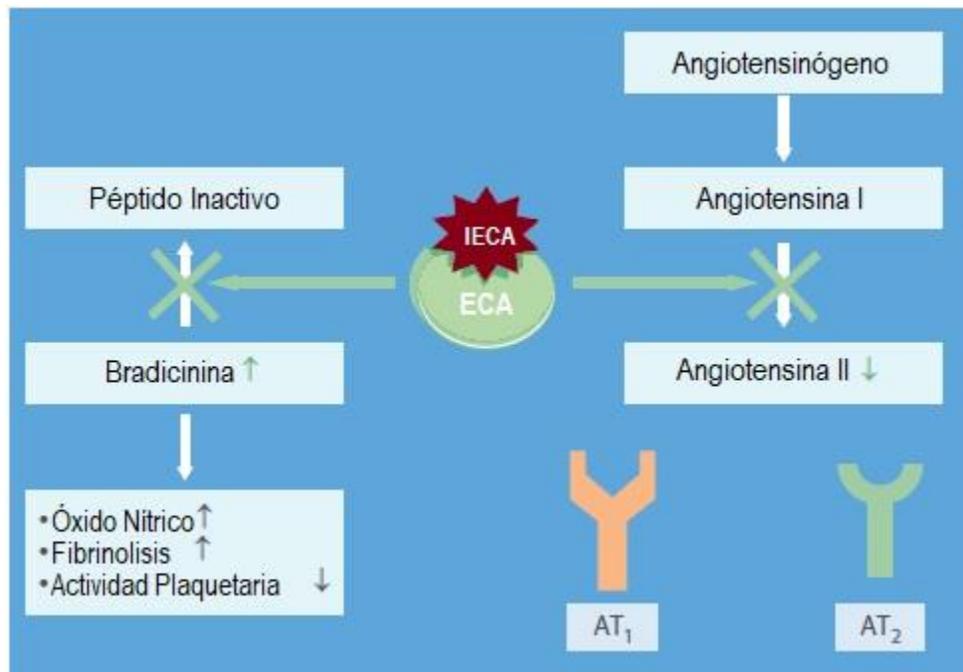


Figura 9. Esquematización del mecanismo de acción de los IECA. (Modificada de Messrli et al. 2018).

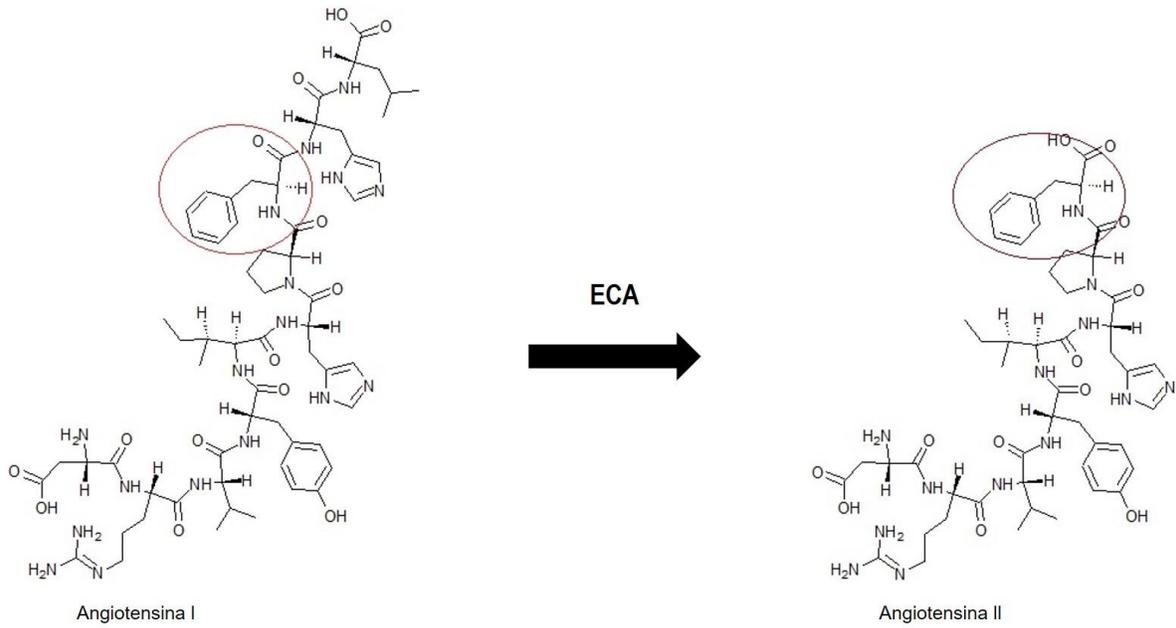


Figura 10. Hidrólisis de Ang I por la acción de la ECA, para formar Agio II.

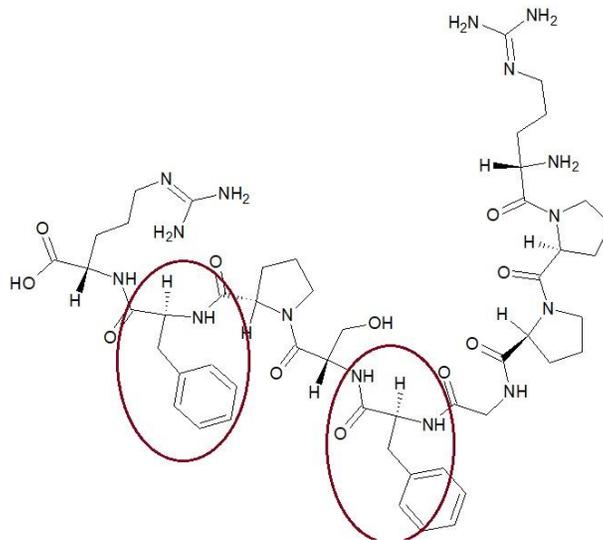


Figura 11. Estructura de la Bradicinin. Los círculos rojos marcan el aminoácido fenilalanina, que es el sitio de corte de la ECA.

Se ha propuesto un posible segundo sitio activo en la ECA, ya que su estructura está formada por dos subunidades (Dominios C y N en la ECA), razón por la cual, esta podría tener una selectividad de sustratos, de tal forma que se podría regular su actividad al inhibir alguno de ellos (Gohlke & Scholkens, 2004).

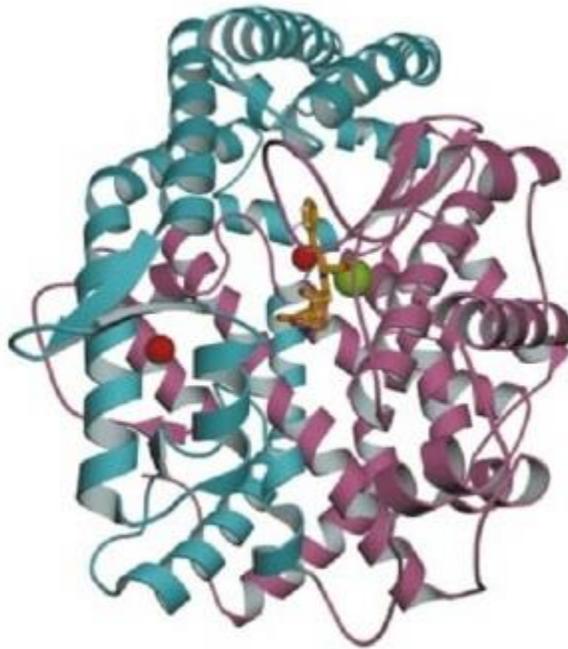


Figura 12. Estructura tridimensional de la enzima convertidora de Angiotensina (ECA). En color verde el ion Zinc (Zn²⁺). (Imagen tomada de Natesh et al., 2003).

1.4. 2-(2-(3,4-dimetoxifenil)etil) isoindolina-1,3-diona

La dioxoisoindolina (Isoindolina-1,3-diona) también llamadas ftalidomida es un farmacóforo al cual se le pueden agregar diferentes sustituyentes, mediante la unión en el grupo amino, dando a la molécula diversas propiedades farmacológicas; de tal suerte que el producto de la reacción de la ftalamida con la feniletilamina da como resultado la Dx-FEA (2-(2-(3,4-dimetoxifenil)etil) isoindolina-1,3-diona) (Fig. 11) (Andrade-Jorge *et al.*, 2017); es probable que este compuesto tenga actividad sobre la presión arterial a través de la inhibición de la ECA, ya que esta estructura es una constante en algunos IECA ya comerciales (Benazepril, enalapil lisinopril) e incluso en fármacos recientes como es el caso de N,N'-Bis(2Feniletil)ftalamida (Andrade-Jorge *et al.*, 2018a).

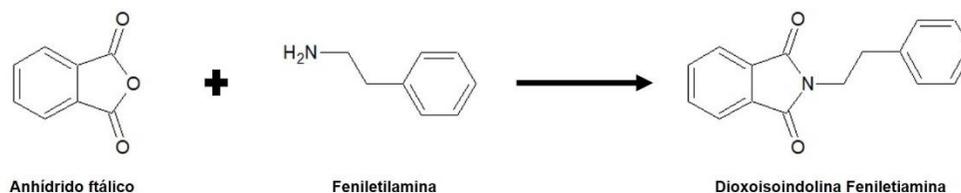


Figura 13. Mecanismo de reacción para obtener la Dioxoisoindolina de Feniletilamina (Dx-FEA).

2. Antecedentes

- Kim y colaboradores (2007), diseñaron y sintetizaron el compuesto 1,3-dioxoisindolina-5-carboxamida, derivado de un farmacóforo, dioxoisindolina, el cual tuvo potencial actividad biológica como bloqueador de los canales de Ca^{2+} , obteniendo un valor de IC_{50} de 0.93 y 0.96 μM en dos de ellos.
- Shakir y colaboradores (2012), desarrollaron dos compuestos de una serie de derivados de isoindolinas 1,3 diona, estas moléculas mostraron actividad analgésica y antiinflamatoria en ratas, a las cuales se les administró de forma oral.
- El-Azab y colaboradores (2016), utilizando carboxilatos y sulfonamidas incorporadas a un farmacóforo compuesto por ftalamida/ftalixanidrida, inhibieron las isoformas de la anhidrasa carbónica (hCA VII y XI y CA I, II, IV, VII y X, respectivamente) las cuales están relacionadas con diferentes patologías, como glaucoma, epilepsia y tumores sólidos.
- Andrade-Jorge y colaboradores (2018b), realizaron experimentos *in vitro* e *in vivo* con un derivado de Dioxoisindolinas 2(2(3,4dimetoxifenil)etil)isoindolina1,3diona, en donde se observó que es un inhibidor competitivo de la enzima acetilcolinesterasa, la cual está involucrada en padecimientos como el Alzheimer.

3. Justificación

La HA es uno de los factores principales para el riesgo cardiovascular, al ser un padecimiento común en la población. Existen diversos fármacos con actividad antihipertensiva dirigidos a diversos blancos terapéuticos, e incluso se recurre a las combinaciones entre ellos para obtener mayor beneficio en el tratamiento de la HA; sin embargo, a pesar de esto, la incidencia de este padecimiento sigue siendo alta, razón por la cual, la búsqueda de nuevos fármacos más efectivos y con menores efectos adversos sigue siendo de gran importancia.

4. Planteamiento del problema

Los fármacos actuales utilizados como IECA tienen diversos efectos secundarios y reducen los valores de PA de manera parcial; por lo que en la actualidad se utilizan mezclas de fármacos antihipertensivos para normalizar los valores de PA. Por esta razón, el diseño de nuevos fármacos debe dirigirse de tal forma que la síntesis de estos cree moléculas con mayor afinidad y eficacia con menores efectos adversos.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de Dx-FEA sobre la presión arterial y su posible interacción con la ECA.

5.2. Objetivos particulares

- Estudiar *in vivo* en un modelo de rata descerebrada y desmedulada el efecto del compuesto Dx-FEA sobre la presión arterial.
- Analizar *in silico* las posibles interacciones moleculares del compuesto Dx-FEA con la ECA.
- Evaluar *in vitro* la actividad inhibitoria del compuesto Dx-FEA sobre la ECA.

6. Hipótesis

El compuesto Dioxo-FEA disminuirá la presión arterial al inhibir la enzima convertidora de angiotensina (ECA).

7. Materiales y métodos

7.1. Animales

Se utilizaron ratas Wistar macho (n=6) con rango de peso de 250-300 g. Los animales se mantuvieron en jaulas a temperatura y humedad ambiental con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, alimento y agua a libre demanda. Se obtuvieron del Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Para el manejo de los animales se siguió la Norma Oficial Mexicana sobre la especificación técnica de la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO.1999, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación)

7.2. Curvas dosis-respuesta (Ensayo *in vivo*)

Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (50mg/kg i.p.); se les realizó la traqueostomía, diseccionando la tráquea e insertando un tubo de polipropileno conectado a una bomba de respiración con un volumen de 2 cm³/g de peso. Para descerebrar y desmedular a los animales, se les insertó un estilete metálico de 16 cm a través de la región orbital y por el foramen magno hasta atravesar el canal vertebral, el estilete se deslizó suavemente hasta llegar al sacro; se realizó la vagotomía y se introdujo un catéter en la arteria carótida acoplado a un transductor de presión conectado a un sistema de adquisición de datos Biopac; también se canularon las dos venas yugulares para la administración de NA y la administración del compuesto Dx-FEA (Gillespie & Muir, 1967).

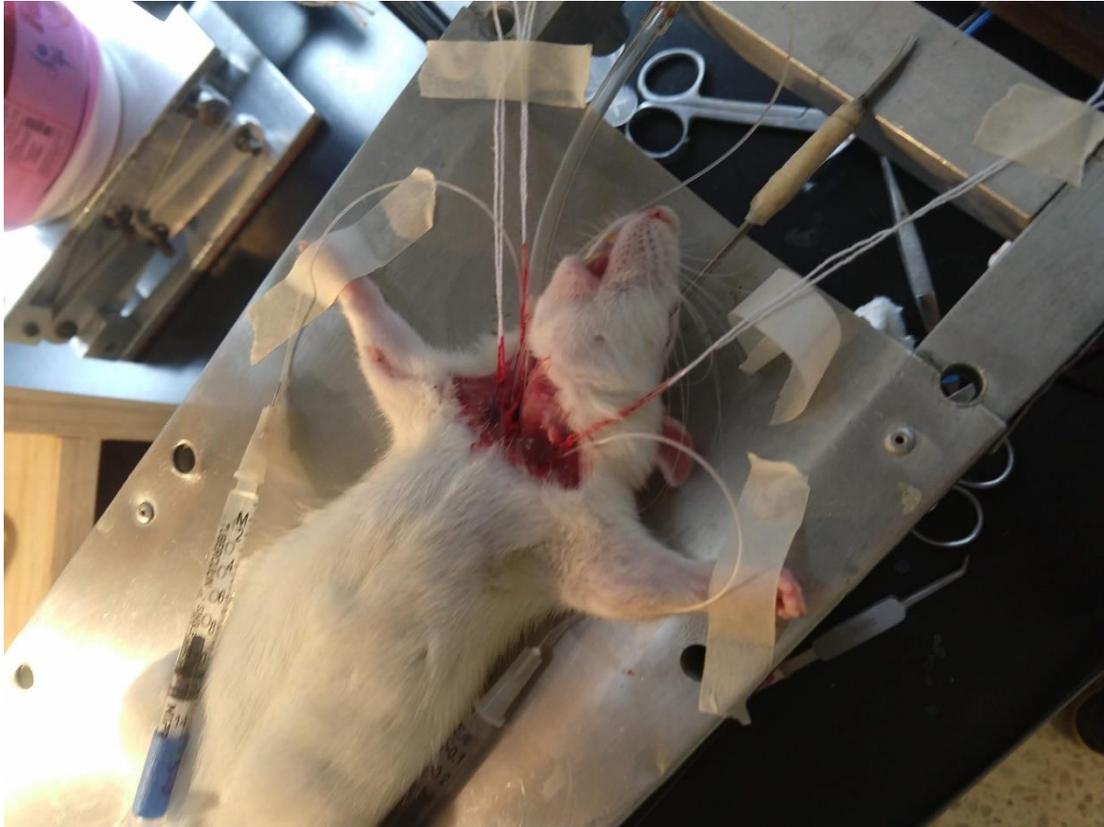


Figura 14. Modelo de la rata descerebrada y desmedulada.

Se administró por una de las venas yugulares NA (20 μ g/kg i.v.) a manera de infusión hasta tener una PA máxima estable, y por la otra se administró el fármaco Dx-FEA. (100, 178, 310, 560, 1,000 mg/kg i.v.); cada una de las dosis de Dx-FEA se administró de manera independiente por cada inyección de NA. Los resultados se graficaron y se analizaron obteniendo el porcentaje de relajación con respecto a la PA máxima producida por NA con cada dosis del fármaco, para lo cual se utilizó el programa SigmaPlot v.12.0. Se obtuvo la dosis efectiva 50 (DE₅₀) por regresión lineal graficando en las ordenadas el porcentaje de efecto y en las abscisas las concentraciones logarítmicas del fármaco (Yokohama *et al.* 1997).

7.3. Acoplamiento molecular *Docking* (Ensayo *in silico*)

El modelado molecular de Dx-FEA se realizó en el programa *Gauss View* 6.0, considerando un estado de protonación en condiciones fisiológicas (pH 7.4). El análisis conformacional se realizó en *Gaussian 16* con el método semi-empírico PM6. Las condiciones del acoplamiento molecular fueron programadas en *Autodock tools* 1.5.6. El Ligando fue preparado añadiendo la rotación de los enlaces, los grados de libertad, las cargas parciales y los enlaces no polares en la enzima con *Autodock tools* 1.5.4.

La estructura cristalizada de la ECA se descargó de la *Protein Data Bank* (PDB código: 1086). El “grid box” se fijó en 80x60x70 con espaciado de 0.375 Å y coordenadas de seguimiento x=37.532 Y=33.432 y Z=44.336.

Para el acercamiento molecular se utilizó el software *Autodock4* en *Fedora22* como sistema operativo, se obtuvieron las conformaciones de baja energía de unión de Dx-FEA con la enzima, así mismo la energía libre de Gibbs (ΔG), constante de disociación (Kd) y el $-\log(10)$ de la constante de disociación (pKd) (Andrade-Jorge *et al.*, 2018a).

Se compararon de los parámetros obtenidos de la interacción Dx-FEA con ECA utilizando al captopril como molécula de referencia (Andrade-Jorge *et al.*, 2018a).

7.4. Cinética Enzimática (Ensayo *in vitro*)

Para la cinética enzimática se usó colorimetría en una placa de 96 pozos y espectrofotómetro EPOC, en donde para el grupo control positivo se adicionó como sustrato Hipuiril-histidil-leucina (HHL) en 0.1 μmol ; del compuesto Dx-FEA se adicionaron 6 concentraciones de manera creciente (46.875, 93.75, 187.5, 375, 750, y 1500 μM) con dimetilsulfóxido (DMSO) al 50% como vehículo. A todos los pozos se les agregó 1 mU de ECA (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA.) más buffer de fosfatos (pH 8.3) hasta completar un volumen final de 150 μL . La reacción se incubó por 6 horas a temperatura constante de 37 °C. Terminando este lapso, para obtener una reacción colorimétrica, se agregaron 20 μL de ácido picrilsulfónico (AcP) (15mM) por 20 minutos para detener la reacción. Como controles negativos se adicionaron HHL y AcP y HHL/ECA/DMSO y AcP. La placa se leyó en un EPOC a 415 nm. Se utilizaron datos del captopril como control positivo.

8. Resultados

8.1. Análisis del ensayo *in vivo*

Los resultados mostraron que la infusión de NA produjo el incremento sostenido de la PA cerca de los 200 mmHg. El fármaco Dx-FEA disminuyó de manera dosis-dependiente, la PA producida por NA hasta 70% con la dosis de 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (fig.18).

En la figura 19 se muestra el gráfico que representa la DE_{50} del Dx-FEA (-4.970 Log mol/kg), por lo que la $DE_{50} = 270 \mu\text{g}/\text{Kg}$.

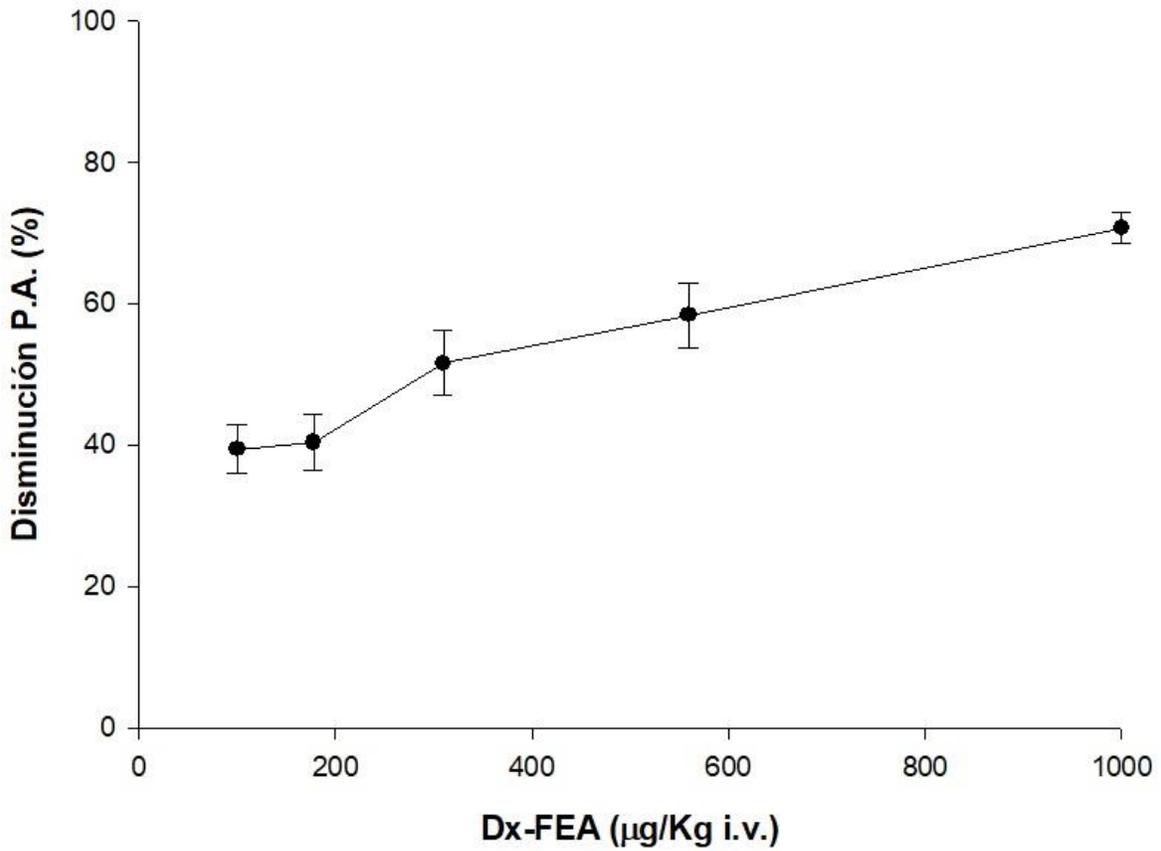


Figura 15. Curva dosis respuesta de Dx-FEA. Se presentan los porcentajes de disminución obtenidos con la administración de dosis crecientes de Dx-FEA en la vasoconstricción producida por NA en el modelo de rata descerebrada y desmedulada.

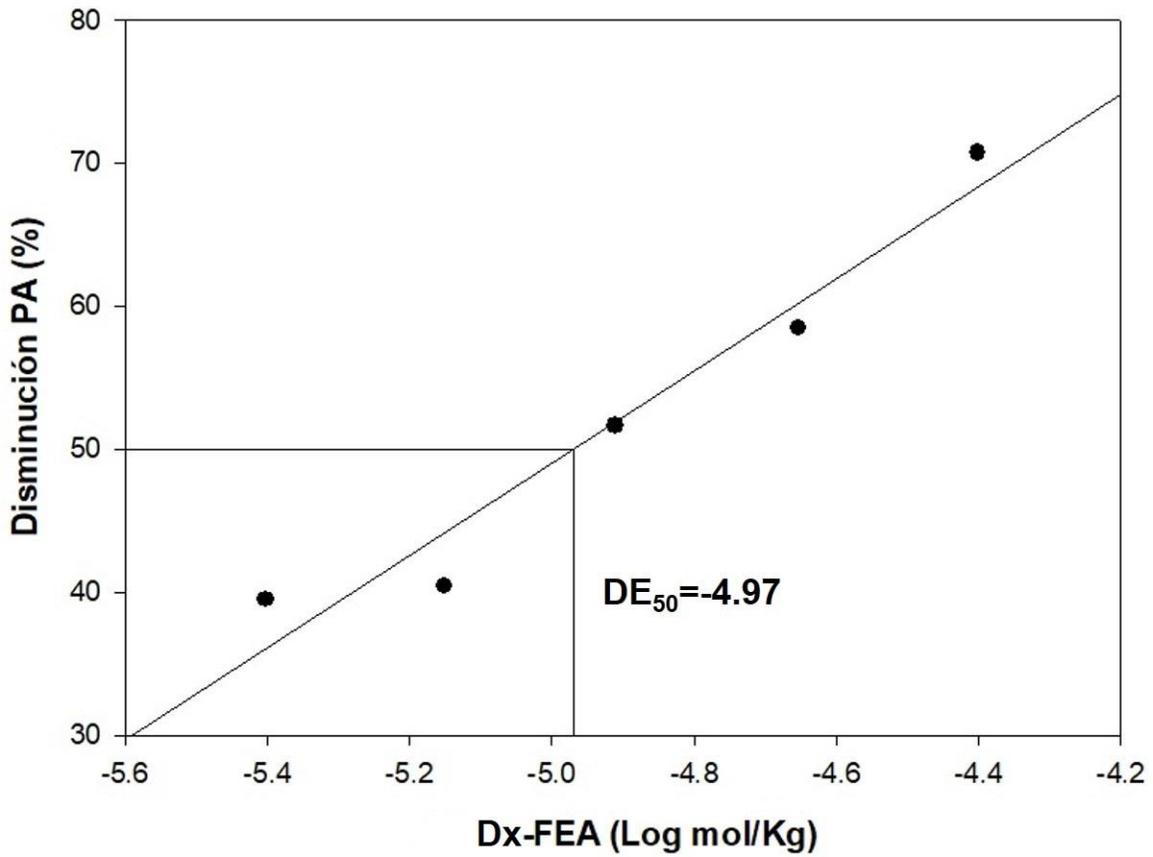


Figura 16. Representación gráfica del cálculo de la DE_{50} DxFEA ($Y=b_0+b_1x$) = 270 μ g/kg ($y=210.2267+32.2337*x$ $R^2=0.9493$).

8.2. Análisis del ensayo *in silico*

Se obtuvieron los parámetros fisicoquímicos de la interacción del Dx-FEA con la ECA (tabla 5), los datos muestran que el Dx-FEA tiene valores similares a los obtenidos con el captopril (Andrade-Jorge *et al.*, 2018a).

Tabla 3. Energía libre de Gibbs (ΔG), constante de disociación (K_d) y pK_a de la interacción entre el Dx-FEA con la ECA.

<i>Ligando</i>	<i>ΔG (Kcal/mol)</i>	<i>K_d (μM)</i>	<i>pK_a</i>
<i>Dx-FEA</i>	-7.12	6.01	5.22
<i>Captopril</i>	-7.12	6.01	5.22

Por otra parte, el análisis de resultados muestra que el Dx-FEA interacciona con diversos aminoácidos de la ECA, con los cuales también interacciona el captopril pero, de manera importante, el Dx-FEA tiene interacción con el ion zinc (Zn^{2+}) en el sitio activo de la enzima (Tabla 6).

Tabla 4. Residuos de aminoácidos involucrados en la interacción de ECA con Dx-FEA y captopril.

Ligando	Residuos
Dx-FEA	Zn701, Tyr523, His513, His353, Glu384, His383 Gly2000
Captopril	Zn701, Lys511, Tyr523, Gly2000, Glu384, Tyr520, His513, Gln281, Phe457

Además de la interacción con el Zn^{2+} , el Dx-FEA tiene otras 8 interacciones en el sitio activo de la ECA, de los cuales dos son con la Tyr523 en dos diferentes puntos de su estructura, de los otros 6 residuos 4 coinciden con aminoácidos con los que también interacciona el captopril (Tyr523, His513, Glu384, y Gly2000). El principal tipo de interacciones del Dx-FEA con los residuos de aminoácidos fueron de tipo Pi-anión.

Tabla 5. Clasificación y distancias de las interacciones de Dx-FEA con los residuos de aminoácidos.

Ligando	Interacciones	
Dx-FEA	1 hidrofóbico:	2 Pi-Pi
	Glu384:C---C:Dioxo-FEA a 4.82Å	Tyr523:C---O:Dioxo-FEA a 3.87Å
		Tyr523:C---O:Dioxo-FEA a 4.67Å
	4 Pi-Anión	1 Pi-Catión
	His383:C---O:Dioxo-FEA a 2.99Å	Zn701:Zn---C:Dioxo-FEA a 4.82Å
	Gly2000:C---O:Dioxo-FEA a 2.06Å	
	His513:C---O:Dioxo-FEA a 2.28Å	
	His353:C---O:Dioxo-FEA a 2.00Å	

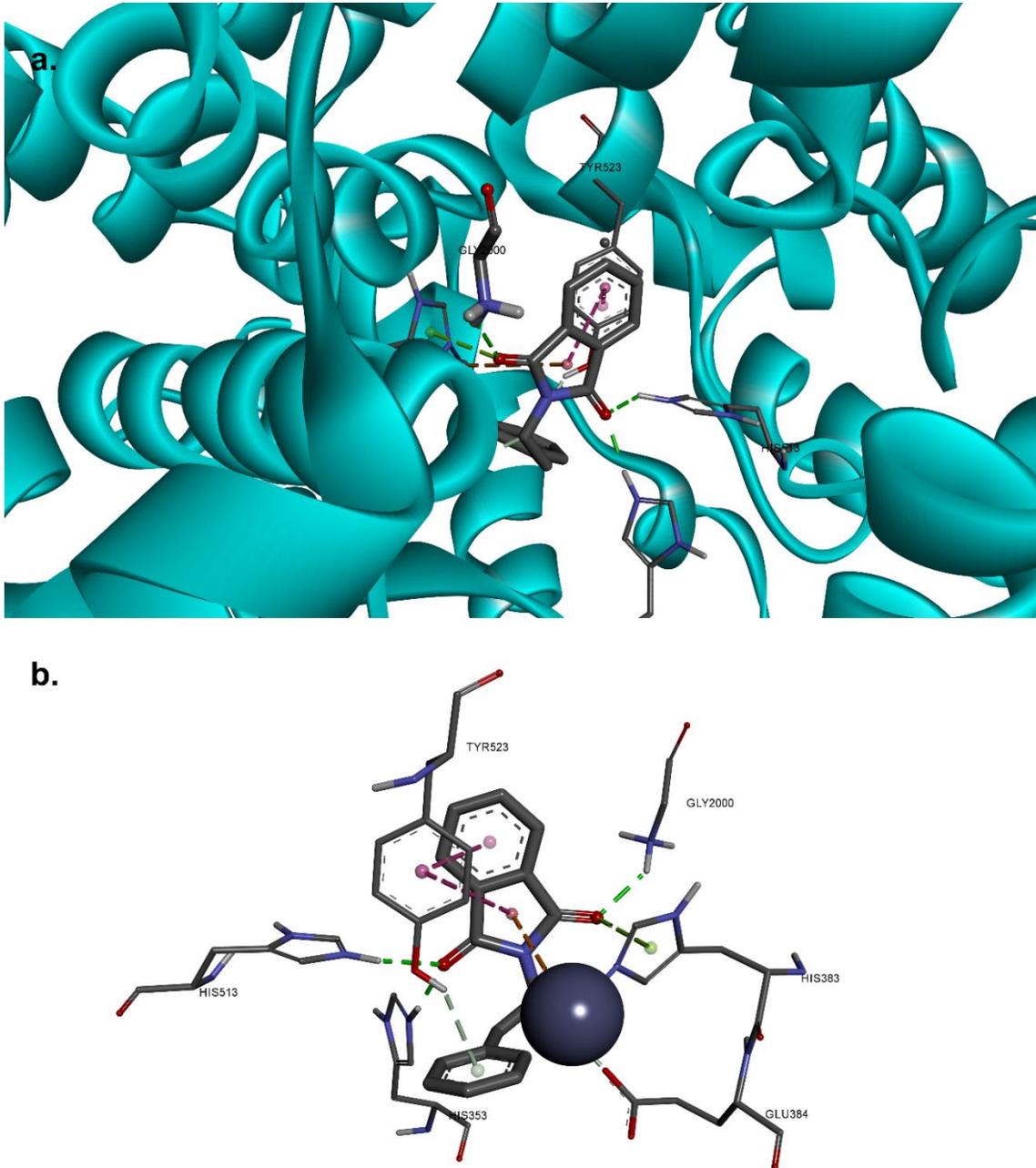


Figura 17. Docking. a) Modo de unión de Dx-FEA (Bastones en gris) en la ECA (listones en azul). b) Se observan las interacciones (líneas discontinuas) que tiene Dx-FEA (al centro de la imagen) con los residuos de aminoácidos y el Zn^{2+} (esfera en azul) de la ECA.

8.3. Análisis de los datos *in vitro*

Los resultados muestran que el captopril en la concentración más alta que fue de 10 nM disminuyó hasta la actividad la ECA a 20% (Fig. 19). A diferencia de el Dx-
FEA a concentraciones que iban desde 46.875 μ M hasta 1500 μ M no produjo inhibición de la ECA. (Fig. 20).

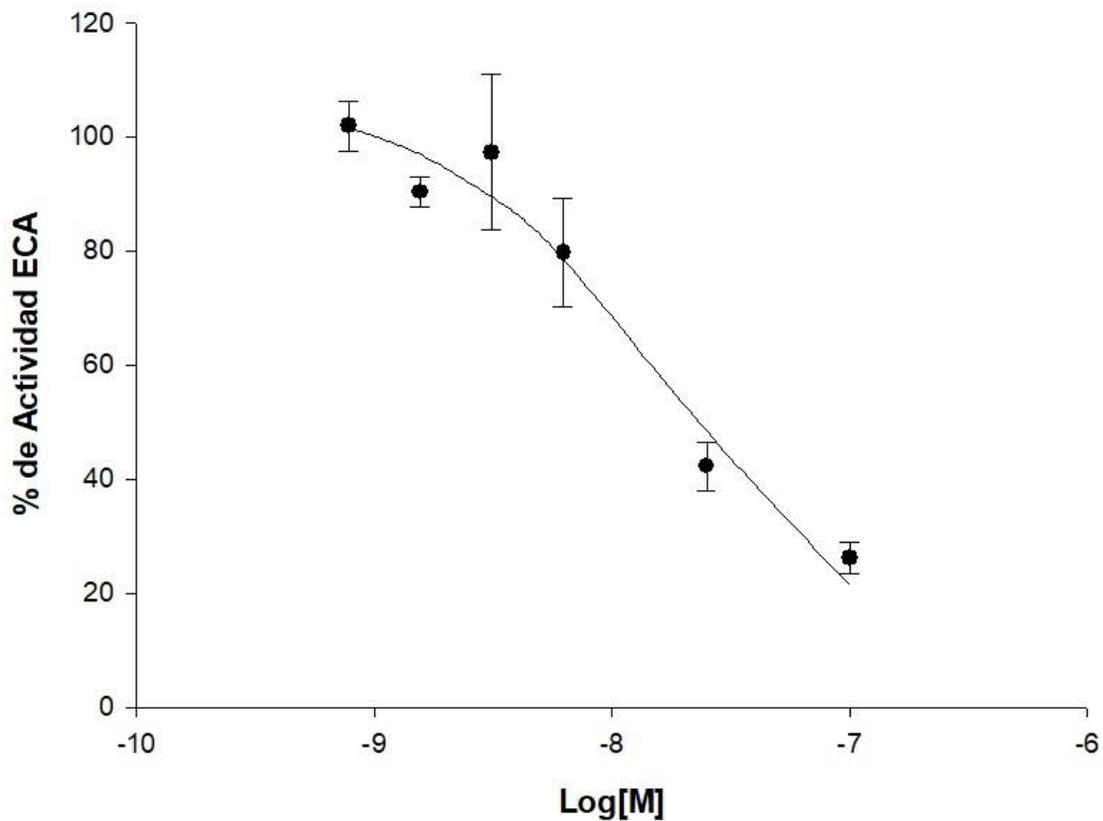


Figura 18. Cinética enzimática de la inhibición de la actividad de ECA con Captopril.

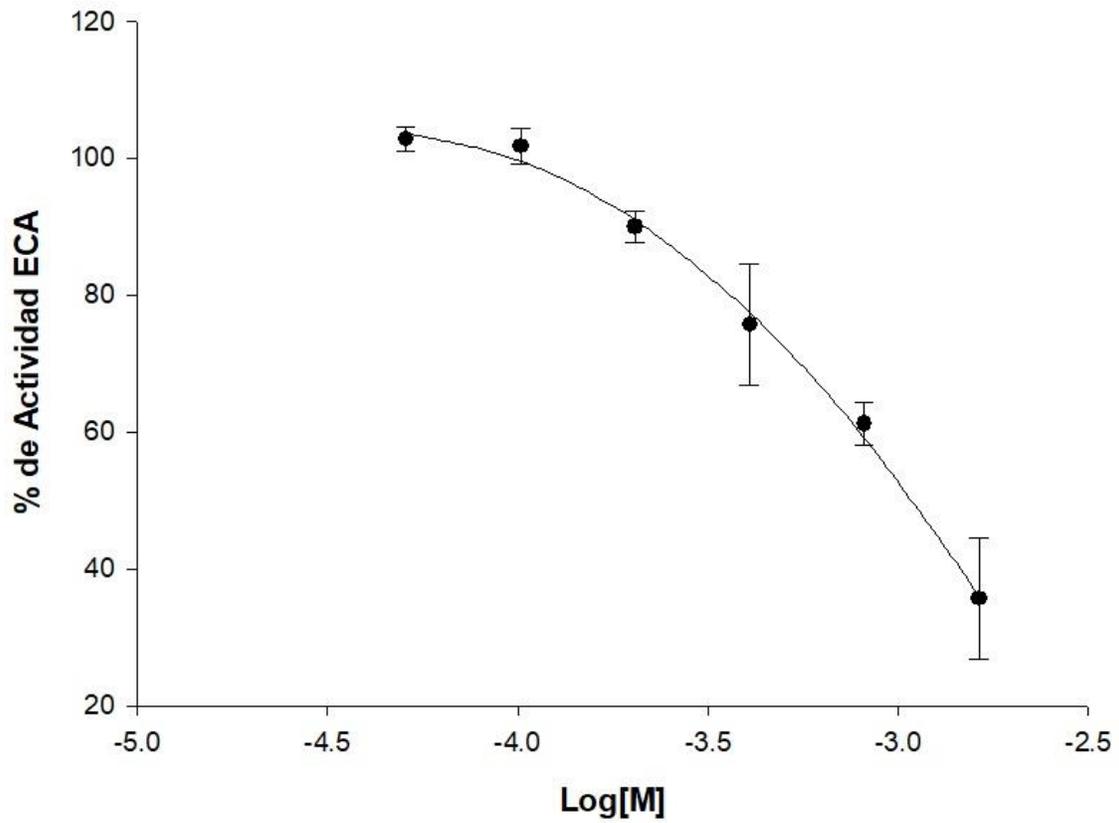


Figura 19. Gráfica que muestra el porcentaje de actividad de ECA en presencia de Dx-FEA en la cinética enzimática.

9. Discusión

Los compuestos derivados de las 1,3-Dioxoisindolinas tienen actividad farmacológica; por ejemplo, estos compuestos inhiben a la enzima acetilcolinesterasa, propiedad que se ha utilizado para el tratamiento del Alzheimer, se ha demostrado que estas moléculas también actúan como bloqueadores de los canales de Ca^{2+} , como analgésicos y antiinflamatorios (Andrade-Jorge *et al.*, 2018b; Shakir *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2007); sin embargo, no se ha comprobado su actividad antihipertensiva. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue analizar si una molécula derivada de las 1,3-Dioxoisindolinas (Dx-FEA) produce un efecto vasodilatador. Para cumplir con nuestro objetivo desarrollamos curvas dosis-respuesta con dosis crecientes de Dx-FEA en la pre-contracción con NA (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v.) en un modelo de rata descerebrada y desmedulada.

El modelo de la rata descerebrada y desmedulada es útil para poder investigar el efecto de los fármacos sobre el sistema nervioso periférico sin que exista la regulación mediada por el sistema nervioso central (Yokohama *et al.*, 1997). Los resultados obtenidos mostraron que con cada dosis administrada del Dx-FEA, la PA por NA disminuyó de manera dosis-dependiente, teniendo una DE_{50} de 270 $\mu\text{g}/\text{kg}$; a pesar de que con este experimento comprobamos que el Dx-FEA tiene efecto vasodilatador, necesitaríamos más con diversos fármacos para determinar de manera más precisa su mecanismo de acción.

En este contexto, el análisis *in silico* es una herramienta de gran importancia debido a que nos da un acercamiento de la interacción que tienen las moléculas con posibles blancos terapéuticos, de manera computacional, por lo que no hay necesidad del uso de tantos animales de experimentación.

El Dx-FEA, derivado de la 1,3-dioxoisindolina, posee similitud estructural con la fenilalanina, ya que presenta una cadena alifática unida a un anillo aromático, esta estructura suele ser constante en los fármacos utilizados como IECA, debido a que la feniletilamina es una estructura de reconocimiento para la ECA quien hidroliza tanto a la Ang I como a la BK donde hay una fenilalanina (Fig. 10; Fig. 11) (Cenoni *et al.*, 2007). Ambas moléculas, Ang II y BK, están ampliamente implicadas en la PA, ya que regulan el tono vascular, como vasoconstrictor y vasodilatador, respectivamente, y ambos son afectados cuando la ECA es inhibida, lo cual repercute en el tono vascular y por consiguiente en la PA (Tom *et al.*, 2003).

Por esta razón, el análisis *in silico* se desarrolló en primer lugar con la ECA. Los resultados mostraron los valores de energía libre de Gibbs (ΔG), la constante de disociación (Kd) y el $-\text{Log}(10)$ de la Kd (pKd), que mostraron afinidad de ECA por Dx FEA ($\Delta G = -7.12$, Kd = 6.01 y pKd = 5.22). Las características de la interacción de son idénticos a los que se obtienen con el acoplamiento de captopril/ECA, esto sugiere la posible interacción de Dx-FEA con el sitio activo de la ECA. De acuerdo con los reportes en los que se describen las características para diseñar un fármaco potencial IECA, una muy importante es que este tenga un grupo funcional que

interactúe con el ion de Zn^{2+} . En las proyecciones *in silico* que se realizaron en este trabajo, el compuesto Dx-FEA se acopló en el sitio activo de la ECA, interaccionando con el núcleo de Zn^{2+} mediante un enlace Pi-cación con el anhídrido ftálico del fármaco (Regulska et al., 2014; Kuster & Marshall, 2005), lo que sugiere esta interacción como un posible mecanismo de acción.

Para comprobar el posible efecto inhibitor del fármaco, se realizaron experimentos *in vitro* mediante cinética enzimática. Sin embargo, encontramos que a concentraciones muy altas del fármaco (1.3 mM), éste produce inhibición de la actividad de la ECA, por lo que no se puede descartar que el mecanismo antihipertensivo sea por otra vía o un mecanismo dual.

10. Conclusiones

En conclusión, los resultados de este trabajo muestran que el compuesto Dx-FEA disminuye la PA producida por NA, por lo cual podría ser utilizado como un fármaco antihipertensivo; sin embargo, se requieren más experimentos para determinar su mecanismo de acción.

11. Referencias

Andrade-Jorge E, Bahena-Herrera JR, Garcia-Gamez J, Padilla-Martínez II, Trujillo-Ferrara JG. Novel synthesis of isoindoline/isoindoline-1,3-dione derivatives under solventless conditions and evaluation with the human D2 receptor. *Med Chem Res.* 2017; 26(10): 2420–2431.

Andrade-Jorge E, Rodríguez JE, Bribiesca-Carlos J, Gallardo-Ortíz IG, Trujillo-Ferrara JG, Villalobos-Molina R. Novel phthalamide derivatives as antihypertensive agents: rapid and clean synthesis, in silico and in vivo evaluation. *Med Chem Res.* 2018a; 28(5): 681-695.

Andrade-Jorge E, Sánchez-Labastida LA, Soriano-Ursúa MA, Guevara-Salazar JA, Trujillo-Ferrara JG. Isoindolines/isoindoline-1,3-diones as AChE inhibitors against Alzheimer’s disease, evaluated by an improved ultra-micro assay. *Med Chem Res.* 2018b; 27(9): 2187-2198.

Assaad SI, Heerdt PM, Crystal GJ. Cardiovascular physiology: Cellular and molecular regulation. En Hemmings HJ, Egan TD del libro *Pharmacology and physiology for anesthesia*. EUA. Elsevier; 2019. P. 456-472.

Bhagani S, Kapil V, Lobo MD. Hypertension. *Med.* 2018; 46(8): 509-515.

WHO. Q&As on hypertension. 2015. [Consultado octubre 2019]. Disponible en: <https://www.who.int/features/qa/82/en/>.

Benavente D, Chue CD, Ferro CJ. Principales componentes del sistema renina-angiotensina-aldosterona: historia, modulación farmacológica e impacto clínico. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 2010; 21(4): 516-529.

Catala M, Kubis N. Gross anatomy and development of the peripheral nervous system. *Handbook Clin Neuro*. 2013; 115:29-41.

Ceconi C, Francolini G, Olivares A, Comini L, Bachetti T, Ferrari R. Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors have different selectivity for bradykinin binding sites of human somatic ACE. *Eur J Pharmacol*. 2007; 577: 1-6.

Charlton M, Thompson JP. Drugs acting on the heart: antihypertensive drugs. *Anaesthesia & Intensive Care Med*. 2015; 16(5): 227-231.

De Jonge A, Knape JT, Van Meel JC, Kalkman HO, Wilffert B, Thoolen MJ, Van Brummelen P, Timmermans PB, Van Zwieten PA. Effect of captopril on sympathetic neurotransmission in pithed normotensive rats. *Eur J Pharmacol*. 1983; 88(2-3): 231-240.

De Mello WC. Local Renin Angiotensin Aldosterone Systems and Cardiovascular Diseases. *Med Clin North Am*. 2017; 101(1): 117-127.

El-Azab AS, Abdel-Aziz AAM, Ayyad RR, Ceruso M, Supuran CT. Inhibition of carbonic anhydrase isoforms I, II, IV, VII and XII with carboxylates and sulfonamides incorporating phthalimide/phthalic anhydride scaffolds. *Bioorg Med Chem*. 2016; 24: 20-25.

Ferrario CM, & Mullick AE. Renin angiotensin aldosterone inhibition in the treatment of cardiovascular disease. *Pharmacol Res.* 2017; 125: 57–71.

Ghosh SK, Pandit JJ. Neurological and humoral control of blood pressure. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine.* 2019; 20(5): 301-305.

Gohlke P, Schölkens BA. ACE Inhibitors: Pharmacology. En Unger T, Schölkens BA del libro *Angiotensin Vol. II.* Berlin. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2004. P. 375-413.

Godfraind T. Calcium Antagonists and Vasodilatation. *Pharmac Ther.* 1994; 64: 37-75.

Hackney AC. Beta Blockers. En Hackney AC del libro *Doping, Performance-Enhancing Drugs, and Hormones in Sport: Mechanisms of Action and Methods of Detection.* NC. Elsevier; 2018. P. 103-111.

James PA, Oparil S, Carter BL, Cushman WC, Dennison-Himmelfarb C, Handler J, Ortiz E. Evidence-Based Guideline for the Management of High Blood Pressure in Adults. *JAMA.* 2014; 311(5): 507-520.

Kallikazaros IE. Arterial hypertension. *Hellenic J Cardiol.* 2013; 54(5): 413-415.

Kapil V, Lobo MD. Hypertension. *Med.* 2014; 42(9): 485–490.

Kaplan AP, Ghebrehiwet B. The plasma bradykinin-forming pathways and its interrelationships with complement. *Mol Immunol.* 2010; 47(13): 2161-2169.

Kim HS, Kim Y, Doddareddy MR, Seo SH, Rhim H, Tae J, Pae AN, Choo H, Cho YS. Design, synthesis, and biological evaluation of 1,3-dioxoisindoline-5-carboxamide derivatives as T-type calcium channel blockers. *Bioorg Med Chem Lett.* 2007; 17(2): 476-481.

Kuster DJ, Marshall GR. Validated ligand mapping of ACE active site. *J Comput Aided Mol Des.* 2005; 19(8): 609-615.

Maiers LS, Bers DM. Calcium, calmodulin and calcium-calmodulin kinase II: Heartbeat to heartbeat and beyond. *J Mol Cell Car.* 2002; 34(8): 919-939.

Messerli FH, Bangalore S, Bavishi C, Rimoldi SF. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors in Hypertension: To Use or Not to Use?. *J Am Coll Cardiol.* 2018; 71(13): 1474-1482.

Mirelli A, De Backer D. The ten principles behind arterial pressure. *Intensive Care Med.* 2017; 44(6): 911-914.

Natarajan A, Villar AM, Jose PA. Renal Modulation: The Renin-Angiotensin System. En Oh W, Baum M del libro *Nephrology and Fluid/electrolyte Physiology*. EUA. Elsevier; 2019. P. 165-188.

Natesh R, Schwager SL, Sturrock ED, Acharya KR. Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex. *Nature.* 2003; 421(6922): 551-554.

Osborn JW, Foss JD. Renal Nerves and Long-Term Control of Arterial Pressure. *Compr Physiol*. 2017; 7(2): 263-320.

Regulska K, Stanis B, Regulski M, Murias M. How to design a potent, specific, and stable angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Drug Discov Today*. 2014; 19(11):

1731-1743.

Sayer G, Bhat G. The Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Heart Failure. *Cardiol Clin*. 2014; 32(1): 21-32.

Shakir R, Muhi-Eldeen ZA, Matalka KZ, Qinna NA. Analgesic and Toxicity Studies of Aminoacetylenic Isoindoline-1,3-dione Derivatives. *ISRN Pharmacol*. 2012; 2012; 1-8.

Sears CE, Casadei B. Mechanisms Controlling Blood Flow and Arterial Pressure. *Surgery (Oxford)*. 30(8): 1-5.

Tom B, Dendorfer A, Danser AH. Bradykinin, angiotensin-(1-7), and ACE inhibitors: how do they interact?. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003; 35(6): 792-801.

Touyz RM. Blood pressure regulation and pathology. En Willis MS, Homeister JW, Stone JR del libro. *Cellular and Molecular Pathology of Cardiovascular Disease*. EUA. Elsevier; 2014. P. 257-275.

Ubeda M, Fenoy F, Carbonell LF, Salazar FJ, García-Estañ J, Salom MG, Quesada T. Effect of captopril on norepinephrine vascular contractility. *Gen Pharmacol.* 1985; 16(3): 303-306.

Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE, Collins KJ, Himmelfarb CD, *et al.* 2017
ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA
Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2018; 71(19): e127-248.

Yokoyama H, Minatoguchi S, Koshiji M, Uno Y, Kakami M, Nagata C, Ito H, Fujiwara H. Losartan and captopril follow different mechanisms to decrease pressor responses in the pithed rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1997; 24(9-10): 697-705.