



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES**

**CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA**

**TÍTULO:**

**“EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA SUBAGUDA DE BENZAZEPINA N-  
SUSTITUIDA (C9) SOBRE HÍGADO, RIÑÓN Y COAGULACIÓN  
SANGUÍNEA”.**

**PRESENTA: IBQ Rafael Camacho Mejorado.**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS EN EL ÁREA  
DE TOXICOLOGÍA.**

**Comité Tutorial:**

**Dr. Andrés Quintanar Stephano (Tutor).**

**Dr. José Luis Quintanar Stephano (Asesor).**

**Dr. Francisco Aníbal Posadas del Río (Asesor).**

**Aguascalientes, Ags., Julio de 2012.**



CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
DEPTO. DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA  
LABORATORIO DE NEUROINMUNOENDOCRINOLOGÍA

**M. en C. Martha Cristina González Díaz**

**Decano del Centro de Ciencias Básicas**


**Presente:**

Los abajo firmantes, miembros del Comité Tutorial del alumno Rafael Camacho Mejorado, estudiante de la Maestría en Ciencias en el Área de Toxicología, le comunicamos que hemos revisado y aprobado el contenido de la tesis "Evaluación Toxicológica Subaguda de Benzazepina *N*- Sustituída (C9) sobre Hígado, Riñón y Coagulación Sanguínea" misma que defenderá en el examen de titulación correspondiente.

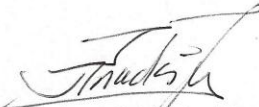
Lo anterior es para que continúen los trámites administrativos correspondientes y se le asigne la fecha del examen de grado.

**"SE LUMEN PROFERRE"**

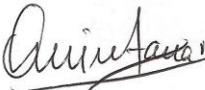
Aguascalientes, Ags., a 23 de julio de 2012.



Dr. José Luis Quintanar Stephano  
(Asesor)



Dr. Francisco Aníbal Posadas del Río  
(Asesor)



Dr. Andrés Quintanar Stephano  
(Tutor)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES  
Centro de Ciencias Básicas

SR. RAFAEL CAMACHO MEJORADO  
ALUMNO (A) DE LA MAESTRÍA EN  
CIENCIAS EN EL ÁREA DE TOXICOLOGÍA  
P R E S E N T E .

Estimado (a) alumno (a) Camacho:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: "Evaluación Toxicológica Subaguda de Benzazepina N-Sustituída (C9) sobre Hígado, Riñón y Coagulación Sanguínea", hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE  
Aguascalientes, Ags., 23 de julio de 2012  
"SE LUMEN PROFERRE"  
LA DECANO

M. en C. MARTHA CRISTINA GONZÁLEZ DÍAZ



c.c.p.- Archivo  
MCGD,mjda

**AGRADECIMIENTOS:** Sin importar el orden de aparición quiero agradecer a todas las personas que estuvieron apoyándome durante la maestría y en especial en la elaboración de la tesis. De forma especial agradezco a CONACyT por su apoyo económico para la realización de mis estudios.

**Dr. Andrés Quintanar Stephano:** Gracias por su apoyo incondicional y brindarme enseñanzas de alta calidad que me servirán en mi vida profesional.

**Dr. José Luis Quintanar Stephano:** Gracias por brindarme sabios consejos y críticas constructivas para mejorar mi proyecto de investigación.

**Dr. Francisco Aníbal Posadas del Río:** Gracias por estar dispuesto en todo momento a resolverme mis dudas e instruirme en los conocimientos de la Toxicología.

**M. en C. José Luis Moreno Hernández Duque:** Por su aporte de conocimientos, su amabilidad y ayuda para realizar parte del trabajo práctico del proyecto.

**Dra. Martha Citlalli Contreras Romo:** Gracias amiga mía, por tu gran apoyo, confianza y consejos, tu ayuda me hizo crecer.

**Dr. José Correa Basurto:** Por las facilidades mostradas para proveernos de reactivo para la realización del proyecto.

**Dr. Kalman Kovacs:** Por su gran ayuda en la interpretación del estudio histológico.

**L.A.Q.B. Adriana Rodríguez Peralta:** Por su disponibilidad para instruirme en las actividades y técnicas de laboratorio.

**L.A.Q.B. Claudia R. González Ruíz:** Gracias “Clau” por tu apoyo cuando estaba en la parte práctica de mi tesis.

**L.A.Q.B. Adriana Cuéllar Juárez:** Por su importante ayuda al proyecto, al mostrar total disponibilidad para el uso de los equipos.

**Laboratorios YALAB:** Por sus facilidades mostradas para trabajar en su laboratorio.

**Mtro. Jesús Antonio Hernández Chávez:** Por haber sido mi guía para no claudicar, gracias “amigo y maestro”.

Y, a todas esas personas que de alguna u otra manera estuvieron conmigo para cumplir con este objetivo de vida, gracias a todos ellos.

**DEDICATORIAS:**

*Le brindo este trabajo, de manera especial, a mi abuela Sra. Benita Meza Reyes Q.E.P.D., por ser una fuente de inspiración y resurgimiento cuando todo parece perdido, por el solo hecho de amar a la vida.*

*A mi Madre Sra. Consuelo Mejorado Meza.*

*A mi Padre Sr. Rafael Camacho Lizardo.*

*A mi hermana Alejandra Camacho Mejorado.*



## ÍNDICE DE CONTENIDOS.

	Pag.		
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	1	8.2 TOMA DE MUESTRAS Y EXTRACCIÓN	
ÍNDICE DE TABLAS.....	2	DE ÓRGANOS.....	41
ÍNDICE DE FIGURAS.....	3	8.2.2 Muestras de Orina.....	41
RESUMEN.....	4	8.2.3 Extracción de Órganos.....	41
ABSTRACT.....	6	8.3- PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO	
1.0- INTRODUCCIÓN.....	8	HEPÁTICO.....	42
1.1 HIPÓFISIS.....	8	8.3.1 Determinación de Transaminasa glutámica	
1.2 ARGININA VASOPRESINA (AVP).....	9	pirúvica (TGP).....	42
1.3 REGULACIÓN DE LA AVP.....	9	8.3.2 Determinación de Transaminasa Glutámica	
1.4 RECEPTORES DE AVP.....	11	Oxalacética (TGO).....	42
1.5 AVP Y DIVERSAS PATOLOGÍAS.....	14	8.3.3 Determinación de Glucógeno Hepático.....	43
1.6 AVP, COAGULACIÓN SANGUÍNEA Y EL		8.3.3.1 Glucosa Total.....	43
FACTOR VON WILLEBRAND.....	15	8.3.3.2 Glucosa Libre.....	44
2.0 ANTAGONISTAS NO PEPTÍDICOS DE LA		8.4 EVALUACIÓN DE LA GLICEMIA.....	44
AVP (VAPTANES).....	16	8.5- PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO	
2.1 HISTORIA.....	16	RENAL.....	45
2.2 VAPTANES Y SUS EFECTOS		8.5.1 Volumen urinario de 24 horas.....	45
TOXICOLÓGICOS.....	19	8.5.10 Determinación de K <sup>+</sup> urinario.....	48
2.3 ANTAGONISTAS NO PEPTÍDICOS DE LOS		8.5.2 Ingesta de agua de 24 horas.....	45
RECEPTORES DE AVP HECHOS EN		8.5.3 Análisis urinario.....	46
MÉXICO.....	20	8.5.4 Creatinina urinaria.....	46
2.3.1 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DEL		8.5.5 Creatinina sanguínea.....	46
POLI-1 Y EFECTOS BIOLÓGICOS.....	21	8.5.6 Depuración de creatinina.....	47
2.3.2 CARACTERÍSTICAS DEL C1 Y SUS		8.5.7 Determinación del Na <sup>+</sup> y K <sup>+</sup> Sérico.....	47
EFECTOS BIOLÓGICOS.....	22	8.5.8 Osmolaridad Efectiva.....	47
2.3.3 CARACTERÍSTICAS DEL C9 Y SUS		8.5.9 Determinación de Na <sup>+</sup> urinario.....	48
EFECTOS BIOLÓGICOS.....	23	8.6- COAGULACIÓN SANGUÍNEA.....	49
3.0 EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE LOS		8.6.1 Tiempo de Protrombina (PT).....	49
FARMACOS.....	25	8.6.2 Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado	
3.1 ANÁLISIS DOSIS – EFECTO TÓXICO.....	28	(TTPA).....	49
3.2 EL HÍGADO Y SUS MECANISMOS		8.7 Histología.....	49
GENERALES DE BIOTRANSFORMACIÓN		8.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	51
Y ELIMINACIÓN.....	29	9.0- RESULTADOS.....	51
3.2.1 POSIBLES MECANISMOS GENERALES		9.1 EFECTOS DEL C9 SOBRE EL PESO	
DE C9 EN EL HÍGADO.....	30	CORPORAL.....	51
3.3 EL RIÑÓN Y SUS MECANISMOS		9.2 EFECTOS DEL C9 SOBRE ALGUNOS	
GENERALES DE BIOTRANSFORMACIÓN		BIOMARCADORES DE DAÑO HEPÁTICO.	52
Y ELIMINACIÓN.....	32	.....	
3.3.1 POSIBLES MECANISMOS DE C9 EN EL		9.2.1 EFECTOS DEL C9 SOBRE LA	
RIÑÓN.....	33	TRANSAMINASA GLUTÁMICO PIRÚVICA	
3.4 POSIBLES EFECTOS DEL C9 EN LA		(TGP) SÉRICA.....	52
COAGULACIÓN SANGUÍNEA.....	34	9.2.2 EFECTO DEL C9 SOBRE LA ENZIMA	
3.5 BIOMARCADORES DE DAÑO RENAL Y		TRANSAMINASA GLUTÁMICO	
HEPÁTICO.....	35	OXALACÉTICA (TGO).....	54
4.0- JUSTIFICACIÓN.....	36	9.2.3 EFECTO DE C9 SOBRE EL GLUCÓGENO	
5.0- HIPÓTESIS.....	38	HEPÁTICO.....	55
6.0- OBJETIVO GENERAL.....	38	9.2.4 EFECTO DE C9 SOBRE GLUCOSA	
7.0- OBJETIVOS PARTICULARES.....	38	SANGUÍNEA.....	56
8.0- METODOLOGÍA.....	38	9.3 EFECTOS DE C9 SOBRE RIÑÓN Y	
8.1 ANIMALES Y GRUPOS.....	38	EQUILIBRIO ELECTROLÍTICO (Na <sup>+</sup> y K <sup>+</sup> ).	
		.....	58

9.3.1 CONCENTRACIÓN SÉRICA DE Na <sup>+</sup> . ....	58	9.4.1 TIEMPO DE PROTROMBINA (TP). ....	67
9.3.2 CONCENTRACIÓN SÉRICA DE K <sup>+</sup> . ....	59	9.4.2 TIEMPO DE TROMBOPLASTINA	
9.3.3 OSMOLARIDAD EFECTIVA SÉRICA. ....	59	PARCIAL ACTIVADO (TPa). ....	69
9.3.4 DENSIDAD URINARIA. ....	60	9.5 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO	
9.3.5 VOLUMEN URINARIO EN 24 HORAS. ....	61	HEPÁTICO. ....	70
9.3.6 CONSUMO DE AGUA EN 24 HORAS. ....	62	9.6 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO RENAL. ....	74
9.3.7 EFECTO PORCENTUALES DEL C9 EN EL		10.0 DISCUSIÓN. ....	77
EQUILIBRIO HIDROELECTROLÍTICO. ....	63	11.0 PERSPECTIVAS. ....	80
9.3.8 EXCRECIÓN DE ELECTROLITOS (Na <sup>+</sup> y		12.0 CONCLUSIONES. ....	81
K <sup>+</sup> ). ....	65	GLOSARIO. ....	82
9.3.9 BIOMARCADORES EN ORINA		REFERENCIA. ....	86
INDICATIVOS DE DAÑO RENAL. ....	66		
9.4. EFECTOS DEL C9 SOBRE LOS TIEMPOS			
DE COAGULACIÓN. ....	67		

**ÍNDICE DE TABLAS.**

**Pag.**

Tabla 1. Clasificación, localización y funciones de los diferentes subtipos de receptores de AVP. ....	12
Tabla 2 Efectos adversos de los vaptanes. ....	20
Tabla 3 Algunos parámetros a evaluar en la etapa preclínica de seguridad farmacológica de acuerdo con la FDA. ....	28
Tabla 4.Efecto de C9 sobre la excreción de Sodio y Potasio .....	65
Tabla 5.Efecto de C9 sobre algunos biomarcadores de daño renal .....	67

**ÍNDICE DE FIGURAS.**

	<b>Pag.</b>		
<b>Figura 1.</b> Descripción de la glándula hipofisis y sus hormonas.....	8	<b>Figura 11.</b> Estructuras químicas y nombre oficial de C9. ....	24
<b>Figura 2.</b> Mecanismo de retroalimentación para la regulación de la secreción de la hormona antidiurética (ADH o AVP) a través del sistema de osmorreceptores hipotalámicos.....	11	<b>Figura 12.</b> Representación de la respuesta a AVP con las diferentes concentraciones de C9, DMSO y V1880.....	24
<b>Figura 3.</b> Activación de los receptores V2 de AVP.....	12	<b>Figura 13.</b> Características del acino hepático.....	30
<b>Figura 4.</b> Activación de los receptores V1 de vasopresina.....	13	<b>Figura 14.</b> Posibles mecanismos de acción y efecto del C9 en los hepatocitos.....	31
<b>Figura 5.</b> Mecanismo de acción de la DDAVP induciendo la liberación del Factor Von Willebrand (FvW).....	16	<b>Figura 15.</b> Las diferentes partes que constituyen a la nefrona, además del tipo de célula en cada una de sus partes.....	33
<b>Figura 6.</b> Estructura química de algunas moléculas antagonistas no-peptídicos de los receptores de AVP.....	18	<b>Figura 16.</b> Posibles mecanismos de acción del C9 en las células renales. ....	34
<b>Figura 7.</b> Interacción del antagonista OPC 21268 de la AVP con un modelo computacional del receptor V1a.....	19	<b>Figura 17.</b> Posibles mecanismos de acción del C9 en la cascada de coagulación.....	35
<b>Figura 8.</b> Estructura química y nombre oficial del POLI-1.....	21	<b>Figura 18.</b> Línea del tiempo del procedimiento utilizado en el experimento para los grupos normales.....	40
<b>Figura 9.</b> Efectos de la exposición aguda al DMSO (100 µl/rata) y diferentes dosis de POLI-I (4, 8 y 16 mg/kg de P.C.) sobre la concentración de glucógeno hepático....	22	<b>Figura 19.</b> Línea del tiempo del procedimiento utilizado para los subgrupos.....	40
<b>Figura 10.</b> Estructura química y nombre oficial del compuesto 1.....	23		



## RESUMEN.

**INTRODUCCIÓN:** La creación de fármacos acuaréticos (que sólo evitan la reabsorción de agua sin afectar a los electrolitos), es decir, diuréticos que sólo inducen la excreción de agua libre de solutos, generaría considerables beneficios en casos que cursan con retención de agua como en la insuficiencia cardiaca, cirrosis hepática, SIADH (síndrome de la secreción inapropiada de hormona antidiurética). La benzazepina *N*-sustituida (C9) es un compuesto no peptídico con sugerida actividad antagonista de receptores de vasopresina u hormona antidiurética, y actualmente se está desarrollando en cuanto a sus propiedades farmacológicas. Dentro del desarrollo de un nuevo fármaco los estudios preclínicos toxicológicos y de seguridad farmacológica son indispensables para garantizar que no se someterá a un riesgo irrazonable en etapas clínicas. En el presente estudio se evaluó el (C9) para determinar, toxicológicamente, el efecto sobre órganos y procesos que pudieran ser el blanco del compuesto, de acuerdo a sus propiedades físico-químicas o bien por su actividad antagonista, tales como su efecto a nivel renal y el equilibrio hidroelectrolítico, hepático y en la coagulación sanguínea (Vía intrínseca - Factor Von Willebrand y vía extrínseca).

**OBJETIVO:** Determinar los efectos de C9 haciendo una evaluación toxicológica subaguda, de dosis-efecto a nivel hepático, renal y en la coagulación sanguínea.

**MÉTODO:** Se utilizaron ratas Wistar machos entre 170 – 220 g., mantenidas en condiciones estándares. Se formaron 5 grupos: Control (solución salina 0.9%) , control DMSO (vehículo), 1, 10 y 20 mg/Kg PC de C9 y se trataron diariamente (IM) durante 15 días. Se tomaron muestras de orina y sangre antes de comenzar los tratamientos y al finalizarlos, para determinar los estados basales y experimentales de las variables. A nivel hepático se evaluó la cantidad de glucógeno, glicemia, así como las enzimas Transaminasa Glutámico Pirúvica (TGP) y la Transaminasa Glutámico Oxalacética (TGO). A nivel renal y del equilibrio hidroelectrolítico se evaluaron las siguientes variables: Sodio, potasio y osmolaridad efectiva sérica;

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

densidad, sodio y potasio urinario, así como el volumen urinario e ingesta de agua en 24 horas. También fueron evaluados algunos biomarcadores de daño tales como: proteinuria, glucosuria, pH, bilirrubina, depuración de creatinina. Para evaluar el efecto en la coagulación sanguínea se determinaron los tiempos de Protrombina (TP) y Tromboplastina (TTPa). Finalmente se realizó un estudio histológico renal y hepático, con tinciones de Hematoxilina – Eosina (H-E) y Periodic Acid Schiff (PAS). **ANÁLISIS ESTADÍSTICO:** Los datos fueron analizados obteniendo la media +/- EEM, por medio de las pruebas *t-student* haciendo la comparación entre los estados basales y experimentales para cada uno de los grupos. Además, se hizo una prueba de Dunnet multiple, específicamente en la determinación del glucógeno hepático y tasa de excreción de electrolitos para comparar todos los grupos con el control. Se consideró diferencia significativa si el valor  $p < 0.05$ .

**RESULTADOS:** No hubo cambios en los biomarcadores de daño renal. En cuanto a daño hepático, se presentó un ligero aumento de la TGP Y TP en la dosis de 20 mg/Kg de C9 lo cual dio un indicio de daño moderado; además de mostrar un aumento de glucógeno, con todas las dosis de C9. El C9 afectó el equilibrio hidroelectrolítico aumentando hasta en un 45 % la excreción de orina e incrementando la osmolaridad efectiva sérica y la concentración de sodio, la cual alcanzó niveles entre 148 a 160 mEq/L con las diferentes dosis de C9; además de generar una disminución en la densidad urinaria, es decir, una orina mas diluida con una excreción de electrolitos ( $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ) normal. No se observaron cambios en el TTPa. En cuanto a los estudios histológicos, no se observaron procesos de daño severo como zonas necróticas y/o apoptóticas, ni presencia de procesos inflamatorios. **CONCLUSIONES:** A nivel hepático se encontró que el C9 indujo un aumento en la cantidad de glucógeno. Además no mostró efectos tóxicos a excepción de la dosis de 20 mg/Kg, en la cual comenzó a generar un daño moderado, al incrementar la TGP (Transaminasa Glutámico Pirúvica) y TP (Tiempo de Protrombina). El C9 afectó el equilibrio hidroelectrolítico incrementando el volumen urinario, la concentración de  $\text{Na}^+$  sérico y la osmolaridad efectiva. Disminuyó la densidad urinaria y mantuvo una excreción normal de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  urinario, mostrando un efecto “acuareético”, probablemente por su actividad antagónica sobre los receptores V2 renales. El C9 no generó daños en el riñón bajo

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

las condiciones del experimento. El C9 no afectó el Tiempo de Tromboplastina (TTPa), por lo tanto no se ve alterada la liberación del factor Von Willebrand (vía intrínseca).

### ABSTRACT

**INTRODUCTION:** The discovery of aquaretic drugs (drugs which avoid water reabsorption and induce urine formation electrolytes free) would give important benefits in several diseases strongly related to water retention, such as: failure congestive heart, hepatic cirrhosis, SIADH (syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone), among others. The benzazepine *N*-substituted (named C9), is a non-peptide compound which suggests an antagonist activity on V1a and V2 vasopressin receptors, and currently it is developing about its pharmacology properties. As a part of a new drug development, the toxicological studies as well as safety pharmacology preclinical studies are strictly required for the purpose of guarantee that there will not be unreasonable hazards into clinical phases. In this study, the C9 was assessed to determine toxicological effects on target organs, according to its physicochemical properties or antagonistic activity, such as renal and hepatic effects: hydro-electrolyte balance and blood clotting (intrinsic and extrinsic pathways).

**OBJECTIVE:** Determine the effects caused by C9 through a subacute toxicological assessment, dose – effect, in liver, kidney and clotting blood.

**METHODS:** Male Wistar rats (170 – 220 g, body weight) were used in this study, the animals were kept under standard conditions. It made up five groups: Control group (saline solution 0.9%); DMSO control group (vehicle), 1, 10 y 20 mg/Kg b.w. of C9. A single administration (IM) was applied daily, for 15 days. Furthermore, samples of urine and blood were taken to get the basal and experimental stages (before and after treatment). Hepatic glycogen as well as Glutamic Pyruvic Transaminase (GPT) and Glutamic Oxaloacetic Transaminase (GOT) enzymes were assessed. Similarly were assessed the following variables: Concentration of sodium and potassium in serum and effective osmolality; density sodium and potassium in urine, as well as volume urine and water intake in 24 hours. Some biomarkers were evaluated, as proteinuria, glucosuria, pH, bilirrubine and creatinine clearance. With regard to clotting blood, the

Prothrombin Time (PT) and active Partial Thromboplastin Time (aPTT) were measured. Finally, a histological study with staining of Hematoxylin –Eosin (H–E) and Periodic Acid Schiff (PAS) was made. **STATISTICAL ANALYSIS:** Data were analyzed using a *t- student test*, (values are expressed as mean  $\pm$  SEM); then, a comparison between basal and experimental stages was done. For hepatic glycogen determination and excretion electrolytes (sodium and potassium) rate, a multiple Dunnett test was used (significant difference if value  $p < 0.05$ ).

**RESULTS:** Respect to hepatic injury, the results showed a slightly increase to GPT and PT in the group 20 mg/Kg b.w.of C9; which gave indication of moderate damage; as well as a glycogen increase under all treatments with C9 (groups: 1, 10 and 20 mg/Kg). The hydro-electrolyte balance was affected by C9, tending to increase the urine excretion till 45 %, as well as the effective osmolality and sodium concentration in blood, which achieved levels from 148 to 160 mEq/L, with all C9 doses (groups: 1, 10 and 20 mg/Kg), this also led a decreasing in density urine, namely, a diluted urine with normal electrolytes (sodium and potassium) excretion. There were no changes in damage renal biomarkers. In the measurement of aPTT, there was no change. Histological studies did not show severe damage, either inflammatory process, necrotic or apoptotic areas. **CONCLUTIONS:** With regard to hepatic findings, the C9 did not show toxic effects, except to doses of 20 mg/Kg, which provoked moderate damage, inasmuch as increased GPT (Glutamic Pyruvic Transaminase) and PT (Prothrombin Time). In addition the C9 induced increasing of hepatic glycogen. The C9, also affected in the hydro – electrolyte balance, as follows: it increased urine volume, sodium concentration in blood and effective osmolality, it decreased urine density and kept normal excretion of sodium and potassium, namely, generated an “aquaretic” effect, probably for its antagonist activity on renal V2 receptors. The C9 did not lead damage in kidney under experimental conditions. Also, it did not affect the active Partial Thromboplastin Time; therefore, the Von Willebrand factor release was not blocked by C9.

## 1.0- INTRODUCCIÓN

### 1.1 HIPÓFISIS.

La hipófisis o pituitaria es una glándula endocrina localizada en la base del cerebro (silla turca) y se conecta por el tallo hipofisiario a la eminencia media del hipotálamo, formando la unidad funcional hipotálamo-hipófisis. En la rata, la hipófisis está formada por tres lóbulos, cada uno de los cuales secreta hormonas específicas, así, el lóbulo anterior o adenohipófisis sintetiza y secreta las hormonas: de crecimiento (GH), prolactina (PRL), adrenocorticotropina (ACTH), hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH) y tirotropina (TSH). El lóbulo intermedio sintetiza y secreta variantes de una misma hormona; hormona estimulante de los melanocitos alfa y gamma ( $\alpha$ MSH y  $\beta$ MSH). El lóbulo posterior o neurohipófisis secreta las hormonas oxitocina (Oxy) y arginina vasopresina (AVP); esta última también llamada hormona antidiurética (ADH) (Guyton y Hall, 2006) (Figura 1).

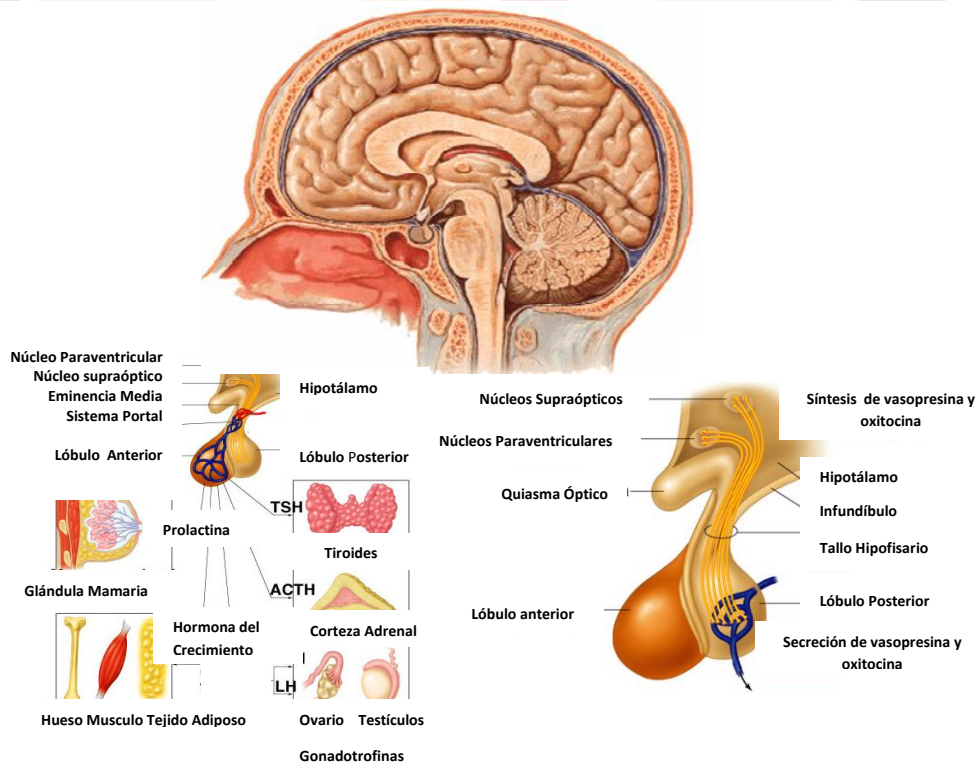


Figura 1. Descripción de la glándula hipófisis y sus hormonas (modificada de Netter, 1972; Seeley y col., 2009).

## **1.2 ARGININA VASOPRESINA (AVP).**

La AVP es una molécula polipeptídica de nueve aminoácidos: Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-GlyNH<sub>2</sub>, que junto con la Oxy, son sintetizadas en los somas neuronales de los núcleos supraópticos y paraventriculares del hipotálamo y transportadas por vía axónica (junto con las neurofisinas I para Oxy y neurofisisina II para la AVP), hasta las terminaciones nerviosas localizadas en la neurohipófisis, desde donde son liberadas a la circulación general (Guyton y Hall, 2006). La secreción de AVP está bajo el control de múltiples mecanismos neuroendocrinos (Scott y col., 2009)

Las funciones más conocidas de la AVP son: a nivel renal el efecto antidiurético, y a nivel del músculo liso vascular, efecto vasoconstrictor. Sin embargo, nuevas acciones de la AVP sobre otros tejidos se han venido descubriendo, así, en el hígado la AVP estimula la glucogenólisis (Hiroyama y col., 2007), sobre las células del endotelio vascular y plaquetas induce liberación del factor Von Willebrand, sobre el sistema inmune actúa como inmunorregulador/inmunoestimulador (Quintanar y col., 2004) en el sistema nervioso central (SNC), participa en los procesos de memoria y aprendizaje, comportamiento social y estados emocionales como la agresión, miedo y ansiedad (Zink y col., 2010). Junto con la hormona liberadora de corticotrofina (CRH), la AVP juega un papel crucial en la regulación de la secreción de ACTH y forma parte del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. Éste eje es el que permite la adaptación de los individuos a situaciones de estrés de cualquier naturaleza (Goodman y Gilman, 1998) (Quintanar y col., 2004)(Zelena y col., 2007).

## **1.3 REGULACIÓN DE LA AVP.**

A través del efecto antidiurético, la AVP participa en la homeostasis osmótica de los líquidos corporales al conservar el agua a través de aumentar la permeabilidad de los túbulos colectores de las nefronas del riñón. Esto lo hace a través del siguiente mecanismo: cuando la osmolaridad de los líquidos corporales se incrementa, es decir se concentran, el cambio es detectado por células receptoras especializadas llamadas osmorreceptores, localizadas en el área hipotalámica anterior. Desde aquí, sale información en forma de potenciales de acción nerviosos a los núcleos supraópticos y paraventriculares del hipotálamo que secretan a nivel de la neurohipófisis la AVP. Una

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

vez en el torrente sanguíneo, la AVP llega a los túbulos colectores del riñón en donde interactúa con receptores V<sub>2</sub>, induciendo aumento de la permeabilidad al agua, la cual es reabsorbida, regresándola al torrente sanguíneo. Los efectos renales de la AVP son mediados por los receptores V<sub>2</sub> de AVP, que inducen la inserción en la membrana luminal, canales de agua llamados acuaporinas 2 (AQP2) (Perucca y col., 2008) (Griffante y col., 2005). De esta manera, al retenerse el agua disminuye la concentración de solutos en los líquidos corporales y la cantidad de orina formada, la cual queda además, muy concentrada. Lo opuesto ocurre cuando hay una disminución de la osmolaridad de los líquidos corporales, lo que causa disminución de la actividad de las células osmorreceptoras y de la secreción de AVP. Una disminución de AVP da lugar a una formación de orina incrementada y diluida (Figura 2) (Goodman y Gilman, 1998).

Por otra parte, la AVP también participa en la regulación de los volúmenes líquidos corporales de la siguiente manera: cuando el volumen sanguíneo disminuye drásticamente, como ocurre en un sangrado abundante, al caer la presión arterial, los receptores de baja presión de las aurículas cardíacas, de las grandes venas y de los vasos pulmonares son estimulados, y envían señales nerviosas a través del nervio vago al núcleo del tracto solitario en el bulbo raquídeo. Desde aquí, sale una vía inhibitoria hacia el núcleo caudal-ventral del bulbo y desde aquí una vía excitadora al hipotálamo que estimula la secreción de AVP. La AVP interactúa con los receptores V<sub>1a</sub> del músculo liso vascular arteriolar provocando vasoconstricción (Perucca y col., 2008). El resultado global de los efectos de la AVP es la vasoconstricción arteriolar y el incremento de la presión arterial (Ganong, 2005).

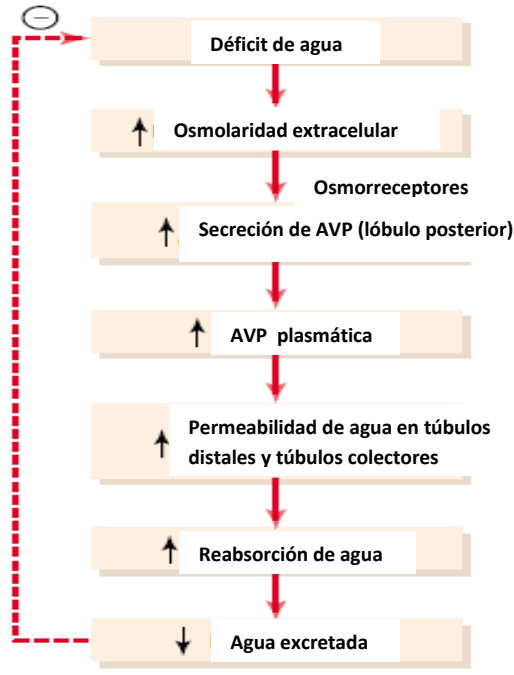


Figura 2. Mecanismo de retroalimentación para la regulación de la secreción de la hormona antidiurética (ADH o AVP) a través del sistema de osmorreceptores hipotalámicos (modificada de Guyton y Hall, 2006).

#### 1.4 RECEPTORES DE AVP.

La AVP actúa sobre receptores membranales específicos, de los cuales se han identificado al menos 3 subtipos: V1a, V1b y V2 (Koshimizu y col., 2006) (Tabla 1). Estos receptores son del tipo transmembranal acoplados a proteínas G (GPCR), y se han definido en base a su distribución en los tejidos y a su respuesta a diversos fármacos (Griffante y col., 2005). Los receptores V1a se hallan ampliamente distribuidos en el organismo, y se encuentran en el músculo liso vascular, miocardio, hígado, riñón, corteza adrenal, diversas partes del SNC, testículos, ovarios, timo y otras células del sistema inmune (Villabona, 2010) ( Quintanar y col., 2011) (Griffante y col., 2005) (Ganong, 2005). Los receptores V1b se han identificado en la hipófisis anterior y median la liberación de corticotropina (ACTH) (Villabona, 2010), en el hipocampo, corteza frontal, putamen, amígdala central e hipotálamo (Griffante y col., 2005). Por su parte, los receptores V2 se han encontrado en el endotelio vascular, plaquetas y en las células del túbulo colector del riñón. Los receptores V2 están acoplados al mecanismo de señalización que media la producción de AMP cíclico como segundo mensajero, mientras que los receptores V1a y V1b están acoplados al sistema de hidrólisis del



fosfatidilinositol movilizando el  $\text{Ca}^{++}$  intracelular (Villabona, 2010)( Griffante y col., 2005) (Tabla 1 y Figuras 3 y 4).

Subtipo	Señalización intracelular	Localización	Funciones
V1a	Acoplamiento con la proteína Gq/IP3/ $\text{Ca}^{++}$	Células musculares lisas vasculares Cardiomiocitos Hepatocitos Plaquetas Cerebro  Miometro Suprarrenal	Vasoconstricción  Hipertrofia miocardio Glucogenólisis Agregación plaquetaria Memoria, adaptación al estrés, ritmos circadianos Contracción uterina Estimulación de secreción de cortisol y aldosterona
V1b	Acoplamiento con la proteína Gq/IP3/ $\text{Ca}^{++}$	Hiipófisis anterior  Médula adrenal Células $\beta$ del páncreas Cerebro	Liberación de ACTH  Secreción de insulina Adaptación al estrés
V2	Acoplamiento con la proteína Gs/AMPC	Membrana basolateral de las células del túbulo colector  Células músculo liso vascular Células endoteliales vasculares  Neumocitos tipo II	Reabsorción de agua libre (inserción de AQP-2 en la membrana apical; inducción de la síntesis de AQP-2)  Vasodilatación Secreción de factor von Willebrand y factor VIII Estimulación de la reabsorción de Na

AQP2: aquaporina 2; IP3: fosfatidilinositol.

Tabla 1. Clasificación, localización y funciones de los diferentes subtipos de receptores de AVP (Villabona, 2010).

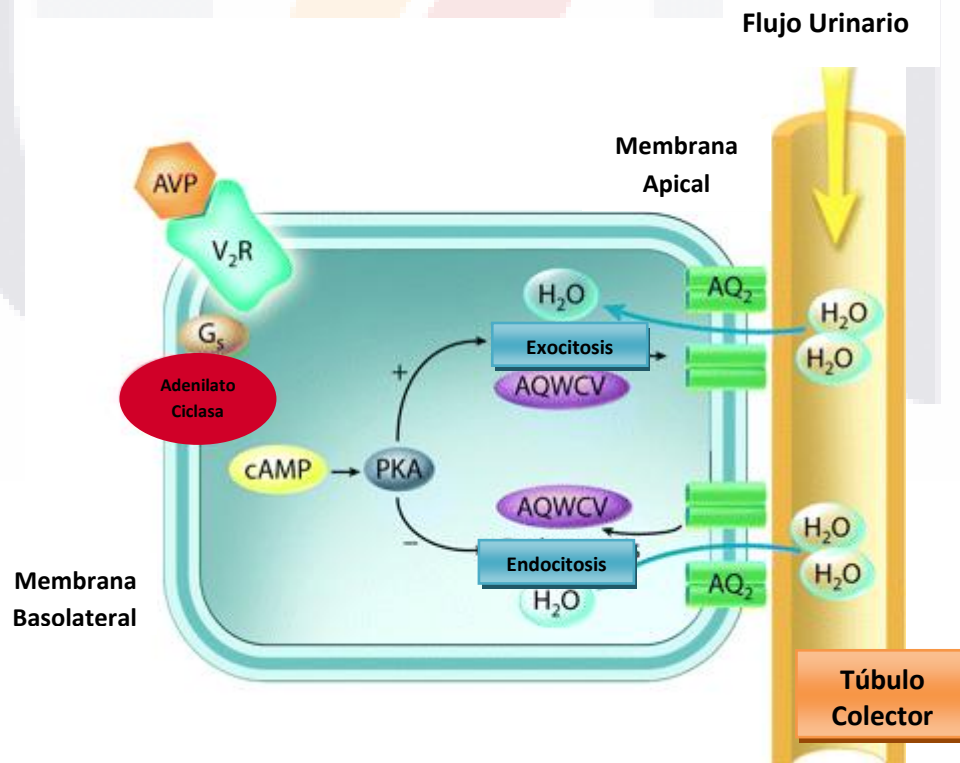


Figura 3. Activación de los receptores V2 de AVP (modificada de Finely y col., 2008).

La unión de la AVP a los receptores V<sub>2</sub>, estimula a la proteína G<sub>s</sub> acoplada a la adenilato ciclasa, causando la producción de cAMP lo cual activa a la proteína quinasa A (PKA). Esta vía incrementa la exocitosis de vesículas contenedoras de acuaporinas tipo 2 (AQMCV) e inhibe la endocitosis de las vesículas, ambos procesos resulta en el aumento de inserción de acuaporinas (AQ2) en la membrana apical. Esto mantiene un incremento en la permeabilidad de agua desde el túbulo colector.

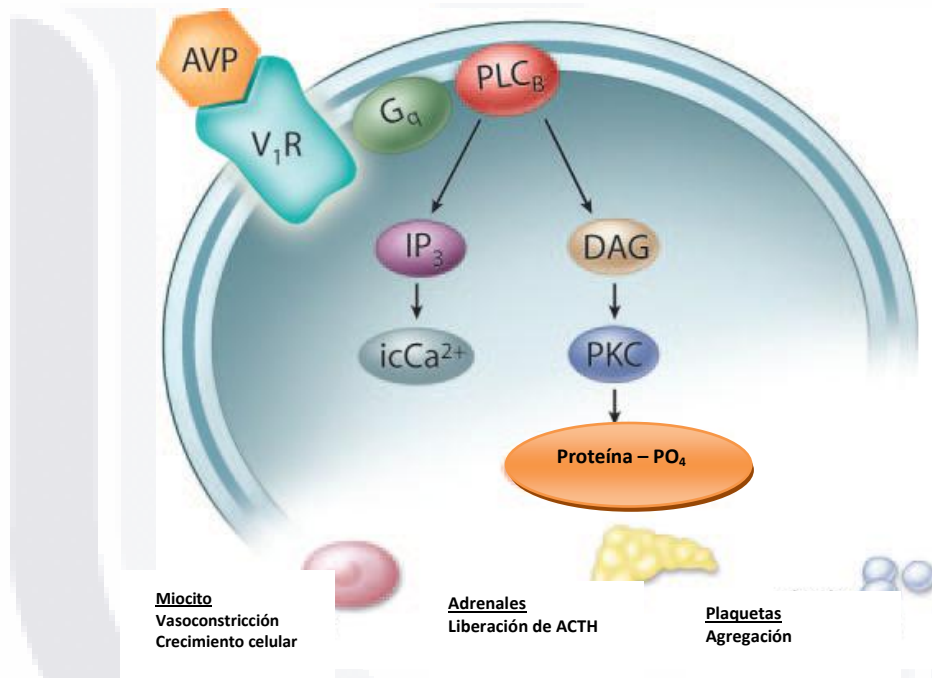


Figura 4. Activación de los receptores V<sub>1</sub> de vasopresina (Finely y col., 2008).

La unión de la AVP al receptor V<sub>1</sub>, estimula la fosfolipasa de membrana (PLC<sub>β</sub>) por la activación de proteína G<sub>q</sub>, lo cual trae como resultado la formación de inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y la movilización de calcio intracelular (icCa<sub>2</sub>). Por otro lado, se genera una cascada de fosforilación, mediante el diacilglicerol (DAG) y la proteína quinasa C (PKC), lo cual según la célula blanco, tiene diversos efectos: vasoconstricción, crecimiento celular, liberación de la hormona adrenocorticotropina (ACTH), agregación plaquetaria (Finely y col., 2008), glucogenólisis (Goodman y Gilman, 1998), etc.

## 1.5 AVP Y DIVERSAS PATOLOGÍAS.

El papel de la AVP en la fisiopatología de la insuficiencia cardiaca congestiva crónica (IC), cirrosis hepática (CH) y el síndrome de secreción inadecuada de ADH (SSIADH), es muy importante, ya que es la responsable de la retención excesiva de agua libre e hiponatremia, y responsable de su agravamiento, que eventualmente puede conducir a la muerte (Quittnat y Gross, 2006)( Gassanov y col., 2011). Aunque el mecanismo por el cual se incrementa la secreción de AVP en la IC y CH no ha sido bien establecido. Sin embargo, uno de los mecanismos propuestos para la secreción aumentada de AVP es la activación de los receptores de baja presión en las aurículas cardiacas, venas centrales y vasos pulmonares (vide supra) (Chatterjee , 2005), dando lugar a los efectos conocidos de la AVP sobre el riñón (absorción de agua libre) y la vasoconstricción, situación que de no corregirse, lleva a la muerte de los pacientes. La hiponatremia se define como una disminución en la concentración de sodio en el plasma sanguíneo por debajo de 135 mEq/L. Cuando la hiponatremia es causada por un exceso del líquido extracelular se le denomina hiponatremia hipervolémica (Ghali y col., 2009).

En problemas cardiacos, como la insuficiencia cardiaca congestiva crónica, o hepáticos como la cirrosis, existe retención de agua por exceso en la secreción de AVP, que conduce a un estado de hiponatremia. En estas patologías, la estimulación de la secreción de AVP no es dependiente de los cambios osmóticos, sin embargo, los efectos de la AVP sobre el riñón causan un incremento en la cantidad de agua que se reabsorbe a través del mecanismo de las AQP2. Un abordaje para tratar de ayudar a estos pacientes ha sido el incrementar la pérdida de agua libre del cuerpo y así para aliviar el exceso de agua sin pérdida de electrolitos. Para este fin se han desarrollado fármacos con efectos bloqueadores de los receptores V2 y V1a de AVP, que incrementarían la pérdida de agua libre por el riñón y disminución de la presión arterial. Actualmente, se está explorando el uso de antagonistas de los receptores V2 y V1a para tratar la congestión y el edema asociado a la insuficiencia cardiaca congestiva crónica y la cirrosis hepática. Se piensa que el uso de estos antagonistas de AVP, pueden ofrecer más beneficios que los obtenidos con los diuréticos de asa convencionales, que además de la pérdida de agua, provocan pérdida de electrolitos que agravan el desequilibrio

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

hidroelectrolítico (Veeraveedu y col., 2010). Debido a esto, los investigadores están en la búsqueda de fármacos alternativos, que bloqueen de manera específica los receptores V2 de AVP del riñón.

### **1.6 AVP, COAGULACIÓN SANGUÍNEA Y EL FACTOR VON WILLEBRAND.**

La presencia de receptores de V2 de AVP en las células del endotelio vascular y en las plaquetas ha sido bien documentada así como su participación en la coagulación sanguínea al inducir la liberación del factor Von Willebrand (Kaufmann y Vischer, 2003). El factor Von Willebrand es una proteína plasmática secretada por las células del endotelio vascular y las plaquetas y su papel es proteger al factor plaquetario VIII evitando su proteólisis.

La enfermedad de Von Willebrand es una alteración de la coagulación sanguínea, hereditaria, autosómica dominante, producida por un déficit del factor Von Willebrand. Su incidencia en la población general es de 1:10000. Es el trastorno de la coagulación con mayor prevalencia en mujeres en edad fértil. Las personas con enfermedad de Von Willebrand presentan un patrón de sangrado similar de las alteraciones plaquetarias (sangrado de mucosas, menorragias y epistaxis). El sangrado asociado a la enfermedad de Von Willebrand es tratado con desmopresina (1-deamino-8-p-arginina-vasopresina (DDAVP), análogo sintético de la AVP (Pérez y col., 2003). La DDAVP, desarrollada originalmente como un medicamento antidiurético, actualmente también se utiliza para aumentar los niveles plasmáticos del factor Von Willebrand, el activador del plasminógeno (t-PA) y el factor VIII de la cascada de la coagulación para mejorar los niveles plasmáticos de FvW/VIII en los trastornos como la hemofilia A y la enfermedad de Von Willebrand. (Wall y col., 1998).

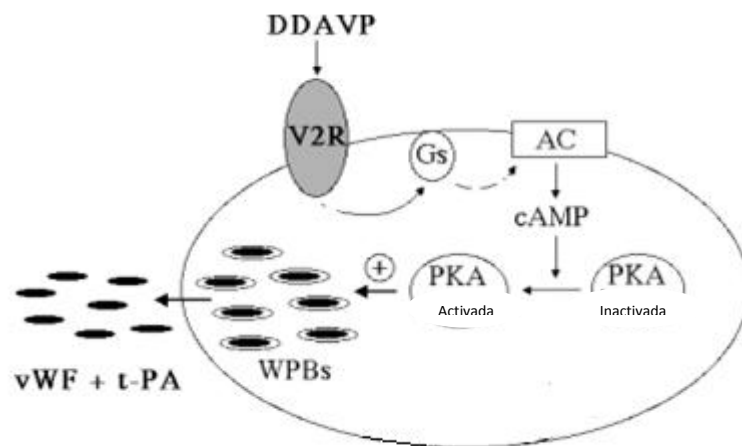


Figura 5. Mecanismo de acción de la DDAVP induciendo la liberación del Factor Von Willebrand (FvW) y la secreción de t-PA. La DDAVP se une a los receptores V2 de AVP endoteliales, activando a la proteína G (Gs), a la adenilato ciclasa (AC), la producción de AMPc y la activación de la proteína quinasa A (PKA). La activación de la PKA estimula la exocitosis de WPBs (gránulos secretores), que conducen a la liberación de FvW y t-PA. Modificada de (Kaufmann y Vischer, 2003).

## 2.0 ANTAGONISTAS NO PEPTÍDICOS DE LA AVP (VAPTANES).

### 2.1 HISTORIA.

Los diuréticos constituyen un grupo importante de medicamentos que se usan para ajustar el volumen y la composición de los líquidos corporales en diversas situaciones clínicas, como la hipertensión arterial, insuficiencia cardiaca, cirrosis hepática, y en el SIADH (Goodman y Gilman, 1998).

El gran interés para crear antagonistas de los receptores de vasopresina específicos yace en la creencia de que estos compuestos pueden ser útiles en varias situaciones clínicas. Así, los antagonistas selectivos para los receptores V1 resultan beneficiosos cuando la resistencia periférica total se halla aumentada, como en la insuficiencia cardiaca congestiva crónica y la hipertensión arterial, mientras que los antagonistas selectivos para los receptores V2 sirven para evitar la resorción excesiva de agua libre, como en el síndrome SIADH y la hiponatremia relacionada con volumen sanguíneo efectivo reducido.

Poco después de la síntesis de la vasopresina por Du Vigneaud (1954), se empezaron a crear moléculas peptídicas análogas derivadas de la AVP con efectos antagonistas sobre los receptores selectivos V1 y V2 de AVP.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Manning y Sawyer en la década de los setentas, desarrollaron antagonistas peptídicos para la respuesta antidiurética y vasopresora de la AVP. Comenzando por modificar a la desmopresina, un agonista peptídico, potente y altamente específico a receptores V2. Ellos sintetizaron exitosamente varios análogos de la vasopresina que antagonizan efectivamente la respuesta antidiurética de AVP in vivo (Manning y Sawyer 1991); un ejemplo de este tipo de antagonistas es el [1-deaminopenicilamina-2-(*O*-metil)-tirosina]arginina vasopresina (dPTir-(Me)AVP) (Koob y col., 1981).

Sin embargo este tipo de antagonistas han mostrado actividad limitada debido a que con la administración prolongada, se revierten los efectos antagonistas, es decir los efectos se convierten en agonistas, tiene poca biodisponibilidad oral, su vida media es corta, además de limitar su desarrollo para uso clínico como tratamiento en desordenes de retención de agua (Verbalis ,2002). Yamamura y col (1992), caracterizaron el primer antagonista no peptídico de receptores V2 de AVP llamado OPC-31260. Subsecuentemente más antagonistas similares fueron caracterizados con la ventaja de tener mayor biodisponibilidad por vía oral, así como una vida media mayor que los peptídicos, por lo que la creación de antagonistas de los receptores V2 con efecto permanentemente antagonista, es decir, que inhiban específicamente la expresión y activación de los canales del agua en los conductos colectores del riñón, proporcionarían una estrategia terapéutica más eficaz, no solo en individuos con síndrome SIADH, sino también en la situación mucho más frecuente de hiponatremia en sujetos con insuficiencia cardíaca congestiva crónica y cirrosis hepática.

La creación de fármacos acuaréticos (que solo evitan la resorción de agua sin afectar a los electrolitos), es decir, diuréticos que sólo inducen la excreción de agua libre de solutos, generaría considerables beneficios en casos que cursan con retención de agua como en la insuficiencia cardíaca, cirrosis hepática y síndrome nefrótico. Para favorecer la acuarexis se recurre, al menos, a tres métodos farmacológicos: inhibición directa de los canales de agua en los túbulos colectores, interferencia en la secreción de AVP a partir de la neurohipófisis y bloqueo de los receptores V2 (Goodman y Gilman, 1998). De estas alternativas la más promisoria ha sido el descubrimiento de potentes antagonistas de los receptores V2 no-peptídicos. Hay muchas razones para esperar que,

a mediano plazo, estos fármacos estén disponibles para proporcionar un tratamiento seguro y eficaz para tratar los trastornos relacionados con la secreción excesiva de AVP.

Los antagonistas no peptídicos de la vasopresina (AVP), llamados *vaptanes*, se desarrollaron en la década de los noventa con el fin de antagonizar tanto el efecto presor como el antidiurético ( Okada y col.,1995)( Yamamura y col., 1998). La característica más importante de los antagonistas de los receptores V2 radica en que su bloqueo inhibe selectivamente la expresión y movilización de las AQP2, permitiendo la pérdida de grandes volúmenes de agua libre sin pérdida de electrolitos. Estudios en animales y humanos con insuficiencia cardiaca congestiva crónica, cirrosis hepática y síndrome SIADH, han permitido corroborar esta hipótesis (Villabona, 2010).

Aunque la estructura molecular de los vaptanes, difiere de la AVP compiten con ella por los receptores de AVP (Quittnat y Grosse, 2006). Algunos ejemplos de antagonistas V2 no-peptídicos son los siguientes (Robertson, 2011):

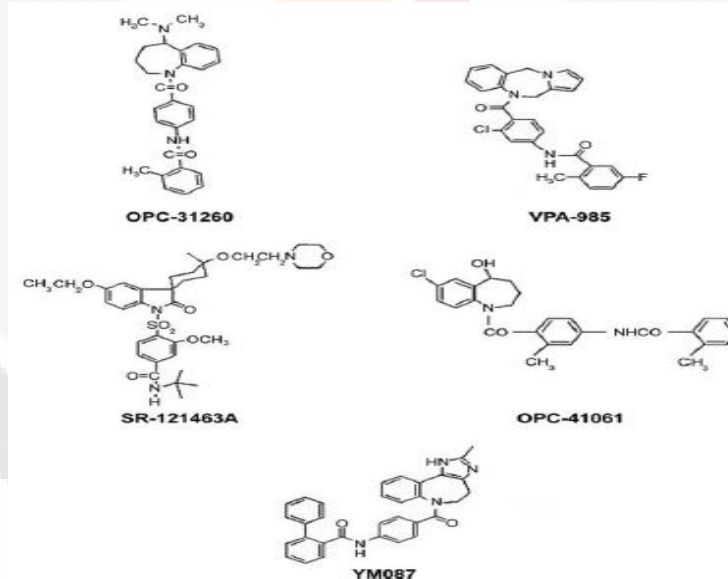


Figura 6. Estructura química de algunas moléculas antagonistas no-peptídicos de los receptores de AVP: YM-087 (conivaptan), OPC-41061 (tolvaptan), VPA-985 (lixivaptan), SR-121463B (Satavaptan) (Quittnat y Grosse, 2006).

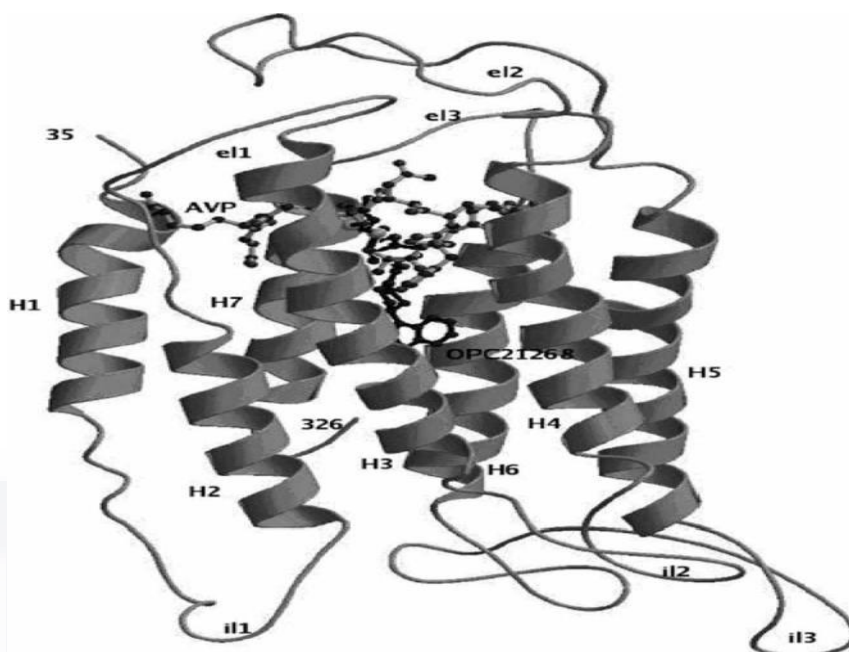


Figura 7. Interacción del antagonista OPC 21268 de la AVP con un modelo computacional del receptor V1a. Los asas son etiquetadas como EL1, EL2, EL3 y para los dominios extracelulares, y IL1, IL2, IL3 para los dominios intracelulares ( Quittnat y Grosse, 2006).

De estos compuestos, el tolvaptan se enlaza el receptor V2 de la arginina vasopresina y ha sido aprobado por la FDA de Estados Unidos (2009), aunque no comercializado todavía. El lixivaptan y satavaptan tienen efectos semejantes al unirse a los receptores V2. El conivaptan y el mozavaptan tienen la capacidad de fijarse a los receptores V1a y V2 (Sequera y col., 2009).

## 2.2 VAPTANES Y SUS EFECTOS TOXICOLÓGICOS.

La información de los efectos toxicológicos de estos compuestos es escasa, solo se tienen reportes de efectos secundarios como se muestra a continuación:

**Evento**



- Boca seca
- Sed
- Poliuria
- Constipación
- Hiperglicemia
- Hipotensión

Tabla 2. Efectos adversos de los vaptanes (Gassanov y col., 2011).

También se ha hecho hincapié en el riesgo de causar mielinólisis pontina central al corregir rápidamente la hiponatremia (Sterns, 2009).

Además, se ha reportado que la mayoría de los vaptanes son metabolizados en el hígado por el citocromo p450. Así, el conivaptan es metabolizado por la isoforma CYP3A4. Los vaptanes pueden interactuar con otros fármacos metabolizados por esta misma enzima. Cuando se administra por vía oral, el conivaptan, es excretado en un 83% por heces fecales y el resto por la orina. (Robertson, 2010) (Gassanov y col., 2011).

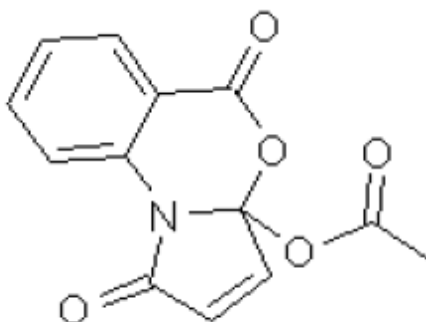
### **2.3 ANTAGONISTAS NO PEPTÍDICOS DE LOS RECEPTORES DE AVP HECHOS EN MÉXICO.**

A raíz de la necesidad de un mejor entendimiento y conocimiento sobre los efectos adversos y/o terapéuticos de los vaptanes, se ha querido estudiar más a fondo este tipo de fármacos. Sin embargo debido a los intereses de las compañías farmacéuticas que los producen, ha sido imposible acceder a ellos. Para resolver este problema, se decidió que los produjéramos en México. A la fecha, trabajando en colaboración el Instituto Politécnico Nacional (Correa y col., 2006) y la Universidad Autónoma de Aguascalientes, se han sintetizado varios de ellos. De estos, dos compuestos derivados del ácido antranílico y un derivado benzazepínico *N*-sustituido

llamado C9. En base a los estudios biológicos preliminares, el C9 parece ser el más prometedor.

### **2.3.1 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DEL POLI-1 Y EFECTOS BIOLÓGICOS.**

El Poli-1 es uno de los derivados del ácido antranílico, fue sintetizado por el Dr. Correa Basurto (Correa y col., 2006) en Laboratorio de Bioquímica de la ESM del IPN. El POLI-1 se caracteriza por ser cristales sólidos de color blanco con un peso molecular de 259 gr-mol, es hidrofóbico, soluble en una mezcla de etanol-agua (1:10), dimetilsulfóxido (DMSO) y solventes lipídicos. Presenta un punto de fusión de 156 +/- 3° C. (Correa y col., 2006). Los efectos toxicológicos agudos de este compuesto fueron estudiados por la M. en C. María Cruz Reyes (2009). Los efectos biológicos más destacados del POLI-1, fueron un incremento del glucógeno hepático (Figura 9), sugiriendo que el bloqueo de los receptores V1a de los hepatocitos indujo la inhibición de la glucogenólisis.



**3a-Acetoxy-5H-pirrolo(1,2-a) (3,1)benzoxazin-1,5-(3aH)-diona  
(POLI-1)**

Figura 8. Estructura química y nombre oficial del POLI-1.

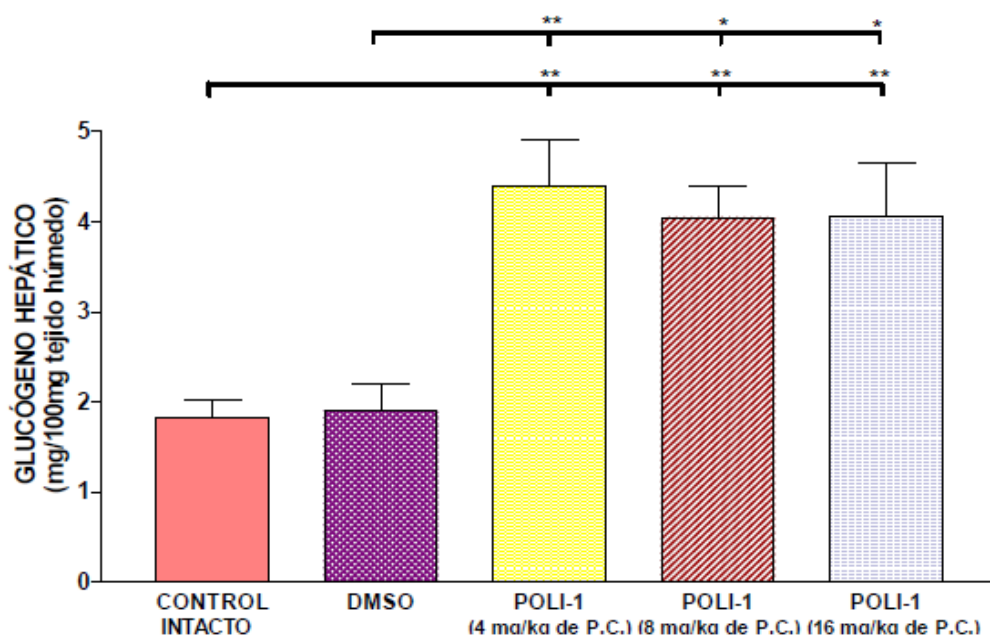
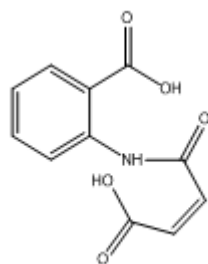


Figura 9. Efectos de la exposición aguda al DMSO (100  $\mu$ l/rata) y diferentes dosis de POLI-I (4, 8 y 16 mg/kg de P.C.) sobre la concentración de glucógeno hepático (mg de glucógeno/100 mg de tejido húmedo). Cada valor representa la media + EEM, n=6 ratas/grupo. Para fines de comparación, un grupo CONTROL INTACTO fue incluido en el estudio. Las diferencias se presentan como \* =  $p < 0.05$  y \*\* =  $p < 0.01$  (Reyes, 2009).

### 2.3.2 CARACTERÍSTICAS DEL C1 Y SUS EFECTOS BIOLÓGICOS.

El C1 presenta un punto de fusión de  $186 \pm 1^\circ \text{C}$  y peso molecular de 203.25 gr-mol. Es soluble en acetona y DMSO, fue sintetizado por el Dr. José Correa Basurto del Laboratorio de Modelado Molecular de la Escuela Superior de Medicina del IPN. Inicialmente fue concebido como agonista de los receptores adrenérgicos (Correa y col., 2006). Por sus características estructurales se pensó que también pudiese interactuar con los receptores vasopresinérgicos como posible antagonista. Los efectos antagonistas sobre los receptores V1a fueron estudiados *in vivo* por la M. en C. Scarlett Arianna Rosendo Villalobos (2010).



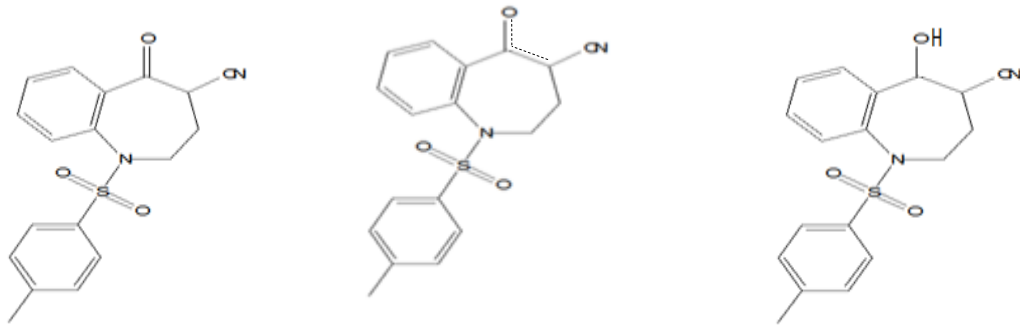
4-(2'-carboxi-fenilamino)-4-oxo-(Z)-2-ácido butenóico

Figura 10. Estructura química y nombre oficial del compuesto 1.

Los principales efectos biológicos de este compuesto fueron el bloqueo dosis dependiente de la respuesta presora de la AVP, encontrándose diferencias significativas a partir de 0.0001  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de dosis del C-1. Además del bloqueo vasopresor, el C-1 también bloqueo de manera dosis dependiente el efecto antidiurético de la AVP a partir de 0.1  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  del C-1 (Rosendo, 2009).

### **2.3.3 CARACTERÍSTICAS DEL C9 Y SUS EFECTOS BIOLÓGICOS.**

El C9 es un compuesto benzazepínico N-sustituido el cual fue sintetizado y evaluado por Citlalli Contreras-Romo (2011). Con base a los estudios *in silico*, mediante modelado molecular, este compuesto parece ser el más prometedor por su afinidad a receptores de AVP.



1-[(4-metil fenil) sulfonil]-5-oxo-2,3,4,5-tetrahidro-1H-1-benzazepina-1-carbonitrilo

Figura 11. Estructuras químicas y nombre oficial de C9.

La figura 12, muestra el efecto bloqueador de los receptores V1a de AVP del C9, utilizando un modelo *in vitro* de anillos de aorta de rata. En este estudio se observa el efecto antagonista dosis dependiente del C9 sobre el efecto presor de la AVP. Observe la disminución altamente significativa en la respuesta presora de la AVP, en la que la concentración más alta de C9 (590  $\mu\text{M}$ ) presenta un bloqueo semejante al V1880, un conocido bloqueador peptídico de los receptores V1a (Contreras, 2012).

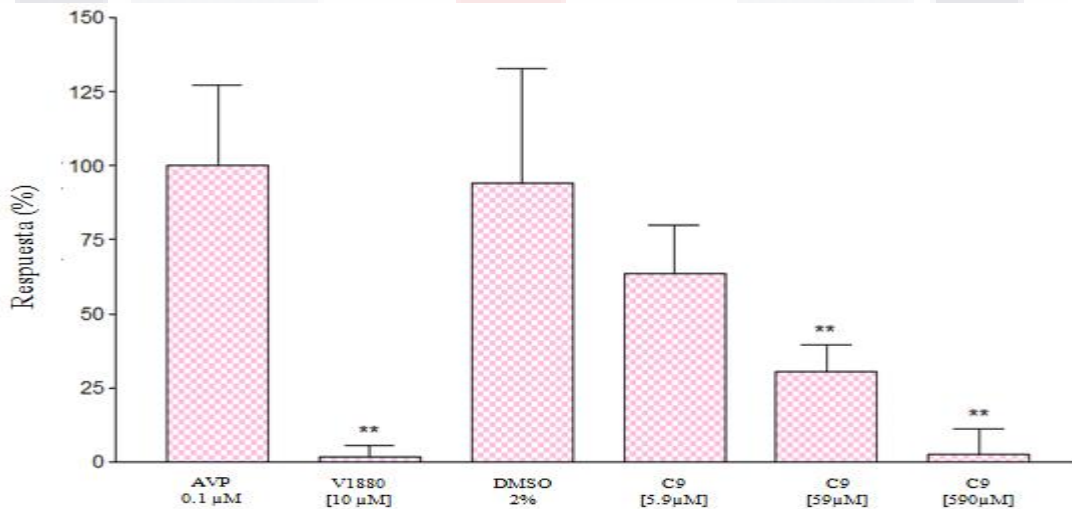


Figura 12. Representación de la respuesta a AVP con las diferentes concentraciones de C9, DMSO y V1880, \*\* $p < 0.01$  (Contreras, 2012).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Cabe señalar, que el C9 tiene equilibrio dinámico con una forma protonada y otra en resonancia entre el oxígeno y el carbono en posición “5-oxo” de la estructura como se muestra en la figura 11. Debido a la resonancia que presenta el electrón que forma la doble ligadura con el oxígeno en esta posición, se puede unir a un hidrógeno presente en el medio, o bien al tener actividad altamente electrónica en la parte del carbonitrilo, podría generar unión a moléculas y estructuras celulares como lípidos de membrana (lipoperoxidación) unión o desacople de complejos mitocondriales (depleción de ATP o daños al ADN mitocondrial), enlaces covalentes con proteínas y ácidos nucleicos (disrupción de funciones y/o mutagénesis) entre otros. Además de acuerdo a estudios hechos en los vaptanes, se ha reportado que en su mayoría de ellos, son metabolizados en el hígado por el citocromo p450 en la isoforma CYP3A4 (Robertson, 2010) (Gassanov y col., 2011) Este importante complejo oxidativo es parte fundamental en la biotransformación de xenobióticos para su eliminación; sin embargo en muchos casos generan metabolitos altamente electrofílicos y por lo tanto altamente reactivos, los cuales podrían generar cierto estrés oxidativo. Por su similitud en estructura, al menos en la parte farmacófora (parte benzazepínica), el C9 podría presentar estas características de biotransformación.

### **3.0 EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE LOS FARMACOS.**

Los efectos adversos de los medicamentos son los efectos nocivos e indeseables que se presentan tras la administración de un fármaco a las dosis utilizadas normalmente para prevención, el diagnóstico o el tratamiento de una enfermedad. ( Jaramillo y col., 2006).

Antes de utilizarse a nivel clínico, los compuestos deben evaluarse para identificar los efectos nocivos que producen sobre las estructuras y funciones de los diversos sistemas de órganos. Los estudios de toxicidad tiene como objetivo, establecer los efectos tóxicos en el hombre, decidir si el nuevo fármaco es razonablemente seguro para su experimentación clínica. Aunque ningún producto químico puede certificarse como totalmente seguro, ya que como afirmaba Paracelso, todas las sustancias son tóxicas y sólo la dosis determina la toxicidad, con frecuencia es posible estimar el riesgo o el peligro potencial que un agente químico puede ocasionar sobre la salud humana cuando es objeto a exposiciones agudas o crónicas. Para este propósito se utilizan

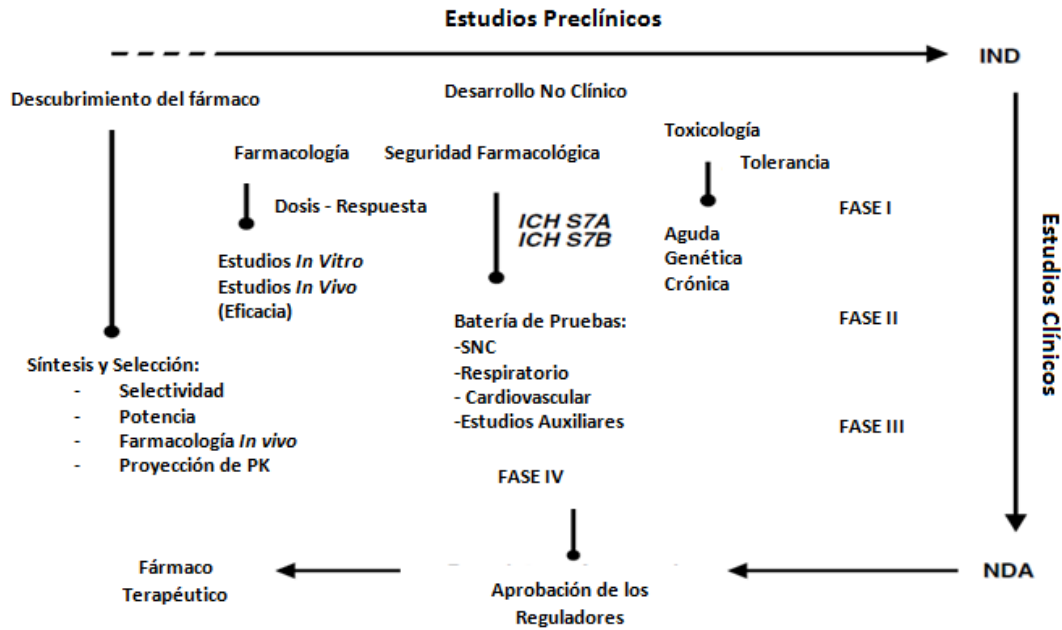
TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

animales expuestos a dosis únicas (toxicidad aguda) o repetidas (subaguda, subcrónica y crónica) del fármaco problema por la vía de administración que se piensa emplear en humanos. Si se piensa en la vía oral, todos los estudios se llevarán a cabo por esta vía.

De la misma forma si se piensa para vías intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, etc. Se deben hacer estudios toxicológicos por cada vía empleada, al menos para toxicidad aguda una dosis única, para subaguda y subcrónica de 15 días a 4 semanas. Las agencias regulatorias exigen que se establezca la menor dosis en la que aparecen efectos adversos relacionadas con la administración del fármaco y una dosis tóxica que ocasione efectos graves, sin producir más que una reducida mortalidad de los animales, debe haber un número de animales supervivientes lo suficientemente amplio como para que los exámenes histológicos y bioquímicos revelen diferencias significativas durante el estudio, como tampoco debe haber alteraciones sanguíneas, bioquímicas o histológicas de interés y menos aún, muertes. Se recomienda que se utilicen las especies animales cuyo metabolismo sea más parecido al ser humano. En general los estudios de toxicidad aguda se llevan a cabo en roedores (rata y ratón), la toxicidad subaguda, subcrónica, y crónica en rata y perro (Mendoza, 2008).

A diferencia de los ensayos clínicos, donde se establece una mínima o nula incidencia de efectos adversos, en los ensayos básicos y preclínicos, la detección de manifestaciones tóxicas no deberá resultar un hecho no deseado. De hecho de las tres dosis administradas en animales, en estos estudios, debe permitir localizar los órganos blancos de toxicidad del producto y estimar el perfil toxicológico del mismo. De esta manera se intenta disminuir las posibilidades de obtener resultados de efectos tóxicos severos e inesperados en fases clínicas (Mondelo y col., 1997).

De acuerdo con FDA (Food and Drug Administration) una posible entidad química con actividad farmacológica, tiene que pasar diferentes etapas o fases antes de poderse aplicar en humanos. Dentro de este desarrollo se tiene un apartado de tolerancia toxicológica y de seguridad farmacológica. Dentro de estos apartados las evaluaciones de efectos adversos en diferentes puntos del organismo son indispensables para garantizar que la nueva entidad no causará daños a humanos en etapas clínicas.



Esquema 1. Diagrama de flujo en desarrollo de un nuevo fármaco (Pugsley y col.,2008).

Una compleja interacción de disciplinas científicas preclínicas y modelos de estudio, son usados para caracterizar el perfil de seguridad de una nueva entidad química. Un programa de desarrollo no clínico, incluye datos desde modelos de descubrimiento del fármaco hasta la seguridad farmacológica y toxicológica donde una aplicación de investigación de un nuevo fármaco (IND, por sus siglas en inglés) es clasificado como candidato. La FDA revisa las aplicaciones del IND para asegurar que los sujetos que formarán parte de la investigación clínica en fase I, no serán sometidos a un riesgo irrazonable. EL candidato a fármaco procede a través de las múltiples etapas clínicas (fases I-III), después se hace una aplicación para nuevo fármaco a las autoridades regulatorias. En este documento tiene el propósito que la FDA apruebe el nuevo fármaco para su venta en el mercado.

Los objetivos del NDA son proveer suficiente información para permitir que los revisores de la FDA establezcan si el fármaco es seguro y efectivo para su propósito indicado. (Pugsley y col., 2008). Dentro de estas etapas de desarrollo algunas de las directrices que se deben seguir para garantizar la seguridad farmacológica son entre otras, evaluar diferentes variables a nivel de sistema nervioso central, cardiovascular, genitourinario, inmunológico, en sangre y procesos inflamatorios, como se muestra en la tabla 3.



Seguridad Farmacológica	Medida de variables
Sistema Nervioso Central	Coordinación, temperatura corporal, conducta, neuromuscular, sensorial-motor, convulsiones
Sistema Respiratorio	Frecuencia respiratoria, pH, pCO <sub>2</sub> , pO <sub>2</sub> , Volumen de ventilación pulmonar,
Sistema Cardiovascular	Presión sanguínea, Frecuencia cardiaca, ECG, gasto cardiaco, presión ventricular izquierdo, contractilidad, TRIaD, Herg, IC50
Otros Sistemas: Gastrointestinal Renal/Genitourinario Inmunológico Sangre	Tiempo de tránsito intestinal, secreción y vaciado gástrico, volumen urinario, Poteínas totales, Tasa de filtración glomerular, electrolitos (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , CL <sup>-</sup> ) Urea, agregación plaquetaria, tiempo de coagulación y sangrado.

Tabla 3. Algunos parámetros a evaluar en la etapa preclínica de seguridad farmacológica de acuerdo con la FDA ( Hondeghem y col., 2003)( Pugsley y col., 2008).

### 3.1 ANÁLISIS DOSIS – EFECTO TÓXICO.

Para que haya un efecto nocivo de algunas sustancias químicas sobre el organismo, necesariamente debe haber un contacto, una interacción química entre la molécula de esa sustancia externa y algún componente membranal o del interior de la célula en donde se dará la interacción, que da como resultado el cambio denominado efecto.

Uno de los postulados básicos de la toxicología es suponer que hay una relación causal entre la concentración del compuesto y los cambios que éste puede provocar en el organismo. Esta relación se ilustra muy bien en las gráficas que se han denominado curvas de dosis- efecto, en donde, se relaciona las concentraciones del compuesto a estudiar, con el cambio producido de acuerdo con el cambio fisiológico que se esté midiendo (Jaramillo y col, 2006).

### **3.2 EL HÍGADO Y SUS MECANISMOS GENERALES DE BIOTRANSFORMACIÓN Y ELIMINACIÓN.**

El hígado es el órgano central responsable de la captación selectiva, metabolismo y excreción de fármacos, xenobióticos y toxinas ambientales. Esta función esencial predispone al hígado a la toxicidad de los fármacos y es la primera razón del fracaso en el desarrollo de un agente farmacológico (Manmeet y col., 2011).

La captación celular y la unión a proteínas citosólicas son seguidas por las fases I y II de la biotransformación en la que se forman metabolitos con mayor hidrosolubilidad. Las reacciones de fase I involucran la oxidación, hidroxilación y otras reacciones mediante el citocromo P450 (CYP) en particular por la isoforma CYP3A4. La actividad del citocromo p450 varía entre individuos y su transcripción es regulada por los receptores nucleares sensibles a xenobióticos tales como el receptor pregnano X (PXR) y el receptor constitutivo androstano (CAR). Las fases de reacción II involucran reacciones de esterificación que forman conjugados con sulfato, ácido glucurónico, aminoácidos o moléculas de glutatión. Generalmente, esto da como resultado un incremento de la solubilidad en el agua y una disminución de la actividad farmacológica, facilitando así, la desintoxicación de los compuestos. Sin embargo, durante este proceso, puede ocurrir la producción de tóxicos intermediarios (DeLeve y col., 1995), debido a sus formas reactivas, mejor conocidos, como radicales libres. Estos radicales, subsecuentemente, conducen a daños hepáticos. Muchos de los efectos no deseados por los fármacos, es precisamente la hepatotoxicidad.

La manera en que estos radicales libres dañan , es por ser compuestos altamente electrofílicos, los cuales, promueven una gran variedad de reacciones; tales como, depleción de glutatión reducido, enlaces covalentes con proteínas, lípidos y ácidos nucleicos; inducción de lipoperoxidación. Todo esto trae como consecuencia efectos directos sobre organelos celulares tales como las mitocondrias, el retículo endoplásmico, el citoesqueleto, o sobre el núcleo. También, pueden tener efecto sobre funciones celulares, a través de la activación e inhibición de proteínas quinasas, factores de transcripción y expresión de genes. Ante este estrés celular, si los mecanismos de reparación y/o adaptación se ven rebasados, puede causar la muerte celular, ya sea por apoptosis o por necrosis, que generalmente se comienza a ver en la zona 3 o

centilobulillar del acino hepático, debido a la presencia del citocromo P450, el cual se encarga de biotransformar a los xenobióticos en su mayoría (Tarantino y col., 2009).

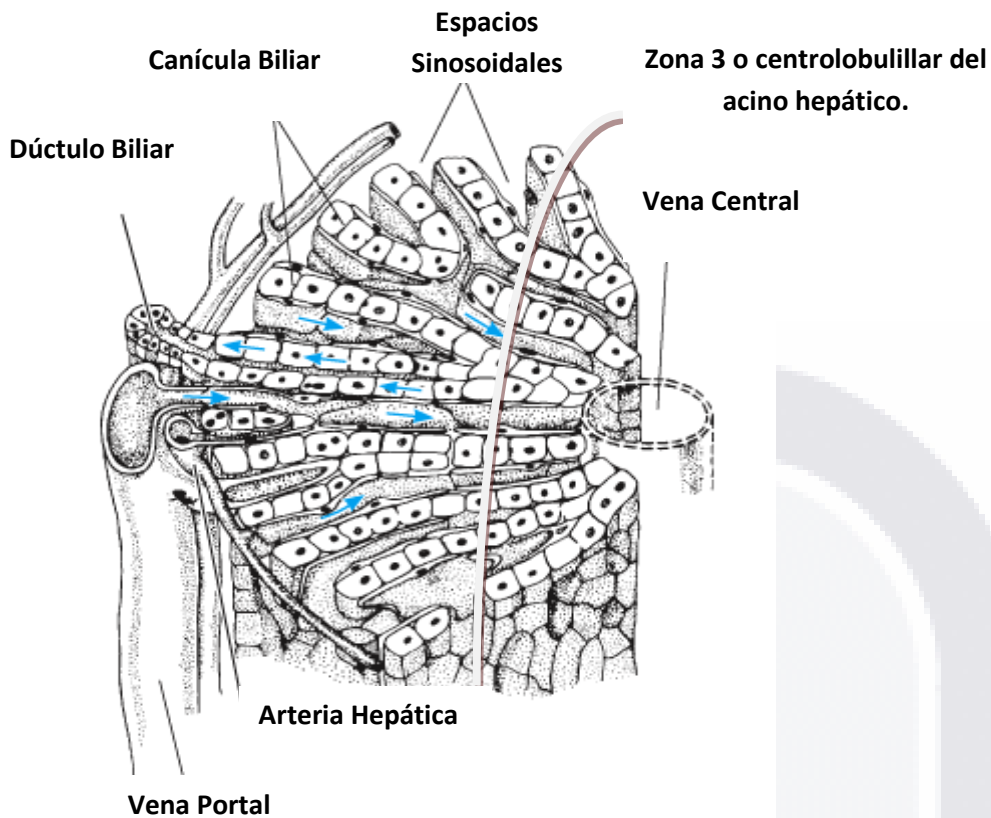


Figura 13. Características del acino hepático. Modificada de (Ganong, 2005).

### **3.2.1 POSIBLES MECANISMOS GENERALES DE C9 EN EL HÍGADO.**

De acuerdo a las características fisicoquímicas del C9 y a la sugerida actividad antagonista de AVP, aquí se presenta varios posibles mecanismos de acción y efectos hipotéticos. Estos mecanismos serían primeramente a través de receptores V1a de los hepatocitos, al bloquear el acoplamiento de la AVP al receptor, se estarían inhibiendo las funciones dependientes de AVP, en este caso, la glucogenólisis.

Otra posibilidad es que el C9 tenga efectos directos sobre las células. Como se mencionó anteriormente el C9 presenta partes en su estructura altamente electronegativas y en resonancia; además por sus características fisicoquímicas podría difundir a través de la membrana celular y entrar al espacio intracelular, lo que generaría desequilibrios en los procesos celulares o en su estructura, tales como acoplamiento a proteínas celulares, oxidación de lípidos de membrana

(lipoperoxidación), desacople de complejos de la cadena respiratoria (depleción de ATP), alteración de ácidos nucleicos (mutagénesis) e incremento de  $Ca^{++}$  intracelular (activación de enzimas hidrolíticas, desequilibrio del citoesqueleto), entre otros posibles efectos.

Aunque no se conoce la vía de biotransformación del C9, es posible que por su similitud estructural con los vaptanes y por sus características de resonancia electronegativa, la biotransformación del C9 ocurra por acción de alguna de las isoformas del citocromo p450. El metabolito generado podría ser altamente reactivo y generar estrés oxidativo, causando así los desequilibrios descritos anteriormente.

Cabe hacer mención, que existen moléculas endógenas antioxidantes tales como el Tiol tripeptido, glutatión (GSH;  $\gamma$ -L-glutamyl-L-cisteinglicina); y superóxido dismutasa (Noctor G. y col, 2011) ( Yang H y col, 2009); las cuales proveen electrones a moléculas electrofílicas altamente reactivas que pudieran interactuar con moléculas o estructuras celulares, dándoles estabilidad y de esta manera volviéndolas menos peligrosas para la homeostasia celular. Cuando estos mecanismos compensatorios se ven rebasados por los agentes oxidantes, se generan finalmente daños irreversibles en la célula, desencadenando el proceso en apoptosis o necrosis.

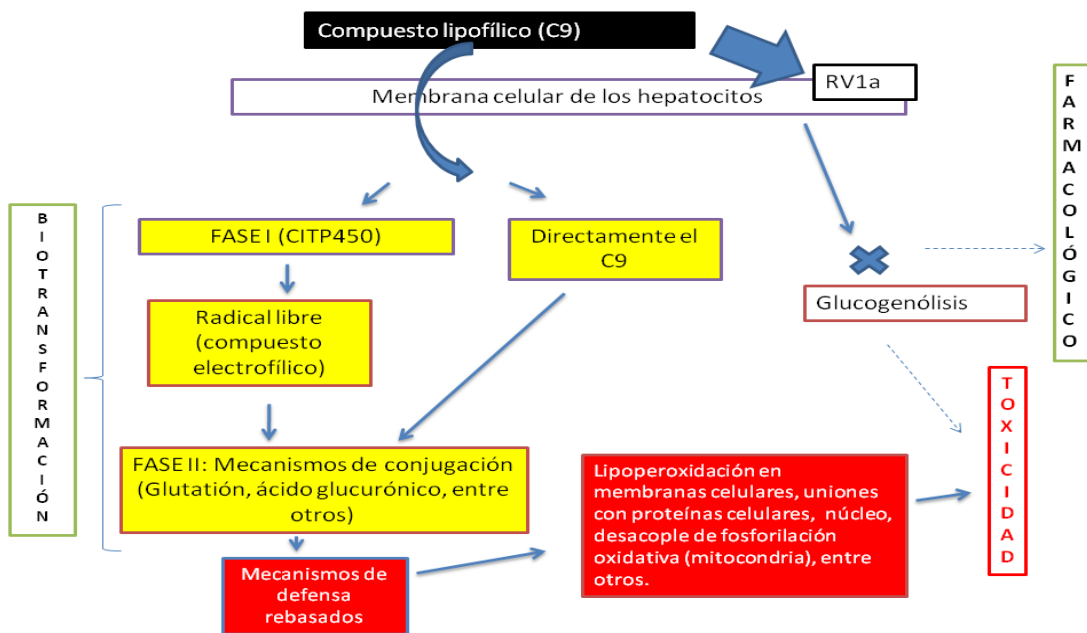


Figura 14. Posibles mecanismos de acción y efecto del C9 en los hepatocitos.

### **3.3 EL RIÑÓN Y SUS MECANISMOS GENERALES DE BIOTRANSFORMACIÓN Y ELIMINACIÓN.**

El riñón es un órgano de vital importancia en el organismo que participa en el mantenimiento de la homeostasis, mediante seis funciones principales: regula el contenido de agua y electrolitos corporales, excreta productos de desecho derivados del metabolismo celular, participa en la regulación de la presión arterial, elimina sustancias extrañas al organismo (xenobióticos), reabsorbe sustancias útiles para las células como la glucosa y los aminoácidos, participa en la regulación del equilibrio ácido-base de los líquidos corporales.

Algunos xenobióticos pueden actuar en sitios específicos de la nefrona y afectar de manera selectiva la estructura o función de las células renales. Los daños pueden darse en los glomérulos, túbulos proximales, asa de Henle, túbulos distales y colectores. Los túbulos proximales es el sitio de daño más frecuente por los xenobióticos, debido a la acumulación selectiva de sustancias químicas en este segmento de la nefrona. La secreción y transporte de cationes, aniones orgánicos y sustancias conjugadas con glutatión permite su acumulación en las células de los túbulos proximales. Además, la bioactivación de sustancias por el citocromo P-450 se realiza principalmente en este segmento de la nefrona. Aunque, el daño inducido por xenobióticos en las estructuras más lejanas de los túbulos es menos frecuente, existen fármacos como la anfotericina B y el metoxifluorano, que a nivel de los túbulos colectores, producen poliuria resistente a la acción de la AVP (Jaramillo y col., 2006).

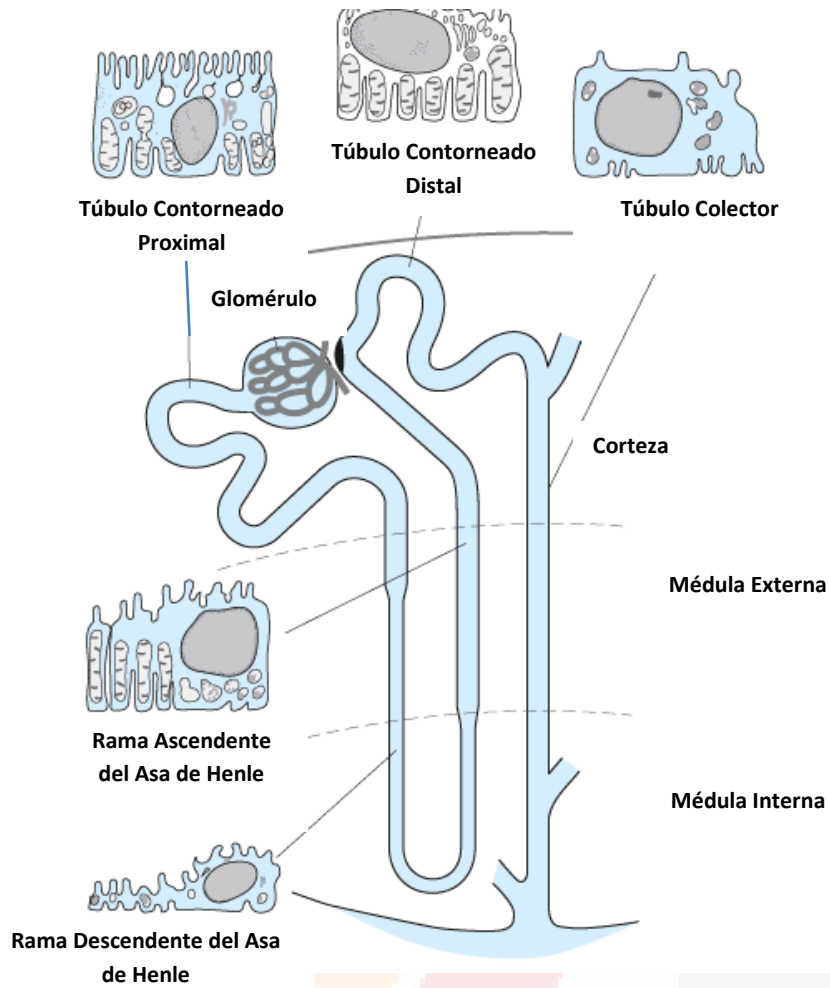


Figura 15. Las diferentes partes que constituyen a la nefrona, además del tipo de célula en cada una de sus partes (Ganong, 2005).

### 3.3.1 POSIBLES MECANISMOS DE C9 EN EL RIÑÓN.

El riñón podría ser un órgano blanco del C9 debido a que en el túbulo colector de las nefronas se encuentran los receptores V2; probablemente el bloqueo de estos receptores de AVP causarían un desequilibrio hidroelectrolítico, a través de poliuria, excreción excesiva de sodio y/o potasio; aumento en la concentración sérica de sodio y/o potasio, incremento de la osmolaridad sérica, además de disminución de la osmolaridad y densidad urinaria. Todo esto es debido al posible bloqueo de los receptores V2 por el C9, que inhibiría la inserción de acuaporinas tipo II en la membrana apical de los túbulos colectores. Esto causaría que la reabsorción de sodio se vería afectada, resultando una orina más diluida y un aumento de la osmolaridad sérica. En cuanto a estos posibles mecanismos de acción del C9, se tiene que tener cuenta la

importancia de determinar si los efectos son toxicológicos o sólo son parte de sus efectos farmacológicos.

Por otro lado, al igual que los mecanismos hepáticos, el C9 por sus propiedades fisicoquímicas, podría difundir pasivamente a través de la membrana celular y afectar directamente procesos fisiológicos, moléculas y/o estructuras celulares. Además, cabe señalar que el complejo citocromo p450 también se encuentra en el riñón (Fisher y col., 2009) y podría generar metabolitos reactivos que pudieran causar daños celulares (Figura 14).

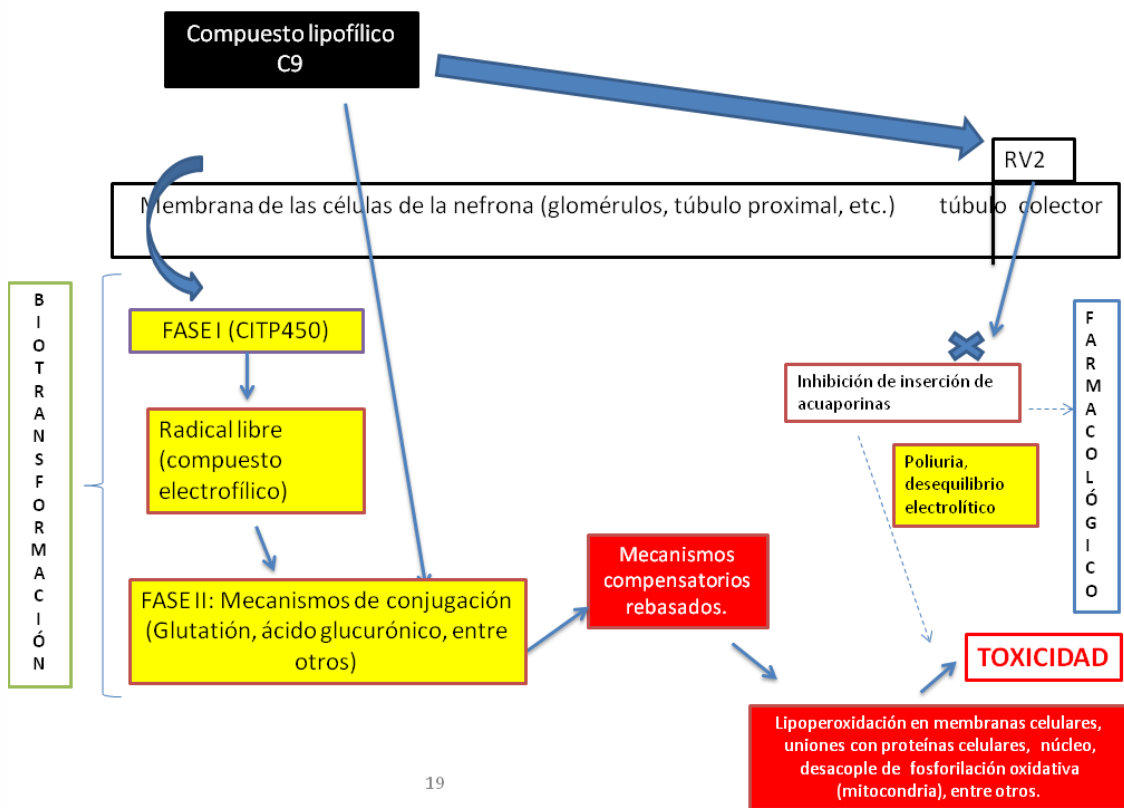


Figura 16. Posibles mecanismos de acción del C9 en las células renales.

### 3.4 POSIBLES EFECTOS DEL C9 EN LA COAGULACIÓN SANGUÍNEA.

Como ya se mencionó, la AVP posee diversos efectos fisiológicos, entre ellos está la regulación de la liberación del factor Von Willebrand, efecto mediado por receptores tipo V2 del endotelio vascular (Figura 5) y plaquetas. Este factor es una glicoproteína plasmática, la cual está involucrada en la agregación plaquetaria y en el transporte del factor VIII de la vía intrínseca de la cascada de coagulación sanguínea. La deficiencia

de este factor es la causa de diversos desordenes hemofílicos (Starke y col., 2011). El C9 al presentar actividad antagonista de la AVP, podría bloquear la liberación de este factor indispensable para que se lleve a cabo correctamente la cascada de coagulación (Figura 17).

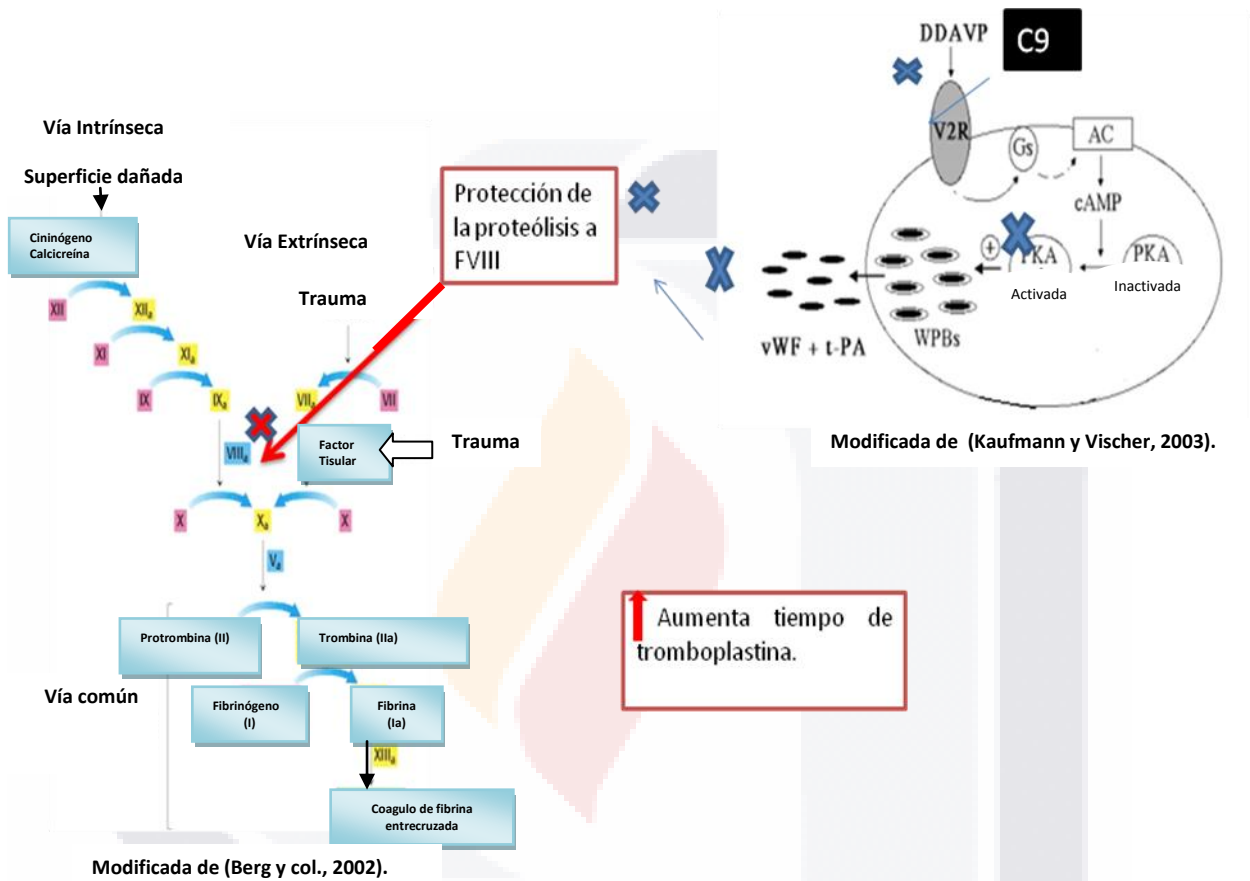


Figura 17. Posibles mecanismos de acción del C9 en la cascada de coagulación.

### 3.5 BIOMARCADORES DE DAÑO RENAL Y HEPÁTICO.

Los biomarcadores, se definen como “características que son objetivamente medidas y evaluadas como indicadores de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica” (NIH. USA).

El desarrollo de los biomarcadores depende del entendimiento de la base patológica para la enfermedad bajo estudio, el cual puede ser a cualquier nivel: genética molecular, bioquímico o anatómico (Feigin, 2004). Así por ejemplo, la actividad



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

enzimática en sangre de la transaminasa glutámico pirúvica (TGP) es un biomarcador que evalúa un daño hepático (Kiyosawa, 2009).

Actualmente la FDA (Food and Drug Administration. USA.), está investigando sobre nuevos biomarcadores a nivel molecular para una detección temprana de daño, evaluando expresión de genes o bien a través de la detección de ciertas proteínas membranales renales presentes en orina, por medio de inmunoensayos (ELISAS) como el caso del KIM-1 (Kidney Injury molecular -1) (Zhou y col., 2008).

Sin embargo los biomarcadores tradicionales a nivel renal como la proteinuria, glucosuria, poliuria y depuración de creatinina, entre otros, siguen siendo ampliamente utilizados en las evaluaciones toxicológicas y de seguridad farmacológica en el desarrollo de un nuevo fármaco.

Los biomarcadores más utilizados para identificar daño hepático, siguen siendo los niveles sanguíneos de las enzimas hepáticas, como la Transaminasa Glutámico Pirúvica (TGP), la Transaminasa Glutámico Oxalacética (TGO) y la fosfatasa alcalina (FA), algunos parámetros de la cascada de la coagulación sanguínea como el Tiempo de Protrombina (TP) y el Tiempo de Tromboplastina Parcial activada (TTPa). Otros biomarcadores importantes de daño hepático o renal, provienen de los estudios histopatológicos tradicionales (Zhou y col., 2008).

#### **4.0- JUSTIFICACIÓN.**

Los estudios toxicológicos y de seguridad farmacológica son indispensables en el desarrollo de un nuevo fármaco para garantizar que a los usuarios no se les someterá a un riesgo irrazonable en etapas clínicas (Pugsley y col., 2008).

La incorporación de los vaptanes como acuaréticos en el arsenal de farmacológico ha sido de gran importancia, debido a que estos nuevos fármacos antagonistas de la AVP, tienen una función terapéutica en cuadros de hiponatremia de diferente origen patológico, ayudando al restablecimiento del balance hidroelectrolítico (Okada y col., 1995; Yamamura y col., 1998). El estudio más preciso de estos fármacos, en cuanto a los efectos adversos y/o deseables, se ha querido realizar en el laboratorio de Neuroinmunoendocrinología de la UAA; sin embargo, debido a las

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

políticas y condiciones restrictivas que imponen las compañías transnacionales que lo fabrican, no fue posible su adquisición. Bajo estas circunstancias, en colaboración con el Dr. José Correa Basurto de Instituto Politécnico Nacional, ha sintetizado varios compuestos con posibles efectos acuareáticos, entre ellos dos derivados del ácido antranílico (C1 y POLI-1) (Correa y col., 2006) y un compuesto benzazepínico N-sustituido (C9) (Contreras, 2012). De los compuestos derivados del ácido antranílico, el POLI-1 ha sido sometido a evaluación toxicológica aguda (Reyes, 2009), mientras que del C1, se hizo una evaluación farmacológica (Rosendo, 2009). Sin embargo estudios recientes sobre el C9, sugieren que posee un potente efecto antagonista de la AVP (Contreras, 2012). En el desarrollo de un fármaco con posible actividad farmacológica son indispensables los estudios de toxicidad y seguridad farmacológica (Esquema 1).

La presente tesis, abarca el estudio de los efectos toxicológicos y farmacológicos del C9 sobre el riñón, hígado y coagulación sanguínea a través de curvas dosis-efecto (1, 10 y 20 mg/Kg) en ratas Wistar machos.

Debido a que es posible que el C9 actúe sobre los receptores V2 de AVP del túbulo colector de las nefronas (Robertson, 2011; Griffante y col., 2005), a que los procesos de biotransformación y eliminación se lleven a cabo en este lugar y a la posibilidad de que el C9 tenga efectos directos e indirectos sobre el riñón, nuestro estudio analiza los efectos renales a través de biomarcadores del equilibrio  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  (Figura 16).

Es sabido, que a nivel del hígado, los hepatocitos expresen receptores V1a funcionales (Villabona, 2010), por lo que el C9 podría bloquear la glucogenólisis dependiente de AVP. Además por sus características, el C9 por puede tener efectos tóxicos a través de un efecto directo sobre la homeostasia celular, o bien a partir de metabolitos reactivos que pudieran generarse por la biotransformación del compuesto (Figura14).

Por sus propiedades antagonistas de los receptores de AVP, es posible que el C9 también afecte la cascada de la coagulación sanguínea de manera indirecta, ya que tendría efectos sobre factores VIII y Von Willebrand. Esta suposición se basa en el conocido papel de la desmopresina (forma sintética de la AVP), controlando

alteraciones de la coagulación, específicamente la hemofilia (Kaufmann y Vischer, 2003) ya que el C9 podría bloquear la liberación del factor Von Willebrand y, por tanto, el bloqueo de la vía intrínseca de la cascada de coagulación sanguínea (Figura 17).

Finalmente, el estudio histopatológico de procesos inflamatorios, necróticos y/o apoptóticos del riñón y el hígado pueden dar información sobre los posibles efectos nocivos del C9.

## **5.0- HIPÓTESIS.**

El antagonista no-peptídico de la vasopresina (C9), tiene efectos nocivos sobre la fisiología e histología del riñón, hígado y la vía intrínseca de la cascada de coagulación sanguínea.

## **6.0- OBJETIVO GENERAL.**

Determinar los efectos de C9 haciendo una evaluación toxicológica subaguda de dosis-efecto a nivel hepático, renal y en la coagulación sanguínea.

## **7.0- OBJETIVOS PARTICULARES:**

Determinar el efecto del C9 sobre el glucógeno hepático y de algunos biomarcadores de daño hepático.

Determinar el efecto del C9 sobre el equilibrio hidroelectrolítico ( $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ) y algunos biomarcadores de daño renal.

Determinar el efecto del C9 sobre la vía extrínseca e intrínseca de la cascada de coagulación sanguínea (factor Von Willebrand).

Determinar daño tisular y celular a través del estudio histopatológico del riñón e hígado.

## **8.0- METODOLOGÍA.**

### **8.1 ANIMALES Y GRUPOS.**

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Se utilizaron ratas Wistar machos de entre 170 y 220 g de peso. Los animales se mantuvieron en el bioterio en condiciones controladas de temperatura ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ), con ciclos de 12 horas luz-12 horas oscuridad (encendido a las 7 de la mañana). La dieta consistió en alimento para rata (Purina) y agua corriente *ad libitum*. Los animales fueron mantenidos en el bioterio al menos una semana antes de comenzar los experimentos. Antes de las mediciones de consumo de agua y formación de orina en 24 horas, a los animales se les permitió adaptarse a las jaulas metabólicas colocándolos dos veces antes de las determinaciones experimentales. Los animales fueron tratados de acuerdo a los estándares de cuidados humanitarios aceptados internacionalmente “Guide to care and use of laboratory animals, ILAR (USA), 1996”.

En función de las variables medidas se repitieron dos experimentos con los mismos grupos de animales de la siguiente manera:

Grupo control (Solución salina 0.9%, 0.4 ml/Kg PC/IM).

Grupo vehículo (DMSO, 0.4 ml/Kg PC/IM).

Grupo tratado con el C9 (dosis 1 mg/Kg en DMSO, 0.4 ml/Kg PC/IM)

Grupo tratado con el C9 (dosis 10 mg/Kg en DMSO, 0.4 ml/Kg PC/IM).

Grupo tratado con el C9 (dosis 20 mg/Kg EN DMSO, 0.4 ml/Kg PC/IM).

La n de cada grupo consistió de 4-7 animales. Los animales de cada grupo fueron pesados cada 8 días, empezando desde una semana antes de los tratamientos.

Una semana antes de iniciar los tratamientos correspondientes y bajo anestesia con éter de metilo, se tomaron muestras sanguíneas basales del seno venoso retro-ocular (1.5 ml).

Los animales fueron inyectados diariamente durante 15 días (Figura 19). Previo al sacrificio, todos los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico y sangrados de la aorta abdominal.

- Colocación de los animales en jaulas metabólicas
- ★ Toma de muestra de orina
- ▲ Toma de muestra sanguínea retro-ocular
- ◆ Tratamiento
- ..... Una administración diaria
- ✕ Sacrificio



Figura 18, Línea del tiempo del procedimiento utilizado en el experimento para los grupos normales.

- ▲ Ayuno postprandial (1-2 Hrs)
- Toma de muestra sanguínea retro-ocular
- ◆ Tratamiento
- ..... Una administración diaria
- ✕ Sacrificio



Figura 19. Línea del tiempo del procedimiento utilizado para los subgrupos.

## 8.2 TOMA DE MUESTRAS Y EXTRACCIÓN DE ÓRGANOS.

Las muestras sanguíneas basales y las obtenidas al sacrificio, se dividieron de la siguiente forma:

\* Para las pruebas de TP y TTPA, se vertieron 0.6 ml de sangre en tubos eppendorf con 60 microlitros de isocitrato como anticoagulante, se centrifugaron, el plasma separado y una vez obtenidas las alícuotas, se procedió a realizar las pruebas de sangrado.

\* Para las determinaciones de TGP, TGO,  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  y CR (Creatinina), 0.9 ml de sangre fueron colocados en tubos eppendorf, centrifugados y una vez obtenidas las alícuotas se procedió a realizar los ensayos enzimáticos. Las alícuotas destinadas para la determinación de  $Na^+$  y  $K^+$  se congelaron a  $-20^{\circ}C$  hasta las determinaciones correspondientes.

\* Las determinaciones glucosa sérica se realizaron en los subgrupos de animales.

### 8.2.2 Muestras de Orina.

Los animales se colocaron en jaulas metabólicas durante 24 horas con libre acceso al agua y sin alimento y en la orina, se evaluaron las siguientes variables: volumen urinario,  $Na^+$ ,  $K^+$ , CR, bilirrubina, proteínas, glucosa y densidad urinaria. Las variables fueron evaluadas en condiciones basales y al final del periodo experimental (Figura 18).

Las alícuotas destinadas para los análisis de electrolitos ( $Na^+$  y  $K^+$ ) se sellaron y congelaron a  $-20^{\circ}C$  hasta su cuantificación. El resto de las variables se realizaron dentro de las primeras 4 horas de la obtención de las muestras. Todo el material utilizado para los análisis fue lavado perfectamente y tratado con ácido nítrico al 10% y enjuagado con agua desionizada.

### 8.2.3 Extracción de Órganos.

Al sacrificio de los subgrupos experimentales los hígados fueron extirpados rápidamente y una muestra del tejido se fijó en formol neutro al 10% y se procesó para el estudio histopatológico. El resto del tejido se colocó en una bolsa de plástico, se selló y se congeló inmediatamente  $-20^{\circ}C$  hasta las determinaciones del glucógeno hepático.

Los riñones fueron extirpados, fijados en formol neutro y procesados para su estudio histopatológico.

### **8.3- PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO HEPÁTICO.**

Las muestras de sangre coaguladas fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos, el suero separado y dividido en alícuotas.

#### **8.3.1 Determinación de Transaminasa glutámica pirúvica (TGP).**

La enzima TGP fue determinada utilizando Kits comerciales de TGP (ALT), (SPINREACT. Girona. España). El método está basado en cinética enzimática y espectrometría UV.

Se utilizan dos reactivos de trabajo: R1, el cual contiene TRIS pH 7.8 (100 mmol/L) y L-alanina (500 mmol/L); R2, el cual contiene NADH (0.18 mmol/L), lactato deshidrogenasa (1200 U/L) y  $\alpha$ -cetoglutarato (15 mmol/L), se mezclan y a partir de esta solución formada se toman 0.5 ml y se colocan en un tubo eppendorf previamente etiquetado, después se agregan 50  $\mu$ l del suero problema, se agita fuertemente y se incuba durante 1 minuto; posteriormente se lee en un aparato Clima Plus, RAL con calibración para TGP con longitud de onda de 340 nm y 25° C. Se toman lecturas de absorbancia cada minuto durante 3 minutos, comenzando con la absorbancia inicial en el tiempo "0". El equipo hace la determinación automática de la concentración de enzima en unidades internacionales por litro (U/L).

#### **8.3.2 Determinación de Transaminasa Glutámica Oxalacética (TGO).**

Para la determinación de la TGO se utilizaron Kits comerciales de TGO (AST), (SPINREACT. Gijona. España). El cual, se basa en la cinética enzimática de la TGO.

Se utilizan dos reactivos de trabajo: R1, el cual contiene TRIS pH 7.8 (80 mmol/L) y L-Aspartato (200 mmol/L); R2, el cual contiene NADH (0.18 mmol/L), lactato deshidrogenasa (800 U/L), malato deshidrogenasa (600 U/L) y  $\alpha$ -cetoglutarato (12 mmol/L), se mezclan y de esta solución se toman 0.5 ml, se vierten en un tubo eppendorf previamente etiquetado, después se agregan 50  $\mu$ l del suero problema y se agita fuertemente y se incuba durante 1 minuto. Posteriormente se lee en un aparato

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Clima Plus, RAL con calibración para TGO con longitud de onda de 340 nm y 25° C. Se toman lecturas de absorbancia cada minuto durante 3 minutos, comenzando con la absorbancia inicial en el tiempo “0”. El equipo hace la determinación automática de la concentración de enzima en unidades internacionales por litro (U/L).

### **8.3.3 Determinación de Glucógeno Hepático.**

La determinación de glucógeno hepático se realizó de acuerdo al método de Murat y Serfaty (1974), adaptado por Jee Hyun Lee y col. (2011), de la siguiente manera:

- a) Dejar descongelar el hígado y se toman 0.250 g de tejido. Se colocan en un vidrio de reloj en hielo.
- b) Coloque la muestra en un tubo de ensaye de 10 ml y agregue 1.5 ml de buffer de citratos 0.1 M (pH 4.2).
- c) En frio, homogenice finamente el tejido, pase la muestra a un tubo y colóquelo en hielo.

\*Todo el procedimiento debe ser realizado en baños de hielo para evitar la degradación del glucógeno.

#### **8.3.3.1 Glucosa Total.**

d) En un tubo eppendorf se pesa 1 mg de la enzima amiloglucosidasa y agregue 500 µl de buffer de citratos 0.1 M (pH 4.2), agite en el vórtex, cuidando que la mezcla no toque la tapa y evitar pérdidas.

e) Tome 500 µl del homogenizado, añádalos al tubo eppendorf y agite en el vórtex hasta mezclar completamente.

f) Incube las muestras en un agitador rotatorio a 60 giros/minuto a temperatura ambiente/2.5 horas.

g) Centrifugue los tubos a 2500 rpm durante 10 minutos.

h) Tome 10 µl del sobrenadante y colóquelos en microtubos previamente etiquetados.



i) Determine la concentración de glucosa mediante espectrometría UV-visible y el método de la glucosa oxidasa (ver sección 8.5)

### 8.3.3.2 Glucosa Libre.

a) Del homogenizado hepático inicial, tome 500 µl y colóquelos en un tubo eppendorf, y manténgalo en frío.

b) Centrifugue las muestras a 2500 rpm durante 10 minutos.

c) Tome 10 µl del sobrenadante para la determinación de glucosa utilizando el método de la glucosa oxidasa (ver sección 8.4) y el espectrómetro UV-Visible.

**NOTA:** Para evitar pérdidas por degradación del glucógeno, se recomienda primero cuantificar la glucosa libre.

Los valores finales del glucógeno se obtienen utilizando la siguiente fórmula estandarizada:

$$\text{Glucógeno (mg)/ 100 mg de tejido húmedo} = \frac{2G_T - G_L}{P} * 100$$

---

$$G_L = V_i * C_G$$

$G_T$ : Glucosa total (mg)

$$G_T = V_i * C_G$$

$G_L$ : Glucosa libre (mg)

$V_i$ : volumen inicial ( ml)

[2] : coeficiente de dilución

$C_G$ : concentración de glucosa ( mg/ml)

$P$ : Peso de la muestra (mg)

---

## 8.4 EVALUACIÓN DE LA GLICEMIA.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Para la determinación de glucosa sérica se utilizó el método de la glucosa oxidasa con un Kit comercial (Glucose-TR de SPINREACT. Gijona. España); el cual cuenta con dos reactivos de trabajo, R1, TRIS pH 7.4 (92 mmol/L) y Fenol 0.3 mmol/L; R2, glucosa oxidasa (15000 U/L), peroxidasa (1000 U/L) y 4-Aminofenazona (2.6 mmol/L). Además, de un estándar de calibración con una concentración de glucosa de 100 mg/dl. Se mezclan los reactivos R1 y R2 en las proporciones mencionadas y de la solución resultante se toma 1 ml y se coloca en tubo eppendorf (1.5 ml). Se añaden 10 µl del suero problema, se agita y se deja incubar 20 minutos a temperatura ambiente (23°C).

Las muestras se leen en un espectrofotómetro UV-visible JENWAY 6300 a una longitud de onda de 505 nm.

Se hace una curva de regresión: absorbancia contra concentración del estándar y la absorbancia de la muestra a evaluar. El valor del problema y se interpola para obtener el valor de glucosa sérica en mg/dl.

## **8.5- PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO RENAL.**

### **8.5.1 Volumen urinario de 24 horas.**

Para la determinación de la producción de orina, los animales fueron colocados en jaulas metabólicas con el respectivo recipiente para coleccionar la orina. Con el fin de evitar la contaminación de las muestras de orina, a los animales se les retiró el alimento sólido durante el periodo experimental. Se midió el volumen pasando la orina de los recipientes a probetas graduadas.

### **8.5.2 Ingesta de agua de 24 horas.**

Se pesaron los biberones antes y después de colocar los animales en las jaulas; de esta manera se obtiene la diferencia, la cual, al convertirla a volumen, se tiene la ingesta de agua en 24 horas.

### **8.5.3 Análisis urinario.**

En las muestras de orina determinaron las siguientes variables: depuración de creatinina en 24 horas, proteína, glucosa, pH, densidad urinaria y bilirrubinas. Para las determinaciones se utilizaron tiras reactivas Multistix ® 10SG y se leyeron con un aparato Seralyzer Clinitek ®.

El procedimiento se realizó de la siguiente manera: En un tubo de ensaye con muestra de orina se sumerge la tira reactiva, asegurándose que todos los cojinetes de la mismas se humedezcan totalmente. Se saca y con un papel absorbente se retira el exceso de orina y se coloca inmediatamente en el recibidor del aparato. Un minuto después se toma la lectura de las diferentes variables.

### **8.5.4 Creatinina urinaria.**

La creatinina se determinó mediante el método colorimétrico – cinético del picrato alcalino, con Kit comercial Creatinine-J, (SPINREACT. Gijona. España). El reactivo de trabajo se prepara mezclando 17.5 mmol/L de ácido pícrico y 0.29 mol/L de hidróxido de sodio.

En un tubo de ensaye, se agregan 0.5 ml de reactivo de trabajo y se mezclan con 50 µl de orina diluida (1:50 en agua destilada), se mezclan vigorosamente y se lee en el aparato Clima Plus RAL con calibración para creatinina a 492 nm.

- Antes de comenzar a leer se tiene que verificar la correcta calibración del aparato con un patrón de creatinina (2 mg/dl).

### **8.5.5 Creatinina sanguínea.**

La creatinina sanguínea se determinó mediante el método colorimétrico – cinético del picrato alcalino, con el Kit comercial Creatinine-J (SPINREACT. Gijona España). Se mezclan 17.5 mmol/L de ácido pícrico y 0.29 mol/L de hidróxido de sodio, esta mezcla es el reactivo de trabajo.

Se toman 0.5 ml de reactivo de trabajo en un tubo de ensaye y se mezclan con 50 µl de suero problema. Se lee en el aparato Clima Plus RAL con calibración para creatinina a 492 nm.

- Antes de comenzar a leer se tiene que verificar la correcta calibración del aparato con un patrón de creatinina (2 mg/dl) suministrado en el Kit.

### 8.5.6 Depuración de creatinina.

Para la depuración (o aclaramiento) renal de creatinina se necesita conocer: a) el volumen urinario en 24 horas, b) la concentración de creatinina sérica y c) la concentración de creatinina urinaria. El valor se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$DCr = ( 1/1440 ) \frac{Vu [U]}{[S]}$$

---

*DCr = Depuración de creatinina  
(ml/min)*

*[U] = Concentración de creatinina  
urinaria (mg/dl)*

*Vu = Volumen urinario (ml)*

*$\frac{1}{1440}$  : Coeficiente de corrección del  
tiempo*

*[S] = Concentración de creatinina  
sérica (mg/dl)*

---

### 8.5.7 Determinación del Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> Sérico.

El sodio y potasio sérico se midieron por el método de ión selectivo en el aparato VITROS DT60 II, usando portaobjetos con microceldas (Ortho Clinical Diagnostics, J & J, NY, USA). Se realiza de la siguiente manera:

En el equipo se elige el ión que se desea cuantificar. Se toman 10 µl del suero y 10 µl de líquido de referencia y con una micropipeta automática y se colocan en sendas microceldas del portaobjeto. Se hace la lectura correspondiente.

### 8.5.8 Osmolaridad Efectiva.

La osmolaridad efectiva se obtuvo a partir de los datos de concentración de potasio, sodio y glucosa en sangre, mediante la siguiente fórmula:

$$Osmolaridad Efectiva = 2 \times ([Na] + [K]) + glucosa (mg/dL)/18$$

### **8.5.9 Determinación de Na<sup>+</sup> urinario.**

Para esta evaluación, se utilizó espectrometría de emisión atómica de la siguiente manera:

Se descongelan las muestras de orina a temperatura ambiente (en caso de que hayan sido almacenadas en congelación). Con el vórtex se agita la orina. En un tubo de ensaye con 4995  $\mu\text{l}$  de agua desionizada se agregan 5  $\mu\text{l}$  de la muestra de orina para obtener una dilución 1:1000, incluyendo el estándar de Sodio, Stanbio. TX. EU. (140 mmol/L).

El estándar y las muestras son leídas en un aparato Perkin Elmer 3110 por emisión atómica a 589 nm.

### **8.5.10 Determinación de K<sup>+</sup> urinario.**

Las determinaciones de potasio se realizaron con el método turbidimétrico, que consiste en provocar la reacción de sustitución de los iones de potasio en el complejo tetrafenilborato de sodio en medio alcalino, formando tetrafenilborato de potasio. Este complejo produce una suspensión ligeramente turbia, la cual es directamente proporcional a la concentración de potasio.

Para que la reacción ocurra adecuadamente, la muestra tiene que estar libre de proteínas. Para lograr esto, se utilizó un agente precipitante Stanbio, TX, USA (ácido tricloroacético) 0.3 mol/L, el cual se agrega con la muestra en relación 50:1. Los volúmenes de mezcla del reactivo de trabajo fueron tetrafenilborato de sodio 0.2 mol/L, Hidróxido de sodio acuoso 2 mol/L, en proporción 1:1; Además un estándar de 4 mmol/L de potasio para hacer la relación de concentración.

Se debe mezclar la muestra (diluida 1:10 con agua desionizada y diluida con el reactivo precipitante 1:50) con el reactivo de trabajo en relación 1:10, para que se lleve a cabo la reacción. Finalmente se lee en espectrometría UV-visible a 580 nm en equipo JENWAY 6300.

## **8.6- COAGULACIÓN SANGUÍNEA.**

Para las pruebas de coagulación sanguínea (PT y TTPa), una alícuota de sangre fue citratada y centrifugada a 3000 rpm durante 10 minutos, se separó el plasma y se dividió en alícuotas.

### **8.6.1 Tiempo de Protrombina (PT).**

El método utilizado fue el de tromboplastina cálcica de Aulesa et al (2002). Utilizando un Kit comercial PT (SPINREACT, Girona, España). Para el análisis se utilizó un equipo RAL, Clot SP. Se colocaron 200 µl del reactivo de trabajo (Tromboplastina cálcica liofilizada, extracto de acetona deshidratada de cerebro de conejo y CaCl<sub>2</sub>) en cubetillas especiales del equipo y se incubaron a 37° C por 5 minutos, después se agregaron 100 µl de plasma citratado e inmediatamente después de la adición comienza a correr el tiempo automáticamente en el equipo, cuando se forma la fibrina, se para el cronómetro automáticamente y se obtiene el tiempo exacto de protrombina.

### **8.6.2 Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado (TTPA).**

El método utilizado se basa en el de Aulesa et al (2002). Kit comercial TTPA (SPINREACT. Girona. España). Para el análisis se utilizó un equipo RAL, Clot Sp; se colocaron 100 µl de plasma citratado, seguido de 100 µl de reactivo de trabajo 1 (ácido elálgico, buffers y conservantes) y se incubaron por 5 minutos a 37° C, posteriormente se añadieron 100 µl de reactivo de trabajo 2 (CaCl<sub>2</sub> 0.02 M) e inmediatamente después comienza a correr el tiempo automáticamente en el equipo, cuando se comienza a formar la fibrina, se para el cronómetro automáticamente y se obtiene el tiempo de tromboplastina parcial activado, éste procedimiento se repite para cada muestra

## **8.7 Histología.**

Después de 48 horas de fijares en el formol neutro al 10% los tejidos (hígado y riñón) fueron procesados en parafina para su estudio histopatológico. El método utilizado fue el Prophet et al (1994):

### **a) Fijación**

Los tejidos se etiquetan y se fijan en formol neutro al 10% durante 48 horas y se lavan con agua corriente por 2 horas.

**b) Deshidratación e Inclusión en parafina.**

Después del lavado, los tejidos se colocan en canastillas etiquetadas y se pasan al recipiente número 1 del procesador de tejidos Leica TP 1020 previamente programado. Los recipientes contienen alcoholes graduados del 70%, 80%, 85%, 90%, 95% y 100%. Los siguientes recipientes contienen mezclas de alcohol-xilol hasta llegar al Xilol absoluto. Los siguientes recipientes contienen mezclas de xilol-parafina hasta llegar a la parafina pura.

**c) Preparación de los cubos de parafina.** Este procedimiento se hace con el dispensador de parafina Leica EG 11400.

Los tejidos incluidos se colocan en el compartimento de parafina caliente del dispensador.

Se prepara el molde Leuckart, se toma el tejido y se orienta para presentar la superficie que será cortada en el micrótopo. Se vierte la parafina líquida y se pasa a la platina fría para que el bloque se solidifique. Los bloques se dejan a temperatura ambiente por 24 horas se retiran del molde y se procede a cortarlos con el micrótopo.

**d) Cortes histológicos.**

Se coloca una navaja nueva y limpia en el micrótopo, ajustar el grosor de cada corte a 5 micras ( $\mu$ ) y colocar los tejidos en el congelador por unos minutos antes de empezar a cortar.

En el micrótopo (Leica RM 2125) se monta el tejido y manteniéndolo frío, se procede a cortarlo en rebanadas de 5-6  $\mu\text{m}$  de espesor. Los cortes se recogen en un portaobjetos y se extienden en el baño de flotación (Leica 26103), que contiene agua caliente (45-50°C). Se identifican los mejores cortes y ayudándose con un pincel se montan en los portaobjetos previamente rotulados y cubiertos con polil L-lisina. Las laminillas se colocan en una canastilla y se pasan a la estufa de secado a 60°C por 3 horas.

Se sacan de la estufa y se dejan a temperatura ambiente.

**e) Tinción de hematoxilina-Eosina (H-E) y Periodic Acid Schiff (PAS).**

Los tejidos de hígado y riñón se tiñeron con hematoxilina-eosina (H-E) (Prophet y col, 1994) y Periodic Acid Schiff (PAS)( Xue-Jun D y col , 2010) :

- Primero se desparafiniza el tejido.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Se enjuaga en agua con golpes ligeros.
  - Se sumergen dos o tres veces en cada solución el tiempo necesario.
  - Los cortes obtenidos y teñidos con H-E o PAS se estudiaron con un microscopio fotónico (NIKON OPTIPHOT II).

## **8.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Los datos fueron analizados obteniendo la media +/- EEM, por medio de las pruebas *t-student* haciendo la comparación entre los estados basales y experimentales para cada uno de los grupos. Además, se hizo una prueba de Dunnet multiple, específicamente en la determinación del glucógeno hepático y tasa de excreción de electrolitos para comparar todos los grupos con el control. Se consideró diferencia significativa si el valor  $p < 0.05$ , altamente significativa si el valor  $p < 0.01$  y extremadamente significativa si el valor  $p < 0.001$ . Se utilizó el programa Instat 3.0 para los análisis estadísticos y Prisma Graph Pad 4.0 para la representación gráfica.

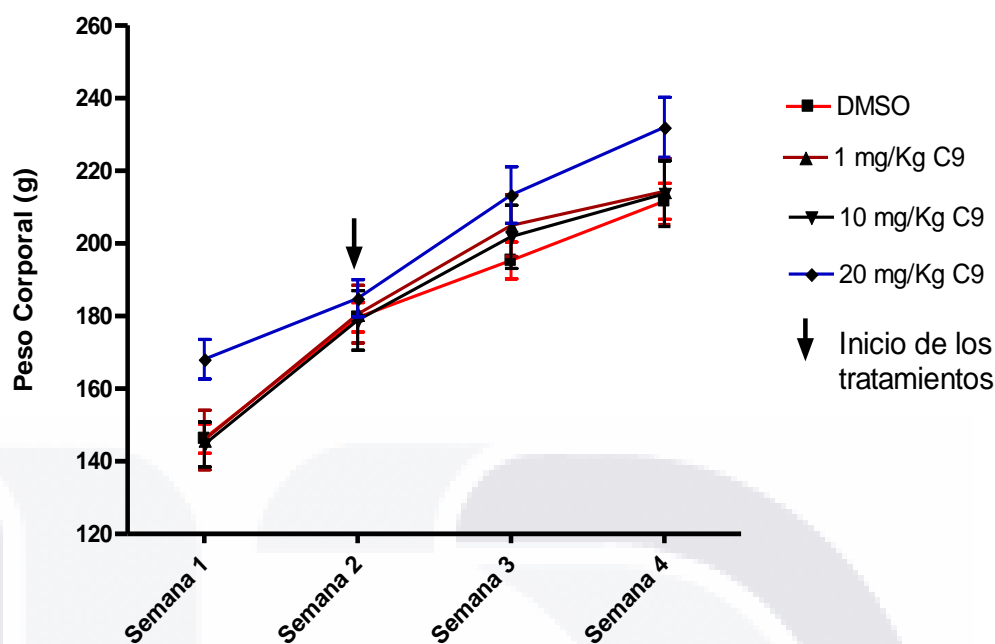
## **9.0- RESULTADOS.**

Dado que las diversas variables medidas en el grupo Control y el grupo DMSO no mostraron diferencias significativas, los valores encontrados en el grupo DMSO se consideraron como valores basales.

### **9.1 EFECTOS DEL C9 SOBRE EL PESO CORPORAL.**

Como se aprecia en la gráfica 1, la comparación de las curvas de peso corporal entre los diferentes grupos, no mostró diferencias significativas.



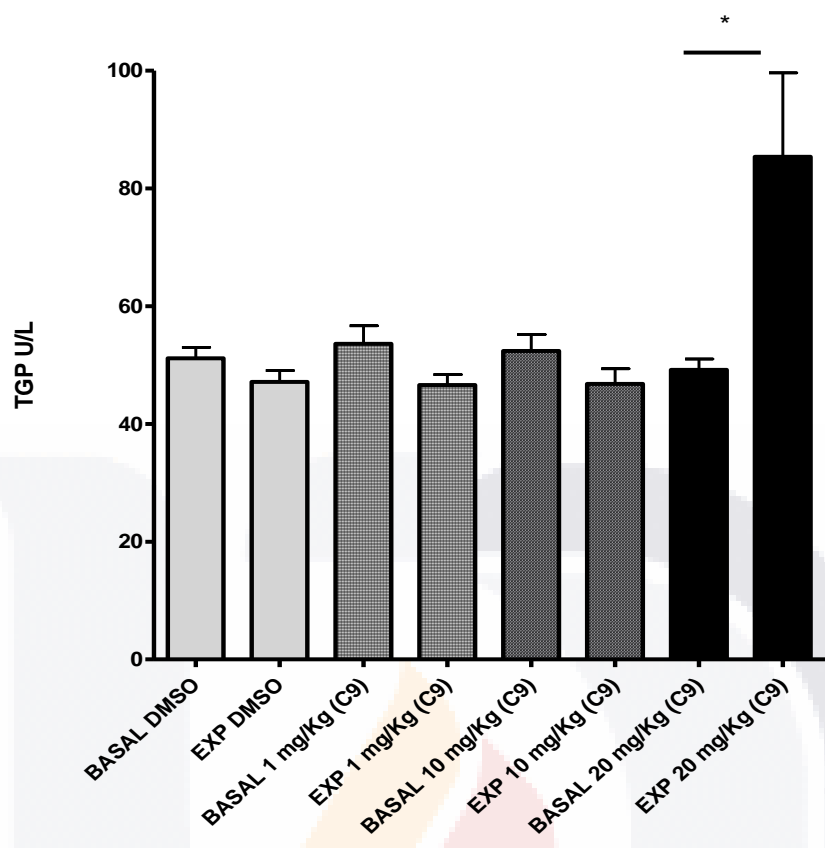


Gráfica 1. Efecto de la administración de las diversas dosis de C9 sobre el peso corporal. Control DMSO, Grupo 1 mg/Kg, Grupo 10 mg/Kg, Grupo 20 mg/Kg. N=6-7 animales/grupo. La flecha indica el inicio del tratamiento.

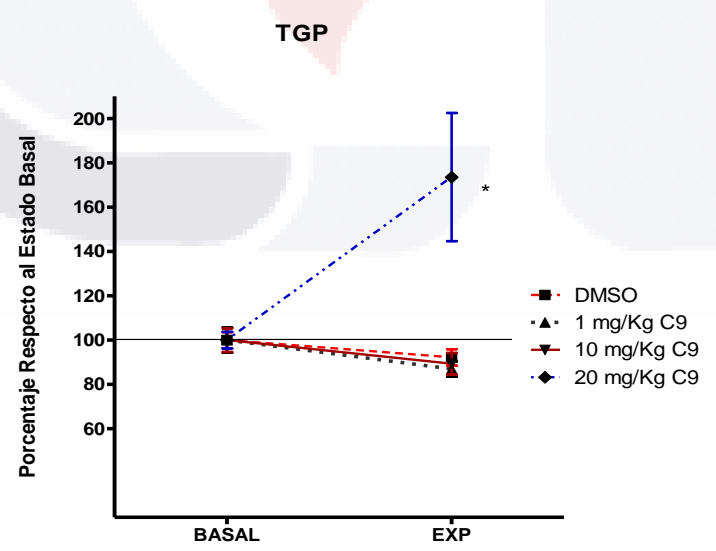
## 9.2 EFECTOS DEL C9 SOBRE ALGUNOS BIOMARCADORES DE DAÑO HEPÁTICO.

### 9.2.1 EFECTOS DEL C9 SOBRE LA TRANSAMINASA GLUTÁMICO PIRÚVICA (TGP) SÉRICA.

Las gráficas 2 y 3 muestran que mientras que las dosis de 1 y 10 mg/Kg no indujeron cambios significativos en las concentraciones de la TGP, la dosis de 20 mg/Kg el C9 indujo un incremento del 70% en las concentraciones séricas de la enzima ( $p < 0.05$  versus la concentración basal).



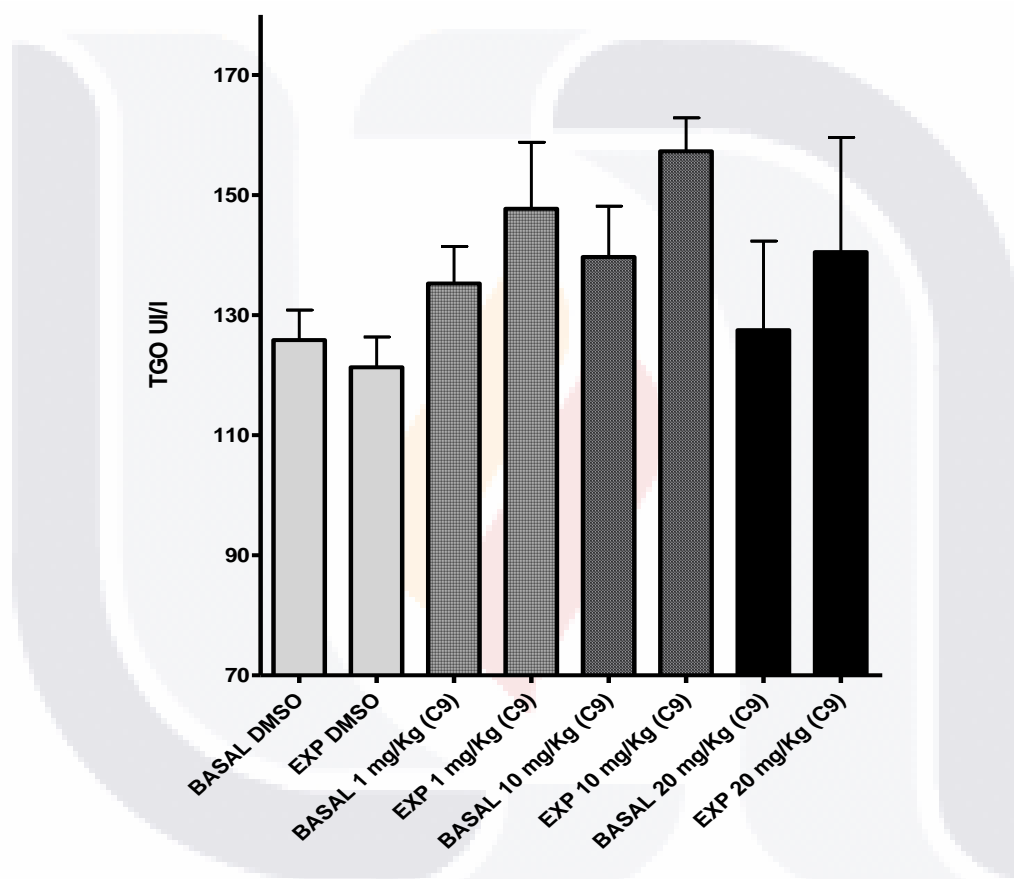
Gráfica 2. Efecto de las diversas dosis del C9 sobre las concentraciones séricas de la enzima TGP. Los valores se expresan como la media  $\pm$  E.E.M. N= 5-6 animales/grupo. \*p<0.05.



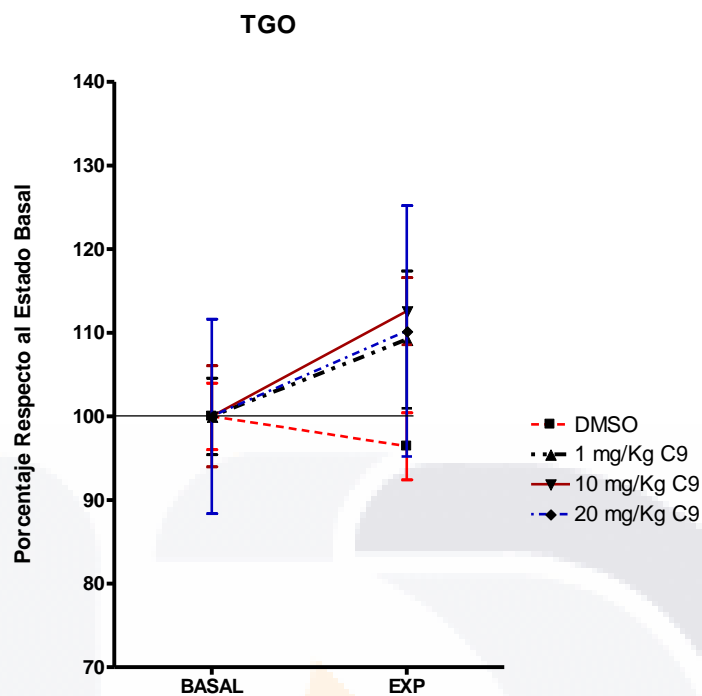
Gráfica 3. Porcentaje de cambio de TGP sérica respecto a las concentraciones basales. Los valores están representados como la media  $\pm$  E.E.M.

### 9.2.2 EFECTO DEL C9 SOBRE LA ENZIMA TRANSAMINASA GLUTÁMICO OXALACÉTICA (TGO).

La TGO también fue utilizada como biomarcador de daño hepático. Las gráficas 4 y 5 muestran que ninguna de las dosis del C9 indujo cambios significativos en las concentraciones de esta enzima.



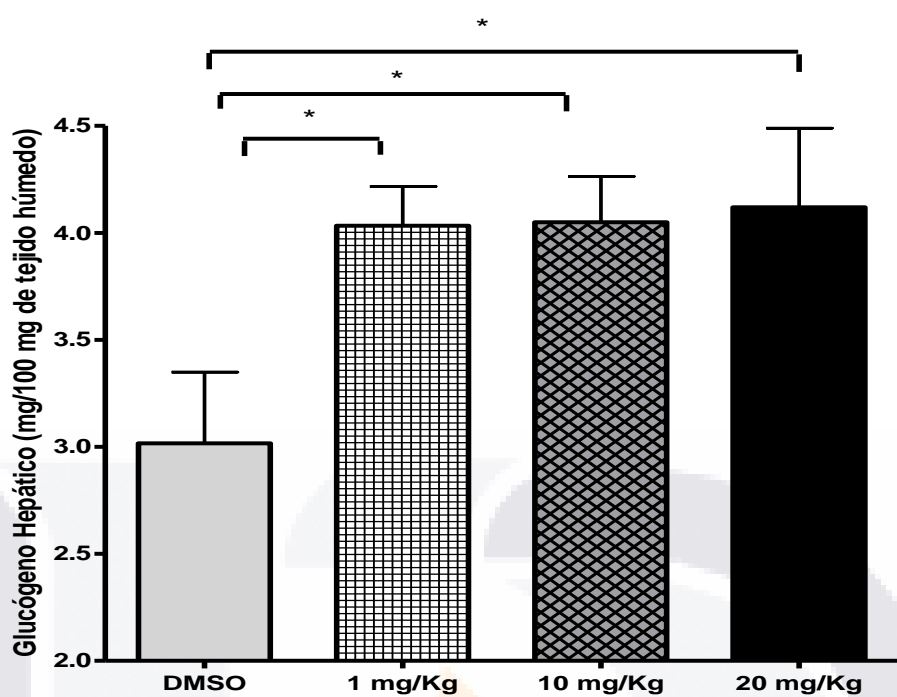
Gráfica 4. El efecto de C9 sobre las concentraciones séricas de TGO.. Los valores se presentan como la media  $\pm$  E.E.M. N= 5 animales/grupo.



Gráfica 5. Efecto de las diferentes dosis del C9 sobre las concentraciones séricas de la TGO. Los cambios se expresan en porcentaje de cambio respecto a las respectivas basales. N=5 animales/grupo.

**9.2.3 EFECTO DE C9 SOBRE EL GLUCÓGENO HEPÁTICO.**

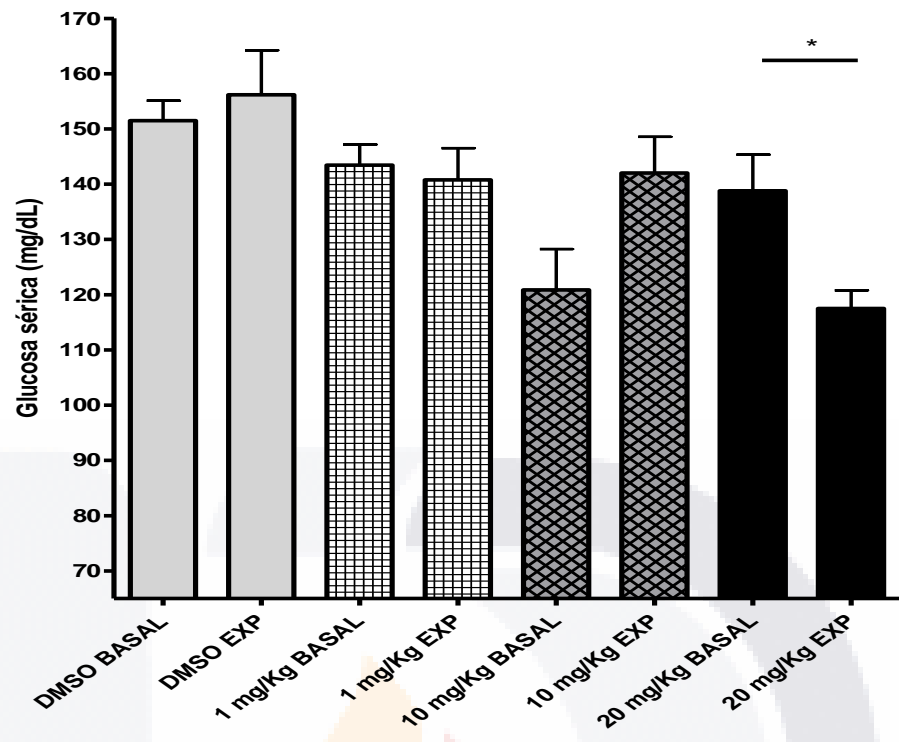
La gráfica 6 muestra que las 3 dosis del C9 indujeron un incremento significativo de los depósitos del glucógeno hepático ( $p < 0.05$  versus basal). Obsérvese además la comparación entre las diferentes dosis no mostró diferencias significativas.



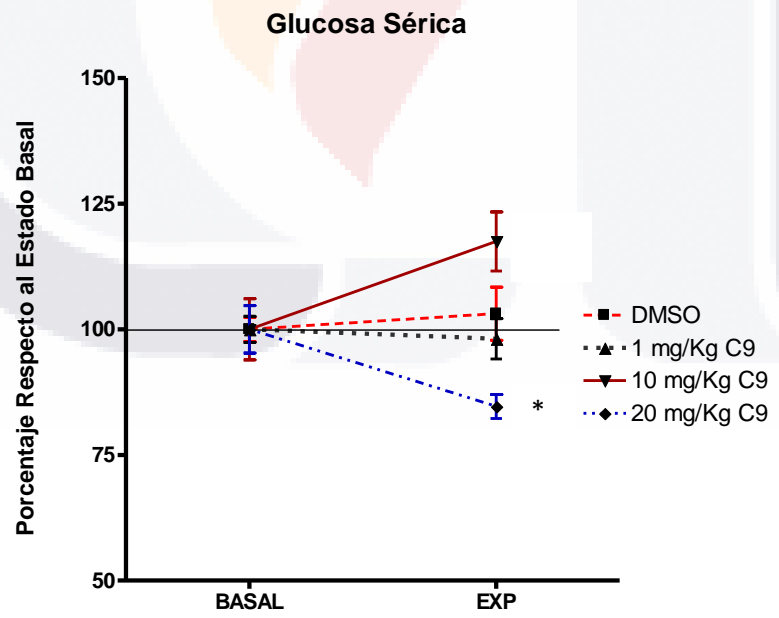
Gráfica 6. Efecto de C9 sobre los depósitos de glucógeno hepático (mg/100 g de tejido húmedo). Grupo DMSO n=7, grupo 1 mg/Kg n=6 grupo 10 mg/Kg n= 6 grupo 20 mg/Kg n=5. Las columnas están representadas como la media± E.E.M.

**9.2.4 EFECTO DE C9 SOBRE GLUCOSA SANGUÍNEA.**

Las gráficas 7 y 8 muestran mientras las dosis de 1 y 10 mg del C9 no indujeron cambios significativos, la dosis de 20 mg/Kg indujo una disminución significativa de la glucemia (p<0.05).



Gráfica 7. Efectos del C9 sobre la concentración de glucosa en sangre. N=6-7 animales/grupo. Los valores se expresan como la media± E.E.M. \*p<0.05

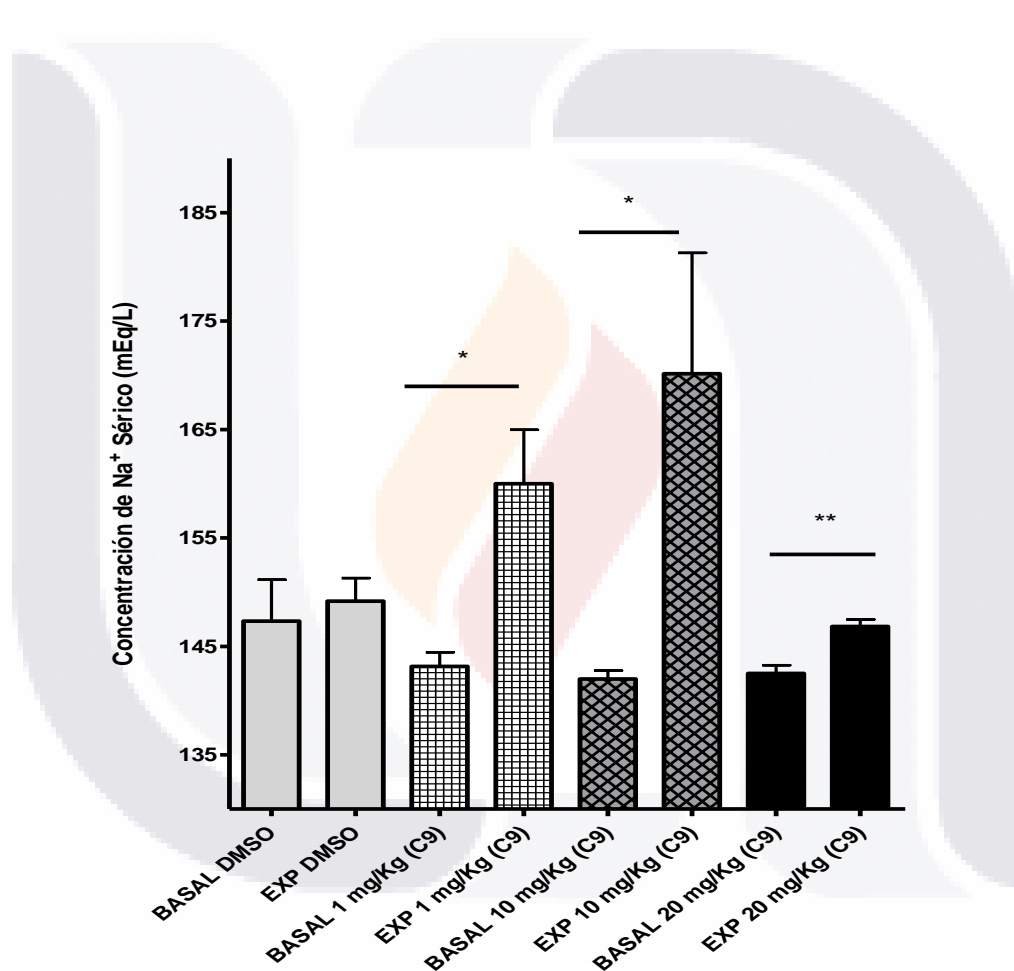


Gráfica 8. Efectos de las diferentes dosis del C9 sobre el porcentaje de cambio de la glucemia. Los valores están representados como la media± E.E.M. \*p<0.05

## 9.3 EFECTOS DE C9 SOBRE RIÑÓN Y EQUILIBRIO ELECTROLÍTICO (Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>).

### 9.3.1 CONCENTRACIÓN SÉRICA DE Na<sup>+</sup>.

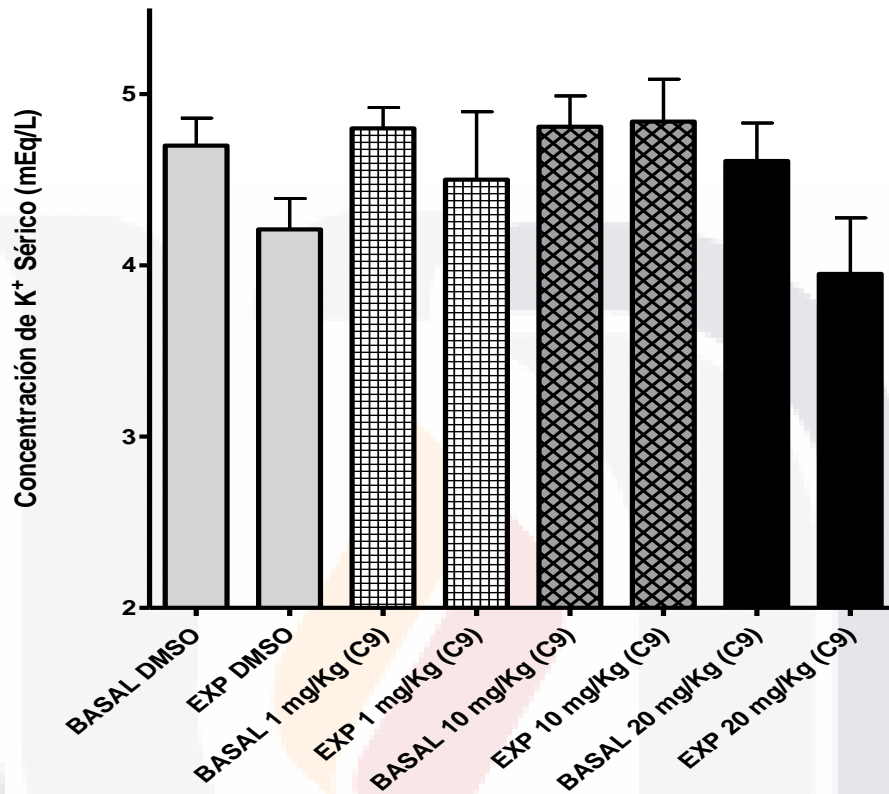
En la gráfica 9 se muestran los efectos de las diferentes dosis del C9 sobre las concentraciones séricas de Na<sup>+</sup>. Obsérvese que aunque todas las dosis del C9 incrementaron significativamente las concentraciones de sodio, la desviación de los resultados fue menor con la dosis más alta del compuesto.



Gráfica 9. Efectos de las diferentes dosis del C9 sobre la concentración sérica de Na<sup>+</sup>. Los valores basales se obtuvieron de los mismos grupos de animales experimentales de muestras sanguíneas tomadas 8 días antes de iniciar el tratamiento. \*p<0.05. \*\*p<0.01. N=6-7 animales/grupo.

### 9.3.2 CONCENTRACIÓN SÉRICA DE $K^+$ .

La gráfica 10 muestra que ninguna de las dosis del C9 afectó la concentración sérica de  $K^+$ .

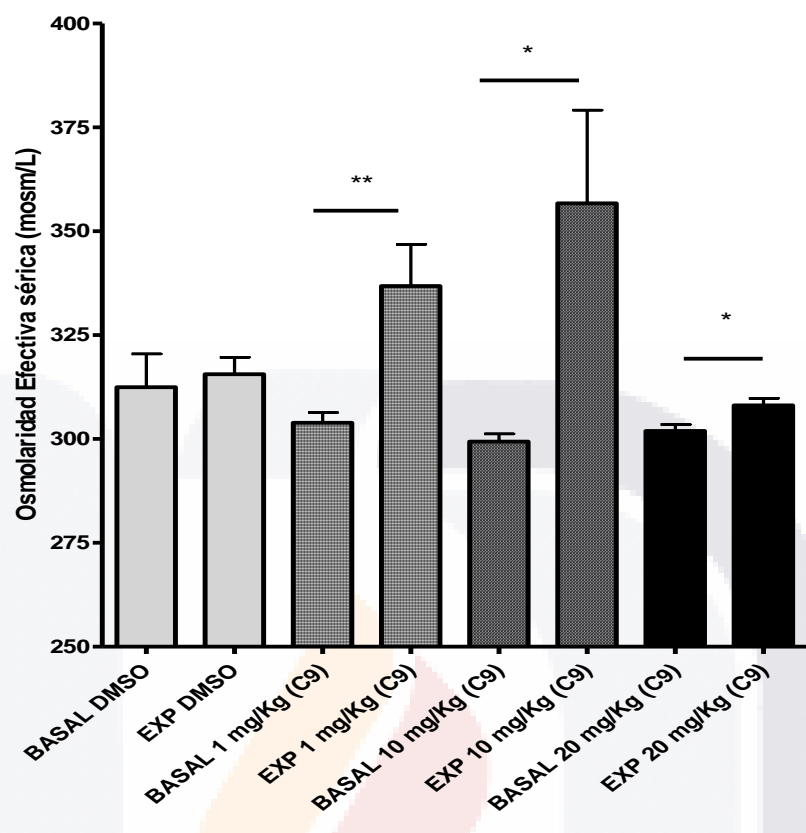


Gráfica 10. Efectos del C9 sobre las concentraciones séricas de  $K^+$ . Los valores basales se obtuvieron de los mismos grupos de animales experimentales de muestras sanguíneas tomadas 8 días antes de iniciar el tratamiento. N= 6-7 animales/grupo.

### 9.3.3 OSMOLARIDAD EFECTIVA SÉRICA.

La osmolaridad efectiva sérica toma en cuenta la concentración de glucosa, sodio y potasio en sangre, los resultados mantienen un comportamiento semejante a la concentración u osmolaridad de  $Na^+$  sérico. Obsérvese en la gráfica 11, como las diferentes dosis del C9, aumenta significativamente la osmolaridad efectiva y que esta fue mayor con la dosis de 10 mg/Kg.

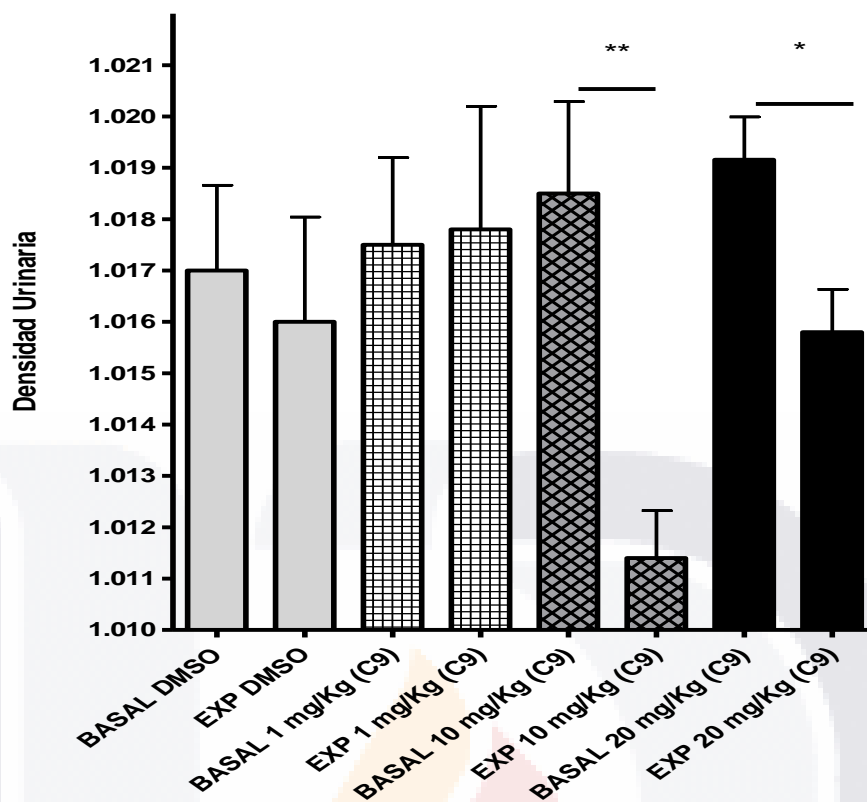




Gráfica 11. Efectos de las diferentes dosis del C9 sobre la osmolaridad efectiva. Los valores basales se obtuvieron de los mismos grupos de animales experimentales de muestras sanguíneas tomadas 8 días antes de iniciar el tratamiento \* $p < 0.05$ . \*\* $p < 0.01$ . N=6-7 animales/grupo.

**9.3.4 DENSIDAD URINARIA.**

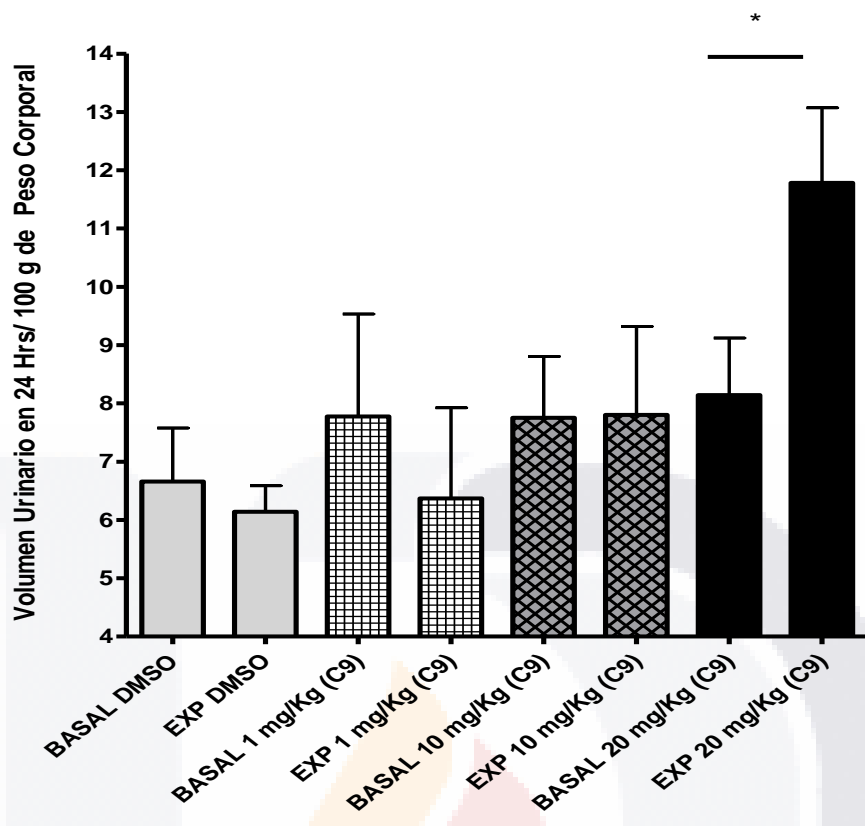
En la gráfica 12 se muestran los efectos del C9 sobre la densidad urinaria. Obsérvese que mientras la menor dosis del compuesto no afectó la densidad, las dosis de 10 y 20 mg/Kg indujeron una formación de orina diluida y que este efecto fue significativamente más grande a la a dosis de 10 mg/kg.



Gráfica 12. Efectos del C9 sobre la densidad urinaria. Los valores basales se obtuvieron de los mismos grupos de animales experimentales de muestras sanguíneas tomadas 8 días antes de iniciar el tratamiento. \* $p < 0.05$ . \*\* $p < 0.01$ . N=6-7 animales/grupo.

### 9.3.5 VOLUMEN URINARIO EN 24 HORAS.

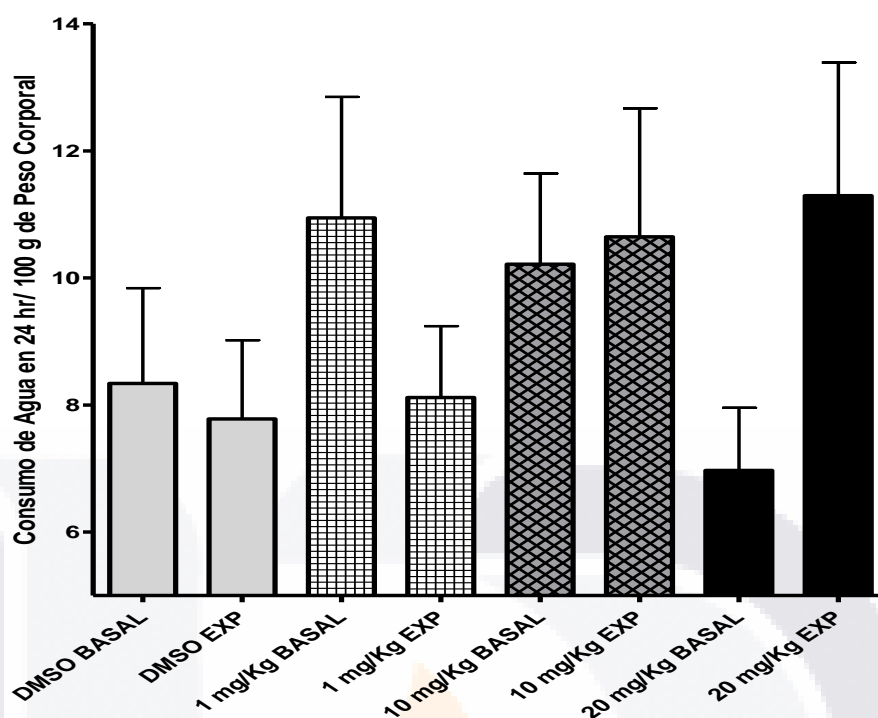
La gráfica 13 muestra el efecto de las diferentes dosis del C9 sobre el volumen de orina en 24 horas. Obsérvese que mientras las dosis de 1 y 10 mg/Kg no afectaron la producción de orina, la dosis de 20 mg/Kg tuvo un efecto diurético ( $p < 0.05$  versus su basal).



Gráfica 13. Efectos del C9 sobre la formación de orina en 24 horas (ml/100 g PC). Los valores basales corresponden a las mediciones hechas en los mismos grupos de animales experimentales 8 días antes de iniciar el tratamiento. \*p<0.05. N= 6-7 animales/grupo.

**9.3.6 CONSUMO DE AGUA EN 24 HORAS.**

La comparación entre los diferentes grupos mostró que el C9 no afectó el consumo de agua. Obsérvese sin embargo en la gráfica 14 que la dosis de 20 mg/Kg mostró una tendencia a incrementar el consumo de agua.

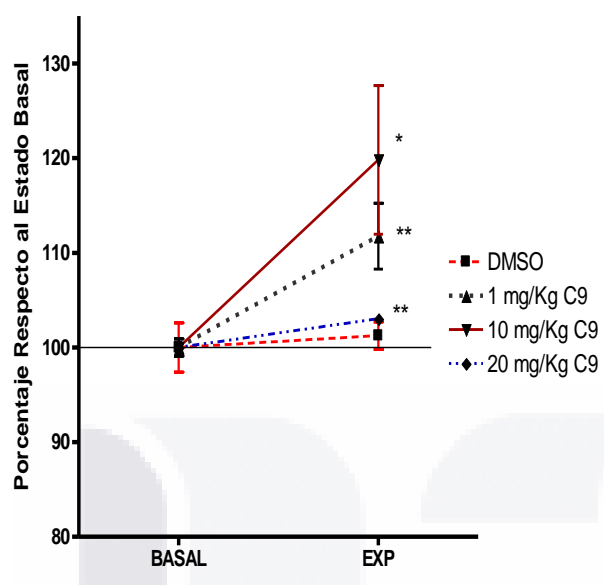


Gráfica 14. Efectos del C9 sobre el consumo de agua en 24 horas (ml/100g de PC). Los valores basales corresponden al consumo de agua determinados en los diferentes grupos 8 días antes de iniciar el tratamiento. No se observaron diferencias significativas entre los diversos grupos. N= 6-7 animales/grupo.

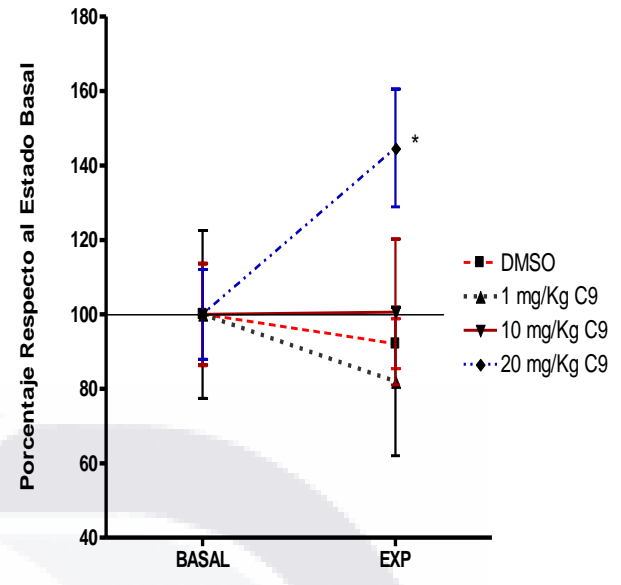
**9.3.7 EFECTO PORCENTUALES DEL C9 EN EL EQUILIBRIO HIDROELECTROLÍTICO.**

En la gráfica 15 se resumen los cambios porcentuales en algunos de los marcadores renales causados por las diferentes dosis del C9. Obsérvese el aumento de la osmolaridad efectiva y la concentración de sodio sérico en un 18% y la disminución de la densidad urinaria de 0.007 unidades con la dosis 10 mg/Kg. Note el aumento de más del 40% en el volumen urinario de 24 horas con la dosis 20 mg/Kg.

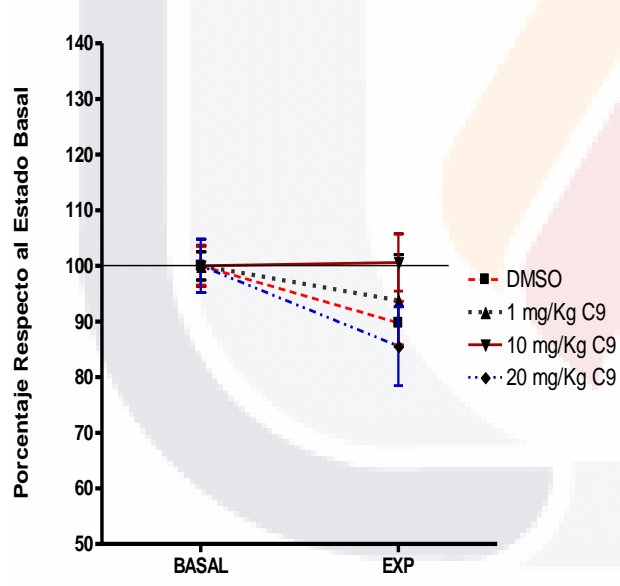
Sodio Sérico



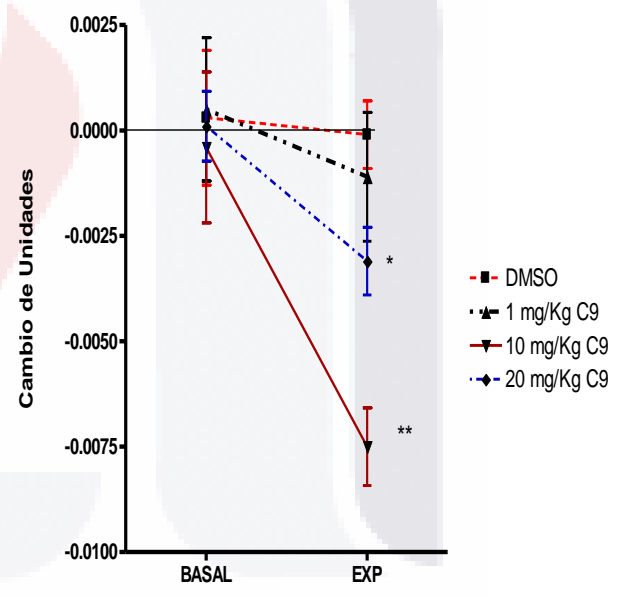
Volumen Urinario

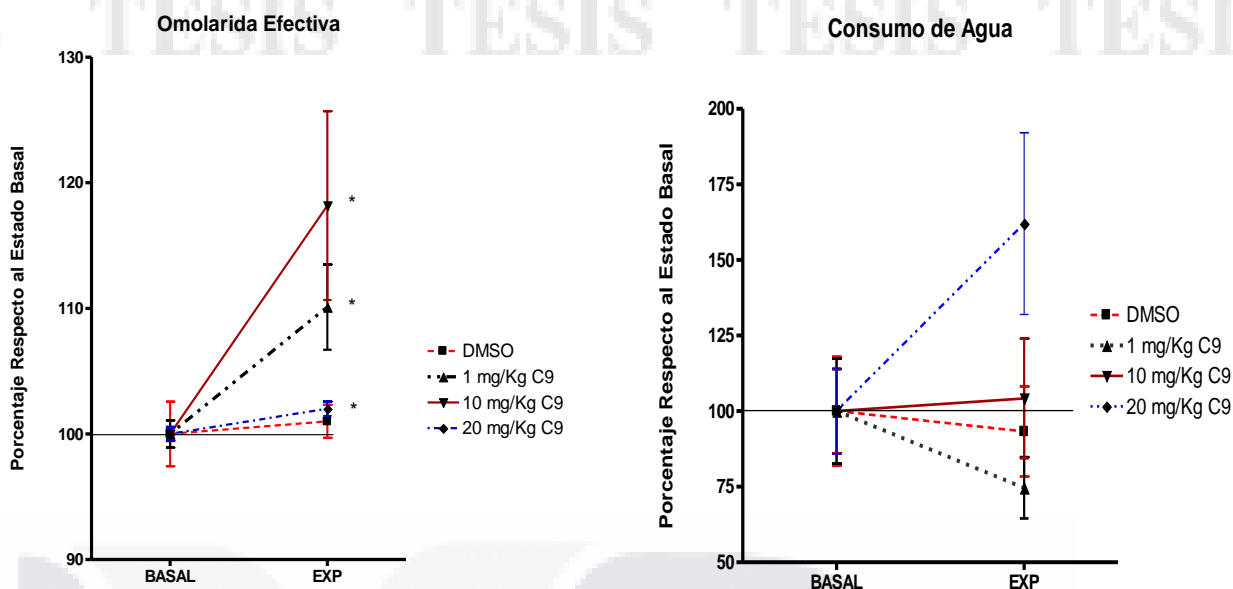


Potasio Sérico



Densidad Urinaria





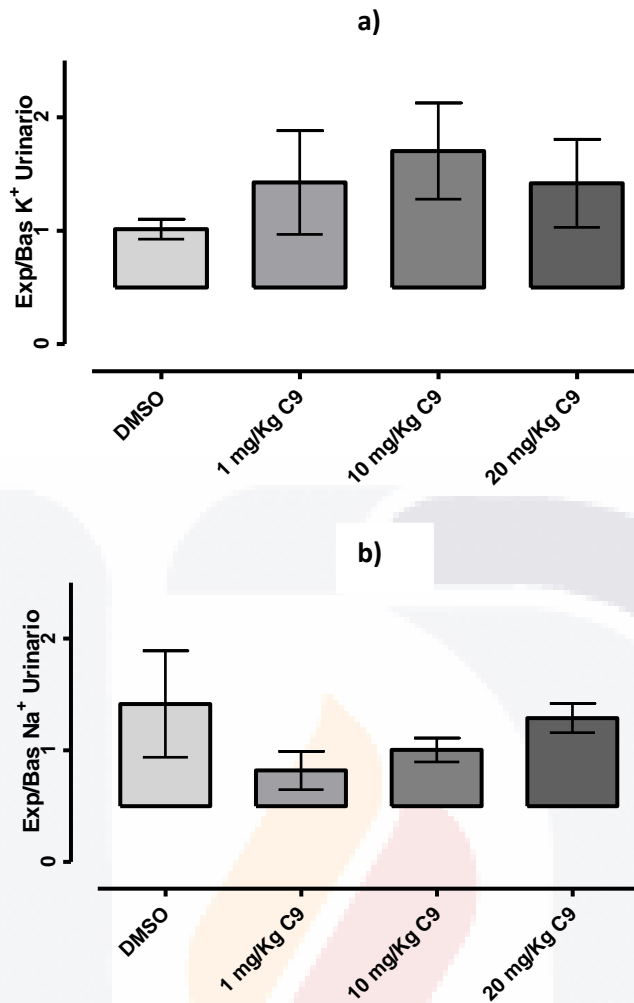
Gráfica 15. Resumen de los efectos del C9 sobre algunos de los marcadores renales. Excepto la densidad urinaria, los demás resultados se expresan como cambios porcentuales respecto a la basal. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

### 9.3.8 EXCRECIÓN DE ELECTROLITOS ( $Na^+$ y $K^+$ ).

La tabla 4 y la gráfica 16 muestran que ninguna de las dosis del C9 afectó la excreción urinaria del sodio y potasio ( $\mu Eq/Hr$ ).

Tabla 4. Efecto de C9 sobre la excreción urinaria de Na y K/hora. N= 6-7 animales/grupo.

	Control Basal	Control Exp	1 mg/Kg (C9) Basal	1 mg/Kg (C9) Exp	10 mg/Kg (C9) Basal	10 mg/Kg (C9) Exp	20 mg/Kg (C9) Basal	20 mg/Kg (C9) Exp
$Na^+$ ( $\mu Eq/Hr$ )	79.8 $\pm$ 31.1	114 $\pm$ 25.2	92.63 $\pm$ 22.6	60.1 $\pm$ 11.4	79.3 $\pm$ 8.5	78.6 $\pm$ 11.6	77.2 $\pm$ 9.9	101.42 $\pm$ 16.8
$K^+$ ( $\mu Eq/Hr$ )	54.4 $\pm$ 7.5	52.34 $\pm$ 4.5	27.7 $\pm$ 4.8	31.4 $\pm$ 3.7	30.3 $\pm$ 5.2	40.6 $\pm$ 4.2	51.8 $\pm$ 7.9	61.8 $\pm$ 13.5



Gráfica 16. Relación de la excreción de K<sup>+</sup> (Experimental/Basal) (a) y Na<sup>+</sup> (b), en los diferentes grupos experimentales. Nótese que ningún tratamiento afectó significativamente a estas variables.

### 9.3.9 BIOMARCADORES EN ORINA INDICATIVOS DE DAÑO RENAL.

Para determinar si el C9 causa daño renal, en la orina de 24 horas, se evaluaron los efectos del compuesto sobre los marcadores más representativos de alteraciones renales. En la tabla 5 se muestran los efectos del C9 sobre las siguientes variables en orina: proteínas, pH, glucosa, bilirrubinas y depuración de creatinina. Observe que las diferentes dosis del C9 no afectaron las proteínas, pH, glucosa y bilirrubinas en la orina, mientras que la depuración de creatinina se incrementó significativamente con la dosis de 20 mg/Kg.

Tabla 5. Efecto de C9 sobre algunos biomarcadores urinarios indicativos de daño renal.

	DMSO Basal	DMSO Exp	1 mg/Kg (C9) Basal	1 mg/Kg (C9) Exp	10 mg/Kg (C9) Basal	10 mg/Kg (C9) Exp	20 mg/Kg (C9) Basal	20 mg/Kg (C9) Exp
Proteínas (mg/dl)	24 ± 6	44±14	66±16,6	65±15,7	65.7±16.6	65±15.7	30±0	41.7±11.7
pH	6.8±0.12	7±0	7.35±0.21	7.42±0.35	7.07±0.31	7.07±0.32	7.33±0.25	7.25±0.11
Glucosa (mg/dl)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Bilirrubina	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Depuración de creatinina (ml/min)	0.74±0.06	0.89±0.06	0.64±0.07	0.72±0.08	0.61±0.06	0.77±0.08	0.52±0.06 <sup>a</sup>	1.29±0.14 <sup>a</sup>

Efecto de C9 en algunos biomarcadores de daño renal. N= 6-7 animales/grupo.<sup>a</sup>  
p<0.001.

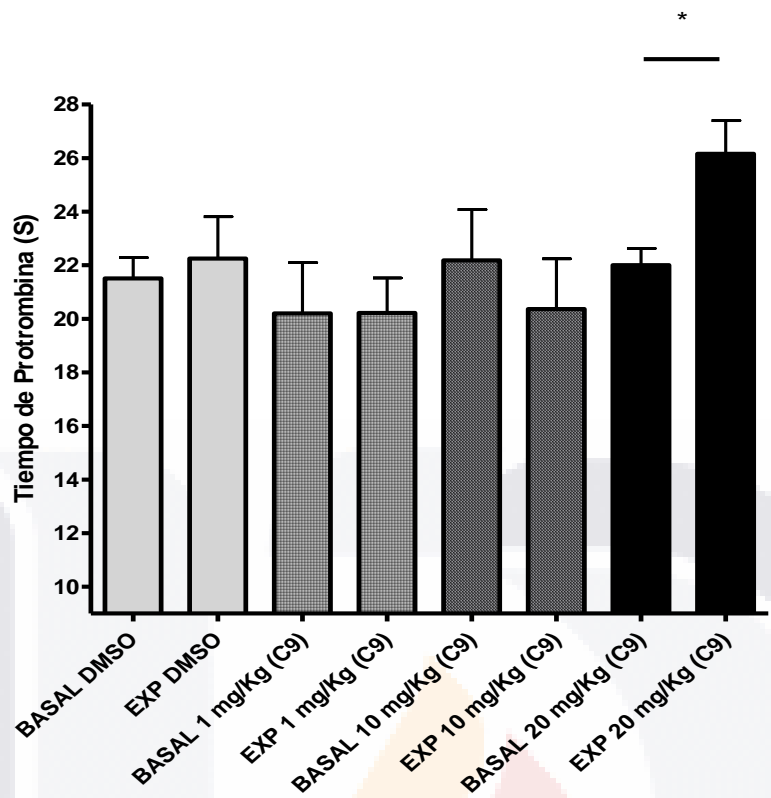
Cabe mencionar que las bilirrubinas urinarias son más representativas de efectos hepáticos, sin embargo, se colocó aquí por fines de agrupación de los datos.

#### 9.4. EFECTOS DEL C9 SOBRE LOS TIEMPOS DE COAGULACIÓN.

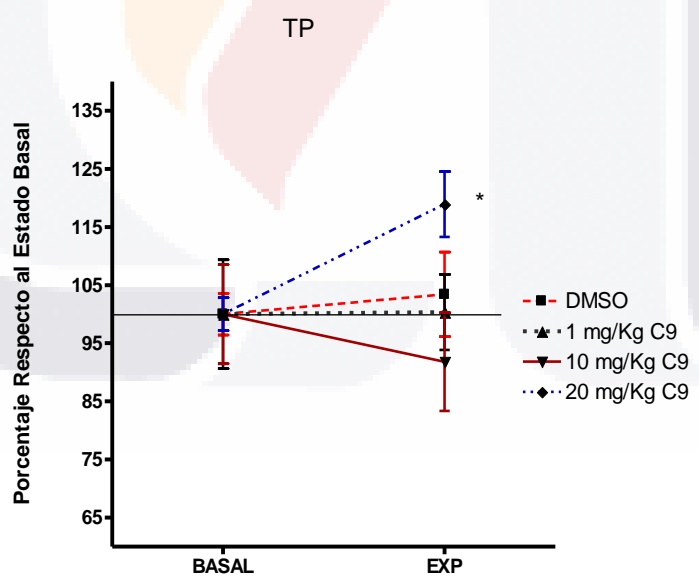
##### 9.4.1 TIEMPO DE PROTROMBINA (TP).

Se evaluó el efecto de C9 sobre el tiempo de protrombina como una forma de analizar posibles alteraciones de la vía extrínseca de la cascada de coagulación. Cabe señalar, que aunque en esta vía no interviene el factor Von Willebrand, aquí se presenta con el fin de determinar si existe una alteración por el bloqueo de los receptores V2 del endotelio vascular o por el posible daño hepático que pudiese alterar la síntesis hepática de los factores de las cascadas de coagulación. Las gráficas 17 y 18 muestran un incremento del 18% de la protrombina con la dosis de 20 mg/Kg (p<0.05 respecto a la basal).





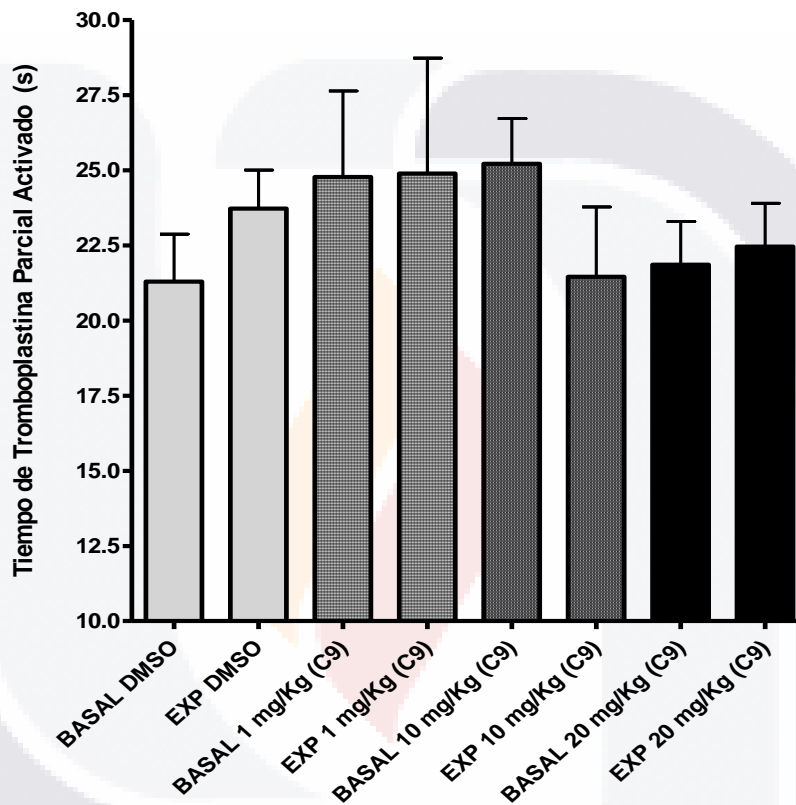
Gráfica 17. Efectos del C9 sobre el tiempo de protrombina. Los valores corresponden a las medias  $\pm$  E.E.M. N= 6 animales/grupo. \* $p < 0.05$ .



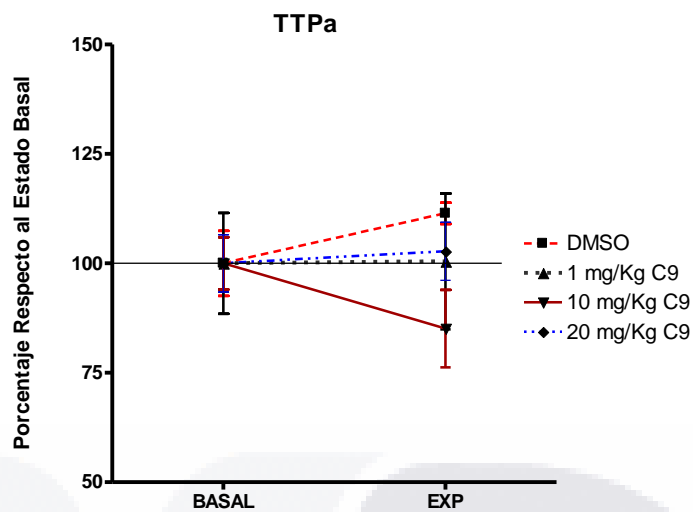
Gráfica 18. Porcentaje de cambio del tiempo de protrombina TP, respecto al estado basal para cada tratamiento. Los valores están representados como la media  $\pm$  E.E.M.

#### 9.4.2 TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADO (TTPa).

Dado que la liberación del factor Von Willebrand pudiera ser bloqueada por la acción de C9 sobre los receptores V2 del endotelio vascular, el análisis del TTPa tuvo como objetivo determinar indirectamente la participación del factor Von Willebrand sobre la vía intrínseca de la coagulación. Las gráficas 19 y 20, muestran que ninguna de las dosis del C9 afectó el TTPa.



Gráfica 19. Efecto de C9 sobre el tiempo de tromboplastina parcial activado. Los valores se expresan como la media  $\pm$  E.E.M. N= 5-7 animales/grupo.



Gráfica 20. Porcentaje de cambio de tiempo de tromboplastina parcial activado. Los valores están representados como la media  $\pm$  E.E.M. No se observaron diferencias significativas entre los grupos. N= 5-7 animales/grupo.

### 9.5 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO HEPÁTICO.

El estudio histológico comparativo entre los diferentes grupos no mostró cambios significativos con respecto a los grupos Control y DMSO. La búsqueda de zonas de lesión en forma de infiltrados inflamatorios no mostró resultados positivos. Igualmente, el estudio detallado para determinar áreas de células con signos de necrosis o apoptosis tampoco arrojaron resultados. Las siguientes microfotografías fueron tomadas de cortes histológicos de hígados provenientes de los diferentes grupos de animales experimentales teñidos con H-E o PAS.

La imagen 1(a) muestra un corte histológico de hígado de un animal control solución salina. Obsérvense los dos espacios centrolobulillares hacia ambos lados de la imagen. La imagen 1(b) muestra un corte del grupo DMSO. Observe el espacio portal hacia el lado superior derecho y uno centrolobulillar hacia la esquina contraria. No se observaron infiltrados inflamatorios ni áreas de células necróticas ni apoptóticas. Obsérvese que las características histológicas de las imágenes 1(c), 1(d) y 1(e) son semejantes a las del grupo Control (sin áreas de infiltrados inflamatorios, células necróticas ni apoptóticas).

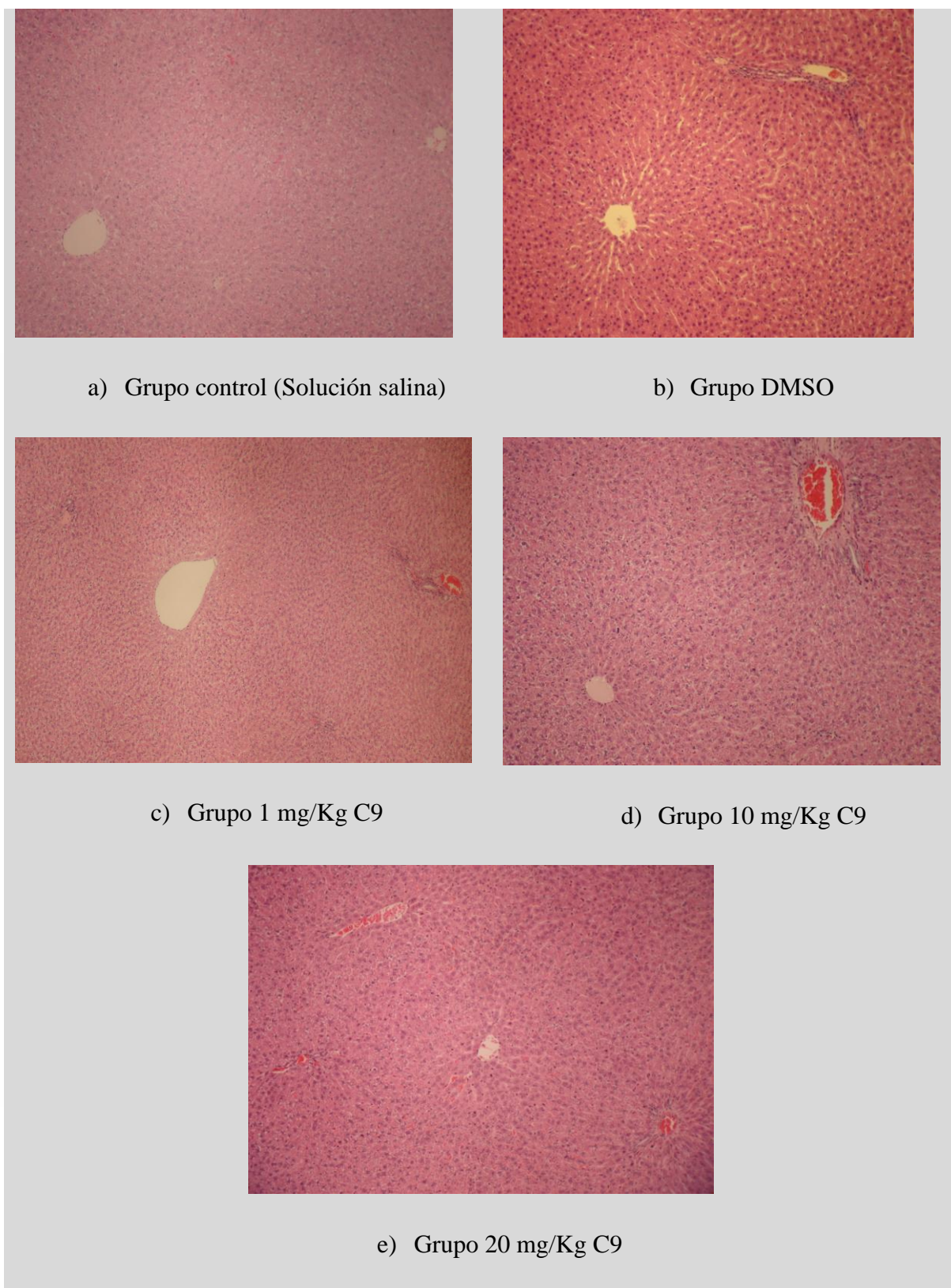
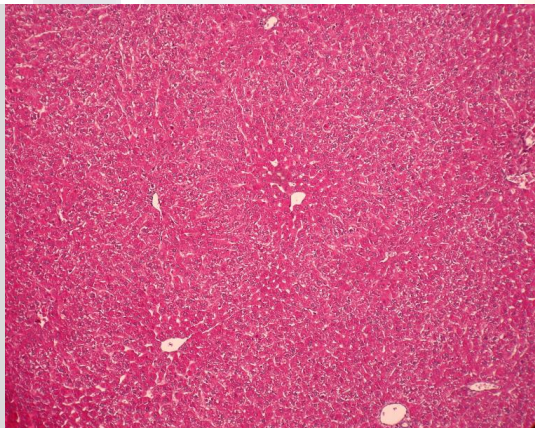
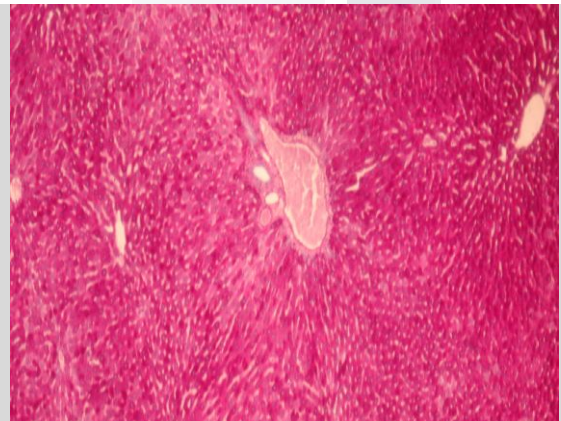


Imagen 1. Microfotografías de cortes histológicos de hígado de los diferentes grupos experimentales (Control, DMSO, 1, 10 y 20 mg/Kg del C9) teñidos con H-E. Amplificación: 200X

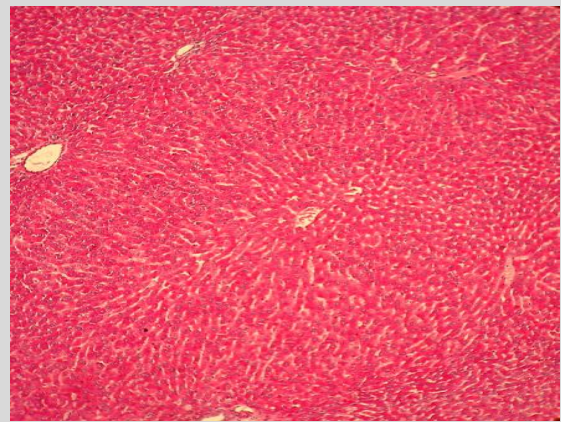
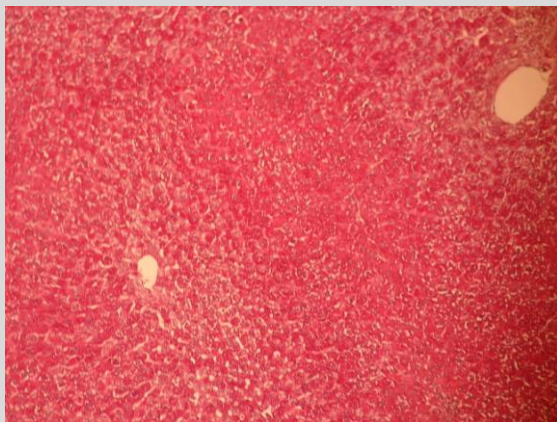
Las microfotografías de la imagen 2, teñidas con PAS muestran la acumulación de glucógeno hepático. Las zonas más oscuras corresponden a mayor acumulación de glucógeno; en la sección (a) se observa parte de un lobulillo hepático del grupo control (solución salina 0.9%), (b) muestra un espacio portal en el centro y dos espacios centrilobulillares hacia ambos lados de la imagen del grupo DMSO mostrando similitud con el grupo control solución salina 0.9%. En la sección (c) se observa parte de un lobulillo hepático del grupo 1 mg/Kg de C9, nótese que tienen una distribución semejante a los controles donde hay espacios llenos y otros vacíos de glucógeno. En las imágenes (d) y (e) se observa la distribución de glucógeno un poco más uniforme con menos espacios vacíos en relación con los controles, sugiriendo un mayor depósito de glucógeno.



a) Grupo control (Solución salina)



b) Grupo DMSO



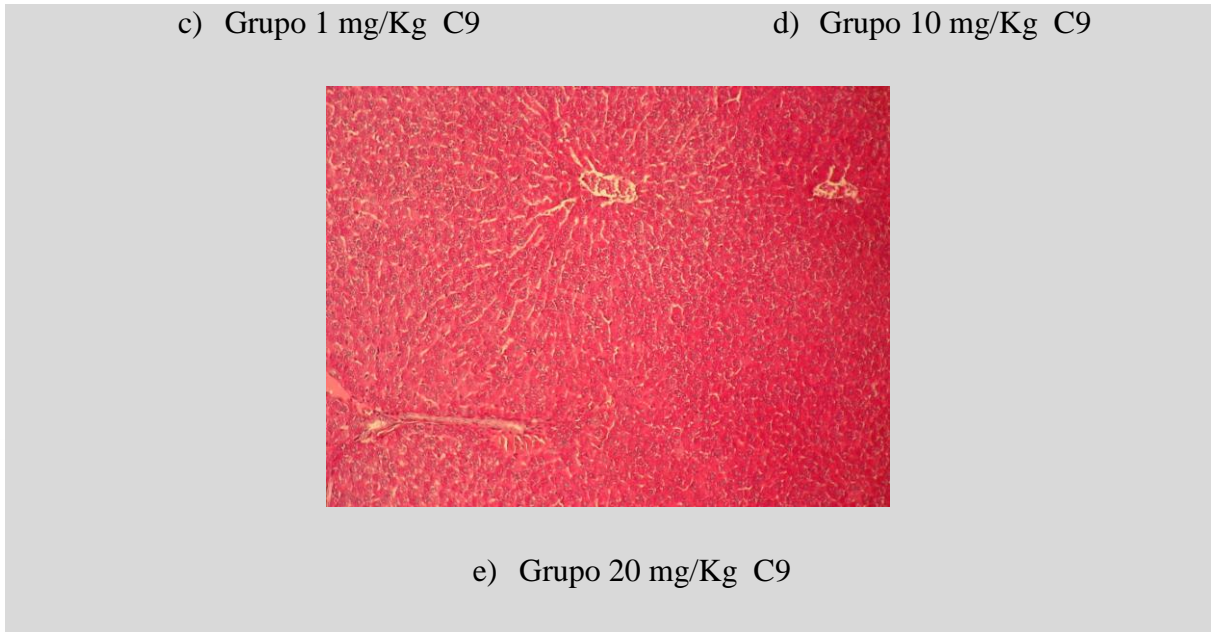
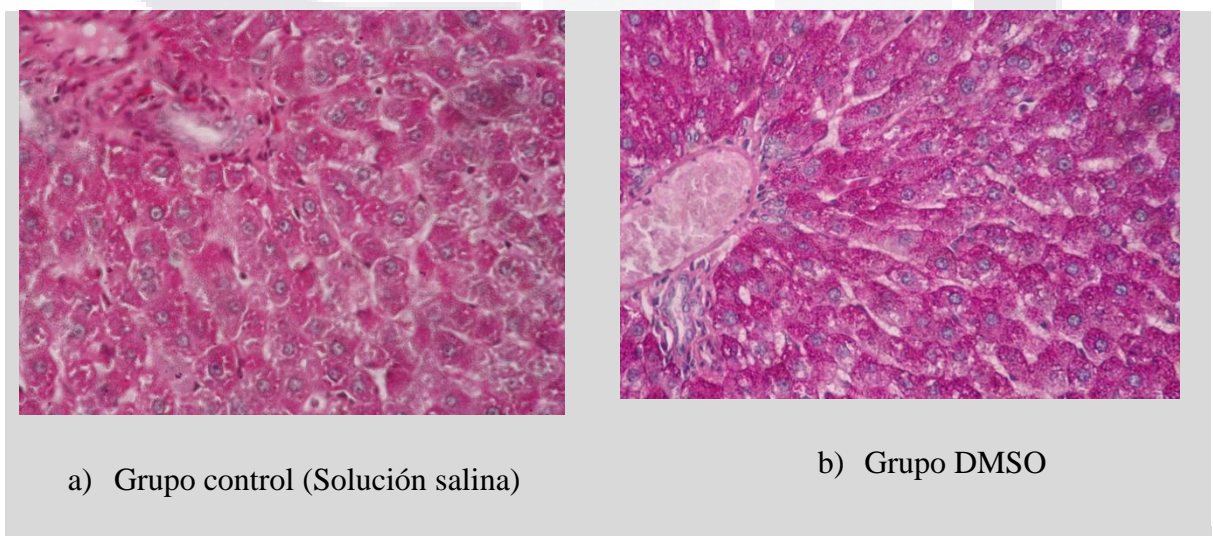


Imagen 2. Microfotografías de cortes histológicos de hígado de los diferentes grupos experimentales (Control, DMSO, 1, 10 y 20 mg/Kg del C9), teñidos con PAS. Amplificación: 200X.

Las siguientes microfotografías de la imagen 3, tomadas a mayor aumento (680X) para buscar con mayor detalle la presencia de células inflamatorias infiltrantes o áreas de células necróticas o en apoptosis inducidos por los diferentes tratamientos con el C9. El estudio histológico no mostró cambios significativos con respecto al grupo Control indicando que ninguna dosis del C9 afectó la histología hepática.



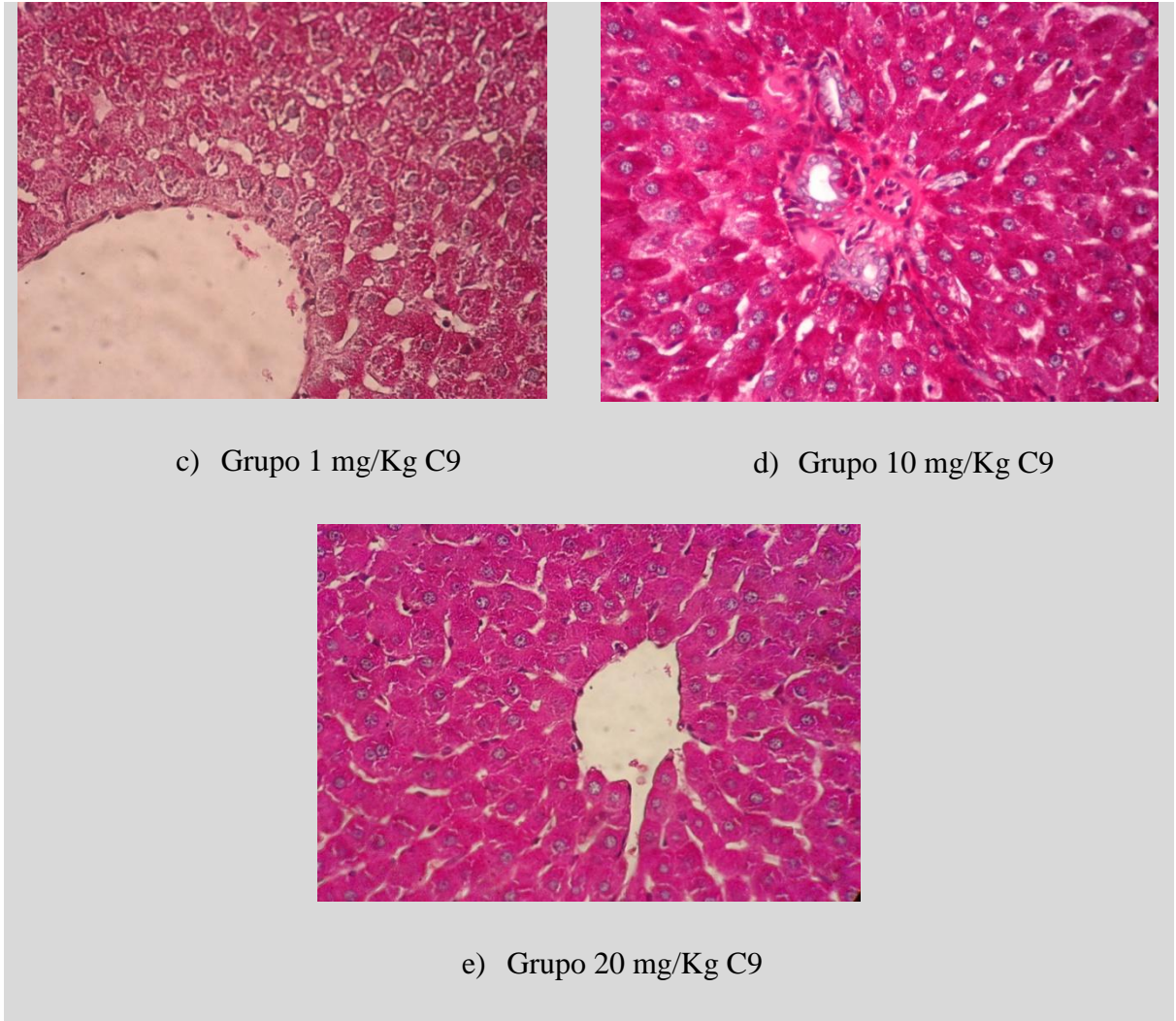
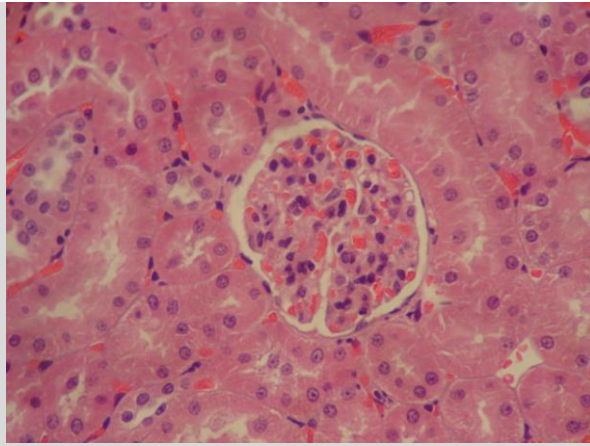


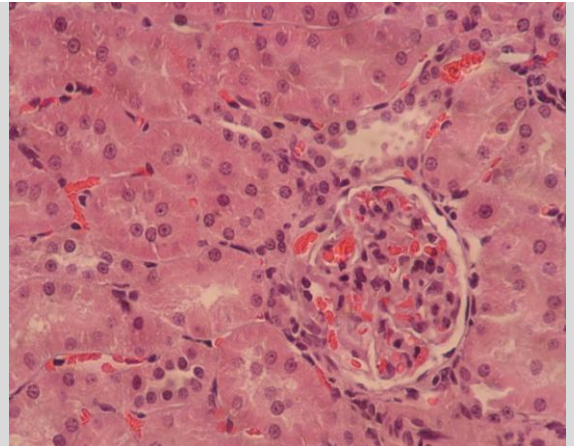
Imagen 3. Microfotografías de cortes histológicos del hígado de los diferentes grupos experimentales teñidos con PAS. Amplificación; 680X.

### 9.6 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO RENAL.

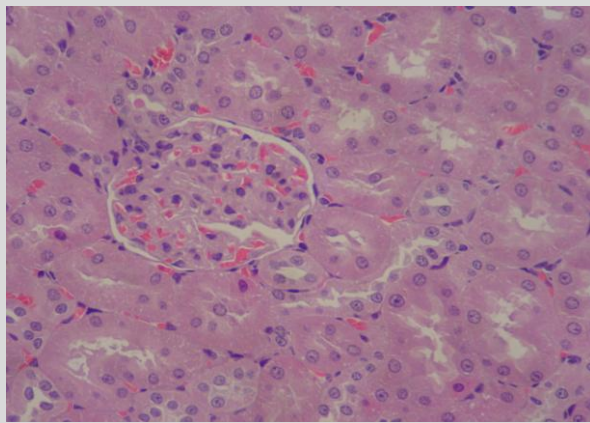
Las siguientes microfotografías de la imagen 4 teñidas con H-E, corresponden a cortes histológicos de corteza renal de animales sometidos a diferentes dosis de C9: Control (a), DMSO (b), 1 (c), 10 (d) y 20 (e) mg/Kg de peso corporal de C9 respectivamente. Obsérvense el aspecto normal de los glomérulos (centro) y de los túbulos contorneados proximales y distales de las nefronas. No se observan infiltrados inflamatorios o áreas de célula en necrosis o apoptosis. Tinción H-E. Amplificación: 800X.



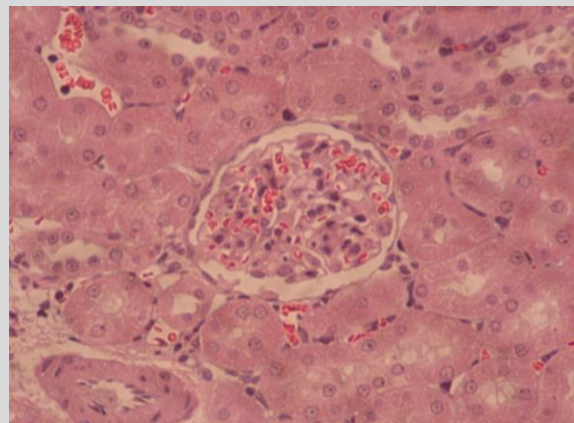
a) Grupo control (Solución salina)



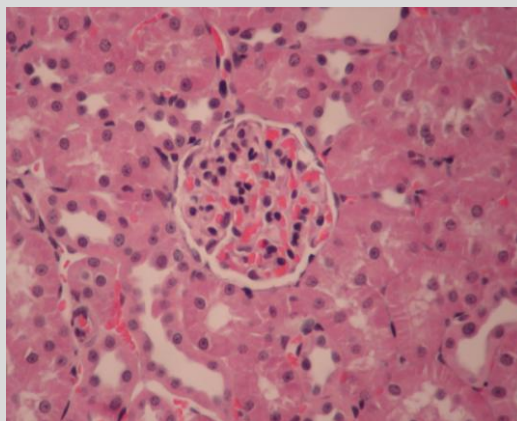
b) Grupo DMSO



c) Grupo 1 mg/Kg C9



d) Grupo 10 mg/Kg C9

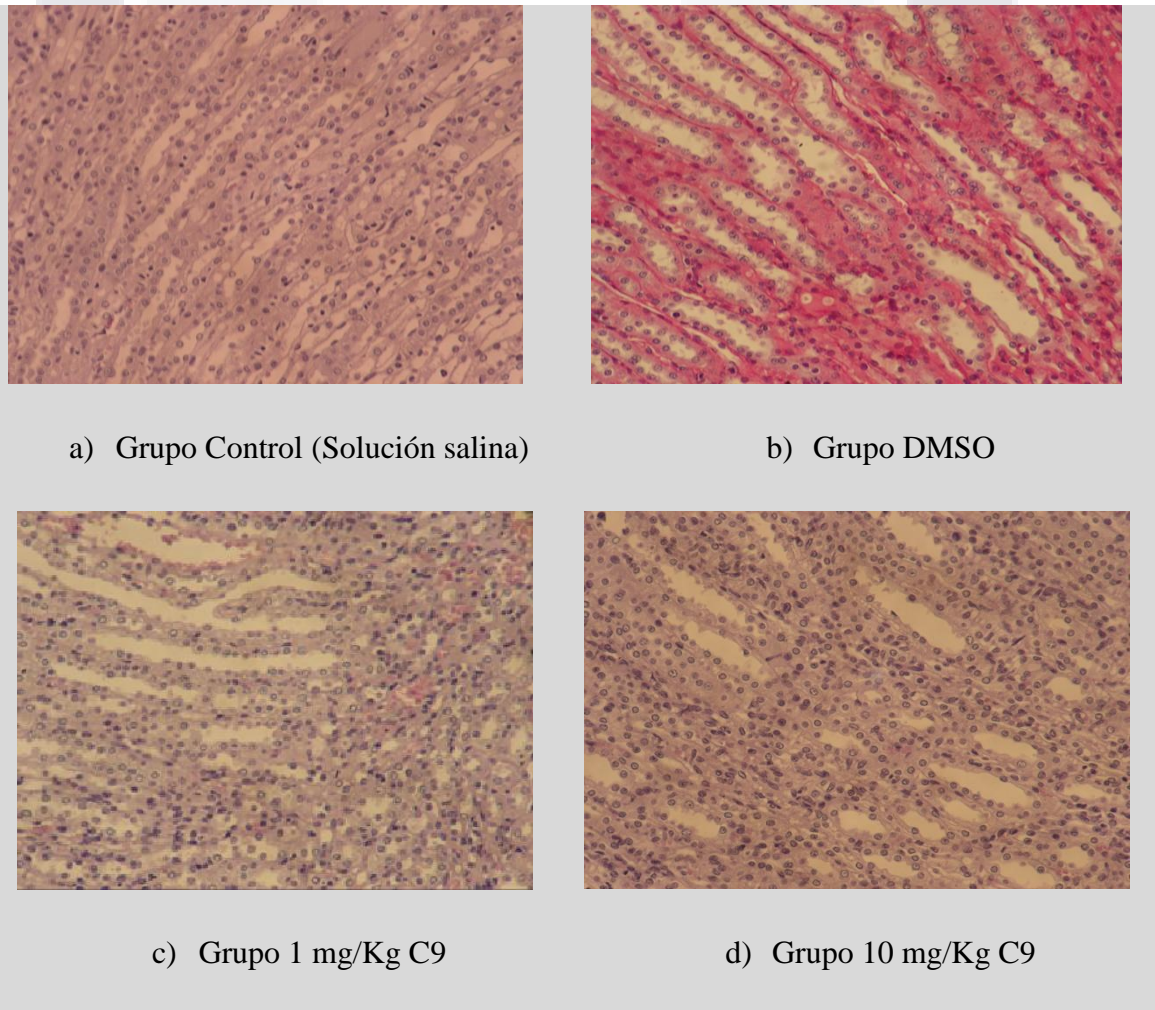


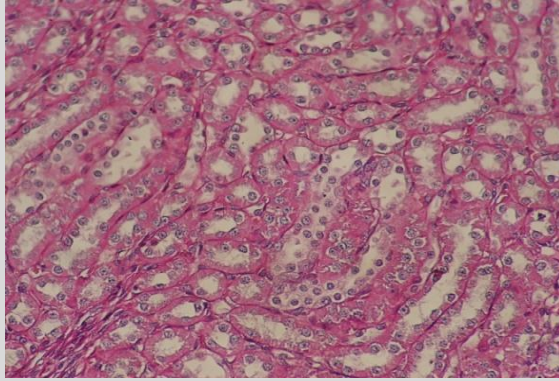
e) Grupo 20 mg/Kg C9



Imagen4. Microfotografías de cortes histológicos de corteza renal de animales sometidos a diferentes dosis de C9: Control (a), DMSO (b), 1 (c), 10 (d) y 20 (e) mg/Kg de peso corporal de C9 respectivamente. Obsérvense el aspecto normal de los tejidos, es decir sin infiltrado de células inflamatorias o áreas de célula en necrosis o apoptosis. Tinción H-E. Amplificación: 800X.

Las siguientes microfotografías de la imagen 5, teñidas con PAS-H, corresponden a cortes histológicos de médula renal de animales sometidos a diferentes dosis de C9: Control (a), DMSO (b), 1 (c), 10 (d) y 20 (e) mg/Kg de peso corporal de C9 respectivamente. Obsérvense el aspecto normal de los diferentes túbulos del asa de Henle y túbulos colectores de las nefronas. No se observan infiltrados inflamatorios o áreas de célula en necrosis o apoptosis. Amplificación: 520X.





e) Grupo 20 mg/Kg C9

Imagen 5. Microfotografías de cortes histológicos a diferentes niveles de la médula renal de los diferentes grupos de animales experimentales. No se observan signos de daño tisular como: infiltrados inflamatorios, áreas con células necróticas o en apoptosis. Tinción PAS-H. Amplificación: 520X.

En conjunto, los resultados de la histología renal a nivel fotónico, sugieren que el C9 en ninguna de las dosis empleadas afecta la morfología renal.

## 10.0 DISCUSIÓN.

Basados en las características fisicoquímicas, en esta tesis se estudiaron los efectos toxicológicas y/o farmacológicas del C9 a través la determinación de cambios en algunas variables hepáticas, renales y de la coagulación sanguínea, sugerentes de daño.

A nivel hepático se realizaron estudios, para ver el efecto que pudiera darse debido al bloqueo de los receptores V1a del hígado y por tanto el bloqueo de la glucogenólisis mediada por AVP, (Hiroyama y col., 2007)( Keppens y De Wulf, 1979) o bien a través de la acción directa o por biotransformación del C9.

El estudio de los efectos tóxicos del C9 sobre la bioquímica y la histología hepática, sugieren que solo con la dosis de 20 mg/Kg se indujo ligeros efectos que podrían considerarse tóxicos como: el aumento de la Transaminasa Glutámico Pirúvica y el Tiempo de Protrombina (Gráficas 2, 3, 17 y 18). El hecho de que los demás biomarcadores tanto histológicos (Imágenes 1, 2, y 3) como bioquímicos (Gráficas 4 y

5) indicativos de daño hepático no mostraran cambios significativos con ninguna de las dosis, sugiere que el C9 no induce efectos tóxicos severos. Por otro lado, el incremento significativo de glucógeno hepático que el glucógeno hepático con las diferentes dosis del C9 (Gráfica 6), sugieren que este compuesto tiene un efecto farmacológico, posiblemente mediado por el bloqueo de los receptores V1a de AVP. El hecho de que no se haya observado un cambio en las concentraciones hepáticas de glucógeno dependiente de la dosis, sugiere que los efectos farmacológicos sobre la glucogenólisis se encuentran en un rango mucho menor. El mecanismo de la hipoglucemia observada con la dosis de 20 mg/Kg (Gráfica 7) se puede explicar parcialmente considerando que con esta dosis se estará bloqueando completamente el efecto glucogenolítico de la AVP. Cabe recordar, que C9 podría bloquear por un lado, la glucogenólisis y alterar los niveles de glucosa en sangre, y por otro lado podría afectar los procesos de liberación de glucagon e insulina que en parte están mediadas por AVP a través de receptores V1b del páncreas (Fujiwara y col., 2007) (Nakamura y col., 2011). Por lo que es necesario realizar nuevos experimentos para probar estas hipótesis.

El incremento de las bilirrubinas, es un biomarcador de daño hepático y por razones fisiológicas, es evaluado a través de su eliminación en orina (Gorchynski y col., 2009). Dado que no se incrementó esta variable en la orina (Tabla 5), podemos pensar que el C9 no tuvo efectos tóxicos sobre el hígado en esta variable.

Las variables relacionadas con los efectos del C9 sobre el equilibrio hidroelectrolítico (sodio y potasio sérico y urinario, osmolaridad efectiva sérica, densidad urinaria, volumen urinario e ingesta de agua) indican que a las dosis empleadas, el C9 afectó diferencialmente algunas de ellas (Gráficos 9, 11, 12, 13 y 15). Dentro de los principales hallazgos, está el incremento de la concentración de sodio sérico, sin embargo hasta aquí no se sabe, si el estado hipernatrémico fue causado por un efecto de excreción de agua libre (hipernatremia hipovolémica), o bien por una reabsorción excesiva de sodio con niveles normales de volumen sanguíneo (hipernatremia euvolémica). La gráfica 12 muestra que a las dosis de 10 y 20 mg/Kg disminuyó la tonicidad urinaria (0.007 y 0.004) respectivamente, lo que significa que se está generando una orina más diluida, sin embargo hasta este punto no se sabe si esta disminución es por un aumento en la excreción de agua libre o bien por una

disminución en la excreción de solutos, en particular de electrolitos, proteínas o glucosa que pudieran afectar la tonicidad urinaria. Observando la tabla 4 y la figura (16), muestran que la cantidad de electrolitos ( $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ) excretados fue igual antes y después de los diferentes tratamientos, resultados semejantes fueron reportados por Tsuboi y col., 1994, al evaluar el efecto causado por un antagonista-no peptídico de AVP. Además en la tabla 5 se observa que no hubo cambios en la excreción de proteínas, ni de glucosa. En base a nuestras observaciones podemos concluir que la excreción de solutos fue la misma antes y después de los tratamientos, por lo que la disminución de la densidad urinaria se debe a la excreción de agua libre con la misma cantidad de solutos (efecto acuareético).

El concepto anterior es apoyado por los resultados del estudio de la producción de orina de 24 horas, que muestra que al final del tratamiento ocurrió un aumento significativo del volumen urinario (40% a la dosis de 20 mg/Kg) (Gráfica 13).

En resumen, los resultados indican que el C9 tiene efectos farmacológicos a nivel renal y que a las dosis empleadas el compuesto no posee efectos tóxicos (Tabla 5), por lo que es posible que la dosis tóxica de este compuesto se encuentre por arriba de la mayor dosis empleada. El C9 fue creado para actuar como antagonista de los receptores de AVP. Si esto es así, es posible que el mecanismo de acción del compuesto haya sido mediado por la interacción competitiva entre el C9 y la AVP por los receptores V2 de los túbulos colectores del riñón es decir el C9 posee efecto acuareético.

El estudio de los efectos del C9 sobre las concentraciones séricas de potasio indica que el compuesto no afectó significativamente su metabolismo. A pesar de que se está perdiendo agua libre de electrolitos, no ocurrieron cambios séricos significativos de este ión. Es posible que esto se deba a que en condiciones normales, este ión se encuentra en bajas concentraciones y los mecanismos homeostáticos que lo mantienen son lo suficientemente poderosos para compensar los efectos del compuesto. El comportamiento de los resultados de osmolaridad, concentración de sodio y potasio sérico son semejantes con los reportados con Koh-ichi y col., (2007); quienes evaluaron al conivaptan, un antagonista no peptídico de AVP.

Una explicación del incremento de la depuración de creatinina con la dosis de 20 mg/kg) puede verse a través de la fórmula de depuración de creatinina que indica que entre más elevado sea el volumen de orina, mas alta será la tasa de depuración de creatinina.

Por otro lado, los efectos de las diferentes dosis del C9 sobre la histología renal no mostraron efectos tóxicos visibles. Los resultados histológicos (Imágenes 4 y 5), junto con los resultados bioquímicos apoyan fuertemente la idea de que el C9, a las dosis empleadas, no posee efectos tóxicos y sí farmacológicos (acuarético) sobre el riñón.

Como se mencionó anteriormente, mientras que el TP se incrementó con la dosis mayor del C9, el TTPa no se modificó con ninguna de las dosis (Gráficas 19 y 20), indicando que el C9 no afecta la liberación del factor de Von Willebrand, es decir el compuesto no bloqueó a los receptores V2 del endotelio vascular.

Una de las manifestaciones generales de que un xenobiótico tiene efectos tóxicos es la alteración en las curvas de peso corporal. En este estudio el hecho de que con las diferentes dosis del C9 no se hayan observado cambios importantes en las curvas de peso corporal, apoya el concepto de que el C9 no indujo efectos tóxicos importantes.

## **11.0 PERSPECTIVAS.**

En resumen podemos decir que es necesario hacer nuevos experimentos con dosis mayores de C9 para determinar sus efectos tóxicos, carcinogénicos y teratogénicos, además de abordar el estudio toxicológico y farmacológico sobre otros sistemas como el SNC, cardiovascular y digestivo entre otros.

Estudios recientes de Contreras-Romo y col. (2012, Tesis Doctoral) muestran que el C9 posee un importante efecto acuarético (bloqueo de los receptores V2 del túbulo colector de la nefrona y vasculares, efecto antagonista de los receptores V1a del músculo liso vascular), que dieron lugar a la realización de la presente tesis. El conocimiento de que a las dosis empleadas en este trabajo no se hayan observado efectos tóxicos significativos pero sí farmacológicos, nos da la seguridad de que dosis menores de 20 mg/Kg, nos permitirán estudiar los efectos farmacológicos (acuarético y

bloqueo de la glucogenólisis hepática, entre otros), los cuales pueden ser utilizados como posibles herramientas terapéuticas en el tratamiento del síndrome de secreción inadecuada de hormona antidiurética, la insuficiencia cardiaca congestiva crónica, la cirrosis hepática (Yamamura y col., 1998) (Villabona, 2010).

## 12.0 CONCLUSIONES.

- A nivel hepático, el C9 aumento la concentración de glucógeno, lo cual sugiere que el compuesto podría tener una actividad bloqueadora de la glucogenólisis.
- Excepto con la dosis de 20 mg/Kg que indujo un ligero aumento de la TGP y TP, sugerentes de toxicidad, además de una leve hipoglucemia; el C9 no indujo cambios toxicológicos a nivel del hígado, riñón y coagulación sanguínea.
- El C9 afecto el equilibrio hidroelectrolítico de la siguiente manera: incrementó el volumen urinario, la concentración de  $\text{Na}^+$  sérico y la osmolaridad efectiva; disminuyó la densidad urinaria y mantuvo una excreción normal de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  urinario; lo cual sugiere tener un efecto “acuareético”.
- El C9 no afectó el tiempo de tromboplastina (TTPa), por lo tanto no se ve alterada la liberación del factor Von Willebrand (vía intrínseca).

## GLOSARIO.

**Absorción:** Proceso por el cual los tóxicos cruzan las membranas de nuestro cuerpo y entran en el torrente sanguíneo o sistema linfático.

**Acuaporinas:** Son proteínas de membrana celular, forman canales que permiten un elevado flujo de agua a través de la membrana. En el riñón existen al menos siete isoformas de acuaporinas.

**Apoptosis:** Proceso fisiológico previsto de muerte y desintegración de tejidos dentro del desarrollo normal de los seres vivos. Cascada de enzimas proteolíticas que resulta en muerte celular controlada al daño celular importante o programas específicos de desarrollo.

**Arginina Vasopresina (AVP):** Hormona liberada principalmente en respuesta a cambios en la osmolalidad sérica o en el volumen sanguíneo. También conocida como hormona antidiurética (ADH).

**Bioactivación:** Conversión metabólica de un xenobiótico a un derivado más tóxico. Proceso metabólico por el cual una sustancia madre es químicamente cambiada a una sustancia hija con actividad biológica potenciada.

**Biotransformación:** Cualquier transformación química de una sustancia producida por organismos vivos o por preparaciones obtenidas de éstos. Conversión de un químico desde una forma a otra por un organismo biológico.

**Carcinogénesis:** Proceso de inducción de neoplasias malignas por agentes físicos, químicos o biológicos.

**Carcinogénico:** Habilidad de una sustancia para producir cáncer.

**Cirrosis hepática:** Es el resultado de la complicación de diferentes padecimientos hepáticos, las células hepáticas mueren por el daño crónico producido y los espacios son reemplazados generalmente por tejido cicatrizado, nódulos y fibrina. Se caracteriza por una función y estructura anormal del hígado.

**Citocromo P-450:** Enzima con gran número de isoformas inducidas o inhibidas por agentes químicos determinados, y clave en la biotransformación y eliminación de un gran número de xenobióticos.

**Detoxificación:** También llamada desintoxicación, es un proceso de transformación química que hacen a una molécula menos tóxica.

**Distribución:** Parte de la toxicocinética que involucra el proceso la transportación de la droga hasta el sitio de acción.

**Dosis:** Cantidad de sustancia administrada o absorbida por un individuo en proporción a su peso o volumen corporal, ordinariamente en 24 horas. Se suele expresar en mg/K.

**Efecto adverso:** Cambio en la morfología, fisiología, crecimiento, desarrollo o tiempo de vida de un organismo, que afecta su capacidad funcional o de la homeostasis, o presenta un incremento de su susceptibilidad a los efectos dañinos de influencias ambientales.

**Eliminación:** Resultado global de los procesos de biotransformación y de excreción por los que el organismo se libera de sustancias.

**Excreción:** Eliminación de sustancias endógenas o absorbidas, o de sus metabolitos o productos de desecho, a través de los órganos del cuerpo, y por medio de orina, bilis, heces, sudor, leche, aliento, pelos, uñas, etc. Los órganos principales de excreción son riñón y tubo digestivo.

**Fármaco:** Cualquier producto que puede ser absorbido por un organismo, difundirse en él y producirle cambios favorables o no. Los fármacos empleados para el tratamiento de enfermedades son los medicamentos.

**FDA:** Administración de drogas y alimentos. La agencia Federal de los Estados Unidos responsable de la seguridad de drogas, cosméticos, aditivos y disposiciones médicas.

**Glucógeno:** Reserva de glucosa en los animales, se almacena principalmente en hígado y músculo.



**Glucogenólisis:** Lisis o escisión de glucógeno mediante un conjunto de reacciones en cascada. Su conversión a glucosa-6-fosfato (G6P) para entrar a la glucólisis, es catalizada en parte por la glucógeno fosforilasa; el camino inverso, se lleva a cabo por la glucógeno sintasa.

**Glucuronidación:** Es el proceso de agregar glucurónido a un tóxico o metabolito de fase I durante la fase II de biotransformación.

**Glutación:** Tripéptido que se encuentra en la mayoría de los tejidos, sobre todo en el hígado. Juega un papel muy importante en la detoxificación y protección celular.

**Grupo Control:** Grupo seleccionado o establecido necesariamente antes de un estudio, integrado por humanos, animales o células, en un todo idéntico al grupo que se estudia, y mantenido en la misma situación y condiciones que éste, pero sin someterlos a la exposición de un tóxico o fármaco. Grupo de comparación o testigo.

**Hepatotoxicidad:** Es el daño hepático que se asocia con insuficiencia hepática causado por la exposición a un fármaco u otro agente no infeccioso.

**Hipernatremia:** Se presenta cuando la concentración de  $\text{Na}^+$  sérico excede los 145 mEq/L, y puede deberse a una pérdida de agua libre o bien a una ganancia hipertónica de  $\text{Na}^+$ . Cuando la hipernatremia es excesiva o cuando se elevan los niveles de sodio rápidamente puede haber riesgo de mielinólisis.

**Hiponatremia:** Se presenta cuando la concentración de  $\text{Na}^+$  sérico se encuentra por debajo de los 135 mEq/L, suele ser consecuencia de una secreción excesiva de AVP, en este caso se le conoce como hiponatremia dilucional o hipervolémica, aunque existen otros casos de hiponatremia debidas a diferentes causas.

**Insuficiencia cardiaca congestiva:** Padecimiento donde el corazón es incapaz de enviar la cantidad de sangre adecuada para satisfacer las necesidades de los tejidos.

**Metabolito:** Cualquier producto intermedio o final resultante del metabolismo.

**Necrosis:** Muerte masiva de áreas rodeadas de zonas sanas. Cambios morfológicos subsecuentes a la muerte celular, caracterizados generalmente por cambios nucleares.

**Osmolaridad:** Medida de la presión osmótica generada por una solución. Es la concentración de moléculas osmóticas activas o medida de la concentración de una sustancia soluble en una solución en términos de su efecto osmótico.

**Poliuria:** Excreción de un gran volumen de orina diluida causada por la insuficiente liberación o antagonismo de AVP.

**Receptor:** Cualquier molécula biológica con la que interaccionan los fármacos para ejercer sus efectos (según este criterio también se considerarían receptores las enzimas, los transportadores de membrana y los canales iónicos), los receptores propiamente dichos son moléculas biológicas o estructuras macromoleculares altamente especializadas cuya misión es servir como sitio de reconocimiento específico de neurotransmisores, hormonas y otros mediadores.

**SIADH:** Es un estado clínico en el cual la secreción de AVP, no es suprimida adecuadamente cuando la osmolaridad plasmática cae por debajo del umbral osmótico y puede generar daño renal en la capacidad de excreción de agua, incrementando el volumen de agua corporal produciendo hiponatremia.

**Teratogenicidad:** Capacidad potencial para producir malformaciones o defectos en la descendencia. Toxicidad del desarrollo, embriotoxicidad.

**Toxicidad:** Capacidad para producir daño a un organismo vivo, en relación con la cantidad de dosis administrada o absorbida.

**Vaptanes.** Sustancias o moléculas sintéticas no peptídicas con propiedades antagonistas de los receptores de AVP.

**Xenobiótico:** Cualquier sustancia que interactúa con el organismo y que no es uno de sus componentes naturales. También puede llamarse sustancia extraña o exógena.

## REFERENCIA.

- Aulesa, C. Ruiz, G. Duran, J. y Galimany, R. Estudio de la influencia de la hemólisis en un perfil básico de coagulación *Revista de Diagnóstico Biológico* , 2002. 51(2): 54-59.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. 5th edition. New York: W H Freeman; 2002. Available from:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21154/>
- Chatterjee K. Neurohormonal activation in congestive heart failure and the role of vasopressin. *American Journal of Cardiology*, 2005. 95(9A):8B-13B.
- Contreras R.M. Síntesis y Caracterización Química y Farmacodinámica de Antagonistas No Peptídicos de los receptores V1a y V2 de Vasopresina. 2012. “Tesis Doctoral”.
- Correa J., Espinosa R. J., González M. M., Espinoza F. M., Vazquez A. I. and Trujillo F J. Inhibition of acetylcholinesterase by two arylderivates: 3<sup>a</sup>-Acetoxy-5H-pyrrolo(1,2-a)(3,1)benzoxazin-1,5-(3aH)-dione and *cis*-N- $\rho$ -Acetoxy-phenylisomaleimide. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2006.21(2):133-138.
- DeLeve LD, Kaplowitz N. Mechanisms of drug-induced liver disease. *Gastroenterology Clinics of North America*, 1995. 24:787–810.
- Feigin A. Evidence from Biomarkers and Surrogate Endpoints *NeuroTherapeutics*, 2004. 1(3): 323–330.
- Finley J. J. , Konstam M.A. and Udelson J.E. Arginine Vasopressin Antagonist for the treatment of heart failure and hyponatremia . *Circulation*, 2008. 118:410-421
- Fisher C. D. , Lickteig A.J., Augustine L.M., Ranger-Moore J., Jackson J.P., Ferguson S.S., and Cherrington N.J. Hepatic Cytochrome P450 Enzyme Alterations in Humans with Progressive Stages of Nonalcoholic Fatty Liver Disease, *Drug Metabolism and Disposition*, 2009. 37(10): 2087–2094.
- Ganong F.W. *Review of Medical Physiology*, Twenty-Second Edition McGraw-Hill Companies, 2005.pp 499, 700-728

- Gassanov N., Semmo N., Semmo M., Nia A.M., Fuhr U., and Fikret E. Arginine vasopressin (AVP) and treatment with arginine vasopressin receptor antagonists (vaptans) in congestive heart failure, liver cirrhosis and syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion (SIADH). *European journal of clinical pharmacology*, 2011. 67 (4): 333-346
- Ghali J. K., Farah J. O., Daifallah S., Zabalawi H.A., Zmily H.D. Conivaptan and its role in the treatment of hyponatremia, *Journal of Drug Design, Development and Therapy*, 2009. 3 :253–268.
- Goodman Louis S. y Gilman A., *Las bases de la farmacología terapéutica*, Mc Graw Hill, 9ª edición.1998, Vol I, pp 767-782.
- Gorchynski J, Dean K and Anderson C.L. Analysis of Urobilinogen and Urine Bilirubin for Intra-Abdominal Injury in Blunt Trauma Patients. *Western Journal of Emergency Medicine*, 2009. 10(2): 85–88.
- Griffante C., Green A., Curcuruto O., Haslam C.P., Dickinson B.A., Arban R. Selectivity of d[Cha4]AVP and SSR149415 at human vasopressin and oxytocin receptors:evidence that SSR149415 is a mixed vasopressin V1b/oxytocin receptor antagonist., *British Journal of Pharmacology*, 2005. 146(5):744-51
- Guyton A.C. y Hall J. E. *Medical Physiology*, 11ª edición, Elsevier Saunders, 2006. pp 358 -360 y 928-930
- Hiroyama F.Y., Sanbe A., Aoyagi T., Birumachi J., Yamauchi J., Tsujimoto G., and Tanoue A. Insulin hypersensitivity in mice lacking the V1b vasopressin receptor. *The Journal of Physiology*, 2007. 584(Pt 1): 235–244.
- Hiroyama M, Toshinori A., Yoko F., Sayuri O., Atsushi S., Fumio E., and Akito T. Hyperammonaemia in V1a vasopressin receptor knockout mice caused by the promoted proteolysis and reduced intrahepatic blood. *The Journal of Physiology*, 2007. 581(Pt 3): 1183–1192.
- Hondeghem LM, Lu H.R., Van Rossem K., De Clerck F. Detection of proarrhythmia in the female rabbit heart: blinded validation. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 2003. 14(3): 287–294.
- Jaramillo J. F., Sánchez A. R., Posadas del Río F. A. *Toxicología básica, textos universitarios*, 1ª edición, 2006. pp 117 y 137.

- Jee Hyun Lee, Yon Ho Choe, Su Jin Kim, Kyung Hoon Paik, and Dong-Kyu Jin. Yonsei Changes in Glycogen and Glycosaminoglycan Levels in Hepatocytes of Iduronate-2-Sulfatase Knockout Mice before and after Recombinant Iduronate-2-Sulfatase Supplementation, *Med J.* 2011 March 1; 52(2): 263–267.
- Kaufmann J. E. and Vischer U. M. Cellular mechanisms of the hemostatic effects of desmopressin (DDAVP), *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2003. 1(4) pp 682–689.
- Keppens S, de Wulf H. 1979. The nature of the hepatic receptors involved in vasopressin-induced glycogenolysis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1979, 15;588(1):63-9.
- Kiyosawa N., Yosuke A., Sunao M., and Takashi Y. Toxicogenomic Biomarkers for Liver Toxicity. *Journal of Toxicology Pathology*, 2009. 22(1): 35–52.
- Koh-ichi W., Matsukawa U., Fujimori A., Arai Y., Sudoh K, Sasamata M., and Miyata K. A Novel Vasopressin Dual V1A/V2 Receptor Antagonist, Conivaptan Hydrochloride, Improves Hyponatremia in Rats with Syndrome of Inappropriate Secretion of Antidiuretic Hormone (SIADH). *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2007.30(1): 91—95.
- Koob G.F., Le Moal M., Gaffori O., Manning M., Sawyer W.H., Rivier J., Bloom F.E. Arginine vasopressin and a vasopressin antagonist peptide: opposite effects on extinction of active avoidance in rats. *Regulatory Peptides*, 1981. 3(2): 153–163
- Manmeet S., Padda, M.D., Sanchez, M.D., Abbasi J. A., M.D., and James L. Boyer M.D. Drug Induced Cholestasis, *Hepatology*, 2011. 53(4): 1377–1387.
- Manning M. and Sawyer W.H. Antagonists of vasopressin and oxytocin: current status and future perspectives. In *Vasopressin*, John Libbey Eurotext. 1991 pp 297–309.
- Mendoza P. N. *Farmacología Medica*. Ed. Médica Panamericana, 2008. pp 139-143.
- Mondelo N., Peluffo V.A., Parma M.D., Cointy R. F., Capozza, J. L., Piccini E., Montuori E. *Toxicología preclínica de bisfosfonatos Medicina*, 1997. 57(supl I): 93-100.

- Murat J.C. and Serfaty A. Simple Enzymatic Determination of Polysaccharide (Glycogen) Content of Animal Tissues. *Clinical Chemistry*, 1997. 20( 12): 1576-1577.
- Nakamura K., Yamashita T., Fujiki H., Aoyagi T., Yamauchi J., Mori T., Tanoue A. Enhanced glucose tolerance in the Brattleboro rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011. 4:405(1):64-7.
- Netter H. F. *The CIBA Collection of Medical Illustrations*, 1972. Vol 1. Ninth printing, pp 40.
- Noctor Graham, Queval G., Mhamdi A., Chaouch S., and Foyer C.H. *Glutathione Arabidopsis Book*. 2011. 9: e0142.
- O'Brien P. J., Slaughter M. R., Polley S.R. and Kramer K. Advantages of glutamate dehydrogenase as a blood biomarker of acute hepatic injury in rats. *Laboratory Animals*, 2002. 36, 313–321.
- Okada H, Suzuki H, Kanno J. and Saruta T. Effect of Nonpeptide Vasopressin Receptor Antagonists on Developing, and Established Doca-Salt Hypertension in Rats. *Clinical and Experimental Hypertension*, 1994. 17( 3 ):469-483.
- Pérez B.P., Gil L., Martínez C., Bueno A.B., Casado A.I., Oro J. Tratamiento con desmopresina (DDAVP) previo a la analgesia epidural del parto a una paciente con enfermedad de von Willebrand tipo I. *Revista Española de Anestesiología y Reanimación*, 2003. 50: 526-529.
- Perucca J. Bichet D.G., Bardoux P., Bouby N., and Bankir L. Sodium Excretion in Response to Vasopressin and Selective Vasopressin Receptor Antagonists. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2008.19(9): 1721–1731.
- Prophet E.B., Mills B. , Arrington J.B. and Sobin L.H., 1994. Laboratory methods in histotechnology. *Armed Forces Institute of Pathology. American Registry of Pathology*. p 274.
- Pugsley M.K., Authier S., and Curtis M.J. Principles of Safety Pharmacology, *British Journal of Pharmacology*, 2008. 154(7): 1382–1399.
- Quintanar S.A., Kovacs K., Berczi I. Effects of neurointermediate pituitaria lobectomía on humoral and cell-mediated immune responses in the rat. *Neuroimmunomodulation*, 2004, 11: 233-240

- Quintanar S.A., Organista E.A., Chavira R.R., Kovacs K., Berczi I. Effects of Neurointermediate Pituitary Lobectomy and Desmopressin on Acute Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Lewis Rats. *Neuroimmunomodulation*, 2012. 19(3):148-157.
- Quittnat F. and Gross P. Vaptans and the Treatment of Water-Retaining Disorders. *Seminars in Nephrology*, 2006 26:234-243.
- Reyes E. M. Estudio de toxicidad aguda del POLI-1 sobre hígado, riñón y sistema inmune, 2009. “Tesis de maestría”.  
Robertson G.L. Vaptans for the treatment of hyponatremia. *Nature Reviews Endocrinology*, 2011.7:151-161.
- Rosendo V. Síntesis de derivados del ácido antranílico y sus propiedades como antagonista a receptores de vasopresina, 2009, “Tesis de maestría”.
- Schrier R. W. Vasopressin and Aquaporin 2 (AQP2) in Clinical Disorders of Water Homeostasis. *Seminars Nephrology*, 2008. 28(3): 289–296.
- Scott V., Bishop V. R., Leng G., and Brown C.H. Dehydration-induced modulation of  $\kappa$ -opioid inhibition of vasopressin neurone activity, *The Journal of Physiology*, 2009. 587(23): 5679–5689.
- Seeley R., Stephens T., Tate P. *Anatomy and Physiology*. Mc GrawHill Science/Engineering/Math, 2009 Print.
- Sequera O.P., Albalade R. M., Alcázar A. R. ¿Son los vaptanes fármacos eficaces y seguros en el tratamiento de la hiponatremia? *Nefrología Suplemento Extraordinario*, 2009. 29(6):21-26.
- Starke R.D., Ferraro F., Paschalaki K.E., Dryden N.E., McKinnon T., Sutton E.R., Payne M.E., Haskard O.D., Hughes D.A., Cutler D., Laffan A.M., and Randi A.M. Endothelial von Willebrand factor regulates angiogenesis. *Bloodjournal*, 2011. 117(3): 1071–1080.
- Sterns H.R., Nigwekar U.S., and Hix K.J. The Treatment of Hyponatremia. *Seminars in Nephrology*, 2009. 29( 3):282-299.
- Tarantino G., Nicola M., Di Minno M., and Capone D. Drug-induced liver injury: Is it somehow foreseeable?. *World Journal of Gastroenterology*, 2009.15(23): 2817–2833.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Tsuboi Y., Ishikawa S.E., Fujisawa G., Okada K. and Thoshikazu S. Therapeutic efficacy of non-peptide AVP antagonist OPC-31260 in cirrhotic rats, *Kidney International*, 1994. 46:237-244.
  - Van der Lubbe N., Thompson C.J., Zietse R., and Hoorn E.J. The clinical challenge of SIADH—three cases. *Clinical Kidney Journal*, 2009. 2 (sup 3): 20–24.
  - Veeraveedu P.T., Palaniyandi S.S., Yamaguchi K., Komai Y., Thandavarayan R.A., Sukumaran V., and Watanabe K. Arginine vasopressin receptor antagonists (vaptans): pharmacological tools and potential therapeutic agents., *Drug Discovery Today*, 2010.15, (19-20):826-841
  - Verbalis J G. Vasopressin V2 receptor antagonists. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2002. 29: 1–9.
  - Villabona, C. Antagonistas del receptor de vasopresina: los vaptanes. *Endocrinology and Nutrition*. 2010.57 ( Supl.2):41-52
  - Wall U., Jern S., Tengborn L., and Jern C. Plasminogen Activator Release in Human Forearm Evidence of a Local Mechanism for Desmopressin-Induced Tissue-Type. *Bloodjournal*, 1998. 91: 529-537.
  - Wiland P., Swierkot J., and Szechinski J. N –Acetyl-b-D-glucosaminidase urinary excretion as an early indicator of kidney dysfunction in rheumatoid arthritis patients on low-dose methotrexate treatment. *British Journal of Rheumatology*, 1997. 36: 59-63.
  - Xue-Jun D., Zhang, Ruo-Lang P., Li-Xin X., and Jian-Zhong S. Identification of cytokines involved in hepatic differentiation of mBM-MSCs under liver-injury conditions *World Journal of Gastroenterology*, 2010. 16(26): 3267–3278.
  - Yamamura Y, Nakamura S., Itoh S., Hirano T., Onogawa T., Yamashita T., Yamada Y., Tsujimae K., Aoyama M., Kotosai K., Ogawa H., Yamashita H., Kondo K., Tominaga M., Tsujimoto G., and Mori T. OPC-41061, a Highly Potent Human Vasopressin V2-Receptor Antagonist: Pharmacological Profile and Aquaretic Effect by Single and Multiple Oral dosing in rats, *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 1998. 287( 3): 860-867.
  - Yamamura Y., Ogawa H., Yamashita H., Chihara T., Miyamoto H., Nakamura S., Onogawa T., Yamashita T., Hosokawa T., Mori T., Tominaga M., and



Yabuuchi Y. Characterization of a novel aquaretic agent, OPC-31260, as an orally effective, nonpeptide vasopressin V2 receptor antagonist. *British Journal of Pharmacology*, 1992. 105 787–791.

- Yang H., Ramani K., Xia M., Suk Ko K, W.H. Li T., Pilsoo O, Jiaping L, and Shelly C. L. Dysregulation of Glutathione Synthesis During Cholestasis in Mice: Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications. *Hepatology*, 2009. 49(6): 1982–1991.
- Zelena D., Domokos A., Barna I., Csabai K., Bagdy G., Makara B.G. The role of vasopressin in chronic stress studied in a chronic mild stress model of depression. *Clinical Neuroscience*, 2007.60(3–4):196–200.
- Zhou Y., Vaidya V.S., Brown P.R., Zhang J., Rosenzweig B.A., Thompson L.K., Miller J.T., Bonventre V.J., and Goering L.P. Comparison of Kidney Injury Molecule-1 and Other Nephrotoxicity Biomarkers in Urine and Kidney Following Acute Exposure to Gentamicin, Mercury, and Chromium *Toxicological Sciences*, 2008. 101(1):159–170.
- Zink F.C., Stein L.J., Kempf L., Hakimi S., and Meyer-Lindenberg A. Vasopressin Modulates Medial Prefrontal Cortex-Amygdala Circuitry During Emotion Processing in Humans. *Journal of Neuroscience*, 2007. 30(20): 7017–7022.