

Los valores de IC_{50} se determinan por análisis de regresión de mínimos cuadrados no lineales usando MathIQ™ (ID Business Solutions Ltd., Reino Unido). La constante de inhibición K_i se calcula usando la ecuación de Cheng and Prusoff (Cheng, Y., Prusoff, W.H., *Biochem. Pharmacol.* 22:3099-3108, 1973).

- 5 Para verificar la conversión de profármacos en fármacos respectivos, los profármacos se incuban con y sin fosfatasa alcalina. Escisión del resto de fosfato por fosfatasa alcalina convierte el profármaco en el fármaco respectivo subyacente [Coleman J. E., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1992**, 21, 441-483]. Como profármaco y fármaco respectivo subyacente muestran diferentes valores IC_{50} , el valor del profármaco luego del tratamiento con fosfatasa alcalina se asemeja al IC_{50} del fármaco
10 respectivo.

B-3. Ensayo celular *in vitro* para detectar la acción de antagonistas del receptor de vasopresina V1a en la regulación de genes profibróticas

- La línea celular H9C2 (American Type Culture Collection No. ATCC CRL-1446), descrita como un tipo de cardiomiocito aislado de tejido cardíaco de rata, expresa de forma endógena el receptor de
15 vasopresina V1a AVPR1A en gran cantidad de copias, mientras la expresión de AVPR2 no se puede detectar. Asimismo, la línea celular NRK49F (ATCC No. CRL1570) aislada de tejido de riñón de rata, muestra patrón de expresión similar de expresión de AVPR1A mRNA alto y reducción de expresión de AVPR2. Para ensayos celulares que detectan la inhibición de la regulación dependiente del receptor AVPR1A de expresión génica por antagonistas del receptor, el procedimiento es el
20 siguiente:

- Las células H9C2 o células NRK49F se siembran en placas de microtitulación de 6 pocillos para cultivo celular a una densidad celular de 50 000 células/ pocillo en 2,0 ml de medio Opti-MEM (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EUA, n.º de catálogo No. 11058-021) y se mantienen en una incubadora celular (96% de humedad, 8% v/v CO_2 , 37°C). Después de 24 horas, se cargan conjuntos
25 de tres pocillos (triplicado) con solución vehicular (control negativo) y solución de vasopresina ([Arg8]-vasopresina acetato, Sigma, n.º de catálogo V9879), o compuesto de prueba (disuelto en vehículo: agua con 20% v/v etanol) y solución de vasopresina. En el cultivo celular, la concentración de vasopresina final es 1 nM. La solución del compuesto de prueba se agrega al cultivo celular en pequeños volúmenes, de modo que no se exceda una concentración final de 0,03% de etanol en el
30 ensayo celular. Después de un tiempo de incubación de 5 horas, el sobrenadante de cultivo se quita bajo succión, las células adherentes se lisan en 350 μ l de amortiguador RLT (Qiagen, n.º de catálogo 79216), y el ARN se aísla del lisado usando el kit RNeasy (Qiagen, n.º 74104). A esto le sigue digestión de ADNsa (Invitrogen, n.º de catálogo 18068-015), síntesis de cADN (Promega, ImProm-II Reverse Transcription System, n.º de catálogo A3800) y reacción en cadena de polimerasa por
35 transcripción inversa (RT-PCR) (pPCR MasterMix RT-QP2X-03-075, Eurogentec, Seraing, Bélgica). Todos los procedimientos se realizan de acuerdo con los protocolos de trabajo de los fabricantes del