

VNiVERSiDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**iNFLVENCiA DEL TRATAMiENTO CON FLVOXETiNA
SOBRE LAS ACCiONES CARDiOVASCVLARES DE
SEROTONiNA EN LA DIABETES EXPERiMENTAL**

Cristina López Muñoz

Salamanca, 2013



Memoria presentada por Cristina López Muñoz
para optar al Grado de Doctor

Salamanca, Abril de 2013

Fdo. Cristina López Muñoz



FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Fisiología y Farmacología

Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca

Las Dras. Dña. MÓNICA GARCÍA DOMINGO, Dña. MARIA LUISA MARTÍN CALVO y
Dña. ASUNCION MORÁN BENITO

CERTIFICAN:

Que la memoria titulada **“Influencia del tratamiento con fluoxetina sobre las acciones cardiovasculares de serotonina en la diabetes experimental”**, que presenta Dña. Cristina López Muñoz para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección en el Laboratorio de Farmacognosia y Farmacología (Departamento de Fisiología y Farmacología) de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca y, considerándola finalizada, autorizan su presentación para que sea juzgada por el tribunal correspondiente.

Para que así conste, expiden y firman la presente certificación en Salamanca, a nueve de abril de dos mil trece.

Fdo. Mónica García

Fdo. M^a Luisa Martín

Fdo. Asunción Morán

Dña. MARIA JESÚS MONTE RÍO, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que la memoria titulada **“Influencia del tratamiento con fluoxetina sobre las acciones cardiovasculares de serotonina en la diabetes experimental”**, presentado por Dña. Cristina López Muñoz para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección conjunta de las Doctoras Dña. Mónica García Domingo, Dña. M^a Luisa Martín Calvo y Dña. Asunción Morán Benito, en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca, a nueve de abril de dos mil trece.

Fdo. M^a Jesús Monte Río

El desarrollo del trabajo experimental incluido en esta Memoria ha sido financiado en parte con cargo a los siguientes Proyectos:

- Título del proyecto: Cambios inducidos en respuestas vasculares a 5-HT y/o en la expresión de receptores serotoninérgicos por diabetes experimental crónica de 8 semanas.
Entidad financiadora: Junta de Castilla y León.
Investigador responsable: Dra. Dña. Asunción Morán Benito.
- Título del proyecto: Efecto del tratamiento antidepresivo con Fluoxetina o con imipramida, en diabetes experimental, con aloxano y en respuestas serotoninérgicas moduladoras de actividad simpática in vivo.
Entidad financiadora: Junta de Castilla y León, Consejería de Sanidad y Bienestar Social.
Investigador responsable: Dra. Dña. M^a Luisa Martín Calvo.
- Título del proyecto: Efectos del tratamiento oral con un antidepresivo y un antagonista 5-HT_{2A} sobre las alteraciones metabólicas y determinadas respuestas cardiovasculares serotoninérgicas, en diabetes inducida con aloxano y mantenida durante 4 semanas en ratas.
Entidad financiadora: Junta de Castilla y León.
Investigador responsable: Dra. Dña. Asunción Morán Benito.
- Título del proyecto: Efectos del tratamiento oral con Sarpogrelato (antagonista 5-HT_{2A}) en las alteraciones metabólicas y en respuestas vasculares renales de 5-hidroxitriptamina en la diabetes experimental a largo plazo.
Entidad financiadora: Junta de Castilla y León, Investigación Biomédica.
Investigador responsable: Dra. Dña. Mónica García Domingo.

A Concha, Marcial y Andrés, por hacer de mí
la persona que soy.

A mi familia, porque una crin de caballo se
rompe, cinco no.

A Carlos, por formar parte de mi vida.

El guerrero de la luz, sin querer, da un paso en falso y se hunde en el abismo.

Los fantasmas lo asustan, la soledad lo atormenta. Como había buscado el Buen Combate, no pensaba que esto pudiera sucederle nunca a él; pero sucedió. Rodeado de oscuridad, se comunica con su maestro.

-Maestro, caí en el abismo.- dice- Las aguas son hondas y oscuras.

-Recuerda esto:- responde el Maestro- lo que ahoga a alguien no es la inmersión, sino el hecho de permanecer bajo el agua.

Y el guerrero usa sus fuerzas para salir de la situación en la que se encuentra.

(Manual del Guerrero de la Luz. Paulo Coelho).

Se hace difícil comenzar a escribir, resumir estos años en tan sólo unas palabras, han sido tantas las personas que han contribuido a la realización de esta memoria y tantos momentos vividos que espero que todos los que habéis estado a mi lado quedéis reflejados.

Al Dr. D. Luis San Román por permitirme, hace un tiempo ya, iniciar la vida de investigadora, y por estar en todo momento, muchas gracias.

A las Dras. Asunción Morán Benito, María Luisa Martín Calvo y Mónica García Domingo que han sido durante este tiempo profesoras, amigas y un poquito "madres y hermana mayor". Gracias por toda su ayuda en este trabajo, por la paciencia, el tiempo y la confianza depositada en mí; por haberme enseñado el "mundo" de la investigación, y permitido vivir en él; por los buenos y malos ratos dentro y fuera del laboratorio, con vosotras he crecido en todos los aspectos, gracias.

A las Dras: Rosalía Carrión, M^a José Montero, M^a Ángeles Sevilla y Ana Vega Ortíz de Urbina porque todos los días, con una sonrisa, preguntan cómo van las cosas.

A mis otros compañeros de laboratorio durante estos años (Modar, Beatriz, José Ángel y Cristina), por todo lo vivido dentro y fuera del laboratorio, por ser compañeros y amigos, por los "como va eso" y las "fricadas", por el tiempo compartido con nuestros animalitos día tras día, gracias.

A Emilia, Javier y Bienve por el día a día, por su interés y ayuda gracias por todo.

A todos mis amigos por aguantarme, llamarme y escucharme, por todos esos buenos y malos ratos, por el "patalea, patalea", los cafés y las risas, porque puedo contar con vosotros, gracias.

A mi padre, a mi madre y a mi hermano por estar siempre a mi lado, apoyarme en todas las decisiones, aconsejarme y escucharme, por quererme y demostrármelo cada día, vosotros habéis hecho de mí la persona que soy, gracias.

A Carlos, por todos y cada uno de los días compartidos, por ser amigo y compañero, porque hacemos equipo, gracias por la paciencia y caminar a mi lado.

A todos los que formáis mi familia, por el gen López y por el gen Muñoz, gracias por vuestro apoyo e interés constante e incondicional, vuestra presencia, los buenos ratos; por el gen Sandín gracias por acogerme como una más ("y digo yo...").

A todos los que se cruzaron mi vida (amigos, compañeros...) por la huella que dejaron en mí. A los que ya no están, me acompañáis y os mantengo cerca en mis recuerdos, gracias por todos y cada uno de ellos.

Muchas gracias a todos por aceptarme tal y como soy, con lo bueno y lo malo.

[Ca²⁺]_i = Concentración de calcio intracelular.	NADPH = Nicotinadenosindifosfato oxidasa.
5-HIAA = 5-Hidroxiindolacético.	NET = Transportador de norepinefrina.
5-HT = 5-Hidroxitriptamina.	NO = Óxido nítrico.
5-HTP = 5-Hidroxitriptófano.	NOS = Óxido nítrico sintasa.
AC = Adenilatocilasa.	PAM = Presión arterial media
Ach = Acetilcolina.	PAS = Presión arterial sistólica.
ADA = Asociación americana de diabetes.	PFK = Fosfofructocinasa.
ADT = Antidepresivos tricíclicos.	PGF2α = Prostaglandina F2 α .
AMP_c = 3',5'-Adenosin monofosfato cíclico.	PI = Fosfatidilinositol.
Amph = Anfetamina.	PIP3 = 3,4,5-Fosfatidilinositoltrifosfato.
AngII = Angiotensina II.	PKB = Proteína cinasa B.
COX = Ciclooxygenasa.	PKC = Proteína cinasa C.
DAT = Transportador de dopamina.	PLC = Fosfolipasa C.
DM = Diabetes Mellitus.	ppm = Pulsos por minuto.
DOPA = 3,4-Dihidroxifenilalanina.	SEM = Error estándar de la media.
ECA = Enzima convertidora de angiotensina.	SERT = Transportador de serotonina.
EDCF = Factor vasoconstrictor dependiente de endotelio.	SNC = Sistema nervioso central.
EEG = Electroencefalograma.	SNP = Sistema nervioso periférico.
eNOS = Óxido nítrico sintasa endotelial.	STZ = Estreptozotocina.
FC = Frecuencia cardiaca.	TGF-β1 = Factor de crecimiento tumoral β 1.
GC = Guanilato ciclase.	TPH = Triptófano hidroxilasa.
GPCR = Receptor acoplado a proteínas G.	TPH1 = Triptófano hidroxilasa 1.
IP₃ = Inositol trifosfato.	TXA2 = Tromboxano A2.
ISRS = Inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina.	TXB2 = Tromboxano B2.
IUPHAR = Internacional Union of Pharmacology.	VSM = Músculo liso vascular.
LAAD = Descarboxilasa de los aminoácidos L-aromáticos.	VSMC = Células de músculo liso vascular.
LCF = Líquido cefalorraquídeo.	
LSD = Dietilamida del ácido lisérgico.	
MAO = Monoaminoxidasas.	
MAT = Transportador de monoaminas.	
MDMA = 3,4-Metilenedioxi-metanfetamina.	
NA = Noradrenalina.	
Na⁺/K⁺ ATPasa = Sodio potasio ATPasa.	

fNDiCE

INTRODUCCIÓN	1
I. 5-HIDROXITRIPTAMINA.	3
1. ANTECEDENTES.	3
2. LOCALIZACIÓN, SÍNTESIS, DEGRADACIÓN Y RECAPTACIÓN DE 5-HT.	4
3. RECEPTORES SEROTONÉRGICOS Y MECANISMOS DE ACCIÓN.	7
4. TRANSPORTADOR DE SEROTONINA E INHIBIDORES DE LA RECAPTACIÓN.	15
5. ACCIONES FARMACOLÓGICAS ASOCIADAS A 5-HT.	19
6. INTERACCIÓN SISTEMA SEROTONÉRGICO-ADRENÉRGICO-COLINÉRGICO.	28
II. DIABETES.	32
1. PÁNCREAS E INSULINA.	35
2. COMPLICACIONES DE LA DIABETES MELLITUS.	37
III. DEPRESIÓN, DIABETES, SISTEMA CARDIOVASCULAR Y 5-HIDROXITRIPTAMINA.	43
OBJETIVOS	49
MATERIAL Y MÉTODOS	53
I. PREPARACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL.	56
1. RATAS NORMOGLUCÉMICAS TRATADAS CON FLUOXETINA.	56
1.1 <i>Tratamiento con fluoxetina.</i>	56
1.2 <i>Determinación de las constantes metabólicas, presión arterial y frecuencia cardiaca.</i>	57
2. RATAS HIPERGLUCÉMICAS TRATADAS CON FLUOXETINA.	59
2.1 <i>Inducción de la diabetes.</i>	59
2.2 <i>Tratamiento con fluoxetina.</i>	60
2.3 <i>Determinación de las constantes metabólicas, presión arterial y frecuencia cardiaca.</i>	61
II. ESTUDIOS “IN VIVO”: RATAS DESMEDULADAS.	62
1. ESTIMULACIÓN SIMPÁTICA.	62
2. ESTIMULACIÓN PARASIMPÁTICA.	75
III. FÁRMACOS UTILIZADOS.	81

IV. EXPRESIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.	83
RESULTADOS	85
I. VARIABLES HEMODINÁMICAS Y CONSTANTES METABÓLICAS.	87
II. ESTIMULACIÓN SIMPÁTICA.	91
1. RATAS NORMOGLUCÉMICAS TRATADAS CON FLUOXETINA.	91
2. RATAS HIPERGLUCÉMICAS TRATADAS CON FLUOXETINA.	102
3. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS INDIRECTOS IMPLICADOS EN LAS ACCIONES SEROTONÉRGICAS EN RATAS HIPERGLUCEMICAS TRATADAS CON FLUOXETINA DURANTE 14 DÍAS.	114
III. ESTIMULACIÓN COLINÉRGICA.	120
1. RATAS NORMOGLUCÉMICAS TRATADAS CON FLUOXETINA DURANTE 14 DÍAS.	120
2. RATAS HIPERGLUCÉMICAS TRATADAS CON FLUOXETINA DURANTE 14 DÍAS.	128
DISCUSIÓN	135
CONCLUSIONES	155
BIBLIOGRAFÍA	159

iNTRODVCCIÓN

I. 5-HIDROXITRIPTAMINA.

1. ANTECEDENTES.

5-Hidroxitriptamina (5-HT o serotonina) es una amina biógena, que actúa como neurotransmisor y hormona. Está presente en numerosas especies, incluyendo al hombre y juega un papel importante en una gran variedad de funciones fisiológicas tales como el dolor, el apetito, las emociones, el sexo, el sueño o la memoria, así como en todos los procesos patológicos asociados a dichas funciones. Serotonina, cuyo nombre químico es 3-(2-aminoetil)-1-H-indol-5-ol, y su fórmula química $C_{10}H_{12}NO$ (Figura 1), tiene un peso molecular de 176 Dalton.

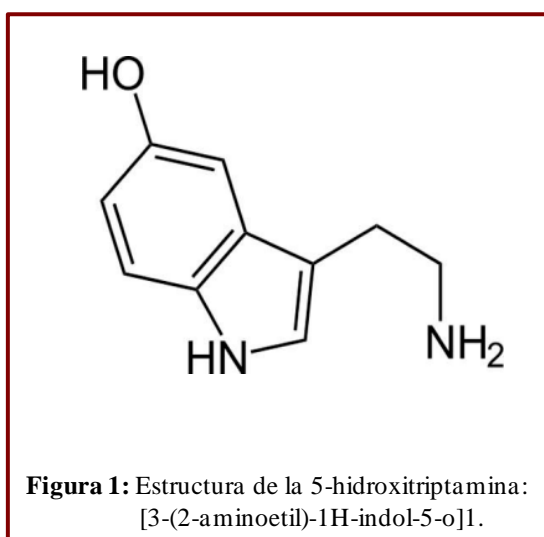


Figura 1: Estructura de la 5-hidroxitriptamina: [3-(2-aminoetil)-1H-indol-5-o]1.

Previamente a ser identificada, en un estudio realizado en gato por Brodie (1900)⁽¹⁾ se describió cómo la inyección de suero sanguíneo causaba vasoconstricción y un reflejo vagal representado por bradicardia e hipotensión reversibles, así como una parada de la respiración que no se reproducía si se inyectaba plasma. 5-Hidroxitriptamina, sin embargo, no fue aislada en sangre hasta 1948 siendo caracterizada poco después por Rapport y colaboradores⁽²⁾ quienes la denominaron haciendo alusión a su acción vascular original (*sero* = suero y *tonin* = vasoconstricción: “serotonina”).

Fue obtenida sintéticamente por primera vez por Hamlin y Fischer en 1951⁽³⁾, siendo a mediados de esta década cuando se sugirió que podría actuar como neurotransmisor a nivel del sistema nervioso central. Aunque menos del 5% de la cantidad total de serotonina del organismo reside en el sistema nervioso central (SNC), 5-HT es un factor muy importante para el buen funcionamiento del cerebro, razón por la cual fue reconocida como sustancia

neurotransmisora⁽⁴⁾. La observación casi simultánea de que la droga psicodisléptica dietilamida del ácido lisérgico (LSD) antagonizaba una respuesta producida por 5-HT (aún cuando la respuesta fuera contracción del músculo liso gastrointestinal) confirmó la idea de que 5-HT era un producto de nuestro cerebro y con importantes efectos conductuales.

Paralelamente, se aisló otra sustancia endógena procedente de las células enterocromafines (presente en la mucosa intestinal) a la que se denominó *enteramina*⁽⁵⁾. La función observada para la enteramina constituía fundamentalmente la contracción de músculo liso. Posteriores investigaciones demostraron que enteramina y serotonina eran química y farmacológicamente similares⁽⁶⁾.

El descubrimiento de las vías biosintética y de degradación⁽⁷⁾ y el interés clínico por los efectos presores de 5-HT⁽⁸⁾ dieron origen a la hipótesis de que determinadas patologías son resultado de una producción anómala de 5-HT⁽⁹⁾.

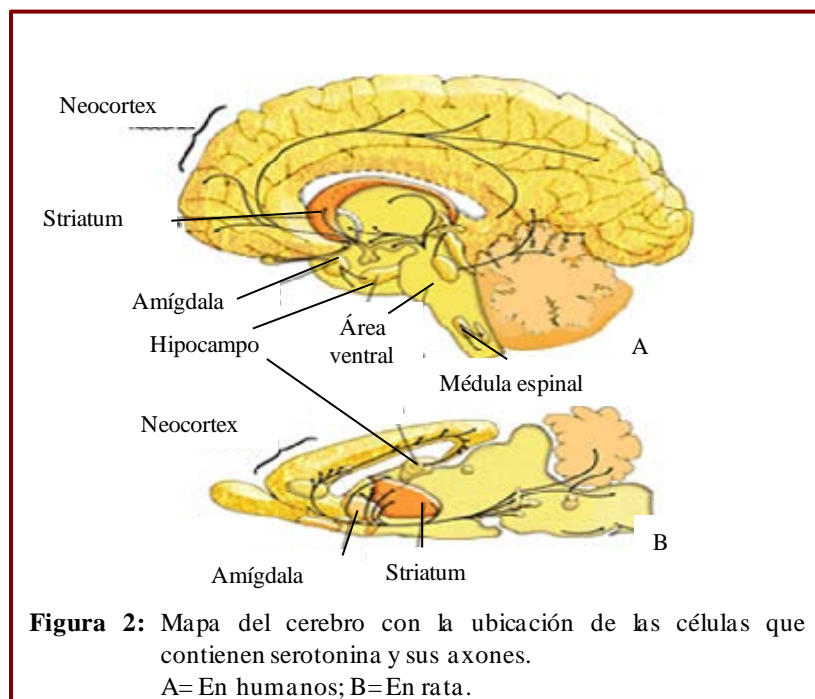
2. LOCALIZACIÓN, SÍNTESIS, DEGRADACIÓN Y RECAPTACIÓN DE 5-HT.

La serotonina se encuentra ampliamente distribuida en los reinos animal y vegetal. Se localiza en vertebrados, tunicados, moluscos, artrópodos, en frutas y en semillas. Se puede encontrar en los sistemas neuronales de todos los organismos que van desde la *Drosophila*⁽¹⁰⁾ a los seres humanos⁽¹¹⁾; se halla también en venenos, entre ellos los de la ortiga ordinaria, avispas y escorpiones. En los mamíferos la podemos encontrar en las células enterocromafines del tracto gastrointestinal, plaquetas, pared de los vasos sanguíneos, pulmones, corazón, y en el SNC, donde actúa como neurotransmisor. En el cerebro la serotonina se localiza principalmente en los núcleos del rafe, glándula pineal y otras neuronas (Figura 2).

La mayor parte de su síntesis ocurre a nivel periférico, concretamente a nivel intestinal (95%), y se produce a partir del aminoácido esencial L-triptófano procedente de la dieta que, una vez ingerido, es captado por las células enterocromafines para sufrir una serie de transformaciones; dependiendo la síntesis, de la cantidad de triptófano disponible y de

diferentes factores que controlan la actividad de la triptófano-hidroxilasa^(12, 13).

El sistema nervioso central contiene menos del 2% de la serotonina total del organismo⁽¹⁴⁾. 5-HT no atraviesa la barrera hematoencefálica, por lo que sus niveles centrales dependen de su síntesis local, siendo el paso inicial de la síntesis, el transporte



facilitado del aminoácido L-triptófano de la sangre hasta el cerebro.

Las neuronas serotoninérgicas contienen la enzima triptófano-hidroxilasa (TPH), que convierte el triptófano en 5-hidroxitriptófano (5-HTP) y su distribución en el cerebro es similar a la de la propia 5-HT. Esta hidroxilación del triptófano parece ser la reacción limitante en la síntesis de serotonina, porque el 5-HTP se encuentra en pequeñas cantidades en el cerebro, posiblemente debido a que el siguiente paso lo transforma tan rápidamente como se forma (Figura 3).

La otra enzima implicada en la síntesis de serotonina es la descarboxilasa de los aminoácidos L-aromáticos (LAAD), que convierte 5-HTP en 5-HT. Esta enzima está presente no sólo en las neuronas serotoninérgicas sino también en las neuronas catecolaminérgicas, donde convierte 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) en dopamina.

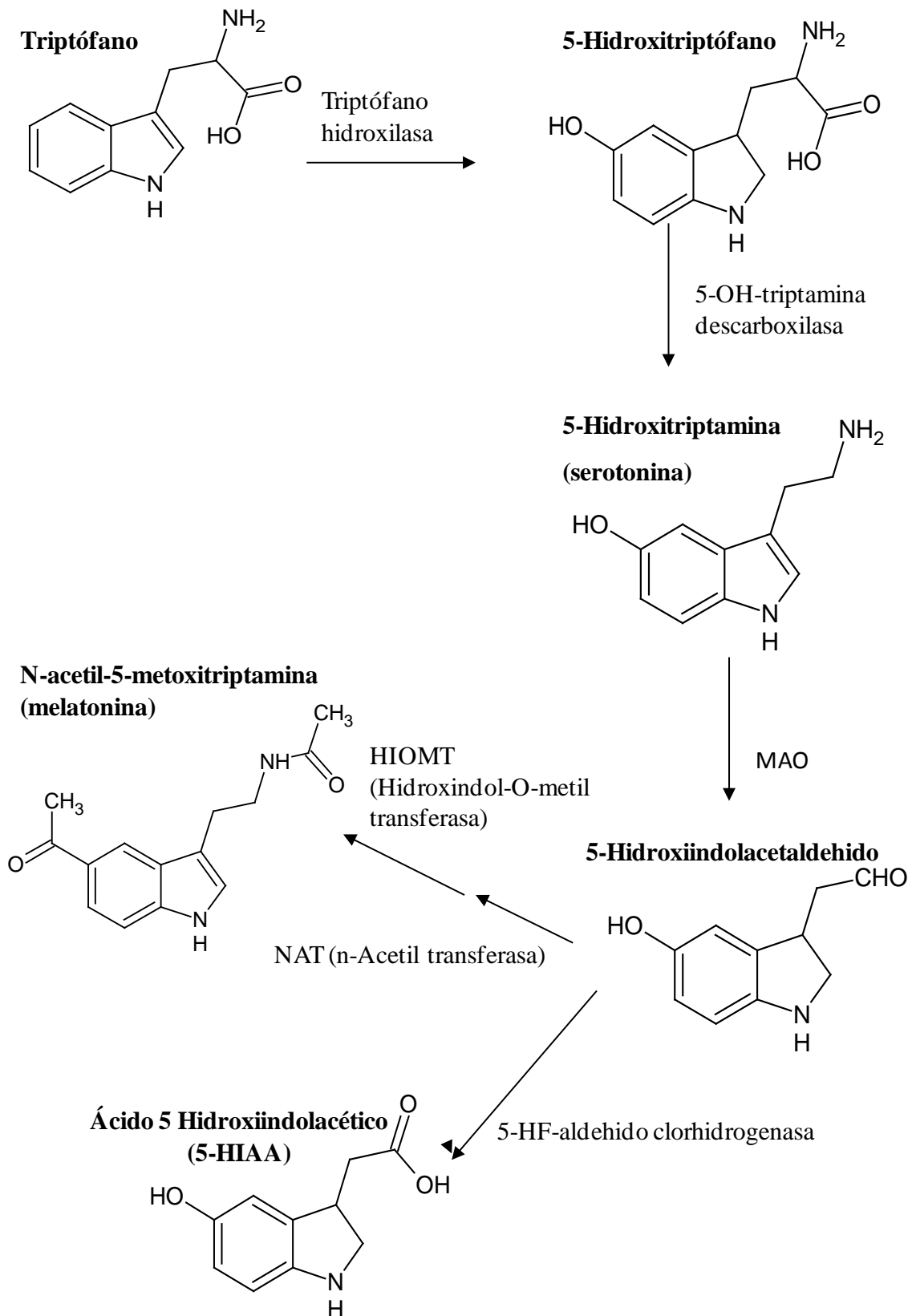


Figura 3: Biosíntesis y metabolismo de 5-HT.

Una vez sintetizada, la serotonina se almacena o es inactivada con rapidez por las monoaminoxidasas (MAO) dando lugar a un producto intermedio, 5-hidroxiindolacetaldehído, que a su vez se oxida por la aldehído deshidrogenasa originando como producto final el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA).

Cuando este sistema se satura (por ejemplo por consumo de etanol), el producto intermedio se reduce en el hígado produciendo 5-hidroxitriptofol. Además del metabolismo por acción de la MAO, existe un proceso de captación mediado por un portador dependiente de Na^+ que participa en la terminación de la acción de serotonina.

La regulación de la concentración extracelular de serotonina se realiza mediante un transportador de alta afinidad, dependiente de Na^+ y energía. Dicho transportador permite recaptar parte de la 5-HT liberada tras el paso de los impulsos eléctricos a través de los axones serotoninérgicos; es por tanto, el mecanismo más efectivo para regular el acceso de serotonina a los receptores pre y postsinápticos, y en definitiva para controlar la actividad del sistema de neurotransmisión serotoninérgica⁽¹⁵⁾.

El transportador de serotonina posee una distribución muy amplia en el organismo, acorde con la de 5-HT. Así, además de en el SNC se encuentra también en células endoteliales, glándulas adrenales y en plaquetas, donde juega un papel fundamental para regular la concentración libre de serotonina en sangre y durante el proceso de coagulación⁽¹⁵⁾.

El bloqueo de este transportador mediante inhibidores selectivos de la recaptación (ISRS) origina un importante incremento de la concentración extracelular de serotonina.

3. RECEPTORES SEROTONÉRGICOS Y MECANISMOS DE ACCIÓN.

La expresión ubicua de los receptores de serotonina en el cuerpo humano permite su papel multifuncional en varios sistemas fisiológicos⁽¹⁶⁾.

Se han identificado hasta siete familias principales de receptores (designados como 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ y 5-HT₇, Figura 4), denominados así por “The

Serotonin Receptor Nomenclature Committee of the International Union of Pharmacology” (NC-IUPHAR)⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. Muchos de estos receptores tienen múltiples subtipos^(20, 21), algunos de estos subtipos no tienen reconocida, hasta el momento, una acción fisiológica.

La clasificación y nomenclatura de estos receptores ha evolucionado durante los últimos años, sobre todo en la última década del siglo XX, en respuesta a una rápida extensión de información sobre la estructura y función a nivel molecular.

El primer intento relevante para caracterizar los receptores de 5-HT fue realizado por Gaddum y Picarelli en 1957⁽²²⁾. Sus estudios se basaron en el análisis de las contracciones inducidas por 5-HT en íleon aislado de cobaya. La morfina (M) o la dibencilina (D) bloquearon estas contracciones de forma parcial que, sin embargo, fueron suprimidas por la combinación de ambos compuestos.

Dichos autores concluyeron que 5-HT actuaba a través de dos mecanismos y receptores diferentes: receptores 5HT-M localizados en las terminales nerviosas parasimpáticas (receptor neurotrópico), que median la liberación de acetilcolina, y receptores 5-HT-D, localizados en el músculo liso (musculotrópicos).

La introducción de técnicas de fijación molecular (binding) con radioligandos *in vitro* en 1979 por Peroutka y Snyder⁽²³⁾, permitió la discriminación entre varios tipos de receptores serotoninérgicos, de modo que se especificó la presencia de dos tipos diferentes de receptores (5-HT₁ y 5-HT₂), según la preferencia de unión, en homogenado de cerebro, por [3H]5-HT o por [3H]espiperona, respectivamente.

En 1986, se propuso una clasificación y nomenclatura diferente, en la que se distinguían tres subtipos de receptores⁽²⁴⁾:

- a) “5-HT_{1-like}” con gran afinidad por 5-carboxamidotriptamina y podían unirse a [3H]5-HT.
- b) 5-HT₂, inicialmente denominados y caracterizados como 5-HT-D o musculotrópicos por localizarse en el músculo esquelético, con gran afinidad por ketanserina.

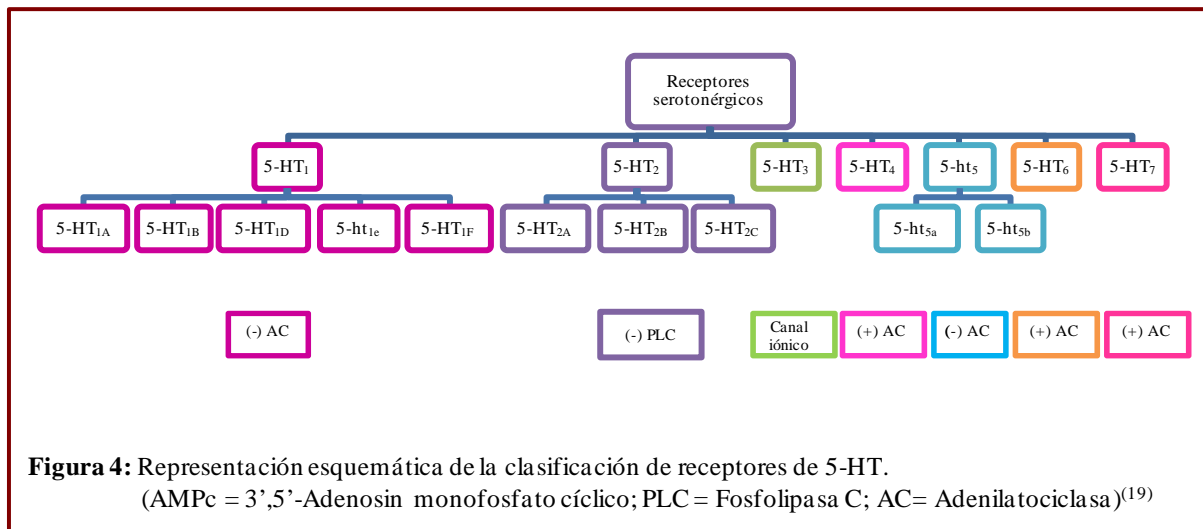
c) 5-HT₃, cuyo mecanismo de acción está asociado a canales iónicos y corresponden a los anteriormente caracterizados como 5-HT-M o neurotrópicos por localizarse en los ganglios parasimpáticos.

Con el tiempo se han identificado y caracterizado nuevos receptores de 5-HT, que a veces han sido nombrados de diferente forma por distintos grupos de investigación^(25, 26). Las nuevas herramientas propias de la biología molecular y su aplicación, junto con las técnicas bioquímicas y funcionales de los últimos años, llevaron a la aparición de una clasificación de receptores basada en la caracterización según su composición aminoacídica y la unión a segundos mensajeros, así como las características funcionales de los mismos.

Para evitar toda esta ambigüedad, “The Serotonin Receptor Nomenclature Committee of the International Union of Pharmacology” (NC-IUPHAR) reclasificó los receptores para 5-HT⁽¹⁷⁻¹⁹⁾ en función de:

- La estructura molecular (secuencias en la estructura de los genes y receptores para sus componentes de nucleótidos y aminoácidos respectivamente).
- El mecanismo de acción y características transduccionales (segundos mensajeros sintetizados de manera subsecuente a la interacción ligando-receptor).
- Su mayor o menor afinidad por la serotonina y criterios operacionales (perfil farmacológico mediante el empleo de agonistas y antagonistas selectivos)^(18, 19, 21).

De esta forma se han establecido siete clases de receptores diferentes, de los cuales, cuatro están bien caracterizados, uno no clonado y otros dos clonados pero de los que sus características operacionales y su mecanismo de transducción no se conocen (Figura 4). De acuerdo con las normas de la IUPHAR un receptor se nombrará con letras mayúsculas cuando sus características estructurales y operacionales se hayan definido bien y se haya establecido como receptor endógeno⁽¹⁷⁾. Aquellos que no cumplan con estos criterios se nombrarán con letras minúsculas.

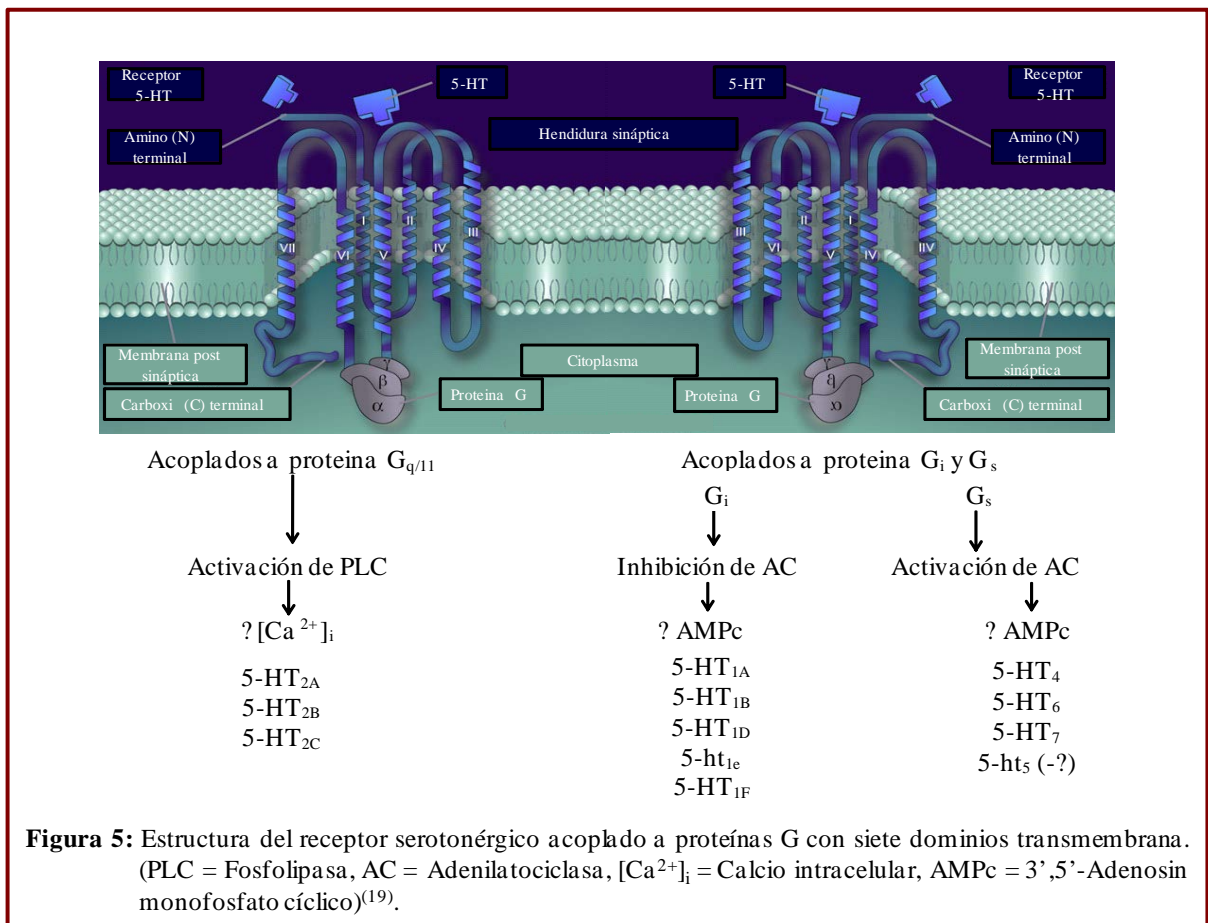


Básicamente todos los receptores de serotonina, a excepción de los receptores 5HT₃ (acoplados a canales iónicos) son miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), que consiste en proteínas integrales de membrana que interactúan con una gran variedad de hormonas y neurotransmisores⁽²⁷⁾.

Todos los GPCRs poseen siete dominios transmembrana que tienen el extremo N-terminal en la parte extracelular y el extremo C-terminal en la zona intracelular, lugar de fosforilación (Figura 5). También está claro que los sitios de unión para los diferentes agonistas y antagonistas están localizados en las regiones transmembrana (α hélices) de la proteína, hecho que ya se ha observado por técnicas de mutagénesis y receptores quiméricos^(28, 29).

Los receptores de 5-HT activan, bien a la enzima adenilatociclasa (AC) [que promueve la producción de 3',5'-adenosin monofosfato cíclico (AMP_c)], la fosfolipasa C (PLC) (que promueve la producción de inositol trifosfato (IP₃) y aumenta el calcio intracelular [Ca²⁺]_i) o bien a canales iónicos (Figura 5 y 6).

Todos estos sistemas efectores están presentes en todas las células, y por tanto los GPCRs juegan un papel fundamental en la regulación de las respuestas fisiológicas y en la acción de alrededor del 80% de todos los neurotransmisores y hormonas⁽³⁰⁾.



1.1 Receptores 5-HT₁.

Los receptores 5-HT₁ comprenden cinco subtipos diferentes de receptores, que comparten entre 41-63% de la secuencia genética, y están acoplados a proteínas G_i/G_o que inhiben la formación de AMPc. Uno de ellos es el receptor 5-ht_{1e}, cuya denominación en minúscula indica que aunque el gen que codifica para este receptor ha sido identificado, su papel fisiológico no ha sido aún bien definido.

En contraste, los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} y 5-HT_{1D} han sido encontrados en una gran variedad de tejidos. Existen agonistas y antagonistas específicos para 5-HT_{1A} y en la actualidad se están desarrollando nuevos compuestos capaces de discriminar entre los subtipos 5HT_{1B} y 5-HT_{1D}, siendo esta tarea difícil debido a la identidad farmacológica tan próxima que poseen. Únicamente en roedores ha sido posible diferenciar la farmacología de 5-HT_{1B} y 5-HT_{1D} debido a que 5-HT_{1B}, en estas especies, exhibe una farmacología única

como resultado de una mutación en ASP123/ARG123. Los receptores 5-HT_{1A} inhiben la descarga de las neuronas serotoninérgicas así como la liberación de serotonina^(19,31)(Tabla 1).

1.2 Receptores 5-HT₂.

Esta familia comprende tres subtipos de receptores diferentes, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C} que comparten entre 46-50% de su secuencia genética, y se acoplan preferentemente a G_{q/11} para aumentar la hidrólisis de IP₃ y aumentar el Ca²⁺ citosólico.

De estos tres subtipos, los receptores 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C} tienen una mayor afinidad por 5HT que cualquiera de los otros receptores identificados hasta hoy (Tabla 1).

1.3 Receptores 5-HT₃.

El receptor 5-HT₃ es el único miembro de esta familia de receptores que pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a canales iónicos (Figura 6). Está localizado exclusivamente en tejido neuronal donde media la despolarización neuronal rápida. Sus respuestas se bloquean por un gran número de potentes antagonistas que son altamente selectivos.

Se cree que existe como estructura homopentamérica de subunidades α y β en las que sólo un 41% de la secuencia se ha clonado, considerándose también la posibilidad de que sean estructuras heteropentámicas. La subunidad α ha sido clonada de humanos, ratas y ratones y muestra similitud con el receptor nicotínico de acetilcolina (Tabla 1).

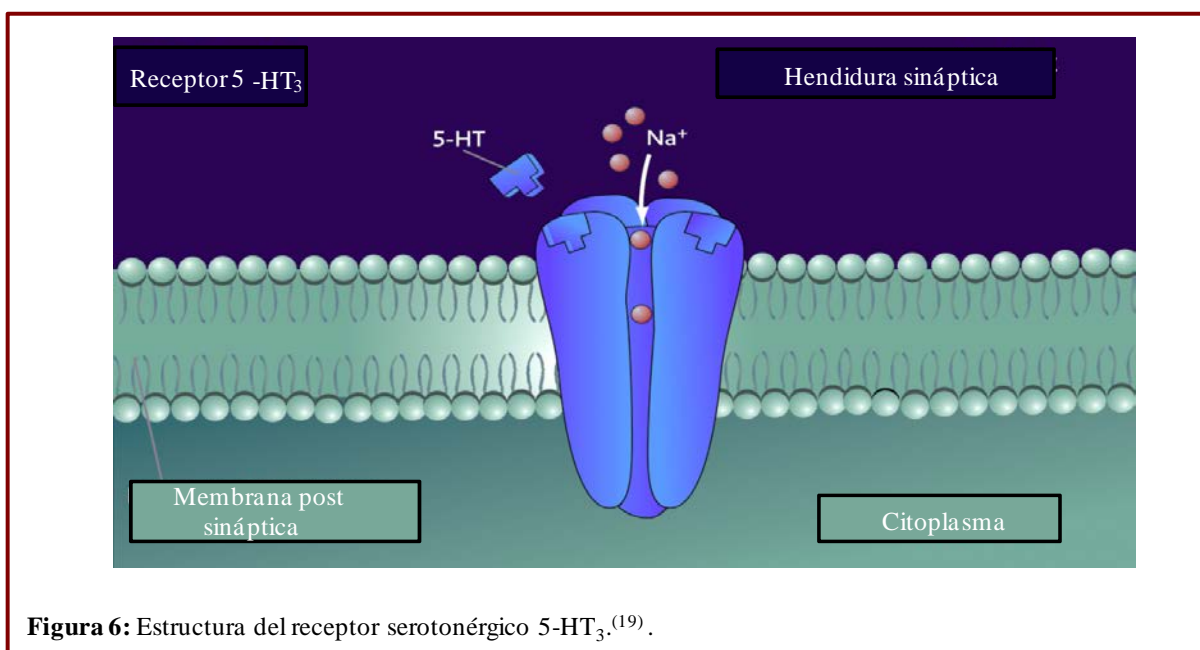


Figura 6: Estructura del receptor serotonérgico 5-HT₃.⁽¹⁹⁾.

1.4 Receptores 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ y 5-HT₇.

Todos ellos se unen preferentemente a proteínas Gs y promueven la formación de AMPc; están organizados como diferentes clases de receptores porque poseen una secuencia idéntica inferior al 40%. No obstante, esta división es asumida como arbitraria y está sujeta a posibles cambios en el futuro. En la actualidad existen agonistas selectivos de receptores 5-HT₄ (Tabla 1), así como agonistas y antagonistas selectivos de receptores 5-HT₆ y 5-HT₇ (Tabla 1).

Para el subtipo de receptores 5-HT₅: 5-HT_{5a} y 5-HT_{5b} comparten más del 70% de la secuencia aminoacídica en roedores. En los seres humanos, el receptor 5-HT_{5b} se expresa exclusivamente en el sistema nervioso central, principalmente en la corteza, el hipocampo y el cerebelo⁽³²⁾. El receptor 5-HT_{5b} no codifica ninguna proteína funcional en los seres humanos. La función precisa de los receptores 5-HT₅ no se conoce, sin embargo, puede presuponerse que los receptores 5-HT_{5a} desempeñan un papel en el control motor y en la ansiedad, basado en el hecho de que ratones knock-out para el receptor 5-HT_{5a} muestran una mayor actividad locomotora y comportamiento exploratorio⁽³²⁾.

Tipo de receptor	Subtipo de receptor	Nombre previo	Localización	Funciones	Agonistas selectivos	Antagonistas selectivos	Mecanismo de transducción
5-HT ₁	5-HT _{1A}	-----	Neuronal hipocampo, núcleo del rafe	Cambios conductuales, hipotensión central	8-OH-DPAT	WAY-100,635	
	5-HT _{1B}	5-HT _{1Dβ}	SNC, terminaciones nerviosas, VSMC	Vasocostricción, inhibición trigeminal	CGS-12066B	SB224289	G _i /G _o (-) AC Dismutación AMPc,
	5-HT _{1D}	5-HT _{1Dα}	SNC	Heterorreceptor en aurícula humana	L-694,247	BRL 15572	cambio en el potencial de membrana
5-HT _{1F}	5-HT _{1Eα}	5-HT _{1Eα}	SNC	No establecidas	-----	Metitepina	
	5-HT _{1F}	5-HT _{1Eβ}	SNC	Inhibición trigeminal	Sumatriptan	Metisergrida	
5-HT _{2A}	5-HT _{2A}	D	VSMC, plaquetas, SNC, tracto gastro intestinal	Vasocostricción, agregación plaquetaria, broncoconstricción	-----	R96544 Espiaperona	
	5-HT _{2B}	5-HT _{2F}	Musculatura lisa de ileon, fundus de rata, útero y endotelio	Contracción fundus en rata y vasodilatación endotelio dependiente vía NO	BW723C86	Ritanserina SB 204741	G _q /G ₁₁ (+) PLC Incrementa hidrólisis de IP y eleva [Ca ²⁺] _i
5-HT _{2C}	5-HT _{1C}	5-HT _{1C}	SNC	Possible participación en la producción de transferrina, erección y regulación del LCR	MK-212	RS 102221	
5-HT ₃	-----	M	Periferia, SNC	Neuroexcitación simpática y parasimpática, provoca émesis	1-fenilguanida	MDL 72222, Granisetron	Asociado a canales iónicos Na ⁺ /K ⁺ ATP asa
5-HT ₄	-----	-----	Tractogastrointestinal, SNC, corazón y vejiga urinaria	Relajación musculatura lisa (esofágica y gastrointestinal), incrementa la amplitud de EEG	BIMU8, ML1030, RS67506	GR 113808, SB 204070	G _s (+) AC Incrementa la formación de AMPc
	5-HT _{5A}	5-HT _{5A}	SNC	Simpatico inhibición cardíaca	Ergotamina	LSD, SB-6995551-A	(-) AC Dismutación AMPc
5-HT ₅	5-HT ₅	5-HT _{5B}	SNC	No establecidas			
	5-HT ₆	-----	SNC, ganglios cervicales superiores	Posible modulación, liberación de Ach en SNC, consolidación de la memoria	5-MeOT≥5-HT	R004679, SB-399885	G _s (+) AC Aumento del AMPc
5-HT ₇	-----	5-HT _{1like}	SNC, musculatura lisa, y ganglios simpáticos	Relajación VSM y gastrointestinal	5-CT>5-HT>5-MeOT	Pimozide, mesulergina, clozapina, SB-269970	G _s (+) AC Aumento del AMPc

Tabla 1: Clasificación de receptores serotoninérgicos (modificado de Andrade y colaboradores⁽²¹⁾).

(VSMC = Células de músculo liso vascular; SNC = Sistema nervioso central; AC = Adenilato ciclasa; PI = Fosfaridil inositol; NO = Oxido nítrico; [Ca²⁺]_i = Calcio intracelular; LCF=Líquido cefalorraquídeo; PLC=Fosfolipasa C; VSM= músculo liso vascular; EEG = Electroencefalograma; AMPc = 3',5'-adenosin monofosfato cíclico; Na⁺/K⁺ ATPasa = Sodio potasio ATPasa; Ach = Acetilcolina).

Se ha descrito que los receptores 5-HT₆ desempeñan un papel en la cognición, el aprendizaje, el control del apetito y los trastornos convulsivos⁽²⁰⁾. Se expresan en varias áreas del cerebro humano, predominando en el núcleo caudado⁽³³⁾.

Existen algunos receptores de serotonina, para los que no se ha identificado el gen que los codifica, que tienen un papel funcional en los tejidos en su conjunto (por ejemplo, despolarización de las motoneuronas de rata, inhibición de la liberación de noradrenalina (NA) en arterias coronaria de cerdo y despolarización lenta de las neuronas mientérica), pero no se correlacionan con ninguno de los anteriormente descritos^(17-19, 34, 35). Como su estructura es desconocida, estos receptores se denominan huérfanos en la nomenclatura actual.

Desde que en 1994, Hoyer y colaboradores,⁽¹⁷⁾ propusieron la clasificación de receptores para serotonina en la que se basa la actual realizada por la IUPHAR⁽¹⁹⁾, el conocimiento de estos receptores ha evolucionado, como es el caso de la determinación de la existencia de diferentes isoformas producidas por modificaciones transduccionales, así han aparecido hasta 7 isoformas funcionales del receptor de 5-HT, cuatro variantes funcionales del receptor 5HT_{2C}, cuatro variantes funcionales para el receptor 5-HT₇ (5-HT_{7(a)}-5-HT_{7(d)}) y cuatro variantes funcionales del receptor 5-HT₄ (5-HT_{4(a)} -5-HT_{4(d)}). Aunque todas estas isoformas no presentan grandes diferencias en cuanto a características operacionales, están distribuidas en diferentes zonas, tanto a nivel central como a nivel periférico⁽¹⁹⁾.

Se sigue investigando sobre cuál es el objeto de todas estas isoformas, aunque se cree que pueden estar relacionadas con la desensibilización de receptores a nivel celular, o en las diferentes respuestas a agonistas mediadas a través de distintas vías efectoras.

4. TRANSPORTADOR DE SEROTONINA E INHIBIDORES DE LA RECAPTACIÓN.

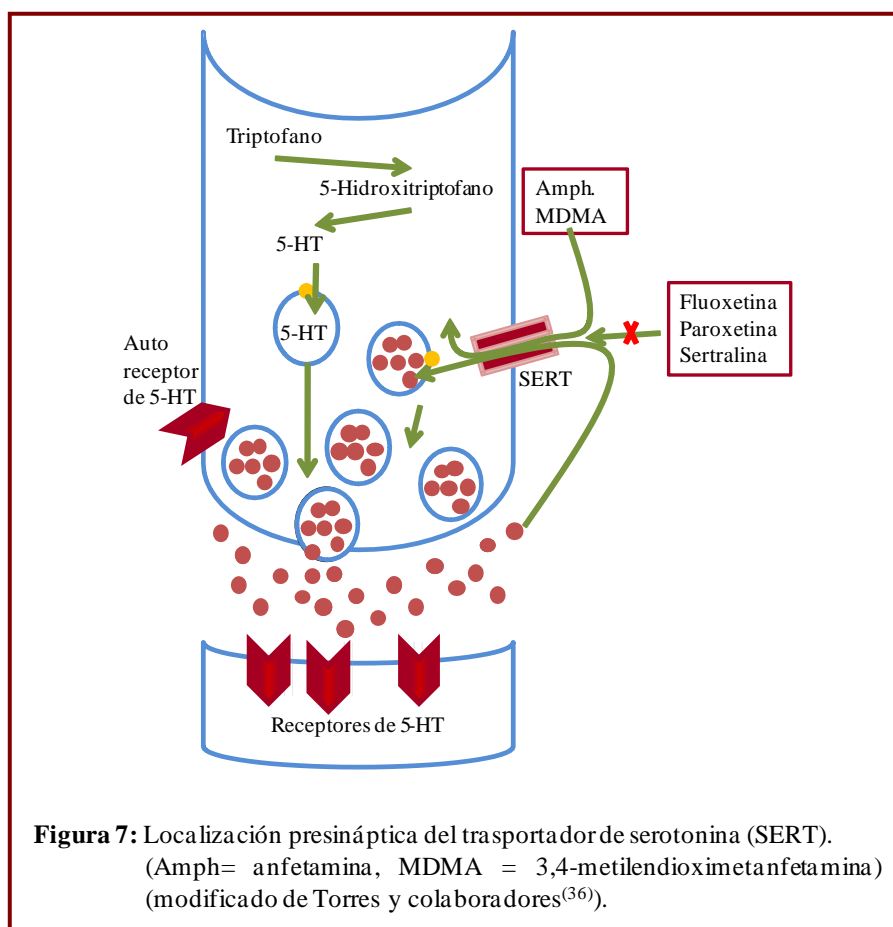
Los transportadores de monoaminas (MATs) son estructuras proteicas que funcionan como transportadores integrales de membrana plasmática para regular las concentraciones de neurotransmisores. Hay tres clases principales de MATs: SERT, DAT y NET, responsables de la recaptación de sus correspondientes neurotransmisores: serotonina, dopamina y

norepinefrina. Los MATs están ubicados en la hendidura sináptica, transportando las monoaminas desde la hendidura sináptica de vuelta hacia el citoplasma de la neurona presináptica⁽³⁶⁾. La regulación de los MATs ocurre generalmente a través de fosforilación y modificación postraduccional⁽³⁷⁾. Debido a su importancia en la señalización neuronal, los MATs son el objetivo de muchos fármacos terapéuticos asociados con trastornos del estado de ánimo, tales como fluoxetina o metilfenidato. Los compuestos sintéticos tales como anfetamina y cocaína también pueden tener como diana los MATs.

Estos transportadores son miembros del grupo de transportadores neuronales de membrana, sustrato específico Na^+/Cl^- -dependientes⁽³⁷⁾. Los MATs son grandes proteínas integrales de membrana compuestas de 12 dominios transmembranales conectados por bucles intracelulares y extracelulares. Los terminales $-\text{NH}_2$ y $-\text{COOH}$ de las proteínas MATs se encuentran dentro del citoplasma de las células presinápticas. Todos los MATs contienen sitios para la fosforilación de proteína cinasa mediante la proteína cinasa AMPc-dependiente, la proteína cinasa C (PKC) y la proteína cinasa Ca^{2+} /calmodulina-dependiente⁽³⁶⁾. Los MATs son responsables de la captación de monoaminas mediante la unión secuencial y cotransporte de iones Na^+ y Cl^- . El gradiente de concentración de iones generado por la bomba iónica Na^+/K^+ -ATPasa proporciona la fuerza impulsora para la captación de monoaminas mediada por transportadores⁽³⁶⁾.

Cuando los gradientes iónicos son alterados (el K^+ extracelular aumenta o el Na^+ ó Cl^- disminuye) los transportadores pueden funcionar en sentido contrario dando lugar a un flujo de salida neto de sustratos e iones de una neurona⁽³⁶⁾ (Figura 7).

SERT es responsable de la recaptación de la serotonina extracelular en un proceso Na^+/Cl^- -dependiente⁽³⁷⁾. En el SNC, SERT se ubica en la corteza cerebral, las regiones CA1 y CA3 del hipocampo, también en los núcleos del rafe mediano y dorsal. En el sistema nervioso periférico (SNP), SERT se ubica en el tracto intestinal, glándulas suprarrenales, placenta, pulmones, y plaquetas^(36, 37).



La expresión de SERT en las plaquetas tiene como función adquirir 5-HT desde el medio extracelular para posteriormente utilizarlo en la activación plaquetaria. La regulación de SERT ha sido vinculada a la depleción aguda de Ca^{2+} y Na^{+} intracelular, a la inhibición de calmodulina, a la PKC, y a la activación de óxido nítrico sintasa (NOS)/GMPc⁽³⁷⁾.

Para regresar a una conformación de reposo el SERT requiere del transportador de K^{+} intracelular⁽³⁶⁾.

La fosforilación juega un papel clave en la función de los MATs. Cuando el SERT es fosforilado mediante la vía PKC-dependiente da lugar a la internalización del mismo. La internalización del SERT reduce la recaptación de 5-HT⁽³⁷⁾.

En 1979 Langer y colaboradores describieron un lugar de fijación para los fármacos tricíclicos (lugar de fijación de imipramina) en cerebro y plaquetas^(38, 39) que resultó ser el transportador de serotonina. Debido a la facilidad de obtención de muestras de sangre, dicho

lugar de fijación se ha utilizado en la búsqueda de anomalías bioquímicas en pacientes deprimidos con resultados contradictorios^(40, 41) y para el estudio de las interacciones farmacológicas de diversos fármacos con el transportador de serotonina en humanos⁽⁴²⁾.

La importancia farmacológica del transportador de serotonina deriva del hecho de que los fármacos antidepresivos de primera generación (tricíclicos) inhibían en mayor o menor grado la recaptación neuronal de 5-HT y NA. Lo cual llevó junto a otros hechos a desarrollar diversas teorías más o menos simplificadas sobre la etiología de la depresión.

Así en base a estas teorías se desarrolló una nueva familia de fármacos antidepresivos, con acción selectiva sobre el transportador de serotonina, los denominados inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina: citalopram, fluoxetina, fluvoxamina, paroxetina y sertralina. Estos fármacos tienen capacidad de inhibir con mayor o menor potencia y selectividad la recaptación neuronal de serotonina, a través del bloqueo del transportador⁽⁴³⁾. Por su mayor especificidad, los ISRS carecen de los efectos secundarios de los fármacos tricíclicos, derivados de su afinidad por los receptores de acetilcolina (ACh), noradrenalina e histamina; lo que facilita un mejor cumplimiento de las pautas terapéuticas y, por tanto, de los tratamientos^(15, 44).

El prototipo de este grupo es la fluoxetina, es de absorción lenta, con una vida media de 24 a 48 horas, lo cual mejora la adherencia al tratamiento. Produce menos efectos secundarios que los antidepresivos tricíclicos, sin efectos cardiacos, náuseas, diarrea, cefalea, disfunción sexual, insomnio, etc., (generalmente dependientes de dosis); a veces, origina nerviosismo al inicio del tratamiento, riesgo de hemorragia gastrointestinal debido a su acción sobre las plaquetas, y es junto con trazodona, los que provocan menor ganancia de peso. Tiene mucha aceptación además de por lo indicado, porque tiene indicaciones adicionales; es de primera elección en el tratamiento de la depresión, tanto en fase aguda como en el mantenimiento y para prevenir la recaída y la recurrencia; mejora las alteraciones del sueño propias de la depresión, trastorno obsesivo-compulsivo o bulimia nerviosa (complemento a psicoterapia).

5. ACCIONES FARMACOLÓGICAS ASOCIADAS A 5-HT.

Como consecuencia de su amplia distribución por todo el organismo la serotonina está implicada en muy diversos procesos fisiológicos y patológicos.

Aunque sus reservas periféricas constituyen la mayor parte de 5-HT del organismo, esta monoamina actúa también como neurotransmisor a nivel del SNC, influyendo de forma directa o indirecta en casi la totalidad de las funciones cerebrales. Entre ellas podemos destacar la función endocrina (el control hormonal lo ejerce fundamentalmente sobre el eje hipotálamo-hipófisis), el sueño (es la 5-HT la principal implicada en las fases III y IV del sueño), el apetito (5-HT regula la ingesta y la saciedad)^(45, 46), la conducta sexual (ejerce efecto inhibitor de la liberación hipotalámica de gonadotropinas) y la regulación de la temperatura corporal^(47, 48).

La alteración en la regulación de la serotonina en seres humanos ha sido implicada en una amplia gama de trastornos psiquiátricos, incluyendo el trastorno obsesivo-compulsivo, la depresión, la ansiedad, los trastornos alimenticios, el abuso de sustancias y la dependencia⁽⁴⁹⁻⁵¹⁾.

La prevalencia de trastornos mentales varía entre 4.3 al 26.4% de la población, según datos epidemiológicos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) recabados en 14 países de América, Europa, Oriente Medio, África y Asia. En el Informe Mundial sobre la Salud del año 2001 se refiere que la prevalencia puntual de depresión en el mundo era del 1.9% en los hombres y del 3.2% en las mujeres. Sin embargo, estas cifras podrían ser demasiado conservadoras, pues estudios más recientes indican valores del 3-5% para varones y del 8-10% para mujeres⁽⁵²⁻⁵⁵⁾. En ese mismo año, la OMS estimó que la prevalencia de depresión en el mundo es del 5-10%, y el riesgo de padecerla durante la vida es del 10-20% para las mujeres y sólo un poco menor para los hombres. Por ello, esta organización ubica la depresión como la cuarta causa de discapacidad en el mundo, señalando que, para el año 2020, si no antes, estará en segundo lugar⁽⁵⁶⁾.

Los niveles plasmáticos de triptófano son significativamente inferiores en los sujetos con depresión mayor que en sujetos control sanos^(57, 58). Además, estudios realizados en humanos ha mostrado que privar al cerebro de triptófano, disminuye los niveles de serotonina

central, induciendo depresión en cuestión de horas⁽⁵⁹⁾. Por lo tanto, los precursores de la serotonina, como L-triptófano y 5-HTP se han utilizado en el tratamiento de esos trastornos basándose en la idea de que la deficiencia de serotonina central es la causa subyacente de la depresión⁽⁶⁰⁾. A pesar de esta hipótesis, la existencia de un vínculo definitivo entre la deficiencia de serotonina y la depresión no ha sido bien establecido⁽⁶¹⁾. Se sabe que en los seres humanos, los precursores de serotonina pueden aumentar la producción de serotonina central⁽⁶²⁾. En el decenio de 1970 a 1980, varios estudios trataron a pacientes deprimidos con precursores de serotonina, como el L-triptófano, y 5-HTP⁽⁶³⁾ siendo la eficacia de la administración 5-HTP controvertida⁽⁶³⁾.

La teoría sobre la relación entre la serotonina y el comportamiento agresivo en seres humanos, primates y roedores es explicada por la deficiencia de esta amina⁽⁶⁴⁾. En ratones knockout del receptor 5-HT_{1A} se observó una mayor tendencia a evitar nuevos ambientes, el miedo y para escapar de situaciones estresantes siendo la hipótesis de que el aumento de la retroalimentación en la neurotransmisión serotoninérgica es probablemente responsable de la ansiedad en estos animales⁽⁶⁵⁾. Se sugirió que estos efectos pueden deberse a la disminución de la densidad de receptores 5HT_{1A} ya que estos ratones tenían niveles normales de 5-HT y 5-HIAA⁽⁶⁶⁾. Además, los agonistas del receptor 5-HT_{1A} han demostrado un potente efecto antiagresivo en roedores y animales agresivos⁽⁶⁷⁾.

A nivel periférico 5-HT también está implicada en la actividad de diversos órganos y sistemas, como son el aparato respiratorio, el sistema gastrointestinal donde se sintetiza el 95% de la serotonina dentro de las células enterocromafines⁽⁶⁸⁻⁷⁰⁾ y el metabolismo del hueso⁽⁷¹⁻⁷³⁾, entre otros.

Afecta también al metabolismo de la glucosa, ya que algunos estudios sugieren que la serotonina induce hiperglucemia⁽⁷⁴⁾. Otros, sin embargo, han demostrado que la serotonina disminuye la concentración sanguínea de glucosa^(75, 76). El mecanismo exacto del efecto hipoglucemiante no está bien determinado, algunos datos indican que este efecto puede estar mediado a través del receptor 5-HT_{2A}, que se expresa tanto en ratas^(77, 78) como humanos⁽⁷⁹⁾. La activación de este receptor induce una absorción rápida de glucosa⁽⁸⁰⁾, causada por una mayor expresión de los transportadores de la misma en la superficie de la célula. El efecto hipoglucemiante de 5-HT no parece estar mediado por la insulina. De hecho, no se observa

aumento significativo en la insulina después de la administración intraperitoneal de triptófano en ratas⁽⁸¹⁾. Además, los miotúbulos expuestos a la serotonina no muestran aumentos en la 3,4,5-fosfatidilinositoltrifosfato (PIP3) o la proteína cinasa B (PKB), los cuales están significativamente elevados en presencia de insulina⁽⁸⁰⁾.

Lustman y colaboradores (1986) observaron que los niveles de serotonina aparecen bajos en los pacientes diabéticos de tipo 1, especulando en cuanto a si tal deficiencia podría contribuir a la mayor incidencia de trastornos afectivos y neuropsiquiátricos en la diabetes⁽⁸²⁾. En un estudio posterior se demuestra que la fracción libre de L-triptófano es baja en niños con diabetes tipo 1 y se postula una relación entre la serotonina central y el aumento de la incidencia de los enfermedades psiquiátricas en los diabéticos tipo 1⁽⁸²⁾.

La serotonina también ejerce su efecto en células mesangiales; de este modo, en este tipo de células, se ha descrito la existencia de receptores 5-HT_{1B} y 5-HT_{2A}, asociados los dos a una inhibición de la adenilatociclasa^(83, 84). La serotonina estimula la producción de factor de crecimiento tumoral $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) y la síntesis de colágeno⁽⁸⁵⁾. También, por si misma, 5-HT es un factor de crecimiento de estas células, por un mecanismo en el que entra en juego la PKC y otras cinasas, pero también la producción de especies reactivas de oxígeno⁽⁸⁶⁾.

A nivel cardiovascular la serotonina funciona como una neurohormona en el sistema cardiovascular y sus respuestas son complejas.

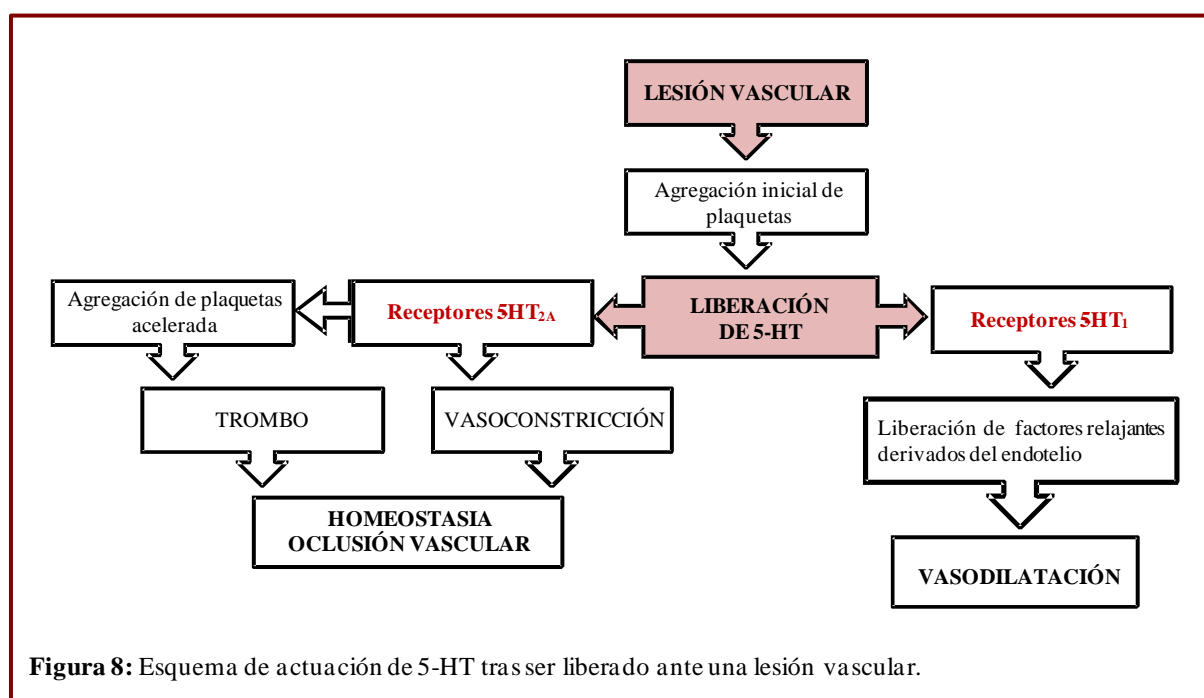
Favorece la agregación plaquetaria, la mayor parte de la serotonina circulante se transporta en los gránulos densos de las plaquetas⁽⁸⁷⁾. La serotonina es liberada por las plaquetas como respuesta a una serie de señales, entre ellas, el contacto con el endotelio dañado, la isquemia y agonistas de los receptores 5-HT₂ y 5-HT₃. Las plaquetas liberan serotonina y otros factores, que son importantes en la regulación de la trombosis y la hemostasia por una acción vasoconstrictora directa. También serotonina actúa en las células endoteliales liberando distintos agentes, cuyo efecto resultante puede ser vasoconstricción o vasodilatación en células de músculo liso⁽⁸⁷⁾. Serotonina afecta al tono de los vasos sanguíneos, vía receptores localizados en las células musculares lisas de la pared de dichos vasos, siendo la típica respuesta a la serotonina vasoconstricción⁽⁸⁷⁾, sin embargo serotonina puede controlar sus propiedades vasoconstrictoras mediante la liberación del óxido nítrico (NO) por activación de diferentes tipos de receptores (Figura 8).

Estudios recientes en ratones knock-out para la triptófano hidroxilasa-1 (TPH 1), muestran un papel entre la serotonina y la función plaquetaria. Los ratones presentan una alteración de la hemostasia asociada con una disminución de serotonina periférica y un menor riesgo de padecer trombosis y tromboembolismo⁽⁸⁸⁾. En estos ratones la estructura plaquetaria y su capacidad de adhesión no está modificada pero, esta última sí se encuentra disminuida.

Las respuestas vasculares de 5-HT dependen de muchos factores entre los que se encuentra la especie animal a estudiar, el tono vascular basal, el lecho vascular que se esté estudiando (Figura 9), la dosis del agonista empleado, las condiciones experimentales y en mayor grado, la naturaleza de los receptores involucrados (5-HT₁ al 5-HT₇), así como la posibilidad de que aparezcan acciones reflejas o indirectas⁽⁸⁹⁻⁹³⁾.

La serotonina actúa como neurotransmisor central sobre el sistema cardiovascular a través de las neuronas de los núcleos del rafe. Mediante la activación de las vías simpáticas y parasimpáticas, la serotonina ejerce efectos cronotrópicos e inotrópicos en el sistema cardiovascular⁽⁹⁴⁻⁹⁶⁾. Estos efectos están mediados a través de receptores de las familias 5-HT₁, 5HT₂ y 5-HT₃^(91, 95, 96), fundamentalmente.

La activación de receptores 5-HT_{1A} pueden causar inhibición simpática central y bradicardia^(94, 96), mientras que la activación del receptor 5-HT_{2A} media la estimulación

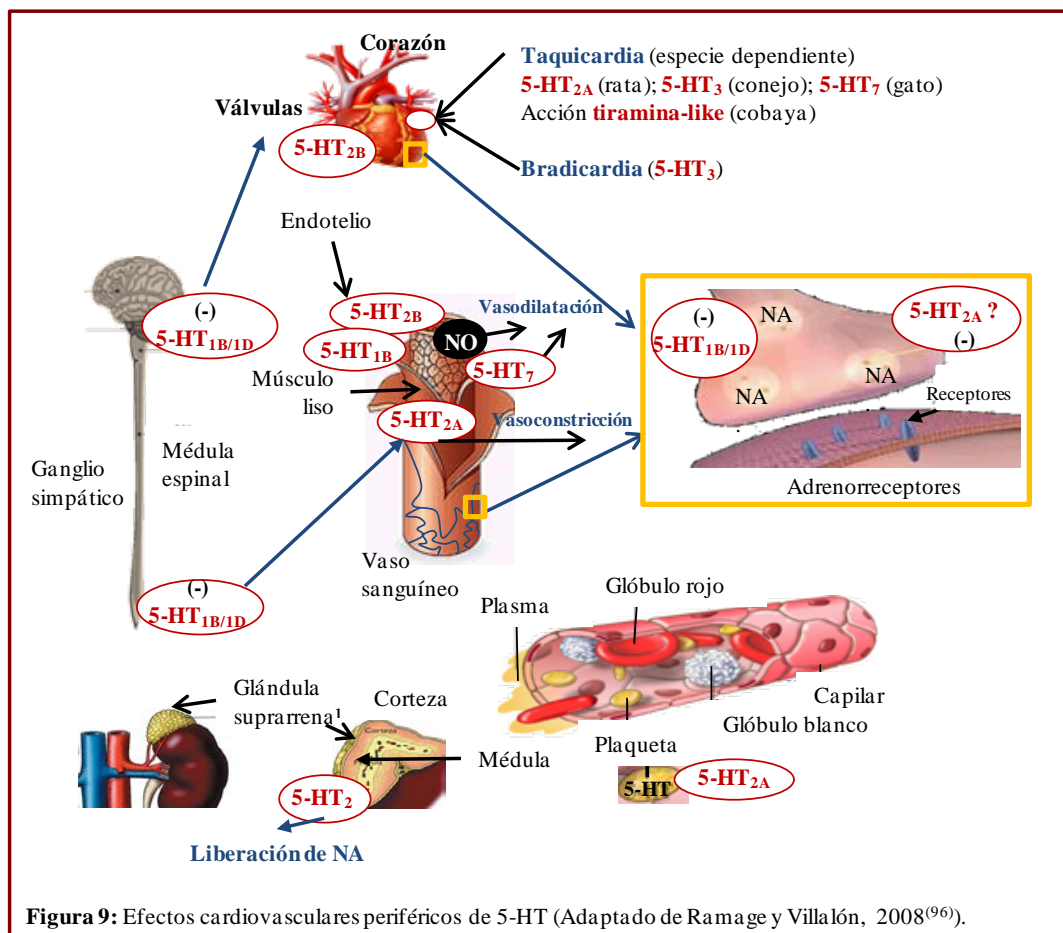


simpática que conduce a un aumento de la presión arterial y taquicardia^(94, 97, 98) (Figura 9).

Los receptores 5-HT₃ median lo que se conoce como el reflejo de Von Bezold-Jarish en humanos. El reflejo se produce cuando los receptores 5-HT₃ en las terminaciones nerviosas aferentes vagales son estimulados, dando lugar a una bradicardia brusca pero transitoria que origina una respuesta hipotensora, seguida de taquicardia refleja y aumento de la presión arterial^(94, 97, 98).

Otros mecanismos bradicardizantes incluyen la inhibición simpática cardíaca por activación de receptores presinápticos 5-HT_{1B/1D} y, en el caso de la rata, con un componente adicional de participación de receptores 5-HT_{5A/5B}^(99, 100).

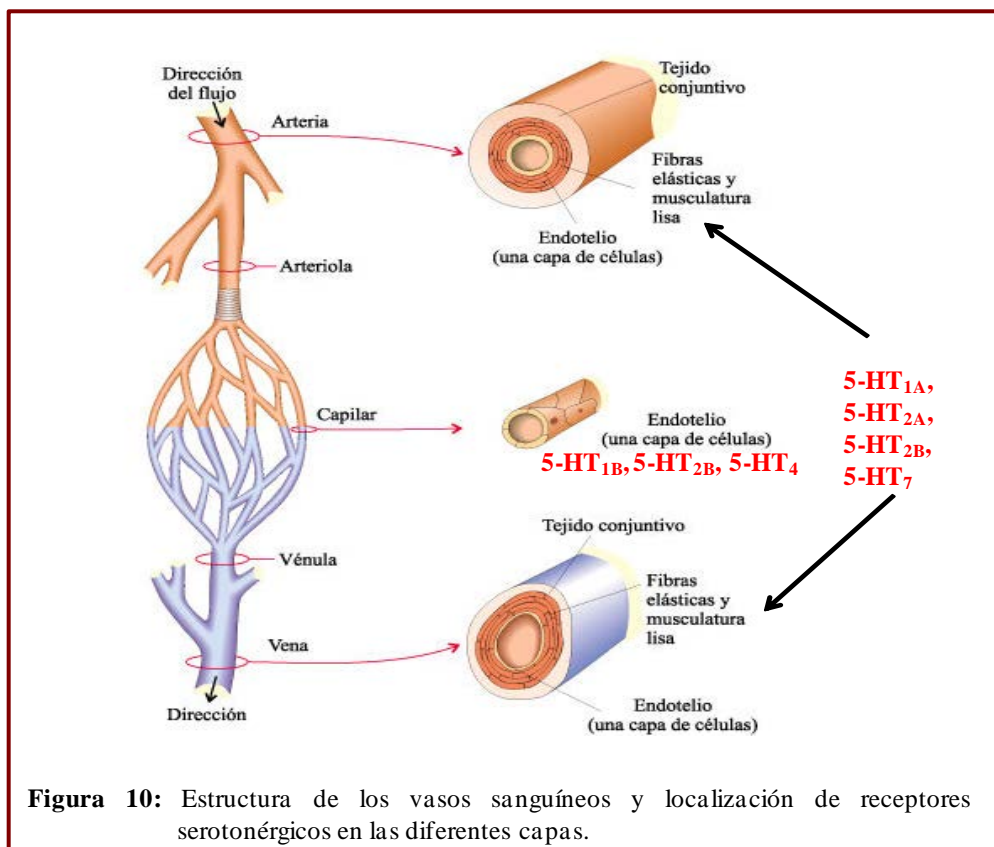
Los receptores 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT₄ y 5-HT₇ están presentes en las células vasculares del músculo liso y células endoteliales⁽¹⁰¹⁾. A través de estos receptores, la serotonina modula la contracción y relajación de los vasos sanguíneos, y por lo tanto, la regulación del tono vascular⁽¹⁰¹⁾. Sin embargo, el receptor o receptores responsables de estas



acciones aún no están totalmente clarificados.

La activación de receptores serotoninérgicos 5-HT₂ localizados a nivel de músculo liso, como ocurre en la mayor parte de los grandes vasos (Figura 10), origina vasoconstricción, hecho ampliamente demostrado ya que su inhibición antagoniza dicho efecto⁽¹⁰²⁾; en cambio, los localizados a nivel endotelial originan vasodilatación como han demostrado algunos autores^(95, 96, 103, 104) quienes proponen para esta vasodilatación, mecanismos serotoninérgicos que inducen liberación del factor relajante endotelial. Serotonina media efectos inotrópicos y cronotrópicos positivos a través de los receptores 5-HT₄ presentes en los miocitos cardíacos^(95, 105). Ratones knock-out para la triptófano hidroxilasa 1, que desarrollan miocardiopatía, muestran concentraciones de serotonina superiores que oscilan del 4-8% respecto a los normales⁽¹⁰⁵⁾, no observándose, sin embargo alteraciones morfológicas cardíacas en estos ratones; a diferencia de los ratones knock-out para el receptor 5-HT_{2B}, que desarrollan defectos morfogenéticos cardíacos que conducen a la muerte embrionaria o neonatal⁽¹⁰⁶⁾.

Se reconoce para esta amina biógena cierto papel en la regulación y control de los



niveles de presión arterial, al menos a nivel central^(91, 96), habiéndose visto que la activación de determinados receptores, como son los 5-HT_{1A} centrales, originan hipotensión.

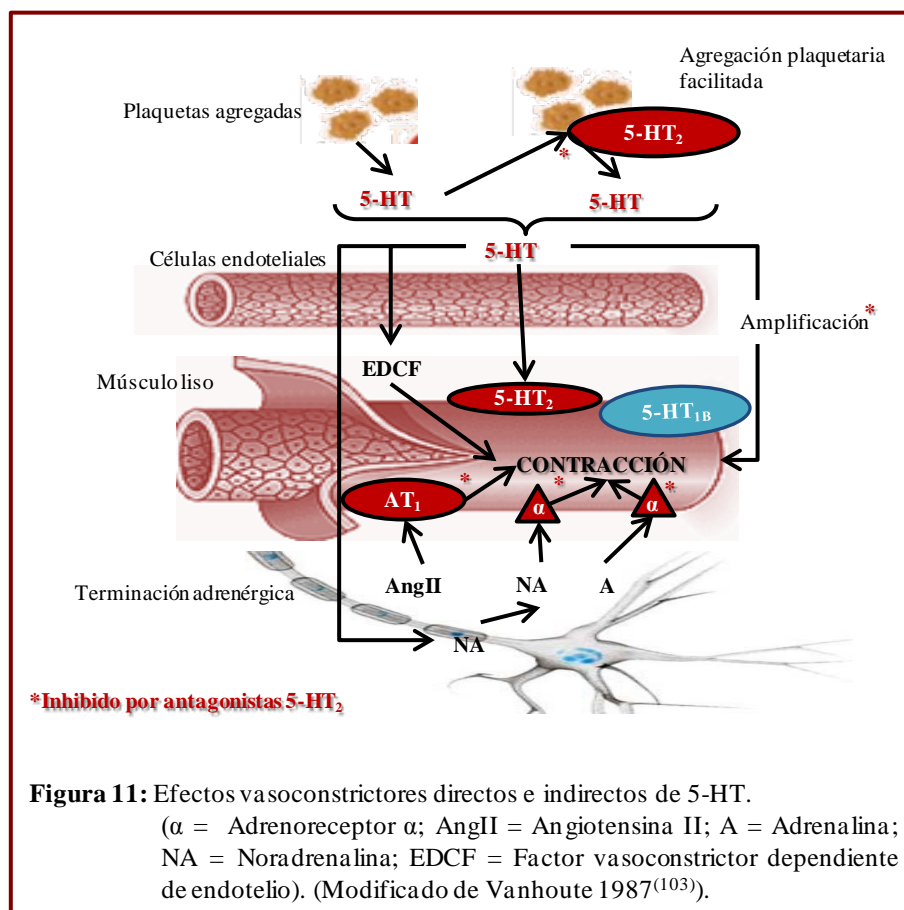
Aunque también hay estudios que han puesto de manifiesto su papel como poderoso autacoide vasoactivo que se libera en la agregación plaquetaria en respuesta a diferentes procesos (inflamación, infecciones, etc.) y que juega un papel importante en la fisiopatología de diversas enfermedades vasculares⁽¹⁰⁷⁾, como pueden ser la hipertensión sistémica pulmonar y la enfermedad periférica vascular⁽¹⁰⁸⁾.

En condiciones *in vitro*, serotonina es capaz de provocar contracción de la mayor parte de los grandes vasos de conductancia, pero con diferencias en la sensibilidad; de este modo, podemos decir que las arterias cerebrales y coronarias son las que originan una mayor respuesta ante la activación serotoninérgica; en cambio, en microcirculación, el efecto constrictor directo de serotonina aparece sobre todo a nivel de vénulas⁽¹⁰⁹⁾; en todo caso, es importante tener en cuenta que la temperatura del tejido que se esté utilizando influye tanto en la microcirculación existente en el mismo, como en los efectos vasculares de serotonina⁽¹¹⁰⁾.

Se han descrito acciones constrictoras de 5-HT provocadas por la activación directa a nivel del músculo liso vascular de receptores 5-HT₁ ó 5-HT₂⁽¹¹¹⁾, por activación de los receptores adrenérgicos^(91, 93), o por liberación de otros agentes vasoconstrictores como angiotensina II (AngII) o prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α})^(93, 112). Algunos estudios muestran que en humanos, en las arterias coronarias, se expresan en gran cantidad los receptores 5-HT₂ y 5-HT_{1B}, moderadamente los receptores 5-HT_{1F} y 5-HT_{1A}, mientras que hay una baja expresión de los receptores 5-HT_{1D}⁽¹⁰¹⁾; y en las arterias cerebrales (arteria temporal y occipitales) se expresan receptores 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT₄ y 5-HT₇; en ambos casos, estudios farmacológicos han mostrado que las respuestas vasoconstrictoras están mediadas a través de los receptores 5-HT_{1B} y 5-HT_{2A}^(96, 113, 114).

En la vena porta de roedores, 5-HT también ejerce un efecto vasoconstrictor, tanto en las preparaciones endotelio dependiente como endotelio independiente, a través de la activación de los receptores 5-HT_{1D/1B} y 5-HT_{2A}⁽¹¹⁵⁾. Otros estudios señalan que el endotelio contrarresta parcialmente la respuesta vasoconstrictora a 5-HT en la arteria cerebral media de cabra⁽¹¹⁶⁾, vena safena de conejo⁽¹¹⁷⁾, arteria uterina humana⁽¹¹⁸⁾ y arteria carótida de conejo⁽⁹⁰⁾ (Figura 11).

En lo referente a las acciones vasodilatadoras, el efecto de serotonina es más marcado cuando el tono simpático está aumentado, aunque también se ha mostrado la presencia directa de receptores serotoninérgicos en células endoteliales⁽¹¹⁹⁾ que pueden facilitar la liberación de óxido nítrico tras activación de receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} y 5-HT_{2B}⁽¹²⁰⁻¹²²⁾.

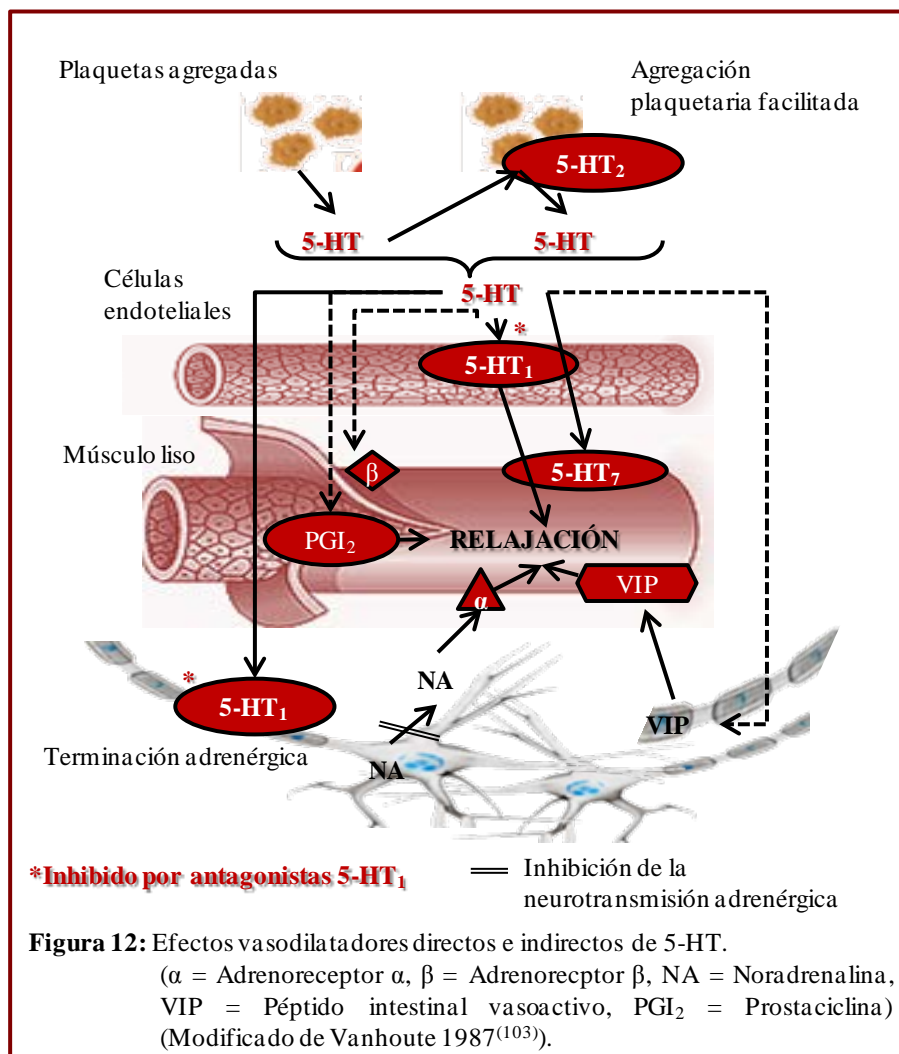


En el caso de cultivos de células endoteliales de aorta de oveja se ha demostrado la activación, al menos en parte, de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) por parte de 5-HT⁽¹²³⁾, y de modo similar para el caso de cultivos de células endoteliales de arteria coronaria humana se ha sugerido la posibilidad de que serotonina induzca la producción de NO a través de los receptores 5-HT_{1B} y 5-HT_{2B}⁽¹²⁴⁾. Las acciones vasodilatadoras de esta amina se han mostrado también en los cambios vasculares de las arterias craneales que acompañan a la migraña. También existen receptores 5-HT₇ en el músculo liso vascular^(125, 126) cuya activación implica vasodilatación mediada por un aumento del AMPc⁽¹²⁷⁻¹³⁰⁾ (Figura 12).

En lechos vasculares se han mostrado acciones tanto vasodilatadoras como vasoconstrictoras, mediadas por diferentes tipos de receptores, que en algunos casos están ligadas a otros sistemas tales como la vía de las ciclooxigenasas o las cininas vasoactivas.

En mesenterio autoperfundido de rata se ha demostrado la existencia de acciones vasoconstrictoras serotoninérgicas mediadas a través de los receptores 5-HT_{2B} y/o 5-HT_{2C}⁽¹³¹⁾. Sin embargo, en la vasculatura del tren posterior en ratas, esta vasoconstricción está ligada a la activación de receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}⁽¹³²⁾.

Las respuestas vasodilatadoras a este nivel se producen por la activación de receptores 5-HT_{1B/1D}⁽¹³³⁾, los cuales llevan a una liberación de adrenalina a nivel de las cápsulas suprarrenales, seguida de una vasodilatación provocada por la activación de receptores β₂-adrenérgicos⁽¹³⁴⁾.



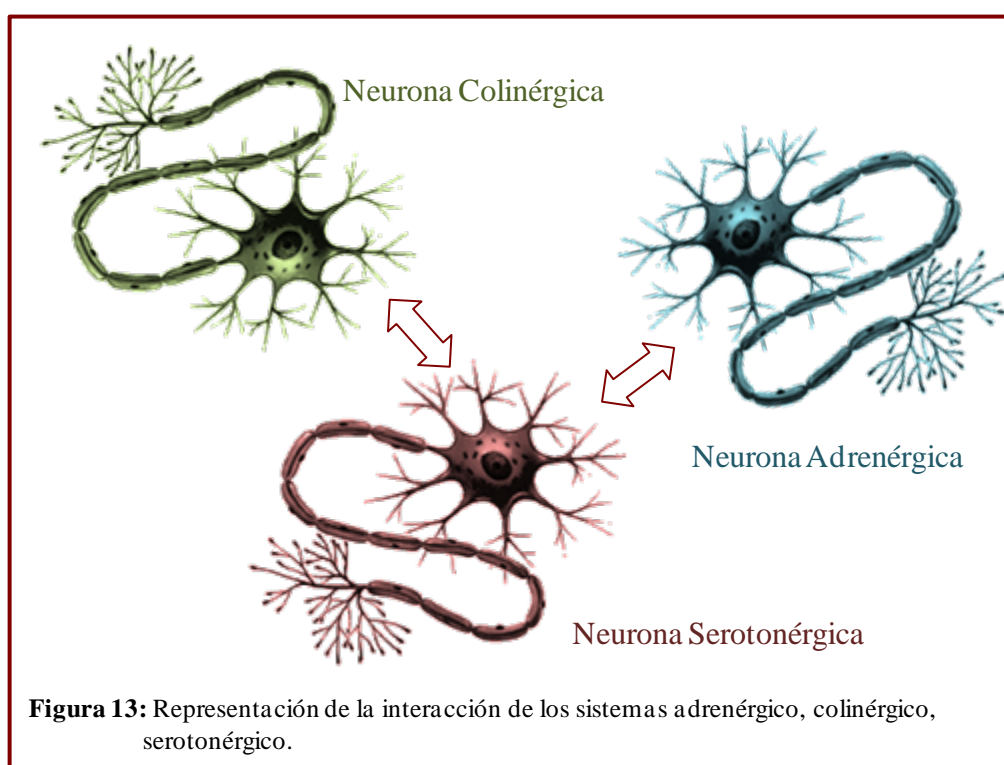
A nivel renal coexisten respuestas tanto vasoconstrictoras como vasodilatadoras⁽¹³⁵⁻¹³⁸⁾. Este efecto dual se ha observado tanto al perfundir 5-HT en la arteria renal de perro⁽¹³⁹⁾ como por administración local de 5-HT en riñón hidronefrótico⁽¹⁴⁰⁾. En este último trabajo mencionado, la vasoconstricción parece que se produce esencialmente a nivel de los grandes vasos (arterias arciformes), mientras que las arteriolas de menos calibre (intralobulares y aferentes) tienden a dilatarse. Estos resultados podrían indicar una situación diferente para los distintos subtipos de receptores de serotonina en todo el árbol vascular intrarrenal. En la década de los 90, Verbeuren y colaboradores sugirieron la existencia de receptores 5-HT_{1A} a nivel endotelial que mediaban la vasodilatación producida por 8-OH-DPAT y por algunos antagonistas β-adrenérgicos^(119, 141). De igual manera, en riñón de perros anestesiados Tian y colaboradores⁽¹⁴²⁾ sugieren vasodilatación renal, mediada por un aumento en la liberación de NO, producida por un agonista de los receptores 5-HT₂, DOI. En estudios de riñón autoperfundido *in situ* se demuestra la implicación de receptores 5-HT₂ en la vasoconstricción provocada tanto por serotonina como por angiotensina II^(137, 138). Con el desarrollo de agonistas y antagonistas selectivos, se ha mostrado la existencia de diferentes subtipos de receptores según la especie animal usada y/o la patología subyacente; así, se ha visto la existencia de receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2B} en arterias renales aisladas de rata⁽¹⁴³⁾, mientras que en anillos de arterias renales de conejo se ha mostrado la existencia de receptores 5-HT_{1B} y 5-HT_{1D}⁽¹⁴⁴⁾. Estudios realizados en nuestro laboratorio, en riñón autoperfundido *in situ* de ratas hipertensas por L-NAME, demuestran la implicación de receptores 5-HT_{2A} en la vasoconstricción provocada por serotonina⁽¹⁴⁵⁾.

6. INTERACCIÓN SISTEMA SEROTONÉRGICO-ADRENÉRGICO-COLINÉRGICO.

La interacción de serotonina con otros neurotransmisores (acetilcolina, adrenalina, noradrenalina, dopamina, etc.) tanto a nivel central como periférico ha sido muy estudiada en los últimos años. En este sentido, hemos de decir que la distribución de neuronas serotoninérgicas a nivel del SNC es muy similar a la de las neuronas noradrenérgicas, que la actividad de estas últimas está regulada por serotonina, y que existen diversos tipos de receptores serotoninérgicos en terminaciones nerviosas adrenérgicas periféricas de distintos

tejidos y especies. La presencia de tales receptores media la liberación y la inhibición de los correspondientes neurotransmisores después de la estimulación neuronal, así como el aumento de dicha liberación en terminales adrenérgicos⁽¹⁴⁶⁾.

Desde hace años existen estudios que demuestran una interacción entre el sistema colinérgico y serotoninérgico⁽¹⁴⁷⁾. La mayoría de estudios realizados con psicofármacos demuestran que la interacción entre los procesos colinérgicos y serotoninérgicos tiene una relevancia funcional. Se ha demostrado liberación de acetilcolina en hipocampo de rata que puede ser controlada localmente por receptores 5-HT_{1B}⁽¹⁴⁸⁾, 5-HT₃^(149, 150) y 5-HT₄⁽¹⁵¹⁻¹⁵³⁾ y que puede ser facilitada a través de la activación de receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₃. También hay evidencia de que una denervación serotoninérgica del hipocampo es capaz de facilitar la liberación de acetilcolina. En la corteza, la liberación de Ach puede ser controlada localmente por receptores 5-HT_{1B} y 5HT₃ inhibidores, mientras que la activación sistémica de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₄ induce efectos de facilitación. Por último, en el estriado, la inhibición local del tono colinérgico puede estar mediada por receptores 5-HT₁ y 5-HT₂⁽¹⁵⁴⁾. A nivel del nervio vago, en ratas desmeduladas existen mecanismos serotoninérgicos inhibidores de la neurotransmisión colinérgica de tipo 5-HT₂ y potenciadores de tipo 5-HT₃⁽¹⁵⁵⁾ que se ven modificados por la diabetes^(156, 157).



La 5-HT, en pulmón, origina tanto constricción como relajación de las vías aéreas, principalmente facilitando postsinápticamente la neurotransmisión colinérgica, aunque también actúa directamente en el músculo liso⁽¹⁵⁸⁾.

Desde que en 1977, McGrath demostró que dosis pequeñas de 5-HT inhibían la liberación de noradrenalina tritiada inducida por estimulación eléctrica en vena safena de perro⁽¹⁵⁹⁾, en numerosos estudios se ha establecido la existencia de interacción entre ambos sistemas a nivel de SNC^(160, 161) y SNP^(89, 145, 156, 157, 162-167). En la actualidad en varias especies de animales se ha puesto de manifiesto la interacción entre el sistema simpático y serotoninérgico, al menos parcialmente, ya que la vasoconstricción cutánea que se produce por 3,4-metilenedioxi-metanfetamina (MDMA) está mediada por la liberación de serotonina y, la subsiguiente estimulación de receptores 5-HT_{2A}⁽¹⁶⁸⁾. Igualmente, se ha demostrado que serotonina es capaz de inhibir la liberación de NA, tanto *in vitro* como *in vivo*, en distintos lechos vasculares de diferentes especies (en vena safena humana y de perro⁽¹⁶⁹⁻¹⁷¹⁾, aurículas humanas⁽¹⁷²⁾, vena cava y vasculatura renal de rata^(173, 174), arterias cerebrales de la especie bovina⁽¹⁷⁵⁾) y en ratas normoglucémicas y diabéticas^(89, 130, 131, 157, 165-167).

Estudios en arteria pulmonar de conejo muestran que receptores 5-HT₄ y 5-HT_{1B/1D} median la liberación de Ach que, a su vez, activan receptores muscarínicos pre y/o postsinápticos en los nervios simpáticos que originan inhibición de la liberación de NA⁽¹⁷⁶⁾. A nivel pulmonar se ha demostrado la implicación de los receptores α -adrenérgicos en las respuestas contráctiles a 5-HT⁽¹⁷⁷⁾, estando implicado en dicha contracción el NO, de tal modo que en presencia de NO endógeno la respuesta contráctil de 5-HT está mediada por los receptores α -adrenérgicos, mientras que la inhibición de NO endógeno potencia el componente de la contracción mediado exclusivamente a través de los receptores 5-HT_{2A}⁽¹⁷⁸⁾.

A nivel del corazón, serotonina favorece la liberación de NA por la estimulación de receptores 5-HT_{1A}, y como consecuencia tiene efectos inotrópicos y cronotrópicos positivos. Además puede producirse bradicardia acompañada de hipertensión por respuesta refleja vagal. En ratas desmeduladas la serotonina induce una inhibición presináptica de la transmisión simpática^(91, 96, 163, 179), estando mediada dicha inhibición por los receptores 5-HT₁, principalmente los 5-HT_{1D}⁽⁸⁹⁾. Sin embargo, se reconocen mecanismos que aumentan la liberación de noradrenalina, mediados por receptores 5-HT₃⁽¹⁶³⁾. Otros autores⁽⁹²⁾ muestran

como, también en ratas desmeduladas, 5-HT induce una inhibición simpática cardíaca mediada por receptores 5-HT₁ y 5-HT_{5A/5B}.

Estudios realizados con plaquetas humanas determinaron que NA juega un papel importante en el control del funcionamiento de los receptores 5HT₁. La NA, por activación de la PKC mediada por receptores α - y β -adrenérgicos, regula la fosforilación de receptores 5-HT₁, interfiriendo así en la capacidad de respuesta funcional de serotonina. Altos niveles de NA (liberados en situaciones de estrés) pueden jugar un papel importante en la regulación de respuesta a receptores 5-HT₁ y en el control y efectividad de fármacos en trastornos de ansiedad⁽¹⁸⁰⁻¹⁸²⁾.

II. DIABETES.

El Comité de Expertos en el Diagnóstico y Clasificación de la Diabetes Mellitus, comité que se creó en mayo de 1995 y que trabaja con el patrocinio de la Asociación Americana de Diabetes (ADA) define la Diabetes Mellitus (DM) como un conjunto de enfermedades metabólicas caracterizadas por una hiperglucemia, que aparece como resultado de defectos en la secreción de insulina, de alteraciones en la acción de la misma, o de ambos. La hiperglucemia crónica está asociada a daños a largo plazo, disfunciones y fallo en varios órganos, especialmente en los ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos.

Dentro de esta denominación común se incluye, como en la propia definición se muestra, un grupo muy heterogéneo de enfermedades, cuya clasificación ha sido una ardua tarea. Fue este Comité de Expertos el que estableció las bases para la actual clasificación^(183, 184), que quedó de la siguiente forma:

1. Diabetes Mellitus tipo 1.
2. Diabetes Mellitus tipo 2.
3. Otros tipos específicos de diabetes:
 - 3.1. Diabetes gestacional.
 - 3.2. Alteración del metabolismo o de la homeostasis de la glucosa.
 - 3.3. Diabetes por etiologías identificables.

Las dos formas más comunes de diabetes son la DM tipo 1 y la DM tipo 2. La primera de ellas suele aparecer a edades tempranas, y se caracteriza porque los enfermos suelen ser delgados, con acetonemia y dependen de la insulina para su supervivencia; mientras que el segundo caso aparece generalmente después de los 40 años y los que la padecen son obesos, con antecedentes familiares de diabetes, y no todos dependen de la insulina exógena (Tabla 2).

<p>Diabetes Mellitus tipo 1</p>	<p>Caracterizada por la destrucción de células β, que habitualmente lleva a déficit absoluto de insulina, hay 2 formas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Diabetes Mellitus mediada por procesos autoinmunes. La destrucción de células β resulta de un proceso autoinmune. • Diabetes Mellitus idiopática: etiología desconocida.
<p>Diabetes Mellitus tipo 2</p>	<p>Caracterizada por resistencia insulínica, que normalmente se acompaña de un déficit relativo de insulina. Puede variar desde resistencia insulínica predominante con déficit relativo de insulina a déficit insulínico predominante con alguna resistencia insulínica.</p>
<p>Homeostasia de la glucosa alterada</p>	<p>Es un estado metabólico intermedio entre la normalidad y la diabetes.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Glucemia basal alterada: glucemia plasmática basal por encima de los valores normales y menor que el valor diagnóstico de la diabetes. • Tolerancia alterada a la glucosa: glucemia mayor que los valores normales y menor que la procedente del diagnóstico de la diabetes tras sobrecarga de 75 g de glucosa.
<p>Diabetes gestacional</p>	<p>Sin cambios en la definición.</p>
<p>Otros tipos específicos</p>	<p>Diabetes causada por otras etiologías identificables:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Defectos genéticos en la función de las células β. • Defectos genéticos en la acción de la insulina. • Enfermedades del páncreas exocrino. • Endocrinopatías. • Fármacos y drogas. • Infección. • Formas raras de diabetes relacionadas con procesos autoinmunes. • Otros síndromes genéticos.

Tabla 2: Características de los distintos tipos de diabetes.

La Organización Mundial de la Salud, publicó un informe titulado: "Global Burden of Diabetes 1995-2025: Prevalence, Numerical Estimates and Projections (Impacto global de la Diabetes 1995-2025: Prevalencia, Estimaciones cuantitativas y Previsiones futuras)⁽¹⁸⁵⁾. En este informe y, basándose en los datos epidemiológicos disponibles en la actualidad, se estiman una serie de predicciones: de las dos formas básicas de diabetes, la tipo 2 se presenta

principalmente en adultos y es, con mucho, la forma más habitual. Representa entre el 85 y el 90 % de todos los casos de diabetes. Predecían que en 2010 la prevalencia de diabetes iba a ser de 285 millones y los datos han arrojado la cifra de 347 millones en mayores de 25 años en 2008.

En 1980 se estimó que había 153 millones de pacientes diabéticos en todo el mundo, representando China e India el 40 % del total de personas con esta patología. Como mínimo, el 50% de todas las personas con diabetes desconoce que tiene la enfermedad y en algunos países, esta cifra puede llegar hasta el 80%. El cuidado de la diabetes desde todos los campos posibles (a nivel médico, de enfermería, consejo y atención farmacéutica, educación del paciente y la familia) ha demostrado que las estancias hospitalarias se reducen hasta el 58%, lo que implica un enorme beneficio socioeconómico. Está ampliamente demostrado que el coste humano y económico de la diabetes se podría reducir notablemente si se invirtiera en prevención, sobre todo en el diagnóstico temprano, para evitar la aparición de complicaciones ⁽¹⁸⁶⁾.

La prevalencia de la diabetes en España se sitúa en el 6%, aunque en personas mayores de 30 años este porcentaje aumenta hasta el 12% y en mayores de 65 años hasta el 25%, y empieza a observarse en edad pediátrica.

La incidencia de esta enfermedad también varía en función del tipo de diabetes:

- DM tipo 1: 10-12 casos/100000 habitantes/año.
- DM tipo 2: 60-150 casos/100000 habitantes/año.

La morbilidad en pacientes diabéticos es mucho mayor que en sujetos que no padecen esta enfermedad, siendo común la aparición de alteraciones renales, oculares, cardiovasculares, y neurológicas.

1. PÁNCREAS E INSULINA.

El órgano responsable de la producción de insulina es el páncreas y, concretamente los islotes de Langerhans, denominados así por su descubridor (1869, Langerhans). Pero la relación directa entre Diabetes Mellitus y daño en los islotes de Langerhans no se estableció hasta 1901 por Opie.

Histológicamente el páncreas tiene dos tejidos con funciones fisiológicas muy diferenciadas:

- Los acinos (páncreas exocrino): son los encargados de la secreción de jugos digestivos al duodeno.
- Los islotes de Langerhans (páncreas endocrino) (Figura 14): el páncreas humano tiene de dos a tres millones de islotes de aproximadamente 0,3 mm cada uno. Se encuentran organizados alrededor de pequeños capilares hacia los que las células secretan las hormonas que producen. Los cuatro tipos de células son:
 - Células β : (60%) que secretan insulina y péptido C.
 - Células α : (25%) que secretan glucagón.
 - Células γ : (10%) que secretan somatostatina.
 - Células PP: que secretan una hormona de función no muy aclarada que se llama polipéptido pancreático.

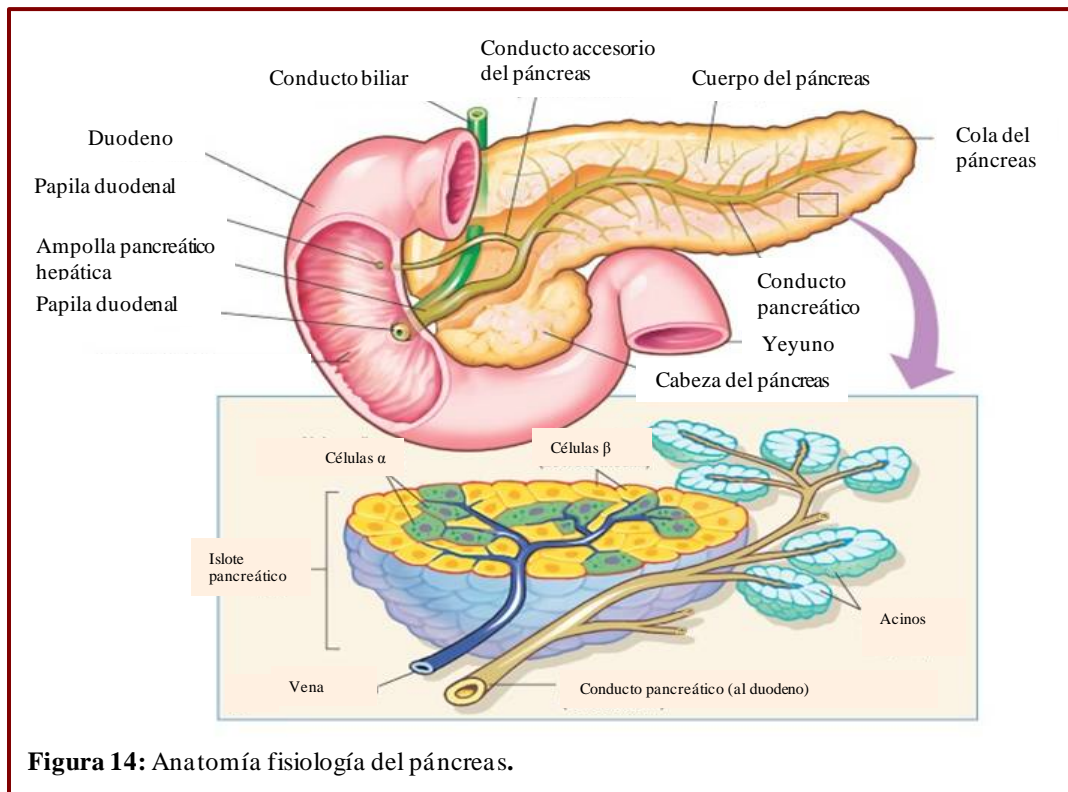
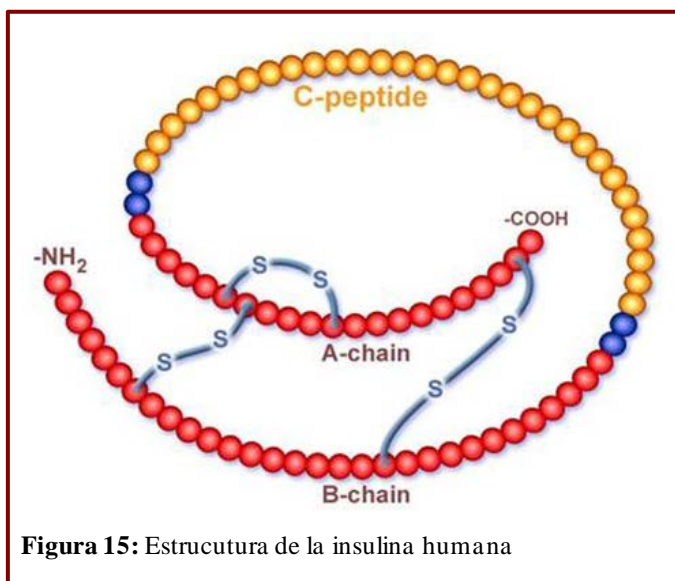


Figura 14: Anatomía fisiología del páncreas.

Desde que Banting y Best descubrieron que la administración de insulina mejoraba notablemente la sintomatología del diabético, esta hormona ha sido ampliamente estudiada. En 1928 Wintersteiner estableció que tenía estructura proteica y hasta 1955 no se conoció la estructura primaria de la misma (Sanger; Premio Nobel)^(187, 188), de hecho fue la primera proteína de la que se determinó su secuencia de aminoácidos. Está formada por dos cadenas de aminoácidos (A y B) de 21 y 30 residuos aminoacídicos unidas por dos puentes disulfuro. (Figura 15).

La insulina se sintetiza como precursor, preproinsulina (peso molecular: 11500 Da), en el retículo endoplásmico rugoso. Este precursor es transportado al aparato de Golgi, donde sufre modificaciones postransduccionales en forma de escisiones proteolíticas a proinsulina (peso molecular: 9000 Da) y posteriormente a insulina (peso molecular: 5080 Da) y péptido C. Estos se almacenan en gránulos en las células β y se cosecretan por exocitosis en cantidades equimoleculares de ambos, aunque también su liberación está regulada por otros sustratos (ácidos grasos libres o cuerpos cetónicos), factores hormonales y químicos.

Cuando comenzó a usarse en terapéutica la hormona insulínica procedía de animales, al principio de ganado bovino (ya que era ésta la que tenía una acción más duradera) y



posteriormente la insulina porcina. A partir de 1979, y gracias a las técnicas de ADN recombinante fue posible producir insulina humana en *Escherichia coli*⁽¹⁸⁹⁾, y unos años más tarde la insulina humana también se había logrado por conversión de la insulina porcina o por biosíntesis en *Saccharomyces cerevisiae*. En la actualidad la insulina puede sintetizarse por mutación de genes,

tanto de *E. coli* como de *S. cerevisiae*, lo que facilita nuevos estudios de esta molécula, tanto estructurales como funcionales.

Con el descubrimiento de la insulina cambió radicalmente el pronóstico de los pacientes diabéticos, ya que de estar destinados a morir en un breve intervalo de tiempo pasaron a vivir de manera normal, aunque pronto se llegó a la conclusión de que la insulina no era la curación sino un mero sustituto que evitaba la muerte, aunque no los efectos secundarios que se producían a largo plazo.

2. COMPLICACIONES DE LA DIABETES MELLITUS.

El principal problema que plantea la diabetes no es la administración de insulina o de antidiabéticos orales, sino sus complicaciones a largo plazo. Estas complicaciones afectan a diferentes órganos, al metabolismo de glúcidos, lípidos y prótidos, así como a diversos sistemas de neurotransmisión originando cuadros patológicos de gran importancia.

La complicación más frecuente en la diabetes es a nivel del sistema nervioso, estimándose que alrededor del 40% de los diabéticos presentan algún tipo de alteración neuropática en el momento del diagnóstico, viéndose afectados tanto nervios sensoriales como motores. Su prevalencia aumenta con el tiempo de evolución de la enfermedad y con la edad del paciente, teniendo varias vías para el desarrollo, tales como la hiperfiltración

glomerular, regulación de la PKC, los productos avanzados de glicosilación final, la activación de la vía de los polioles, el aumento del estrés oxidativo y la regulación de los factores de crecimiento⁽⁹⁵⁾. Esta afección lleva a un encharcamiento del tejido nervioso (debido al funcionamiento erróneo del sistema enzimático de la aldosa-reductasa), que a largo plazo provoca defectos en la transmisión del impulso nervioso. En muchos casos también aparece desmielinización de las fibras nerviosas, que es la causa principal de las neuralgias que sufre el paciente diabético. La neuropatía diabética origina aumento de la respuesta vascular a NA⁽¹⁹⁰⁾ y en la mayoría de los casos una disminución del flujo sanguíneo. Se ha visto que las respuestas de los vasos, donde se ha demostrado histoquímicamente que hay terminaciones nerviosas adrenérgicas, serotoninérgicas y peptidérgicas, están disminuidas, lo que puede generar una alteración del flujo sanguíneo por inervación nerviosa, que pueden contribuir a la patogénesis de la neuropatía diabética^(95, 191, 192). Por otro lado, también existe la evidencia contraria, es decir, que son las alteraciones vasculares subyacentes a la diabetes las que causan el desarrollo de la neuropatía diabética.

Los estudios realizados en ratas diabéticas a nivel del sistema nervioso central han llevado a teorías contrapuestas con respecto al sistema serotoninérgico central^(193, 194). Lackovic y colaboradores, en 1990, demostraron que la cantidad de serotonina sintetizada en cerebro es mayor en ratas diabéticas no tratadas con insulina⁽¹⁹⁵⁾; esta investigación se contrapone con las realizadas por otros autores que afirman que en ratas con hiperglucemia crónica está disminuida la síntesis de este neurotransmisor⁽¹⁹⁶⁾. También, se ha demostrado que en animales con DM inducida hay cambios hormonales, tales como la elevación de la concentración de corticosterona en plasma⁽¹⁹⁷⁾.

Las alteraciones hemáticas y cardiovasculares son la principal causa de morbilidad y mortalidad en personas diabéticas. Las alteraciones hemáticas afectan a casi todas las células sanguíneas. A nivel leucocitario hay una menor actividad mitogénica y fagocitaria, produciéndose a su vez un incremento de la hemólisis. Las proteínas plasmáticas se glucosilan, lo que hace que la sangre sea más viscosa y haya un mayor riesgo de trombos. A nivel plaquetario hay una hiperagregabilidad, con el consiguiente aumento de la liberación de factores intraplaquetarios como tromboxano A2 (TXA2) y 5-HT^(198, 199).

Las alteraciones cardiovasculares se pueden producir a nivel de grandes vasos (macroangiopatías) o de pequeños vasos (microangiopatías). Estudios realizados muestran la existencia de alteraciones a nivel del metabolismo del ácido araquidónico y modificaciones en la permeabilidad y sensibilidad que pueden contribuir a estas alteraciones vasculares (90, 200, 201). También en la diabetes se ven modificaciones a las respuestas contráctiles, por estimulación eléctrica y a la administración de agentes vasoconstrictores exógenos, aunque en estos casos las respuestas son contradictorias ya que hay autores que hablan de un aumento de la respuesta vasoconstrictora a agentes exógenos^(202, 203) y otros proponen que estas respuestas están atenuadas^(204, 205).

Entre las microangiopatías más frecuentes está la nefropatía diabética, que se manifiesta claramente por glomeruloesclerosis que evoluciona siempre hacia insuficiencia renal. La diabetes es la responsable de un 30% de las insuficiencias renales graves que necesitan tratamiento con diálisis y de un 16% de los trasplantes de riñón.

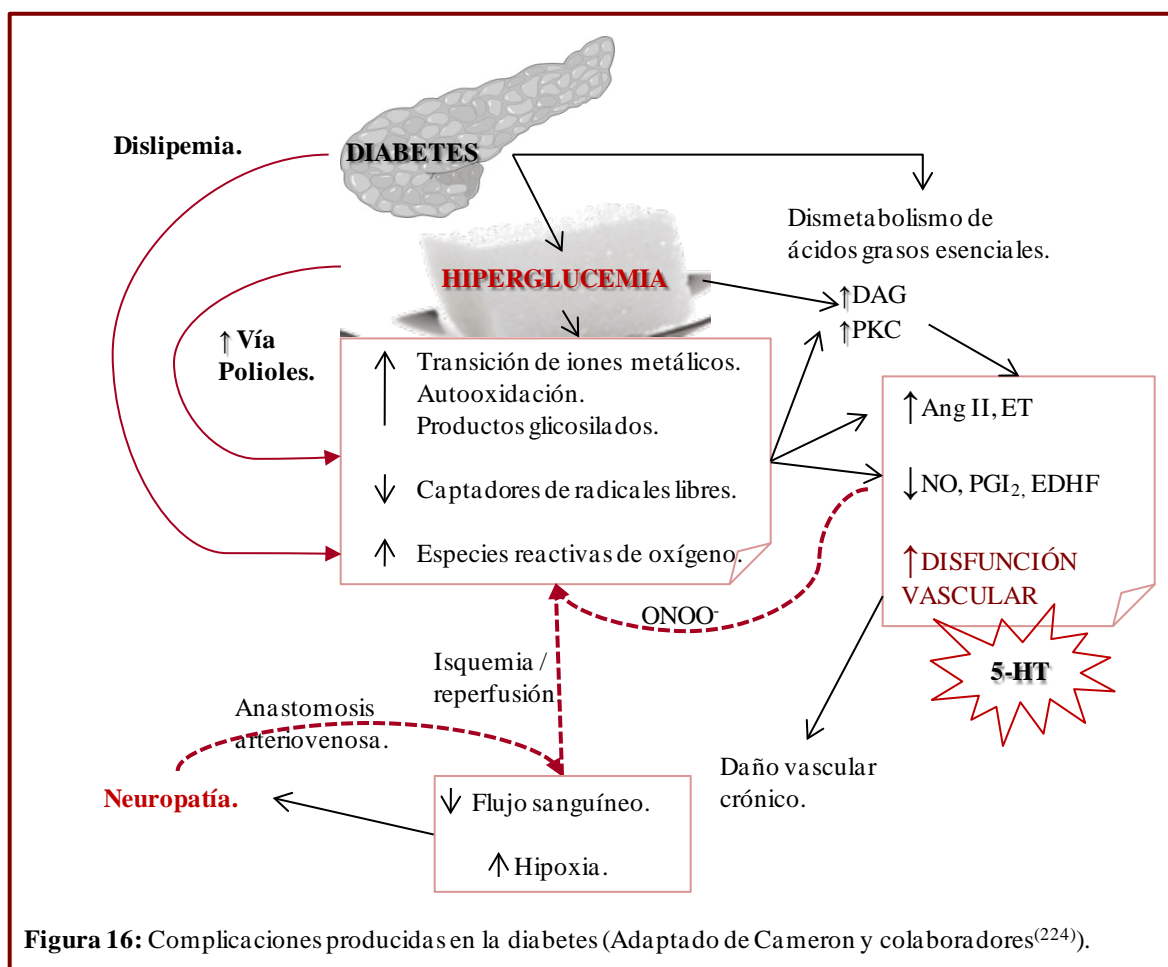
La evolución del riñón hacia la nefropatía diabética se manifiesta clínicamente por microalbuminuria, seguida de proteinuria y de uremia que culminan en la insuficiencia renal terminal. La aparición de proteinuria está precedida normalmente de diversas modificaciones funcionales como la hiperfiltración glomerular, la vasodilatación renal y el aumento de la permeabilidad capilar a macromoléculas. Todo ello se acompaña de cambios estructurales que incluyen un aumento del espesor de la membrana basal, una hipertrofia glomerular y una expansión mesangial que conducen, de modo global, a la glomeruloesclerosis y a la fibrosis intersticial. Existen factores metabólicos (hiperglucemia, glicosilación de proteínas, vía de los polioles), así como factores hormonales (prostaglandinas, glucagón, factor natriurético atrial) que están implicados en las alteraciones de las funciones renales durante la diabetes. Las alteraciones de la hemodinamia intrarrenal, unido a las alteraciones de diferentes vías metabólicas llevan a la expansión del mesangio glomerular y a la glomeruloesclerosis por mecanismos que, a día de hoy, no están completamente elucidados^(206, 207).

Así, en la evolución de la nefropatía diabética el riñón pasa por diferentes estadios: un estadio precoz caracterizado por una hiperfiltración glomerular producida por una reducción de la resistencia vascular intrarrenal y una hipertensión en los capilares glomerulares, seguida de una normalización hemodinámica en la que aparece la microalbuminuria; más tarde

aparece el estadio tardío, en el que se instaura la insuficiencia renal con glomeruloesclerosis y proteinuria, y que, finalmente conlleva la necesidad de diálisis o de trasplante renal. Algunos estudios han demostrado que esta nefropatía se desarrolla más rápidamente, tanto a nivel clínico⁽²⁰⁸⁾ como en animales de experimentación⁽²⁰⁹⁾ cuando, además de la DM existe otra enfermedad concomitante como la hipertensión. En la aparición de este fallo renal se han implicado diversos factores endoteliales, como es el caso del NO⁽²¹⁰⁾ y los prostanoïdes que juegan un papel importante en el mantenimiento de la función renal, homeostasis de los líquidos corporales, y la presión arterial. Los prostanoïdes corticales renales derivados de ciclooxigenasas (COX), concretamente de la COX-2, en particular PGI₂ y PGE₂, juegan un papel crítico en el mantenimiento de la presión arterial y la función renal. Estudios en animales muestran que, en ratas diabéticas por estreptozotocina (STZ), la síntesis renal de PGE₂, PGI₂, y tromboxano B₂ (TXB₂) está incrementada^(211, 212). La expresión de COX-2 también se encuentra incrementada en la rama ascendente gruesa y mácula densa, tanto en animales diabéticos tipo 1 por STZ como en ratas diabéticas Zucker tipo II⁽²¹³⁻²¹⁵⁾, o en riñones de pacientes diabéticos⁽²¹⁶⁾.

Las macroangiopatías que más frecuentemente se producen en la diabetes son hipertensión arterial, hiperlipemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hiperlipemia combinada y arterioesclerosis (Figura 16).

Uno de los factores críticos y, muchas veces responsable del inicio del desarrollo de las enfermedades vasculares en el diabético, es el endotelio, más concretamente, la pérdida de su capacidad reguladora en los vasos. La vasodilatación endotelio dependiente, en la diabetes, está alterada. Estas modificaciones se muestran particularmente en la fase tardía de esta enfermedad, tanto en rata diabética⁽²¹⁷⁻²¹⁹⁾ como en el hombre⁽²²⁰⁻²²³⁾. La cantidad de NO disponible es un factor de riesgo común con la propia hiperglucemia producida por la diabetes u otras alteraciones metabólicas. La glucosilación de proteínas y la sobreexpresión de nicotinadenosindifosfato oxidasa (NADPH) en las células musculares lisas o endoteliales aumentan el estrés oxidativo en los vasos sanguíneos y llevan a una degradación de óxido nítrico⁽²²⁴⁻²²⁶⁾.



Existen estudios que han demostrado que realmente hay alteraciones a nivel de la vasodilatación producida por el endotelio. De esta forma Pieper y colaboradores en 1998 mostraron que la relajación producida por el óxido nítrico estaba disminuida en la DM, lo que les llevó a sugerir que este déficit se reparaba con la administración de L-arginina, un precursor del NO, lo que lleva a plantear una posible asociación entre el desarrollo de la enfermedad y el déficit de NO⁽²²⁷⁾. De hecho la enzima eNOS se “desacopla” en condiciones de hiperglucemia, lo que quiere decir que la enzima tiende a producir más anión superóxido que NO⁽²²⁸⁻²³⁰⁾. Otros estudios sugieren que, probablemente, el responsable principal de este comportamiento del enzima es el cofactor de la óxido nítrico sintasa, la tetrahidrobiopterina^(224, 231). Otros autores señalan modificaciones en los niveles de endotelina 1 en diabetes experimental^(199, 232).

Por el contrario, en la fase precoz de la diabetes el NO parece estar implicado en la hiperfiltración glomerular, y de hecho ha sido demostrado que la excreción urinaria de nitritos

y nitratos está aumentada⁽²³³⁾, la hiperfiltración glomerular es inhibida por un inhibidor de la NOS^(233, 234) y la expresión de la NOS está aumentada a nivel glomerular en rata diabética^(235, 236). Estos resultados sugieren que el NO, cualquiera que sea su origen, puede jugar un papel importante en la hiperfiltración glomerular que se produce en la fase precoz de la diabetes. Otros estudios también muestran un incremento, a nivel de diversas arterias, en rata diabética, de los factores vasoconstrictores derivados de endotelio (EDCF), como son los prostanoïdes^(237, 238).

Los prostanoïdes derivados de la COX juegan un papel crítico en la modulación del flujo sanguíneo renal y la tasa de filtración glomerular⁽²¹²⁾. En condiciones normales, los prostanoïdes parecen ejercer poca influencia sobre el flujo sanguíneo renal y la tasa de filtración glomerular⁽²¹²⁾. Sin embargo, bajo ciertas condiciones fisiopatológicas, particularmente en estados asociados con la disminución del volumen sanguíneo arterial efectivo, como la insuficiencia cardíaca congestiva, síndrome nefrítico y diabetes, el mantenimiento de la función renal normal se vuelve dependiente de prostanoïdes^(212, 239-241). Se ha demostrado que la hiperglucemia y el estrés oxidativo aumentan la expresión de COX-2 (inducible) en células endoteliales en cultivo y que, por tanto, aumentan también la liberación de TXA2.

Angulo y colaboradores ya en 1998, demostraron una importante relación entre las alteraciones endoteliales y las metabólicas en ratas diabéticas por STZ, en las cuales, el grado de hiperglucemia se manipuló por la administración subcutánea de insulina⁽²⁴²⁾. En este sentido, Pieper y colaboradores^(227, 243) realizaron estudios que llevaron a la conclusión de que la defectuosa relajación dependiente de endotelio que había en ratas mantenidas hiperglucémicas durante doce semanas, volvía a la normalidad después de cuatro semanas de haberles hecho un trasplante pancreático.

III. DEPRESIÓN, DIABETES, SISTEMA CARDIOVASCULAR Y 5-HIDROXITRIPTAMINA.

El trastorno depresivo se ha estudiado ampliamente y se han generado diversas teorías sobre su etiología. Así, desde el punto de vista biológico una de las teorías es la hipótesis monoaminérgica, que explica la depresión como un trastorno que se produce por un déficit de neurotransmisores monoaminérgicos, entre otros, de serotonina con lo que se produce una disminución de la neurotransmisión, con producción de los síntomas depresivos. Otra hipótesis es la de la desregulación de los receptores, que parece ser la que más se acerca a la realidad. Ésta defiende que debido al agotamiento de neurotransmisores, se produce un aumento de receptores postsinápticos y es esta situación y las alteraciones que provoca en la neurona postsináptica la que produce el mal funcionamiento de sistemas, como el serotoninérgico entre otros y los síntomas depresivos ⁽²⁴⁴⁾.

Como ya hemos indicado anteriormente la serotonina ejerce una importante influencia en el estado de ánimo, conducta, movimiento, apreciación del dolor, actividad sexual, apetito, secreciones endocrinas, funciones cardiacas y el ciclo de sueño-vigilia. Como neurotransmisor se encuentra implicada en la fisiopatología y tratamiento de la depresión desde el descubrimiento de los fármacos antidepresivos en los años 50⁽²⁴⁵⁾. La participación de los receptores serotoninérgicos en los efectos antidepresivos de los ISRS es compleja e implica la estimulación y bloqueo de los diferentes subtipos de receptores de 5-HT⁽⁴⁴⁾.

Considerando la naturaleza compleja del sistema serotoninérgico y la interacción con otros sistemas neuroquímicos, muchos mecanismos pueden desempeñar un papel en el desarrollo de la depresión. Actualmente los mecanismos sugeridos incluyen una baja producción neuronal de serotonina o expresión de receptores postsinápticos, una reducción de la estimulación o una excesiva autoinhibición. Independientemente de los mecanismos exactos, la depresión es atribuible al menos en parte, a la transmisión anormal de serotonina a nivel central, por lo tanto, los agentes que modulen la transmisión serotoninérgica en el cerebro pueden ser eficaces como antidepresivos⁽²⁴⁵⁾.

La implicación de 5-HT en la depresión es ampliamente aceptada y, cada vez, resulta más evidente la relación entre 5-HT y diabetes, ya que durante el desarrollo de esta patología se han descrito cambios en los niveles plasmáticos de triptófano, en el recambio de 5-HT y modificaciones en la liberación de 5-HT⁽²⁴⁶⁾.

A su vez, la depresión, es frecuente en pacientes diabéticos, estando presentes los trastornos depresivos mayores en el 15-20 % de pacientes con diabetes tipo 1 ó tipo 2^(247, 248). Los datos actuales indican que la prevalencia de la depresión en situación de diabetes alcanza cifras del 24-29%, que la depresión no tratada en diabéticos agrava sus complicaciones⁽²⁴⁹⁾ y que la presencia de la depresión tiene un efecto negativo en la regulación de la glucosa^(250, 251), estando asociada además a un claro incremento del riesgo de complicaciones micro y macrovasculares^(252, 253) y a su vez a un control errático de los niveles de glucosa en sangre⁽²⁵⁴⁾.

Estudios clínicos revelan que los ISRS como fluoxetina, son mejores antidepresivos para pacientes diabéticos que otros fármacos antidepresivos del grupo de los tricíclicos (ADT) proponiéndose para los ISRS, ciertos efectos beneficiosos del tratamiento en el control de la glucemia. Aunque algunos estudios preclínicos muestran resultados dispares dentro de los ISRS, Gómez y colaboradores en 2001 mostraron que la sertralina aumenta la secreción de insulina estimulada por glucosa sin ningún cambio en la sensibilidad periférica a la insulina⁽²⁵⁵⁾. No obstante, hasta el momento, la eficacia de los antidepresivos en pacientes diabéticos requiere de más estudios⁽⁷³⁾.

En 2003, Herrera y colaboradores publicaron un estudio, donde la fracción libre de triptófano está reducida en niños con diabetes tipo 1 y, postulan que las deficiencias de serotonina centrales pueden ser responsable del aumento de la incidencia de desórdenes neurosiquiátricos en niños con diabetes tipo 1⁽⁸²⁾.

En la Diabetes Mellitus las tasas plasmáticas de 5-HT están aumentadas⁽²⁵⁶⁻²⁵⁸⁾, debido a que hay un aumento de la agregabilidad plaquetaria, siendo estas plaquetas la principal fuente de serotonina a nivel periférico⁽²⁵⁹⁻²⁶¹⁾, que durante la agregación liberan de forma masiva 5-HT. La activación serotoninérgica en los pacientes diabéticos se confirma porque se dobla la cantidad de ácido 5-hidroxiindolacético, principal metabolito de 5-HT, que se excreta urinariamente. Recientemente hay evidencias que muestran la implicación de la serotonina en

la regulación de la glucosa⁽⁷³⁾. Además, la 5-HT estimula la captación de glucosa y regula la actividad fosfofructocinasa (PFK) a través del receptor 5-HT_{2A}, lo que da lugar a una fosforilación de un residuo de tirosina de la PFK y la redistribución intracelular de la PFK dentro del músculo esquelético⁽²⁶²⁾. Otros autores⁽¹⁹⁴⁾ muestran que la diabetes crónica en ratas se asocia con una disminución en la concentración cerebral de 5-HT y con un incremento en el número de receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₂ en cerebro.

Existe, como terminamos de mencionar, una estrecha relación entre el sistema cardiovascular y serotonina. A su vez en la diabetes se originan complicaciones cardiovasculares importantes, entre las cuales destaca la hipertensión arterial, que tiene una incidencia y prevalencia mucho mayor en individuos con hiperglucemia crónica. Muchos estudios se han interesado por el posible papel de la serotonina en la fisiopatología de las complicaciones de la diabetes. De hecho esta enfermedad se ha asociado a modificaciones i) en las concentraciones de 5-HT y de la agregación plaquetaria^(258, 261) ii) en la población de receptores serotoninérgicos^(194, 263) y iii) en las respuestas vasculares inducidas por serotonina en diferentes vasos sanguíneos y su regulación endotelial⁽²⁶⁴⁾.

Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación han podido demostrar que 5-HT y determinados mecanismos serotoninérgicos afectan a la transmisión simpática y parasimpática, en ratas desmeduladas y que la existencia de diabetes experimental inducida en ratas con aloxano y mantenida durante cuatro u ocho semanas, genera cambios significativos en la modulación que 5-hidroxitriptamina y determinados mecanismos serotoninérgicos, ejercen en la neurotransmisión simpática *in vivo*^(89, 130, 137, 155, 163, 164, 166, 265). De igual modo, hemos descrito cambios inducidos por diabetes en determinadas acciones vasculares analizadas en territorios vasculares autoperfundidos (renal, mesentérico y del tren posterior) así como en la expresión de determinados tipos y subtipos de receptores serotoninérgicos^(130-132, 134, 137, 138, 157).

El tratamiento con antidepresivos durante la diabetes, situación de alta prevalencia en la actualidad, puede inducir cambios beneficiosos en la evolución de la enfermedad diabética^(266, 267) y de sus complicaciones. Sin embargo, se desconoce si dicho tratamiento antidepresivo pueden afectar a las acciones vasculares de 5-HT y/o a los mecanismos indirectos implicados en dichas acciones (a través de la liberación de diferentes mediadores

endoteliales), que han sido establecidos por nosotros y otros investigadores durante la diabetes experimental.

Como ya se ha descrito previamente, serotonina ejerce diversas respuestas cardiovasculares, bradicardia y taquicardia, hipotensión e hipertensión, vasodilatación y vasoconstricción y muestra un amplio rango de acciones fisiológicas dado que sus receptores, se encuentran ubicuamente expresados. Todo lo cual muestra la elevada complejidad del sistema serotoninérgico. Los conocimientos actuales sobre tipos y subtipos de receptores serotoninérgicos, así como la mayor disponibilidad de agonistas y antagonistas selectivos, facilitan el estudio de tales sistemas de receptores y permiten un mejor conocimiento de las implicaciones y de los mecanismos de esta amina biógena.

Nuestro grupo de investigación viene desarrollando una línea de trabajo dedicada al estudio de las acciones cardiovasculares de serotonina en ratas, centrándose preferentemente en establecer la participación periférica de esta amina y los posibles mecanismos serotoninérgicos en determinadas funciones cardiovasculares; con el objetivo fundamental de asignar un papel funcional a alguno de los tipos y subtipos de receptores descritos previamente por técnicas no funcionales *in vivo* en ratas normotensas e hipertensas, normoglucémicas e hiperglucémicas, habiéndose puesto de manifiesto hasta el momento, los siguientes aspectos:

1.- Existencia de una interacción entre 5-hidroxitriptamina y mecanismos colinérgicos y adrenérgicos, en ratas desmeduladas normoglucémicas y diabéticas de cuatro y ocho semanas:

- 5-hidroxitriptamina modula la neurotransmisión colinérgica cardíaca, inhibiendo o facilitando la liberación de acetilcolina. Los mecanismos inhibidores implican la activación de receptores 5-HT₂ en ratas normoglucémicas, receptores 5HT_{1D} en ratas diabéticas de 4 semanas y receptores 5-HT₇ en ratas diabéticas de 8 semanas; mientras que los potenciadores corresponden a receptores 5-HT₃ en ratas normoglucémicas y 5HT_{1A} en ratas diabéticas tanto de 4 como de 8 semanas⁽¹⁵⁵⁻¹⁵⁷⁾.

- La existencia de mecanismos serotoninérgicos en la neurotransmisión simpática cardiovascular que actúan inhibiendo o facilitando la liberación de noradrenalina desde las terminaciones nerviosas simpáticas. Los mecanismos inhibidores conllevan la activación de receptores 5-HT_{1D}, mientras que los potenciadores conllevan la activación de receptores 5-HT₃^(89, 163).
- Determinados antagonistas de receptores 5-HT₁/5-HT₂, ejercen efectos inhibidores de la transmisión simpática vascular en ratas, por mecanismos no directamente relacionados con el antagonismo de receptores serotoninérgicos⁽¹⁶⁴⁾.
- Se ha demostrado igualmente un efecto inhibitorio de 5-HT sobre la neurotransmisión simpática cardíaca en ratas desmeduladas normotensas, en el cual participan receptores 5-HT₁ de naturaleza presináptica, siendo el subtipo 5HT_{1B} el más implicado en dicha acción en el caso de roedores⁽⁹⁹⁾.
- Al igual que en ratas normoglucémicas, en ratas diabéticas de cuatro semanas, existen mecanismos serotoninérgicos inhibidores de la neurotransmisión simpática cardiovascular. Sin embargo, la acción serotoninérgica inhibidora mediada por activación de receptores presinápticos 5-HT_{1A} por la vía del NO^(130, 165).
- A diferencia de las ratas diabéticas de cuatro semanas, en ratas diabéticas de 8 semanas hay dos vías implicadas en los mecanismos serotoninérgicos inhibidores de la neurotransmisión simpática cardiovascular: la vía del NO por activación de receptores presinápticos 5-HT_{1A} y productos liberados por activación de la vía de las COX a través de receptores presinápticos 5-HT_{2A}^(166, 265).

2.- Acciones vasculares serotoninérgicas y mecanismos implicados, en territorios vasculares autoperfundidos de rata normoglucémicas y diabéticas de cuatro y ocho semanas:

- En riñón autoperfundido *in situ* de rata normoglucémica, 5-hidroxitriptamina ejerce efectos vasoconstrictores mediados por la activación de receptores 5HT_{2C}, que implican un incremento en la formación de angiotensina II^(137, 138), por una mayor actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA)⁽²⁶⁸⁾.

- En riñón autoperfundido *in situ* de rata hipertensa por N ω -Nitro-L-arginina (L-NAME), 5-hidroxitriptamina ejerce efectos vasoconstrictores mediados por la activación local de los receptores 5-HT_{2A}⁽¹⁴⁵⁾.
- En el riñón autoperfundido *in situ* de ratas diabéticas a largo plazo (ocho semanas), la acción vasoconstrictora de 5-HT está mediada por la activación del receptor 5-HT_{2A} que conduce a la activación de la vía de la ciclooxigenasa, estando sobreexpresada la COX-2⁽¹⁶⁷⁾.
- En el lecho mesentérico autoperfundido *in situ* de rata anestesiada, la administración local de 5-HT induce respuestas vasoconstrictoras provocadas por la activación de receptores 5-HT₂, estando mediadas mayoritariamente por los subtipos 5-HT_{2A/2B}⁽¹³¹⁾.
- En el tren posterior autoperfundido de ratas normotensas, la vasoconstricción serotoninérgica está ligada a la activación de receptores 5-HT_{2A}⁽¹³³⁾, mientras que, en ratas espontáneamente hipertensas, la vasoconstricción esta mediada por los subtipos 5-HT_{2A/2C}⁽¹³²⁾.
- En el tren posterior autoperfundido, serotonina induce también respuestas vasodilatadoras por activación de receptores 5-HT_{1B/1D}⁽¹³³⁾, los cuales llevan a una liberación de adrenalina a nivel de las cápsulas suprarrenales, seguida de una vasodilatación provocada por la activación de receptores β_2 -adrenérgicos⁽¹³⁴⁾.

OBJETIVOS

Siguiendo en esta línea de investigación y trabajando en animales diabéticos con complicaciones micro y macrovasculares que pueden verse agravadas por la coexistencia de depresión, el tratamiento con agentes antidepresivos durante la diabetes, puede inducir cambios en la evolución de la enfermedad y de sus complicaciones.

En este trabajo de Tesis Doctoral se plantea como **objetivo general** determinar el grado de participación de distintos tipos y subtipos de receptores serotoninérgicos y, de mediadores endoteliales, en respuestas cardiovasculares serotoninérgicas que afectan a la neurotransmisión simpática y parasimpática en una situación de hiperglucemia experimental con tratamiento antidepresivo (fluoxetina), donde las manifestaciones vasculares derivadas de la hiperglucemia y fluoxetina podrían a su vez modificar las acciones serotoninérgicas.

Por tanto, los **objetivos específicos** planteados en este trabajo son:

1. Determinar la duración del tiempo de tratamiento con fluoxetina, para establecer un modelo experimental en el que estudiar las implicaciones que 5-HT ejerce a nivel cardiovascular tanto en la neurotransmisión simpática como en la parasimpática.
2. Analizar, en ratas normoglucémicas tratadas con fluoxetina, si se mantiene la influencia serotoninérgica inhibitoria y/o potenciadora de la neurotransmisión adrenérgica y colinérgica nivel periférico vascular.
3. Estudiar, en ratas hiperglucémicas de 4 semanas tratadas con fluoxetina, la influencia que 5-hidroxitriptamina y otros agonistas serotoninérgicos, ejercen sobre respuestas vasculares obtenidas por estimulación simpática total y por administración de noradrenalina exógena, estableciendo la naturaleza de dichas acciones analizando el tipo/s de receptor/es serotoninérgicos implicados.
4. Establecer la participación de mediadores endoteliales u otros mecanismos indirectos en las acciones que serotonina y otros agonistas serotoninérgicos ejercen sobre los efectos presores obtenidos por estimulación simpática total en ratas hiperglucémicas de cuatro semanas tratadas con fluoxetina.

5. Analizar, en ratas diabéticas de cuatro semanas tratadas con fluoxetina, la naturaleza de los mecanismos serotoninérgicos determinando el tipo/s de receptor/es implicados en la neurotransmisión colinérgica, así como su localización pre y/o postsináptica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los experimentos realizados en este trabajo se han desarrollado utilizando ratas procedentes del Animalario de la Universidad de Salamanca (nº Registro P.A.E.-SA001) cumpliendo la normativa vigente para el manejo y utilización de animales de experimentación dispuestas por la Unión Europea (86/609/EEC, Artículo 5, Apéndice II), que ha sido divulgada por la legislación española (R.D. 223/1988 y R.D. 1201/2005) y la Recomendación 2007/526/CE, de 18 de junio de 2007, (Apéndice A del Convenio Europeo sobre la protección de los animales vertebrados utilizados con fines experimentales u otros fines científicos ETS 123).

La elección de esta especie animal se llevó a cabo teniendo en cuenta los siguientes criterios:

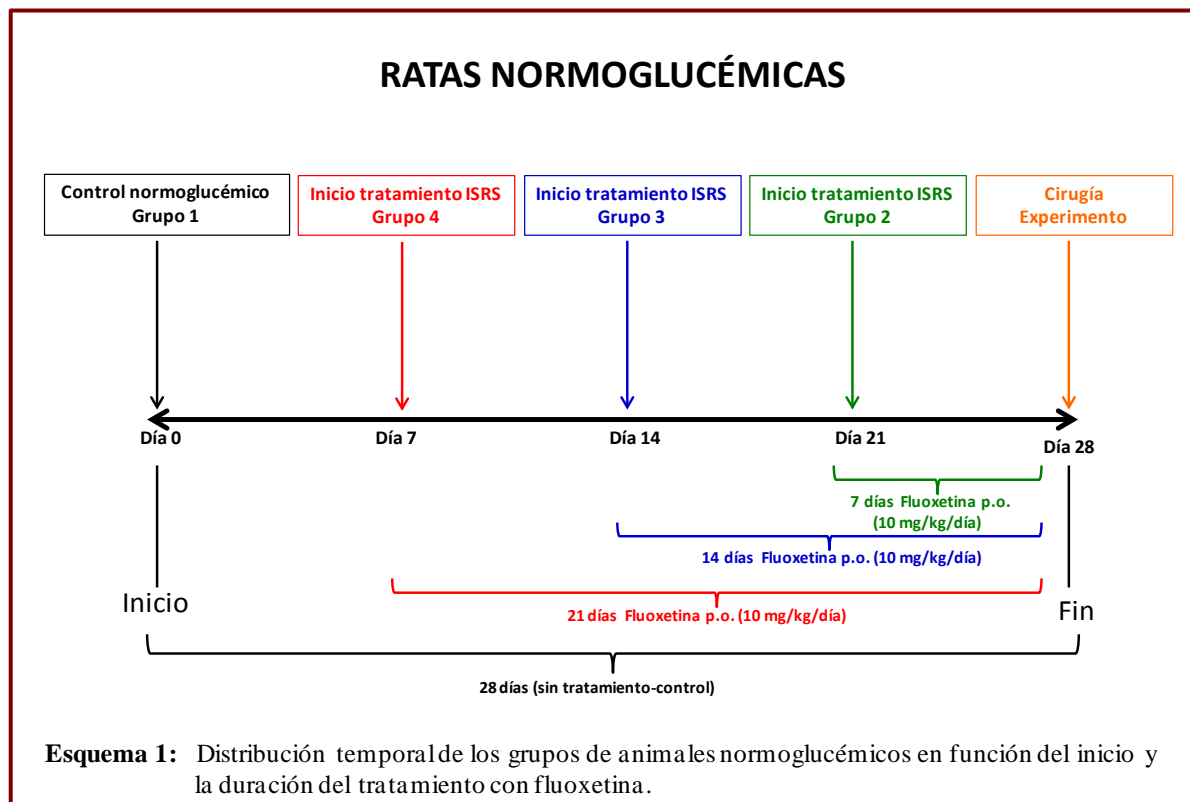
- Amplia similitud de respuesta y comportamiento con la especie humana.
- Estándar en la bibliografía internacional, valores basales de glucemia muy similares a los de la especie humana, oscilando en ambos casos entre 80-120 mg/dl.
- Experiencia del grupo de trabajo.
- Bajo coste.
- Fácil manejo.

I. PREPARACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL.

1. RATAS NORMOGLUCÉMICAS TRATADAS CON FLUOXETINA.

1.1. Tratamiento con fluoxetina.

Se utilizaron ratas Wistar macho de 275 ± 25 g, que fueron tratadas durante 7, 14 ó 21 días con fluoxetina (10 mg/kg/día, p.o.), incorporada en el agua de bebida, siguiendo el proceso desarrollado en el Esquema 1 y utilizando como grupo control animales estabulados durante 28 días. La fluoxetina se prepara diariamente, según el peso corporal de los animales medido cada 7 días⁽²⁶⁹⁾. Los animales se mantuvieron estabulados durante 28 días con agua y comida *ad libitum*.



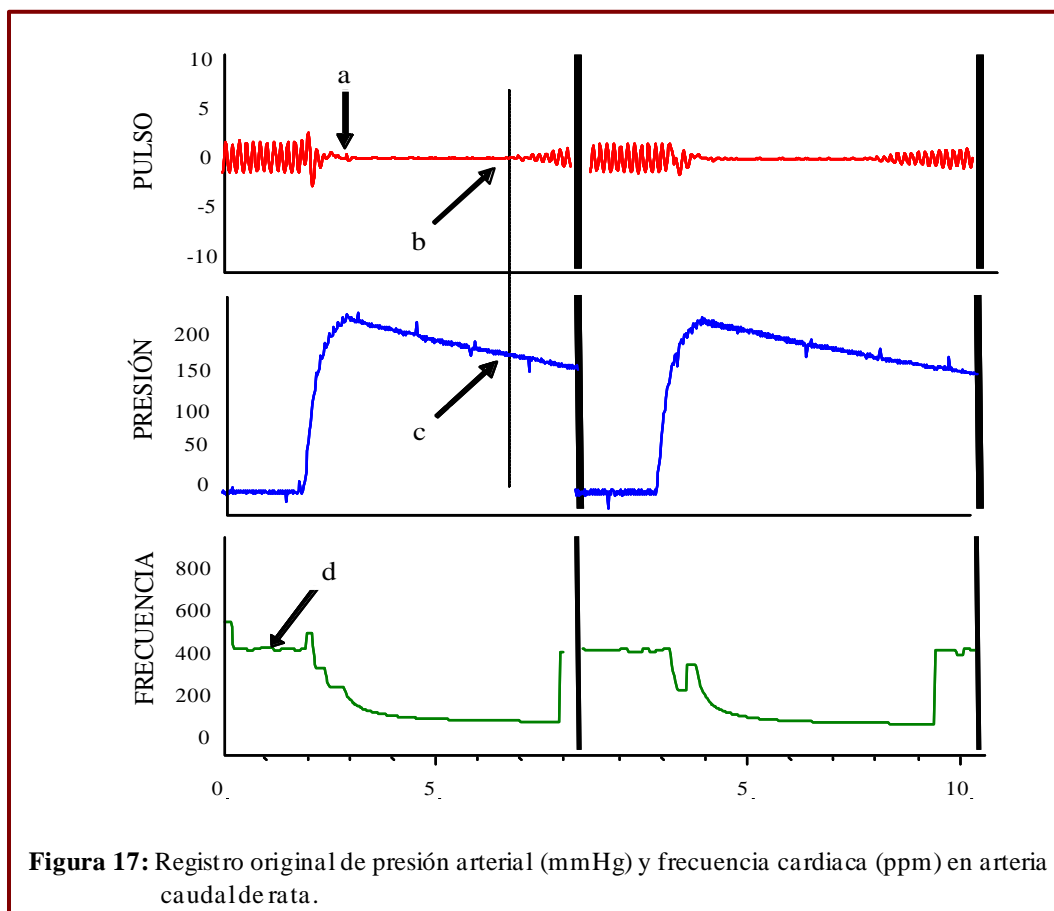
Previamente se hicieron controles de la cantidad de agua que, en similares condiciones, beben al día los animales de ese peso estableciéndose una ingesta media de 42 ml/día.

1.2. Determinación de constantes metabólicas, presión arterial y frecuencia cardiaca.

A tiempo cero, antes y después de cada tratamiento (7, 14 ó 21 días con fluoxetina) los animales se introducen en jaulas de metabolismo durante 3 días, manteniéndolos en la misma habitación con temperatura ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) y fotoperíodo (8 a 20 horas) controlados, comida y agua *ad libitum*. Los dos primeros días permiten el acostumbramiento de los animales y el tercero se determina el consumo de comida, de agua, la producción de orina y heces, así como el peso de los animales, la glucemia, la presión arterial y frecuencia cardiaca. La orina se recoge en un tubo que contiene 100 ml de azida sódica al 0.1% y 1 ml glicerina. Se determinan los valores de electrolitos en orina (Na^+ , K^+ , Cl^-) mediante un analizador automático (Spotchem EL SE-1520) y de creatinina en sangre mediante un analizador automático (Spotchem EZ SP-4430).

La presión arterial se mide en la arteria caudal, mediante un método incruento, con un equipo NIPREM 546 (Cibertec S.A., España). El fundamento de la medida consiste en comprimir el tejido alrededor de la arteria caudal, mediante un manguito neumático, hasta la oclusión completa de la arteria, un detector de infrarrojos colocado en la cola transforma la señal mecánica en eléctrica que se monitoriza por medio de un ordenador. Según se observa en la Figura 17, la desaparición de la señal (a) permite afirmar que se ha producido la oclusión de la arteria. La disminución controlada de la presión en el manguito neumático se acompaña de la aparición de la onda de pulso en la cola (b). La presión neumática medida en ese punto es igual a la presión arterial sistólica (PAS) en la arteria (c). El registro de la onda pulsátil permite medir simultáneamente la frecuencia cardiaca, en pulsos por minuto (ppm), a partir de este registro (d).

Este método tiene la ventaja de ser simple, reproducible, no traumático y permite trabajar con el animal despierto. Para obtener buenos resultados es conveniente habituar al animal a este tipo de manipulación antes de realizar las medidas definitivas.



Las determinaciones se realizan con los animales despiertos, situándolos en un cepo que deja la cola en libertad. Para captar mejor la señal, se procede a la dilatación de la arteria caudal aplicando calor durante un periodo aproximado de 5 minutos. A continuación se colocan el transductor y el manguito y se procede al registro de la presión arterial tomando como criterio válido la obtención de diez valores seguidos con una variación no superior a 10 mmHg.

Se determina el valor de la PAS, así como la frecuencia cardíaca antes de comenzar el tratamiento y a los 7, 14 y 21 días del tratamiento con fluoxetina.

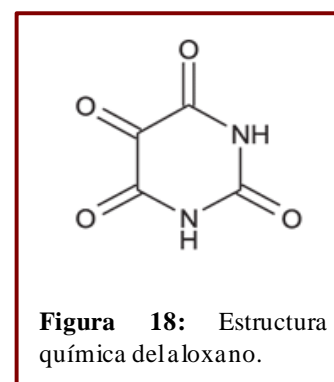
La medición de glucemia se hace por extracción de una gota de sangre de la cola de las ratas y su análisis con las tiras reactivas Accu-Check sensor Comfort Glucose para la determinación de glucosa mediante el aparato Accutrend Sensor (Roche). El test proporciona una medida cuantitativa de la glucemia entre 10 y 600 mg/dl.

2. RATAS HIPERGLUCÉMICAS TRATADAS CON FLUOXETINA.

2.1 Inducción de la diabetes.

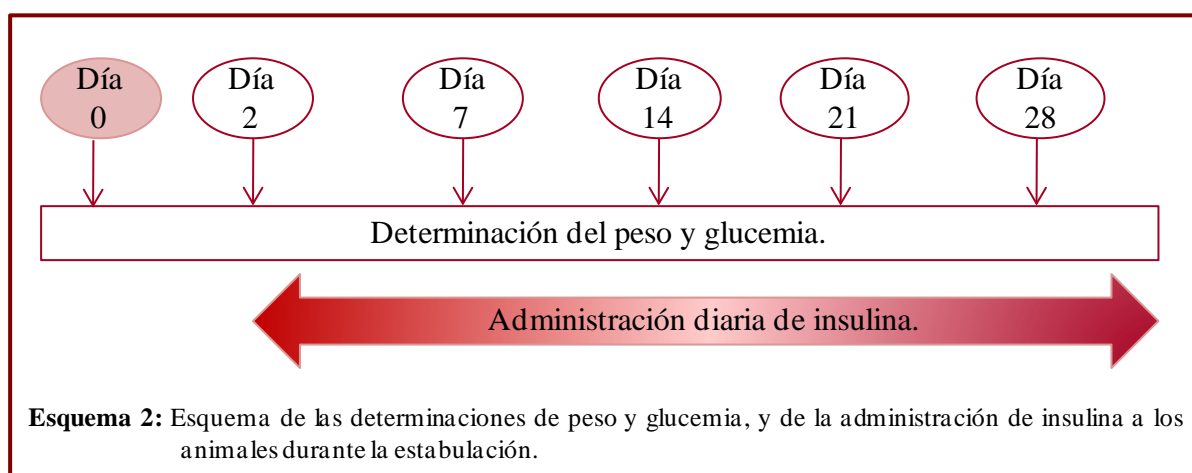
La inducción de la diabetes experimental se realiza en ratas Wistar macho de 275 ± 25 g de peso, a las cuales se administra por vía subcutánea una dosis de aloxano de 150 mg/kg (2,4,5,6-(1H, 3H) pirimidinatetraona; Figura 18), disuelto en NaCl 0,9%. Se destruyen así las células del páncreas y se origina una diabetes experimental extrapolable a la Diabetes Mellitus tipo 1^(90, 130, 157, 165, 166, 193, 259, 270-272).

Previamente a la inyección de aloxano se determina la glucemia basal y el peso corporal de todos los animales a tratar, y posteriormente se va haciendo un seguimiento de los mismos en el tiempo. La primera medida de la glucemia y del peso después de la inyección del aloxano se hace a los dos días para confirmar la aparición de la enfermedad (Esquema 2). La glucemia se realiza por extracción de una gota de sangre de la cola de las ratas y su análisis con las tiras reactivas Accu-Check sensor Comfort Glucose para la determinación de glucosa mediante el aparato Accutrend Sensor (Roche).



El test proporciona una medida cuantitativa de la glucemia entre 10 y 600 mg/dl, considerando a los animales hiperglucémicos cuando los valores son superiores a 200 mg/dl.

Durante los 28 días se realizan mediciones de glucemia y de peso, tal y como se muestra en el Esquema 2, es decir, que periódicamente se confirma que los animales se



mantienen diabéticos, y se retiran del experimento aquellos que no lo son.

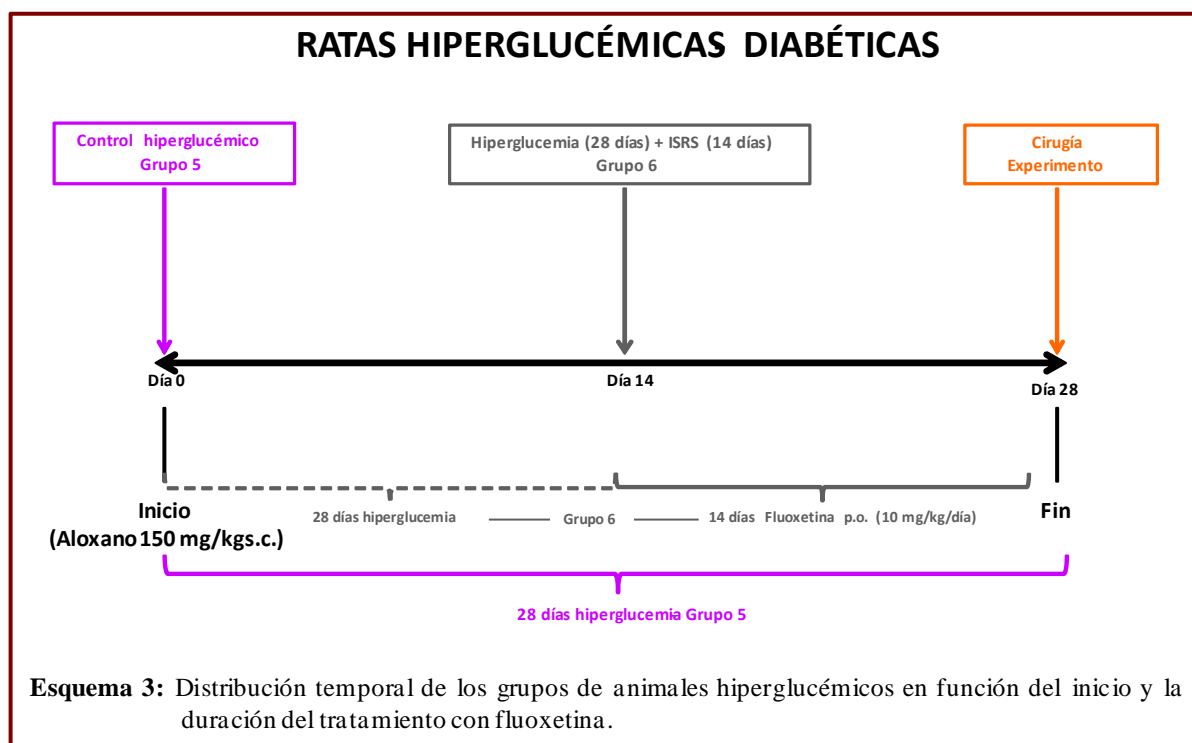
Los animales se mantienen en condiciones controladas y constantes de temperatura, humedad y fotoperiodicidad durante 28 días, en los que disponen de agua y comida a voluntad y se les administra diariamente, por vía subcutánea, insulina Insulatard NPH 100 UI (Novo Nordisk). La dosis administrada varía en función del nivel de glucemia (Tabla 3) y permite mantener al animal diabético, sin que sus valores de glucemia oscilen mucho.

Valores de glucemia (mg/dl)	Insulina (UI)
200-300	1
300-400	2
400-500	3
500-600	4
>600	5

Tabla 3: Dosis de insulina administradas para el mantenimiento de la diabetes.

2.2 Tratamiento con fluoxetina.

El tratamiento con fluoxetina (10 mg/kg/día p.o.), incorporada en el agua de bebida, en animales diabéticos se comienza a los 14 días tras la inducción de la diabetes y se mantiene hasta los 28 días de estabulación, según se indica en el Esquema 3, utilizando como grupo control los animales diabéticos estabulados durante 28 días. La fluoxetina se prepara diariamente, según el peso corporal de los animales medido cada 7 días⁽²⁶⁹⁾. Los animales se mantuvieron estabulados durante 28 días con agua y comida *ad libitum*.



Previamente se hicieron controles de la cantidad de agua que, en similares condiciones, beben al día los animales de ese peso estableciéndose una ingesta media de 84 ml/día.

2.3 Determinación de constantes metabólicas, presión arterial y frecuencia cardiaca.

Tanto en el grupo control hiper glucémico como en el tratado 14 días con fluoxetina se realiza la determinación de constantes metabólicas del forma similar a como se ha descrito para los animales normo glucémicos, utilizando para ello jaulas metabólicas.

II. ESTUDIOS “*IN VIVO*”: RATAS DESMEDULADAS.

Para analizar las implicaciones serotoninérgicas en la neurotransmisión simpática vascular y parasimpática cardíaca todos los experimentos se han realizados trabajando con ratas desmeduladas (pithed).

Este modelo permite controlar, de manera selectiva, acciones de fármacos sobre el sistema nervioso autónomo sin que haya influencia del sistema nervioso central, evitándose así, posibles respuestas reflejas.

Esta técnica ofrece, entre otras, tres posibilidades válidas para el estudio y la puesta a punto de nuevos fármacos y de sus mecanismos de acción:

1. Estudio de la acción propia de los fármacos a nivel cardiovascular, consecuencia de mecanismos simpáticos y parasimpáticos, que dan lugar a variaciones en presión arterial, frecuencia cardíaca, resistencia periférica, etc.
2. Estudio de la modificación que estos fármacos pueden ejercer sobre respuestas previamente inducidas por agentes autonómicos adrenérgicos o colinérgicos.
3. Investigación de respuestas o acciones sobre estimulación nerviosa, simpática o parasimpática, ya sea por estimulación de todo el sistema nervioso autónomo⁽²⁷³⁾ o de tan sólo un segmento determinado de dicho sistema⁽²⁷⁴⁾. Esta última modalidad se aplica preferentemente al estudio de sustancias o fármacos relacionados con el sistema simpático, de manera que previa atropinización del animal se consiguen respuestas presoras por estimulación de todo el sistema simpático^(21, 30, 31), o bien respuestas diferentes en función del segmento espinal que se estimule.

1. ESTIMULACIÓN SIMPÁTICA.

1.1 *Preparación del animal.*

Los animales se anestesian con pentobarbital sódico (60 mg/kg, i.p.), y se colocan en posición decúbito supino en la mesa de operaciones, controlando en todo momento la

temperatura corporal de los mismos mediante una fuente de calor. Se les practica la traqueotomía, se canulan las venas yugulares derecha e izquierda como vías de administración de fármacos y se aísla la arteria carótida izquierda. Seguidamente se conecta la cánula traqueal a una bomba de respiración (1 ml aire/100 g de peso, 50 inspiraciones/min), y se procede a la desmedulación del animal según la técnica descrita por Gillespie y Muir⁽²⁷³⁾ y modificada por nuestro grupo⁽¹⁶³⁾, mediante la inserción de una varilla metálica de 1.5 mm de diámetro, a través del seno orbital y el foramen magnum por todo el cordón espinal hasta la primera vértebra sacra, a una distancia total de aproximadamente 15 cm. De este modo se consigue la destrucción de todo el sistema nervioso central conservando intactos los nervios troncales que salen de él⁽²⁷⁵⁾.

Posteriormente se hepariniza al animal (1000 UI/kg) y se procede a la canulación de la arteria carótida izquierda que se conectará a un transductor de presión acoplado a un amplificador PRS-206 y un cardiotácometro CAR-306, incluidos en un POLIGRAPH-2006 de Leticia, lo que permite controlar durante todo el experimento la presión arterial y la frecuencia cardíaca del animal.

A continuación se procede a la administración, por vía intravenosa, de d-tubocurarina⁽²⁷⁶⁾ (2 mg/kg) para evitar las posibles contracciones musculares provocadas por la estimulación eléctrica. Transcurridos cinco minutos se administra al animal, también por vía intravenosa, atropina⁽⁴⁷⁾ (1 mg/kg) para evitar los posibles efectos colinérgicos. Los animales se mantienen calientes mediante una lámpara de calor (37.5 ± 0.5 °C).

1.2 *Protocolo experimental.*

Una vez estabilizado el animal se procede a la estimulación simpática de todo el flujo espinal, denominada estimulación simpática total, que pretende obtener variaciones de presión arterial en los animales, sin que haya alteraciones de la frecuencia cardíaca^(163, 273, 275). Para esta estimulación se conectan al animal dos electrodos, el electrodo de estimulación, que se coloca sobre la varilla utilizada para la desmedulación y que ha sido introducida en todo el cordón espinal, y el electrodo indiferente o de tierra que se coloca subcutáneamente en la pata del animal, formando así un circuito cerrado. Ambos electrodos, a su vez están conectados a un estimulador Cibertec Stimulation CS-9.

La estimulación simpática se realiza aplicando durante 25 segundos pulsos monofásicos de 1 ms de duración a un voltaje supramaximal que en ratas normoglucémicas fue de 15.0 ± 3.0 V y en ratas diabéticas de 27.5 ± 2.5 V, realizando una batería creciente de frecuencias a 0.1, 0.5, 1.0 y 5.0 Hz en intervalos de 5 minutos, que permite la obtención de una primera curva estimulación-respuesta que denominamos E0. A continuación se realizan tres nuevas curvas E1, E2 y E3 a intervalos de 5 minutos, perfundiendo (mediante una bomba de perfusión modelo Harvard 122) a través de la vena yugular derecha una infusión de suero fisiológico y/o agonistas. En otro grupo de animales se realizan curvas dosis-respuesta por administración de NA exógena (0.01, 0.05, 0.1 y 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) antes (E'0) y durante (E'1, E'2 y E'3) la perfusión intravenosa de solución salina y/o agonistas serotoninérgicos. Los animales se dividen en varios grupos, en función de los agonistas y/o antagonistas administrados.

1.3 *Ratas normoglucémicas tratadas con fluoxetina.*

En estos animales se estudiarán en primer lugar las acciones que serotonina y diferentes agonistas serotoninérgicos ejercen sobre los efectos presores derivados de la estimulación simpática, así como los tipos y/o subtipos de receptores serotoninérgicos implicados.

Los cuatro grupos previamente descritos se dividen en varios subgrupos según los agonistas y/o antagonistas utilizados.

En primer lugar, tras la realización de la curva E0, los animales reciben una perfusión continua de solución salina (1 ml/h), 5-HT o diferentes agonistas serotoninérgicos (5-CT, α -metil-5-HT, 1-fenilbiguanida, 8-OH-DPAT, CGS-12066B, L-694,247, BW723C86 ó MK212), según se indica en las siguientes tablas (4, 5, 6, 7). A los 5 minutos de iniciada la perfusión se realizan tres nuevas curvas (E1, E2 y E3) en idénticas condiciones a las descritas para la curva E0.

- Grupo 1 control (confirmación de resultados previos):

Tratamiento	Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$)	Tipo/Subtipo de receptor activado	Lotes
Solución Salina	1 ml/h	----	1
5-HT	5, 10, 80	5-HT _{1,2,3,4,5,6,7}	2, 3, 4
5-CT⁽²⁷⁷⁾	5	5-HT _{1/7}	5
α-metil-5-HT⁽²⁷⁸⁾	5	5-HT _{2A/2B/2C}	6
1-fenilbiguanida⁽²⁷⁹⁾	5	5-HT ₃	7

Tabla 4: Lotes de animales normoglucémicos que reciben en perfusión diferentes agonistas serotoninérgicos en experimentos de estimulación simpática total.

- Grupo 2 tratamiento durante 7 días con fluoxetina:

Tratamiento	Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$)	Tipo/Subtipo de receptor activado	Lotes
Solución Salina	1 ml/h	----	8
5-HT	5, 10, 80	5-HT _{1,2,3,4,5,6,7}	9, 10, 11
5-CT	5	5-HT _{1/7}	12
α-metil-5-HT	5	5-HT _{2A/2B/2C}	13
1-fenilbiguanida	5	5-HT ₃	14

Tabla 5: Lotes de animales normoglucémicos tratados durante 7 días con fluoxetina, que reciben en perfusión diferentes agonistas serotoninérgicos en experimentos de estimulación simpática total.

- Grupo 3 tratamiento durante 14 días con fluoxetina:

Tratamiento	Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$)	Tipo/Subtipo de receptor activado	Lotes
Solución Salina	1 ml/h	----	15
5-HT	5, 10, 80	5-HT _{1,2,3,4,5,6,7}	16, 17, 18
5-CT	5	5-HT _{1/7}	19
8-OH-DPAT ⁽²⁸⁰⁾	5	5-HT _{1A}	20
CGS-12066B ⁽²⁸¹⁾	5	5-HT _{1B}	21
L-694,247 ⁽²⁸²⁾	5	5-HT _{1D}	22
α-metil-5-HT	5	5-HT _{2A/2B/2C}	23
BW723C86 ⁽²⁸³⁾	5	5-HT _{2B}	24
MK 212 ⁽²⁸⁴⁾	5	5-HT _{2C}	25
1-fenilbiguanida	5	5-HT ₃	26

Tabla 6: Lotes de animales normoglucémicos tratados durante 14 días con fluoxetina, que reciben en perfusión diferentes agonistas serotoninérgicos en experimentos de estimulación simpática total.

- Grupo 4 tratamiento durante 21 días con fluoxetina:

Tratamiento	Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$)	Tipo/Subtipo de receptor activado	Lotes
Solución Salina	1 ml/h	----	27
5-HT	5, 10, 80	5-HT _{1,2,3,4,5,6,7}	28, 29, 30
5-CT	5	5-HT _{1/7}	31
α-metil-5-HT	5	5-HT _{2A/2B/2C}	32
1-fenilbiguanida	5	5-HT ₃	33

Tabla 7: Lotes de animales normoglucémicos tratados durante 21 días con fluoxetina, que reciben en perfusión diferentes agonistas serotoninérgicos en experimentos de estimulación simpática total.

El estudio del subtipo de receptores implicados se realiza en el grupo 3 (animales tratados durante 14 días con fluoxetina), en los que después de la curva estimulación-respuesta E0, los animales reciben, por vía intravenosa, antagonistas serotoninérgicos: WAY-100,635 (0.1 mg/kg), BRL 15527 (1 mg/kg), ritanserina (1 mg/kg), espiperona (0.125 mg/kg) o SB269970 (0.5 mg/kg) realizando una nueva curva control (E0_{antagonista}) 10 minutos después de la administración de cada antagonista. A continuación se perfunden solución salina y agonistas serotoninérgicos, realizándose las tres curvas de estimulación-respuesta (E1, E2 y E3) según se indica en la tabla 8.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Tipo/Subtipo de receptor	Agonista (dosis; $\mu\text{g/kg/min}$)	Lotes
WAY-100,635 ⁽²⁸⁵⁾	0.1	5-HT _{1A}	Solución salina	34
			5-HT (10)	35
BRL 15572 ⁽²⁸⁶⁾	1.0	5-HT _{1D}	Solución salina	36
			5-HT (10)	37
Ritanserina ⁽²⁸⁷⁾	1.0	5-HT _{2A/2B/2C}	Solución salina	38
			5-HT (10)	39
SB 269970 ⁽²⁸⁸⁾	0.5	5-HT ₇	Solución salina	40
			5-HT (10)	41
WAY-100,635 +	0.1	5-HT _{1A}	Solución salina	42
			5-HT (10)	43
BRL 15572	1.0	5-HT _{1D}		
Espiperona ⁽¹⁷⁾	0.125	5-HT _{2A}	Solución salina	44
			α -metil-5-HT (5)	45

Tabla 8: Lotes de animales normoglucémicos tratados con fluoxetina durante 14 días tras administración i.v. de antagonistas serotoninérgicos y su combinación con agonistas en experimentos de estimulación simpática total.

La determinación de la naturaleza de los receptores implicados se realiza en el grupo 3 (animales tratados durante 14 días con fluoxetina), donde los incrementos de presión arterial se inducen por la administración de noradrenalina exógena (0.01, 0.05, 0.1 y 0.5 $\mu\text{g/kg}$, i.v.), obteniéndose curvas dosis-respuesta a NA antes (E'0) y después (E'1, E'2 y E'3) de la

perfusión continua de solución salina (1 ml/h), 5-HT (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$), 5-CT (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) o α -metil-5-HT (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) (Tabla 9).

Tratamiento	Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$)	Tipo/Subtipo de receptor activado	Lote
Solución Salina	1 ml/h	----	46
5-HT	10	5-HT _{1,2,3,4,5,6,7}	47
5-CT	5	5-HT _{1/7}	48
α-metil-5-HT	5	5-HT _{2A/2B/2C}	49

Tabla 9: Lotes de animales normoglucémicos tratados con fluoxetina durante 14 días utilizados en los experimentos con administración de NA exógena.

1.4 Ratas hiperglucémica tratadas con fluoxetina.

En estos animales se estudiarán en primer lugar las acciones que serotonina y diferentes agonistas serotoninérgicos ejercen sobre los efectos presores derivados de la estimulación simpática, así como los tipos y/o subtipos de receptores serotoninérgicos implicados utilizando como modelo animal ratas Wistar diabéticas (28 días) tratadas con fluoxetina durante 14 días.

Los animales hiperglucémicos previamente descritos (grupo 5 y 6) se dividen en varios subgrupos según los agonistas y/o antagonistas utilizados.

En primer lugar, tras la realización de la curva E0, los animales reciben una perfusión continua de solución salina (1 ml/h), 5-HT o diferentes agonistas serotoninérgicos (5-CT, α -metil-5-HT, 1-fenilbiguanida, 8-OH-DPAT, CGS-12066B, L-694,247, BW723C86 ó MK 212), según se indica en las siguientes tablas (10 y 11). A los 5 minutos de iniciada la perfusión se realizan tres nuevas curvas (E1, E2 y E3) en idénticas condiciones a las descritas para la curva E0.

- Grupo 5 hiperglucémico (confirmación de resultados previos):

Tratamiento	Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$)	Tipo/Subtipo de receptor activado	Lotes
Solución Salina	1 ml/h	----	50
5-HT	5, 10, 20, 80	5-HT _{1,2,3,4,5,6,7}	51, 52, 53, 54
5-CT	5	5-HT _{1/7}	55
α-metil-5-HT	5	5-HT ₂	56
1-fenilbiguanida	5	5-HT ₃	57

Tabla 10: Lotes de animales hiperglucémicos que reciben en perfusión diferentes agonistas serotoninérgicos en experimentos de estimulación simpática total.

- Grupo 6 hiperglucémico tratado con fluoxetina durante 14 días:

Tratamiento	Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$)	Tipo/Subtipo de receptor activado	Lotes
Solución Salina	1 ml/h	----	58
5-HT	5, 10, 20, 80	5-HT _{1,2,3,4,5,6,7}	59, 60, 61, 62
5-CT	5	5-HT _{1/7}	63
8-OH-DPAT	5, 10, 20	5-HT _{1A}	64, 65, 66
CGS-12066B	5	5-HT _{1B}	67
L-694,247	5, 10, 20	5-HT _{1D}	68, 69, 70
α-metil-5-HT	5	5-HT _{2A/2B/2C}	71
BW 723C86	5	5-HT _{2B}	72
MK 212	5	5-HT _{2C}	73
1-fenilbiguanida	5	5-HT ₃	74

Tabla 11: Lotes de animales hiperglucémicos tratados durante 14 días con fluoxetina, que reciben en perfusión diferentes agonistas serotoninérgicos en experimentos de estimulación simpática total.

El estudio del subtipo de receptores implicados en las acciones serotoninérgicas en el modelo animal hiperglucémico tratado con fluoxetina (grupo 6) se realiza del siguiente modo: después de la estimulación E0, los animales de estos lotes reciben por vía intravenosa, una dosis de distintos antagonistas serotoninérgicos, WAY-100,635 (100 µg/kg), BRL15572 (1 mg/kg), ritanserina (1 mg/kg), R96544 (1 mg/kg), SB 204742 (1 mg/kg) y RS102221 (1 mg/kg), realizando una nueva curva control (E0_{antagonista}) 10 minutos después de la administración de cada antagonista. A continuación se perfunden solución salina y agonistas serotoninérgicos y se realizan las tres curvas de estimulación-respuesta (E1, E2 y E3) según se indica en la tabla 12.

En un último grupo de animales hiperglucémicos tratados con fluoxetina durante 14 días (lotes 92-95) los incrementos de presión arterial se inducen por la administración exógena de noradrenalina (0.01, 0.05, 0.1 y 0.5 µg/kg, i.v.), obteniéndose curvas dosis-respuesta a NA antes (E'0) y después (E'1, E'2 y E'3) de la perfusión continua de solución salina (1 ml/h), 5-HT (10 µg/kg/min), 5-CT (5 µg/kg/min) o α-metil-5-HT (5 µg/kg/min) (Tabla 13).

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Tipo/Subtipo de receptor	Agonista (dosis; $\mu\text{g/kg/min}$)	Lotes
WAY-100,635	0.1	5-HT _{1A}	Solución salina	75
			5-HT (10)	76
			8-OH-DPAT (5)	77
BRL 15572	1.0	5-HT _{1D}	Solución salina	78
			5-HT (10)	79
			L-694,247 (5)	80
Ritanserina	1.0	5-HT ₂	Solución salina	81
			5-HT (10)	82
			α -metil-5-HT (5)	83
R 96544 ⁽²⁸⁹⁾	1.0	5-HT _{2A}	Solución salina	84
			α -metil-5-HT (5)	85
SB 204741 ⁽¹²²⁾	1.0	5-HT _{2B}	Solución salina	86
			α -metil-5-HT (5)	87
RS 102221 ⁽²⁹⁰⁾	1.0	5-HT _{2C}	Solución salina	88
			α -metil-5-HT (5)	89
WAY-100,635 +	0.1	5-HT _{1A}	Solución salina	90
			BRL 15572	5-HT (10)

Tabla 12: Lotes de animales hiperglucémicos tratados con fluoxetina durante 14 días tras la administración i.v. de antagonistas serotoninérgicos y su combinación con agonistas en experimentos de estimulación simpática total.

Tratamiento	Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$)	Tipo/Subtipo de receptor Activado	Lote
Solución Salina	1 ml/h	----	92
5-HT	10	5-HT _{1,2,3,4,5,6,7}	93
5-CT	5	5-HT _{1/7}	94
α-metil-5-HT	5	5-HT _{2A/2B/2C}	95

Tabla 13: Lotes de animales hiperglucémicos tratados con fluoxetina durante 14 días utilizados en los experimentos con administración de NA exógena.

Los lotes 96-116 de animales hiperglucémicos tratados con fluoxetina durante 14 días fueron destinados a estudiar si la acción derivada de la activación de los receptores correspondía a una acción directa y/o indirecta (Tabla 14).

En los lotes 96-99, tras la curva E0 se administra un inhibidor de la guanilato ciclasa, ODQ (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) realizando su curva control correspondiente a los 10 minutos y perfundiendo posteriormente suero fisiológico (1 ml/h), 5-HT (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$), 8-OH-DPAT (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) o L-694,247 (5 mg/kg/min) y realizando para cada agonista serotoninérgico las tres curvas estimulación-respuesta en las condiciones anteriormente descritas (Tabla 14).

En los lotes 100-104, una vez realizada la curva control para indometacina (2 mg/kg), inhibidor de la ciclooxigenasa, 10 minutos después de su administración por vía intravenosa, se perfunde suero fisiológico (1 ml/h), 5-HT (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$), 8-OH-DPAT (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$), L-694,247 (5 mg/kg/min) o α -metil-5-HT (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) y se realizan las tres curvas estimulación-respuesta (Tabla 14).

En los lotes 105 y 106, tras realizar la curva estimulación respuesta E0 se administra por vía intravenosa L-NAME⁽²⁹¹⁾ (10 mg/kg), inhibidor de la óxido nítrico sintasa (NOS), realizando a los 30 minutos de la administración la curva estimulación-respuesta control (E0_{L-NAME}). A continuación se perfunde suero fisiológico (1 ml/h) y 8-OH-DPAT (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) haciendo en todos los casos tres nuevas curvas estimulación-respuesta (Tabla 14).

A los lotes 107 y 108, después de realizar la curva estimulación respuesta E0 se administra por vía intravenosa L-NAME (10 mg/kg), administrando a los 30 minutos L-Arginina (100 mg/kg), sustrato de la óxido nítrico sintasa, realizando a los 10 minutos de esta última administración la curva estimulación-respuesta control (E0_{L-Arg}). A continuación se administra, suero fisiológico (1 ml/h) u 8-OH-DPAT (5 µg/kg/min) haciendo en ambos casos tres nuevas curvas estimulación-respuesta (Tabla 14).

En los lotes 109-111, una vez realizada la curva control para FR122047 (1.5 mg/kg), inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa 1, 10 minutos después de su administración por vía intravenosa, se perfunde suero fisiológico (1 ml/h), L-694,247 (5 mg/kg/min) o α -metil-5-HT (5 µg/kg/min) y se realizan las tres curvas estimulación-respuesta (Tabla 14).

En los lotes 112-114, una vez realizada la curva control para nimesulida (1.5 mg/kg), inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa 2, 10 minutos después de su administración por vía intravenosa, se perfunde suero fisiológico (1 ml/h), L-694,247 (5 mg/kg/min) o α -metil-5-HT (5 µg/kg/min) y se realizan las tres curvas estimulación-respuesta (Tabla 14).

En los lotes 115 y 116, una vez realizada la curva control para ICI 192,605 (0.5 mg/kg), antagonista de receptores de tromboxano A₂, 10 minutos después de su administración por vía intravenosa, se perfunde suero fisiológico (1 ml/h) o α -metil-5-HT (5 µg/kg/min) y se realizan las tres curvas estimulación-respuesta (Tabla 14).

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Mecanismo de acción	Agonista (dosis; $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$)	Lotes
ODQ ⁽²⁹²⁾	0.01	Inhibidor selectivo de la GC soluble	Solución salina	96
			5-HT (10)	97
			8-OHDPAT (5)	98
			L-694,246 (5)	99
Indometacina ⁽²⁹³⁾	2.0	Inhibidor de la COX	Solución salina	100
			5-HT (10)	101
			8-OH-DPAT (5)	102
			L-694,247 (5)	103
α -metil-5-HT (5)	104			
L-NAME ⁽²⁹¹⁾	10	Inhibidor NOS	Solución salina	105
			8-OH-DPAT (5)	106
L-NAME + L-Arginina ⁽²⁹⁴⁾	10	Inhibidor NOS	Solución salina	107
	100	Sustrato NOS	8-OHDPAT (5)	108
FR 122047 ⁽²⁹⁵⁾	1.5	Inhibidor COX-1	Solución salina	109
			L-694,247 (5)	110
			α -metil-5-HT (5)	111
Nimesulida ⁽²⁹⁶⁾	1.5	Inhibidor COX-2	Solución salina	112
			L-694,247 (5)	113
			α -metil-5-HT (5)	114
ICI 192,605 ⁽²⁹⁷⁾	0.5	Antagonista de receptores de TXA2	Solución salina	115
			α -metil-5-HT (5)	116

Tabla 14: Lotes de animales hiperglucémicos tratados con fluoxetina durante 14 días, que reciben perfusión i.v. de diferentes agonistas serotoninérgicos, en presencia de ODQ, indometacina, L-NAME, L-NAME + L-Arginina, FR122047, nimesulida o ICI 192.605 en experimentos de estimulación simpática total (GC= guanilato ciclasa; COX= Ciclooxigenasa; TXA2= Tromboxano A2; NOS= óxido nítrico sintasa).

2. ESTIMULACIÓN PARASIMPÁTICA.

2.1. *Preparación del animal.*

De manera similar a como se preparan los animales para la estimulación simpática, ya descrita, los animales se anestesian, se demedulan^(155, 273) y se canulan las venas yugulares para la administración de fármacos

Se hepariniza al animal (1000 UI/kg) y se procede a la canulación de la arteria carótida izquierda que se conectará a un transductor de presión acoplado a un amplificador PRS-206 (Cibertec, España) y a su vez conectado a un Power Lab 4/26 (ADInstruments, Reino Unido) que registra la señal del amplificador y la digitaliza para después trabajar con ella en el software LabChart® & Scope™ (ADInstruments, Reino Unido) lo que permite controlar durante todo el experimento la presión arterial y la frecuencia cardíaca del animal.

Ambos nervios vagos son aislados, y se realiza una ligadura a nivel cervical, posteriormente se cortan al nivel de la ligadura, para evitar el reflejo vagal aferente y eferente. La estimulación eléctrica se aplica en forma de pulsos con un estimulador Cibertec CS-9 mediante un electrodo bipolar de platino conectado al nervio vago cervical derecho.

Antes de la estimulación eléctrica se procede a la administración, por vía intravenosa, de d-tubocurarina (2 mg/kg) para evitar las posibles contracciones musculares provocadas por la estimulación eléctrica. Transcurridos 5 minutos se administra al animal, también por vía intravenosa, atenolol⁽⁴⁷⁾ (1 mg/kg) para evitar los posibles efectos simpáticos. Los animales se mantienen calientes ($37.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$) mediante una lámpara de calor.

2.2. *Protocolo experimental.*

Una vez estabilizado el animal se procede a la estimulación colinérgica, que pretende obtener variaciones de frecuencia cardíaca en los animales.

La estimulación colinérgica se realiza aplicando durante 15 segundos pulsos monofásicos de 1 ms de duración a un voltaje supramaximal de $15 \pm 3\text{V}$, realizando una batería creciente de frecuencias a 3, 6 y 9 Hz en intervalos de 5 minutos, que permite la

obtención de una primera curva estimulación-respuesta que denominamos E0. A continuación se realiza una nueva curva E1 a intervalos de 5 minutos, administrando a través de la vena yugular derecha suero fisiológico, agonistas y/o antagonistas serotoninérgicos. Los animales se dividen en varios grupos, en función de los agonistas y/o antagonistas administrados.

2.3. *Ratas normoglucémicas tratadas con fluoxetina.*

En estos animales (lotes 117-127) se estudia la influencia de serotonina y agonistas serotoninérgicos sobre la bradicardia inducida por estimulación vagal en animales normoglucémicos tratados durante 14 días con fluoxetina.

En primer lugar, tras la realización de la curva E0, los animales reciben una administración intravenosa tipo bolus de solución salina (1 ml/kg), 5-HT (10, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) o diferentes dosis de agonistas serotoninérgicos (5-CT, α -metil-5-HT, 1-fenilbiguanida, 8-OH-DPAT, CGS-12066B, L-694,247) según indicado en la tabla 15. Cinco minutos después de la administración se realiza una nueva curva (E1) en idénticas condiciones a las descritas para la curva E0 (Tabla 15).

Tratamiento	Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Tipo/Subtipo de receptor activado	Lotes
Solución Salina	1 ml/kg	----	117
5-HT	10, 50, 100, 200	5-HT _{1,2,3,4,5,6,7}	118,119,120,121
5-CT	10	5-HT _{1/7}	122
8-OH-DPAT	50	5-HT _{1A}	123
CGS-12066B	50	5-HT _{1B}	124
L-694,247	50	5-HT _{1D}	125
α-metil-5-HT	10	5-HT _{2A/2B/2C}	126
1-fenilbiguanida	10	5-HT ₃	127

Tabla 15: Lotes de animales normoglucémicos tratados con fluoxetina durante 14 días que reciben en perfusión diferentes agonistas serotoninérgicos en experimentos de estimulación eléctrica colinérgica.

En los lotes 128-133, los animales reciben por vía intravenosa, distintos antagonistas serotoninérgicos: SB 269970 (0.5 mg/kg), BRL 15572 (1 mg/kg), MDL 72222 (2 mg/kg) solos ($E_{0_{\text{antagonista}}}$) o en presencia del agonista correspondiente, según se indica en la tabla 16 realizando una nueva curva estimulación-respuesta 5 minutos después de la administración i.v. de cada agonista.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Tipo/Subtipo de receptor	Agonista (dosis: $\mu\text{g/kg}$)	Lotes
SB 269970	0.5	5-HT ₇	Solución salina	128
			5-CT (10)	129
BRL 15572	1.0	5-HT _{1D}	Solución salina	130
			L-694,247(50)	131
MDL72222 ⁽²⁹⁸⁾	2.0	5-HT ₃	Solución salina	132
			1-fenilbiguanida (10)	133

Tabla 16: Lotes de animales normoglucémicos tratados con fluoxetina durante 14 días tras administración i.v. de antagonistas serotoninérgicos y su combinación con agonistas en experimentos de estimulación eléctrica colinérgica.

En otro grupo de animales normoglucémicos tratados con fluoxetina durante 14 días (lotes 134-138) la bradicardia se induce por la administración de acetilcolina exógena (1, 5 y 10 $\mu\text{g/kg}$, i.v.), obteniéndose curvas dosis-respuesta a acetilcolina antes (E'_{0}) y después (E'_{1}) de la administración i.v. tipo de bolus de solución salina (1 ml/h), 5-HT (10 y 100 $\mu\text{g/kg}$), 5-CT (10 $\mu\text{g/kg}$) y 1-fenilbiguanida (10 $\mu\text{g/kg}$) (Tabla 17).

Tratamiento	Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Tipo/Subtipo de receptor activado	Lote
Solución Salina	1 ml/kg	----	134
5-HT	10, 200	5-HT _{1,2,3,4,5,6,7}	135, 136
5-CT	10	5-HT _{1/7}	137
1-fenilbiguanida	10	5-HT ₃	138

Tabla 17: Lotes de animales normoglucémicos tratados durante 14 días con fluoxetina, que reciben perfusión i.v. de agonistas serotoninérgicos en presencia de Ach exógena.

2.4. *Ratas hiperglucémicas tratadas con fluoxetina.*

En estos animales se estudia la influencia de serotonina y agonistas serotoninérgicos sobre la bradicardia inducida por estimulación colinérgica en animales hiperglucémicos tratados durante 14 días con fluoxetina

En primer lugar, tras la realización de la curva E0, los animales reciben una administración intravenosa tipo bolus de solución salina (1 ml/kg), 5-HT (10, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) o diferentes dosis de agonistas serotoninérgicos (5-CT, α -metil-5-HT, 1-fenilbiguanida, 8-OH-DPAT, CGS-12066B, L-694,247). 5 minutos después de la administración se realiza una nueva curva (E1) en idénticas condiciones a las descritas para la curva E0 (Tabla 18).

Tratamiento	Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Tipo/Subtipo de receptor activado	Lotes
Solución Salina	1 ml/kg	----	139
5-HT	10, 50, 100, 200	5-HT _{1,2,3,4,5,6,7}	140, 141, 142, 143
5-CT	10, 100	5-HT _{1/7}	144, 145
8-OH-DPAT	50	5-HT _{1A}	146
CGS-12066B	50	5-HT _{1B}	147
L-694,247	50	5-HT _{1D}	148
α-metil-5-HT	10, 100	5-HT _{2A/2B/2C}	149, 150
1-fenilbiguanida	10, 100	5-HT ₃	151, 152

Tabla 18: Lotes de animales hiperglucémicos tratados con fluoxetina durante 14 días tras administración i.v. de diferentes agonistas serotoninérgicos en experimentos de estimulación eléctrica colinérgica.

En los lotes 153-157, los animales reciben por vía intravenosa, distintos antagonistas serotoninérgicos: SB 269970 (0.5 mg/kg) o BRL 15572 (1 mg/kg) solos ($E_{0\text{antagonista}}$) o en presencia del agonista correspondiente, según se indica en la tabla 19 realizando una nueva curva estimulación-respuesta 5 minutos después de la administración de cada agonista.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Tipo/Subtipo de receptor	Agonista (dosis: $\mu\text{g}/\text{kg}$)	Lotes
SB 269970	0.5	5-HT ₇	Solución salina	153
			5-CT (10, 100)	154, 155
BRL 15572	1.0	5-HT _{1D}	Solución salina	156
			L-694,247 (50)	157

Tabla 19: Lotes de animales hiperglucémicos tratados con fluoxetina durante 14 días tras administración i.v. de antagonistas serotoninérgicos y su combinación con agonistas en experimentos de estimulación eléctrica colinérgica.

En otro grupo de animales hiperglucémicos tratados con fluoxetina durante 14 días (lotes 158-162) la bradicardia se induce por la administración de acetilcolina exógena (1, 5 y

10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.), obteniéndose curvas dosis-respuesta a acetilcolina antes (E'0) y después (E'1) de la administración i.v. tipo de bolus de solución salina (1 ml/h), 5-hidroxitriptamina (10 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) o 5-CT (10 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Tratamiento	Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Tipo/Subtipo de receptor activado	Lote
Solución Salina	1 ml/kg	----	158
5-HT	10, 100	5-HT _{1,2,3,4,5,6,7}	159, 160
5-CT	10, 100	5-HT _{1/7}	161, 162

Tabla 20: Lotes de animales hiperglucémicos tratados 14 días con fluoxetina, que reciben perfusión i.v. de agonistas serotoninérgicos en presencia de Ach exógena.

III. FÁRMACOS UTILIZADOS.

Los fármacos utilizados fueron los siguientes:

- Pentobarbital sódico (Sigma).
- Heparina sódica (Roche).
- Clorhidrato de d-tubocurarina (Sigma).
- Sulfato de atropina (Scharlau).
- Atenolol (Sigma).
- Insulina Humulina NPH (Lilly).
- Clorhidrato de fluoxetina (Normon).
- Sulfato de serotonina-creatinina (5-HT; Sigma).
- Maleato de 5-carboxamidotriptamina (5-CT; Sigma).
- Bromhidrato de 8-hidroxi-dipropilaminotetralina (8-OH-DPAT; RBI).
- Dimaleato de 7-trifluorometil-4-(4-metil-1-piperazinil)pirrolo[1,2-a]-quinoxalina (CGS-12066B; RBI).
- 2-[5-[3-(4-metilsulfonilamino)benzil-1,2,4-oxadiazol-5-il]-1H-indol-3-il]etanamina (L-694,247; RBI).
- Maleato de α -metil-5-hidroxitriptamina (α -metil-5-HT; RBI).
- Clorhidrato de α -metil-5-(2-tienilmetoxi)-1H-indol-3-etanamina (BW 723C86, Tocris).
- Clorhidrato de 6-cloro-2-(1-piperazinil)pirazina (MK 212, Tocris).
- Clorhidrato de 1-fenilbiguanida (RBI).
- Diclorhidrato de (S)-N-terbutil-3-(4-(2-metoxifenil)-piperazin-1-il)-2-fenilpropanamida (WAY-100,635; Tocris).
- Clorhidrato 3-[4-(4-clorofenil)piperazin-1-il]-1,1-difenil-2-propanol (BRL 15572, Tocris).
- 6-[2-[4-[bis(4-fluorofenil)metileno]-1-piperidinil]etil]-7-metil-5H-tiazolo[2,3a]pirimidin-5-ona (ritanserina, Tocris).
- Clorhidrato de 8-[4-(4-fluorofenil)-4-oxobutil]-1-fenil-1,3,8-triazaspiro[4,5]decan-4-ona (espiperona, Tocris).
- Clorhidrato de (2R,4R)-5-[2-[2-[2-(3-metoxifenil)etil]]fenoxi]etil]-1-metil-3-pirrolidinol (R-96544, Tocris).
- N-(1-metil-1H-indol-5il)-N'-(3-metil-5-isotiazolil) urea (SB 204741, Tocris).
- Clorhidrato 8-[5-(2,4-dimetoxi-5-(4-trifluorometilfenilsulfonamida)fenil-5-oxopentil]-1,3,8-triazaspiro [4,5] decana-2,4-diona (RS 102221, Tocris).
- Tropanil-3,5-diclorobenzoato (MDL 72222, Tocris).
- Mesilato de metiotepina (Sigma).
- Clorhidrato de (2R)-1-[(3-hidroxiifenil)sulfonil]-2-[2-(4-metil-1-piperidinil)etil]pirrolidina (SB 269970, Tocris).
- Clorhidrato N^G-nitro-L-arginina metilester (L-NAME, Tocris).
- L-arginina (Tocris).
- 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ, Tocris).
- 1-(4-clorobenzoil)-5-metoxi-2-metil-1H-indol (indometacina, Tocris).

- Clorhidrato de 1-[[4,5-bis(4-metoxifenil)-2-tiazolil]carbonil]-4-metilpiperazina (FR 122047, Tocris).
- N-(4-nitro-2-fenoxifenil) metanesulfonamida (nimesulida, Tocris).
- Ácido 4-(Z)-6-(2-o-clorofenil-4-o-hidroxfenil-1,3-dioxan-cis-5-il)hexenoico (ICI 192,605, Tocris).

Todos los fármacos utilizados fueron disueltos en agua destilada al mismo tiempo que los experimentos, con las excepciones de: L-694,247 en HCl 0.01 M, BRL15572 en propilenglicol 20%, ritanserina en ácido láctico 0.04 M, RS102221, SB204741, BW723C86, ODQ y nimesulida disueltos en etanol 50% y espiperona e ICI 192,605 disueltos en dimetil sulfóxido.

IV. EXPRESIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.

Las variaciones de presión arterial obtenidas por estimulación eléctrica o por administración exógena de noradrenalina, se expresan como incrementos, en milímetros de mercurio (mm Hg), de la presión arterial media, obtenida antes de la estimulación y en el máximo estabilizado de cada estimulación o administración de NA. La presión arterial media en cada caso se calcula a partir de los valores de presión máxima y mínima (P_{\max} y P_{\min} , respectivamente), de acuerdo con la expresión de Friedman (1981):

$$PAM = P_{\min} + (P_{\max} - P_{\min})/3$$

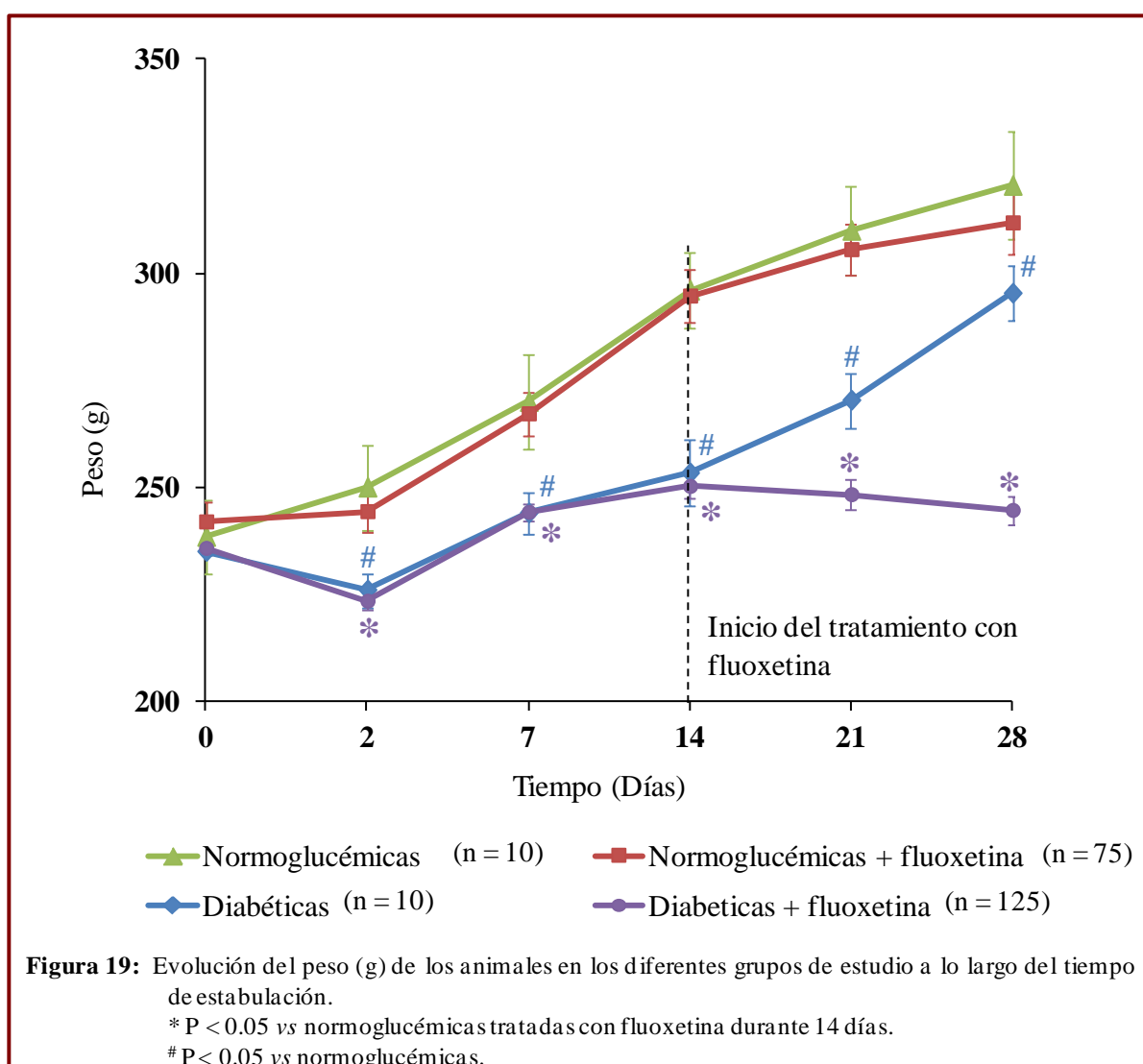
Las variaciones de frecuencia cardiaca obtenidas por estimulación eléctrica o por administración de Ach exógena, se expresan como descensos en ppm (de la FC), obtenidas antes de la estimulación y la máxima bradicardia estabilizada conseguida con cada estimulación o administración de Ach exógena.

Todos los datos representan el valor medio \pm SEM (error estándar de la media) de al menos cinco experimentos; habiéndose determinado en todos los casos la significancia estadística mediante el análisis de la varianza (ANOVA). Las diferencias se consideran significativas cuando $P < 0.05$.

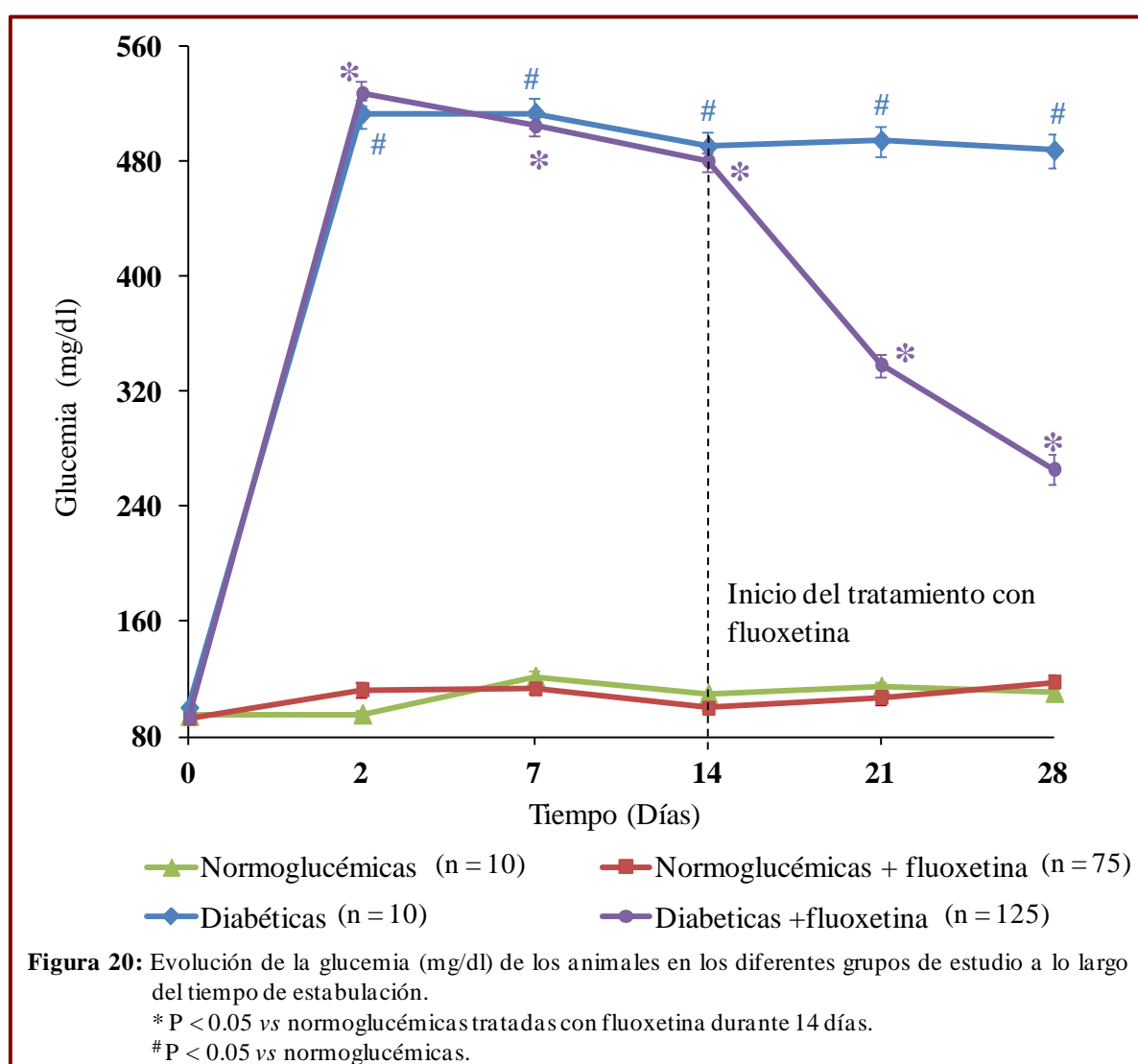
RESVLTADOS

I. VARIABLES HEMODINÁMICAS Y CONSTANTES METABÓLICAS

La administración oral de fluoxetina (10 mg/kg/día) no modificó la evolución del peso en animales normoglucémicos (Figura 19). La inducción de la diabetes originó una pérdida inicial de peso que se recuperó de forma progresiva, sin alcanzar en ningún momento los valores de los animales normoglucémicos. Sin embargo, en los animales diabéticos el tratamiento con fluoxetina originó un cambio en la evolución del peso (Figura 19). Durante los 14 días el peso se mantuvo a diferencia de lo que ocurre en animales diabéticos donde el peso aumentó progresivamente (Figura 19).



Los animales sin tratamiento (grupo control normoglucémico) mantuvieron los valores normales de glucemia durante los 28 días de estabulación (Figura 20), hecho que no se modificó en presencia del tratamiento antidepresivo (14 días con fluoxetina). La administración s.c. de 150 mg/kg de aloxano originó una hiperglucemia (hasta 500 mg/dl) a partir del segundo día, que se mantuvo sin variaciones significativas a lo largo de los 28 días (Figura 20). El tratamiento con fluoxetina produjo una acusada disminución de los valores de glucosa en estos animales. (Figura 20).



Los valores de presión arterial y frecuencia cardiaca no se modificaron con el tratamiento de fluoxetina en ninguno de los dos modelos animales utilizados (Tabla 21).

		Presión arterial (mm Hg)	Frecuencia cardiaca (ppm)
Normoglucémicas + fluoxetina (n=45)	Inicio	128.40 ± 3.93	358.00 ± 13.95
	14 días	126.60 ± 2.06	353.80 ± 11.38
Diabéticas + fluoxetina (n=45)	Inicio	136.36 ± 1.35	305.25 ± 19.59
	14 días	149.85 ± 7.97	247.08 ± 10.63

Tabla 21: Valores de presión arterial (mm Hg) y de frecuencia cardiaca (ppm) de los animales normoglucémicos y diabéticos tratados con fluoxetina durante 14 días. Los resultados se expresan como media ± SEM para el número de animales indicado entre paréntesis.

Los valores del consumo de agua y comida, la producción de heces y orina de los animales normoglucémicos y diabéticos tratados 14 días con fluoxetina se recogen en la tabla 22. En animales diabéticos tratados con fluoxetina se observó un incremento en la toma de agua y producción de orina y una disminución en la producción de heces.

Los valores de creatinina en sangre en los animales hiperglucémicos tratados con fluoxetina se encontraron elevados con respecto a los obtenidos en animales normoglucémicos con el tratamiento con el ISRS, pasando de 0.65 ± 0.05 mg/dl en normoglucémicos con fluoxetina a 0.96 ± 0.10 mg/dl en diabéticas tratadas con fluoxetina (Tabla 22). Los niveles Na^+ y Cl^- muestran diferencias entre ambos grupos. (Tabla 22).

	Peso corporal (g)	Toma de comida (mg/g/día)	Toma de bebida (µl/g/día)	Heces (mg/g/día)	Orina (µl/g/día)
Normoglucémicos + fluoxetina (n=10)	299.40 ± 16.86	69.97 ± 3.9	109.02 ± 11.06	25.13 ± 3.18	23.55 ± 1.40
Diabéticos + fluoxetina (n=10)	255.67 ± 32.46	87.81 ± 10.02	174.48 ± 33.85*	10.47 ± 1.20*	32.22 ± 3.68*
	Glucemia (mg/dl)	Sangre Creatinina (mg/dl)	Na ⁺ (mM)	K ⁺ (mM)	Cl ⁻ (mM)
Normoglucémicos + fluoxetina (n=10)	112.90 ± 5.43	0.65 ± 0.05	40.00 ± 3.00	60.90 ± 4.00	155.50 ± 51.50
Diabéticos + fluoxetina (n=10)	265.85 ± 5.90*	0.96 ± 0.10*	24.17 ± 4.74*	59.93 ± 5.99	120.64 ± 21.64*

Tabla 22: Características de los animales normoglucémicos y diabéticos 14 días después del inicio del tratamiento con fluoxetina. * P < 0.05 vs normoglucémicos tratados con fluoxetina durante 14 días. Los resultados se expresan como media ± SEM para el número de animales indicados entre paréntesis.

II. ESTIMULACIÓN SIMPÁTICA.

La estimulación eléctrica de todo el flujo espinal en ratas desmeduladas (pithed), en nuestras condiciones experimentales y a frecuencias de estimulación variables, provocó una estimulación simpática vascular, tal y como ha sido previamente propuesto por otros autores^(273, 275, 299), y nuestro grupo^(163, 165, 166), que indujo incrementos de presión arterial sin cambios apreciables en la frecuencia cardiaca.

1. RATAS NORMOGLUCÉMICAS TRATADAS CON FLUOXETINA.

Los valores de presión arterial media y de frecuencia cardiaca en ratas control desmeduladas fueron respectivamente de 61.90 ± 1.90 mm Hg y 255.70 ± 12.30 ppm. Estas variables en los distintos grupos de tratamiento con fluoxetina (7, 14 ó 21 días) (56.3 ± 2.2 mm Hg y 226.70 ± 17.70 ppm, 51.90 ± 2.20 mm Hg y 218.80 ± 7.50 ppm, 51.80 ± 3.90 mm Hg y 231.0 ± 7.90 ppm respectivamente) no difirieron de los del grupo control; manteniéndose a lo largo de cada experimento, sin presentar modificaciones importantes después de la administración o perfusión de los productos utilizados.

1.1 *Efecto del tratamiento durante 7, 14 ó 21 días con fluoxetina sobre los incrementos de presión arterial media obtenidos por estimulación simpática total en ratas desmeduladas.*

La estimulación eléctrica de todo el cordón espinal en ratas normoglucémicas controles y tratadas con fluoxetina (7, 14 ó 21 días), provocó una activación simpática vascular que dio lugar a incrementos de presión arterial media (Δ PAM) frecuencia-dependientes. El tratamiento con fluoxetina modificó los Δ PAM obtenidos por estimulación eléctrica a todas las frecuencias de estimulación en la curva S-R E0, siendo estos incrementos inferiores a medida que aumenta el tiempo de tratamiento con fluoxetina (tabla 23).

	0.1 Hz	0.5 Hz	1.0 Hz	5.0 Hz
Control (n=35)	2.27 ± 0.39	14.70 ± 1.89	27.37 ± 3.29	57.47 ± 6.61
Fluoxetina 7 (n=35)	2.04 ± 0.12	12.54 ± 0.53	24.61 ± 0.91	49.46 ± 1.77
Fluoxetina 14 (n=60)	1.36 ± 0.14*	7.51 ± 0.69*	14.93 ± 1.10*	32.89 ± 2.10*
Fluoxetina 21 (n=35)	0.80 ± 0.17*	2.01 ± 0.18*	5.11 ± 0.73*	14.06 ± 1.07*

Tabla 23: Incrementos de presión arterial media (mmHg) obtenidos por estimulación eléctrica (E0) en ratas desmeduladas control y tratadas con fluoxetina durante 7, 14 ó 21 días. Los resultados se expresan como media ± SEM para el número de animales indicado entre paréntesis. * P < 0.05 vs control.

1.2 *Efecto de la perfusión i.v. de solución salina y agonistas serotoninérgicos (5-HT, 5-CT, α -metil-5-HT y 1-fenilbiguanida) sobre los incrementos de presión arterial media obtenidos por estimulación simpática total en animales tratados durante 7, 14 ó 21 días con fluoxetina.*

En estudios previos, realizados en nuestro laboratorio, en ratas desmeduladas, la perfusión continua de 5-HT así como la de los agonistas selectivos de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{1D}, 8-OH-DPAT y L-694,247 respectivamente, produjeron una inhibición de los incrementos de presión obtenidos por estimulación eléctrica; sin embargo, la perfusión continua del agonista selectivo de receptores 5-HT₃, 1-fenilbiguanida potenció dichos incrementos de presión^(89, 163, 268). La validación de estos datos se llevó a cabo repitiendo los ensayos en un grupo control al que administramos 5-HT, 8-OH-DPAT o L-694,247. Los efectos inhibidores obtenidos no difirieron significativamente de los obtenidos previamente, hecho que nos permitió utilizar el resto de los experimentos como controles de nuestro estudio.

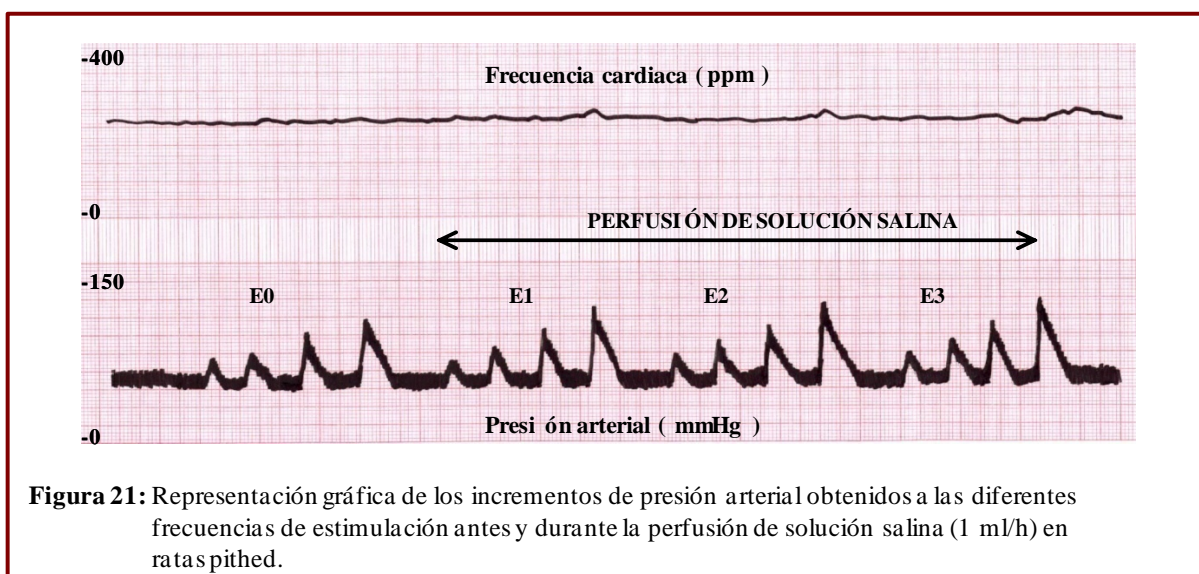


Figura 21: Representación gráfica de los incrementos de presión arterial obtenidos a las diferentes frecuencias de estimulación antes y durante la perfusión de solución salina (1 ml/h) en ratas pithed.

A las frecuencias de estimulación empleadas (0.1, 0.5, 1.0 y 5.0 Hz), los incrementos de presión arterial se mantuvieron estables en las curvas de estimulación-respuesta E1, E2 y E3 en los animales que recibieron 1 ml/h de solución salina (ejemplo gráfico en la Figura 21).

En animales tratados con fluoxetina (7, 14 ó 21 días), ninguna de las dosis de serotonina ensayadas (5-80 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) modificó el valor basal de presión arterial media ni de frecuencia cardiaca. Sin embargo, todas ejercieron una acción inhibitoria sobre el efecto presor inducido por estimulación eléctrica, siendo mayor el grado de inhibición a las frecuencias bajas de estimulación (Tabla 24). Del mismo modo, el grado de inhibición fue mayor a medida que aumentó el tiempo de tratamiento con fluoxetina (Tabla 24).

El efecto inhibitorio de 5-HT fue constante a partir de la curva estimulación-respuesta E2, durante toda la perfusión, por ello en las figuras representamos solamente los incrementos de PAM de esta estimulación comparándolos con los obtenidos en la estimulación E0.

	0.1 Hz	0.5 Hz	1.0 Hz	5.0 Hz
Fluoxetina 7	0.57 ± 0.37*	3.23 ± 0.83*	10.69 ± 2.14*	34.89 ± 4.50
Fluoxetina 14	0.00 ± 0.00*	3.71 ± 0.87*	8.41 ± 2.80*	28.24 ± 7.56
Fluoxetina 21	0.18 ± 0.20*	0.79 ± 0.27*	3.67 ± 0.69	10.74 ± 2.19

Tabla 24: Valores de Δ PAM obtenidos tras la administración de 5-HT 10 μ g/kg/min en animales tratados con fluoxetina durante 7, 14 ó 21 días.* P < 0.05 vs su E0 control (7, 14 y 21 días de tratamiento con fluoxetina).

En todos los animales tratados con fluoxetina (7, 14 ó 21 días) la administración de un agonista de receptores 5-HT₃, 1-fenilbiguanida (5 μ g/kg/min), no modificó las respuestas presoras obtenidas por estimulación eléctrica (Figura 22)

La acción inhibitoria de serotonina se reprodujo con la perfusión i.v. del agonista selectivo de receptores 5-HT_{1/7}, 5-CT (5 μ g/kg/min) (Figura 22).

La perfusión i.v. de un agonista selectivo de receptores 5-HT₂, α -metil-5-HT, (5 μ g/kg/min) dio lugar a una potenciación de las respuestas presoras obtenidas por estimulación eléctrica en los grupos de animales tratados con fluoxetina durante 14 ó 21 días (Figura 22 b y c). La administración de α -metil-5-HT en ratas tratadas con fluoxetina durante 7 días no modificó la respuesta presora obtenida por estimulación simpática (Figura 22 a).

Del mismo modo que ocurría con 5-HT, la inhibición de las respuestas presoras obtenida con la administración de 5-CT es mayor a frecuencias de estimulación bajas y mayor al aumentar el tiempo de tratamiento con fluoxetina (Figura 22).

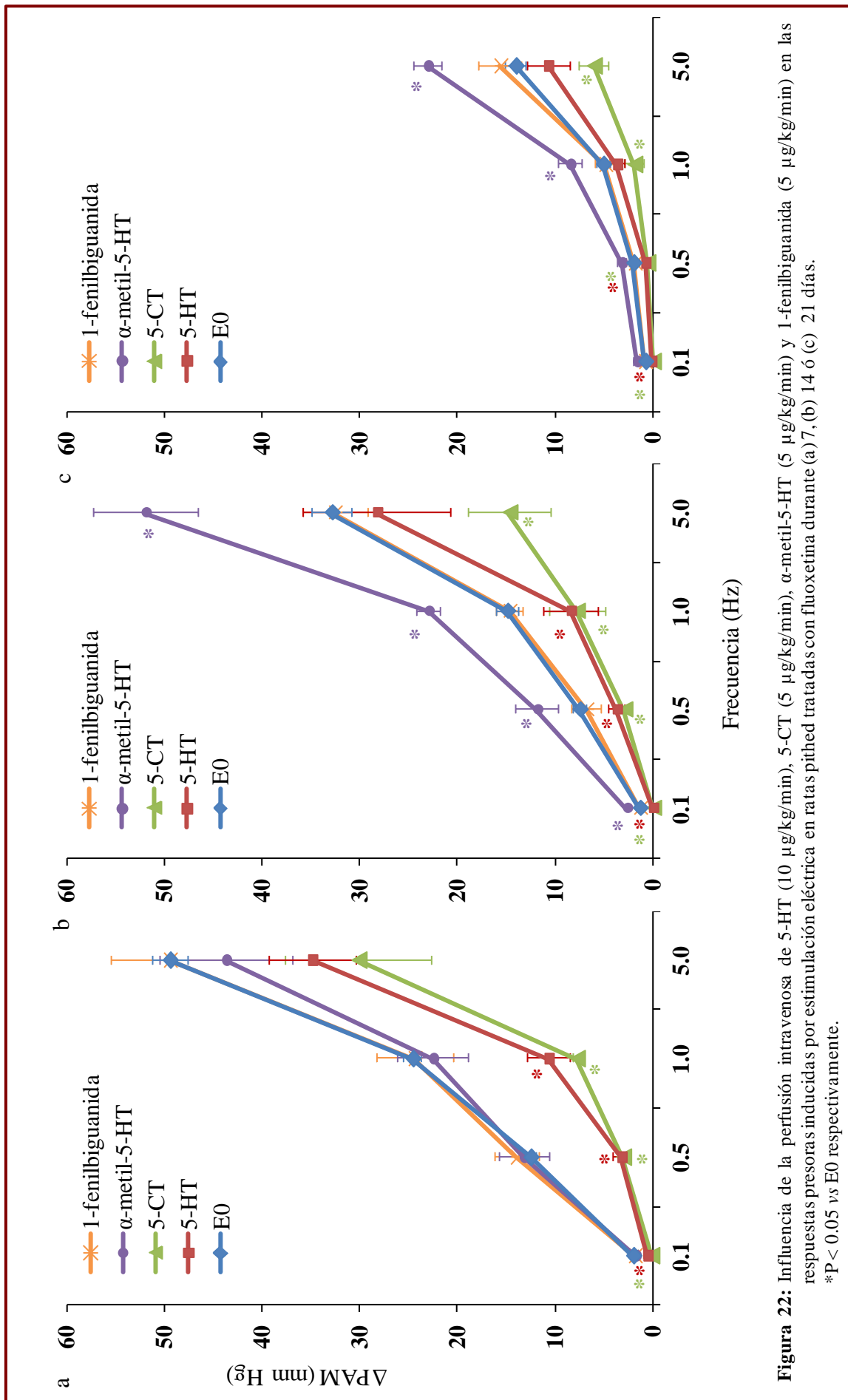
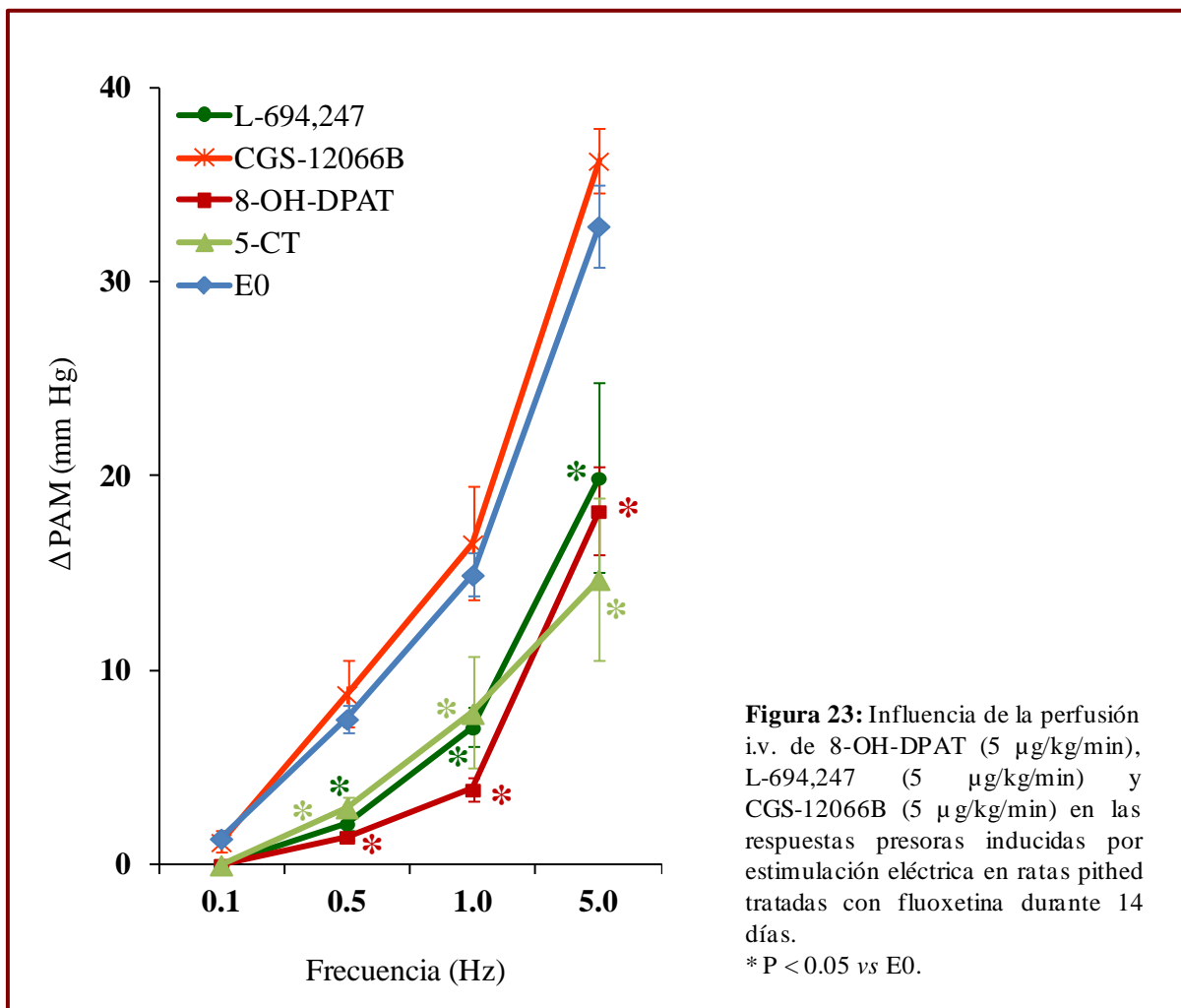


Figura 22: Influencia de la perfusión intravenosa de 5-HT (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$), 5-CT (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$), α -metil-5-HT (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) y 1-fenilbiguanida (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) en las respuestas presoras inducidas por estimulación eléctrica en ratas pithed tratadas con fluoxetina durante (a) 7, (b) 14 ó (c) 21 días.
* $P < 0.05$ vs E0 respectivamente.

1.3. Efecto de la perfusión i.v. de solución salina y agonistas serotoninérgicos (8-OH-DPAT, L-694,247, CGS-12066B, BW723C86 y MK212) sobre los incrementos de presión arterial media obtenidos por estimulación simpática total en animales tratados durante 14 días con fluoxetina.

El efecto inhibitor de 5-CT (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) sobre las respuestas presoras obtenidas por estimulación simpática en ratas tratadas con fluoxetina durante 14 días (Figura 23), se reprodujo con la perfusión de un agonista selectivo de los receptores 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) y con la perfusión de un agonista selectivo de los receptores 5-HT_{1D}, L-694,247 (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$). Sin embargo, la perfusión i.v. de CGS-12066B (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$), agonista selectivo de los receptores 5-HT_{1B} no fue capaz de modificar las respuestas presoras obtenidas por estimulación simpática total (Figura 23).



La potenciación observada con α -metil-5-HT en animales tratados con fluoxetina durante 14 días (Figura 24), no se reproduce con la perfusión de BW-723C86, agonista de receptores 5-HT_{2B}, (5 μ g/kg/min), ni de MK 212, agonista de receptores 5-HT_{2C}, (5 μ g/kg/min) (Figura 24).

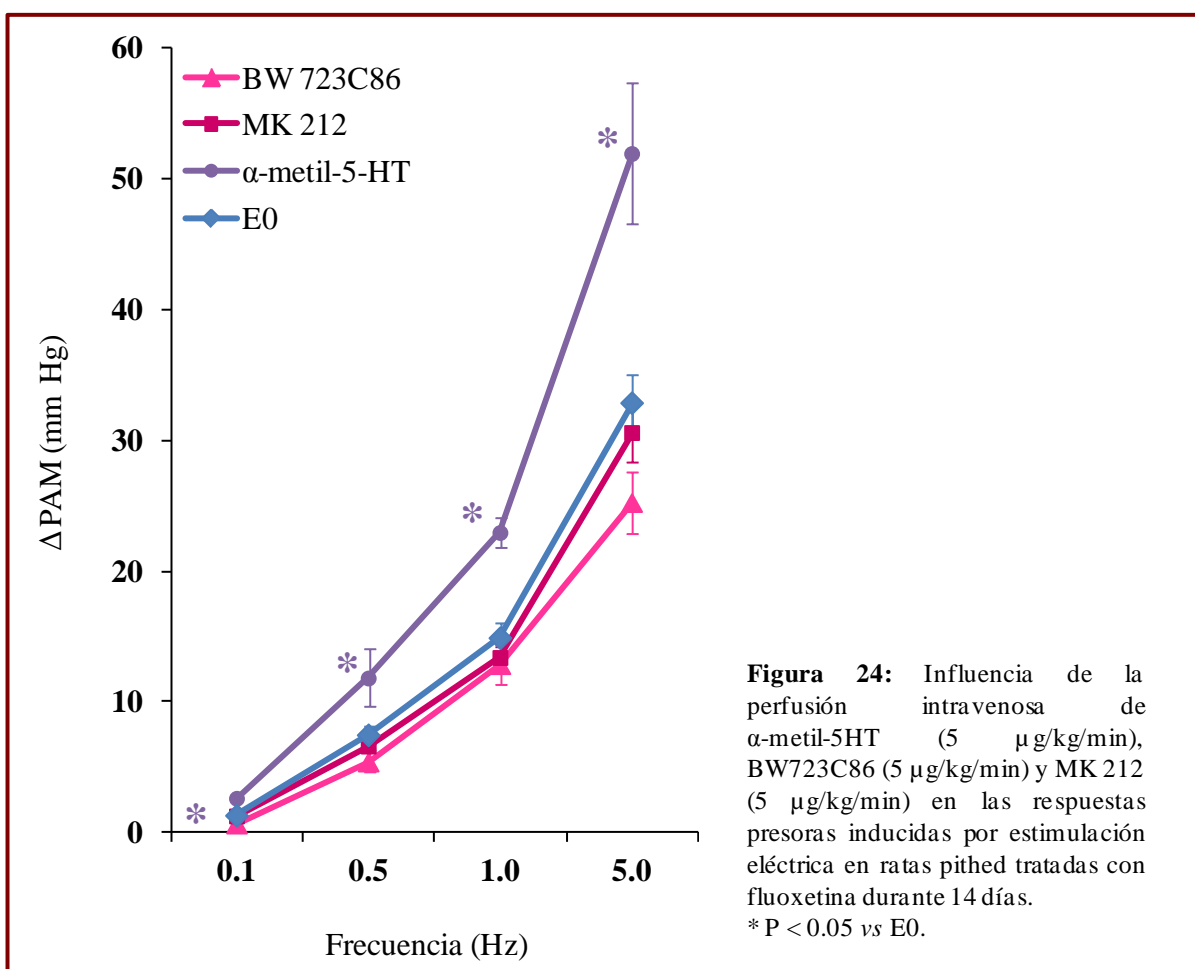


Figura 24: Influencia de la perfusión intravenosa de α -metil-5HT (5 μ g/kg/min), BW723C86 (5 μ g/kg/min) y MK 212 (5 μ g/kg/min) en las respuestas presoras inducidas por estimulación eléctrica en ratas pithed tratadas con fluoxetina durante 14 días.
* $P < 0.05$ vs E0.

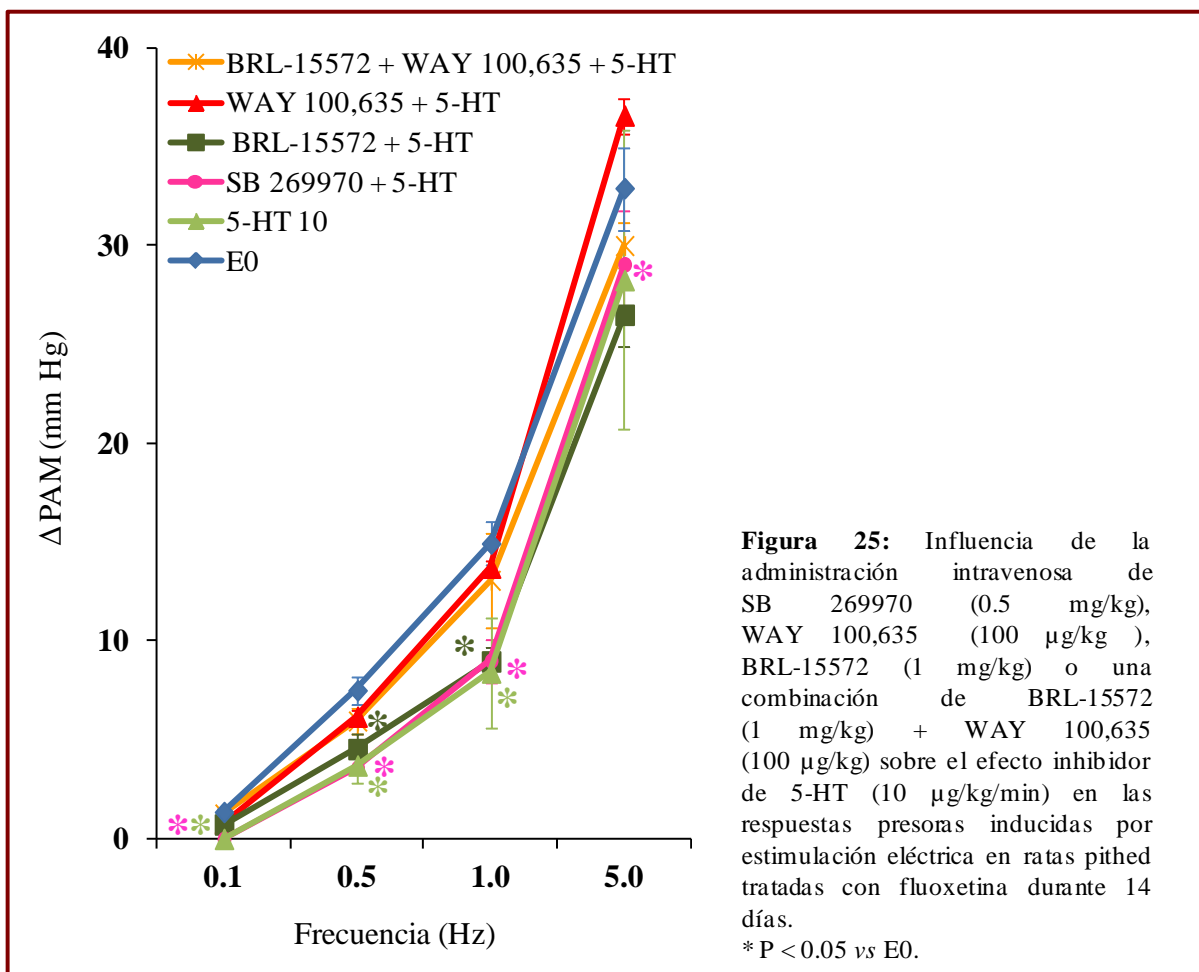
1.4. *Efecto de los antagonistas de receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1D} y 5-HT₇ sobre la inhibición ejercida por serotonina en las respuestas presoras obtenidas por estimulación eléctrica en animales tratados durante 14 días con fluoxetina.*

La administración i.v. de WAY 100,635 (100 µg/kg), antagonista de receptores 5-HT_{1A}, de BRL-15572 (1 mg/kg), antagonista de receptores 5-HT_{1D} o de SB269970 (0.5 mg/kg), antagonista selectivo de receptores 5-HT₇ no modificó *per se*, las respuestas presoras obtenidas por estimulación eléctrica.

El efecto inhibitor de 5-HT (10 µg/kg/min) fue parcialmente bloqueado por el pretratamiento con WAY 100,635 (100 µg/kg). Del mismo modo, la administración i.v. previa de BRL-15572 (1 mg/kg) antagonizó parcialmente la acción inhibitora de 10 µg/kg/min de 5-HT (Figura 25).

El pretratamiento intravenoso con una combinación de WAY 100,635 (100 µg/kg) + BRL-15572 (1 mg/kg) bloqueó completamente la inhibición inducida por la administración de 10 µg/kg/min de 5-HT (Figura 25).

El bloqueo selectivo de los receptores 5-HT₇ con SB269970 (0.5 mg/kg) no modificó la acción inhibitora de las respuestas presoras inducida por la administración de 5-HT (Figura 25).

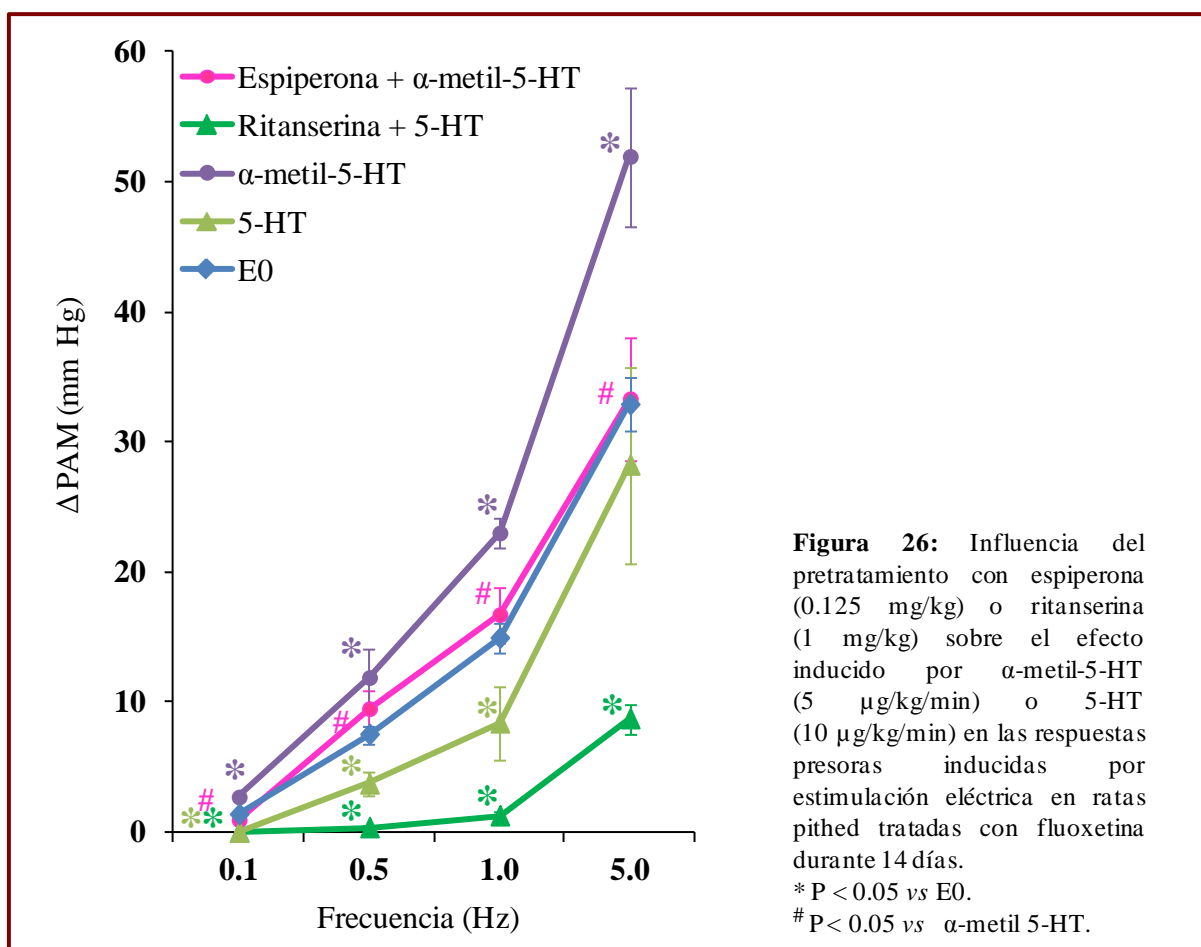


1.5 Efecto de los antagonistas de receptores $5\text{-HT}_{2A/2B/2C}$ y 5-HT_{2A} sobre la potenciación ejercida por α -metil-5-HT en las respuestas presoras obtenidas estimulación eléctrica en animales tratados durante 14 días con fluoxetina.

Ritanserina (1 mg/kg), antagonista selectivo de receptores $5\text{-HT}_{2A/2B/2C}$, y espiperona (0.125 mg/kg), antagonista selectivo de receptores 5-HT_{2A} , administrados por vía i.v., no modificaron, *per se*, las respuestas presoras obtenida por estimulación eléctrica del flujo simpático total.

El pretratamiento con ritanserina (1 mg/kg) originó un efecto inhibitor de 5-HT (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) más marcado que el de 5-HT solo (Figura 26).

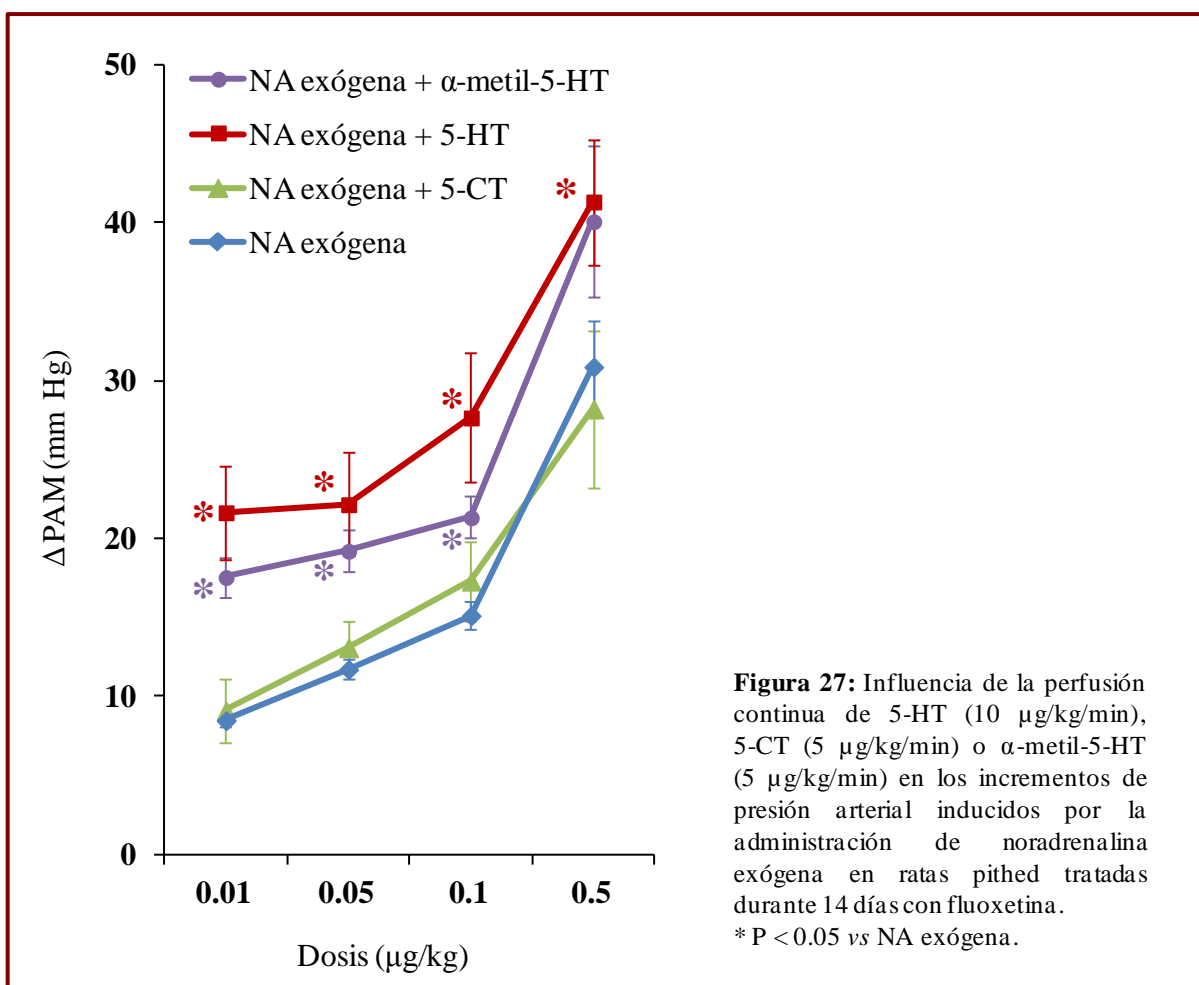
El efecto potenciador de las respuestas presoras obtenidos por la infusión de α -metil-5-HT (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) fue bloqueado por el pretratamiento con espiperona (0.125 mg/kg) (Figura 26) .



1.6 Efecto de 5-HT, 5-CT y α -metil-5-HT sobre las respuestas presoras inducidas por administraci3n de NA ex3gena en ratas tratadas con fluoxetina durante 14 d3as.

Para designar la naturaleza pre y/o postsin3ptica de las acciones serotonin3gicas, se realizaron una serie de experimentos donde los incrementos de presi3n arterial se obtuvieron por la administraci3n de NA ex3gena. La administraci3n i.v. en bolus de NA a dosis de 0.01, 0.05, 0.1 y 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ indujo incrementos de presi3n arterial crecientes con las dosis y constantes a lo largo del tiempo (Figura 27). Tales incrementos para la curva dosis respuesta, E'0 en ratas desmeduladas tratadas con fluoxetina durante 14 d3as fueron 8.50 ± 0.40 , 11.74 ± 0.58 , 15.14 ± 0.83 y 30.88 ± 2.95 mmHg (Figura 27).

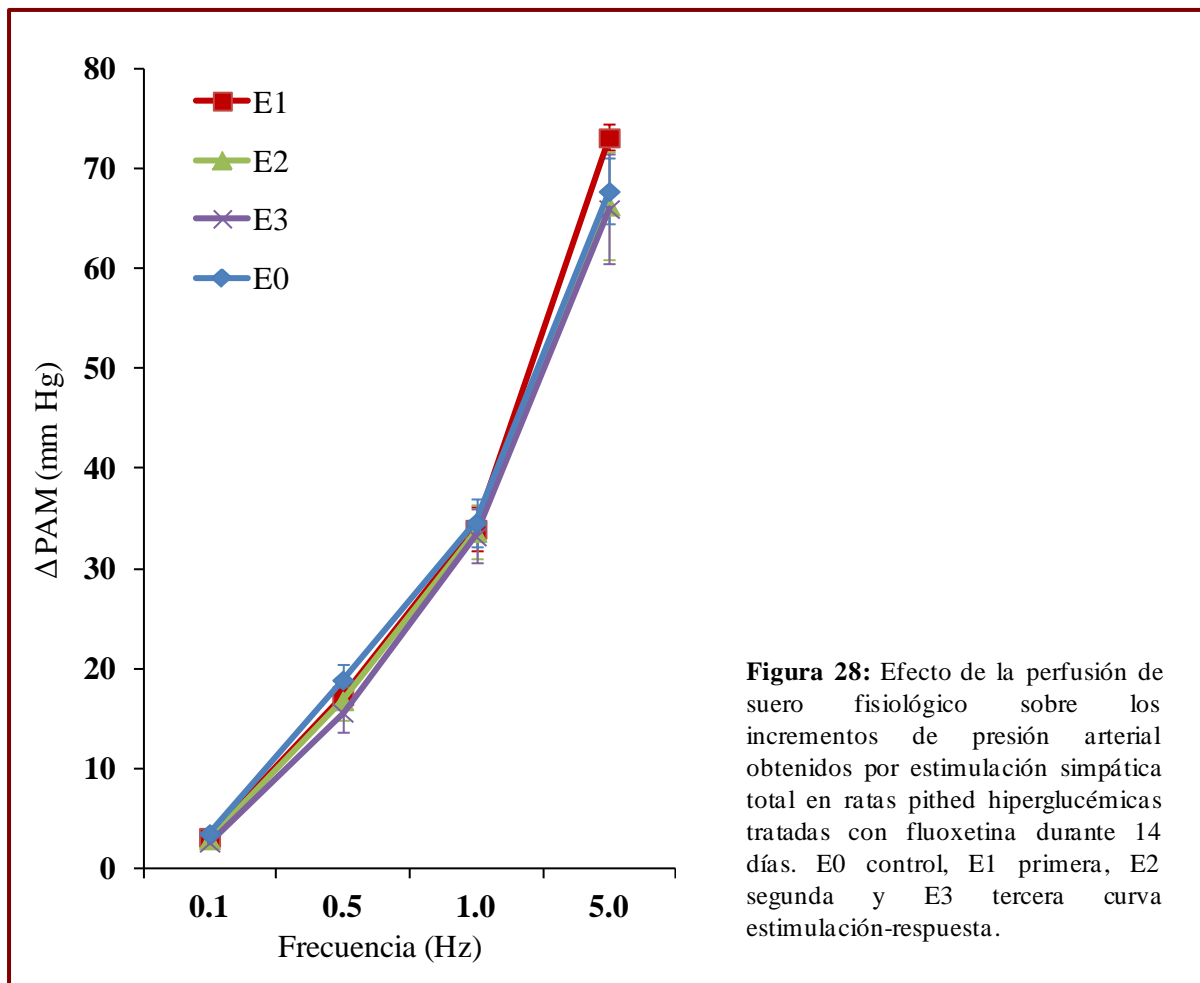
La perfusi3n de 5-HT (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) y de α -metil-5-HT (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) dio lugar a una potenciaci3n de las respuestas presoras obtenidas por administraci3n de NA ex3gena. (Figura 27). Mientras que la perfusi3n de 5-CT (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) no modific3 dichas respuestas.



2. RATAS HIPERGLUCÉMICAS TRATADAS CON FLUOXETINA.

2.1. *Efecto de la perfusión i.v. de solución salina y agonistas serotoninérgicos (5-HT, 5-CT, α -metil-5-HT y 1-fenilbiguanida) sobre los incrementos de presión arterial media obtenidos por estimulación simpática total en animales hiperglucémicos tratados durante 14 días con fluoxetina.*

La estimulación eléctrica de todo el cordón espinal en animales diabéticos tratados con fluoxetina durante 14 días, dio lugar a incrementos de presión arterial media frecuencia dependiente. A las frecuencias de estimulación empleadas los incrementos de presión arterial media en la curva de estimulación respuesta E0 fueron 3.54 ± 0.32 , 18.90 ± 1.48 , 34.62 ± 2.33 y 67.80 ± 3.27 mmHg. Dichos incrementos se mantuvieron sin cambios significativos en las curvas de estimulación-respuesta E1, E2 y E3, en los animales que recibieron 1ml/h de solución salina (Figura 28), siendo significativamente superiores a los de los animales



normoglucémicos tratados con fluoxetina durante 14 días (Tabla 23).

Las dosis de 5-HT empleadas (5, 10, 20 y 80 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$), que no modificaron el valor basal de PAM de los animales, indujeron una acción inhibitora sobre el efecto presor inducido por estimulación eléctrica a todas las frecuencias de estimulación. La inhibición es dosis dependiente (Tabla 25). La acción inhibitora es mayor a bajas frecuencias de estimulación. El efecto inhibitor es significativo a todas las frecuencias de estimulación a partir de la dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ (Tabla 25).

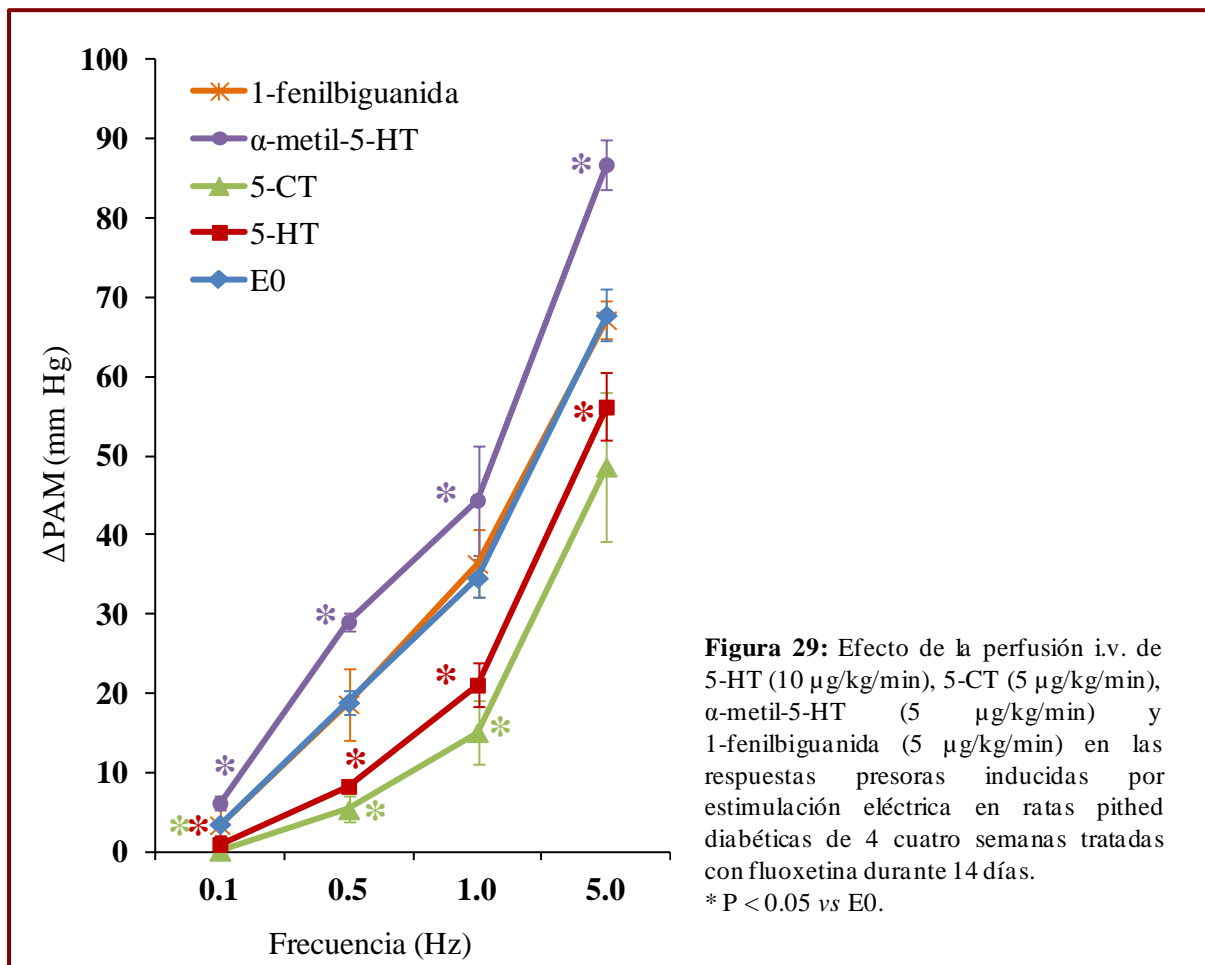
El efecto inhibitor de 5-HT se mantiene constante desde la estimulación E2 durante toda la perfusión, por ello sólo representamos en las figuras los incrementos de PAM de esta estimulación comparados con los obtenidos en la estimulación E0.

	0.1Hz	0.5Hz	1.0Hz	5.0Hz
E0	3.54 \pm 0.32	18.90 \pm 1.48	34.62 \pm 2.33	67.80 \pm 3.27
5-HT 5	2.33 \pm 0.67	11.67 \pm 1.86	25.33 \pm 3.48	65.33 \pm 1.17
5-HT 10	1.00 \pm 1.00*	8.33 \pm 0.51*	21.11 \pm 2.70*	56.22 \pm 4.26
5-HT 20	0.78 \pm 0.40*	4.00 \pm 2.00*	14.33 \pm 2.40*	47.22 \pm 1.39*
5-HT 80	0.00 \pm 0.00*	2.96 \pm 1.19*	8.12 \pm 2.25*	32.67 \pm 4.44*

Tabla 25: Efecto de la perfusión intravenosa de 5-HT (5, 10, 20, 80 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) en los incrementos de presión obtenidos por estimulación eléctrica en ratas pithed hiperglucémicas de 4 semanas tratadas con fluoxetina durante 14 días. *P<0.05 vs E0.

El efecto inhibitor producido por 5-HT sobre las respuestas presoras obtenidas por estimulación eléctrica del cordón espinal se reprodujo con la perfusión i.v. del agonista selectivo de receptores 5-HT_{1/7}, 5-CT (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) (Figura 29), siendo su efecto inhibitor superior al de la propia serotonina a dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$. Sin embargo, la administración del agonista selectivo de receptores 5-HT₂, α -metil-5-HT (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) (Figura 29), en

perfusión continua, potenció dichas respuestas presoras; mientras que la administración de 1-fenilbiguanida (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$), agonista selectivo de receptores 5-HT₃, no modificó las respuestas presoras obtenidas por estimulación eléctrica (Figura 29).



2.2. Efecto de la perfusión i.v. de solución salina y agonistas serotoninérgicos 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C} (8-OH-DPAT, L-694,247, CGS-12066B, BW723C86 y MK212, respectivamente) sobre los incrementos de presión arterial media obtenidos por estimulación simpática total en animales hiperglucémicos tratados durante 14 días con fluoxetina.

El efecto inhibitorio producido por 5-HT (10 µg/kg/min) sobre las respuestas presoras obtenidas por estimulación eléctrica del cordón espinal fue también reproducido por la perfusión i.v. del agonista selectivo de receptores 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT (5 µg/kg/min), y por la perfusión de L-694,247 (5 µg/kg/min), agonista selectivo de receptores 5-HT_{1D}. Sin embargo, el agonista selectivo de receptores 5-HT_{1B}, CGS-12066B (5 µg/kg/min), no reprodujo dicha inhibición (Figura 30).

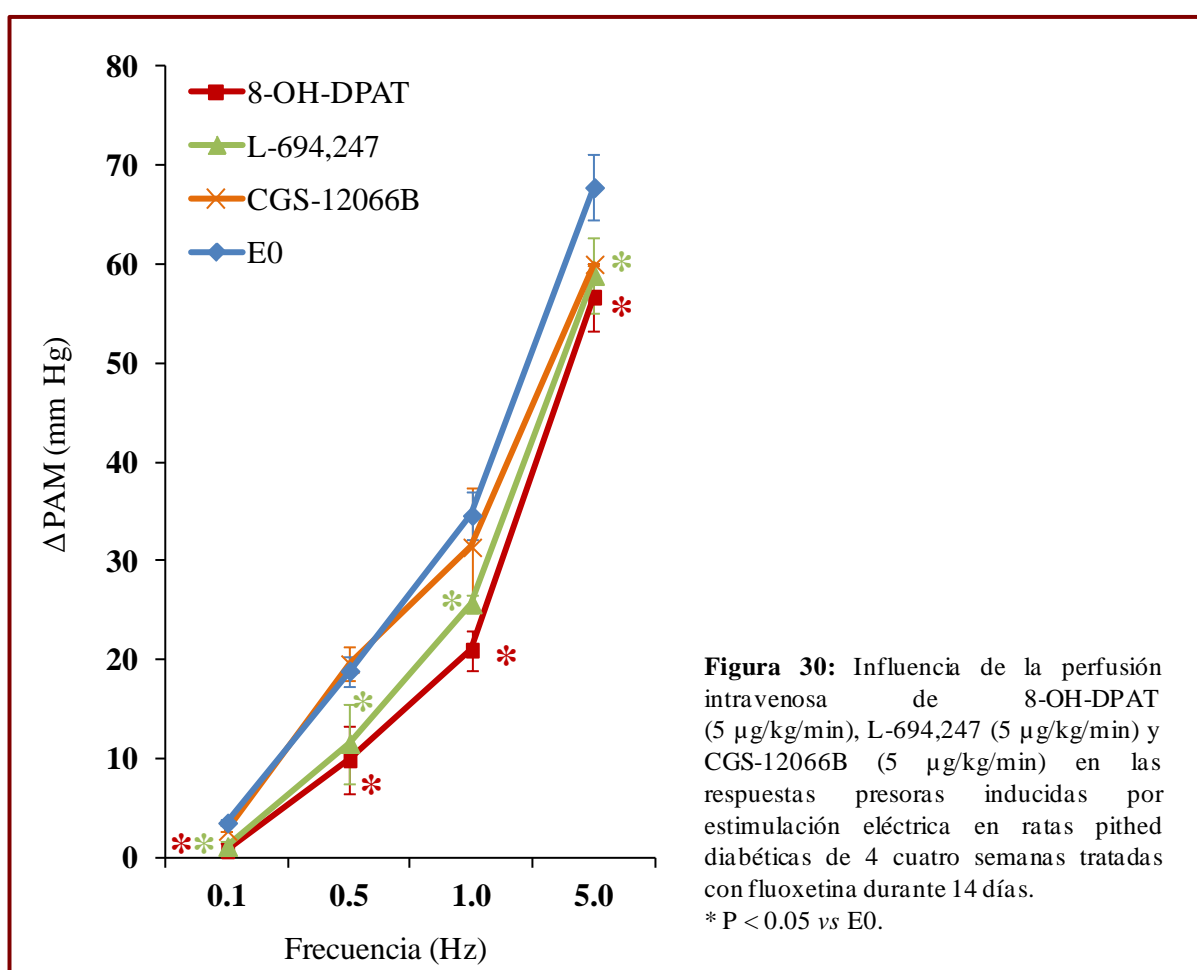
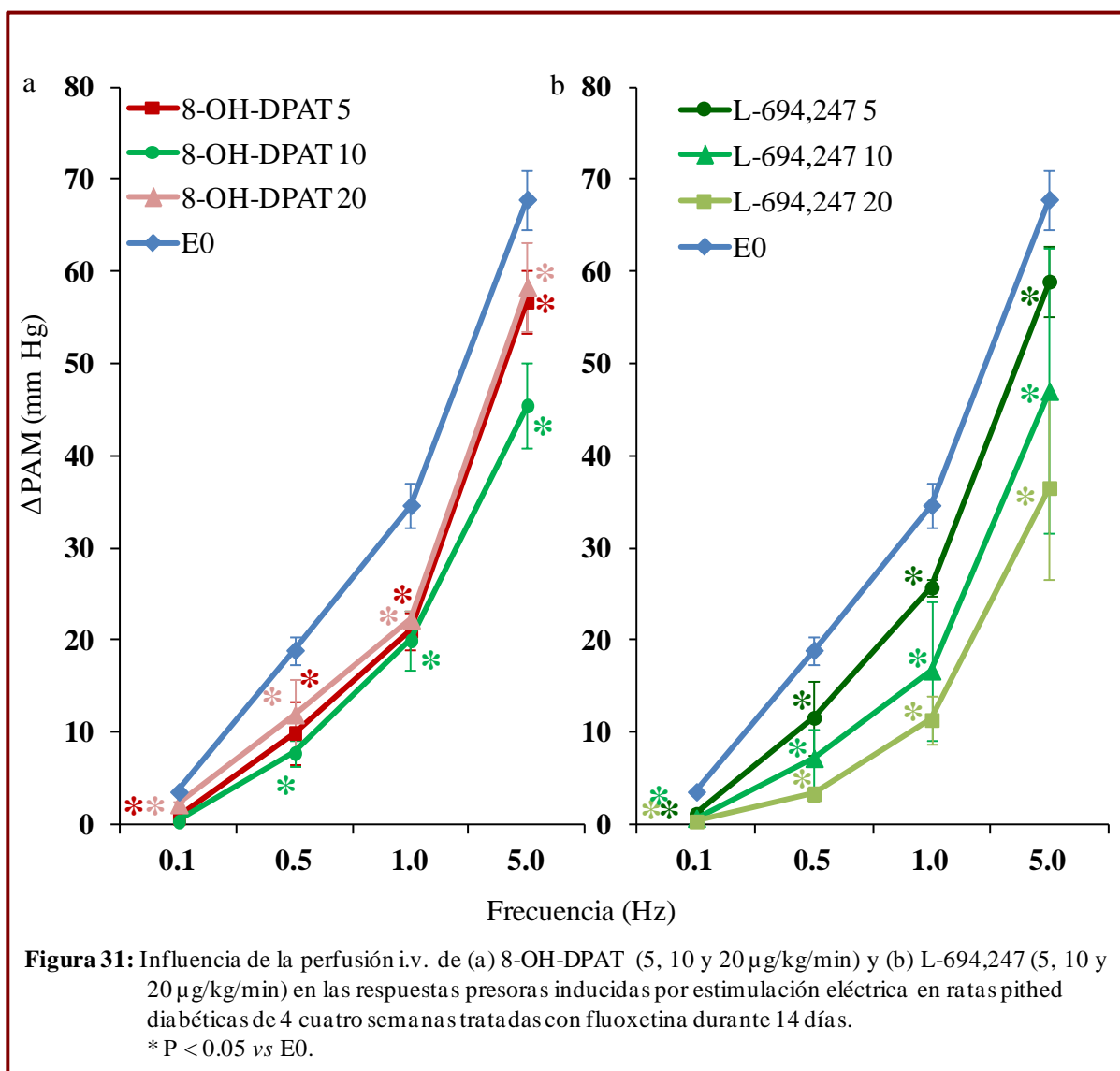
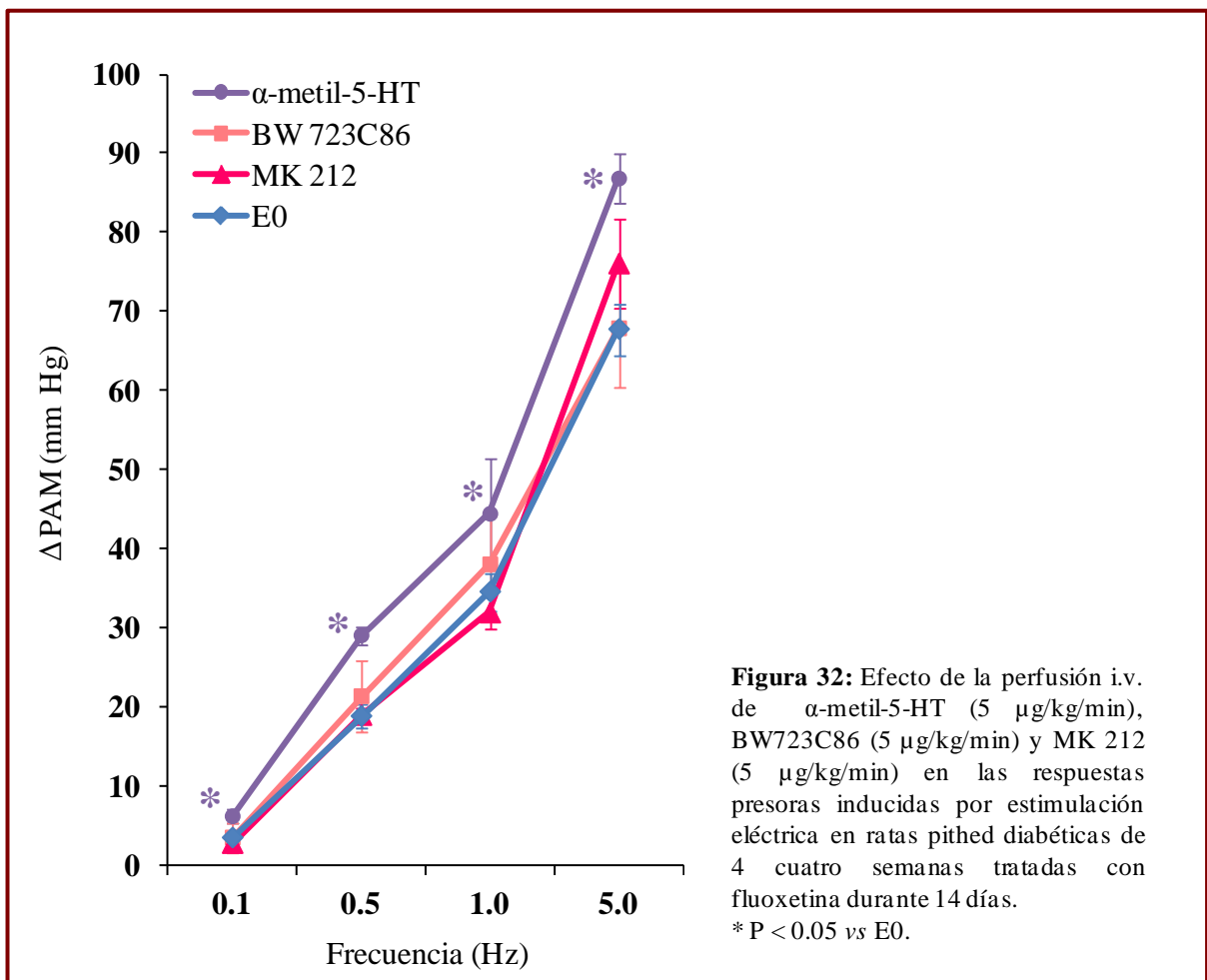


Figura 30: Influencia de la perfusión intravenosa de 8-OH-DPAT (5 µg/kg/min), L-694,247 (5 µg/kg/min) y CGS-12066B (5 µg/kg/min) en las respuestas presoras inducidas por estimulación eléctrica en ratas pithed diabéticas de 4 a 4 semanas tratadas con fluoxetina durante 14 días.
* P < 0.05 vs E0.

La inhibición de los incrementos de presión arterial que produjeron el agonista de receptores 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT (5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) y el agonista de receptores 5-HT_{1D}, L-694,247 (5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) fue dosis y frecuencia dependiente para ambos (Figura 31 a y b). Ninguna de las dosis ensayadas modificó por si misma el valor basal de presión arterial media.



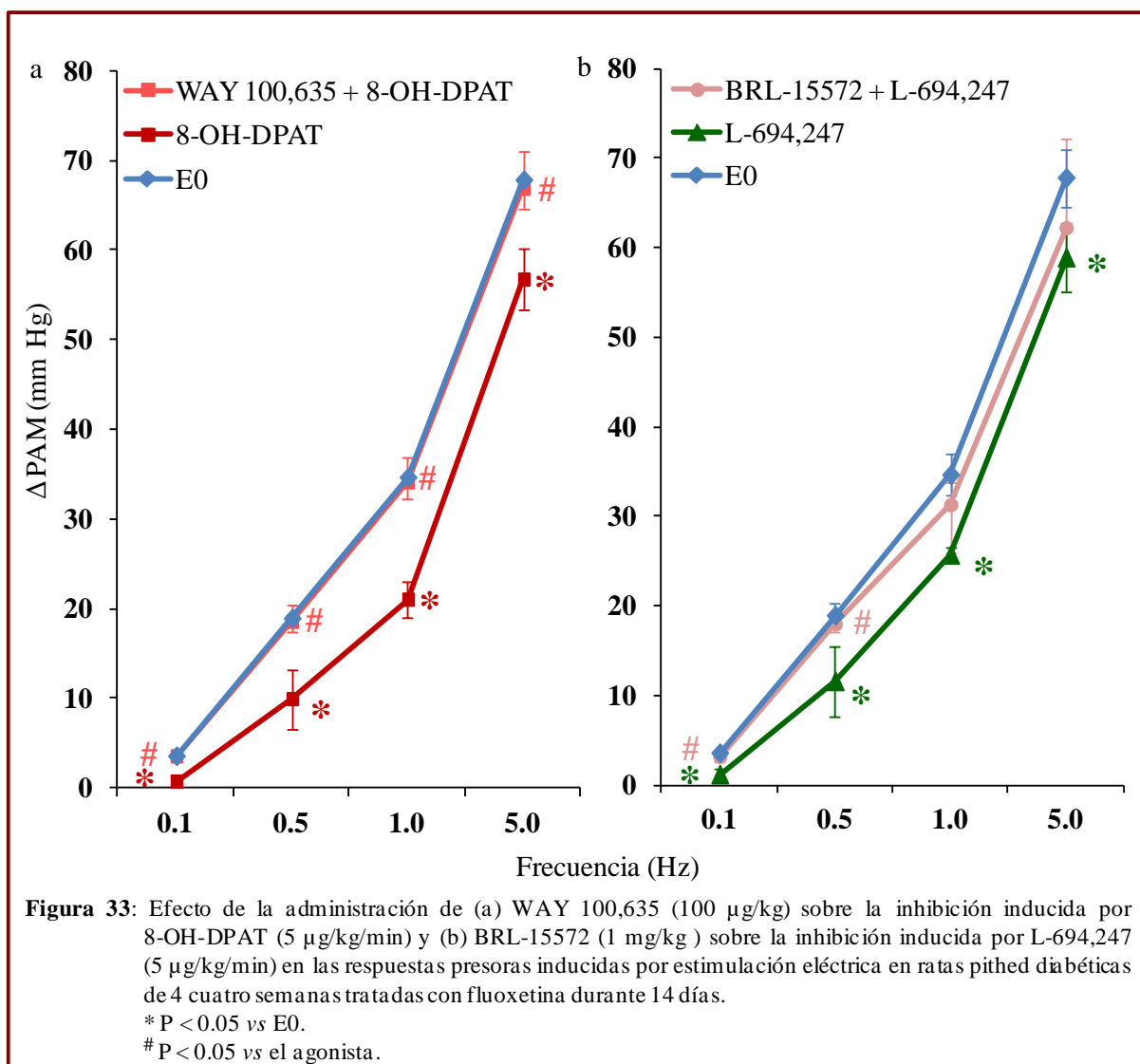
La potenciación observada para el agonista de receptores 5-HT_{2A/2B/2C}, α -metil-5-HT (5 μ g/kg/min), no fue reproducida por los agonistas selectivos de los receptores 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C}, BW-723C86 (5 μ g/kg/min) y MK 212 (5 μ g/kg/min) respectivamente (Figura 32).



2.3. Efecto de los antagonistas de receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{1D} (WAY-100,635 y BRL-1572, respectivamente) sobre la inhibición serotoninérgica en las respuestas presoras obtenidas por estimulación eléctrica en animales hiper glucémicos tratados durante 14 días con fluoxetina.

El pretratamiento, en ratas diabéticas desmeduladas tratadas con fluoxetina durante 14 días, con WAY 100,635 (100 µg/kg) antagonista de receptores 5-HT_{1A}, o con el antagonista de receptores 5-HT_{1D}, BRL-15572 (1 mg/kg), no modificó *per se*, las respuestas presoras obtenidas por estimulación simpática total.

El antagonista selectivo de receptores 5-HT_{1A}, WAY-100,635 (100 µg/kg) revierte totalmente la acción inhibitoria observada con la perfusión de 8-OH-DPAT (5 µg/kg/min), agonista selectivo de receptores 5-HT_{1A} (Figura 33a) y parcialmente, la inhibición inducida



por 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ de 5-HT (Figura 34).

El efecto inhibitor provocado por L-694,247 (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) fue completamente bloqueado por el antagonista selectivo de los receptores 5-HT_{1D}, BRL-15772 (1 mg/kg). (Figura 33b). Dicho antagonista revierte parcialmente la acción inhibitora de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ de 5-HT (Figura 34).

La administración conjunta de WAY 100,635 (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y BRL-15572 (1 mg/kg) bloquea totalmente la inhibición de las respuestas presoras producidas por la perfusión i.v. de 5-HT (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) (Figura 34).

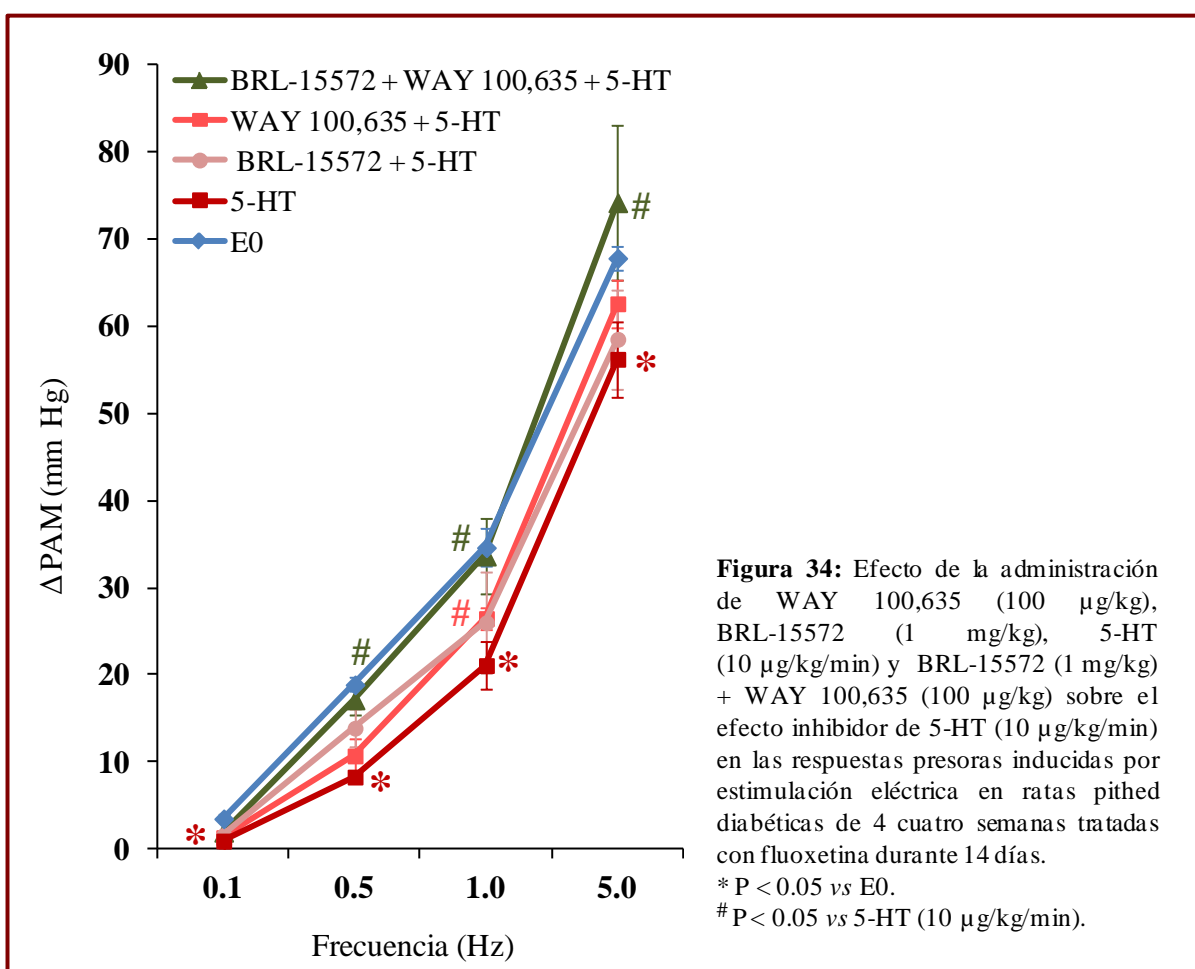


Figura 34: Efecto de la administración de WAY 100,635 (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$), BRL-15572 (1 mg/kg), 5-HT (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) y BRL-15572 (1 mg/kg) + WAY 100,635 (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) sobre el efecto inhibitor de 5-HT (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) en las respuestas presoras inducidas por estimulación eléctrica en ratas pithed diabéticas de 4 a cuatro semanas tratadas con fluoxetina durante 14 días.

* $P < 0.05$ vs E0.

$P < 0.05$ vs 5-HT (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$).

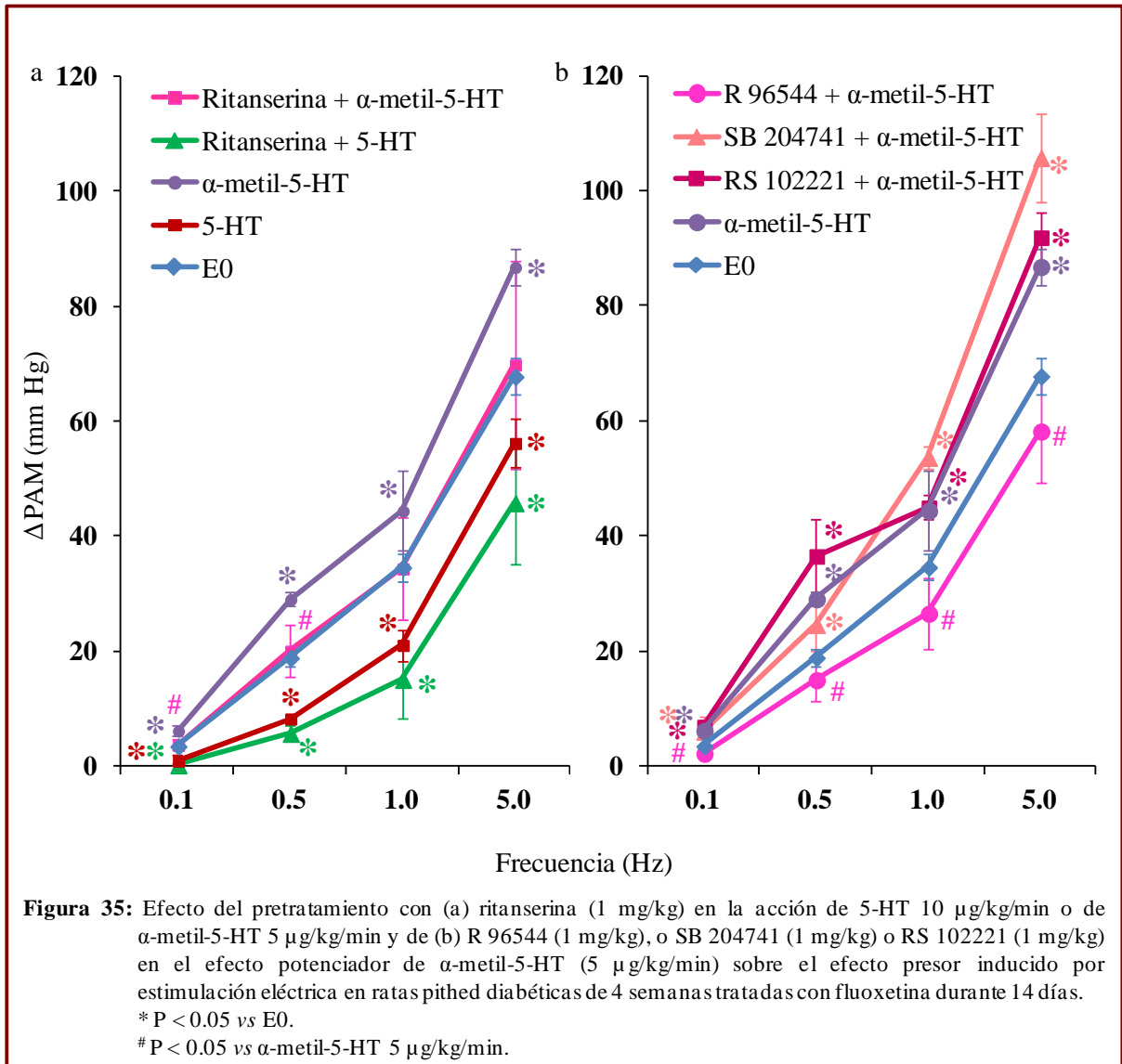
2.4. *Efecto de los antagonistas de receptores 5-HT_{2A/2B/2C}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C} (ritanseria, R 96544, SB 204741, RS 102221, respectivamente) sobre la potenciación ejercida por α -metil-5-HT en las respuestas presoras obtenidas por estimulación eléctrica en animales hiperglucémicos tratados durante 14 días con fluoxetina.*

Los antagonistas de receptores 5-HT_{2A/2B/2C}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C} (ritanseria, R 96544, SB 204741, RS 102221, respectivamente) no modificaron *per se* las respuestas presoras obtenidas por la estimulación eléctrica del cordón espinal en ratas diabéticas desmeduladas tratadas durante 14 días con fluoxetina.

El pretratamiento con ritanserina (1 mg/kg) produjo que el efecto inhibitor de 5-HT (10 μ g/kg/min) sea más marcado (Figura 35a).

El efecto potenciador de las respuestas presoras obtenidas por la perfusión de α -metil-5-HT (5 μ g/kg/min) fue bloqueado por el pretratamiento con el antagonista selectivo de receptores 5-HT_{2A/2B/2C}, ritanserina (1 mg/kg) (Figura 35a). Del mismo modo, la administración de R 96544 (1 mg/kg) antagonista selectivo de los receptores 5-HT_{2A}, bloqueó la potenciación de las respuestas presoras evocadas por α -metil-5-HT (5 μ g/kg/min) (Figura 35b).

Sin embargo, la administración i.v. del antagonista de receptores 5-HT_{2B}, SB 204741 (1 mg/kg), o del antagonista de receptores 5-HT_{2C}, RS 102221 (1 mg/kg) no modificaron la potenciación de las respuestas presoras producidas por 5 μ g/kg/min de α -metil-5-HT (Figura 35b).



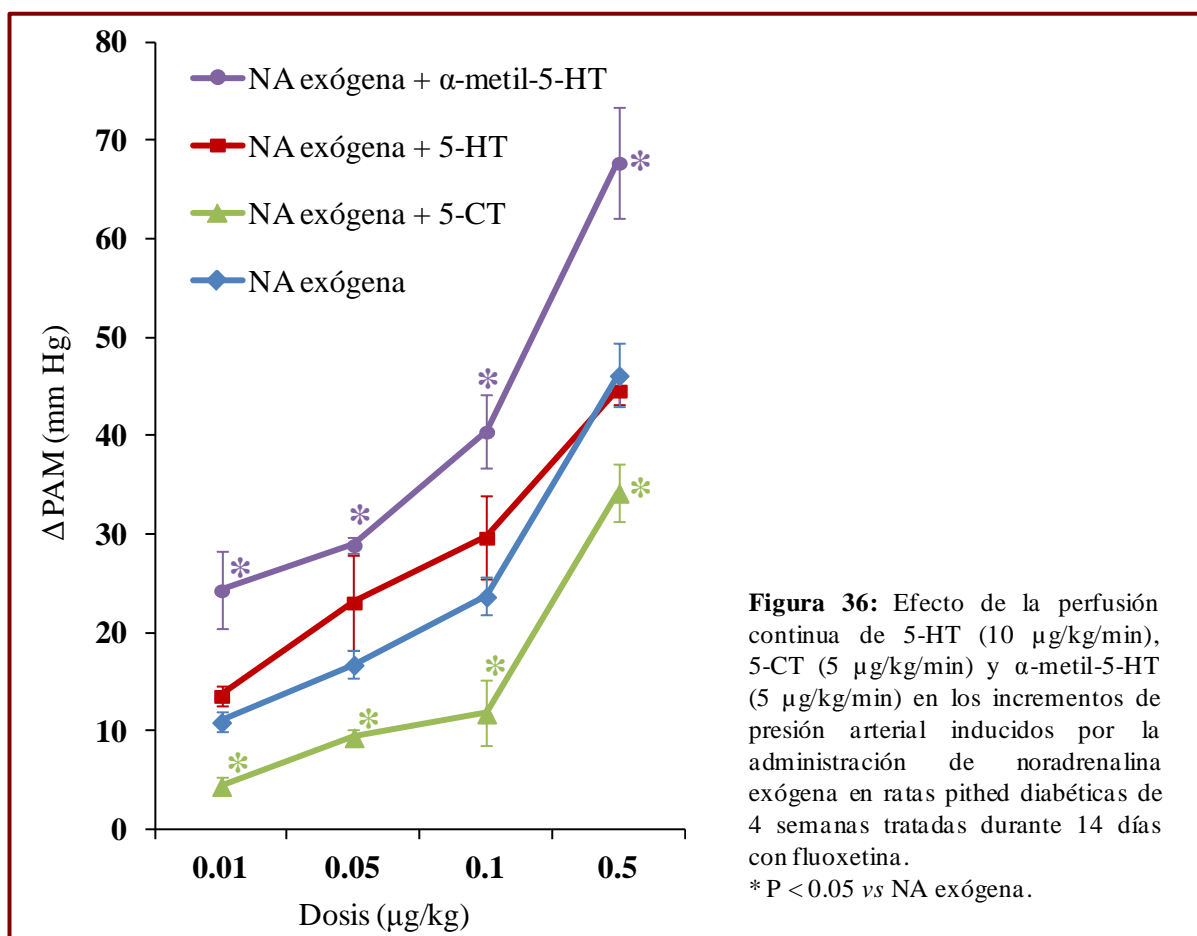
2.5. *Efecto de 5-HT, 5-CT o α -metil-5-HT sobre las respuestas presoras inducidas por administración de NA exógena en ratas hiperglucémicas tratadas con fluoxetina durante 14 días.*

Para designar la naturaleza pre y/o postsináptica de las acciones serotoninérgicas, se realizaron una serie de experimentos donde los incrementos de presión arterial se obtuvieron por la administración de NA exógena. La administración i.v. en bolus de NA a dosis de 0.01, 0.05, 0.1 y 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ induce incrementos de presión arterial crecientes y constantes a lo largo del tiempo. Tales incrementos para la curva dosis respuesta, E'0 en ratas hiperglucémicas desmeduladas tratadas con fluoxetina durante 14 días fueron 11.00 ± 1.00 , 16.83 ± 1.36 , 23.74 ± 1.86 y 46.20 ± 3.30 mm Hg, respectivamente (Figura 36). Estos valores son significativamente superiores a los obtenidos en animales normoglucémicos tratados con fluoxetina durante 14 días (Figura 27).

La perfusión de 5-HT (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) no originó diferencias significativas en los incrementos de PAM obtenidos por administración de NA exógena (Figura 36).

La perfusión de 5-CT (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$), agonista selectivo de los receptores 5-HT_{1/7}, inhibió las respuestas presoras obtenida por administración de noradrenalina exógena (Figura 36).

Sin embargo, la perfusión de α -metil-5-HT (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) dio lugar a una potenciación de las respuestas presoras obtenidas por administración de NA exógena (Figura 36).



3. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS INDIRECTOS IMPLICADOS EN LAS ACCIONES SEROTONÉRGICAS EN RATAS HIPERGLUCEMICAS TRATADAS CON FLUOXETINA DURANTE 14 DÍAS.

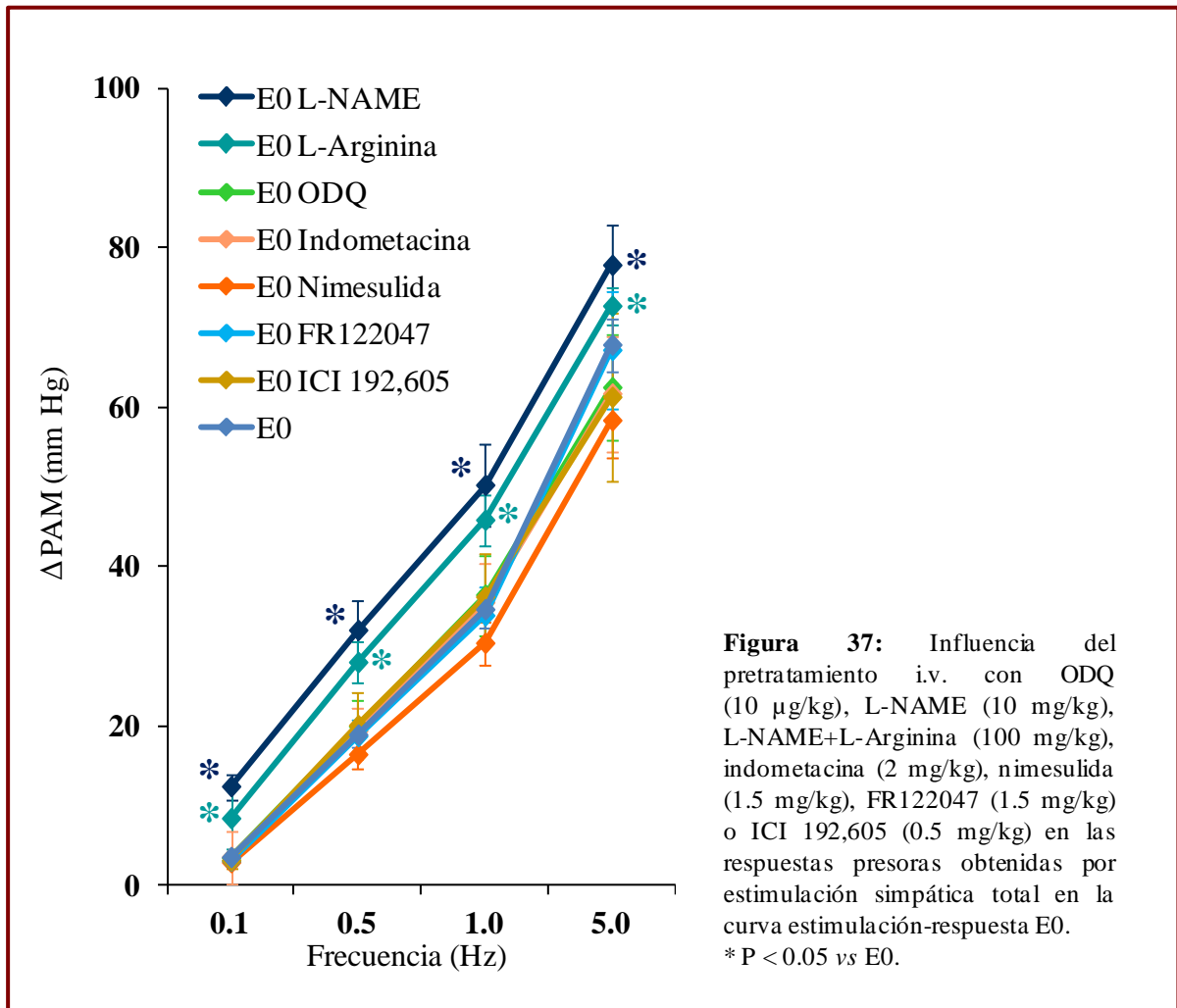
3.1. Efecto de L-NAME, L-NAME+L-Arginina, ODQ, nimesulida, FR122047, ICI 192,605 e indometacina sobre los incrementos de presión arterial media obtenidos por estimulación simpática total en animales hiperglucémicos tratados durante 14 días con fluoxetina.

Teniendo en cuenta a las acciones potenciadoras y/o inhibitoras inducidas por serotonina y/o agonistas serotoninérgicos, los siguientes experimentos se destinaron a estudiar posibles acciones indirectas. Para ello se bloquearon diferentes sistemas vasculares endógenos (óxido nítrico y derivados de las ciclooxigenasas) implicados en la regulación de la presión arterial.

ODQ (10 µg/kg), inhibidor de la guanilato ciclasa, nimesulida (1.5 mg/kg), inhibidor de la COX-2, FR122047 (1.5 mg/kg), inhibidor de COX-1, indometacina (2 mg/kg), inhibidor no selectivo de COX, ICI 192,605 (0.5 mg/kg), antagonista de receptores de TXA₂, L-NAME (10 mg/kg) + L-Arginina (100 mg/kg; donador de óxido nítrico) no modificaron ni la presión arterial basal ni la frecuencia cardiaca en los animales hiperglucémicos tratados con fluoxetina durante 14 días. Únicamente el tratamiento con L-NAME (10 mg/kg; inhibidor de la oxido nítrico sintasa) incrementó los valores basales de presión arterial y frecuencia cardiaca (89.3 ± 8.3 mmHg y 261.7 ± 5.1 ppm).

Solamente el pretratamiento con L-NAME (10 mg/kg) o L-NAME (10 mg/kg) + L-Arginina (100 mg/kg) originó, a todas las frecuencias de estimulación (0.1, 0.5, 1.0 y 5.0 Hz), incrementos de PAM significativamente superiores a los de la curva estimulación-respuesta E₀, que fueron para L-NAME: 12.42 ± 1.57, 32.02 ± 3.81, 50.21 ± 5.17 y 77.80 ± 4.98 mmHg y para L-NAME + L-Arginina: 8.42 ± 3.38, 28.00 ± 2.52, 54.83 ± 3.50 y 72.67 ± 2.40 mmHg (Figura 37).

Los incrementos de PAM obtenidos en las curvas de estimulación E1, E2 y E3 en presencia de ODQ, L-NAME, L-NAME + L-Arginina, indometacina, nimesulida, FR122047, ICI 192,605, tras la perfusión de solución salina (1 ml/h) son similares a los obtenidos en la curva E0 de cada tratamiento.



3.2. Estudio de los mecanismos indirectos implicados en las acciones inhibitoras serotoninérgicas en ratas hiperglucémicas tratadas con fluoxetina durante 14 días.

La administración i.v. de ODQ es capaz de revertir completamente el efecto inhibitor producido por 8-OH-DPAT (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$; Figura 38 a), y de manera parcial la acción inhibitora de 5-HT (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$; Figura 39). Sin embargo, el efecto inhibitor L-694,247 (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$; Figura 38 b) sobre las respuestas presoras obtenidas por estimulación eléctrica en ratas hiperglucémicas tratadas con fluoxetina durante 14 días no se vio modificado en los animales pretratados con ODQ (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

El efecto inhibitor producido por 5-HT (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) es parcialmente revertido en

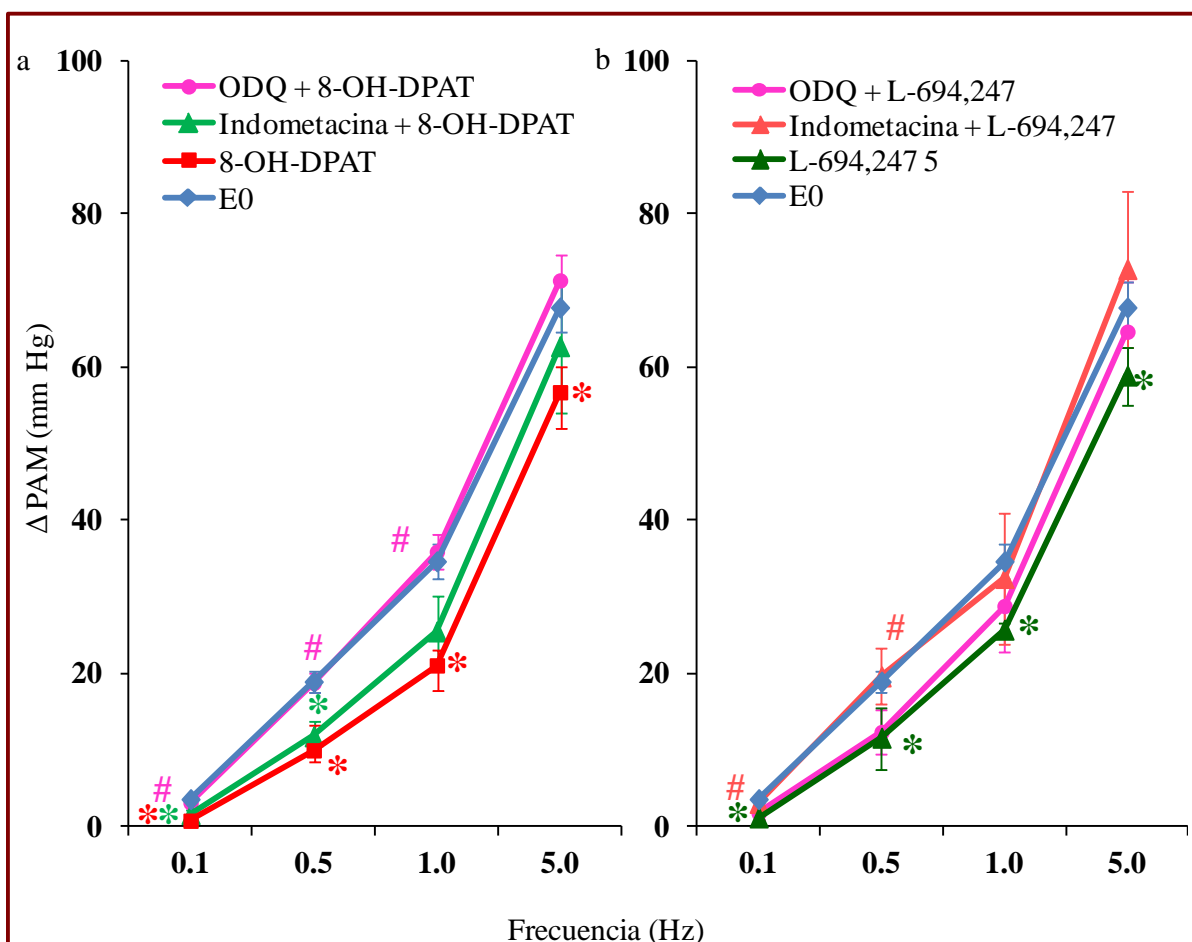
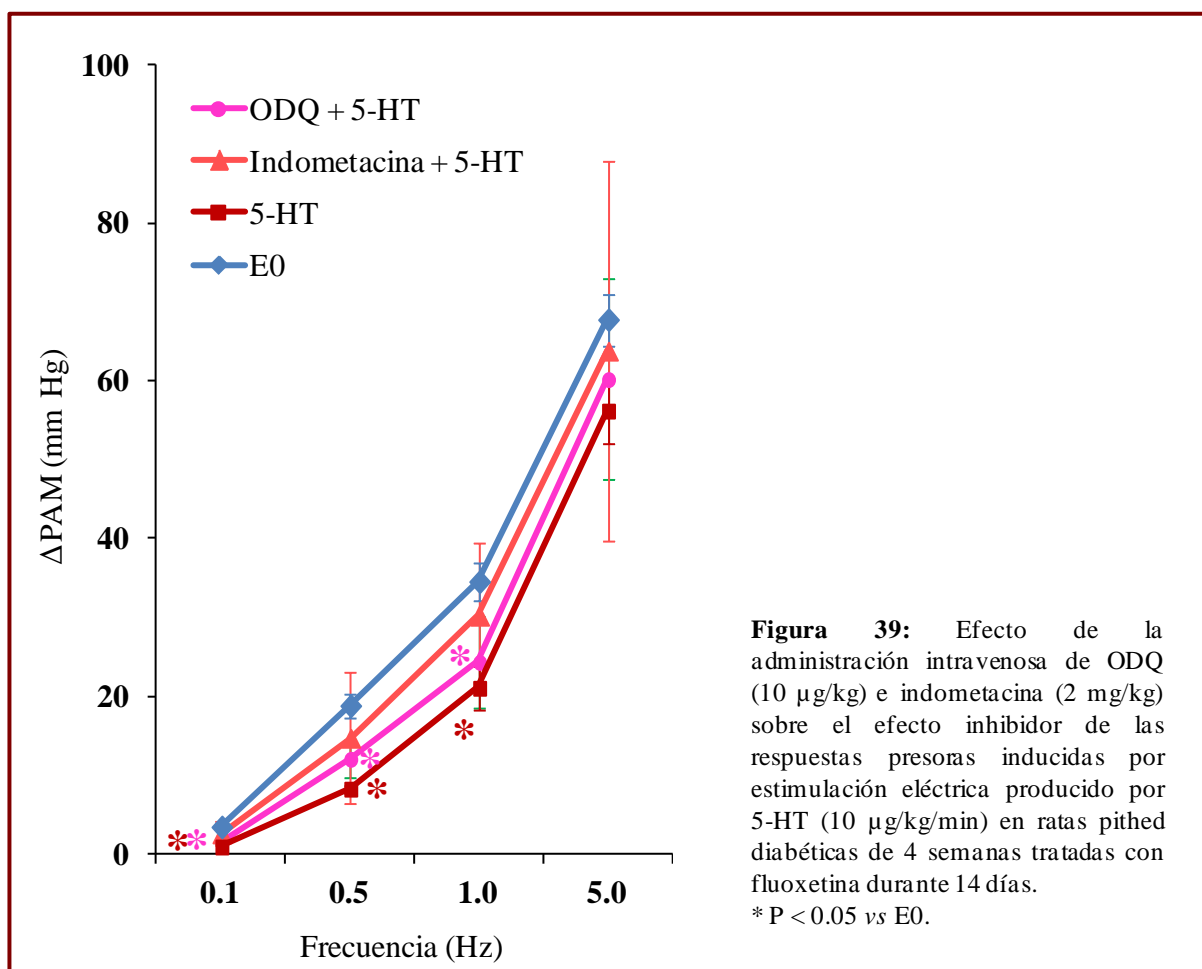


Figura 38: Efecto de la perfusión intravenosa de (a) 8-OH-DPAT (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) y (b) L-694,247 (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) en las respuestas presoras inducidas por estimulación eléctrica en presencia de ODQ (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) o de indometacina (2 mg/kg) en ratas pithed diabéticas de 4 semanas tratadas con fluoxetina durante 14 días.

* $P < 0.05$ vs E0.

$P < 0.05$ vs cada agonista.

presencia de indometacina (2 mg/kg), inhibidor no selectivo de ciclooxigenasa (Figura 39). Del mismo modo, indometacina bloquea totalmente la acción inhibidora sobre las respuestas presoras inducidas por estimulación eléctrica de L-694,247 (5 μ g/kg/min; Figura 38 b). Sin embargo, 8-OH-DPAT (5 μ g/kg/min), en presencia de indometacina (2 mg/kg) continúa ejerciendo su acción inhibidora (Figura 38 a).



La administración i.v. tipo bolus de L-NAME (10 mg/kg), inhibidor de la oxido nítrico sintasa, bloqueó el efecto inhibidor de 8-OH-DPAT (5 μ g/kg/min) (Figura 40 a).

El pretratamiento con L-arginina (100 mg/kg), 30 minutos después de la administración intravenosa de L-NAME, dio lugar a que la perfusión continua del agonista de receptores 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT (5 μ g/kg/min) manifestara, de nuevo, el efecto inhibidor sobre los incrementos de presión arterial obtenidos por estimulación eléctrica (Figura 40 a).

El pretratamiento con el inhibidor selectivo de COX-1, FR122047, (1.5 mg/kg) bloqueó el efecto inhibitor producido por L-694,247 sobre los incrementos de presión obtenidos por estimulación eléctrica. Sin embargo el pretratamiento con el inhibidor de COX-2, nimesulida (1.5 mg/kg), no fue capaz de revertir dicho efecto inhibitor sobre la respuesta presora (Figura 40 b).

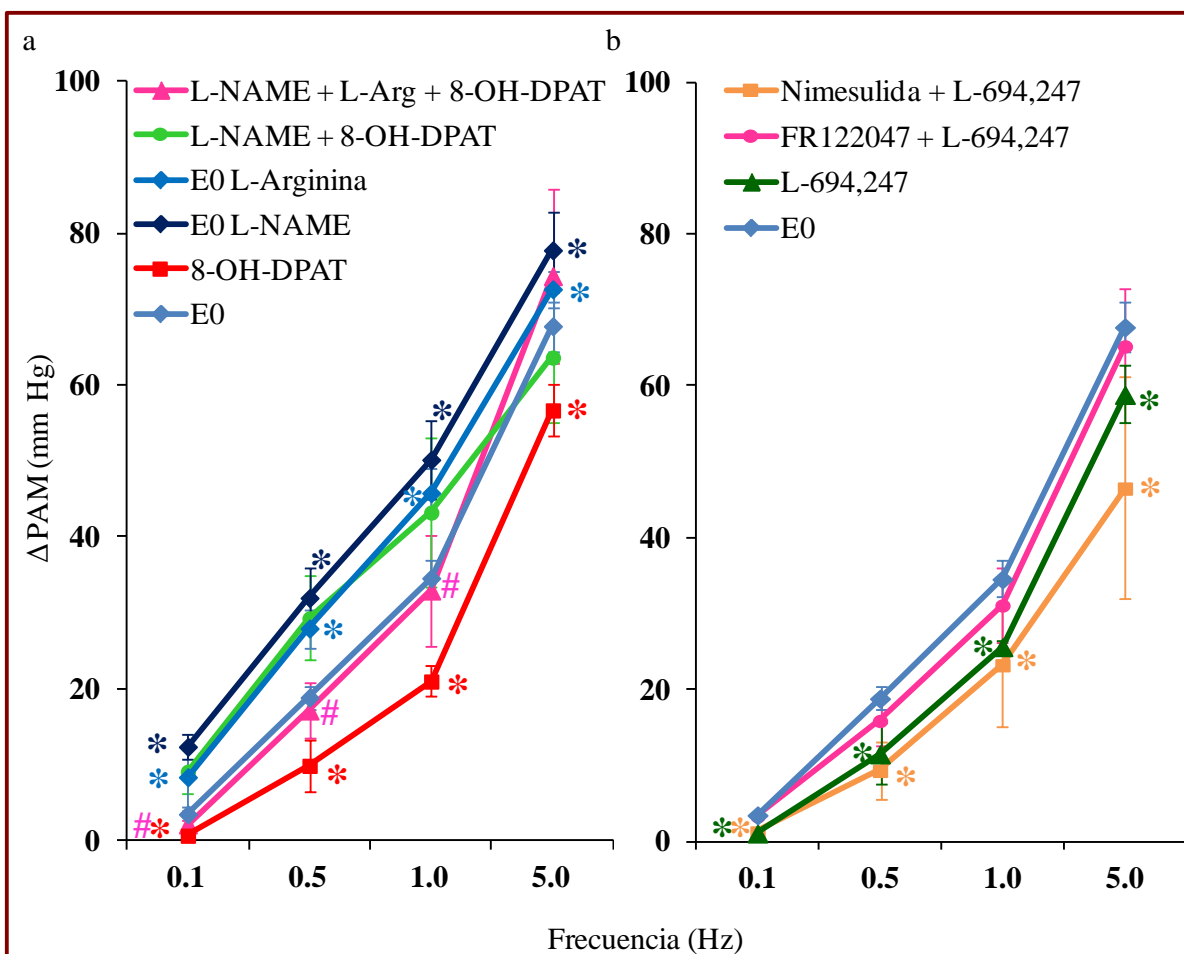


Figura 40: Efecto de la perfusión de (a) 8-OH-DPAT (5 μ g/kg/min) en presencia de L-NAME (10 mg/kg) o L-NAME (10 mg/kg) + L-Arginina (100 mg/kg) y (b) de L-694,247 (5 μ g/kg/min) en presencia de nimesulida (1.5 mg/kg) o de FR122047 (1.5 mg/kg) en las respuestas presoras inducidas por estimulación eléctrica en ratas pithed diabéticas de 4 semanas tratadas con fluoxetina durante 14 días.

* P < 0.05 vs E0.

P < 0.05 vs E0 L-Arginina.

3.3. Estudio de los mecanismos indirectos implicados en las acciones potenciadoras serotoninérgicas en ratas hiperglucémicas tratadas con fluoxetina durante 14 días.

El efecto potenciador de la respuesta presora obtenida por estimulación eléctrica, inducida por α -metil-5-HT (5 μ g/kg/min) se vio bloqueado con la administración de indometacina, inhibidor no selectivo de COX (1.5 mg/kg), de ICI 192,605 (0.5 mg/kg) (Figura 41 a), antagonista de receptores de tromboxano A₂, nimesulida (1.5 mg/kg), inhibidor selectivo COX-2 ó FR122047 (1.5 mg/kg), inhibidor selectivo de COX-2. (Figura 41 b).

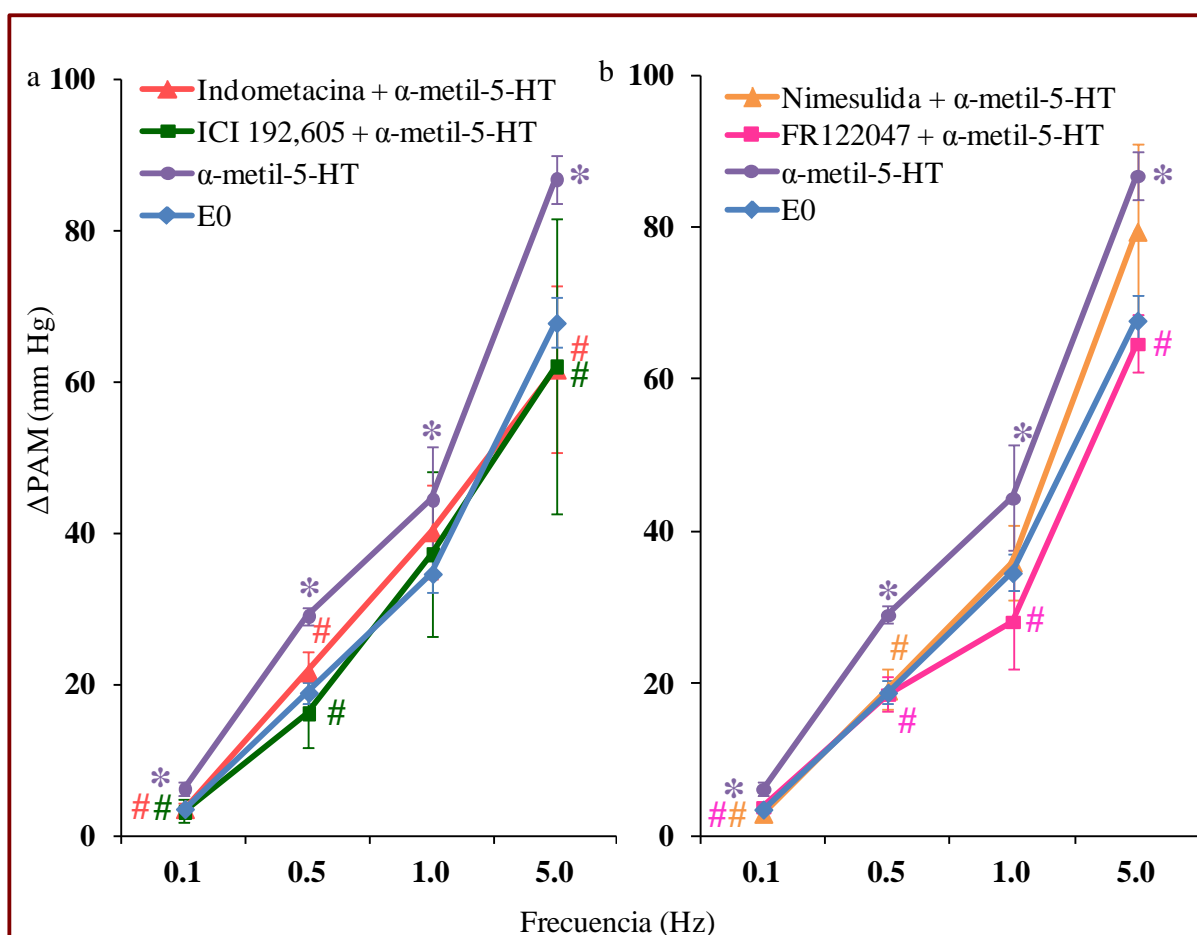


Figura 41: Efecto de la perfusión intravenosa de α -metil-5-HT (5 μ g/kg/min) en las respuestas presoras inducidas por estimulación eléctrica en presencia de (a) indometacina (2 mg/kg) o de ICI 192,605 (0.5 mg/kg) y de (b) nimesulida (1.5 mg/kg) o FR122047 (1.5 mg/kg) en ratas pithed. diabéticas de 4 semanas tratadas con fluoxetina durante 14 días

* P < 0.05 vs E0.

P < 0.05 vs α -metil-5-HT.

III. ESTIMULACIÓN COLINÉRGICA.

La estimulación eléctrica del nervio vago en ratas desmeduladas (pithed), en nuestras condiciones experimentales y a distintas frecuencias de estimulación, interfirió con la transmisión colinérgica cardíaca, provocando una acción bradicardizante frecuencia dependiente⁽¹⁵⁵⁻¹⁵⁷⁾.

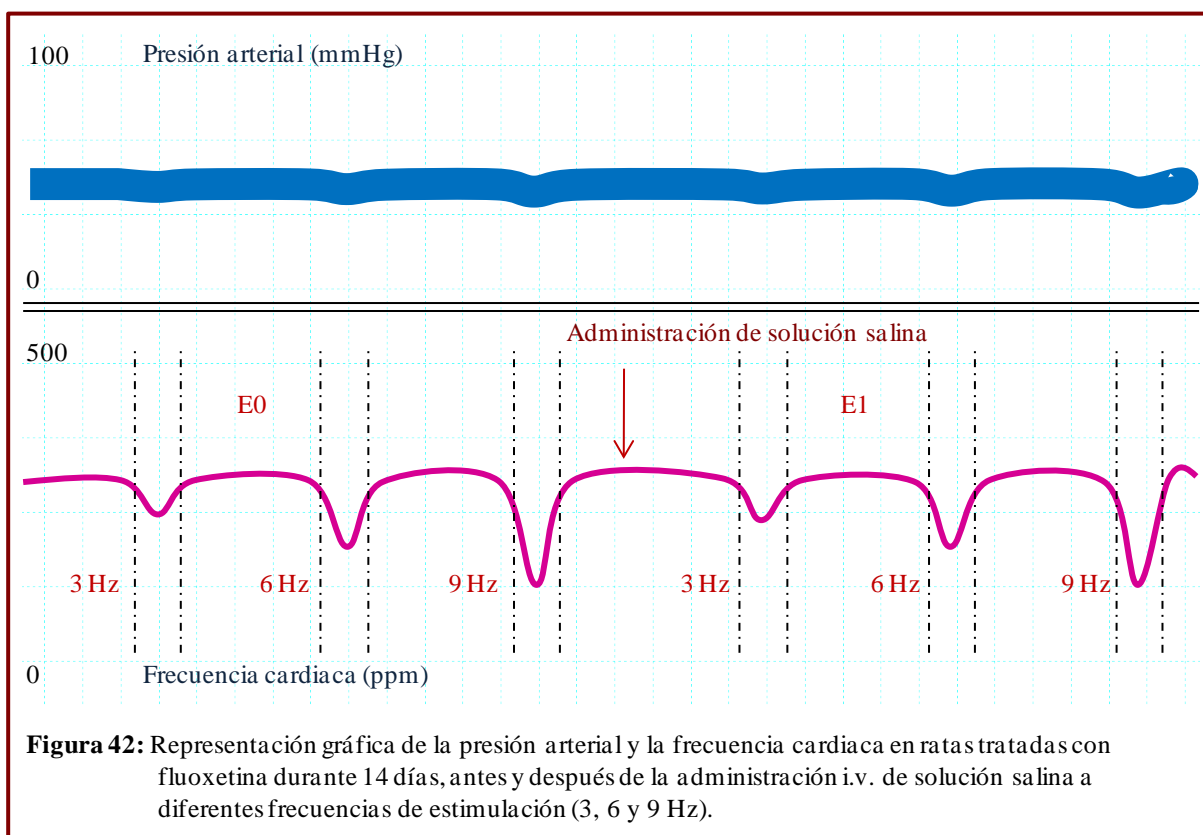
1. RATAS NORMOGLUCÉMICAS TRATADAS CON FLUOXETINA DURANTE 14 DÍAS.

Las ratas Wistar normoglucémicas pithed tratadas con fluoxetina durante 14 días, utilizadas en nuestros experimentos, presentaron valores de presión arterial y frecuencia cardíaca de 50.30 ± 3.10 mm Hg y de 279.20 ± 5.50 ppm respectivamente. La disminución de la frecuencia cardíaca obtenida en nuestras condiciones experimentales fue producida por una estimulación de las neuronas vagales a nivel cardíaco, preferentemente a nivel preganglionar^(155, 300), que llevó a la liberación de acetilcolina. Esta liberación de acetilcolina conllevó una activación de receptores colinérgicos, que fueron los responsables de la bradicardia. Esta acción explicó que la bradicardia producida por estimulación eléctrica fuera reproducida por acetilcolina exógena y totalmente inhibida tras la administración de atropina.

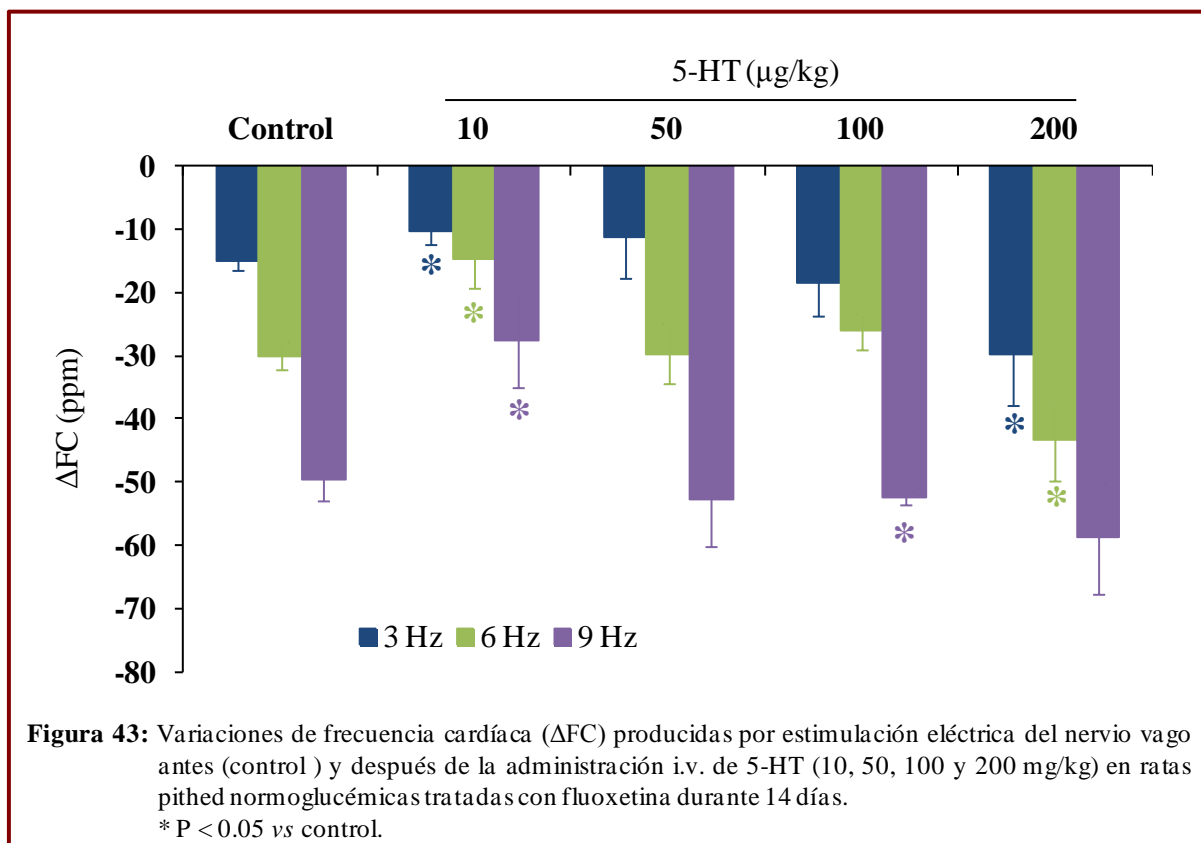
1.1. Efecto de la administración i.v. de solución salina o 5-HT sobre la bradicardia obtenida por estimulación eléctrica del nervio vago en ratas normoglucémicas tratadas con fluoxetina durante 14 días.

La estimulación eléctrica vagal en ratas normoglucémicas tratadas con fluoxetina durante 14 días, a las frecuencias de 3, 6 y 9 Hz, dio lugar a una bradicardia frecuencia dependiente. A las frecuencias utilizadas en la curva estimulación control, la disminución de la frecuencia cardíaca fue respectivamente de: -15.20 ± 1.20 , -29.90 ± 2.10 , -49.50 ± 3.30 ppm, mientras que la presión arterial no se modificó significativamente durante todo el experimento (Figura 42).

Dichos descensos se mantuvieron sin cambios significativos en los animales que recibieron 1 ml/kg de solución salina.



La administración por vía i.v. de dosis bajas de 5-HT (10 y 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) provocó una reducción de la bradicardia obtenida por estimulación vagal, significativa a la dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Sin embargo, la administración de dosis altas de 5-HT (100 y 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$), dio lugar a una potenciación de dicha bradicardia (Figura 43).

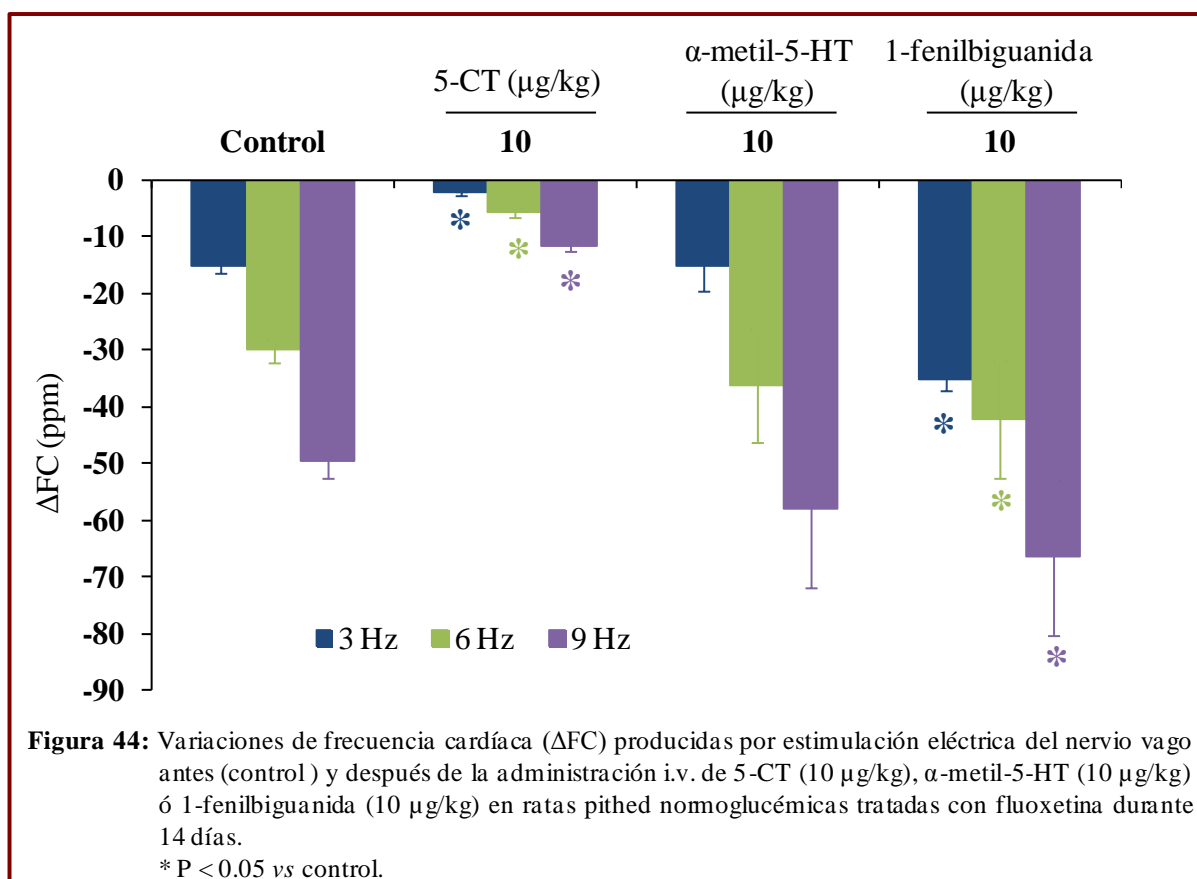


1.2. Efecto de la administración i.v. de agonistas serotoninérgicos (5-CT, α -metil-5-HT, 1-fenilbiguanida, 8-OH-DPAT, L-694,247 y CGS-12066B) sobre la bradicardia obtenida por estimulación eléctrica del nervio vago en ratas normoglucémicas tratadas con fluoxetina durante 14 días.

La bradicardia inducida eléctricamente tras la administración i.v. tipo bolus del agonista selectivo 5-HT_{1/7}, 5-CT (10 μ g/kg) fue significativamente inferior a la obtenida en el grupo control (Figura 44).

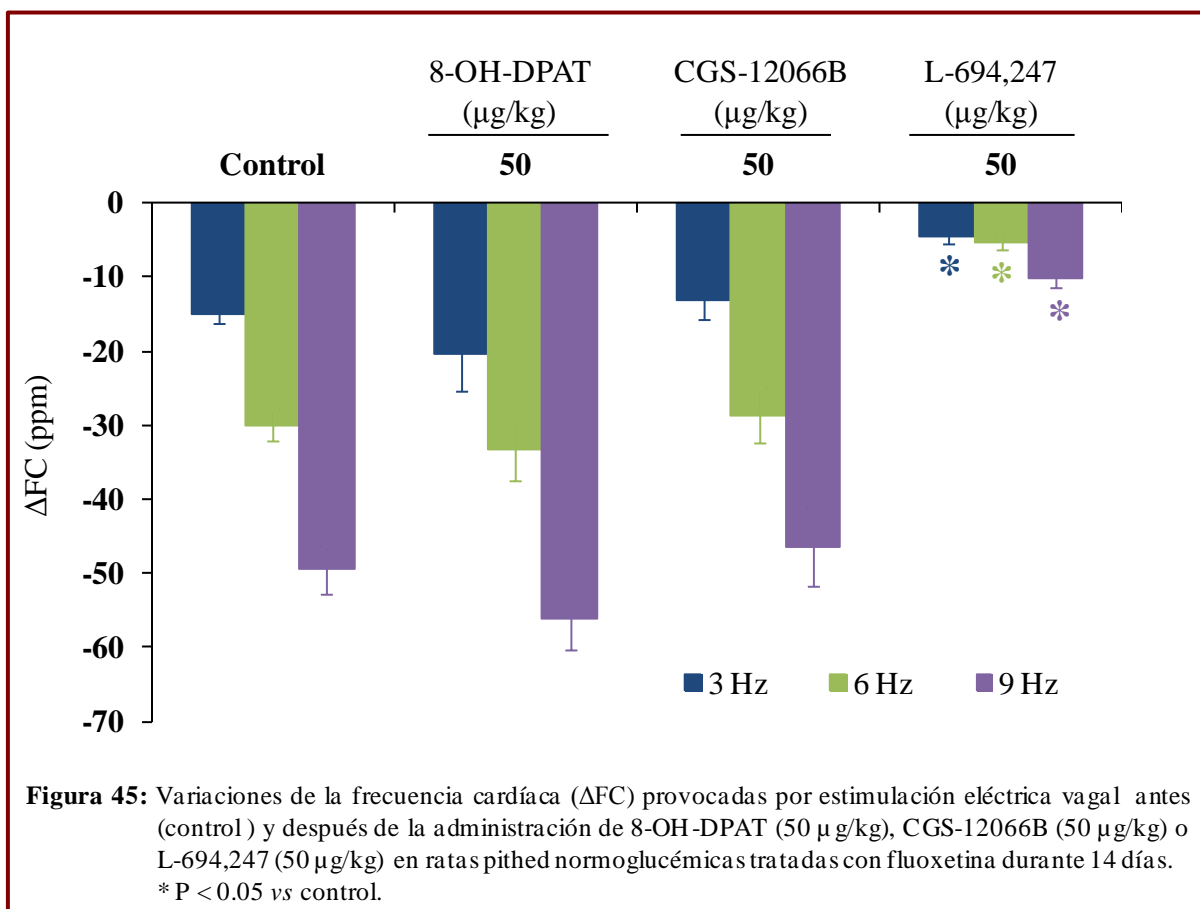
La administración del agonista de receptores 5-HT₃, 1-fenilbiguanida (10 μ g/kg) potenció la bradicardia a las tres frecuencias de estimulación ensayadas (Figura 44).

Sin embargo, la administración de α -metil-5-HT (10 μ g/kg), agonista selectivo de los receptores 5-HT₂, no modificó la bradicardia inducida por estimulación eléctrica vagal (Figura 44).



El efecto inhibitor de 5-CT, fue reproducido con la administración i.v. del agonista selectivo del receptor 5-HT_{1D}, L-694,247 (50 µg/kg) (Figura 45).

Sin embargo, ni la administración del agonista selectivo de receptores 5-HT_{1B}, CGS-12066B (50 µg/kg), ni del agonista selectivo de receptores 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT, modificaron la bradicardia inducida por estimulación eléctrica (Figura 45).

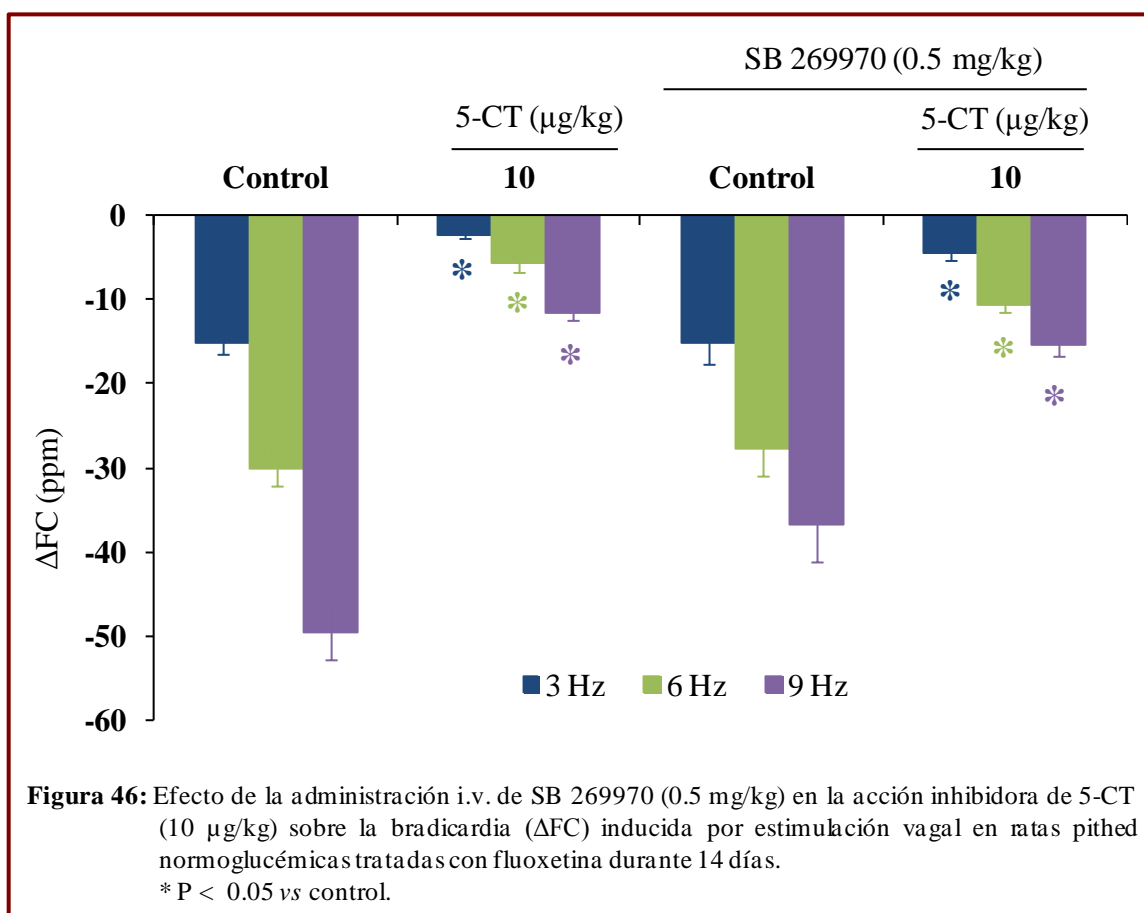


1.3. Efecto de los antagonistas de receptores 5-HT_{1D}, 5-HT₇ y 5-HT₃ sobre la bradicardia obtenida por estimulación eléctrica del nervio vago en ratas normoglucémicas tratadas con fluoxetina durante 14 días.

El pretratamiento con SB 269970 (0.5 mg/kg), antagonista selectivo de los receptores 5-HT₇, BRL-15572 (1 mg/kg), antagonista selectivo del receptor 5-HT_{1D} o MDL-72222 (1 mg/kg), antagonista selectivo de los receptores 5-HT₃ no modificó la bradicardia obtenida por estimulación eléctrica vagal a ninguna de las frecuencias utilizadas (Figuras 46 y 47).

En presencia de SB 269970 (0.5 mg/kg), 5-CT (10 µg/kg) continuó ejerciendo la acción inhibitoria de la bradicardia obtenida por estimulación vagal (Figura 46).

El pretratamiento con BRL-15572 (1 mg/kg) o MDL-72222 (1 mg/kg) bloquearon la inhibición de la bradicardia inducida por L-694,247 (50 µg/kg) y la potenciación producida por el agonista de los receptores 5-HT₃, 1-fenilbiguanida (10 µg/kg) (Figura 47).



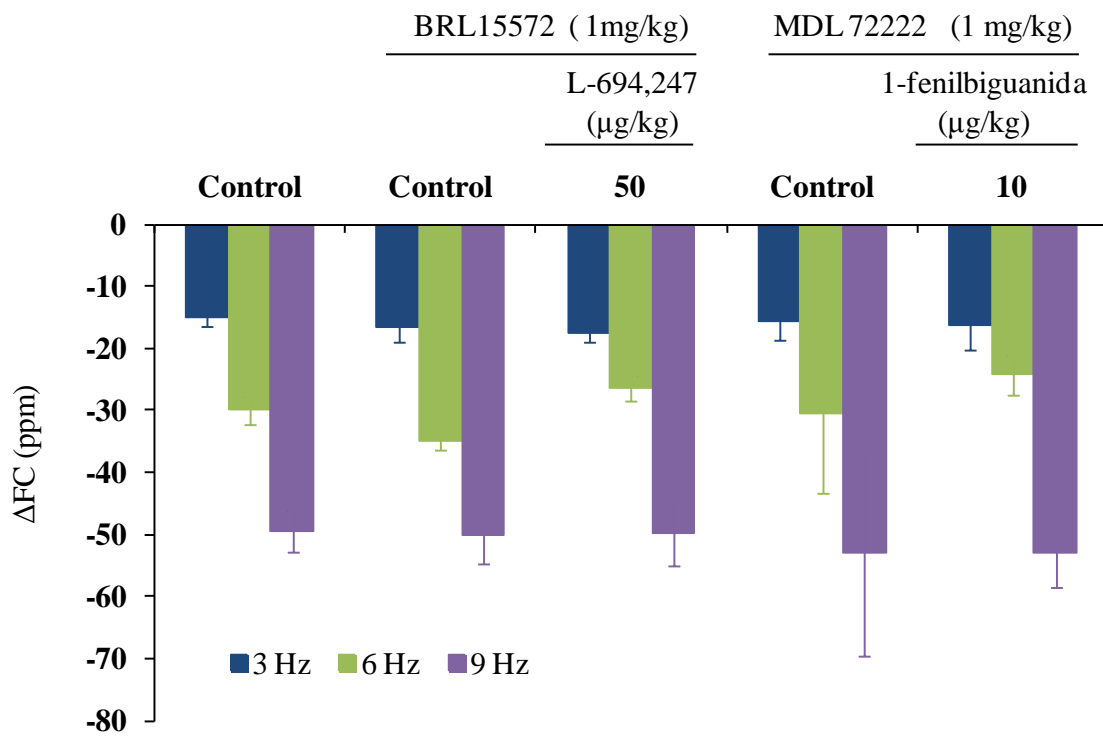
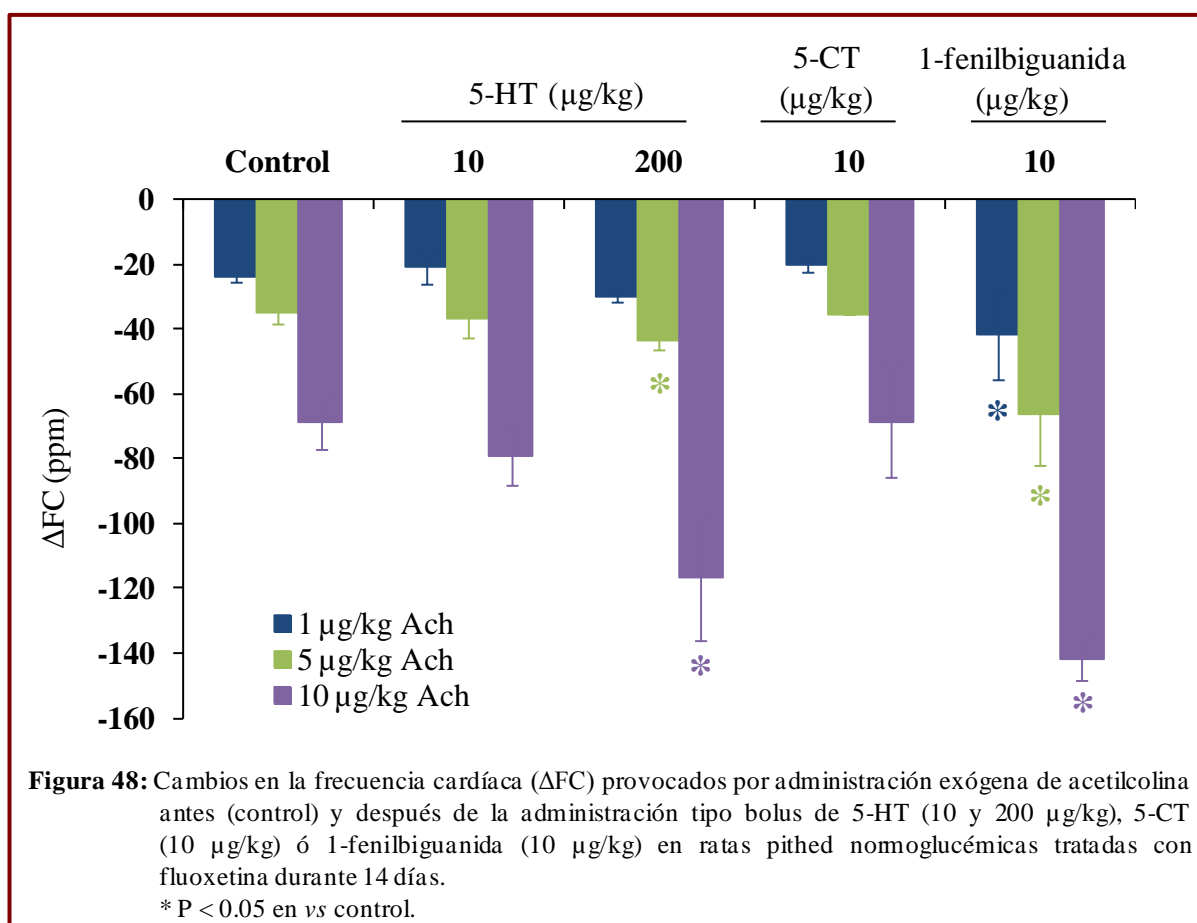


Figura 47: Efecto de la administración i.v. de BRL 15572 (1 mg/kg) sobre la acción inhibitoria de L-694,247 (50 μ g/kg) y de MDL 72222 (1 mg/kg) sobre la acción potenciadora de 1-fenilbiguanida (10 μ g/kg) en la bradicardia (ΔFC) inducida por estimulación vagal en ratas pithed normoglucémicas tratadas con fluoxetina durante 14 días.

1.4. Efecto de 5-HT, 5-CT y 1-fenilbiguanida sobre las respuestas bradicardizantes obtenidas por la administración de acetilcolina exógena en ratas normoglucémicas tratadas con fluoxetina durante 14 días.

La administración exógena de acetilcolina (1, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) en ratas normoglucémicas tratadas con fluoxetina durante 14 días, dio lugar a una bradicardia dosis-dependiente (Figura 48). La administración de 5-HT (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) o de 5-CT (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) no modificó la bradicardia obtenida por administración de Ach exógena. Sin embargo, la administración de 5-HT (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) o de 1-fenilbiguanida (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) dio lugar a una potenciación significativa de la bradicardia (Figura 48).



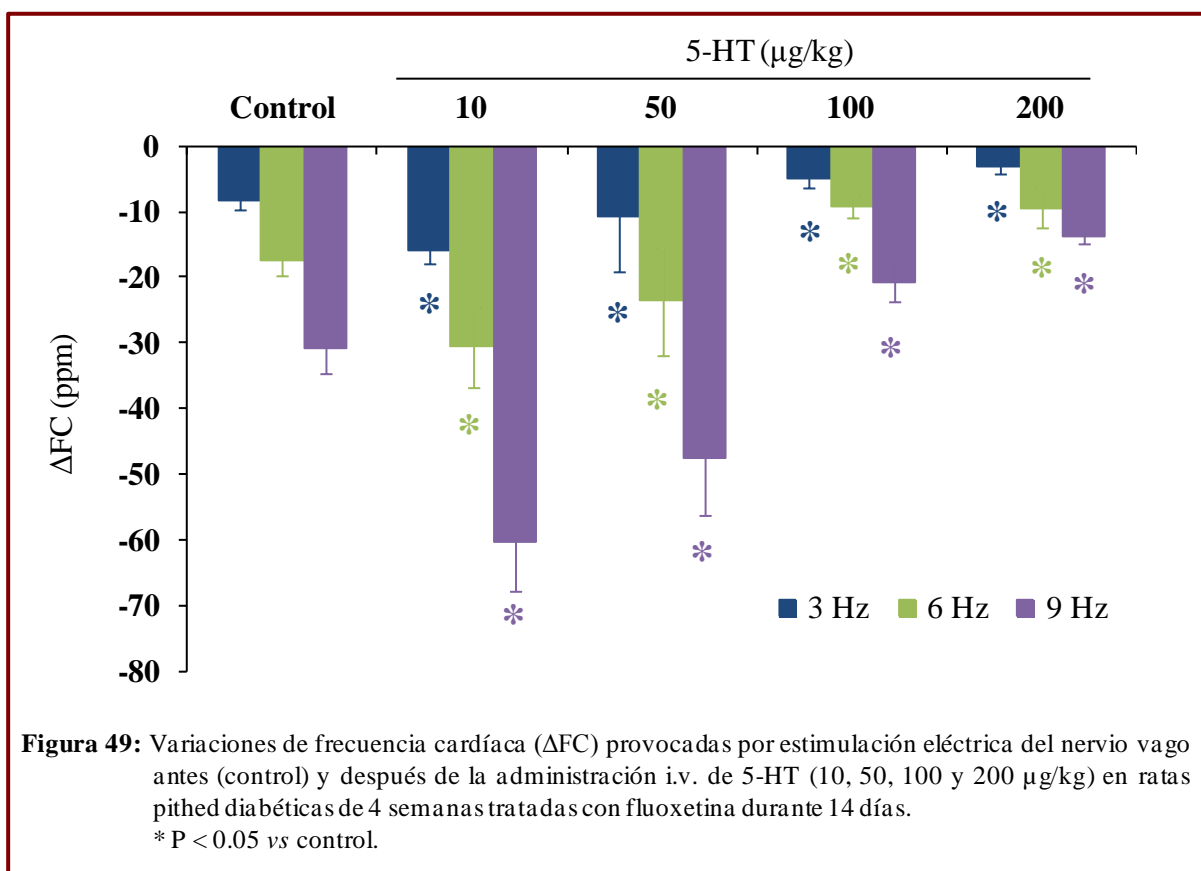
2. RATAS HIPERGLUCÉMICAS TRATADAS CON FLUOXETINA DURANTE 14 DÍAS.

Las ratas Wistar hiperglucémicas pithed tratadas con fluoxetina durante 14 días utilizadas en nuestros experimentos presentaron valores de presión arterial y frecuencia cardiaca de 52.16 ± 4.60 mm Hg y de 264.40 ± 7.70 ppm respectivamente.

2.1. Efecto de la administración i.v. de solución salina o 5-HT sobre la bradicardia obtenida por estimulación eléctrica del nervio vago en ratas hiperglucémicas tratadas con fluoxetina durante 14 días.

La estimulación eléctrica vagal en ratas hiperglucémicas tratadas con fluoxetina durante 14 días, a las frecuencias de 3, 6 y 9 Hz, dio lugar a una bradicardia frecuencia dependiente. A las frecuencias utilizadas en la curva estimulación respuesta control, la disminución de la frecuencia cardiaca fue de : -8.29 ± 1.28 , -17.40 ± 2.20 y -30.70 ± 3.81 ppm respectivamente. Dichos descensos se mantuvieron sin cambios significativos en los animales que recibieron 1 ml/kg de solución salina. La bradicardia originada por estimulación eléctrica en ratas hiperglucémicas tratadas durante 14 días con fluoxetina fue menor que la obtenida bajo las mismas condiciones en ratas normoglucémicas tratadas con fluoxetina durante 14 días, mientras que la presión arterial no se modificó significativamente durante todo el experimento.

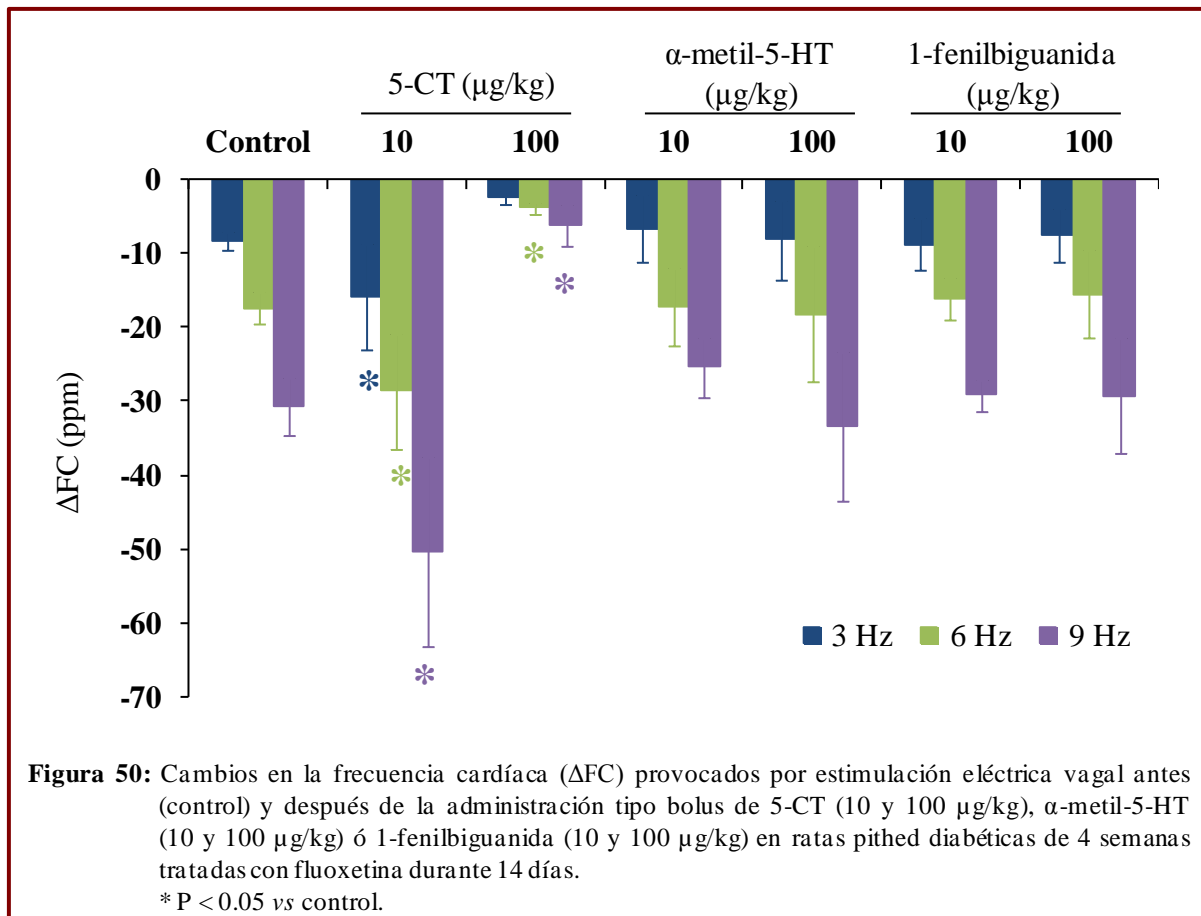
La administración por vía i.v. de 5-HT a dosis de 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ provocó una potenciación de la bradicardia obtenida por estimulación vagal a todas las frecuencias ensayadas. Sin embargo, la administración de dosis más elevadas de 5-HT (100 y 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$), originó una inhibición de la bradicardia inducida vagalmente (Figura 49).



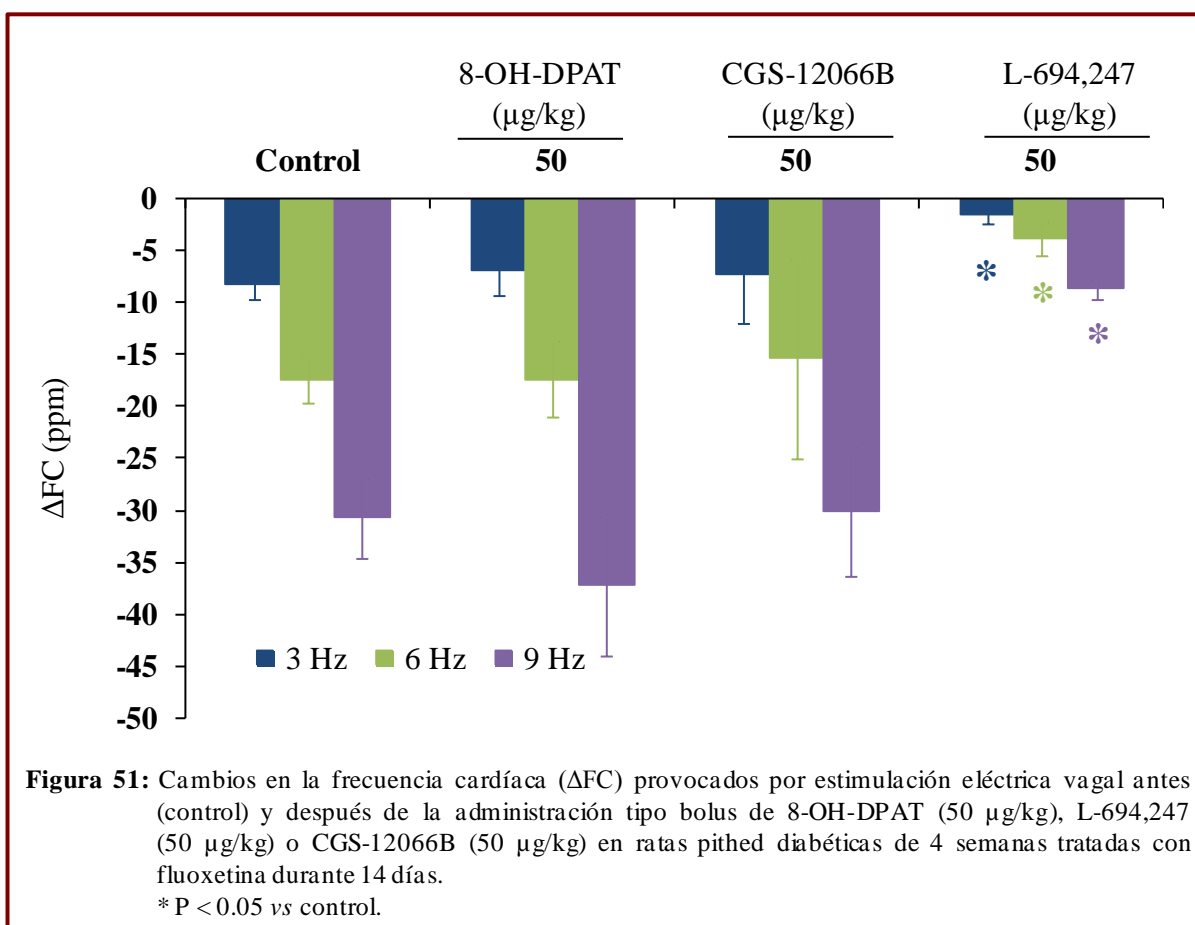
2.2. Efecto de la administración i.v. de solución salina (control) o agonistas serotoninérgicos (5-CT, α -metil-5-HT, 1-fenilbiguanida, 8-OH-DPAT, L-694,247 y CGS-12066B) sobre la bradicardia obtenida por estimulación eléctrica del nervio vago en ratas hiper glucémicas tratadas con fluoxetina durante 14 días.

La bradicardia inducida eléctricamente tras la administración i.v. tipo bolus del agonista selectivo de receptores 5-HT_{1/7}, 5-CT a dosis bajas (10 μ g/kg) fue significativamente superior a la obtenida en el grupo control (Figura 50). Mientras que la dosis más elevada de 5-CT (100 μ g/kg) dio lugar a una disminución de la bradicardia obtenida por estimulación eléctrica a todas las frecuencias de estimulación (Figura 50).

Ni la administración del agonista de receptores 5-HT₃, 1-fenilbiguanida (10 y 100 μ g/kg) ni la administración del agonista de receptores 5-HT₂, α -metil-5-HT (10 y 100 μ g/kg), modificaron la bradicardia obtenida por estimulación eléctrica. (Figura 50).



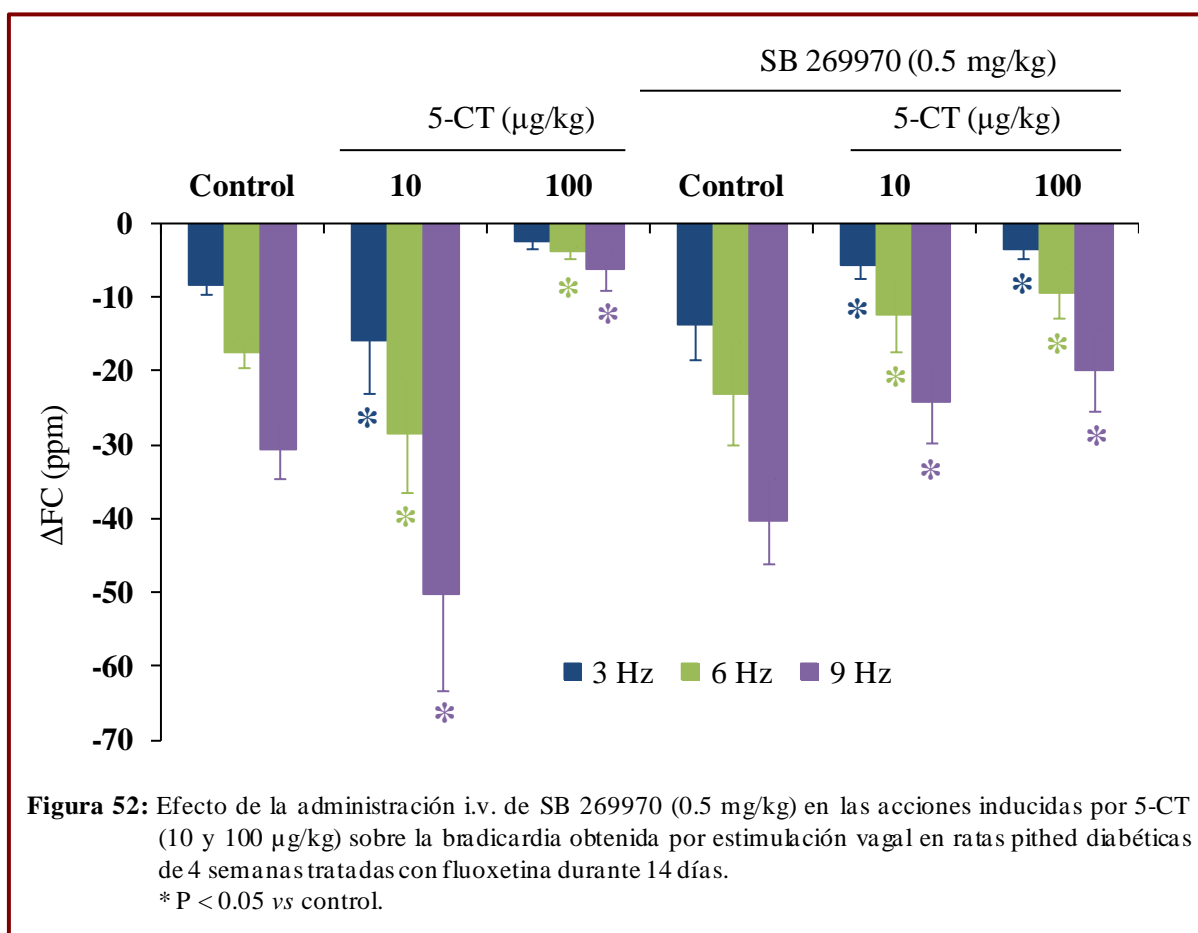
El efecto inhibitor inducido por las dosis elevadas de 5-CT es reproducido por el agonista selectivo de receptores 5-HT_{1D}, L-694,247 (50 µg/kg) (Figura 51), siendo la inhibición significativa a todas las frecuencias de estimulación ensayadas. Sin embargo, la administración i.v. tipo bolus del agonista selectivo de receptores 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT (50 µg/kg) o del agonista selectivo de receptores 5-HT_{1B}, CGS-12066B (50 µg/kg), no modificó la bradicardia inducida por estimulación eléctrica del nervio vago (Figura 51).



2.3. Efecto de los antagonistas de receptores 5-HT_{1D}, y 5-HT₇ sobre la bradicardia obtenida por estimulación eléctrica del nervio vago en ratas hiper glucémicas tratadas con fluoxetina durante 14 días.

En ratas diabéticas de cuatro semanas tratadas con fluoxetina durante 14 días, la administración i.v. tanto de SB 269970 (0.5 mg/kg), antagonista selectivo de receptores 5-HT₇ (Figura 52), como de BRL-15572 (1 mg/kg), antagonista selectivo de receptores 5-HT_{1D}, no modificó significativamente la bradicardia inducida por estimulación eléctrica (Figura 53).

El pretratamiento con el antagonista de receptores 5-HT₇, SB 269970 (0.5 mg/kg), modificó la respuesta obtenida por 5-CT, originando una acción inhibitoria que se manifiesta tanto a dosis bajas como a dosis altas (Figura 52).



La administración del antagonista selectivo de receptores 5-HT_{1D}, BRL-15572 (1 mg/kg), bloqueó la inhibición de la bradicardia obtenida por la administración i.v. de L-694,247 (50 µg/kg) (Figura 53).

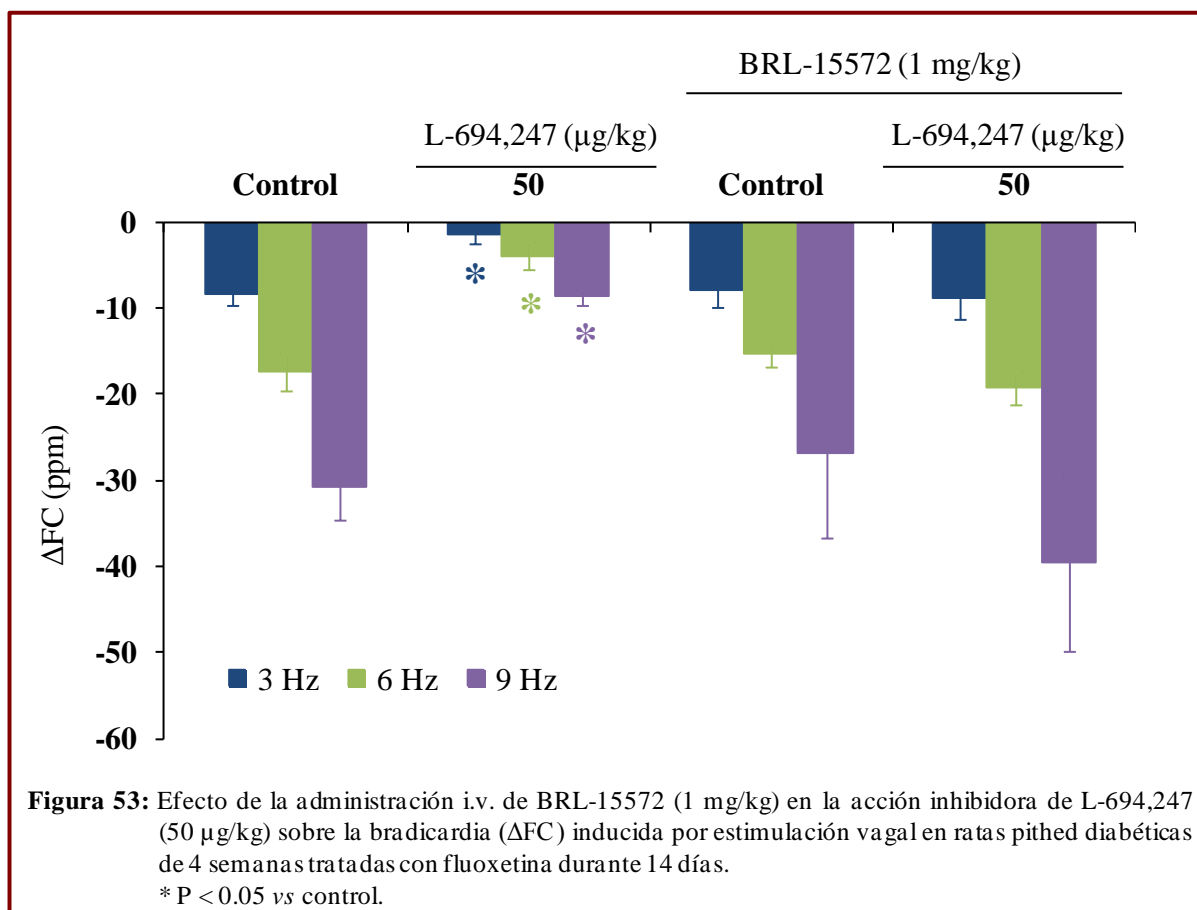
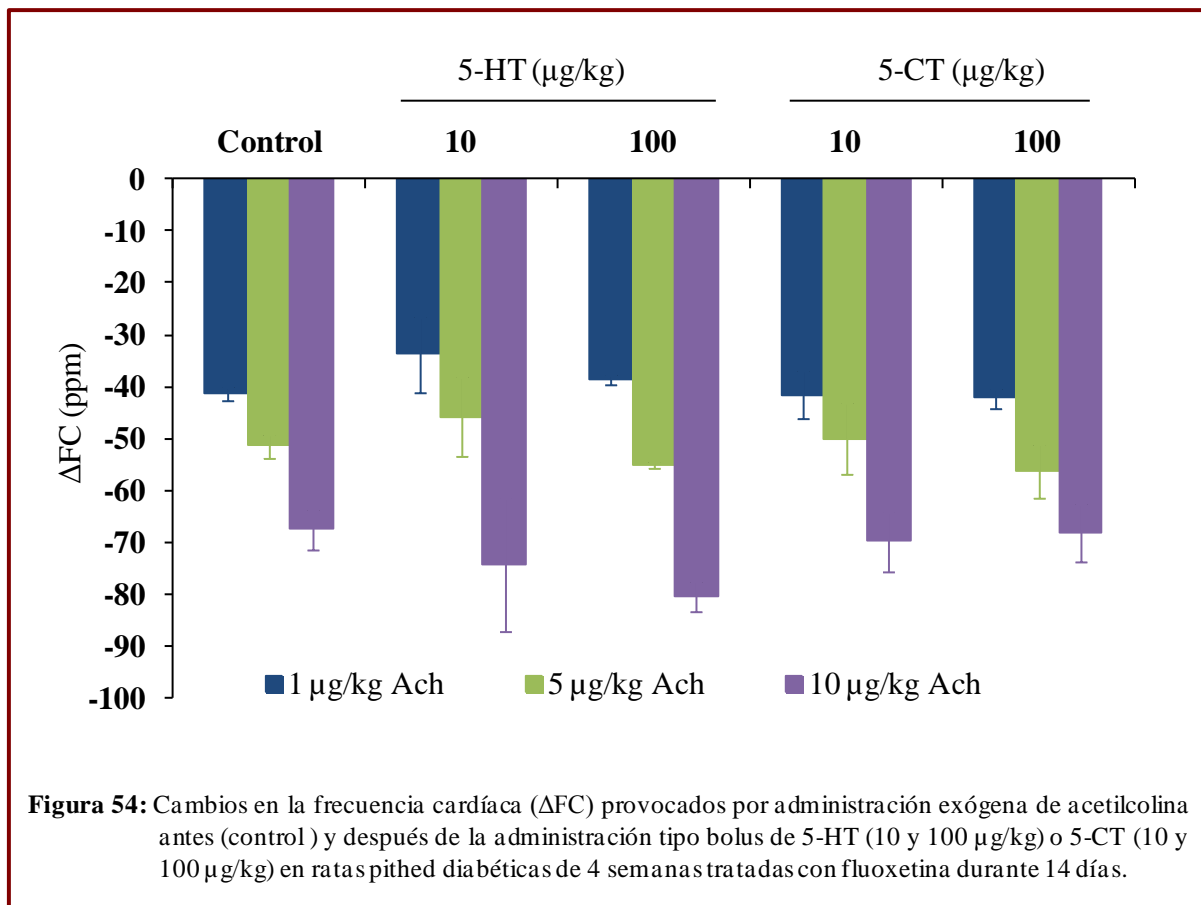


Figura 53: Efecto de la administración i.v. de BRL-15572 (1 mg/kg) en la acción inhibitoria de L-694,247 (50 µg/kg) sobre la bradicardia (ΔFC) inducida por estimulación vagal en ratas pithed diabéticas de 4 semanas tratadas con fluoxetina durante 14 días.

* $P < 0.05$ vs control.

2.4. Efecto de 5-HT y 5-CT sobre las respuestas bradicardizantes obtenidos por la administración de acetilcolina exógena en ratas hiperglucémicas tratadas con fluoxetina durante 14 días.

En este grupo de animales la bradicardia fue inducida por administración de un agonista muscarínico, acetilcolina exógena (1, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Este efecto bradicardizante (frecuencia dependiente) en ratas diabéticas de 4 semanas tratadas con fluoxetina durante 14 días se mantiene estable tras la administración i.v. tipo bolus de solución salina (1 ml/kg), de 5-HT (10 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) o de 5-CT (10 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (Figura 54).



DISCUSIÓN

Existen múltiples evidencias de que las variadas acciones e implicaciones serotoninérgicas a nivel cardiovascular, están condicionadas por aspectos tales como la especie animal en estudio, el lecho vascular analizado, el tono simpático basal o la existencia de una patología subyacente^(130, 132, 133, 157, 163-166). De hecho en lo que se refiere a la modulación serotoninérgica sobre la neurotransmisión simpática y parasimpática vascular, nuestro grupo ha establecido que la existencia de una situación de hiperglucemia experimental o de hipertensión, genera cambios significativos no sólo en las acciones directas de 5-HT sino también en los mecanismos indirectos implicados^(157, 165).

La complejidad de acciones de 5-HT y otros agonistas serotoninérgicos se comprende en parte por la diversidad de receptores serotoninérgicos que en la actualidad se conocen^(17, 18). La disponibilidad, cada vez mayor de agonistas y antagonistas selectivos de los diferentes tipos, e incluso subtipos, de tales receptores junto con los avances farmacodinámicos, son factores importantes a la hora de poder justificar, con mayor rigor y exactitud, las diferencias de actividad encontradas.

Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación han podido demostrar que 5-HT y determinados mecanismos serotoninérgicos afectan a la transmisión simpática y parasimpática, en ratas desmeduladas y que la existencia de diabetes experimental inducida en ratas con aloxano y mantenida durante cuatro semanas, genera cambios significativos en la modulación que 5-hidroxitriptamina y determinados mecanismos serotoninérgicos, ejercen en la neurotransmisión *in vivo*^(89, 137, 155, 163, 164). De igual modo, hemos detectados cambios inducidos por diabetes o hipertensión en determinadas acciones vasculares analizadas en territorios vasculares autoperfundidos (renal, mesentérico y tren posterior) así como en la expresión de determinados tipos y subtipos de receptores serotoninérgicos^(131-134, 137, 138, 145).

De acuerdo con los antecedentes existentes y los resultados ya obtenidos por nosotros, planteamos en esta memoria de Tesis Doctoral, que el tratamiento con fluoxetina, antidepressivo de frecuente uso en clínica que ha evidenciado efectos derivados de la recaptación de 5-HT y también de NA en ratas, podría afectar a las implicaciones que 5-HT ejerce tanto a nivel de neurotransmisión simpática y parasimpática no sólo en ratas normoglucémicas sino también en situación de diabetes experimental.

Los resultados obtenidos en ratas tratadas con fluoxetina y posteriormente desmeduladas, en experimentos de estimulación simpática, coinciden en parte con los mostrados en ratas normoglucémicas^(163, 179, 301) y en ratas hiperglucémicas⁽¹⁶⁵⁾, donde son los receptores serotoninérgicos 5-HT₁ los que principalmente median la inhibición de respuestas presoras obtenidas por estimulación eléctrica. No obstante, hemos observado determinadas diferencias que probablemente tienen que ver con este tratamiento, encontrando acciones potenciadoras relacionadas con la activación de receptores 5-HT₂ a diferencia de las encontradas en ratas normoglucémicas, no tratadas, donde el receptor implicado es el 5-HT₃⁽¹⁶³⁾.

De acuerdo con los resultados aquí obtenidos, el tratamiento antidepresivo con fluoxetina durante 7, 14 ó 21 días, a la dosis de 10 mg/kg/día no induce modificaciones significativas en la evolución del peso de los animales ni tampoco en los parámetros cardiovasculares de presión arterial y de frecuencia cardíaca. Los valores de glucosa en sangre de ratas tratadas con fluoxetina son ligeramente inferiores a los de animales no tratados, aunque esta variación no resulta significativa. En otras constantes fisiológicas (toma de comida, bebida, producción de heces y orina) tampoco se observan variaciones con respecto al grupo control. Estos resultados nos permiten deducir que el tratamiento antidepresivo por sí mismo, a la dosis y con la duración establecidas, no induce cambios significativos en parámetros que de acuerdo con estudios previos realizados por nosotros en animales con diabetes experimental, se van a modificar significativamente^(302, 303) por lo que, posteriormente, y con los resultados obtenidos en animales diabéticos, podremos comprobar si tal y como proponen otros autores^(67, 82) dicho tratamiento antidepresivo resulta beneficioso o no en situación de diabetes. Por su parte, los valores de creatinina, Na⁺, K⁺ y Cl⁻ no se ven modificados, lo que no permite deducir que los animales tratados además de no manifestar alteraciones orgánicas tales como hipertensión, hiperfagia o aumento de la diuresis, parecen mostrar una funcionalidad renal normal.

De acuerdo con nuestros resultados los incrementos de presión arterial media obtenidos por estimulación simpática en ratas tratadas durante 7 días fueron, aunque algo inferiores, muy similares a los obtenidos en ratas no tratadas. Sin embargo, tanto en ratas tratadas durante 14 días como en las tratadas durante 21 días, los incrementos de presión arterial media fueron significativamente inferiores a los observados en los animales no

tratados. De igual modo los experimentos con 5-HT y los agonistas selectivos de receptores 5-HT₁, 5-HT₂ y 5-HT₃, nos permitieron observar que las diferencias significativas frente a los controles se manifiestan solo partir de los 14 días de tratamiento con fluoxetina. De acuerdo con estos hechos, el resto de experimentos llevados a cabo en esta memoria de Tesis Doctoral, se realizan en ratas tratadas durante 14 días con fluoxetina a la dosis de 10 mg/kg/día.

Nuestros resultados muestran que, tal como ocurría en ratas control sin tratamiento antidepressivo^(89, 130, 157, 165, 166, 179), 5-HT interfiere en la neurotransmisión adrenérgica inhibiendo los incrementos de presión arterial obtenidos por estimulación simpática de manera significativa a partir de la dosis de 10 µg/kg/min, en todos los grupos ensayados (animales tratados durante 7, 14 ó 21 con fluoxetina). Esta inhibición, superior al 80%, es mayor a frecuencias de estimulación bajas y, coincidiendo con lo que proponen otros autores^(130, 163, 165, 304), nos induce a pensar en una localización presináptica, y por tanto, nos permite plantear que el tratamiento con fluoxetina, antidepressivo capaz de modular los niveles de serotonina, no modifica en principio la naturaleza mayoritariamente presináptica de la inhibición serotoninérgica en la neurotransmisión simpática^(89, 163).

Los resultados obtenidos con 5-CT, potente agonista de receptores 5-HT_{1/7}⁽¹⁷⁾, ponen de manifiesto un efecto inhibitor superior al ejercido por serotonina. La dosis de 5 µg/kg/min de 5-CT supera la inhibición desarrollada por 10 µg/kg/min de 5-HT, y es más intensa cuanto mayor es la duración del tratamiento con el ISRS.

La administración del agonista de receptores 5-HT₂, α-metil-5-HT⁽²⁷⁸⁾, origina a una potenciación de los incrementos de presión arterial media obtenidos al estimular eléctricamente todo el cordón espinal. Esta potenciación de manera similar a la inhibición de 5-HT ó 5-CT, es frecuencia dependiente, mayor a frecuencias de estimulación bajas, y mayor cuando se incrementa el tiempo de tratamiento con fluoxetina.

La mayor inhibición de 5-CT, junto con la potenciación observada al administrar α-metil-5-HT y junto con la ausencia de actividad del agonista selectivo 5-HT₃, 1-fenilbiguanida^(279, 305) nos confirma que al igual que en rata controles, el efecto inhibitor mediado por 5-hidroxitriptamina en ratas tratadas con fluoxetina se debe a la activación de receptores 5-HT_{1/7}.

Dado que 5-CT es un agonista 5-HT₁ que muestra afinidad por receptores 5-HT₇⁽¹⁷⁾ para el cual se describen acciones hipotensoras^(17, 91) que podrían participar, al menos en parte, en las acciones inhibitoras de serotonina sobre las respuestas presoras obtenidas por estimulación simpática, quisimos determinar la posible implicación de estos receptores 5-HT₇, administrando SB 269970, antagonista de receptores 5-HT₇^(288, 306, 307). Este antagonista no modificó la inhibición generada por 5-HT, por tanto podríamos excluir que la hipotensión propia derivada de la posible activación 5-HT₇ contribuya a la inhibición simpática. Esto estaría de acuerdo con los resultados previos obtenidos por nuestro grupo y otros autores, en ratas no tratadas con fluoxetina, donde se excluye que en la acción inhibitora de 5-HT sobre la transmisión simpática participe la activación 5-HT₇, confirmándose que la inhibición inducida por serotonina está mediada exclusivamente por la activación de receptores 5-HT₁^(89, 163).

En las ratas tratadas con fluoxetina el efecto inhibitorio de 5-HT y 5-CT, es reproducido por el agonista selectivo 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT^(280, 308), que demuestra una potencia similar al agonista 5-CT para este subtipo de receptor (pEC₅₀ valores de 8.2 y 8.6 respectivamente)⁽¹⁷⁾, inhibiendo el efecto presor obtenido por estimulación eléctrica, aparentemente con la misma intensidad que 5-CT. Una posible activación de receptores α₂-presinápticos por este agonista, tal y como propone Castillo y colaboradores⁽³⁰⁹⁾, podría explicar esta inhibición. Sin embargo, la reversibilidad total del efecto inhibitorio de 8-OH-DPAT tras la administración de WAY 100,635 un antagonista selectivo de 5-HT_{1A}⁽²⁸⁵⁾ y sin actividad antagonista α-adrenoceptora, junto con el bloqueo parcial obtenido con este antagonista sobre el efecto inhibitorio de 5-HT nos permite confirmar la participación de receptores 5-HT_{1A} en esta actividad inhibitoria.

La ausencia de actividad con el agonista selectivo del receptor 5-HT_{1B} CGS-12066B⁽²⁸¹⁾, permite excluir la posible participación de este subtipo de receptores en la inhibición observada para serotonina. Sin embargo, el agonista selectivo de receptores 5-HT_{1D}, L-694,247 en nuestros experimentos mostró una reducción de los incrementos de presión obtenidos por estimulación eléctrica que coinciden con los encontrados previamente por nosotros y otros autores tanto en estudios *in vitro* de especies no roedoras^(146, 169, 173, 174) como en estudios *in vivo* en ratas pithed^(89, 310). La participación del receptor 5-HT_{1D} se confirmó por la administración de un antagonista selectivo de este receptor, BRL-15572⁽²⁸⁶⁾,

que de forma significativa bloquea por completo la acción inhibitoria de L-694,247, y de manera parcial también bloquea el efecto inhibitorio de 5-HT.

Estos resultados nos permiten deducir la participación de los subtipos de receptores serotoninérgicos 1A y 1D en el efecto inhibitorio de serotonina en ratas tratadas con fluoxetina. La confirmación de estos resultados se demuestra con el pretratamiento simultáneo con los antagonistas WAY 100,635 y BRL-15572, con el que obtenemos una reversibilidad total de la respuesta inhibitoria obtenida por la perfusión de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ de 5-HT; confirmando, de esta manera, que son los subtipos 5HT_{1A} y 5-HT_{1D} los implicados en la respuesta inhibitoria que 5-HT ejerce en la neurotransmisión simpática vascular en ratas tratadas con fluoxetina durante 14 días a diferencia de lo encontrado anteriormente por nuestro grupo de trabajo en ratas no tratadas, donde el efecto inhibitorio se debía mayoritariamente a la activación de receptores serotoninérgicos del subtipo 5-HT_{1D}.

Además de una acción inhibitoria en ratas normoglucémicas tratadas durante 14 días con fluoxetina también se observó una potenciación de las respuestas presoras por estimulación simpática que se manifestó con la perfusión del agonista de receptores 5-HT_{2A/2B/2C}⁽²⁷⁸⁾, α -metil-5-HT, siendo esta potenciación, al igual que la acción inhibitoria, frecuencia y tiempo (de tratamiento) dependiente. Si bien es conocido que la activación por serotonina de receptores 5-HT₂ en grandes vasos induce vasoconstricción que es antagonizada por el bloqueo de tales receptores⁽¹⁰²⁾, este efecto potenciador no había sido descrito en nuestro grupo ya que las acciones potenciadoras encontradas anteriormente en ratas normoglucémicas⁽¹⁶³⁾, son debidas a la activación del receptor 5-HT₃.

La administración previa de un antagonista 5-HT₂, ritanserina⁽²⁸⁷⁾, bloqueó totalmente la potenciación de las respuestas presoras inducidas por α -metil-5-HT, potencia este pretratamiento potencia el efecto inhibitorio de 5-HT. El antagonista selectivo de receptores 5-HT_{2A}, espiperona⁽¹⁷⁾ revirtió completamente la acción potenciadora de α -metil-5-HT. Sin embargo, ni la administración de un agonista de receptores 5-HT_{2B}, BW 723C86⁽²⁸³⁾, ni de un agonista de receptores 5-HT_{2C}, MK 212⁽²⁸⁴⁾ reprodujeron la acción potenciadora de α -metil-5-HT. Estos resultados nos permiten excluir la participación de ambos subtipos (5-HT_{2B} y 5-HT_{2C}) en las respuestas presoras obtenidas por estimulación eléctrica y plantear la hipótesis de

que la activación de receptores 5-HT_{2A} es la responsable de la acción potenciadora inducida por α -metil-5-HT en animales tratados con fluoxetina durante 14 días.

Estos resultados, unidos a la ausencia de actividad por parte de 1-fenilbiguanida, al hecho de que la perfusión de 5-CT no modifique las respuestas presoras obtenidas por administración de noradrenalina exógena y que sin embargo α -metil-5-HT sí potencie las respuestas presoras obtenidas por la administración de noradrenalina exógena tal y como sucedía con la estimulación eléctrica, nos permiten deducir, por un lado, la naturaleza presináptica de la inhibición serotoninérgica en la neurotransmisión adrenérgica (por activación de receptores 5-HT₁) y, por otro lado, la naturaleza pre y postsináptica de la acción potenciadora por activación de receptores 5-HT_{2A}, en ratas tratadas con fluoxetina durante 14 días.

Una vez analizado como el tratamiento con fluoxetina (10 mg/kg/día, p.o. durante 14 días) interfiere en la modulación que 5-HT ejerce en la neurotransmisión simpática periférica en ratas desmeduladas (acciones inhibitorias por activación de receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{1D} y potenciadoras por activación 5-HT_{2A}) podemos abordar el análisis de la influencia de este tratamiento sobre las acciones cardiovasculares de serotonina en la diabetes experimental.

El aloxano es el agente diabetógeno empleado en nuestros experimentos, el cual se encuentra avalado no solo por la experiencia del grupo sino que es ampliamente utilizado por otros investigadores como modelo experimental de diabetes^(90, 157, 165, 166). Se caracteriza porque destruye las células β de los islotes de Langerhans del páncreas con la consiguiente ausencia de insulina^(311, 312), originando la aparición en los animales, de una hiperglucemia semejante a la que aparece en la Diabetes Mellitus tipo 1.

Con el empleo de aloxano se obtiene una hiperglucemia elevada y descompensada en torno a 450 mg/dl, con el fin de conseguir alteraciones vasculares tras las 4 semanas durante las cuales los animales están expuestos a la hiperglucemia^(130, 165), manteniéndose durante los 28 días de estabulación de los animales. Sin embargo, el tratamiento con fluoxetina durante 14 días origina un descenso significativo de los valores de glucosa en sangre si bien los animales permanecen con valores de glucosa elevados. Además, este tratamiento modifica la evolución del peso respecto al encontrado en el grupo control tal y como habíamos observado

en ratas hiperglucémicas^(165, 166), encontrando, como ha sido descrito por otros autores^(313, 314), una dificultad en la ganancia de peso corporal.

Respecto al resto de constantes fisiológicas (toma de comida, bebida, producción de heces y orina) se observan variaciones con respecto al grupo control (ratas normoglucémicas tratadas con fluoxetina). Los animales beben y orinan más; sin embargo existe una menor producción de heces y el consumo de pienso en estos animales es ligeramente superior respecto al de animales normoglucémicos tratados con fluoxetina. Estos resultados coinciden en parte con los encontrados en ratas diabéticas sin tratamiento, donde el consumo de pienso, agua y la producción de orina están incrementadas^(166, 302) debido a ese estado diabético que presentan los animales. El menor consumo de pienso respecto a las ratas diabéticas⁽³⁰²⁾ podría justificar en parte la pérdida de peso que se observa en la evolución tras el tratamiento con fluoxetina. En nuestros experimentos, como previamente han mostrado otros autores⁽³¹⁵⁾, no se modifica la presión arterial ni la frecuencia cardíaca. Sin embargo, los animales diabéticos tratados con fluoxetina muestran valores de creatinina en sangre, de Na⁺ y Cl⁻ en orina incrementados, lo que evidencia un cierto daño renal por la hiperglucemia si bien, resultaron inferiores a los encontrados en diabéticos^(166, 302) no tratados con fluoxetina, probablemente como consecuencia de valores de glucemia inferiores.

En los experimentos en ratas diabéticas, fue necesario utilizar un voltaje supramaximal superior al empleado en animales normoglucémicos. Los Δ PAM son superiores en ratas diabéticas de cuatro semanas tratadas con fluoxetina durante 14 días que los obtenidos en ratas normoglucémicas que se sometieron al mismo tratamiento. Las diferencias entre ratas diabéticas y normoglucémicas podría deberse a una disfunción del sistema nervioso autónomo, aunque es una hipótesis controvertida, ya que varios autores proponen un aumento de la reactividad vascular a los agentes adrenorreceptores⁽³¹⁶⁾, mientras que otros habían demostrado la atenuación de las respuestas contráctiles simpáticas⁽³¹⁷⁾ o incluso ningún cambio⁽³¹⁸⁾.

La perfusión de 5-HT (5-80 μ g/kg/min) en ratas diabéticas tratadas con fluoxetina, induce una inhibición significativa de las respuestas presoras obtenidas por estimulación eléctrica a todas las frecuencias de estimulación. La inhibición fue dosis dependiente y mayor a bajas frecuencias de estimulación. La acción inhibidora fue reproducida con la perfusión

continua del agonista selectivo de receptores 5-HT_{1/7}, 5-CT⁽²⁷⁷⁾. Esto revela que tal y como ocurría en ratas normoglucémicas⁽¹⁶³⁾ o diabéticas^(130, 165) no tratadas con fluoxetina y en normoglucémicas tratadas con fluoxetina, serotonina interfiere en la neurotransmisión adrenérgica y reduce los incrementos de presión arterial obtenidos por estimulación simpática. Sin embargo 5-HT (10 µg/kg/min) no modifica los incrementos de presión arterial obtenidos por la administración de NA exógena.

Por otro lado, y al igual que en ratas no diabéticas tratadas con fluoxetina, la administración del agonista selectivo de receptores 5-HT₂, α-metil-5-HT, en perfusión continua, dio lugar a una potenciación de las respuestas presoras obtenidas por estimulación que fue dosis y frecuencia dependientes; mientras que la perfusión con 1-fenilbiguanida (5 µg/kg/min), agonista serotoninérgico 5-HT₃, no modificó los ΔPAM obtenidos por estimulación eléctrica del flujo simpático.

El efecto inhibitor de 5-HT y 5-CT, en este grupo de estudio, al igual que ocurría en el grupo control (normoglucémicas con fluoxetina), es reproducido por el agonista selectivo de receptores 5-HT_{1A}⁽²⁸⁰⁾, 8-OH-DPAT, y por L-694,247, agonista selectivo de receptores 5-HT_{ID}⁽²⁸²⁾. El agonista selectivo de receptores 5-HT_{1B}⁽²⁸¹⁾, CGS-12066B, no modificó los ΔPAM, lo que nos permitió descartar la implicación de este subtipo de receptor en la acción inhibitora serotoninérgica. Estos resultados junto con el hecho de que en ratas diabéticas tratadas con fluoxetina la acción inhibitora de serotonina se ve bloqueada parcialmente con el pretratamiento con un antagonista selectivo de receptores 5-HT_{1A} o de receptores 5-HT_{ID} y que la administración conjunta de ambos antagonistas reviertan totalmente la acción inhibitora de 5-HT, nos permite descartar también la posible influencia inhibitora por parte del receptor 5-HT₇ en ratas diabéticas con fluoxetina.

Nuestros resultados muestran que el efecto potenciador se debe a la activación selectiva de receptores 5-HT_{2A} ya que el aumento de los incrementos de presión arterial observado al administrar el agonista selectivo de receptores 5-HT₂, al igual que ocurrió en los controles normoglucémicos tratados con fluoxetina, no se reproduce al administrar un agonista de receptores 5-HT_{2B}, BW-723C86^(283, 319), ni un agonista de receptores 5-HT_{2C}, MK 212⁽²⁸⁴⁾. Por otro lado el efecto potenciador de α-metil-5-HT fue totalmente bloqueado al administrar el antagonista selectivo de receptores 5-HT₂, ritanserina⁽²⁸⁷⁾, antagonista que a su

vez, al bloquear la actividad potenciadora del receptor 5-HT₂, potencia ligeramente el efecto inhibitor de 5-HT. Por último, la participación exclusiva del subtipo 5-HT_{2A} en las acciones potenciadoras, se confirma porque la administración de R 96544 antagonista selectivo de los receptores 5-HT_{2A}⁽²⁸⁹⁾, bloqueó la potenciación de la respuesta presora de α -metil-5-HT obtenida por estimulación eléctrica simpática de ratas diabéticas de 4 semanas tratadas con fluoxetina durante 14 días.

Posteriormente, al determinar la naturaleza de estas acciones potenciadoras e inhibitoras observamos que mientras la perfusión continua de 5-HT (10 μ g/kg/min), no inhibe la respuesta presora obtenida por administración exógena de noradrenalina, la perfusión de α -metil-5-HT o de 5-CT potencia e inhibe respectivamente las respuestas presoras obtenidas por administración de noradrenalina exógena, lo que nos induce a pensar que el tratamiento con fluoxetina, en situación de hiperglucemia, cambia la naturaleza exclusivamente presináptica de las acciones serotoninérgicas inhibitoras de estimulación simpática.

Una vez confirmados estos hechos, y dado que la diabetes induce alteraciones de muy diversa índole, tanto a nivel celular como a nivel de regulación de la capacidad de resistencia y conductancia de los vasos sanguíneos, nos propusimos analizar en animales hiperglucémicos tratados durante 14 días con el inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina, fluoxetina, si la respuesta inhibitora mediada por activación de receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{1D} y la respuesta potenciadora mediada por receptores 5-HT_{2A}, se debe a una acción directa o está mediada por otros mecanismos.

Estudios previos muestran que la activación de diferentes receptores serotoninérgicos pueden inducir la liberación de mediadores, que indirectamente modulen las respuestas serotoninérgicas^(130, 265). El endotelio juega un importante papel en la regulación del tono vascular. La relajación dependiente del endotelio esta aumentada poco después de la aparición de la diabetes en varios lechos vasculares^(227, 320, 321) o en cultivos de células endoteliales^(123, 124) debido, en algunos casos, a la mejora en la producción de NO⁽³²²⁾ o a la mayor sensibilidad de las células de músculo liso vascular al NO⁽³²³⁾. Sin embargo, otros autores demostraron un deterioro de la relajación por el NO durante la diabetes, probablemente

debido a un aumento del estrés oxidativo^(242, 324) o a la disminución de la producción de NO, o la capacidad de respuesta de las células de músculo liso vasculares al óxido nítrico⁽³²⁵⁻³²⁷⁾.

En base a estos hechos, y de acuerdo con resultados previamente obtenidos por nosotros, donde se mostró la participación del NO en el efecto inhibitor que 5-HT ejerce sobre las respuestas presoras inducidas eléctricamente en los animales diabéticos a corto y largo plazo^(130, 265), analizamos en ratas desmeduladas y diabéticas tratadas con fluoxetina el papel de la vía/síntesis del NO sobre las respuestas inhibitoras serotonérgicas producidas por estimulación simpática.

La administración intravenosa tipo bolus del inhibidor de la óxido nítrico sintasa⁽²⁹¹⁾, L-NAME, produce un aumento de la presión arterial media y hace que los incrementos de presión arterial obtenidos por estimulación eléctrica también estén aumentados, lo cual se justifica por la inhibición de la liberación basal de NO producido por este agente⁽³²⁸⁾, de modo similar a lo que nuestro grupo ya ha demostrado en ratas normoglucémicas y diabéticas^(130, 265). En nuestro modelo experimental, la presencia de L-NAME revierte totalmente la inhibición producida por 8-OH-DPAT, agonista selectivo de receptores 5-HT_{1A}, sin modificar la acción inhibitora inducida por L-694,247, agonista selectivo de los receptores 5-HT_{1D}.

Por otro lado, cuando los animales tratados con L-NAME se tratan con L-arginina, sustrato de la óxido nítrico sintasa⁽³²⁹⁻³³¹⁾, desciende por un lado el incremento de presión arterial inducido por L-NAME y al perfundir 8-OH-DPAT se manifiesta de nuevo el efecto inhibitor de este agonista sobre los incrementos de presión obtenidos por estimulación simpática.

Estos hechos ponen de manifiesto, tal como han sugerido otros autores en diferentes condiciones experimentales a las nuestras^(90, 205, 322, 332, 333) que existe relación entre 5-HT y diabetes, y nos permite evidenciar la participación del factor relajante endotelial en las respuestas vasculares serotonérgicas de ratas hiperglucémicas tratadas con fluoxetina durante 14 días.

La implicación del NO en las acciones inhibitoras serotonérgicas sobre los incrementos de presión inducidos por estimulación simpática total, se confirma aún más, con los experimentos llevados a cabo en presencia de ODQ, un inhibidor de la guanilato

ciclasa⁽³³⁴⁻³³⁷⁾. La activación de la guanilato ciclasa modula los niveles de GMPc y su activación viene dada por la presencia del NO^(47, 265). En nuestros experimentos con animales hiperglucémicos tratados con fluoxetina, el tratamiento con ODQ (10 µg/kg), revierte por un lado parcialmente, la acción inhibitora producida por serotonina, y por otro lado, de manera total, el efecto inhibitor de 8-OH-DPAT, lo que demuestra la implicación del óxido nítrico y la vía de la guanilato ciclasa, en la inhibición inducida por serotonina sobre las respuestas presoras obtenidas por estimulación eléctrica del flujo simpático. Sin embargo la presencia de ODQ no modificó la acción inhibitora de L-694,247, coincidiendo estos resultados con los encontrados previamente en ratas diabéticas a largo plazo sin tratamiento⁽²⁶⁵⁾.

Otra de las posibles vías implicadas en la acción inhibitora serotoninérgica de las respuestas presoras inducidas por estimulación simpática es la vía de las ciclooxigenasas, ya que hay estudios que demuestran una interacción entre el sistema serotoninérgico y la ciclooxigenasa. De acuerdo con resultados anteriores de nuestro grupo⁽¹³⁴⁾, la inhibición de la síntesis de prostaglandinas mediante la administración de indometacina, a una dosis habitualmente utilizada por nosotros y otros autores para inhibir el sistema de las ciclooxigenasas y la consiguiente producción de prostaglandinas⁽³³⁸⁻³⁴⁰⁾ no modifica la respuesta vasodilatadora de 5-HT en el tren posterior de la rata anestesiada. Sin embargo para otros autores, la liberación de prostaglandinas es uno de los procesos que justifican determinadas acciones vasodilatadores serotoninérgicas en otros territorios vasculares, como el renal en el perro^(339, 341) o en la rata^(342, 343).

Ha sido demostrado que la relajación endotelio dependiente, en diabetes, está disminuida debido a un aumento de la liberación de factores vasoconstrictores derivados del ácido araquidónico (TXA2 ó PGH2)⁽³⁴⁴⁾. Más recientemente, por técnicas de Western Blot, Nasrallah y colaboradores, en 2003⁽³⁴⁵⁾ y nuestro grupo⁽³⁰³⁾ hemos demostrado la existencia de un aumento de la expresión de las dos isoformas de COX (constitutiva e inducible) a nivel renal. La administración de indometacina, un inhibidor no selectivo de COX⁽³⁴⁶⁾ revierte parcialmente la acción inhibitora de 5-HT (10 µg/kg/min) y completamente el efecto inhibitor producido por el agonista selectivo de receptores 5-HT_{1D}, L-694,247 a todas las frecuencias de estimulación; mientras que, la inhibición producida por el agonista selectivo de receptores 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT no se ve revertida cuando se bloquea la vía de las ciclooxigenasas; lo que confirma que en animales hiperglucémicos tratados con fluoxetina

hay una modificación de los mecanismos reguladores serotoninérgicos a nivel vascular, con respecto a lo que ocurre en situación de diabetes experimental.

Teniendo en cuenta que al bloquear con indometacina la vía de la ciclooxigenasa se modula la liberación de agentes no solo vasodilatadores, sino también vasoconstrictores derivados de la vía del ácido araquidónico, como TXA₂ y PGH₂⁽⁴⁷⁾, administramos indometacina en ratas hiperglucémicas tratadas con fluoxetina durante 14 días para estudiar la influencia de esta vía sobre las acciones potenciadoras inducidas por α -metil-5-HT (5 μ g/kg/min). El pretratamiento con indometacina dio lugar a una reversión significativa de los efectos vasopresores inducidos por activación del receptor 5-HT_{2A}.

La potenciación inducida por la activación de receptores 5-HT_{2A} fue revertida tanto por un potente y selectivo inhibidor de la COX-1, FR122047⁽²⁹⁵⁾, como por nimesulida, un inhibidor selectivo de la COX-2^(347, 348). Estos datos sugieren que derivados endoteliales pueden tener influencia vasoconstrictora; la activación de COX-1 y COX-2 conduce a la producción de tromboxanos y prostaglandinas⁽³⁴⁹⁾; así, el pretratamiento con un antagonista de receptores de tromboxano A₂, ICI 192,605⁽²⁹⁷⁾, fue capaz de revertir totalmente la acción potenciadora de α -metil-5-HT.

En 2001, Okumura y colaboradores⁽³⁵⁰⁾, mostraron, durante la diabetes, un aumento de la actividad de prostanoides vasodilatadores y teniendo en cuenta que en nuestros estudios indometacina fue capaz de bloquear la acción inhibidora del agonista selectivo de receptores 5-HT_{1D}, L-694,247, al igual que para las acciones potenciadoras, intentamos determinar la isoforma de ciclooxigenasa implicada, observando que aunque están implicadas ambas (COX-1 y COX-2) es la activación de la COX-1 la que participa en mayor medida en el efecto inhibidor del agonista 5-HT_{1D} (L-694,247), ya que mientras nimesulida, un inhibidor selectivo de la COX-2, bloqueó parcialmente la acción inhibidora del agonista 5-HT_{1D}, el pretratamiento con un inhibidor selectivo de la COX-1, FR122047 bloqueó prácticamente esta respuesta.

Estos datos ponen de manifiesto, como ya ha sido descrito por otros autores y por nuestro grupo en diferentes condiciones experimentales durante la diabetes^(130, 165, 205, 265), que serotonina está directamente relacionada con las alteraciones producidas durante el desarrollo de la enfermedad y revela la participación de NO y prostanoides en las respuestas vasculares

serotonérgicas en ratas hiperglucémicas de 4 semanas tratadas con fluoxetina. Ya hemos comentado que el endotelio juega un papel importante en la regulación del tono vascular. La relajación endotelio dependiente está aumentada poco después de la aparición de la diabetes en varios lechos vasculares^(227, 320, 321) o en cultivos de células endoteliales^(123, 124) debido, en algunos casos, al aumento en la producción de NO⁽³²²⁾ o a una mayor sensibilidad de las células musculares o del músculo liso vascular al NO⁽³²³⁾. Sin embargo, otros autores demostraron un deterioro de la relajación debida a NO durante la diabetes, probablemente debido a un aumento del estrés oxidativo^(242, 324) o debido a una disminución en la producción del NO o a la capacidad de respuesta de las células vasculares del músculo liso al NO⁽³²⁵⁻³²⁷⁾. Por otro lado, Szerafin y colaboradores (2006)⁽³⁵¹⁾ describen que la expresión de COX-2 y la dilatación inducida por bradiquininas liberadas por prostaglandina están incrementadas en las arterias coronarias de pacientes diabéticos. Además, en riñón perfundido de ratas con diabetes experimental inducida por estreptozotocina, se ha visto que están incrementados los metabolitos con acción vasodilatadora derivados del ácido araquidónico⁽³⁵²⁾. Por otro lado, en las enfermedades cardiovasculares y durante el envejecimiento, la disfunción endotelial se debe en parte a la liberación de factores contracturantes derivados de endotelio, que implican la activación de las ciclooxigenasas endoteliales y la liberación de diversos prostanoides como los tromboxanos⁽³⁵³⁾.

Estos datos sugieren que derivados endoteliales del ácido araquidónico deben tener influencia vasodilatadora (probablemente debido a la formación de prostaciclina) y/o vasoconstrictoras en las arterias de ratas diabéticas de 4 semanas tratadas durante 14 días con fluoxetina; y están de acuerdo con datos anteriores que indican una disminución en la actividad de prostanoides vasoconstrictores^(90, 201, 354) y un aumento en la actividad de prostanoides vasodilatadores^(350, 355) durante la diabetes. Por el contrario, Arikawa y colaboradores (2006)⁽³⁵⁶⁾ ya describieron como, en arterias mesentéricas de ratas diabéticas, la activación de la síntesis de tromboxano A2 exacerbaba la contracción producida por ET 1. Estos datos justifican, en parte, que en nuestro modelo experimental, encontremos dos aspectos diferentes, en principio contradictorios, ya que la contribución del endotelio a la regulación de la reactividad vascular viene dada por la liberación de sustancias vasoconstrictoras (angiotensina II, endotelina-1, tromboxano A2, prostaglandinas, etc.) o vasodilatadoras (NO, prostaciclina, factor hiperpolarizante derivado de endotelio), siendo el equilibrio entre ambos tipos de factores el que regula el tono muscular^(346, 357).

Las enfermedades micro y macrovasculares son actualmente las principales causas de morbilidad y mortalidad en pacientes con Diabetes Mellitus y la disfunción endotelial desempeña también un papel clave en la patogénesis de estas enfermedades vasculares diabéticas. El deterioro de vasodilatación dependiente del endotelio se ha demostrado en varios lechos vasculares de diferentes modelos animales de diabetes y en seres humanos con diabetes tipo 1 y 2. Sin embargo, los mecanismos de la disfunción endotelial parecen diferir según el modelo de la diabetes y el lecho vascular en estudio, e incluyen la transducción de señales o el deterioro de la disponibilidad de sustrato, alteración en la liberación de NO, aumento de la destrucción de NO, disminución de la sensibilidad del músculo liso vascular de NO, y una mayor liberación de factores derivados del endotelio contracturantes^(358, 359). En este sentido el tratamiento con fluoxetina en ratas diabéticas, como ponen de manifiesto nuestros resultados, induce cambios en las vías de señalización intracelular activadas por receptores serotoninérgicos, responsables de la inhibición y/o potenciación que serotonina ejerce sobre neurotransmisión simpática vascular en ratas desmeduladas.

A diferencia de lo que ocurre con la gran diversidad y amplitud de estudios realizados para analizar la posible interferencia entre el sistema serotoninérgico y la transmisión simpática, la gran mayoría de resultados obtenidos en relación con la posible implicación serotoninérgica sobre efectos parasimpáticos cardiovasculares, se refieren al control serotoninérgico central de la activación refleja vagal y sugieren que determinadas neuronas serotoninérgicas centrales controlarían el tono vagal del corazón^(302, 360-363).

Los resultados en cualquier caso, son controvertidos y muy variables proponiéndose acciones despolarizantes con aumento de la actividad vagal mediada a través de la activación de receptores 5-HT₃ y 5-HT₂^(361, 364, 365), 5-HT₄⁽³⁶⁶⁾ e incluso 5-HT_{1A}^(361, 362, 367); pero también se sugieren acciones inhibitoras de la liberación de acetilcolina, preferentemente mediadas por activación de receptores 5-HT₁^(366, 368) e incluso 5-HT₂⁽¹⁵⁵⁾. También se han propuesto acciones duales de 5-HT a través de receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{1D}⁽¹⁵⁶⁾, o de 5-HT a través de receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₇⁽¹⁵⁷⁾.

La Diabetes Mellitus se asocia a graves complicaciones, que incluyen la neuropatía diabética autonómica, caracterizada, en parte, por la deficiencia en la respuesta parasimpática cardiaca⁽³⁶⁹⁾. La disfunción parasimpática en el corazón diabético puede llevar a un desequilibrio autonómico que predispone el corazón a arritmias ventriculares y muerte súbita. Resultados previos de nuestro grupo sugieren una posible acción periférica de los receptores serotoninérgicos en la modulación de la transmisión colinérgica cardiaca, además de la ya conocida regulación central de los receptores 5-HT_{1A} en los efectos cardiovasculares^(367, 370). Otros autores han sugerido un papel de los receptores 5-HT₇ en la activación del flujo vagal en el corazón^(96, 157, 371, 372).

Además de la interacción entre el sistema serotoninérgico y la neurotransmisión simpática, en esta memoria de Tesis Doctoral nos propusimos evaluar si el tratamiento con fluoxetina en animales diabéticos origina cambios en la modulación serotoninérgica sobre la neurotransmisión parasimpática cardiaca, utilizando el mismo modelo experimental de diabetes inducida por aloxano, demostrado como un modelo apropiado para el estudio del papel de serotonina y los receptores serotoninérgicos en el desarrollo y progresión de la disfunción autonómica y endotelial debida a la Diabetes Mellitus tipo 1^(165, 166, 201).

En nuestras condiciones experimentales se consiguen reducciones de frecuencia cardiaca inducidas por la liberación de acetilcolina al estimular neuronas cardiacas vagales, preferentemente preganglionares⁽³⁰⁰⁾. La acetilcolina liberada activa receptores muscarínicos postsinápticos y genera bradicardia.

La bradicardia inducida eléctricamente en ratas normoglucémicas tratadas con fluoxetina durante 14 días fue inferior a la bradicardia obtenida bajo las mismas condiciones en ratas normoglucémicas⁽¹⁵⁵⁾, a diferencia de cuando la bradicardia se obtiene por administración de Ach exógena que origina bradicardias superiores a las de la estimulación eléctrica y a las de sus controles normoglucémicos.

La administración i.v. en bolus de 5-HT (10-200 µg/kg) induce un efecto dual sobre la bradicardia inducida por estimulación eléctrica. Dosis bajas (10 y 50 µg/kg) dan lugar a un efecto inhibitor mientras que dosis altas (100 y 200 µg/kg) potencian la bradicardia inducida por estimulación vagal, potenciación que se reproduce por la administración de un agonista selectivo de los receptores 5-HT₃, 1 fenilbiguanida (bloqueada por el pretratamiento con

MDL 72222, antagonista de receptores 5-HT₃), mientras que la inhibición se reproduce por la administración i.v. de un agonista de receptores 5-HT_{1/7}. El pretratamiento con SB269970, antagonista selectivo de los receptores 5-HT₇, no modifica la acción inhibitora inducida por el agonista 5-HT_{1/7}, descartando, así la participación de este receptor en la acción inhibitora. Sin embargo, la administración de L-694,247, a diferencia de que ocurre con 8-OH-DPAT y CGS-12066B, reproduce la acción inhibitora de 5-CT. Este efecto inhibitor fue bloqueado completamente con el pretratamiento con un antagonista selectivo 5-HT_{1D}, BRL 15572. La activación de los receptores 5-HT₂, por administración de α -metil-5-HT no modificó la respuesta bradicardizante.

El tratamiento con fluoxetina origina cambios en la modulación colinérgica, no solo en el receptor implicado en la acción inhibitora sino también en la localización de los mismos. El efecto inhibitor de 5-HT (10 μ g/kg) y de 5-CT (10 μ g/kg) sobre la bradicardia inducida por estimulación vagal no se manifiesta cuando la bradicardia es provocada por Ach exógena en ratas normoglucémicas tratadas con fluoxetina durante 14 días. Sin embargo, al administrar dosis de 200 μ g/kg de 5-HT ó 1-fenilbiguanida (10 μ g/kg), aparece una potenciación de la bradicardia, determinando así un cambio en la naturaleza del receptor implicado en ratas tratadas con fluoxetina respecto a ratas no tratadas. Estos resultados confirman una naturaleza pre y postsináptica para las acciones potenciadoras y se mantiene la localización presináptica en las inhibitoras. Estos cambios coinciden con los resultados de Brink y colaboradores,⁽³⁷³⁾ en 2004, quien al estudiar el sistema colinérgico en la fisiopatología de la depresión demostró que el tratamiento con fluoxetina cambia las respuestas de 5-HT a nivel cardiaco *in vivo* por activación de nervios parasimpáticos. Los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1D} y 5-HT₃ pueden tener un papel fisiológico en la regulación de los reflejos cardiovasculares, controlando cambios en la acción parasimpática (vagal) del corazón.

La inducción de la diabetes y el tratamiento con fluoxetina durante 14 días originan cambios en la regulación serotoninérgica de la bradicardia obtenida por estimulación vagal. Las bradicardias obtenidas por estimulación del nervio vago en ratas diabéticas tratadas con fluoxetina fueron menores que las obtenidas en ratas normoglucémicas y diabéticas^(137, 156) en las mismas condiciones experimentales. Nuestro grupo de investigación y otros autores han sugerido que la diabetes inducida químicamente puede provocar defectos funcionales cardíacos en los nervios colinérgicos^(137, 300, 374, 375). A nivel cardiaco, inhibidores de los

receptores muscarínicos M_2 limitan la liberación de acetilcolina de los nervios⁽³⁷⁶⁻³⁷⁹⁾. El hecho de que la inhibición de la liberación de acetilcolina por inhibidores neuronales de receptores muscarínicos M_2 esté aumentada durante la diabetes ha sido descrito ampliamente en diferentes modelos experimentales, incluyendo pulmón de rata⁽³⁷⁹⁾, íleon y tráquea de ratas diabéticas⁽³⁸⁰⁾, vejiga urinaria⁽³⁸¹⁾ o incluso, aurícula humana⁽³⁸²⁾. En base a estos antecedentes, en el presente estudio, se examinaron los cambios inducidos por la diabetes y el tratamiento con fluoxetina, en la acción que 5-HT ejerce en la respuesta cardíaca *in vivo* por estimulación eléctrica del nervio vago.

5-HT tiene un efecto dual sobre la bradicardia inducida por estimulación eléctrica en las ratas con diabetes experimental, tratadas durante 14 días con fluoxetina. Este doble efecto fue reproducido por el agonista selectivo de receptores 5-HT_{1/7}, 5-CT⁽¹⁷⁾: a dosis bajas (10 y 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$), 5-HT y 5-CT incrementan la bradicardia, mientras que las dosis más altas (100 y 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) de 5-HT y 5-CT disminuyen el efecto de la bradicardia a todas las frecuencias de estimulación. En contraste, la administración de α -metil-5-HT, (agonista selectivo de los receptores 5-HT₂)⁽²⁷⁸⁾ o de 1-fenilbiguanida (agonista selectivo del receptor 5-HT₃)^(279, 305) no tienen efecto sobre la bradicardia inducida vagalmente en ratas diabéticas tratadas durante 14 días con fluoxetina. Esto sugiere que, los efectos serotoninérgicos sobre la bradicardia están mediados por activación de los receptores 5-HT_{1/7}, pero no a través de la activación de receptores 5-HT₂ y 5-HT₃ en ratas diabéticas tratadas con fluoxetina. Previamente, nuestro grupo ha demostrado que, en ratas normoglucémicas desmeduladas, los receptores 5-HT₂ están involucrados en la inhibición de la bradicardia inducida vagalmente, mientras que los receptores 5-HT₃ son los requeridos para la acción estimulante⁽¹³⁷⁾. Sin embargo el tratamiento con fluoxetina, en nuestros experimentos, modificó la participación del receptor implicado en la acción inhibidora, manteniendo las potenciadoras por activación 5-HT₃. Por lo tanto, proponemos que, en el tratamiento con fluoxetina en la diabetes experimental, el sistema serotoninérgico interfiere con la transmisión colinérgica cardíaca, produciendo aumento o inhibición de la bradicardia inducida por estimulación vagal.

En este modelo experimental hemos observado que los decrementos en la bradicardia inducida vagalmente tras la administración de dosis altas de 5-HT o de 5-CT (agonista selectivo de los receptores 5-HT_{1/7}) fueron reproducidos, a todas las frecuencias de estimulación, por el agonista selectivo de receptores 5-HT_{1D}, L-694,247⁽²⁸²⁾, siendo este

efecto inhibitor bloqueado por el pretratamiento con el antagonista selectivo de receptores 5-HT_{1D}, BRL15572⁽³⁴⁾. Por otro lado, ni CGS-12066B, agonista de los receptores de 5-HT_{1B}⁽²⁸¹⁾, ni 8-OH-DPAT, agonista 5-HT_{1A}⁽²⁸⁰⁾, tuvieron efecto sobre bradicardia inducida vagalmente, lo que sugiere que el subtipo de receptor 5-HT_{1D} es el principal responsable de la reducción de la bradicardia inducida por estimulación vagal. A su vez, los incrementos de la bradicardia observados con dosis bajas de 5-HT y 5-CT se revierten en presencia del antagonista de receptores 5-HT₇, SB269970⁽²⁸⁸⁾.

También se ha demostrado que el efecto dual producido por 5-HT o 5-CT (acciones estimulantes e inhibitoras) sobre la bradicardia inducida por estimulación vagal, no se reproduce cuando la bradicardia es inducida por Ach exógena. Estos resultados confirman la naturaleza presináptica de las acciones serotoninérgicas en ratas diabéticas en tratamiento con un ISRS, a diferencia de lo que ocurrió en ratas diabéticas no tratadas con fluoxetina donde la naturaleza y el tipo de receptor son diferentes⁽¹⁵⁶⁾.

El presente estudio mostró que en la diabetes con tratamiento con fluoxetina cambia las respuestas a 5-HT a nivel cardiaco *in vivo* por activación de los nervios parasimpáticos. Los receptores periféricos 5-HT_{1D} y 5-HT₇ pueden tener un papel fisiológico en la regulación de los reflejos cardiovasculares, controlando cambios en la acción parasimpática (vagal) del corazón. La Diabetes Mellitus se asocia a complicaciones, que incluye la neuropatía diabética autonómica, caracterizada, en parte, por la deficiencia en la respuesta parasimpática cardiaca. La disfunción parasimpática en el corazón diabético puede llevar a un desequilibrio autonómico que predispone el corazón a arritmias ventriculares y muerte súbita. Nuestros resultados sugieren una posible acción periférica de los receptores serotoninérgicos en la modulación de la transmisión colinérgica cardiaca, ya que además de la conocida regulación central de los receptores 5-HT_{1A} en los efectos cardiovasculares^(367, 370), otros autores^(96, 371, 372), y nosotros mismos en este trabajo de Tesis Doctoral, sugerimos un papel de los receptores 5-HT₇ en la activación del flujo vagal en el corazón. En esta línea, Oskutyte y colaboradores, en 2009⁽³⁸³⁾ han mostrado la presencia de receptores 5-HT₁ y 5-HT₇, los cuales juegan un papel importante en la activación cardiovascular reflejo del flujo parasimpático al corazón.

CONCLVSiONES

1. El tratamiento con fluoxetina, un inhibidor de la recaptación de serotonina, origina cambios en la influencia serotoninérgica sobre la neurotransmisión simpática y parasimpática, tanto en ratas normoglucémicas como diabéticas.
2. El tratamiento con fluoxetina en ratas diabéticas induce cambios en el tipo y subtipo de receptores implicados en la acción que serotonina ejerce sobre las respuestas presoras obtenidas por estimulación simpática total en ratas.
3. El efecto inhibitor está mediado por la activación de receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{1D} mientras que la acción potenciadora se debe a la activación de receptores 5-HT_{2A}. En ambos casos, la naturaleza de dichas acciones es pre y/o postsináptica.
4. La acción inhibitor que serotonina ejerce sobre las respuestas obtenidas por estimulación eléctrica del flujo simpático total, a través de la activación de los receptores 5-HT_{1A} está mediada por la vía del óxido nítrico y de la guanilato ciclasa, mientras que la inhibición producida por activación de receptores 5-HT_{1D} implica la vía de las ciclooxigenasas.
5. La acción potenciadora de serotonina sobre las respuestas obtenidas por estimulación eléctrica del flujo simpático total, a través de la activación de receptores 5-HT_{2A}, está mediada por la vía de las ciclooxigenasas, implicando al tromboxano A₂.
6. La diabetes a largo plazo origina cambios en el tipo/subtipo de receptores implicados en la bradicardia inducida por estimulación vagal. Dichos cambios están mediados por la activación presináptica de receptores 5-HT_{1D} (inhibidores de la bradicardia) y de receptores 5-HT₇ (potenciadores de la acción bradicardizante).

En resumen, el tratamiento con un inhibidor de la recaptación de serotonina induce cambios en los mecanismos serotoninérgicos cardiovasculares. Además la hiperglucemia experimental mantenida en ratas durante 4 semanas, tratadas con fluoxetina durante 14 días, da lugar a cambios en el tipo y subtipo de receptores implicados tanto en la neurotransmisión simpática como parasimpática, en la naturaleza de los mismos y en la participación de los mecanismos directos o indirectos.

BIBLIOGRAFIA

1. Brodie T.G. The immediate action of an intravenous injection of blood-serum. *J Physiol.* 1900;26(1-2):48-71.
2. Rapport M.M., Green A.A., Page I.H. Partial purification of the vasoconstrictor in beef serum. *J Biol Chem.* 1948;174(2):735-41.
3. Hamlin K.E., Fischer F.E. The synthesis of 5-hydroxytryptamine. 1951.
4. Twarog B.M., Page I.H. Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am J Physiol.* 1953;175(1):157-61.
5. Erspamer V., Asero B. Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. 1952;169(4306):800-1.
6. Erspamer V. Observations of the metabolism of endogenous 5-hydroxytryptamine (enteramine) in the rat. *Experientia.* 1954;10(11):471-2.
7. Udenfrien S. Lovenberg W., Sjoerdsma A. Physiologically active amines in common fruits and vegetables. 1959;85(2):487-90.
8. Sjoerdsma A. Serotonin. *N Engl J Med.* 1959(261):231-7.
9. Sjoerdsma A., Palfreyman M.G. History of serotonin and serotonin disorders. *Ann N Y Acad Sci.* 1990;600:1-7; discussion -8.
10. Lundell M.J., Chu-LaGraff Q., Doe C.Q., Hirsh J. The engrailed and huckebein genes are essential for development of serotonin neurons in the Drosophila CNS. *Mol Cell Neurosci.* 1996. 46-61.
11. Hornung J.P. The human raphe nuclei and the serotonergic system. *J Chem Neuroanat.* 2003. 331-43.
12. Walther D.J., Peter J.U., Bashammakh S., Hortnagl H., Voits M., Fink H., Bader, M. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science.* 2003. 76.
13. Zhang X., Beaulieu J.M., Sotnikova T.D., Gainetdinov R.R., Caron M.G. Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis. *Science.* 2004. 217.
14. Hills R.J., Jessen, R.K. Gamma aminobutyric acid (GABA), 5-hydroxytryptamine (5-HT) and dopamine. 1995.
15. Artigas F. El transportador de serotonina como diana terapéutica. *Psicofarmacología.* 1997(2):13-9.
16. Barnes N.M., Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology.* 1999. 1083-152.
17. Hoyer D., Clarke D.E., Fozard J.R., Hartig P.R., Martín G.R., Mylecharane E.J., Saxena, P.R. Humphrey, P.P. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev.* 1994;46(2):157-203.
18. Hoyer D., Hannon J.P., Martín G.R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002. 533-54.
19. Andrade R., Barnes N.M., Baxter G., Bockaert J., Branchek T., Cohen M.L., Dumuis A., Eglen R.M., Göthert M., Hamblin M., Hamon M., Hartig P.R., Hen R., Herrick-Davis K., Hills R., Hoyer D., Humphrey P.P.A., Latté K.P., Maroteaux L., Martin GR., Middlemiss D.N., Mylecharane E., Peroutka S.J., Saxena P.R., Sleight A., Villalón C.M., Yocca F. 5-Hydroxytryptamine receptors 2013 [cited Last modified on 05/10/2012 Accessed on 26/03/2013]. Available from: <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyMenuForward?familyId=1>.
20. Glennon R.A. Higher-end serotonin receptors: 5-HT₍₅₎, 5-HT₍₆₎, and 5-HT₍₇₎. *J Med Chem.* 2003;46(14):2795-812.
21. Hannon J., Hoyer D. Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res.* 2008. 198-213.
22. Gaddum J.H., Picarelli Z.P. Two kinds of tryptamine receptor. *Br J Pharmacol Chemother.* 1957;12(3):323-8.
23. Peroutka S.J., Snyder S.H. Multiple serotonin receptors: differential binding of [3H] 5-hydroxytryptamine, [3H]lysergic acid diethylamide and [3H]spiroperidol. *Mol Pharmacol.* 1979;16(3):687-99.
24. Bradley P.B., Engel G., Feniuk W., Fozard J.R., Humphrey P.P., Middlemiss D.N., Mylecharane, E.J., Richardson, B.P. Saxena, P.R. Proposals for the classification and nomenclature of functional receptors for 5-hydroxytryptamine. *Neuropharmacology.* 1986;25(6):563-76.
25. Levy F.O., Gudermann T., Perez-Reyes E., Birnbaumer M., Kaumann A.J., Birnbaumer L. Molecular cloning of a human serotonin receptor (S12) with a pharmacological profile resembling that of the 5-HT_{1D} subtype. *J Biol Chem.* 1992;267(11):7553-62.
26. Weinshank R.L., Zgombick J.M., Macchi M.J., Branchek T.A., Hartig P.R. Human serotonin 1D receptor is encoded by a subfamily of two distinct genes: 5-HT_{1D} alpha and 5-HT_{1D} beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(8):3630-4.
27. Iismaa T.P., Shine J. G protein-coupled receptors. *Curr Opin Cell Biol.* 1992;4(2):195-202.
28. Adham N., Tamm J.A., Salon J.A., Vaysse P.J., Weinshank R.L., Branchek T.A. A single point mutation increases the affinity of serotonin 5-HT_{1D} alpha, 5-HT_{1D} beta, 5-HT_{1E} and 5-HT_{1F} receptors for beta-adrenergic antagonists. *Neuropharmacology.* 1994;33(3-4):387-91.

29. Wurch T., Colpaert F.C., Pauwels P.J. Chimeric receptor analysis of the ketanserin binding site in the human 5-Hydroxytryptamine_{1D} receptor: importance of the second extracellular loop and fifth transmembrane domain in antagonist binding. *Mol Pharmacol.* 1998;54(6):1088-96.
30. Birnbaumer L., Abramowitz J., Brown A.M. Receptor-effector coupling by G proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1990. 163-224.
31. Pauwels P.J. Diverse signalling by 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptors. *Biochem Pharmacol.* 2000. 1743-50.
32. Grailhe R., Grabtree G.W., Hen R. Human 5-HT₍₅₎ receptors: the 5-HT_(5A) receptor is functional but the 5-HT_(5B) receptor was lost during mammalian evolution. *Eur J Pharmacol.* 2001. 157-67.
33. Kohen R., Metcalf M.A., Khan N., Druck T., Huebner K., Lachowicz J.E., Meltzer H.Y., Sibley D.R., Roth B.L., Hamblin M.W. Cloning, characterization, and chromosomal localization of a human 5-HT₆ serotonin receptor. *J Neurochem.* 1996;66(1):47-56.
34. Saxena P.R., De Vries P., Villalón C.M. 5-HT_{1-like} receptors: a time to bid goodbye. *Trends Pharmacol Sci.* 1998. 311-6.
35. Villalón C.M., De Vries P., Saxena P.R. Serotonin receptors as cardiovascular targets. *1997;2(7):294-300.*
36. Torres G.E., Gainetdinov R.R., Caron M.G. Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nat Rev Neurosci.* 2003. 13-25.
37. Ramamoorthy S., Shippenberg T., Jayanthi L. regulation of monoamine transporters role of transporter phosphorylation. *Pharmacol Ther.* 2011 Feb;129(2):220-38.
38. Blier P., De Montigny C. Current advances and trends in the treatment of depression. *Trends Pharmacol Sci.* 1994. 220-6.
39. Raisman R., Briley M., Langer S.Z. Specific tricyclic antidepressant binding sites in rat brain. *Nature.* 1979;281(5727):148-50.
40. Mellerup E.T., Dam H., Kim M.Y., Loldrup D., Plenge P., Rosenberg R., Schepelern, S. Imipramine binding in depressed patients with psychogenic pain. *Psychiatry Res.* 1990. 29-34.
41. Nemeroff C.B., Knight D.L., Franks J., Craighead W.E., Krishnan K.R. Further studies on platelet serotonin transporter binding in depression. *Am J Psychiatry.* 1994;151(11):1623-5.
42. Caldecott-Hazard S., Guze B.H., Kling M.A., Kling A., Baxter L.R. Clinical and biochemical aspects of depressive disorders: I. Introduction, classification, and research techniques. *Synapse.* 1991;8(3):185-211.
43. Hyttel J. Pharmacological characterization of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). *Int Clin Psychopharmacol.* 1994;9 Suppl 1:19-26.
44. Carr G.V., Lucki I. The role of serotonin receptor subtypes in treating depression: a review of animal studies. *Psychopharmacology (Berl).* 2011;213(2-3):265-87.
45. Kaye W. Neurobiology of anorexia and bulimia nervosa. *Physiol Behav.* 2008. 121-35.
46. Kumar K.K., Tung S., Iqbal J. Bone loss in anorexia nervosa: leptin, serotonin, and the sympathetic nervous system. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1211:51-65.
47. Flórez J. In: Elsevier-Masson, editor. Libro: Farmacología humana - Editorial Elsevier2008.
48. Hodges M.R., Richerson G.B. The role of medullary serotonin (5-HT) neurons in respiratory control: contributions to eupneic ventilation, CO₂ chemoreception, and thermoregulation. *J Appl Physiol.* 2010. 1425-32.
49. Bellivier F, Leboyer M, Courtet P, Buresi C, Beaufiles B, Samolyk D, et al. Association between the tryptophan hydroxylase gene and manic-depressive illness. *Arch Gen Psychiatry.* 1998;55(1):33-7.
50. Lucki I. The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biol Psychiatry.* 1998. 151-62.
51. Mann J.J., Brent D.A., Arango V. The neurobiology and genetics of suicide and attempted suicide: a focus on the serotonergic system. *NeuroPsychopharmacology.* 2001. 467-77.
52. Bello M., Puentes-Rosas E., Medina-Mora M.E., Lozano R. [Prevalence and diagnosis of depression in Mexico]. *Salud Publica Mex.* 2005;47 Suppl 1:S4-11.
53. Kessler R.C., Berglund P., Demler O., Jin R., Koretz D., Merikangas K.R., Rush A.J., Walters E.E., Wang P.S. The epidemiology of major depressive disorder: results from the National. *Jama.* 2003;289(23):3095-105.
54. Kessler R.C., Chiu W.T., Demler O., Merikangas K.R., Walters E.E. Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the. *Arch Gen Psychiatry.* 2005;62(6):617-27.
55. WHO. The world health report 2003. Shaping the future. 2004. Available from: http://www.who.int/whr/2003/en/whr03_en.pdf.
56. Castillo-Quan J.I., Barrera-Buenfil D.J., Perez-Osorio J.M., Alvarez-Cervera F.J. [Depression and diabetes: from epidemiology to neurobiology]. *Rev Neurol.* 2010. 347-59.
57. Copen A., Eccleston E., Craft I., Bye P. Letter: Total and free plasma-tryptophan concentration and oral contraception. *Lancet.* 1973;2(7844):1498.

58. Cowen P.J., Parry-Billings M., Newsholme E.A. Decreased plasma tryptophan levels in major depression. *J Affect Disord.* 1989;16(1):27-31.
59. Lam R.W., Zis A.P., Grewal A., Delgado P.L., Charney D.S., Krystal J.H. Effects of rapid tryptophan depletion in patients with seasonal affective disorder in remission after light therapy. *Arch Gen Psychiatry.* 1996;53(1):41-4.
60. Turner E.H., Loftis J.M., Blackwell A.D. Serotonin a la carte: supplementation with the serotonin precursor 5-hydroxytryptophan. *Pharmacol Ther.* 2006. 325-38.
61. Mann J.J., McBride P.A., Anderson G.M., Mieczkowski T.A. Platelet and whole blood serotonin content in depressed inpatients: correlations with acute and life-time psychopathology. *Biol Psychiatry.* 1992;32(3):243-57.
62. Young S.N., Gauthier S. Effect of tryptophan administration on tryptophan, 5-hydroxyindoleacetic acid and indoleacetic acid in human lumbar and cisternal cerebrospinal fluid. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1981;44(4):323-8.
63. Meyers S. Use of neurotransmitter precursors for treatment of depression. *Altern Med Rev.* 2000;5(1):64-71.
64. Mehlman P.T., Higley J.D., Faucher I., Lilly A.A., Taub D.M., Vickers J., Suomi S.J., Linnoila M., Mehlman P.T., Higley J.D., Faucher I., Lilly A.A., Taub D.M., Vickers J., Suomi S.J., Linnoila M. Low CSF 5-HIAA concentrations and severe aggression and impaired impulse control in nonhuman primates. *Am J Psychiatry.* 1994;151(10):1485-91.
65. Parks C.L., Robinson P.S., Sibille E., Shenk T., Toth M. Increased anxiety of mice lacking the serotonin_{1A} receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(18):10734-9.
66. Ramboz S., Oosting R., Amara D.A., Kung H.F., Blier P., Mendelsohn M., Mann J.J., Brunner D., Hen R. Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(24):14476-81.
67. De Boer S.F., Koolhaas J.M. 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptor agonists and aggression: a pharmacological challenge of the serotonin deficiency hypothesis. *Eur J Pharmacol.* 2005. 125-39.
68. Bulbring E., Crema A. Observations concerning the action of 5-hydroxytryptamine on the peristaltic reflex. *Br J Pharmacol Chemother.* 1958;13(4):444-57.
69. Grahame-Smith D.G. The biosynthesis of 5-hydroxytryptamine in carcinoid tumours and intestine. *Clin Sci.* 1967;33(1):147-58.
70. Gershon M.D. Review article: roles played by 5-hydroxytryptamine in the physiology of the bowel. *Aliment Pharmacol Ther.* 1999;13 Suppl 2:15-30.
71. Westbroek I., Van der Plas A., De Rooij K.E., Klein-Nulend J., Nijweide P.J. Expression of serotonin receptors in bone. *J Biol Chem.* 2001. 28961-8.
72. Bliziotis M.M., Eshleman A.J., Zhang X.W., Wiren K.M. Neurotransmitter action in osteoblasts: expression of a functional system for serotonin receptor activation and reuptake. *Bone.* 2001. 477-86.
73. Jonnakuty C., Gagnoli C. What do we know about serotonin? *J Cell Physiol.* 2008;217(2):301-6.
74. Wozniak K.M., Linnoila M. Hyperglycemic properties of serotonin receptor antagonists. *Life Sci.* 1991;49(2):101-9.
75. Furman B.L., Wilson G.A. Further studies on the effects of 5-hydroxytryptophan on plasma glucose and insulin in the mouse. *Diabetologia.* 1980;19(4):386-90.
76. Yamada J., Sugimoto Y., Kimura I., Takeuchi N., Horisaka K. Serotonin-induced hypoglycemia and increased serum insulin levels in mice. *Life Sci.* 1989;45(20):1931-6.
77. Guillet-Deniau I., Burnol A.F., Girard J. Identification and localization of a skeletal muscle serotonin 5-HT_{2A} receptor coupled to the Jak/STAT pathway. *J Biol Chem.* 1997;272(23):14825-9.
78. Anju T.R., Paulose C.S. Amelioration of hypoxia-induced striatal 5-HT_{2A} receptor, 5-HT transporter and HIF1 alterations by glucose, oxygen and epinephrine in neonatal rats. *NeuroScience Letters.* 2011;502:129-32.
79. Ito T., Ikeda U., Shimpo M., Yamamoto K., Shimada K. Serotonin increases interleukin-6 synthesis in human vascular smooth muscle cells. *Circulation.* 2000;102(20):2522-7.
80. Hajduch E., Rencurel F., Balendran A., Batty I.H., Downes C.P., Hundal H.S. Serotonin (5-Hydroxytryptamine), a novel regulator of glucose transport in rat skeletal muscle. *J Biol Chem.* 1999;274(19):13563-8.
81. Smith S.A., Pogson C.L. Tryptophan and the control of plasma glucose concentrations in the rat. *Biochem J.* 1977;168(3):495-506.
82. Herrera R., Manjarrez G., Nishimura E., Hernandez J. Serotonin-related tryptophan in children with insulin-dependent diabetes. *Pediatr Neurol.* 2003. 20-3.
83. Schoeffter P., Pfeilschifter J., Bobirnac I. 5-Hydroxytryptamine 5-HT_{1B} receptors inhibiting cyclic AMP accumulation in rat renal mesangial cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1995;351(1):35-9.

84. Nebigil C.G., Garnovskaya M.N., Spurney R.F., Raymond J.R. Identification of a rat glomerular mesangial cell mitogenic 5-HT_{2A} receptor. *Am J Physiol*. 1995;268(1 Pt 2):F122-7.
85. Kasho M., Sakai M., Sasahara T., Anami Y., Matsumura T., Takemura T., Matsuda H., Kobori S., Shichiri M. Serotonin enhances the production of type IV collagen by human mesangial cells. *Kidney Int*. 1998;54(4):1083-92.
86. Greene E.L., Houghton O., Collinsworth G., Garnovskaya M.N., Nagai T., Sajjad T., Bheemanathini V., Grewal J.S., Paul R.V., Raymond J.R. 5-HT_(2A) receptors stimulate mitogen-activated protein kinase via H₂O₍₂₎ generation in rat renal mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000;278(4):F650-8.
87. Maurer-Spurej E., Pittendreigh C., Solomons K. The influence of selective serotonin reuptake inhibitors on human platelet serotonin. *Thromb Haemost*. 2004. 119-28.
88. Walther D.J., Peter J.U., Winter S., Holtje M., Paulmann N., Grohmann M., Vowinckel J., Alamo-Bethencourt V., Wilhelm C.S., Ahnert-Hilger G., Bader M. Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release. *Cell*. 2003. 851-62.
89. Morán A., Fernández M.M., Velasco C., Martín M.L., San Román L. Characterization of prejunctional 5-HT₁ receptors that mediate the inhibition of pressor effects elicited by sympathetic stimulation in the pithed rat. *Br J Pharmacol*. 1998;123(6):1205-13.
90. Miranda F.J., Alabadi J.A., Llorens S., Ruiz de Apodaca R.F., Centeno J.M., Alborch E. Diabetes-induced changes in endothelial mechanisms implicated in rabbit carotid arterial response to 5-hydroxytryptamine. *Eur J Pharmacol*. 2000;401(3):397-402.
91. Villalón C.M., Centurión D. Cardiovascular responses produced by 5-hydroxytryptamine: a pharmacological update on the receptors/mechanisms involved and therapeutic implications. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2007;376(1-2):45-63.
92. Sanchez-López A., Centurión D., Lozano-Cuenca J., Muñoz-Islas E., Cobos-Puc L.E., Villalón C.M. [Role of serotonin receptors in vascular tone in the pithed rat]. *Arch Cardiol Mex*. 2009;79 Suppl 2:83-94.
93. Watts S.W., Morrison S.F., Davis R.P., Barman S.M. Serotonin and blood pressure regulation. *Pharmacol Rev*. 2012. 359-88.
94. Ramage A.G. Central cardiovascular regulation and 5-hydroxytryptamine receptors. *Brain Res Bull*. 2001. 425-39.
95. Cote F., Fligny C., Fromes Y., Mallet J., Vodjdani G. Recent advances in understanding serotonin regulation of cardiovascular function. *Trends Mol Med*. 2004. 232-8.
96. Ramage A.G., Villalón C.M. 5-hydroxytryptamine and cardiovascular regulation. *Trends Pharmacol Sci*. 2008;29(9):472-81.
97. Jones B.J., Blackburn T.P. The medical benefit of 5-HT research. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002. 555-68.
98. Yusuf S., Al-Saady N., Camm A.J. 5-hydroxytryptamine and atrial fibrillation: how significant is this piece in the puzzle? *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2003;14(2):209-14.
99. Villalón C.M., López-Munoz F.J., Perusquia M., Terron J.A. External carotid effects of 2-(2-aminoethyl)-quinoline (D-1997) in vagosympathectomized dogs. *Eur J Pharmacol*. 1998. 15-23.
100. Sanchez-López A., Centurión D., Vazquez E., Arulmani U., Saxena P.R., Villalón C.M. Pharmacological profile of the 5-HT-induced inhibition of cardioaccelerator sympathetic outflow in pithed rats: correlation with 5-HT₁ and putative 5-HT_{5A/5B} receptors. *Br J Pharmacol*. 2003. 725-35.
101. Nilsson T., Longmore J., Shaw D., Pantev E., Bard J.A., Brancheck T., Edvinsson L. Characterisation of 5-HT receptors in human coronary arteries by molecular and pharmacological techniques. *Eur J Pharmacol*. 1999. 49-56.
102. Gradin K., Dahlof C., Persson B. A low dietary sodium intake reduces neuronal noradrenaline release and the blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1986;332(4):364-9.
103. Vanhoutte P.M. Endothelium and responsiveness of vascular smooth muscle. *J Hypertens Suppl*. 1987;5(5):S115-20.
104. Vanhoutte P.M. Say NO to ET. *J Auton Nerv Syst*. 2000. 271-7.
105. Côté F., Thevenot E., Fligny C., Fromes Y., Darmon M., Ripoche M.A., Bayard E., Hanoun N., Saurini F., Lechat P., Dandolo L., Hamon M., Mallet J., Vodjdani G. Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003. 13525-30.
106. Nebigil C.G., Choi D.S., Dierich A., Hickel P., Le Meur M., Messaddeq N., Launay J.M., Maroteaux L. Serotonin 2B receptor is required for heart development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000. 9508-13.
107. Vanhoutte P.M. 5-hydroxytryptamine and vascular disease. *Fed Proc*. 1983;42(2):233-7.
108. Frishman W.H., Grewal P. Serotonin and the heart. *Ann Med*. 2000;32(3):195-209.

109. Altura B.M. Pharmacology of venules: some current concepts and clinical potential. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1981;3(6):1413-28.
110. Van Nueten J.M., Janssens W.J., Vanhoutte P.M. Serotonin and vascular reactivity. *Pharmacol Res Commun*. 1985;17(7):585-608.
111. Feniuk W., Humphrey. The Peripheral actions of 5-hydroxytryptamine / edited by John R. Fozard. - Version details - Trove: Oxford; New York: Oxford University Press; 1989.
112. Frishman W.H., Huberfeld S., Okin S., Wang Y.H., Kumar A., Shareef B. Serotonin and serotonin antagonism in cardiovascular and non-cardiovascular disease. *J Clin Pharmacol*. 1995;35(6):541-72.
113. Kaumann A.J., Frenken M., Posival H., Brown A.M. Variable participation of 5-HT_{1-like} receptors and 5-HT₂ receptors in serotonin-induced contraction of human isolated coronary arteries. 5-HT_{1-like} receptors resemble cloned 5-HT_{1D} beta receptors. *Circulation*. 1994;90(3):1141-53.
114. Verheggen R., Hundeshagen A.G., Brown A.M., Schindler M., Kaumann A.J. 5-HT_{1B} receptor-mediated contractions in human temporal artery: evidence from selective antagonists and 5-HT receptor mRNA expression. *Br J Pharmacol*. 1998;124(7):1345-54.
115. Datte J.Y., Offoumou M.A. Involvement of nitric oxide in fading of 5-hydroxytryptamine-induced vasocontraction in rat isolated vena portae smooth muscle. *J Pharm Pharm Sci*. 2004;7(1):1-7.
116. Miranda F.J., Torregrosa G., Salom J.B., Alabadi J.A., Jover T., Barbera M.D., Alborch E. Endothelial modulation of 5-hydroxytryptamine-induced contraction in goat cerebral arteries. *Gen Pharmacol*. 1993;24(3):649-53.
117. Valentin J.P., Bonnafous R., John G.W. Influence of the endothelium and nitric oxide on the contractile responses evoked by 5-HT_{1D} receptor agonists in the rabbit isolated saphenous vein. *Br J Pharmacol*. 1996;119(1):35-42.
118. Karlsson C., Bodelsson G., Bodelsson M., Stjernquist M. Endothelium-derived prostanoids reduce 5-hydroxytryptamine-induced contraction in the human uterine artery. *Hum Reprod*. 1998;13(7):1947-51.
119. Verbeuren T.J., Mennecier P., Laubie M. 5-Hydroxytryptamine-induced vasodilatation in the isolated perfused rat kidney: are endothelial 5-HT_{1A} receptors involved? *Eur J Pharmacol*. 1991. 17-27.
120. Fozard J.R., Kalkman H.O. 5-Hydroxytryptamine (5-HT) and the initiation of migraine: new perspectives. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 1994;350(3):225-9.
121. Schmuck K., Ullmer C., Kalkman H.O., Probst A., Lubbert H. Activation of meningeal 5-HT_{2B} receptors: an early step in the generation of migraine headache? *Eur J Neurosci*. 1996;8(5):959-67.
122. Glusa E., Pertz H.H. Further evidence that 5-HT-induced relaxation of pig pulmonary artery is mediated by endothelial 5-HT_(2B) receptors. *Br J Pharmacol*. 2000;130(3):692-8.
123. McDuffie J.E., Coaxum S.D., Maleque M.A. 5-hydroxytryptamine evokes endothelial nitric oxide synthase activation in bovine aortic endothelial cell cultures. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1999;221(4):386-90.
124. Ishida T., Kawashima S., Hirata K., Yokoyama M. Nitric oxide is produced via 5-HT_{1B} and 5-HT_{2B} receptor activation in human coronary artery endothelial cells. *Kobe J Med Sci*. 1998;44(2):51-63.
125. Ullmer C., Schmuck K., Kalkman H.O., Lubbert H. Expression of serotonin receptor mRNAs in blood vessels. *FEBS Lett*. 1995. 215-21.
126. Verheggen R., Meier A., Werner I., Wienekamp A., Kruschat T., Brattelid T., Levy F.O., Kaumann A. Functional 5-HT receptors in human occipital artery. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2004;369(4):391-401.
127. Schoeffter P., Ullmer C., Bobirnac I., Gabbiani G., Lubbert H. Functional, endogenously expressed 5-hydroxytryptamine 5-HT₇ receptors in human vascular smooth muscle Cells. *Br J Pharmacol*. 1996;117(6):993-4.
128. Terrón J.A., Falcon-Neri A. Pharmacological evidence for the 5-HT₇ receptor mediating smooth muscle relaxation in canine cerebral arteries. *Br J Pharmacol*. 1999;127(3):609-16.
129. Centurión D., Glusa E., Sanchez-López A., Valdivia L.F., Saxena P.R., Villalón C.M. 5-HT₇, but not 5-HT_{2B}, receptors mediate hypotension in vagosympathectomized rats. *Eur J Pharmacol*. 2004. 239-42.
130. García M., Morán A., Martín L.M., Barthelmebs M., San Román L. The nitric oxide synthesis/pathway mediates the inhibitory serotoninergic responses of the pressor effect elicited by sympathetic stimulation in diabetic pithed rats. *Eur J Pharmacol*. 2006;537(1-3):126-34.
131. Fernández M.M., Morán A., Martín M.L., San Román L. Mesenteric vasoconstrictor response to 5-hydroxytryptamine in the in situ blood autoperfused rat mesentery: involvement of 5-HT_(2B) and/or 5-HT_(2C) receptor activation. *Eur J Pharmacol*. 2000. 221-7.
132. Calama E., Morán A., Ortíz de Urbina A.V., Martín M.L., San Román L. Vasoconstrictor responses to 5-hydroxytryptamine in the autoperfused hindquarters of spontaneously hypertensive rats. *Pharmacology*. 2004. 66-72.

133. Calama E., Fernández M.M., Morán A., Martín M.L., San Román L. Vasodilator and vasoconstrictor responses induced by 5-hydroxytryptamine in the in situ blood autoperfused hindquarters of the anaesthetized rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2002;366(2):110-6.
134. Calama E., García M., Jarque M.J., Morán A., Martín M.L., San Román L. 5-Hydroxytryptamine-induced vasodilator responses in the hindquarters of the anaesthetized rat, involve beta2-adrenoceptors. *J Pharm Pharmacol.* 2003;55(10):1371-8.
135. Shoji T., Tamaki T., Fukui K., Iwao H., Abe Y. Renal hemodynamic responses to 5-hydroxytryptamine (5-HT): involvement of the 5-HT receptor subtypes in the canine kidney. *Eur J Pharmacol.* 1989;171(2-3):219-28.
136. Verbeke M., Smollich B., Van de Voorde J., De Ridder L., Lameire N. Beneficial influence of ketanserin on autoregulation of blood flow in post-ischemic kidneys. *J Am Soc Nephrol.* 1996;7(4):621-7.
137. Morán A., Velasco C., Martín M.L., San Román L. Renal vasoconstrictor response to 5-hydroxytryptamine in the in situ autoperfused rat kidney: involvement of angiotensin II and the 5-HT₂ receptor activation. *Eur J Pharmacol.* 1997. 205-11.
138. Morán A., Ortíz de Urbina A.V., Martín M.L., García M., Rodríguez-Barbero A., Dorado F., San Román L. Characterization of contractile 5-hydroxytryptamine receptor subtypes in the in situ autoperfused kidney in the anaesthetized rat. *Eur J Pharmacol.* 2008. 133-7.
139. Takahashi T., Hisa H., Satoh S. Serotonin-induced vasoconstriction in dog kidney. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1992;20(5):779-84.
140. Endlich K., Kuhn R., Steinhausen M. Visualization of serotonin effects on renal vessels of rats. *Kidney Int.* 1993;43(2):314-23.
141. Verbeuren T.J. Vasodilator effect of tertatolol in isolated perfused rat kidneys: involvement of endothelial 5-HT_{1A} receptors. *Cardiology.* 1993;83 Suppl 1:5-9.
142. Tian R.X., Kimura S., Kondou N., Fujisawa Y., Zhou M.S., Yoneyama H., Kosaka H., Rahman M., Nishiyama A., Abe Y. DOI, a 5-HT₂ receptor agonist, induces renal vasodilation via nitric oxide in anesthetized dogs. *Eur J Pharmacol.* 2002. 79-84.
143. Watts S.W., Thompson J.M. Characterization of the contractile 5-hydroxytryptamine receptor in the renal artery of the normotensive rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004. 165-72.
144. Hinton J.M., Hill P., Jeremy J., Garland C. Signalling pathways activated by 5-HT_(1B)/5-HT_(1D) receptors in native smooth muscle and primary cultures of rabbit renal artery smooth muscle cells. *J Vasc Res.* 2000. 457-68.
145. Morán A., Ortíz de Urbina A.V., Martín M.L., Rodríguez-Barbero A., San Román L. Characterization of the contractile 5-hydroxytryptamine receptor in the autoperfused kidney of L-NAME hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 2009. 90-6.
146. Humphrey P.P., Feniuk W., Watts A.D. Prejunctional effects of 5-hydroxytryptamine on noradrenergic nerves in the cardiovascular system. *Fed Proc.* 1983;42(2):218-22.
147. Dilsaver S.C. Cholinergic mechanisms in depression. *Brain Res.* 1986;396(3):285-316.
148. Rutz S., Riegert C., Rothmaier A.K., Buhot M.C., Cassel J.C., Jackisch R. Presynaptic serotonergic modulation of 5-HT and acetylcholine release in the hippocampus and the cortex of 5-HT_{1B}-receptor knockout mice. *Brain Res Bull.* 2006. 81-93.
149. Consolo S., Bertorelli R., Russi G., Zambelli M., Ladinsky H. Serotonergic facilitation of acetylcholine release in vivo from rat dorsal hippocampus via serotonin 5-HT₃ receptors. *J Neurochem.* 1994;62(6):2254-61.
150. Gil-Bea F.J., Dominguez J., García-Alloza M., Marcos B., Lasheras B., Ramirez M.J. Facilitation of cholinergic transmission by combined treatment of ondansetron with flumazenil after cortical cholinergic deafferentation. *NeuroPharmacology.* 2004. 225-32.
151. Ge J., Barnes N.M. 5-HT₄ receptor-mediated modulation of 5-HT release in the rat hippocampus in vivo. *Br J Pharmacol.* 1996;117(7):1475-80.
152. BIRTHELMER A., DOMMES E., JELTSCH H., CASSEL J.C., JACKISCH R. Septal grafts and evoked acetylcholine release in the rat hippocampus after 192 IgG-saporin lesions. *Neuroreport.* 2002;13(7):973-6.
153. Belcheva I., Tashev R., Belcheva S. Hippocampal asymmetry in serotonergic modulation of learning and memory in rats. *Laterality.* 2007. 475-86.
154. Gillet G., Ammor S., Fillion G. Serotonin inhibits acetylcholine release from rat striatum slices: evidence for a presynaptic receptor-mediated effect. *J Neurochem.* 1985;45(6):1687-91.
155. Morán A., Velasco C., Martín M.L., San Román L. Pharmacological characterization of 5-HT receptors in parasympathetic innervation of rat heart. *Eur J Pharmacol.* 1994;252(2):161-6.
156. García M., Morán A., Martín M.L., Ortíz de Urbina A.V., San Román L. Diabetes-induced changes in 5-hydroxytryptamine modulation of vagally-induced bradycardia in rat heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007. 1199-206.

157. Restrepo B., Martín M.L., San Román L., Morán A. Peripheral 5-HT_{1A} and 5-HT₇ serotonergic receptors modulate parasympathetic neurotransmission in long-term diabetic rats. *Exp Diabetes Res.* 2010;2010:686734.
158. Cazzola M., Matera M.G., D'Amato G., Rossi F. Effects of serotonin on airways: recent developments. *Allergy.* 1995;50(1):1-10.
159. McGrath M.A. 5-hydroxytryptamine and neurotransmitter release in canine blood vessels. Inhibition by low and augmentation by high concentrations. *Circ Res.* 1977;41(4):428-35.
160. Pedigo N.W., Yamamura H.I., Nelson D.L. Discrimination of multiple [3H]5-hydroxytryptamine binding sites by the neuroleptic spiperone in rat brain. *J Neurochem.* 1981;36(1):220-6.
161. Allgaier C., Warnke P., Stangl A.P., Feuerstein T.J. Effects of 5-HT receptor agonists on depolarization-induced [3H]-noradrenaline release in rabbit hippocampus and human neocortex. *Br J Pharmacol.* 1995;116(2):1769-74.
162. Saxena P.R., Villalón C.M. 5-Hydroxytryptamine: a chameleon in the heart. *Trends Pharmacol Sci.* 1991;12(6):223-7.
163. Morán A., Velasco C., Salvador T., Martín M.L., San Román L. Inhibitory 5-hydroxytryptamine receptors involved in pressor effects obtained by stimulation of sympathetic outflow from spinal cord in pithed rats. *Br J Pharmacol.* 1994;113(4):1358-62.
164. Fernández M.M., Calama E., Morán A., Martín M.L., San Román L. Characterization of mechanisms involved in presynaptic inhibition of sympathetic pressor effects induced by some 5-HT₁ receptor antagonists. *J Auton Pharmacol.* 2000;20(5-6):313-23.
165. García M., Morán A., Calama E., Martín M.L., Barthelmebs M., San Román L. Diabetes-induced changes in the 5-hydroxytryptamine inhibitory receptors involved in the pressor effect elicited by sympathetic stimulation in the pithed rat. *Br J Pharmacol.* 2005;145(5):593-601.
166. Morán A., Restrepo B., Ortíz de Urbina A.V., García M., Martín M.L., San Román L. Pharmacological profile of 5-hydroxytryptamine-induced inhibition on the pressor effect elicited by sympathetic stimulation in long-term diabetic pithed rats. *Eur J Pharmacol.* 2010;643(1):70-7.
167. Restrepo B., García M., Rodríguez-Barbero A., San Román L., Martín M.L., Morán A. Participation of cyclooxygenase pathway in the vasoconstriction induced by 5-HT in the in situ autoperfused kidney of long-term diabetic rats. *Eur J Pharmacol.* 2011;659(1):37-44.
168. Blessing W.W., Seaman B. 5-hydroxytryptamine(2A) receptors regulate sympathetic nerves constricting the cutaneous vascular bed in rabbits and rats. *NeuroScience.* 2003. 939-48.
169. Molderings G.J., Werner K., Likungu J., Gothert M. Inhibition of noradrenaline release from the sympathetic nerves of the human saphenous vein via presynaptic 5-HT receptors similar to the 5-HT_{1D} subtype. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1990;342(4):371-7.
170. Gothert M., Fink K., Frolich D., Likungu J., Molderings G., Schlicker E., Zentner J. Presynaptic 5-HT auto- and heteroreceptors in the human central and peripheral nervous system. *Behav Brain Res.* 1996;73(1-2):89-92.
171. Medhurst A.D., Brown A.M., Kaumann A.J., Parsons A.A. Simultaneous measurement of [3H]noradrenaline release and neurogenic contraction under identical conditions, to determine the prejunctional inhibitory effects of SKF 99101H and BRL 56905 in dog saphenous vein. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1997;355(4):475-82.
172. Molderings G.J., Frolich D., Likungu J., Gothert M. Inhibition of noradrenaline release via presynaptic 5-HT_{1D} alpha receptors in human atrium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1996;353(3):272-80.
173. Charlton K.G., Bond R.A., Clarke D.E. An inhibitory prejunctional 5-HT₁-like receptor in the isolated perfused rat kidney. Apparent distinction from the 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} and 5-HT_{1C} subtypes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1986;332(1):8-15.
174. Molderings G.J., Fink K., Schlicker E., Gothert M. Inhibition of noradrenaline release via presynaptic 5-HT_{1B} receptors of the rat vena cava. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1987;336(3):245-50.
175. Barrus M.T., Marin J., Villamor J., Balfagon G. Receptors involved in the modulation of 5-hydroxytryptamine release in bovine cerebral arteries. *J Pharm Pharmacol.* 1992;44(10):824-9.
176. Molderings G.J., Bruss M., Gothert M. Functional and molecular identification of 5-hydroxytryptamine receptors in rabbit pulmonary artery: involvement in complex regulation of noradrenaline release. *Pharmacol Rep.* 2006;58(2):188-99.
177. Ogawa Y., Takenaka T., Onodera S., Tobise K., Takeda A., Hirayama T., Morita K., Kikuchi K. Comparison of 5-hydroxytryptamine-induced contraction of rat pulmonary artery to that of aorta in vitro. *Jpn Circ J.* 1995;59(2):89-97.
178. Shaw A.M., Brown C., Irvine J., Bunton D.C., MacDonald A. Role of the 5-HT_(2A) receptor and alpha(1)-adrenoceptor in the contractile response of rat pulmonary artery to 5-HT in the

- presence and absence of nitric oxide. *Pulm Pharmacol Ther.* 2000. 277-85.
179. Villalón C.M., Contreras J., Ramirez-San Juan E., Castillo C., Perusquia M., Terrón J.A. Characterization of prejunctional 5-HT receptors mediating inhibition of sympathetic vasopressor responses in the pithed rat. *Br J Pharmacol.* 1995;116(8):3330-6.
180. Yoshioka M., Matsumoto M., Numazawa R., Togashi H., Smith C.B., Saito H. Changes in the regulation of 5-hydroxytryptamine release by alpha2-adrenoceptors in the rat hippocampus after long-term desipramine treatment. *Eur J Pharmacol.* 1995;294(2-3):565-70.
181. Bandoh T., Hayashi M., Ino K., Takada S., Ushizawa D., Hoshi K. Acute effect of milnacipran on the relationship between the locus coeruleus noradrenergic and dorsal raphe serotonergic neuronal transmitters. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2004. 471-8.
182. Trincavelli M.L., Cuboni S., Montali M., Santaguida S., Lucacchini A., Martini C. Norepinephrine-mediated regulation of 5HT₁ receptor functioning in human platelets. *Neurochem Res.* 2008;33(7):1292-300.
183. McCance D.R., Hanson R.L., Pettitt D.J., Bennett P.H., Hadden D.R., Knowler W.C. Diagnosing diabetes mellitus--do we need new criteria? *Diabetologia.* 1997;40(3):247-55.
184. Kuzuya T., Nakagawa S., Satoh J., Kanazawa Y., Iwamoto Y., Kobayashi M., Nanjo K., Sasaki A., Seino Y., Ito C., Shima K., Nonaka K., Kadowaki T. Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of Diabetes Mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 2002. 65-85.
185. King H., Aubert R.E., Herman W.H. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care.* 1998;21(9):1414-31.
186. Informes de la Federación Internacional de Diabetes sobre el progreso del Día Mundial de la Diabetes, 2010. 2010. Available from: <http://www.scielo.sa.cr/scieloOrg/php/reflinks.php?refpid=S0001-6002201100010000200001&lng=es&pid=S0001-60022011000100002>.
187. Sanger F. Sequences, sequences, and sequences. *Annu Rev Biochem.* 1988;57:1-28.
188. Sanger F. The early days of DNA sequences. *Nat Med.* 2001. 267-8.
189. Goeddel D.V., Kleid D.G., Bolivar F., Heyneker H.L., Yansura D.G., Crea R., Hirose T., Kraszewski A., Itakura K., Riggs A.D. Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(1):106-10.
190. Moorhouse J.A., Carter S.A., Doupe J. Vascular responses in diabetic peripheral neuropathy. *Br Med J.* 1966;1(5492):883-8.
191. Kappelle A.C., Biessels G.J., Van Buren T., Erkelens D.W., De Wildt D.J., Gispen W.H. Effects of nimodipine on sciatic nerve blood flow and vasa nervorum responsiveness in the diabetic rat. *Eur J Pharmacol.* 1993;250(1):43-9.
192. Kappelle A.C., Biessels G., Bravenboer B., Van Buren T., Traber J., De Wildt D.J., Gispen W.H. Beneficial effect of the Ca²⁺ antagonist, nimodipine, on existing diabetic neuropathy in the BB/Wor rat. *Br J Pharmacol.* 1994;111(3):887-93.
193. Jamnicky B., Muck-Seler D., Slijepcevic M. Favourable effect of tryptophan/insulin treatment on serotonergic imbalance in alloxan diabetic rats. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol.* 1993;105(2):267-73.
194. Sandrini M., Vitale G., Vergoni A.V., Ottani A., Bertolini A. Streptozotocin-induced diabetes provokes changes in serotonin concentration and on 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors in the rat brain. *Life Sci.* 1997. 1393-7.
195. Lackovic Z., Salkovic M., Kuci Z., Relja M. Effect of long-lasting diabetes mellitus on rat and human brain monoamines. *J Neurochem.* 1990;54(1):143-7.
196. Bellush L.L., Reid S.G. Metabolic and neurochemical profiles in insulin-treated diabetic rats. *Am J Physiol.* 1994;266(1 Pt 2):R87-94.
197. Bellush L.L., Reid S.G., North D. The functional significance of biochemical alterations in streptozotocin-induced diabetes. *Physiol Behav.* 1991. 973-81.
198. Hodgson W.C., Sikorski B.W., King R.G. Cardiovascular sensitivity changes to eicosanoids in rats with experimentally induced diabetes mellitus. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1992;19(1):9-15.
199. James G.M., Hodgson W.C. Attenuated 5-HT₂ receptor-mediated responses in hindquarters of diabetic rats. *Eur J Pharmacol.* 1995. 109-15.
200. Hodgson W.C., King R.G., Boura A.L. Augmented potentiation of renal vasoconstrictor responses by thromboxane A2 receptor stimulation in the alloxan-diabetic rat. *J Pharm Pharmacol.* 1990;42(6):423-7.
201. Miranda F.J., Alabadi J.A., Llorens S., Ruiz de Apodaca R.F., Centeno J.M., Alborch E. Experimental diabetes induces hyperreactivity of rabbit renal artery to 5-hydroxytryptamine. *Eur J Pharmacol.* 2002;439(1-3):121-7.
202. Agrawal D.K., McNeill J.H. Vascular responses to agonists in rat mesenteric artery from diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 1987;65(7):1484-90.
203. Abebe W., MacLeod K.M. Protein kinase C-mediated contractile responses of arteries from diabetic rats. *Br J Pharmacol.* 1990;101(2):465-71.

204. Takiguchi Y., Satoh N., Hashimoto H., Nakashima M. Changes in vascular reactivity in experimental diabetic rats: comparison with hypothyroid rats. *Blood Vessels*. 1988;25(5):250-60.
205. Ralevic V., Belai A., Burnstock G. Effects of streptozotocin-diabetes on sympathetic nerve, endothelial and smooth muscle function in the rat mesenteric arterial bed. *Eur J Pharmacol*. 1995. 193-9.
206. Lehmann R., Schleicher E.D. Molecular mechanism of diabetic nephropathy. *Clin Chim Acta*. 2000. 135-44.
207. Raptis A.E., Viberti G. Pathogenesis of diabetic nephropathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2001;109 Suppl 2:S424-37.
208. Marre M., Berrut G., Bouhanick B. Hypertension and diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother*. 1993;47(2-3):61-6.
209. Cooper M.E., Allen T.J., Jerums G., Doyle A.E. Accelerated progression of diabetic nephropathy in the spontaneously hypertensive streptozotocin diabetic rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1986;13(9):655-62.
210. Keynan S., Hirshberg B., Levin-Iaina N., Wexler I.D., Dahan R., Reinhartz E., Ovadia H., Wollman Y., Chernihovskiy T., Iaina A., Raz I. Renal nitric oxide production during the early phase of experimental diabetes mellitus. *Kidney Int*. 2000. 740-7.
211. Craven P.A., Caines M.A., DeRubertis F.R. Sequential alterations in glomerular prostaglandin and thromboxane synthesis in diabetic rats: relationship to the hyperfiltration of early diabetes. *Metabolism*. 1987. 95-103.
212. Hao C.M., Breyer M.D. Physiological regulation of prostaglandins in the kidney. *Annu Rev Physiol*. 2008;70:357-77.
213. Komers R., Lindsley J.N., Oyama T.T., Schutzer W.E., Reed J.F., Mader S.L., Anderson S. Immunohistochemical and functional correlations of renal cyclooxygenase-2 in experimental diabetes. *J Clin Invest*. 2001;107(7):889-98.
214. Cheng H.F., Wang C.J., Moeckel G.W., Zhang M.Z., McKanna J.A., Harris R.C. Cyclooxygenase-2 inhibitor blocks expression of mediators of renal injury in a model of diabetes and hypertension. *Kidney Int*. 2002. 929-39.
215. Dey A., Williams R.S., Pollock D.M., Stepp D.W., Newman J.W., Hammock B.D., Imig J.D. Altered kidney CYP2C and cyclooxygenase-2 levels are associated with obesity-related albuminuria. *Obes Res*. 2004. 1278-89.
216. Khan K.N., Stanfield K.M., Harris R.K., Baron D.A. Expression of cyclooxygenase-2 in the macula densa of human kidney in hypertension, congestive heart failure, and diabetic nephropathy. *Ren Fail*. 2001;23(3-4):321-30.
217. Oyama Y., Kawasaki H., Hattori Y., Kanno M. Attenuation of endothelium-dependent relaxation in aorta from diabetic rats. *Eur J Pharmacol*. 1986;132(1):75-8.
218. Félétou M., Moreau N., Duhault J. Vascular responsiveness in young, diabetic, and aging hyperinsulinemic rats. *Life Sci*. 1994;54(23):1801-13.
219. Kobayashi T., Taguchi K., Nemoto S., Nogami T., Matsumoto T., Kamata K. Activation of the PDK-1/Akt/eNOS pathway involved in aortic endothelial function differs between hyperinsulinemic and insulin-deficient diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009. H1767-75.
220. Johnstone M.T., Creager S.J., Scales K.M., Cusco J.A., Lee B.K., Creager M.A. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent Diabetes Mellitus. *Circulation*. 1993;88(6):2510-6.
221. Van Etten R.W., De Koning E.J., Verhaar M.C., Gaillard C.A., Rabelink T.J. Impaired NO-dependent vasodilation in patients with Type II (non-insulin-dependent) Diabetes Mellitus is restored by acute administration of folate. *Diabetologia*. 2002;45(7):1004-10.
222. Triggle C.R., Ding H., Anderson T.J., Pannirselvam M. The endothelium in health and disease: a discussion of the contribution of non-nitric oxide endothelium-derived vasoactive mediators to vascular homeostasis in normal vessels and in type II diabetes. *Mol Cell Biochem*. 2004;263(1-2):21-7.
223. Silva A.M., Schaan B.D., Signori L.U., Plentz R.D., Moreno H.Jr., Bertoluci M.C., Irigoyen M.C. Microalbuminuria is associated with impaired arterial and venous endothelium-dependent vasodilation in patients with Type 2 diabetes. *J Endocrinol Invest*. 2010. 696-700.
224. Cameron N.E., Eaton S.E., Cotter M.A., Tesfaye S. Vascular factors and metabolic interactions in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetologia*. 2001;44(11):1973-88.
225. Lassegue B., Clempus R.E. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003. R277-97.
226. Paravicini T.M., Touyz R.M. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*. 31 Suppl 2. 2008. S170-80.
227. Pieper G.M., Dembny K., Siebeneich W. Long-term treatment in vivo with NOX-101, a scavenger of nitric oxide, prevents diabetes-induced endothelial dysfunction. *Diabetologia*. 1998;41(10):1220-6.
228. Cosentino F., Hishikawa K., Katusic Z.S., Luscher T.F. High glucose increases nitric oxide

- synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. *Circulation*. 1997;96(1):25-8.
229. Brodsky S.V., Gao S., Li H., Goligorsky M.S. Hyperglycemic switch from mitochondrial nitric oxide to superoxide production in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283(5):H2130-9.
230. Capellini V.K., Celotto A.C., Baldo C.F., Olivon V.C., Viaro F., Rodrigues A.J., Evora P.R. Diabetes and vascular disease: basic concepts of nitric oxide physiology, endothelial dysfunction, oxidative stress and therapeutic possibilities. *Curr Vasc Pharmacol*. 2010. 526-44.
231. Milstien S., Katusic Z. Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999. 681-4.
232. Ergul A. Endothelin-1 and diabetic complications: focus on the vasculature. *Pharmacol Res*. 2011. 477-82.
233. Bank N., Aynedjian H.S. Role of EDRF (nitric oxide) in diabetic renal hyperfiltration. *Kidney Int*. 1993;43(6):1306-12.
234. Tolins J.P., Shultz P.J., Raj L., Brown D.M., Mauer S.M. Abnormal renal hemodynamic response to reduced renal perfusion pressure in diabetic rats: role of NO. *Am J Physiol*. 1993;265(6 Pt 2):F886-95.
235. Choi K.C., Kim N.H., An M.R., Kang D.G., Kim S.W., Lee J. Alterations of intrarenal renin-angiotensin and nitric oxide systems in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kidney Int Suppl*. 1997;60:S23-7.
236. Veelken R., Hilgers K.F., Hartner A., Haas A., Bohmer K.P., Sterzel R.B. Nitric oxide synthase isoforms and glomerular hyperfiltration in early diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11(1):71-9.
237. Tesfamariam B., Jakubowski J.A., Cohen R.A. Contraction of diabetic rabbit aorta caused by endothelium-derived PGH₂-TxA₂. *Am J Physiol*. 1989;257(5 Pt 2):H1327-33.
238. Shimizu K., Muramatsu M., Kakegawa Y., Asano H., Toki Y., Miyazaki Y., Okumura K., Hashimoto H., Ito T. Role of prostaglandin H₂ as an endothelium-derived contracting factor in diabetic state. *Diabetes*. 1993;42(9):1246-52.
239. Arisz L., Donker A.J., Brentjens J.R., Van der Hem G.K. The effect of indomethacin on proteinuria and kidney function in the nephrotic syndrome. *Acta Med Scand*. 1976;199(1-2):121-5.
240. Walshe J.J., Venuto R.C. Acute oliguric renal failure induced by indomethacin: possible mechanism. *Ann Intern Med*. 1979;91(1):47-9.
241. Antillon M., Cominelli F., Lo S., Morán M., Somberg K., Reynolds T., Zipser R.D. Effects of oral prostaglandins on indomethacin-induced renal failure in patients with cirrhosis and ascites. *J Rheumatol Suppl*. 1990;20:46-9.
242. Angulo J., Rodriguez-Manas L., Peiro C., Neira M., Marin J., Sanchez-Ferrer C.F. Impairment of nitric oxide-mediated relaxations in anaesthetized autoperfused streptozotocin-induced diabetic rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1998;358(5):529-37.
243. Pieper G.M., Adams M.B., Roza A.M. Pancreatic transplantation reverses endothelial dysfunction in experimental Diabetes Mellitus. *Surgery*. 1998. 89-95.
244. García Delgado-Morente A. GMA. Guía de seguimiento farmacoterapéutico sobre depresión. Bayvit, editor. Barcelona2004.
245. Artigas F. Serotonin receptors involved in antidepressant effects. *Pharmacol Ther*. 2013;137(1):119-31.
246. Gulseren L., Gulseren S., Hekimsoy Z., Mete L. Comparison of fluoxetine and paroxetine in type II Diabetes Mellitus patients. *Arch Med Res*. 2005. 159-65.
247. Gavard J.A., Lustman P.J., Clouse R.E. Prevalence of depression in adults with Diabetes. An epidemiological evaluation. *Diabetes Care*. 1993;16(8):1167-78.
248. De Groot M., Kushnick M., Doyle T., Merrill J., McGlynn M., Shubrook J., Schwartz F. Depression among adults with diabetes: prevalence, impact, and treatment options. *Diabetes Spectr*. 2010;23(1):15-8.
249. Warnock J.K., Mutzig E.M. Diabetes Mellitus and major depression: considerations for treatment of Native Americans. *J Okla State Med Assoc*. 1998;91(9):488-93.
250. Lustman P.J., Griffith L.S., Clouse R.E., Cryer P.E. Psychiatric illness in Diabetes Mellitus. Relationship to symptoms and glucose control. *J Nerv Ment Dis*. 1986;174(12):736-42.
251. Lustman P.J., Griffith L.S., Clouse R.E., Freedland K.E., Eisen S.A., Rubin E.H., Carney R.M., McGill J.B. Effects of nortriptyline on depression and glycemic control in diabetes: results of a double-blind, placebo-controlled trial. *Psychosom Med*. 1997;59(3):241-50.
252. Lustman P.J., Anderson R.J., Freedland K.E., De Groot M., Carney R.M., Clouse R.E. Depression and poor glycemic control: a meta-analytic review of the literature. *Diabetes Care*. 2000;23(7):934-42.
253. Lustman P.J., Clouse R.E. Depression in diabetic patients: the relationship between mood and glycemic control. *J Diabetes Complications*. 2005. 113-22.
254. Derijks H.J., Janknegt R., Heerdink E.R., De Koning F.H., Krekels M.M., Looij B.J., Egberts A.C. Influence of antidepressant use on glycemic control in patients with Diabetes Mellitus: an open-

- label comparative study. *J Clin Psychopharmacol*. 2009. 405-8.
255. Gomez R., Huber J., Lhullier F., Barros H.M. Plasma insulin levels are increased by sertraline in rats under oral glucose overload. *Braz J Med Biol Res*. 2001. 1569-72.
256. Barradas M.A., Gill D.S., Fonseca V.A., Mikhailidis D.P., Dandona P. Intraplatelet serotonin in patients with Diabetes Mellitus and peripheral vascular disease. *Eur J Clin Invest*. 1988;18(4):399-404.
257. Malyszko J., Mysliwiec M. Blood platelet function, plasma serotonin and lipid *Metabolism in patients with diabetic nephropathy*. *Pol Arch Med Wewn*. 1995;94(1):26-31.
258. Martín F.J., Miguez J.M., Aldegunde M., Atienza G. Platelet serotonin transport is altered in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci*. 1995. 1807-15.
259. Murray J., Kaneko J.J., Rucker R.B. Experimental diabetes and platelet aggregation in the rat. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1983;41(2):283-91.
260. Malyszko J., Mazerska M., Mysliwiec M. Lipid metabolism and fibrinolysis in diabetic nephropathy in the course of diabetes type II. *Pol Arch Med Wewn*. 1995;94(4):324-30.
261. Hasegawa Y., Suehiro A., Higasa S., Namba M., Kakishita E. Enhancing effect of advanced glycation end products on serotonin-induced platelet aggregation in patients with Diabetes Mellitus. *Thromb Res*. 2002. 319-23.
262. Coelho W.S., Sola-Penna M. Serotonin regulates 6-phosphofructo-1-kinase activity in a PLC-PKC-CaMK II- and Janus kinase-dependent signaling pathway. *Mol Cell Biochem*. 2013;372(1-2):211-20.
263. Price J.C., Kelley D.E., Ryan C.M., Meltzer C.C., Drevets W.C., Mathis C.A., Mazumdar S., Reynolds C.F. Evidence of increased serotonin-1A receptor binding in type 2 diabetes: a positron emission tomography study. *Brain Res*. 2002. 97-103.
264. Ni W., Geddes T.J., Priestley J.R., Szasz T., Kuhn D.M., Watts S.W. The existence of a local 5-hydroxytryptaminergic system in peripheral arteries. *Br J Pharmacol*. 2008. 663-74.
265. Restrepo B., García M., López C., Martín M.L., San Román L., Morán A. The cyclooxygenase and nitric oxide synthesis/pathways mediate the inhibitory serotonergic response to the pressor effect elicited by sympathetic stimulation in long-term diabetic pithed rats. *Pharmacology*. 2012. 169-76.
266. Park S., Choi S.B. Does fluoxetine administration influence insulin resistance in 90% pancreatectomized rats?. *Metabolism*. 2002. 38-43.
267. Ghaeli P., Shahsavand E., Mesbahi M., Kamkar M.Z., Sadeghi M., Dashti-Khavidaki S. Comparing the effects of 8-week treatment with fluoxetine and imipramine on fasting blood glucose of patients with major depressive disorder. *J Clin Psychopharmacol*. 2004. 386-8.
268. Fernández M.M. Implicaciones serotoninérgicas cardiovasculares in vivo: neurotransmisión simpática y territorios vasculares autoperfundidos en rata.: Universidad de Salamanca; 1999.
269. McNamara R.K., Able J.A., Rider T., Tso P., Jandacek R. Effect of chronic fluoxetine treatment on male and female rat erythrocyte and prefrontal cortex fatty acid composition. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2010. 1317-21.
270. Kolta M.G., Soliman K.F., Williams B.B. Role of 5-hydroxytryptamine in the regulation of brain neuropeptides in normal and diabetic rat. *Horm Res*. 1986;23(2):112-21.
271. Head R.J., Longhurst P.A., Panek R.L., Stitzel R.E. A contrasting effect of the diabetic state upon the contractile responses of aortic preparations from the rat and rabbit. *Br J Pharmacol*. 1987;91(2):275-86.
272. Ozturk Y., Altan V.M., Yildizoglu-Ari N. Duration-dependent changes in calcium responsiveness in the alloxan-diabetic rat intestine. *J Diabetes Complications*. 1996. 288-93.
273. Gillespie J.S., Muir T.C. A method of stimulating the complete sympathetic outflow from the spinal cord to blood vessels in the pithed rat. *Br J Pharmacol Chemother*. 1967;30(1):78-87.
274. Gillespie J.S., MacLaren A., Marshall R.W., Muir T.C., Pollock D. Segmental stimulation of spinal autonomic outflows in the pithed cat and rat. *J Physiol*. 1970;211(2):Suppl:11.
275. Zukowska-Grojec Z., Bayorh M.A., Zerbe R.L., Palkovits M., Kopin I.J. Role of catecholamines and vasopressin in cardiovascular responses to bilateral dorsolateral transection of the medulla oblongata in the rat. *Hypertension*. 1983;5(6):908-15.
276. Wotring V.E., Yoon K.W. The inhibitory effects of nicotinic antagonists on currents elicited by GABA in rat hippocampal neurons. *NeuroScience*. 1995. 293-300.
277. Wood M., Chaubey M., Atkinson P., Thomas D.R. Antagonist activity of meta-chlorophenylpiperazine and partial agonist activity of 8-OH-DPAT at the 5-HT₇ receptor. *Eur J Pharmacol*. 2000;396(1):1-8.
278. Baxter G., Kennett G., Blaney F., Blackburn T. 5-HT₂ receptor subtypes: a family reunited? *Trends Pharmacol Sci*. 1995;16(3):105-10.
279. Ireland S.J., Tyers M.B. Pharmacological characterization of 5-hydroxytryptamine-induced

- depolarization of the rat isolated vagus nerve. *Br J Pharmacol.* 1987;90(1):229-38.
280. Yoshitake T., Kehr J. Differential effects of (R)-, (R, S)- and (S)-8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin on hippocampal serotonin release and induction of hypothermia in awake rats. *Life Sci.* 2004;74(23):2865-75.
281. Tomkins D.M., O'Neill M.F. Effect of 5-HT_(1B) receptor ligands on self-administration of ethanol in an operant procedure in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2000;66(1):129-36.
282. Buhlen M., Fink K., Boing C., Gothert M. Evidence for presynaptic location of inhibitory 5-HT_{1D} beta-like autoreceptors in the guinea-pig brain cortex. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1996;353(3):281-9.
283. Kennett G.A., Ainsworth K., Trail B., Blackburn T.P. BW 723C86, a 5-HT_{2B} receptor agonist, causes hyperphagia and reduced grooming in rats. *NeuroPharmacology.* 1997;36(2):233-9.
284. Hemrick-Luecke S.K., Fuller R.W. Involvement of 5-HT_{2A} receptors in the elevation of rat serum corticosterone concentrations by quipazine and MK-212. *Eur J Pharmacol.* 1996;311(2-3):207-11.
285. Fletcher A., Bill D.J., Bill S.J., Cliffe I.A., Dover G.M., Forster E.A., Haskins J.T., Jones D., Mansell H.L., Reilly Y. WAY100135: a novel, selective antagonist at presynaptic and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors. *Eur J Pharmacol.* 1993;237(2-3):283-91.
286. Price G.W., Burton M.J., Collin L.J., Duckworth M., Gaster L., Gothert M., Jones B.J., Roberts C., Watson J.M., Middlemiss D.N. SB-216641 and BRL-15572 compounds to pharmacologically discriminate h5-HT_{1B} and h5-HT_{1D} receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1997;356(3):312-20.
287. Watanabe Y., Usui H., Kobayashi S., Yoshiwara H., Shibano T., Tanaka T., Morishima Y., Yasuoka M., Kanao M. Syntheses and 5-HT₂ antagonist activity of bicyclic 1,2,4-triazol-3(2H)-one and 1,3,5-triazine-2,4(3H)-dione derivatives. *J Med Chem.* 1992;35(1):189-94.
288. Kogan H.A., Marsden C.A., Fone K.C. DR4004, a putative 5-HT₍₇₎ receptor antagonist, also has functional activity at the dopamine D2 receptor. *Eur J Pharmacol.* 2002. 105-11.
289. Ogawa T., Sugidachi A., Tanaka N., Fujimoto K., Asai F. Pharmacological profiles of R-96544, the active form of a novel 5-HT_{2A} receptor antagonist R-102444. *Eur J Pharmacol.* 2002;457(2-3):107-14.
290. Bonhaus D.W., Rocha C.L., Dawson M.W., Eglén R.M. Absorption and brain penetration of a high affinity, highly selective 5-HT_{2C} receptor antagonist, RS-102221. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;861:269.
291. Moore P.K., Handy R.L. Selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase is no NOS really good NOS for the nervous system? *Trends Pharmacol Sci.* 1997;18(6):204-11.
292. Hwang T.L., Wu C.C., Teng C.M. Comparison of two soluble guanylyl cyclase inhibitors, methylene blue and ODQ, on sodium nitroprusside-induced relaxation in guinea-pig trachea. *Br J Pharmacol.* 1998;125(6):1158-63.
293. Palomer A., Cabre F., Pascual J., Campos J., Trujillo M.A., Entrena A., Gallo M.A., García L., Mauleon D., Espinosa A. Identification of novel cyclooxygenase-2 selective inhibitors using pharmacophore models. *J Med Chem.* 2002;45(7):1402-11.
294. Schmidt H.H., Warner T.D., Ishii K., Sheng H., Murad F. Insulin secretion from pancreatic B cells caused by L-arginine-derived nitrogen oxides. *Science.* 1992;255(5045):721-3.
295. Ochi T., Goto T. Differential effect of FR122047, a selective cyclo-oxygenase-1 inhibitor, in rat chronic models of arthritis. *Br J Pharmacol.* 2002;135(3):782-8.
296. Cullen L., Kelly L., Connor S.O., Fitzgerald D.J. Selective cyclooxygenase-2 inhibition by nimesulide in man. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;287(2):578-82.
297. Al Jarad N., Hui K.P., Barnes N. Effects of a thromboxane receptor antagonist on prostaglandin D2 and histamine induced bronchoconstriction in man. *Br J Clin Pharmacol.* 1994;37(1):97-100.
298. Fozard J.R. MDL 72222: a potent and highly selective antagonist at neuronal 5-hydroxytryptamine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1984;326(1):36-44.
299. Borkowski K.R., Quinn P. Adrenaline and the development of genetic Hypertension. *J Hypertens Suppl.* 1984;2(3):S81-3.
300. Roquebert J., Morán A., Demichel P., Sauvage M.F. Pharmacological characterization of dopamine receptors in parasympathetic innervation of rat heart. *Eur J Pharmacol.* 1991;200(1):59-63.
301. Villalón C.M., Contreras J., Ramriez-San Juan E., Castillo C., Perusquia M., López-Munoz F.J., Terron J.A. 5-hydroxytryptamine inhibits pressor responses to preganglionic sympathetic nerve stimulation in pithed rats. *Life Sci.* 1995;57(8):803-12.
302. García M. Influencia de la diabetes experimental en respuestas serotoninérgicas a nivel cardiovascular y renal. Salamanca: Universidad de Salamanca; 2005.
303. Restrepo B. Influencia de la diabetes experimental crónica en respuestas serotoninérgicas a nivel cardiovascular y renal. Salamanca: Universidad de Salamanca; 2011.

304. Docherty J.R. Investigations of cardiovascular 5-hydroxytryptamine receptor subtypes in the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1988;337(1):1-8.
305. Chen J.P., Van Praag H.M., Gardner E.L. Activation of 5-HT₃ receptor by 1-phenylbiguanide increases dopamine release in the rat nucleus accumbens. *Brain Res.* 1991;543(2):354-7.
306. Lovell P.J., Bromidge S.M., Dabbs S., Duckworth D.M., Forbes I.T., Jennings A.J., King F.D., Middlemiss D.N., Rahman S. K., Saunders D.V., Collin L.L., Hagan J.J., Riley G.J., Thomas D.R. A novel, potent, and selective 5-HT₍₇₎ antagonist: (R)-3-(2-(2-(4-methylpiperidin-1-yl)ethyl)pyrrolidine-1-sulfonyl) phenol (SB-269970). *J Med Chem.* 2000;43(3):342-5.
307. Hagan J.J., Price G.W., Jeffrey P., Deeks N.J., Stean T., Piper D., Smith M.I., Upton N., Medhurst A.D., Middlemiss D.N., Riley G.J., Lovell P.J., Bromidge S.M., Thomas D.R. Characterization of SB-269970-A, a selective 5-HT₍₇₎ receptor antagonist. *Br J Pharmacol.* 2000;130(3):539-48.
308. Helton D.R., Colbert W.E. Alterations of in-vitro 5-HT receptor pharmacology as a function of multiple treatment with 5-hydroxytryptamine or 8-hydroxy-2-(di-N-propylamino) tetralin in rat isolated aorta, uterus and fundus, and guinea-pig isolated trachea. *J Pharm Pharmacol.* 1994;46(11):902-5.
309. Castillo C.I.M., Terron J.A., Villalón C.M., Hong E. Direct effects of indorenate and 8-OH-DPAT on the blood pressure of pithed rats. *Drug Development Research.* 1994;33(1):20-5.
310. Shepherd S.L., Jordan D., Ramage A.G. Comparison of the effects of IVth ventricular administration of some tryptamine analogues with those of 8-OH-DPAT on autonomic outflow in the anaesthetized cat. *Br J Pharmacol.* 1994;111(2):616-24.
311. Szkudelski T., Szkudelska K. Glucose as a lipolytic agent: studies on isolated rat adipocytes. *Physiol Res.* 2000;49(2):213-7.
312. Sailaja Devi M.M., Das U.N. Effect of prostaglandins against alloxan-induced Diabetes Mellitus. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2006. 39-60.
313. Yen T.T., Fuller R.W. Preclinical pharmacology of fluoxetine, a serotonergic drug for weight loss. *Am J Clin Nutr.* 1992;55 (1 Suppl):177s-80s.
314. D'Souza D.N., Zhang Y., García F., Battaglia G., Van de Kar L.D. Fluoxetine-induced changes in body weight and 5-HT_{1A} receptor-mediated hormone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;286(2):R390-7.
315. Howarth F.C., Jacobson M., Shafiullah M., Ljubisavljevic M., Adeghate E. Heart rate, body temperature and physical activity are variously affected during insulin treatment in alloxan-induced type 1 diabetic rat. *Physiol Res.* 2011. 65-73.
316. Taylor P.D., Oon B.B., Thomas C.R., Poston L. Prevention by insulin treatment of endothelial dysfunction but not enhanced noradrenaline-induced contractility in mesenteric resistance arteries from streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Pharmacol.* 1994;111(1):35-41.
317. Andersson D., Brunkwall J., Bergqvist D., Edvinsson L. Diminished contractile responses to neuropeptide Y of arteries from diabetic rabbits. *J Auton Nerv Syst.* 1992;37(3):215-22.
318. Ralevic V., Belai A., Burnstock G. Impaired sensory-motor nerve function in the isolated mesenteric arterial bed of streptozotocin-diabetic and ganglioside-treated streptozotocin-diabetic rats. *Br J Pharmacol.* 1993;110(3):1105-11.
319. Kennett G.A., Bright F., Trail B., Baxter G.S., Blackburn T.P. Effects of the 5-HT_{2B} receptor agonist, BW 723C86, on three rat models of anxiety. *Br J Pharmacol.* 1996;117(7):1443-8.
320. Bhardwaj R., Moore P.K. Endothelium-derived relaxing factor and the effects of acetylcholine and histamine on resistance *Blood Vessels.* *Br J Pharmacol.* 1988;95(3):835-43.
321. Heygate K.M., Lawrence I.G., Bennett M.A., Thurston H. Impaired endothelium-dependent relaxation in isolated resistance arteries of spontaneously diabetic rats. *Br J Pharmacol.* 1995;116(8):3251-9.
322. Choi K.C., Lee S.C., Kim S.W., Kim N.H., Lee J.U., Kang Y.J. Role of nitric oxide in the pathogenesis of diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Intern Med.* 1999;14(1):32-41.
323. Yamada K., Nakano H., Nakayama M., Nozaki O., Miura Y., Nishimura M., Tsuchida H., Mimura N. Endothelium-dependent relaxation in peripheral vasculature and kidney of non-insulin-dependent Diabetes Mellitus. *J Diabetes Complications.* 1995;9(4):203-7.
324. Leo C.H., Hart J.L., Woodman O.L. Impairment of both nitric oxide-mediated and EDHF-type relaxation in small mesenteric arteries from rats with streptozotocin-induced Diabetes. *Br J Pharmacol.* 2011;162(2):365-77.
325. Sikorski B.W., James G.M., Glance S.D., Hodgson W.C., King R.G. Effect of endothelium on diabetes-induced changes in constrictor responses mediated by 5-hydroxytryptamine in rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993;22(3):423-30.
326. Taylor P.D., Graves J.E., Poston L. Selective impairment of acetylcholine-mediated endothelium-dependent relaxation in isolated resistance arteries of the streptozotocin-induced diabetic rat. *Clin Sci (Lond).* 1995;88(5):519-24.

327. Bolego C., Vegeto E., Pinna C., Maggi A., Cignarella A. Selective agonists of estrogen receptor isoforms: new perspectives for cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(10):2192-9.
328. Rees D.D., Palmer R.M., Schulz R., Hodson H.F., Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol.* 1990;101(3):746-52.
329. Palmer R.M., Rees D.D., Ashton D.S., Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988. 1251-6.
330. Palmer R.M., Ashton D.S., Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 1988;333(6174):664-6.
331. Tousoulis D., Tentolouris C., Crake T., Katsimaglis G., Stefanadis C., Toutouzas P., Davies G.J. Effects of L- and D-arginine on the basal tone of human diseased coronary arteries and their responses to substance P. *Heart.* 1999;81(5):505-11.
332. Schoeffter P., Hoyer D. 5-Hydroxytryptamine (5-HT)-induced endothelium-dependent relaxation of pig coronary arteries is mediated by 5-HT receptors similar to the 5-HT_{1D} receptor subtype. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990;252(1):387-95.
333. Sugimoto H., Shikata K., Matsuda M., Kushiro M., Hayashi Y., Hiragushi K., Wada J., Makino, H. Increased expression of endothelial cell nitric oxide synthase (eNOS) in afferent and glomerular endothelial cells is involved in glomerular hyperfiltration of diabetic nephropathy. *Diabetologia.* 1998;41(12):1426-34.
334. Bryan-Lluka L.J., Papacostas M.H., Paczkowski F.A., Wanstall J.C. Nitric oxide donors inhibit 5-hydroxytryptamine (5-HT) uptake by the human 5-HT transporter (SERT). *Br J Pharmacol.* 2004. 63-70.
335. Lovren F., Triggle C. Nitric oxide and sodium nitroprusside-induced relaxation of the human umbilical artery. *Br J Pharmacol.* 2000;131(3):521-9.
336. Chen S.J., Chen K.H., Wu C.C. Nitric oxide-cyclic GMP contributes to abnormal activation of Na⁺-K⁺-ATPase in the aorta from rats with endotoxic shock. *Shock.* 2005. 179-85.
337. Sand A.E., Andersson E., Fried G. Effects of nitric oxide donors and inhibitors of nitric oxide signalling on endothelin- and serotonin-induced contractions in human placental arteries. *Acta Physiol Scand.* 2002;174(3):217-23.
338. Román R.J., Kauker M.L. Renal effect of prostaglandin synthetase inhibition in rats: micropuncture studies. *Am J Physiol.* 1978;235(2):F111-8.
339. Blackshear J.L., Orlandi C., Hollenberg N.K. Serotonin and the renal blood supply: role of prostaglandins and the 5HT₂ receptor. *Kidney Int.* 1986;30(3):304-10.
340. Ding X.R., Stier C.Jr., Harold I. Hemodynamic effect of norepinephrine and serotonin with and without indomethacin. *Chin Med J (Engl).* 1989;102(6):461-3.
341. Blackshear J.L., Orlandi C., Hollenberg N.K. Constrictive effect of serotonin on visible renal arteries: a pharmacangiographic study in anesthetized dogs. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1991;17(1):68-73.
342. Ding X.R., Stier C.T.Jr., Itskovitz H.D. Serotonin and 5-hydroxytryptophan on blood pressure and renal blood flow in anesthetized rats. *Am J Med Sci.* 1989;297(5):290-3.
343. Tuncer M., Vanhoutte P.M. Role of prostanoids in the increased vascular responsiveness and delayed tachyphylaxis to serotonin in the kidney of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 1991;9(7):623-9.
344. Tesfamariam B. Selective impairment of endothelium-dependent relaxations by prostaglandin endoperoxide. *J Hypertens.* 1994;12(1):41-7.
345. Nasrallah R., Landry A., Singh S., Sklepowicz M., Hebert R.L. Increased expression of cyclooxygenase-1 and -2 in the diabetic rat renal medulla. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003;285(6):F1068-77.
346. Moncada S., Vane J.R. Prostacyclin: its biosynthesis, actions and clinical potential. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1981;294(1072):305-29.
347. Kiff R.J., Gardiner S.M., Compton A.M., Bennett T. Selective impairment of hindquarters vasodilator responses to bradykinin in conscious Wistar rats with streptozotocin-induced Diabetes Mellitus. *Br J Pharmacol.* 1991;103(2):1357-62.
348. Abdelrahman A.M., Al Suleimani Y.M. Four-week administration of nimesulide, a cyclooxygenase-2 inhibitor, improves endothelial dysfunction in the hindlimb vasculature of streptozotocin-induced diabetic rats. *Arch Pharm Res.* 2008;31(12):1584-9.
349. Vane J.R., Bakhle Y.S., Botting R.M. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1998;38:97-120.
350. Okumura M., Imanishi M., Yamashita T., Yamamura Y., Kim S., Iwao H., Tanaka S., Fujii S. Renal production of thromboxane and prostaglandins in a rat model of type 2 diabetes. *Life Sci.* 2000;66(5):371-7.
351. Szerafin T., Erdei N., Fulop T., Pasztor E.T., Edes I., Koller A., Bagi Z. Increased

- cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin-mediated dilation in coronary arterioles of patients with Diabetes Mellitus. *Circ Res.* 2006;99(5):e12-7.
352. Kamata K., Hosokawa M., Matsumoto T., Kobayashi T. Altered arachidonic acid-mediated responses in the perfused kidney of the streptozotocin-induced diabetic rat. *J Smooth Muscle Res.* 2006;42(5):171-87.
353. Félétou M., Vanhoutte P.M., Verbeuren T.J. The thromboxane/endoperoxide receptor (TP): the common villain. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2010;55(4):317-32.
354. Makino A., Kamata K. Possible modulation by endothelin-1, nitric oxide, prostaglandin I₂ and thromboxane A₂ of vasoconstriction induced by an alpha-agonist in mesenteric arterial bed from diabetic rats. *Diabetologia.* 1998;41(12):1410-8.
355. Alabadi J.A., Miranda F.J., Llorens S., Ruiz de Apodaca R.F., Centeno J.M., Alborch E. Diabetes potentiates acetylcholine-induced relaxation in rabbit renal arteries. *Eur J Pharmacol.* 2001;415(2-3):225-32.
356. Arikawa E., Cheung C., Sekirov I., Battell M.L., Yuen V.G., McNeill J.H. Effects of endothelin receptor blockade on hypervasoactivity in streptozotocin-diabetic rats: vessel-specific involvement of thromboxane A₂. *Can J Physiol Pharmacol.* 2006;84(8-9):823-33.
357. Furchgott R.F., Vanhoutte P.M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.* 1989;3(9):2007-18.
358. De Vriese A.S., Verbeuren T.J., Van de Voorde J., Lameire N.H., Vanhoutte P.M. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol.* 2000;130(5):963-74.
359. Mazzone T., Chait A., Plutzky J. Cardiovascular disease risk in type 2 Diabetes Mellitus: insights from mechanistic studies. *Lancet.* 2008;371(9626):1800-9.
360. Ramage A.G., Fozard J.R. Evidence that the putative 5-HT_{1A} receptor agonists, 8-OH-DPAT and ipsapirone, have a central hypotensive action that differs from that of clonidine in anaesthetized cats. *Eur J Pharmacol.* 1987;138(2):179-91.
361. Ramage A.G., Mifflin S.W. Vagal-evoked excitation of a sub-population of neurones in the nucleus of the solitary tract (NTS) involves 5-HT₃ receptors in the anaesthetized rat. *J Physiol.* 1998(509):129.
362. Sporton S.C., Shephard S.L., Jordan D., Ramage A.G. Microinjections of 5-HT_{1A} agonists into the dorsal motor vagal nucleus produce a bradycardia in the atenolol-pretreated anaesthetized rat. *Br J Pharmacol.* 1991;104(2):466-70.
363. Jordan D. Vagal control of the heart: central serotonergic (5-HT) mechanisms. *Exp Physiol.* 2005;90(2):175-81.
364. Yoshioka M., Ikeda T., Abe M., Togashi H., Minami M., Saito H. Pharmacological characterization of 5-hydroxytryptamine-induced excitation of afferent cervical vagus nerve in anaesthetized rats. *Br J Pharmacol.* 1992;106(3):544-9.
365. Kirby G.C., McQueen D.S. Effects of the antagonists MDL 72222 and ketanserin on responses of cat carotid body chemoreceptors to 5-hydroxytryptamine. *Br J Pharmacol.* 1984;83(1):259-69.
366. Tonini M., Coccini T., Onori L., Candura S.M., Rizzi C.A., Manzo L. The influence of neuronal 5-hydroxytryptamine receptor antagonists on non-cholinergic ganglionic transmission in the guinea-pig enteric excitatory reflex. *Br J Pharmacol.* 1992;107(1):5-7.
367. Skinner M.R., Ramage A.G., Jordan D. Modulation of reflexly evoked vagal bradycardias by central 5-HT_{1A} receptors in anaesthetized rabbits. *Br J Pharmacol.* 2002;137(6):861-73.
368. Galligan J.J., Surprenant A., Tonini M., North R.A. Differential localization of 5-HT₁ receptors on myenteric and submucosal neurons. *Am J Physiol.* 1988;255(5 Pt 1):G603-11.
369. Park H.J., Zhang Y., Du C., Welzig C.M., Madias C., Aronovitz M.J., Georgescu S.P., Naggar I., Wang B., Kim Y.B., Blaustein R.O., Karas R.H., Liao R., Mathews C.E., Galper J.B. Role of SREBP-1 in the development of parasympathetic dysfunction in the hearts of type 1 diabetic Akita mice. *Circ Res.* 2009;105(3):287-94.
370. Dreteler G.H., Wouters W., Saxena P.R. Comparison of the cardiovascular effects of the 5-HT_{1A} receptor agonist flesinoxan with that of 8-OH-DPAT in the rat. *Eur J Pharmacol.* 1990;180(2-3):339-49.
371. Kellett D.O., Ramage A.G., Jordan D. Central 5-HT₇ receptors are critical for reflex activation of cardiac vagal drive in anaesthetized rats. *J Physiol.* 2005;563(Pt 1):319-31.
372. Alexander S.P., Mathie A., Peters J.A. Guide to Receptors and Channels (GRAC), 3rd edition. *Br J Pharmacol.* 2008;153 Suppl 2:S1-209.
373. Brink C.B., Viljoen S.L., De Kock S.E., Stein D.J., Harvey B.H. Effects of myo-inositol versus fluoxetine and imipramine pretreatments on serotonin 5HT_{2A} and muscarinic acetylcholine receptors in human neuroblastoma cells. *Metab Brain Dis.* 2004;19(1-2):51-70.
374. Tomlinson D.R., Gillon K.R., Smith M.G. Axonal transport of noradrenaline and noradrenergic transmission in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia.* 1982;22(3):199-204.
375. Tomlinson D.R., Yusof A.P. Autonomic neuropathy in the alloxan-diabetic rat. *J Auton Pharmacol.* 1983;3(4):257-63.

376. Yonehara N., Saito K., Uchida S., Noguchi Y., Yoshida H. Effects of muscarinic agonists and antagonists on the negative chronotropic response to the vagus nerve stimulation. *Jpn J Pharmacol.* 1979;29(5):797-9.
377. Fuchs P., Fuder H. The determination of presynaptic KA values of methacholine and pilocarpine and of a presynaptic receptor reserve in the rat perfused heart. *Br J Pharmacol.* 1985;84(1):35-46.
378. Wetzel G.T., Brown J.H. Presynaptic modulation of acetylcholine release from cardiac parasympathetic neurons. *Am J Physiol.* 1985;248 (1 Pt 2):H33-9.
379. Belmonte K.E., Jacoby D.B., Fryer A.D. Increased function of inhibitory neuronal M2 muscarinic receptors in diabetic rat lungs. *Br J Pharmacol.* 1997;121(7):1287-94.
380. Coulson F.R., Jacoby D.B., Fryer A.D. Increased function of inhibitory neuronal M2 muscarinic receptors in trachea and ileum of diabetic rats. *Br J Pharmacol.* 2002;135(6):1355-62.
381. Tong Y.C., Cheng J.T., Wan W.C. Effects of Ba-Wei-Die-Huang-Wan on the cholinergic function and protein expression of M2 muscarinic receptor of the urinary bladder in diabetic rats. *Neurosci Lett.* 2002;330(1):21-4.
382. Oberhauser V., Schwertfeger E., Rutz T., Beyersdorf F., Rump L.C. Acetylcholine release in human heart atrium: influence of muscarinic autoreceptors, diabetes, and age. *Circulation.* 2001;103(12):1638-43.
383. Oskutyte D., Jordan D., Ramage A.G. Evidence that 5-hydroxytryptamine(7) receptors play a role in the mediation of afferent transmission within the nucleus tractus solitarius in anaesthetized rats. *Br J Pharmacol.* 2009;158(5):1387-94.