

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN FISIOPATOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA  
CELULAR Y MOLECULAR**



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**  
CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



**PAPEL DE LOS RECEPTORES  
SEROTONÉRGICOS EN LA REGULACIÓN  
VASCULAR RENAL EN RATAS DIABÉTICAS**

Autora: Irina Rebollo Mato

Tutores: Dra. Asunción Morán Benito, Dra. Mónica García Domingo, Dr. José Ángel García  
Pedraza

Salamanca, 2022

## RESUMEN

El riñón está inervado por nervios simpáticos postganglionares que afectan a la vasculatura renal, y, por tanto, contribuyen a la homeostasis cardiovascular. Algunos estudios han relacionado el aumento de la actividad nerviosa simpática renal con el desarrollo, mantenimiento y agravamiento de enfermedades que cursan con alteraciones cardiovasculares, como es la diabetes mellitus (DM). Una de las sustancias endógenas que influye sobre la regulación de la homeostasis cardiovascular es la 5-hidroxitriptamina (5-HT o serotonina). Las concentraciones de serotonina y su respuesta cardiovascular, están alteradas en pacientes diabéticos; esto sugiere una posible relación entre las acciones de esta neurohormona y el desarrollo de las complicaciones cardiovasculares. En este trabajo nos planteamos determinar si 5-HT modula la neurotransmisión simpática renal, estableciendo el perfil farmacológico de los receptores serotoninérgicos en la regulación vascular renal en la diabetes experimental. Para ello, se utilizaron ratas Wistar diabéticas (aloxano 150 mg/kg, subcutáneo). Tras 28 días, los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (60 mg/kg, intraperitoneal) y se prepararon para la autoperfusión *in situ* del riñón, midiendo presión arterial sistémica, frecuencia cardíaca y presión de perfusión renal (PPR). La estimulación eléctrica de los nervios simpáticos renales ( $12,5 \pm 2,5$  V; 1 ms; 2, 4 y 6 Hz) originó incrementos ( $\Delta$ ) de PPR frecuencia-dependientes. 5-HT (agonista de 5-HT<sub>1/2/3/4/5/6/7</sub>) y 5-CT (agonista de 5-HT<sub>1/5/7</sub>) (0,0125-0,4  $\mu$ g/kg; 0,1-1  $\mu$ g/kg; intraarterial, respectivamente) disminuyeron  $\Delta$ PPR obtenidos por estimulación eléctrica de los nervios periarteriales renales, mientras que la administración intraarterial de los agonistas  $\alpha$ -metil-5-HT (5-HT<sub>2</sub>), 1-PBG (5-HT<sub>3</sub>), cisaprida (5-HT<sub>4</sub>) y AS-19 (5-HT<sub>7</sub>) (0,4  $\mu$ g/kg para cada agonista) no modificó dichos  $\Delta$ PPR. La administración intravenosa de SB699551 (1 mg/kg), antagonista de receptores 5HT<sub>5</sub>, no originó cambios en la respuesta inhibitoria inducida por 5-CT. Por otro lado, 5-HT no modificó  $\Delta$ PPR producidos por administración intraarterial de noradrenalina exógena (0,05-0,4  $\mu$ g/kg). Estos resultados evidencian una actividad noradrenérgica exacerbada en diabetes y que la activación presináptica del receptor 5-HT<sub>1</sub> inhibe significativamente la actividad simpática y sus consecuentes efectos vasopresores en el riñón autoperfundido *in situ* de ratas diabéticas. La activación 5-HT<sub>1</sub> supone una posible diana terapéutica en patologías como la DM, que cursen con hiperactividad simpática, reduciendo las complicaciones cardiovasculares asociadas. *Palabras clave:* 5-hidroxitriptamina, diabetes, hiperactividad simpática, receptor 5-HT<sub>1</sub>, vasculatura renal.

## ABSTRACT

The kidney is innervated by postganglionic sympathetic nerves that regulate the renal vasculature and, thus, contribute to cardiovascular homeostasis. Some studies have related the increase in renal sympathetic nerve activity with the development, maintenance and aggravation of diseases that occur with cardiovascular alterations, such as diabetes mellitus (DM). One of the endogenous substances that influences the regulation of cardiovascular homeostasis is 5-hydroxytryptamine (5-HT or serotonin). Serotonin concentrations, and its cardiovascular response, are altered in diabetic patients; this suggests a possible relationship between the actions of this neurohormone and the development of cardiovascular complications. In this work, we determined whether 5-HT modulates renal sympathetic neurotransmission, establishing the pharmacological profile of serotonergic receptors in renal vascular regulation in experimental diabetes. To do so, Wistar diabetic rats (alloxan 150 mg/kg, subcutaneous) were utilized. After 28 days, the animals were anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg, intraperitoneal) and prepared for the *in situ* autoperfusion of the kidney, measuring systemic arterial pressure, heart rate, and renal perfusion pressure (PPR). Electrical stimulation of the renal sympathetic nerves ( $12.5 \pm 2.5$  V; 1 ms; 2, 4, and 6 Hz) caused frequency-dependent increases ( $\Delta$ ) in PPR. 5-HT (5-HT<sub>1/2/3/4/5/6/7</sub> agonist) and 5-CT (5-HT<sub>1/5/7</sub> agonist) (0.0125-0.4  $\mu$ g/kg; 0.1-1  $\mu$ g/kg; intraarterial, respectively) decreased  $\Delta$ PPR obtained by electrical stimulation of renal periarterial nerves, while intraarterial administration of the  $\alpha$ -methyl-5-HT (5-HT<sub>2</sub>) agonists, 1-PBG (5-HT<sub>3</sub>), cisapride (5-HT<sub>4</sub>) and AS-19 (5-HT<sub>7</sub>) (0.4  $\mu$ g/kg for each agonist) did not modify these  $\Delta$ PPR. Intravenous administration of SB699551 (1 mg/kg), a 5HT<sub>5</sub> receptor antagonist, did not cause changes in the inhibitory effect of 5-CT. On the other hand, 5-HT did not modify  $\Delta$ PPR produced by intraarterial administration of exogenous norepinephrine (0.05-0.4  $\mu$ g/kg). These results show an exacerbated noradrenergic activity in diabetes and that presynaptic activation of the 5-HT<sub>1</sub> receptor significantly inhibits sympathetic activity and its consequent vasopressor effects in the *in situ* autoperfused kidney of diabetic rats. 5-HT<sub>1</sub> activation might be a possible therapeutic target in pathologies, such as DM, that occur with sympathetic hyperactivity, reducing associated cardiovascular complications.

*Keywords: 5-hydroxytryptamine, diabetes, sympathetic hyperactivity, 5-HT<sub>1</sub> receptor, renal vasculature.*

## ABREVIATURAS

**5-CT** = 5-Carboxamidotriptamina

**5-HT** = 5-Hidroxitriptamina, serotonina

**$\alpha$ -metil-5-HT** =  $\alpha$ -Metil-5-hidroxitriptamina

**A** = Adrenalina

**ACh** = Acetilcolina

**AMPc** = 3',5'-Adenosin monofosfato cíclico

**Ang II** = Angiotensina II

**AS-19** = (S)-N,N-Dimetil-5-(1,3,5-trimetil-pirazol-4-il)-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-amino

**DM** = Diabetes mellitus

**DM1** = Diabetes mellitus tipo 1

**D-R** = Dosis-respuesta

**EDHF** = Factor hiperpolarizante derivado de endotelio

**ET** = Endotelina

**FC** = Frecuencia cardíaca

**GI** = Gastrointestinal

**i.a.** = Intraarterial

**i.p.** = Intraperitoneal

**ISRS** = Inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina

**i.v.** = Intravenoso

**LCR** = Líquido cefalorraquídeo

**NA** = Noradrenalina

**NO** = Óxido nítrico

**NT** = Neurotransmisor

**PAS** = Presión arterial sistémica

**1-PBG** = 1-Fenilbiguanida

**PFK** = Fosfofructokinasa

**PGI<sub>2</sub>** = Prostaciclina

**PKC** = Proteína kinasa C

**PPR** = Presión de perfusión renal

**ROS** = Especies reactivas de oxígeno

**SB699551** = Dicloruro de N-[2-(dimetilamino)etil]-N-[[4'-[[[(2-feniletil)amino]metil][1,1'-bifenil]-4-il]metil]ciclopentanopropanamida

**s.c.** = Subcutáneo

**SNC** = Sistema nervioso central

**SNS** = Sistema nervioso simpático

**S-R** = Estimulación-respuesta

**SRAA** = Sistema renina-angiotensina-aldosterona

**TGF- $\beta$**  = Factor de crecimiento transformante  $\beta$

**VC** = Vasoconstricción

**VSM** = Músculo liso vascular

**VSMC** = Células del músculo liso vascular

# ÍNDICE

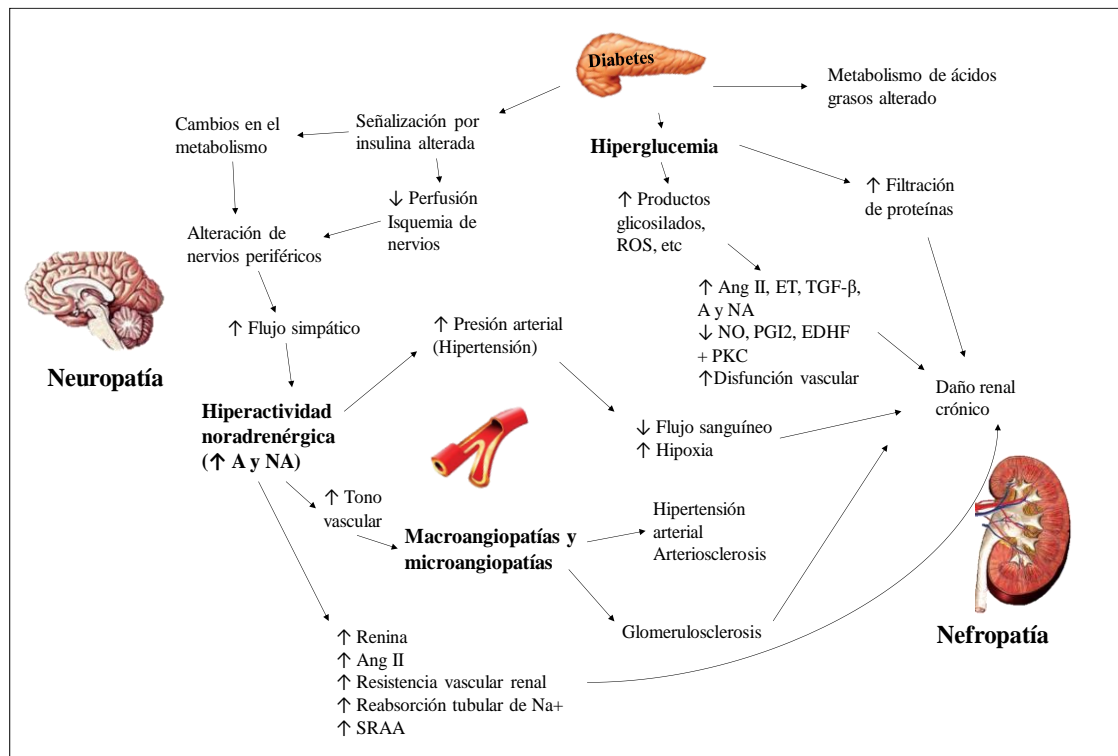
1. Introducción.....	1
2. Objetivos .....	7
3. Materiales y Métodos .....	7
3.1. Aprobación ética del protocolo experimental .....	7
3.2. Fármacos utilizados .....	8
3.3. Inducción de la diabetes mellitus tipo 1 experimental.....	9
3.4. Metodología general .....	10
3.5. Protocolos experimentales .....	12
3.5.1. Estimulación eléctrica de los nervios periarteriales (vasopresores) renales .....	12
3.5.2. Administración de noradrenalina exógena.....	14
3.6. Expresión, tratamiento y análisis de datos obtenidos .....	14
4. Resultados y Discusión .....	14
4.1. Evolución de glucemia y peso .....	14
4.2. Variables hemodinámicas basales.....	16
4.3. Efecto vascular de la estimulación eléctrica de los nervios simpáticos periarteriales renales en ratas diabéticas.....	16
4.4. Efecto de 5-HT sobre los incrementos de PPR obtenidos por estimulación simpática en ratas diabéticas .....	17
4.5. Naturaleza del efecto inhibidor de 5-HT sobre la neurotransmisión simpática renal en ratas diabéticas .....	18
4.6. Estudio de los receptores serotoninérgicos implicados en el efecto inhibidor de 5-HT sobre los incrementos de presión de perfusión renal obtenidos por estimulación simpática en ratas diabéticas.....	19
5. Conclusiones .....	23
6. Bibliografía.....	23

# 1. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) se define 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 ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos<sup>1-7</sup>. Además, altos niveles de glucemia favorecen la glicosilación de proteínas de membrana y de moléculas que intervienen en la señalización de la función renal, dando lugar a productos avanzados de la glicosilación, que intervienen, entre otros procesos, en la generación de estrés oxidativo afectando al sistema renina-angiotensina-aldosterona, a la activación de la proteína kinasa C y al aumento de factor de crecimiento transformante  $\beta$  con consecuente fibrosis<sup>8</sup>, que acaban generando nefropatía diabética. La diabetes también afecta al sistema nervioso, tanto nervios sensoriales como motores, generando la denominada neuropatía diabética, la cual origina, entre otros, aumento de la liberación de noradrenalina (NA)<sup>9</sup>, y, en consecuencia, aumento del tono vascular y disminución del flujo sanguíneo. Se ha demostrado que las respuestas de los vasos sanguíneos (donde hay terminaciones nerviosas adrenérgicas, serotoninérgicas y peptidérgicas) están alteradas, lo que puede generar una variación del flujo sanguíneo por inervación nerviosa, que puede contribuir a la patogénesis de la neuropatía diabética<sup>9,10</sup>.

A los efectos perjudiciales, tanto renales como neuropáticos, hay que sumarles la principal causa de mortalidad en personas diabéticas, que son las complicaciones cardiovasculares que aparecen<sup>11,12</sup>, que provocan, a su vez, disfunción vascular, que, junto con situaciones de isquemia, pueden desembocar también en nefro- y neuropatía diabética (Figura 1). Estas complicaciones vasculares son diez veces mayores en los pacientes con diabetes mellitus tipo 1 (DM1) que en el resto de la población<sup>3,13,14</sup>, sobre todo teniendo en cuenta que en los primeros estadios de las complicaciones cardiovasculares los síntomas pasan desapercibidos<sup>15-17</sup>. Las alteraciones cardiovasculares se pueden producir a nivel de grandes vasos (macroangiopatías) o de pequeños vasos (microangiopatías) (Figura 1). Entre las microangiopatías más frecuentes está la nefropatía diabética, que se manifiesta claramente por glomeruloesclerosis que puede evolucionar hacia insuficiencia renal. La diabetes es la responsable de un elevado porcentaje de insuficiencias renales graves que necesitan tratamiento con diálisis, e incluso, trasplante renal.

Las macroangiopatías que más frecuentemente se producen en la diabetes son hipertensión arterial y arterioesclerosis<sup>14,18</sup>.



**Figura 1.** Efectos de la diabetes sobre el sistema nervioso, vascular y excretor. +, activación; ↑, aumento; ↓, disminución; A, adrenalina; Ang II, angiotensina II; EDHF, factor hiperpolarizante derivado de endotelio; ET, endotelina; NA, noradrenalina; NO, óxido nítrico; PGI2, prostaciclina; PKC, proteína quinasa C; ROS, especies reactivas de oxígeno; SRAA, sistema renina-angiotensina-aldosterona; TGF-β, factor de crecimiento transformante β.

El sistema nervioso simpático (SNS) contribuye de manera importante al control de la presión arterial modificando el gasto cardíaco, la resistencia vascular periférica y la función renal<sup>19</sup>. A los efectos patológicos a nivel cardiovascular de la DM1 contribuye la hiperactividad de la inervación simpática, con su consecuente efecto vasoconstrictor, y, por lo tanto, provoca un aumento de la presión arterial<sup>20-22</sup>. Si la neurotransmisión noradrenérgica se ve incrementada se produce deterioro vascular, hipertensión arterial, enfermedad renal e insuficiencia cardíaca<sup>23,24</sup>. En relación a ello, se ha visto que muchos problemas cardiovasculares asociados a la diabetes, en humanos<sup>25,26</sup> y en animales de experimentación<sup>27,28</sup>, se deben a una disfunción o desregulación del SNS.

Parece que el SNS es un modulador clave del control de la presión arterial por parte del riñón, ya que el mismo está inervado por fibras simpáticas postganglionares que afectan a la vasculatura renal, las estructuras glomerulares y tubulares, así como al aparato

yuxtaglomerular, lo que contribuye a la homeostasis cardiovascular<sup>29</sup>. La activación de los nervios simpáticos renales aumenta i) la reabsorción tubular de sodio, ii) la liberación de renina (donde la angiotensina II periférica facilita la actividad nerviosa simpática renal y favorece la liberación de NA de las terminaciones nerviosas adrenérgicas, actuando sobre receptores presinápticos y potenciando la vasoconstricción mediada por receptores  $\alpha$ ) y iii) la resistencia vascular renal, por lo que la hiperactividad a este nivel juega un papel patogénico crucial en el desarrollo, mantenimiento y agravamiento de enfermedades cardiovasculares<sup>30-35</sup>. Por lo tanto, un potencial terapéutico en las complicaciones cardiovasculares de la diabetes podría ser la modulación de la liberación de NA, habiéndose establecido que la liberación de la misma podría estar regulada por receptores no adrenérgicos, incluidos los receptores serotoninérgicos<sup>36-41</sup>.

Serotonina (5-hidroxitriptamina o 5-HT) es una monoamina endógena, que actúa como neurotransmisor y mediador, sintetizada a partir del triptófano, que interviene en muchos procesos fisiológicos, tales como regular la temperatura, causar sensación de saciedad, y controlar las emociones y el estado de ánimo, entre otros. Todas estas funciones se deben a su complejidad fisiológica, una característica que posee gracias a su variedad de receptores. Se han identificado hasta siete familias diferentes de receptores; muchos de estos tienen múltiples subtipos con una localización muy extensa (sistema nervioso central, el intestino, el sistema cardiovascular y la sangre), lo que hace que estén asociados a diversos procesos tanto fisiológicos como patológicos<sup>42</sup> (trastornos mentales, enfermedades cardiovasculares, entre otras) (Tabla 1).



**Tabla 1.** Clasificación, mecanismo de transducción, localización y funciones de los receptores serotoninérgicos<sup>42</sup>.

Tipo de receptor	SUBTIPO DE RECEPTOR	MECANISMO TRANSDUCCIONAL	LOCALIZACIÓN	FUNCIONES PRINCIPALES
5-HT <sub>1</sub>	5-HT <sub>1A</sub>	Proteína G <sub>i</sub> (-) Adenilato ciclasa ↓ AMP <sub>c</sub>	Neuronal: hipocampo, núcleo del rafe	Cambios conductuales, hipotensión central
	5-HT <sub>1B</sub>		SNC, terminales simpáticas, VSMC	VC, (-) trigeminal y liberación de NA
	5-HT <sub>1D</sub>		SNC, terminales simpáticas, VSMC	Heterorreceptor en aurícula, (-) liberación de NT
	5-ht <sub>1e</sub> 5-HT <sub>1F</sub>		SNC SNC	No establecidas (-) trigeminal
5-HT <sub>2</sub>	5-HT <sub>2A</sub>	Proteína G <sub>q/11</sub> (+) Fosfolipasa C ↑ [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	VSMC, plaquetas, SNC, tracto GI	VC, agregación plaquetaria, taquicardia
	5-HT <sub>2B</sub>		VSM de íleon, fundus y endotelio	Contracción fundus y vasodilatación NO-dependiente
	5-HT <sub>2C</sub>		SNC	Regulación LCR, apetito, sueño
5-HT <sub>3</sub>		Canal iónico Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> Despolarización de membrana	Nervio vago, SNC	Neuroexcitación parasimpática, emesis
5-HT <sub>4</sub>		Proteína G <sub>sC</sub> (+) Adenilato ciclasa ↑ AMP <sub>c</sub>	Tracto GI, SNC, corazón y vejiga	Relajación VSM y GI
5-HT <sub>5</sub>	5-HT <sub>5A</sub>	Proteína G <sub>i</sub> (-) Adenilato ciclasa ↓ AMP <sub>c</sub>	SNC, ¿terminales simpáticas?	Control motor, ansiedad, (-) simpática cardíaca
	5-ht <sub>5b</sub>	Desconocido	¿SNC?	No establecidas
5-HT <sub>6</sub>		Proteína G <sub>s</sub> (+) Adenilato ciclasa ↑ AMP <sub>c</sub>	SNC, ganglios cervicales superiores	Modulación de ACh central, memoria
5-HT <sub>7</sub>		Proteína G <sub>s</sub> (+) Adenilato ciclasa ↑ AMP <sub>c</sub>	SNC, VSM y ganglios simpáticos	Relajación VSM y GI

(+), activación; (-), inhibición; AMP<sub>c</sub>, 3',5'-adenosin monofosfato cíclico; ACh, acetilcolina; GI, gastrointestinal; LCR, líquido cefalorraquídeo; NA, noradrenalina; NO, óxido nítrico; NT, neurotransmisor; SNC, sistema nervioso central; VC, vasoconstricción; VSM, músculo liso vascular; VSMC, células del músculo liso vascular.

5-Hidroxitriptamina modula la neurotransmisión adrenérgica, dando lugar a efectos simpático-excitadores o simpático-inhibidores, a respuestas vasopresoras y taquicárdicas o vasodepresoras y bradicárdicas<sup>36,40,43,44</sup>. En este sentido, algunos estudios de nuestro grupo y otros han sugerido que el receptor 5-HT<sub>1</sub> media en la inhibición de la neurotransmisión simpática<sup>36-40,45-49</sup>.

En relación al sistema serotoninérgico y en situación de diabetes, se ha observado una alteración del perfil farmacológico de los receptores de 5-HT que producen inhibición simpática<sup>38</sup>. La participación del sistema serotoninérgico en la fisiopatología de la DM1 es clave, ya que esta

enfermedad presenta alteraciones en las acciones serotoninérgicas centrales y periféricas<sup>50-53</sup>. En estudios existentes a nivel vascular en ratas Wistar, se ha visto que en una situación de DM1 experimental, la modulación farmacológica de 5-HT modifica el efecto serotoninérgico que se produce en la transmisión simpática<sup>49,54</sup>. En la DM las tasas plasmáticas de 5-HT están aumentadas<sup>55-57</sup>, debido a que hay un aumento de la agregación plaquetaria, siendo estas plaquetas la principal fuente de serotonina a nivel periférico<sup>49,58</sup> que durante la agregación la liberan de forma masiva. La mayor concentración de serotonina en los pacientes diabéticos se confirma porque se dobla la cantidad de ácido 5-hidroxiindolacético, principal metabolito de 5-HT, que se excreta en orina. Hay evidencias que muestran la implicación de la serotonina en la regulación de la glucosa<sup>59</sup>. Además, la 5-HT estimula la captación de glucosa y regula la actividad fosfofructokinasa (PFK) a través del receptor 5-HT<sub>2A</sub>, 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<sup>60</sup>. Otros autores han demostrado 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<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2</sub><sup>61</sup>. Existe, como terminamos de mencionar, una estrecha relación entre el sistema cardiovascular, serotonina y diabetes. 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<sup>49,56,58</sup>, ii) en la población de receptores serotoninérgicos<sup>61,62</sup> y iii) en las respuestas vasculares inducidas por serotonina y su regulación endotelial<sup>2,63</sup>.

Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación (Tabla 2) han podido demostrar que 5-HT y determinados mecanismos serotoninérgicos afectan a la neurotransmisión simpática, y que la existencia de diabetes experimental inducida 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*.

**Tabla 2.** Antecedentes del grupo de investigación en relación con la modulación serotoninérgica de la actividad simpática en diferentes modelos experimentales.

Ratas Wistar	TERRITORIO VASCULAR	MODULACIÓN SEROTONÉRGICA	RECEPTORES IMPLICADOS	REFERENCIA
NORMOGLUCÉMICAS	Sistémico	Potenciación	5-HT <sub>3</sub> Presinápticos	Morán <i>et al.</i> , 1994
	Sistémico	Inhibición	5-HT <sub>1A/1D</sub> presinápticos	Morán <i>et al.</i> , 1994, 1998.
	Sistémico (Tratamiento ISRS)	Potenciación	5-HT <sub>2A</sub> pre y/o postsinápticos	García-Pedraza <i>et al.</i> , 2021
	Sistémico (Tratamiento ISRS)	Inhibición	5-HT <sub>1A/1D</sub> presinápticos	García-Pedraza <i>et al.</i> , 2021
	Sistémico (Bloqueo 5-HT <sub>2</sub> )	Inhibición	5-HT <sub>1D</sub> y 5-HT <sub>7</sub> presinápticos	García-Pedraza <i>et al.</i> , 2013
	Mesenterio autoperfundido (Hipertensas)	Inhibición	5-HT <sub>4</sub> Presinápticos	García-Pedraza <i>et al.</i> , 2019
	Mesenterio autoperfundido (Normotensas)	Inhibición	5-HT <sub>1D</sub> pre y/o postsinápticos	García-Pedraza <i>et al.</i> , 2017
Riñón autoperfundido	Inhibición	5-HT <sub>1D</sub> presinápticos	García-Pedraza <i>et al.</i> , 2015	
DIABÉTICAS	Sistémico	Inhibición	5-HT <sub>1A</sub> presinápticos	García <i>et al.</i> , 2005
	Sistémico (Bloqueo 5-HT <sub>2</sub> )	Inhibición	5-HT <sub>1D</sub> y 5-HT <sub>7</sub> pre y/o postsinápticos	Fernández-González <i>et al.</i> , 2022
	Sistémico (Tratamiento ISRS)	Potenciación	5-HT <sub>2A</sub> pre y/o postsinápticos	García-Pedraza <i>et al.</i> , 2022
	Sistémico (Tratamiento ISRS)	Inhibición	5-HT <sub>1A/1D</sub> pre y/o postsinápticos	García-Pedraza <i>et al.</i> , 2022

ISRS, inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina.

Por esto último, teniendo en cuenta que en diabetes existe una alteración en la neurotransmisión simpática, y que, por otro lado, la serotonina modula la neurotransmisión simpática renal en ratas no diabéticas, se plantea la hipótesis de que en diabetes la serotonina también va a ser capaz de modular la neurotransmisión simpática renal a través de la activación de sus receptores.

Dado que la diabetes presenta complicaciones cardiovasculares sistémicas y renales y que el sistema serotoninérgico es capaz de regular la función cardiovascular a distintos niveles, la

modulación de este sistema puede ser una diana terapéutica en tratamientos farmacológicos dirigidos a las complicaciones de la diabetes, centrándose en la función renal.

## 2. OBJETIVOS

Se ha puesto de manifiesto que, pese a un buen control de la glucemia en la DM, no se logra frenar el deterioro cardiovascular. Varios factores distintos de la hiperglucemia, como la hiperactividad simpática, pueden desencadenar complicaciones presentes en la enfermedad y se proponen como mecanismos patogénicos subyacentes<sup>7</sup>. Estudios realizados por nuestro grupo de investigación han demostrado que: (a) existe un incremento de la neurotransmisión simpática vascular en ratas con DM1<sup>38,54</sup>, (b) la activación de receptores 5-HT<sub>1</sub> reduce la actividad noradrenérgica periférica tanto en ratas normoglucémicas<sup>40,64</sup> como diabéticas<sup>38,54</sup>, y (c) en la inervación simpática renal, 5-HT inhibe la transmisión noradrenérgica a través de la activación de receptores 5-HT<sub>1D</sub> en ratas normoglucémicas<sup>47</sup>.

Dado que la diabetes induce daños, entre los que destacan los neuropáticos, renales y cardiovasculares, donde el aumento patológico de la actividad simpática vascular juega un papel importante, y dado que, como nuestro grupo ha demostrado, serotonina es capaz de modular la neurotransmisión simpática renal en animales normoglucémicos, en este trabajo nos planteamos, como **objetivo general** determinar si 5-HT es capaz de modular la neurotransmisión simpática vascular renal en ratas diabéticas tipo 1, y como **objetivo específico** establecer el perfil farmacológico de los receptores serotoninérgicos en la regulación vascular renal en ratas diabéticas.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### *3.1. Aprobación ética del protocolo experimental*

En este trabajo se han utilizado 100 ratas Wistar macho (285±15 g) procedentes del Animalario de la Universidad de Salamanca y mantenidas con un ciclo de luz-oscuridad de 12h-12h, estabuladas a una temperatura constante de (22±2°C) y humedad del 50%, con acceso a comida y agua *ad libitum*. Todos los protocolos experimentales han sido aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca (006N°201400037278) y cumplen con la normativa vigente (Directiva 2010/63/EU y R.D. 1386/2018).

### 3.2. Fármacos utilizados

Los fármacos utilizados en este trabajo experimental se detallan en la Tabla 3. Todos los compuestos se disolvieron en suero fisiológico (NaCl 0,9%), excepto cisaprida (HCl 0,01 M) y AS-19 (etanol 5%). Ninguno de estos vehículos utilizados afectó a las variables hemodinámicas estudiadas (ver punto 3.4).

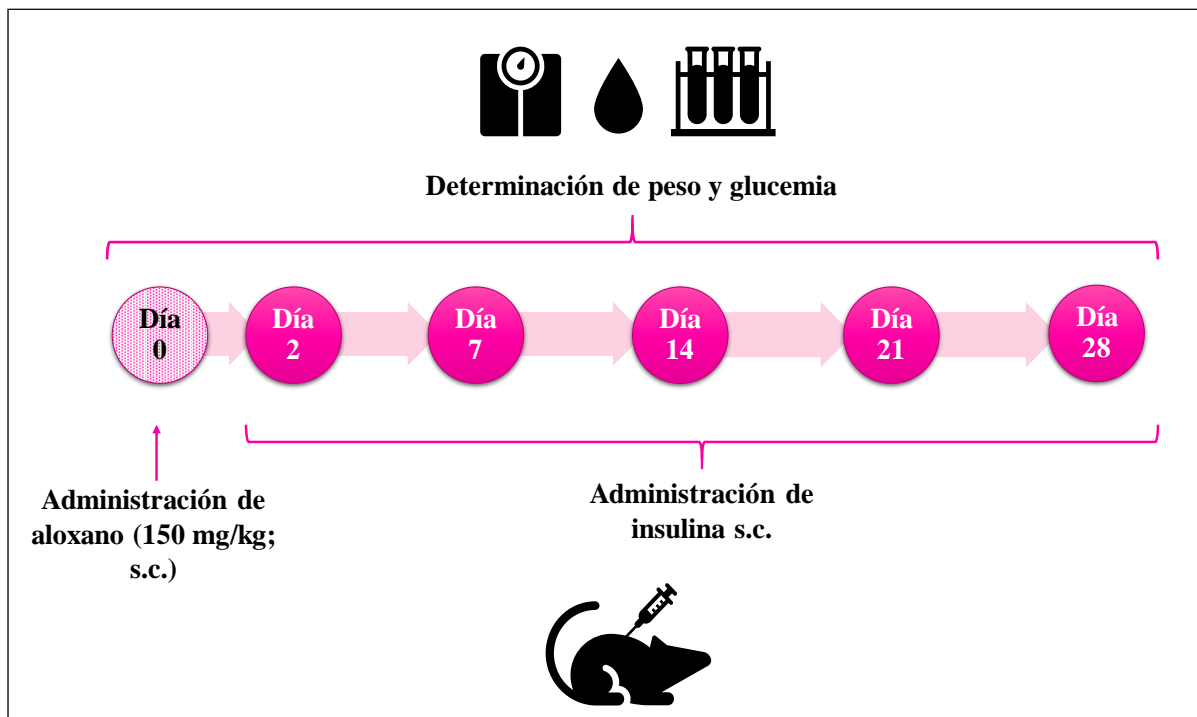
**Tabla 3.** Fármacos utilizados, descripción, vía de administración y proveedor.

FÁRMACO	DESCRIPCIÓN	VÍA DE ADMINISTRACIÓN UTILIZADA	PROVEEDOR
Aloxano	Agente diabético	s.c.	Sigma-Aldrich, St. Lois, MO, US
Insulina isofánica	Hormona hipoglucemiante	s.c.	Lilly, Madrid, España
Pentobarbital sódico	Anestésico	i.p.	Vetoquinol, Madrid, España
Heparina sódica	Anticoagulante	i.v.	Rovi, Madrid, España
Atropina	Antagonista muscarínico	i.v.	Scharlau, Barcelona, España
5-CT (5-carboxamidotriptamina)	Agonista 5-HT <sub>1/5/7</sub>	i.a.	Tocris Bioscience, Bristol, UK
$\alpha$ -metil-5-HT ( $\alpha$ -metil-5-hidroxitriptamina)	Agonista 5-HT <sub>2</sub>	i.a.	Sigma-Aldrich, St. Lois, MO, US
1-PBG (1-fenilbiguanida)	Agonista 5-HT <sub>3</sub>	i.a.	Sigma-Aldrich, St. Lois, MO, US
Cisaprida	Agonista 5-HT <sub>4</sub>	i.a.	Tocris Bioscience, Bristol, UK
AS-19; (S)-N,N-dimetil-5-(1,3,5-trimetil-pirazol-4-il)-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-amino	Agonista 5-HT <sub>7</sub>	i.a.	Tocris Bioscience, Bristol, UK
SB699551; Dicloruro de N-[2-(dimetilamino)etil]-N-[[4'-[[2-feniletil)amino]metil][1,1'-bifenil]-4-il]metil]ciclopentanopropanamida	Antagonista 5-HT <sub>5A</sub>	i.v.	Sigma-Aldrich, St. Lois, MO, US
Noradrenalina	Agonista $\alpha$ y $\beta_1$	i.a.	Sigma-Aldrich, St. Lois, MO, US
5-HT	Agonista 5-HT <sub>1-7</sub>	i.a.	Sigma-Aldrich, St. Lois, MO, US

*i.a.*, intraarterial; *i.p.*, intraperitoneal; *i.v.*, intravenosa; *s.c.*, subcutánea.

### 3.3. Inducción de la diabetes mellitus tipo 1 experimental

La diabetes se induce por administración s.c. de aloxano (150 mg/kg) que destruye las células  $\beta$  del páncreas, originando una situación que simula la DM1 de forma experimental<sup>38,49,54</sup>. Se realiza un seguimiento de peso y glucemia antes y periódicamente después de esta administración. La glucemia se mide utilizando tiras reactivas y el glucómetro Accu-Chek Aviva (Roche Diagnostics; Barcelona, España). Dicho análisis se realiza utilizando una gota de sangre extraída de la cola de cada animal (Figura 2).



**Figura 2.** Inducción de diabetes. Determinación de peso y glucemia durante 28 días de estabulación.

A los dos días de la administración de aloxano, se confirma el estado diabético en los animales, midiendo la glucemia y el peso. Estos parámetros se miden periódicamente a lo largo de los 28 días de estabulación (Figura 2), siendo retirados del estudio los animales que presentan valores de glucemia  $< 300$  mg/dL. Para preservar la situación de diabetes, pero sin sufrimiento de los animales, se administra una dosis no terapéutica de insulina, según lo aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca. En paralelo, se mantiene un grupo control de animales no diabéticos, que reciben a día 0 una inyección s.c. de suero fisiológico.

### 3.4. Metodología general

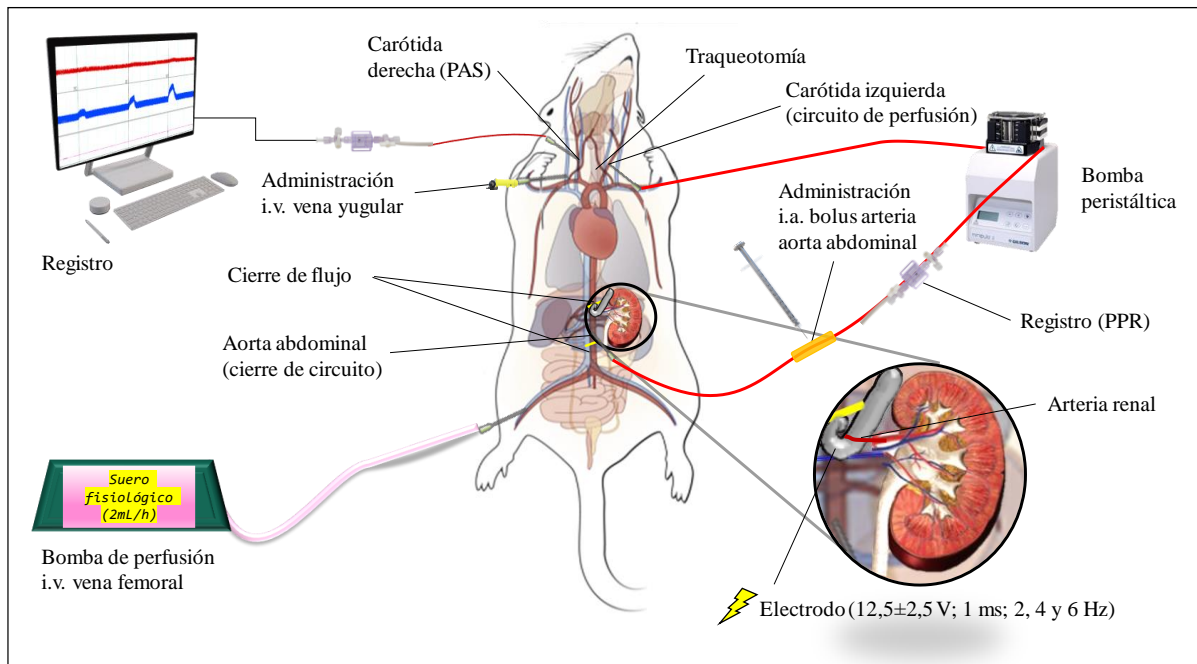
Después de la anestesia con pentobarbital sódico (60 mg/kg, i.p.), se realiza traqueotomía y se colocan catéteres en las arterias carótidas derecha e izquierda. Se canula la arteria carótida derecha para la medición de la presión arterial sistémica (PAS) y frecuencia cardíaca (FC), utilizando un transductor de presión conectado a un amplificador e-corder 410 (Modelo ED410, Cibertec, España), y a su vez con un software de registro LabChart™ y Scope™.

Se canulan las venas yugular y femoral para administración de fármacos, y se mantiene la temperatura corporal de los animales con una fuente de calor.

La autoperfusión *in situ* del riñón izquierdo se lleva a cabo según el método de Fink y Brody<sup>65</sup> modificado por García-Pedraza et al.<sup>47</sup>. El lecho vascular se perfunde mediante un circuito extracorpóreo utilizando una bomba peristáltica Gilson.

Mediante laparotomía se expone la aorta abdominal, tras desviación de los intestinos hacia el lado derecho del animal. Se coloca un hilo alrededor de la aorta por encima de la arteria renal izquierda, pero por debajo del origen de la arteria renal derecha y arterias mesentéricas superiores. Se colocan dos hilos adicionales alrededor de la aorta, 1 cm por debajo de la arteria renal izquierda y 1 cm por encima de la bifurcación ilíaca. Luego se administra heparina sódica (5 mg/kg) por vía intravenosa (para prevenir la formación de coágulos de sangre) y se inicia una infusión intravenosa, a través de la vena femoral, de suero fisiológico (2 mL/h) que continúa durante todo el experimento.

Se canula la arteria carótida izquierda como punto de partida del flujo extracorpóreo, y se corta la circulación por encima y por debajo de la arteria renal izquierda, canulando la misma. La sangre se bombea desde la arteria carótida izquierda hacia arteria renal izquierda, perfundiendo, por tanto, el riñón, con dicho circuito extracorpóreo. La sangre inmediatamente comienza a fluir desde la carótida a la arteria renal izquierda, sin interrupción del flujo de sangre hacia el riñón (Figura 3).



**Figura 3.** Riñón autoperfundido *in situ* en rata diabética. Estimulación simpática renal. PAS, presión arterial sistémica; PPR, presión de perfusión renal.

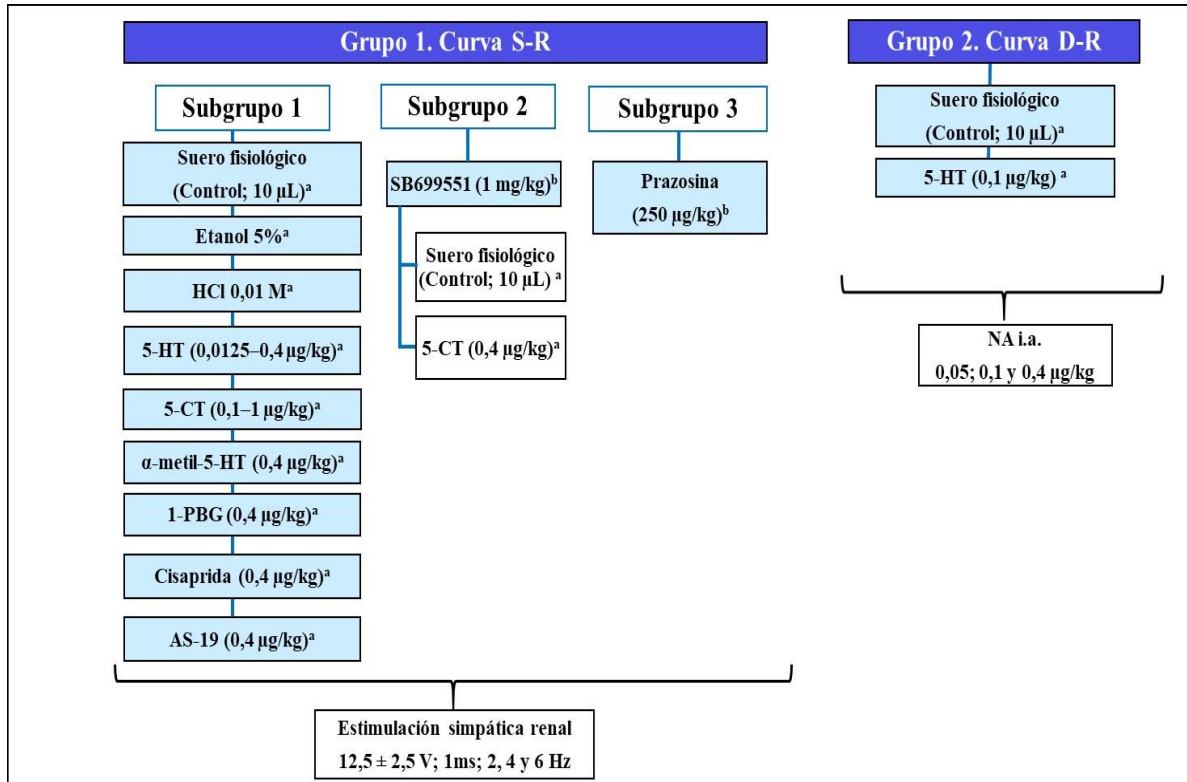
La porción distal del circuito externo se conecta a un transductor de presión conectado, a su vez, a un amplificador e-corder 410 (Modelo ED410, Cibertec, España) para la medición de la presión de perfusión renal (PPR).

Al comienzo de cada experimento, el flujo se ajusta igualando la PPR a la PAS. El flujo se mantiene constante a lo largo de cada experimento y los cambios en la PPR reflejan cambios en la resistencia vascular renal. El flujo en el lecho vascular renal oscila entre 2 y 2,9 mL/min<sup>47</sup>. En todos los experimentos, se administra atropina (1 mg/kg) por vía intravenosa para bloquear posibles efectos colinérgicos.

En este punto, los animales se dividen en dos grupos (ver Figura 4), para determinar el efecto producido por 5-HT y agonistas/antagonistas serotoninérgicos sobre las respuestas vasopresoras inducidas por: (i) estimulación eléctrica de los nervios renales simpáticos (n=80); o (ii) administración de bolus i.a. de NA exógena (n=10). La estimulación eléctrica a frecuencias crecientes de estimulación de los nervios periarteriales renales ( $12,5 \pm 2,5$  V; 1 ms; 2, 4 y 6 Hz), así como la administración i.a. tipo bolus de dosis crecientes de NA (0,05, 0,1 y 0,4  $\mu$ g/kg) se realizan en intervalos de 3-5 minutos de tiempo. A cada frecuencia, la estimulación



se realiza de forma continua hasta que la respuesta es máxima (5-10 s), y la presión de perfusión basal se restablece inmediatamente después de finalizar la estimulación.



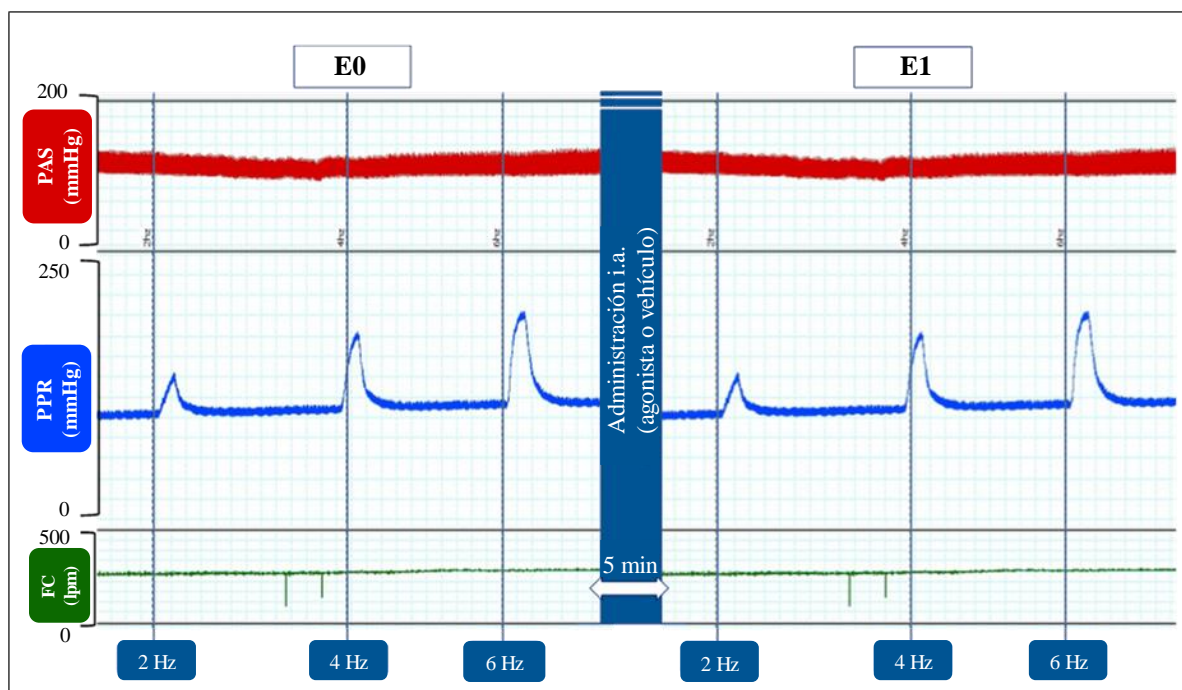
**Figura 4.** Grupos experimentales de estudio en animales diabéticos. *a*, administración intraarterial; *b*, administración intravenosa.

### 3.5. Protocolos experimentales

Después de que los animales alcancen condiciones hemodinámicas estables durante al menos 15 min, se determinan los valores basales de PAS, FC y PPR.

#### 3.5.1. Estimulación eléctrica de los nervios periarteriales (vasopresores) renales

El primer grupo de animales se utiliza para estudiar la influencia de los agonistas de 5-HT y antagonistas de la neurotransmisión simpática renal. Los incrementos ( $\Delta$ ) de PPR se obtienen por estimulación eléctrica de los nervios periarteriales renales. Para ello, se coloca un electrodo bipolar en la arteria renal izquierda, y se procede a la estimulación (Estimulador Cibertec CS-9), utilizando pulsos monofásicos a frecuencias crecientes de estimulación (2, 4 y 6 Hz). Así, se completa la curva estimulación-respuesta (S-R) control (E0) en 15 minutos (Figura 5).



**Figura 5.** Ejemplo de registro de la presión arterial sistémica (PAS; mmHg), presión de perfusión renal (PPR; mmHg) y frecuencia cardíaca (FC; latidos por minuto (lpm)) tras la estimulación eléctrica simpática.

Luego, los animales se dividen en tres subgrupos (Figura 4):

- Administración i.a. de fármacos agonistas:

Después de finalizar la curva S-R E0, se administran vía i.a. los siguientes fármacos y sus vehículos: suero fisiológico, HCl 0,01 M, etanol 5% (10  $\mu$ L para cada vehículo), 5-HT (0,0125; 0,1 y 0,4  $\mu$ g/kg),  $\alpha$ -metil-5-HT, 1-PBG, cisaprida, AS-19 (0,4  $\mu$ g/kg para cada agonista) o 5-CT (0,1; 0,4 y 1  $\mu$ g/kg). Tras 5 min de su administración se repite una nueva curva S-R (E1) en las condiciones anteriormente descritas (Figura 5).

- Administración i.v. de fármacos antagonistas:

En este segundo subgrupo, después de finalizar la curva S-R E0, se administra vía i.v. el antagonista de receptores 5-HT<sub>5A</sub>, SB699551 (1 mg/kg). Tras 10 min, se repite una nueva curva en presencia del antagonista (E0<sub>antagonista</sub>). Una vez realizada esta curva S-R del antagonista, se administran vía i.a. 5-CT (0,4  $\mu$ g/kg) o suero (10  $\mu$ L), repitiéndose otra nueva curva E1 tras 5 min de la administración del agonista (o vehículo) en las mismas condiciones antes detalladas.

- El tercer subgrupo se realiza para confirmar la naturaleza  $\alpha_1$ -adrenérgica de los  $\Delta$ PPR obtenidos por estimulación eléctrica. Para ello, este grupo de animales recibe prazosina (250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; i.v.), un antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico, 10 minutos antes de la estimulación eléctrica.

### 3.5.2. Administración de noradrenalina exógena

En el segundo grupo de ratas (Figura 4) los  $\Delta$ PPR se obtienen por administración de NA exógena (0,05; 0,1 y 0,4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; como se ha descrito previamente), realizándose así la curva dosis-respuesta (D-R) control denominada E'0. Tras ello, se administra i.a. suero fisiológico (10  $\mu\text{L}$ ) o 5-HT (0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) y se realiza una nueva curva D-R (E'1) en las mismas condiciones.

### 3.6. Expresión, tratamiento y análisis de datos obtenidos

Todos los resultados obtenidos quedan debidamente registrados y almacenados en los programas LabChart<sup>TM</sup> y Scope<sup>TM</sup>.

Los cambios en la PPR producidos por estimulación eléctrica o NA exógena, se expresan como  $\Delta$ PPR (mmHg) en relación a los valores basales. Todos los datos representan el valor medio  $\pm$  EEM de, al menos, cinco experimentos, determinando la significancia estadística mediante la prueba *t* de Student. Las diferencias se consideran significativas cuando  $p < 0,05$ .

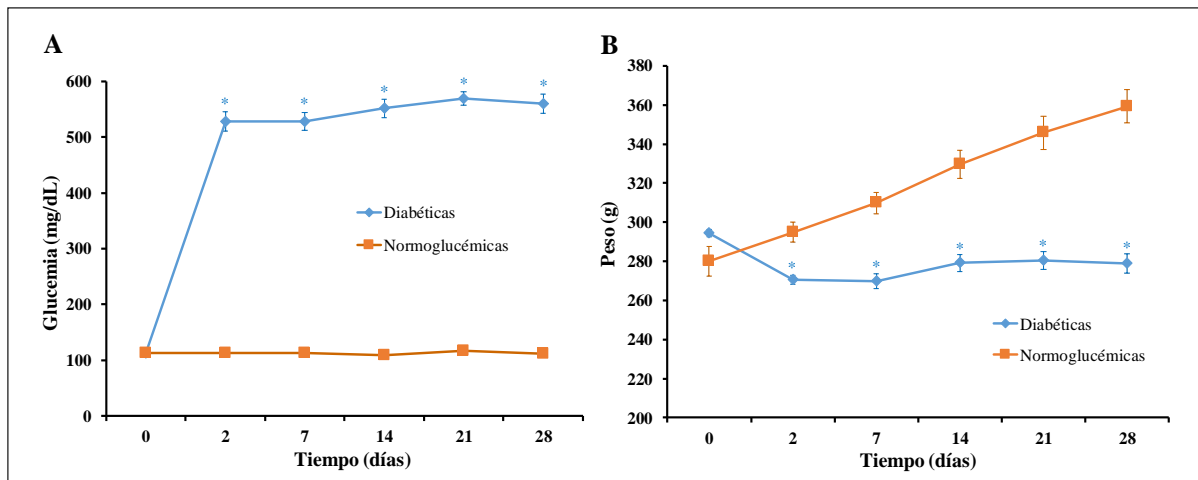
Nota: En el estudio de la neurotransmisión simpática renal, dado que ninguno de los vehículos modificó los  $\Delta$ PPR, el análisis estadístico se realizó frente al grupo que recibe suero fisiológico (control).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Evolución de glucemia y peso

La administración s.c. de aloxano (día 0) causó un incremento significativo de la glucemia basal desde el día 2 post-inyección en el grupo de ratas diabéticas respecto al grupo de animales al que se le administró suero fisiológico s.c. (ratas normoglucémicas control). Esta hiperglucemia en ratas diabéticas se mantuvo durante los 28 días de estabulación sin variación

significativa (Figura 6A). En el grupo de animales normoglucémicos control, la glucemia no se modificó de manera significativa durante los 28 días, manteniéndose constante desde el día 0 (Figura 6A).



**Figura 6.** Evolución de (A) la glucemia (mg/dL) y (B) el peso (g) de los animales durante los 28 días de estabulación. \* $p < 0,05$  vs normoglucémicas.

En relación al peso, este se incrementa progresivamente en los animales normoglucémicos durante los 28 días de estabulación, mientras que en ratas diabéticas en el día 2 post-inducción se origina una pérdida significativa de peso corporal (Figura 6B). Esta pérdida inicial de peso se mantiene durante los 28 días en ratas hiperglucémicas, sin que estos animales puedan incrementar su peso, a diferencia de lo que ocurre en los animales no diabéticos, los cuales aumentan de peso progresivamente desde el día 2 (Figura 6B). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por nuestro grupo de investigación y por otros autores utilizando aloxano como inductor de DM1 experimental<sup>2,38,54</sup> o estreptozotocina<sup>66,67</sup>.

Este modelo experimental de DM1 (utilizando aloxano) mimetiza la sintomatología característica de esta enfermedad en humanos<sup>68</sup>, como es la pérdida inicial de peso y la hiperglucemia marcada debido a la falta de utilización de glucosa por las células a causa del déficit de insulina. Igualmente, estos animales diabéticos presentan otros signos como poliuria, polidipsia y polifagia (medidos en jaulas metabólicas), datos que no se muestran en este trabajo experimental, pero que nuestro grupo ya ha demostrado previamente y que forman parte de la sintomatología característica de la DM1<sup>49</sup>.

#### 4.2. Variables hemodinámicas basales

Después de anestesiarse al animal con pentobarbital sódico (60 mg/kg; i.p.) y 15 min de estabilización tras iniciar la autoperfusión renal *in situ*, los valores basales de la PAS, PPR y FC fueron de, respectivamente,  $97\pm 3$  mmHg,  $113\pm 2$  mmHg y  $308\pm 6$  lpm en ratas diabéticas. Al comparar con los parámetros cardiovasculares encontrados en ratas normoglucémicas ( $94\pm 3$  mmHg,  $92\pm 2$  mmHg y  $395\pm 10$  lpm, respectivamente)<sup>47</sup> observamos que, mientras que la PAS no se modifica de manera significativa, la PPR es mayor y la FC se reduce en ratas diabéticas, lo que se puede relacionar con el daño renal (incremento de la presión arterial renal) y neuropático (alteración del sistema nervioso autónomo) que aparece en la DM1<sup>3,9-12</sup>.

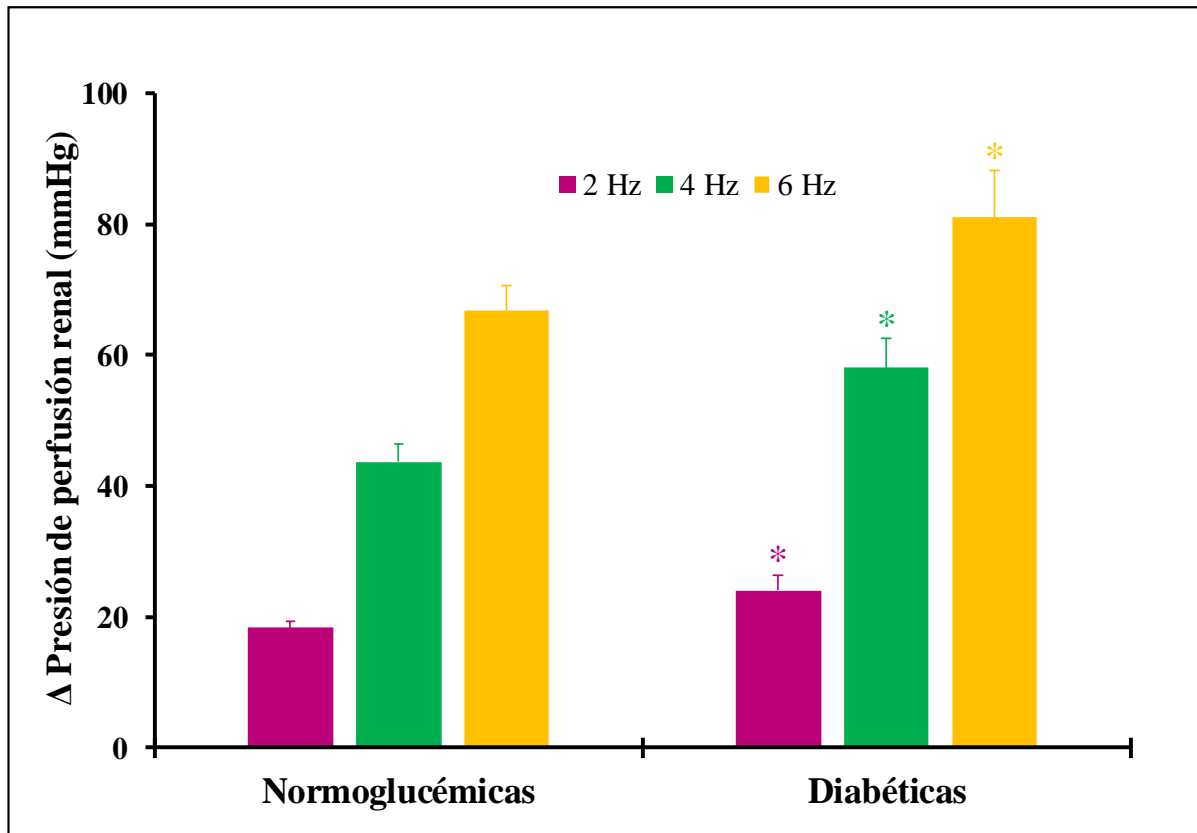
Estas variables hemodinámicas (PAS, PPR y FC) no varían tras la administración i.a. de agonistas serotoninérgicos (o vehículos), o i.v. de antagonistas serotoninérgicos (o suero fisiológico), con la excepción de la administración i.a. de 5-HT y  $\alpha$ -metil-5-HT, los cuales originaron un incremento de la PPR (vasoconstricción renal) que inmediatamente volvió a valores basales. Esta respuesta vasopresora ya se ha descrito por nuestro grupo de investigación a nivel renal, donde la activación de receptores 5-HT<sub>2</sub> es la principal responsable del efecto vasoconstrictor serotoninérgico<sup>47,50,69-71</sup>.

#### 4.3. Efecto vascular de la estimulación eléctrica de los nervios simpáticos periarteriales renales en ratas diabéticas

Como se ha descrito en la introducción, la arteria renal está ricamente inervada por fibras simpáticas postganglionares, las cuales regulan fundamentalmente el tono vascular<sup>9</sup>. En nuestras condiciones experimentales, la estimulación eléctrica de los nervios simpáticos periarteriales renales origina  $\Delta$ PPR frecuencia-dependientes (Figuras 5 y 7), los cuales se deben a la liberación de NA y activación preferentemente de receptores  $\alpha_1$  a nivel vascular. Para confirmar la naturaleza noradrenérgica de estas respuestas vasopresoras renales, en un grupo de animales diabéticos se administra previamente prazosina (antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico) y se observa un bloqueo total de estas respuestas vasoconstrictoras a todas las frecuencias de estimulación (resultados no mostrados).

Los  $\Delta$ PPR obtenidos tras estimulación eléctrica son mayores en ratas diabéticas que en ratas normoglucémicas<sup>47</sup> (Figura 7). Esta diferencia confirma que en situación de DM1

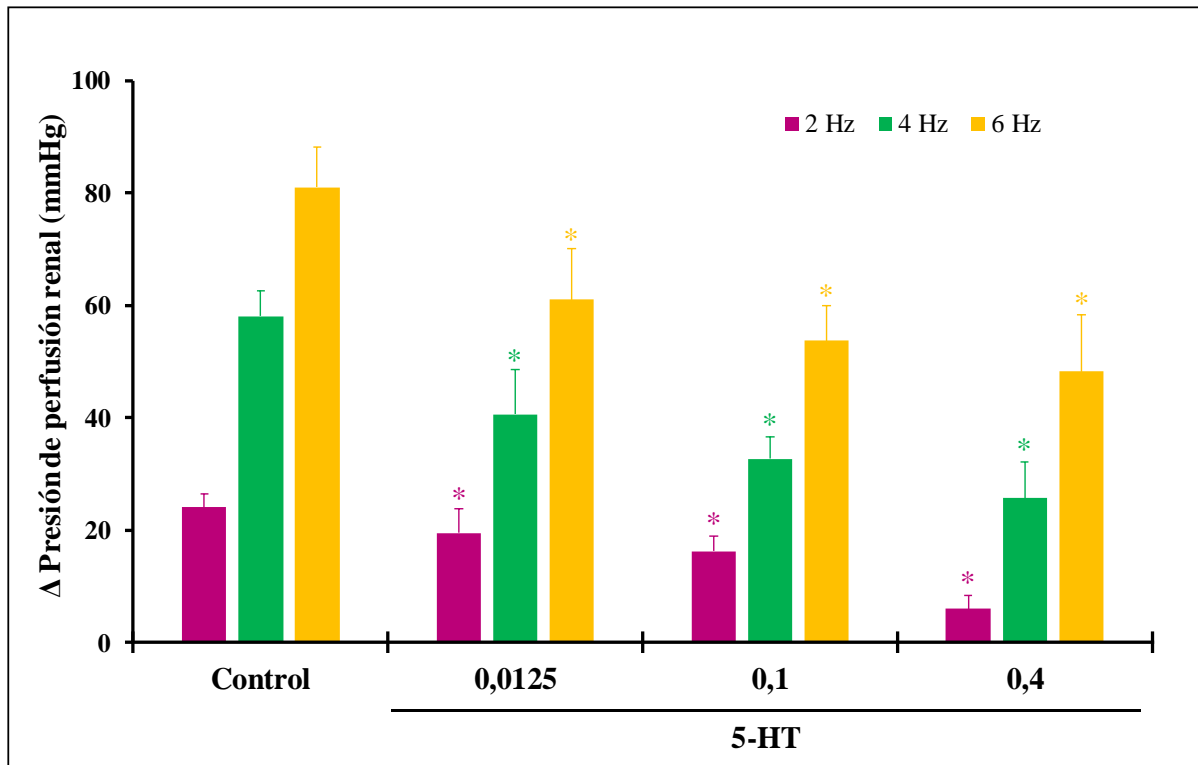
experimental existe una hiperactividad simpática a nivel renal, lo que concuerda con otros autores y estudios experimentales<sup>9,12,38</sup>.



**Figura 7.** Incrementos ( $\Delta$ ) de la presión de perfusión renal (mmHg) inducidos por estimulación eléctrica de los nervios simpáticos renales en ratas normoglucémicas y en ratas diabéticas. \* $p < 0,05$  vs normoglucémicas.

#### 4.4. Efecto de 5-HT sobre los incrementos de PPR obtenidos por estimulación simpática en ratas diabéticas

Para determinar si 5-HT modula la neurotransmisión simpática renal, se administran dosis crecientes de 5-HT (i.a.) y se analiza su capacidad para modificar la vasoconstricción renal que aparece tras estimulación eléctrica. 5-HT origina una inhibición de estas respuestas vasopresoras obtenidas por estimulación eléctrica de los nervios simpáticos periarteriales renales de manera dosis- y frecuencia-dependiente (Figura 8).



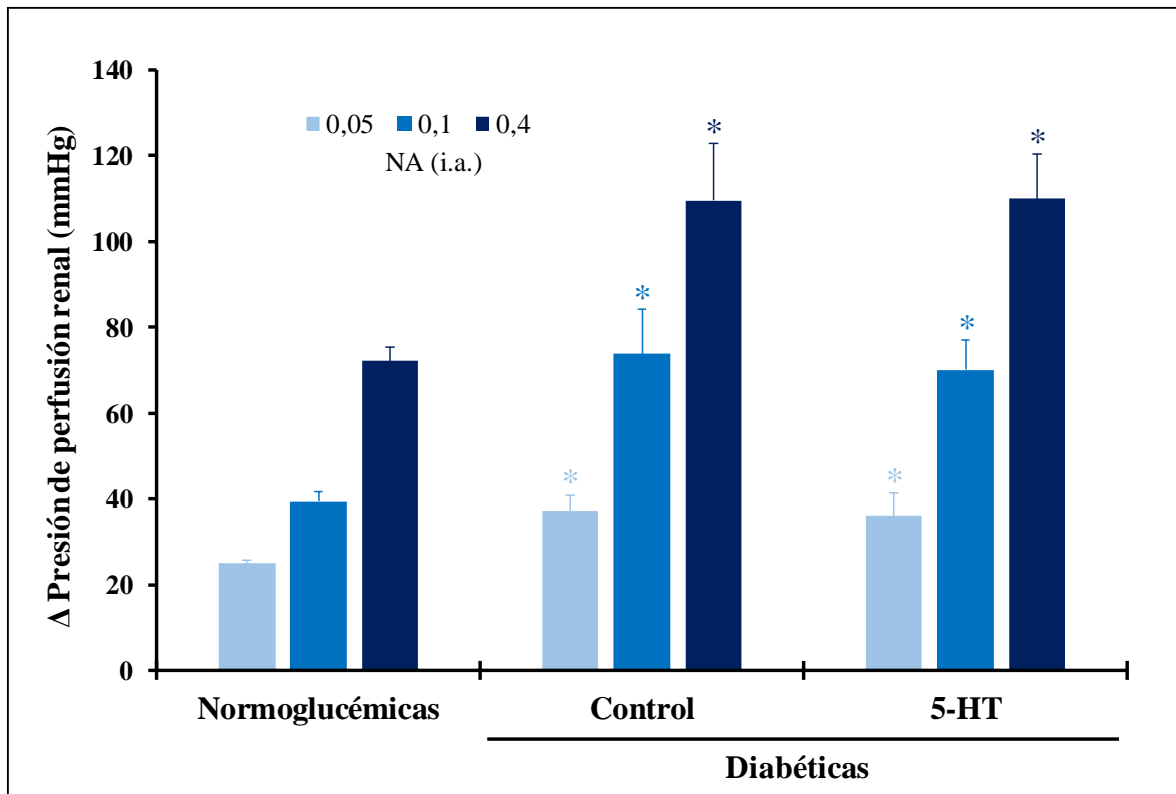
**Figura 8.** Efecto de la administración i.a. de suero fisiológico (control; 10  $\mu$ L) o 5-HT (0,0125-0,4  $\mu$ g/kg) sobre los incrementos ( $\Delta$ ) de presión de perfusión renal obtenidos por estimulación eléctrica de los nervios simpáticos renales en ratas diabéticas. \* $p < 0,05$  vs control.

Este efecto simpático-inhibidor de 5-HT ya se ha demostrado en otros modelos experimentales y territorios vasculares<sup>36,40,43,44,47,48,72-77</sup>. Sin embargo, en ratas no diabéticas la dosis de 0,0125  $\mu$ g/kg de 5-HT no modificó los  $\Delta$ PPR<sup>47</sup>, mientras que en animales diabéticos esta dosis de 5-HT redujo de manera significativa las respuestas vasopresoras renales (Figura 8), lo que parece indicar que en DM1 experimental existe una respuesta alterada a 5-HT, como ya se ha descrito por otros autores<sup>59</sup>.

#### 4.5. Naturaleza del efecto inhibidor de 5-HT sobre la neurotransmisión simpática renal en ratas diabéticas

Para conocer la naturaleza sináptica de la inhibición producida por 5-HT en animales diabéticos, se obtienen respuestas vasoconstrictoras renales por administración de dosis crecientes de noradrenalina. Estos  $\Delta$ PPR en ratas diabéticas son mayores que los encontrados en animales normoglucémicos (Figura 9), lo que pone de manifiesto una mayor respuesta adrenérgica renal en situación de DM1 experimental que contribuye a la hiperactividad simpática discutida anteriormente.

La administración de la dosis intermedia utilizada de 5-HT (0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; i.a.) no modificó los  $\Delta\text{PPR}$  inducidos por NA exógena en ratas diabéticas (Figura 9). Estos resultados nos confirman que la naturaleza de la inhibición simpática renal de 5-HT es presináptica, ya que no influye sobre la NA exógena, sino únicamente sobre la que se libera de los nervios noradrenérgicos renales tras estimulación simpática (ver apartado 4.4). Estos resultados coinciden con los descritos en animales normoglucémicos, donde la modulación serotoninérgica era también de naturaleza presináptica<sup>47</sup>.



**Figura 9.** Efecto de la administración i.a. de suero fisiológico (control; 10  $\mu\text{L}$ ) o 5-HT (0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) sobre los incrementos ( $\Delta$ ) de presión de perfusión renal obtenidos por administración de dosis crecientes de noradrenalina exógena (0,05; 0,1 y 0,4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; i.a.) en ratas normoglucémicas y diabéticas. \* $p < 0,05$  vs normoglucémicas.

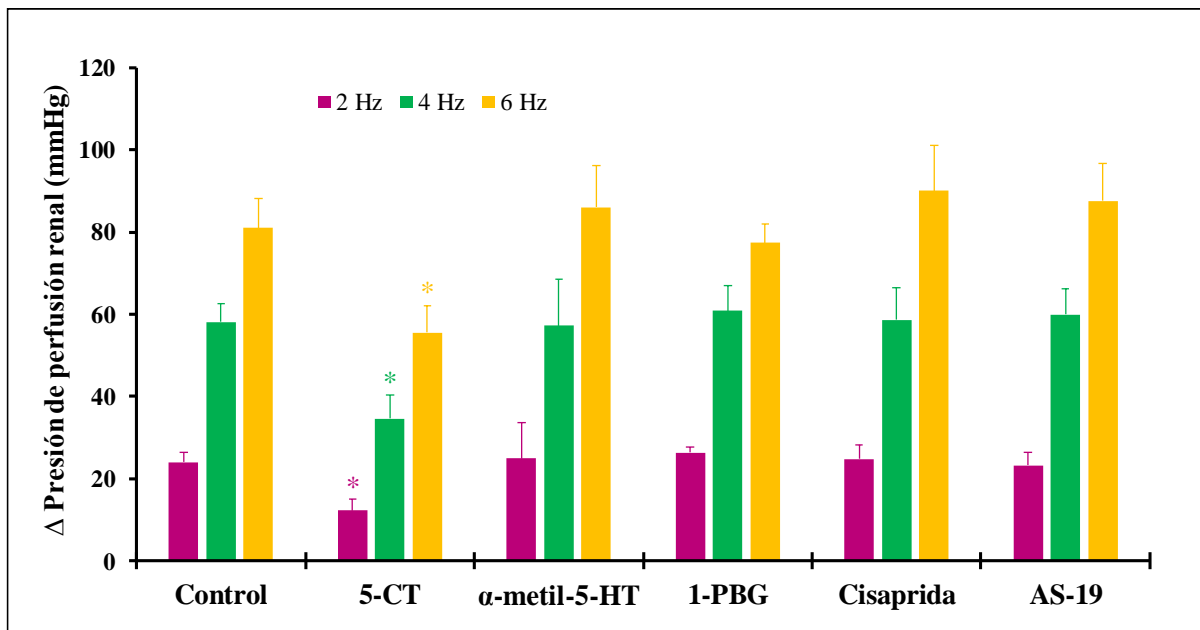
#### 4.6. Estudio de los receptores serotoninérgicos implicados en el efecto inhibitor de 5-HT sobre los incrementos de presión de perfusión renal obtenidos por estimulación simpática en ratas diabéticas

La administración i.a de  $\alpha$ -metil-5-HT, 1-PBG, cisaprida y AS-19 (agonistas de receptores 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub> y 5-HT<sub>7</sub>, respectivamente) no provocó cambios significativos en los incrementos de la PPR en ratas diabéticas (Figura 10), descartándose la participación de estos 4 tipos de receptores en la inhibición que 5-HT ejerce sobre la neurotransmisión simpática



renal. Estos receptores tampoco estaban involucrados en la regulación serotoninérgica de la inervación simpática renal de ratas normoglucémicas<sup>47</sup>.

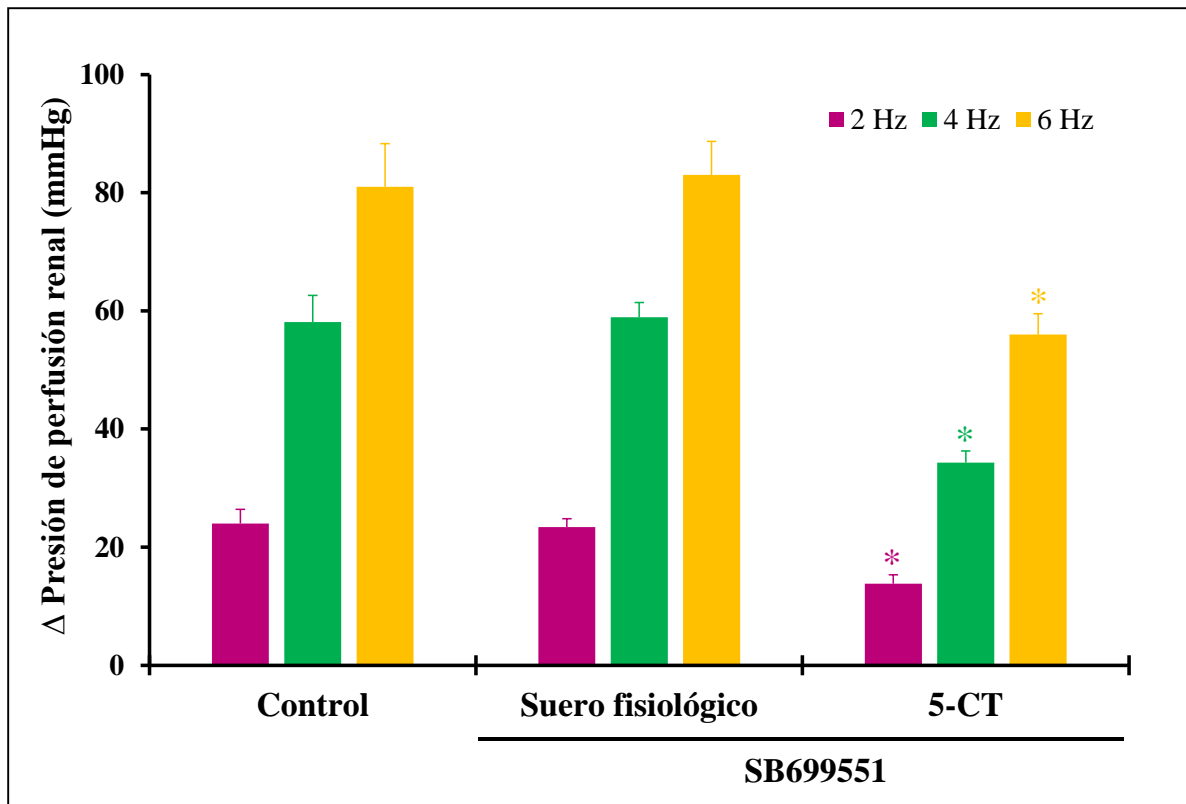
Sin embargo, el agonista de receptores 5-HT<sub>1/5/7</sub>, 5-CT, redujo las respuestas vasoconstrictoras renales tras estimulación eléctrica (Figura 10), reproduciendo la acción inhibitoria simpática de 5-HT. A pesar de que el agonista 5-CT activa a los receptores 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>5</sub> y 5-HT<sub>7</sub>, nuestros resultados permiten descartar la participación de 5-HT<sub>7</sub> en la inhibición puesto que AS-19 (agonista 5-HT<sub>7</sub>) no modificó los  $\Delta$ PPR (Figura 10).



**Figura 10.** Efecto de la administración i.a. de suero fisiológico (control; 10  $\mu$ L), 5-CT,  $\alpha$ -metil-5-HT, 1-fenilbiguanida (1-PBG), cisaprida o AS-19 (0,4  $\mu$ g/kg para cada agonista) sobre los incrementos ( $\Delta$ ) de presión de perfusión renal inducidos por estimulación eléctrica de los nervios simpáticos renales en ratas diabéticas. \* $p < 0,05$  vs control.

Para estudiar la posible implicación de los receptores 5-HT<sub>5</sub> en el efecto inhibitorio de 5-CT, utilizamos un antagonista selectivo de receptores 5-HT<sub>5A</sub>, SB699551 (1 mg/kg; i.v.), debido a la falta de existencia de agonista específico para estos receptores. La administración de SB699551 no alteró los  $\Delta$ PPR obtenidos por estimulación eléctrica en ratas diabéticas (Figura 11). Sin embargo, 5-CT (0,4  $\mu$ g/kg; i.a.) sigue reduciendo las respuestas vasoconstrictoras renales en presencia del antagonismo de los receptores 5-HT<sub>5A</sub> (Figura 11), confirmándose, por tanto, que la activación de estos receptores no está implicada en la inhibición de la neurotransmisión simpática renal inducida por 5-CT en ratas diabéticas. El mecanismo efector de estos receptores está asociado a la inhibición de la liberación de neurotransmisores al estar acoplados a proteínas G<sub>i/o</sub><sup>42</sup>, habiendo demostrado nuestro grupo que en ratas diabéticas son

los receptores 5-HT<sub>5A</sub> los responsables de la inhibición serotoninérgica sobre la innervación simpática cardíaca<sup>66</sup>; no obstante, en este estudio y bajo sus condiciones experimentales, estos receptores serotoninérgicos no ejercen ningún papel modulador adrenérgico.

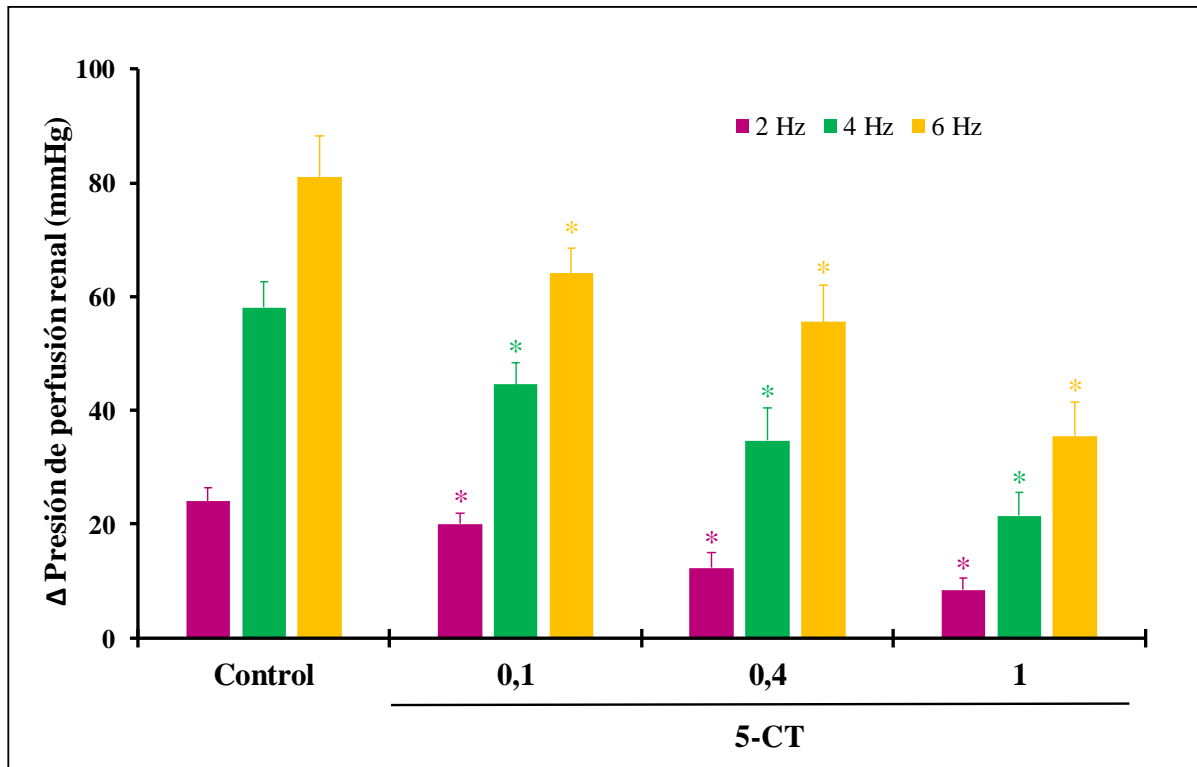


**Figura 11.** Efectos de la administración i.a. de suero fisiológico (control; 10  $\mu$ L) o 5-CT (0,4  $\mu$ g/kg), en presencia o no de la administración de SB699551 (1 mg/kg; i.v.) sobre los incrementos ( $\Delta$ ) de presión de perfusión renal inducidos por estimulación eléctrica de los nervios simpáticos renales en ratas diabéticas. \* $p < 0,05$  vs control.

Con todos estos resultados se concluye que los receptores 5-HT<sub>1</sub> son los involucrados en la acción inhibidora serotoninérgica sobre la neurotransmisión noradrenérgica renal en ratas diabéticas. Estos resultados coinciden con resultados previos de nuestro grupo, donde la activación de diferentes subtipos de la familia de receptores 5-HT<sub>1</sub> ejerce un efecto simpático-inhibidor en distintos modelos experimentales y lechos vasculares<sup>38,40,47-49,54,64</sup>.

Como estudios futuros, y siguiendo la trayectoria del grupo de investigación, se propone identificar qué subtipos (Tabla 1) dentro de la familia de los receptores 5-HT<sub>1</sub> serían los responsables del efecto simpático-inhibidor renal, y así determinar si la DM1 experimental induce cambios en la regulación serotoninérgica del tono vascular noradrenérgico del riñón.

Una vez determinado que el efecto simpático-inhibidor renal del agonista 5-CT se debe a la activación preferente de receptores de la familia 5-HT<sub>1</sub>, se administran dosis crecientes de este agonista (Figura 12) para analizar su similitud con el agonista endógeno serotoninérgico, serotonina.



**Figura 12.** Efectos de la administración i.a. de suero fisiológico (control; 10 µL) o 5-CT (0,1 – 1 µg/kg) sobre los incrementos ( $\Delta$ ) de presión de perfusión renal inducidos por estimulación eléctrica de los nervios simpáticos renales en ratas diabéticas. \* $p < 0,05$  vs control.

Como se observa en la Figura 12, el efecto inhibitor de 5-CT es frecuencia- y dosis-dependiente, al igual que 5-HT (Figura 8), sobre los incrementos de PPR en ratas diabéticas (Figura 12). Aunque este mismo efecto del 5-CT se observó sobre la inervación simpática renal de ratas normoglucémicas<sup>2,47</sup>, las dosis utilizadas en ratas diabéticas tuvieron que ser superiores, lo que se puede relacionar con el daño vascular y renal presente en este modelo de DM1, como previamente hemos descrito.

El estudio realizado aporta evidencias, según los resultados obtenidos, de una actividad noradrenérgica exacerbada en diabetes y de que la activación del receptor 5-HT<sub>1</sub> inhibe, de forma presináptica, dicha hiperactividad noradrenérgica y sus consecuentes efectos

vasopresores en el riñón autoperfundido *in situ* de ratas diabéticas. Este estudio de farmacología básica abre una puerta a continuar con sucesivas investigaciones en este campo, dado que constituye la base de una posible diana terapéutica para las complicaciones micro- y macrovasculares asociadas a la diabetes mellitus, y para otras patologías que cursen con hiperactividad simpática.

## 5. CONCLUSIONES

1. La inducción de diabetes por aloxano en ratas provoca una hiperactividad simpática a nivel renal.
2. La administración de serotonina modula la neurotransmisión simpática renal en ratas diabéticas, inhibiendo de manera presináptica la liberación de noradrenalina.
3. 5-CT reproduce la acción inhibitoria de 5-HT sobre la neurotransmisión simpática renal en ratas diabéticas. El efecto simpático-inhibidor renal está mediado por la activación de receptores 5-HT<sub>1</sub> en DM1.
4. La inhibición de la actividad simpática a través de la activación de receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1</sub> puede constituir un potencial terapéutico en patologías que cursen con hiperactividad simpática, como en la DM, reduciendo las complicaciones cardiovasculares asociadas.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014; 37 Suppl 1: S81-S90.
2. García-Pedraza JÁ, Ferreira-Santos P, Aparicio R, Montero MJ, Morán A. Blocking 5-HT<sub>2</sub> receptor restores cardiovascular disorders in type 1 experimental diabetes. *Sci Rep*. 2016; 6: 33979. DOI: 10.1038/srep33979.
3. Federación Internacional de Diabetes. *IDF Diabetes Atlas*, 10th ed. Bruselas, Bélgica: Federación Internacional de Diabetes, 2021.
4. Organización Mundial de la Salud [Internet]. Organización Mundial de la Salud [actualizado 10 noviembre 2021; citado 4 mayo 2022]. Diabetes. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>.

5. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev.* 2013; 93(1): 137-188.
6. Perin PC, Maule S, Quadri R. Sympathetic nervous system, diabetes, and hypertension. *Clin Exp Hypertens.* 2001; 23(1-2): 45-55.
7. Vergès B. Cardiovascular disease in type 1 diabetes: A review of epidemiological data and underlying mechanisms. *Diabetes Metab.* 2020; 46(6): 442-449.
8. Grupo Español de Estudio de la Nefropatía Diabética (GEENDIAB), Navarro González J, Mora-Fernández C, Macía Heras M, Martínez-Castelao A, Górriz Teruel JL, et al. Fisiopatología de la nefropatía diabética. *Nefrología [Internet].* 2008 [citado 4 julio 2022]; 1(1): 0. Disponible en: <https://www.revistanefrologia.com/es-fisiopatologia-nefropatia-diabetica-articulo-X1888970008000118>.
9. Duque A, Mediano MFF, De Lorenzo A, Rodrigues LF Jr. Cardiovascular autonomic neuropathy in diabetes: Pathophysiology, clinical assessment and implications. *World J Diabetes.* 2021; 12(6): 855-867.
10. Côté F, Fligny C, Fromes Y, Mallet J, Vodjdani G. Recent advances in understanding serotonin regulation of cardiovascular function. *Trends Mol Med.* 2004; 10(5): 232-238.
11. Secrest AM, Becker DJ, Kelsey SF, Laporte RE, Orchard TJ. Cause-specific mortality trends in a large population-based cohort with long-standing childhood-onset type 1 diabetes. *Diabetes.* 2010; 59(12): 3216-3222.
12. Teoh IH, Elisaus P, Schofield JD. Cardiovascular risk management in type 1 diabetes. *Curr Diab Rep.* 2021; 21(9): 29. DOI: 10.1007/s11892-021-01400-9.
13. Morimoto A, Onda Y, Nishimura R, Sano H, Utsunomiya K, Tajima N, et al. Cause-specific mortality trends in a nationwide population-based cohort of childhood-onset type 1 diabetes in Japan during 35 years of follow-up: the DERI Mortality Study. *Diabetologia.* 2013; 56(10): 2171-2175.
14. Cameron NE, Eaton SE, Cotter MA, Tesfaye S. Vascular factors and metabolic interactions in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetologia.* 2001; 44(11): 1973-1988.

15. Miller RG, Secrest AM, Sharma RK, Songer TJ, Orchard TJ. Improvements in the life expectancy of type 1 diabetes: the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications study cohort. *Diabetes*. 2012; 61(11): 2987-2992.
16. Vinik AI, Erbas T, Casellini CM. Diabetic cardiac autonomic neuropathy, inflammation and cardiovascular disease. *J Diabetes Investig*. 2013; 4(1): 4-18.
17. Sharma H, Lencioni M, Narendran P. Cardiovascular disease in type 1 diabetes. *Cardiovasc Endocrinol Metab*. 2019; 8(1): 28-34.
18. Cardiovascular disease [Internet]. *Diabetes.org* [citado 4 julio 2022]. <https://www.diabetes.org/diabetes/cardiovascular-disease>.
19. Thomas P, Dasgupta I. The role of the kidney and the sympathetic nervous system in hypertension. *Pediatr Nephrol*. 2015; 30(4): 549-560.
20. Yang L, Gao Y-J, Lee RMKW. Quinapril effects on resistance artery structure and function in hypertension. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2004; 370(6): 444-451.
21. Brondum E, Kold-Petersen H, Nilsson H, Flyvbjerg A, Aalkjaer C. Increased contractility to noradrenaline and normal endothelial function in mesenteric small arteries from the Goto-Kakizaki rat model of type 2 diabetes. *J Physiol Sci*. 2008; 58(5): 333-339.
22. Rocha-Pereira C, Arribas SM, Fresco P, González MC, Gonçalves J, Diniz C. Impaired inhibitory function of presynaptic A1-adenosine receptors in SHR mesenteric arteries. *J Pharmacol Sci*. 2013; 122(2): 59-70.
23. Grassi G. Sympathetic neural activity in hypertension and related diseases. *Am J Hypertens*. 2010; 23(10): 1052-1060.
24. Hadaya J, Ardell JL. Autonomic modulation for cardiovascular disease. *Front Physiol*. 2020; 11: 617459. DOI: 10.3389/fphys.2020.617459.
25. Moțățaianu A, Maier S, Bajko Z, Voidazan S, Bălașa R, Stoian A. Cardiac autonomic neuropathy in type 1 and type 2 diabetes patients. *BMC Neurol*. 2018; 18(1): 126. DOI: 10.1186/s12883-018-1125-1.

26. Agashe S, Petak S. Cardiac autonomic neuropathy in diabetes mellitus. *Methodist Debaquey Cardiovasc J.* 2018; 14(4): 251-256.
27. Švíglerová J, Mudra J, Tonar Z, Slavíková J, Kuncová J. Alteration of the cardiac sympathetic innervation is modulated by duration of diabetes in female rats. *Exp Diabetes Res.* 2011; 2011: 835932. DOI: 10.1155/2011/835932.
28. Xuan Y-L, Wang Y, Xue M, Hu H-S, Cheng W-J, Li X-R, et al. In rats the duration of diabetes influences its impact on cardiac autonomic innervations and electrophysiology. *Auton Neurosci.* 2015; 189: 31-36.
29. Id D, Kaltenbach B, Franke J, Sievert H. Renal Denervation. In: *Catheter-Based Cardiovascular Interventions.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013. p. 925-937.
30. DiBona GF. Dynamic analysis of patterns of renal sympathetic nerve activity: implications for renal function. *Exp Physiol.* 2005; 90: 159-161.
31. Zoccali C, Mallamaci F, Parlongo S, Cutrupi S, Benedetto FA, Tripepi G, et al. Plasma norepinephrine predicts survival and incident cardiovascular events in patients with end-stage renal disease. *Circulation.* 2002; 105: 1354-1359.
32. Burke SL, Head GA, Lambert GW, Evans RG. Renal sympathetic neuroeffector function in renovascular and angiotensin II-dependent hypertension in rabbits. *Hypertension.* 2007; 49: 932-938.
33. Bruno RM, Ghiadoni L, Seravalle G, Dell'oro R, Taddei S, Grassi G. Sympathetic regulation of vascular function in health and disease. *Front Physiol.* 2012; 3: 284. DOI: 10.3389/fphys.2012.00284.
34. Sorota S. The sympathetic nervous system as a target for the treatment of hypertension and cardiometabolic diseases. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2014; 63: 466-476.
35. de Beus E, de Jager R, Joles JA, Grassi G, Blankestijn PJ. Sympathetic activation secondary to chronic kidney disease: therapeutic target for renal denervation? *J Hypertens.* 2014; 32: 1751-1761.
36. Morán A, Velasco C, Salvador T, Martín ML, 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: 1358-1362.
37. Villalon CM, Contreras J, Ramirez-San Juan E, Castillo C, Perusquia M, Terron JA. Characterization of prejunctional 5-HT receptors mediating inhibition of sympathetic vasopressor responses in the pithed rat. *Br J Pharmacol.* 1995; 116: 3330-3336.
38. García M, Morán A, Calama E, Martín ML, Barthelmebs M, Román LS. 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: 593-601.
39. Morán A, Restrepo B, De Urbina AV, García M, Martín ML, 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: 70-77.
40. García-Pedraza JÁ, García M, Martín ML, Gómez-Escudero J, Rodríguez-Barbero A, Román LS, et al. Peripheral 5-HT<sub>1D</sub> and 5-HT<sub>7</sub> serotonergic receptors modulate sympathetic neurotransmission in chronic sarpogrelate treated rats. *Eur J Pharmacol.* 2013; 714: 65-73.
41. Watts SW, Morrison SF, Davis RP, Barman SM. Serotonin and blood pressure regulation. *Pharmacol Rev.* 2012; 64: 359-388.
42. Barnes NM, Ahern GP, Becamel C, Bockaert J, Camilleri M, Chaumont-Dubel S, et al. International union of basic and clinical pharmacology. CX. Classification of receptors for 5-hydroxytryptamine; Pharmacology and function. *Pharmacol Rev.* 2021; 73(1): 310-520.
43. Morán A, Fernández MM, Velasco C, Martín ML, San Román L. Characterization of prejunctional 5-HT<sub>1</sub> receptors that mediate the inhibition of pressor effects elicited by sympathetic stimulation in the pithed rat. *Br J Pharmacol.* 1998; 123: 1205-1213.
44. Villalón CM, Centurión D. Cardiovascular responses produced by 5-hydroxytryptamine: a pharmacological update on the receptors/mechanisms involved and therapeutic implications. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2007; 376: 45-63.



45. Ireland SJ, Jordan CC. Pharmacological characterization of 5-hydroxytryptamine induced hyperpolarization of the rat superior cervical ganglion. *Br J Pharmacol.* 1987; 92: 417-427.
46. Jones JF, Martin G, Ramage AG. Evidence that 5-HT<sub>1D</sub> receptors mediate inhibition of sympathetic ganglionic transmission in anaesthetized cats. *Br J Pharmacol.* 1995; 116: 1715-1717.
47. García-Pedraza JÁ, García M, Martín ML, Morán A. 5-HT<sub>1D</sub> receptor inhibits renal sympathetic neurotransmission by nitric oxide pathway in anesthetized rats. *Vascul Pharmacol.* 2015; 72: 172-180.
48. García-Pedraza JÁ, García-Domingo M, Gómez-Roso M, Rodríguez-Barbero A, Martín ML, Morán A. 5-HT modulates the rat mesenteric vasopressor outflow by 5-HT<sub>1D</sub> sympatholytic receptors. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2017; 44(12): 1224-1231.
49. Fernández-González JF, García-Pedraza JÁ, Marín-Quílez A, Bastida JM, Martín ML, Morán A, García-Domingo M. Effect of sarpogrelate treatment on 5-HT modulation of vascular sympathetic innervation and platelet activity in diabetic rats. *Biomed Pharmacother.* 2022; 153: 113276. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113276.
50. Restrepo B, García M, Rodríguez-Barbero A, San Román L, Martín ML, 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: 37-44.
51. Haider S, Ahmed S, Tabassum S, Memon Z, Ikram M, Haleem DJ. Streptozotocin-induced insulin deficiency leads to development of behavioral deficits in rats. *Acta Neurol Belg.* 2013; 113(1): 35-41.
52. Shiba T, Yokota A, Gamoh S, Tanaka-Totoribe N, Kuwabara M, Nakamura E, et al. Diabetes mellitus induces hyperreactivity of 5-hydroxytryptamine (5-HT)-induced constriction in human internal thoracic artery and is associated with increase in the membrane protein level of 5-HT<sub>2A</sub> receptor. *Biol Pharm Bull.* 2018; 41(5): 820-823.
53. Cao N, Huang J, Ni J, Si J, Gu B, Wang Z, et al. Streptozotocin-induced diabetes causes upregulation of serotonin (5-HT)<sub>2A/C</sub> receptors in lumbosacral cord

motoneurons and down regulation of serotonergic paraneurons in the urethra. *Brain Res.* 2019; 1715: 21-26.

54. García-Pedraza JÁ, Fernández-González JF, López C, Martín ML, Alarcón-Torrecillas C, Rodríguez-Barbero A, Morán A, García-Domingo M. Oral fluoxetine treatment changes serotonergic sympatho-regulation in experimental type 1 diabetes. *Life Sci.* 2022; 293: 120335. DOI: 10.1016/j.lfs.2022.120335.
55. Barradas MA, Gill DS, Fonseca VA, Mikhailidis DP, Dandona P. Intraplatelet serotonin in patients with Diabetes Mellitus and peripheral vascular disease. *Eur J Clin Invest.* 1988; 18(4): 399-404.
56. 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.
57. Martín FJ, Míguez JM, Aldegunde M, Atienza G. Platelet serotonin transport is altered in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci.* 1995; 56(21): 1807-1815.
58. 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; 107(6): 319-323.
59. Jonnakuty C., Gragnoli C. What do we know about serotonin? *J Cell Physiol.* 2008; 217(2): 301-306.
60. 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): 211-220.
61. Sandrini M, Vitale G, Vergoni AV, Ottani A, Bertolini A. Streptozotocin-induced diabetes provokes changes in serotonin concentration and on 5-HT1A and 5-HT2 receptors in the rat brain. *Life Sci.* 1997; 60(16): 1393-1397.
62. Price JC, Kelley DE, Ryan CM, Meltzer CC, Drevets WC, Mathis CA, et al. Evidence of increased serotonin-1A receptor binding in type 2 diabetes: a positron emission tomography study. *Brain Res.* 2002; 927(1): 97-103.

63. Ni W, Geddes TJ, Priestley JRC, Szasz T, Kuhn DM, Watts SW. The existence of a local 5-hydroxytryptaminergic system in peripheral arteries. *Br J Pharmacol.* 2008; 154(3): 663-674.
64. García-Pedraza JÁ, López C, Fernández-González JF, Martín ML, Morán A, García-Domingo M. Vascular sympathetic neurotransmission and its serotonergic regulation are modified by chronic fluoxetine treatment. *J Pharmacol Sci.* 2021; 147(1): 48-57.
65. Fink GD, Brody MJ. Continuous measurement of renal blood flow changes to renal nerve stimulation and intra-arterial drug administration in rat. *Am J Physiol.* 1978; 234: H219-H222.
66. García-Pedraza JÁ, Hernández-Abreu O, Morán A, Carretero J, García-Domingo M, Villalón CM. Role of peripheral 5-HT<sub>5A</sub> receptors in 5-HT-induced cardiac sympatho-inhibition in type 1 diabetic rats. *Sci Rep.* 2020; 10(1): 19358. DOI: 10.1038/s41598-020-76298-6.
67. Manjarrez-Gutiérrez G, Rocío Herrera-Márquez JR, Bueno-Santoyo S, González-Ramírez M, Hernández J. Changes in brain serotonin biosynthesis in rats with diabetes mellitus induced by streptozocin: effect of insulin treatment. *Rev Invest Clin.* 2000; 52(5): 509-516.
68. Moussavi S, Chatterji S, Verdes E, Tandon A, Patel V, Ustun B. Depression, chronic diseases, and decrements in health: results from the World Health Surveys. *Lancet.* 2007; 370(9590): 851-858.
69. Morán A, Velasco C, Martín ML, San Román L. Renal vasoconstrictor response to 5-hydroxytryptamine in the in situ autoperfused rat kidney: involvement of angiotensin II and the 5-HT<sub>2</sub> receptor activation. *Eur J Pharmacol.* 1997; 330(2-3): 205-211.
70. Morán A, Ortiz de Urbina A-V, Martín M-L, García M, Rodríguez-Barbero A, Dorado F, et al. Characterization of contractile 5-hydroxytryptamine receptor subtypes in the in situ autoperfused kidney in the anaesthetized rat. *Eur J Pharmacol.* 2008; 592(1-3): 133-137.
71. Morán A, de Urbina A-VO, Martín M-L, Rodríguez-Barbero A, Román LS. Characterization of the contractile 5-hydroxytryptamine receptor in the autoperfused kidney of L-NAME hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 2009; 620(1-3): 90-96.

72. Villalón CM, Centurión D, del Mar Fernández M, Morán A, Sánchez-López A. 5-Hydroxytryptamine inhibits the tachycardia induced by selective preganglionic sympathetic stimulation in pithed rats. *Life Sci.* 1999; 64(20): 1839-1847.
73. Sánchez-Lopez A, Centurión D, Vázquez E, Arulmani U, Saxena PR, Villalón CM. Pharmacological profile of the 5-HT-induced inhibition of cardioaccelerator sympathetic outflow in pithed rats: correlation with 5-HT1 and putative 5-HT5A/5B receptors. *Br J Pharmacol.* 2003; 140(4): 725-735.
74. Sánchez-López A, Centurión D, Vázquez E, Arulmani U, Saxena PR, Villalón CM. Further characterization of the 5-HT1 receptors mediating cardiac sympatho-inhibition in pithed rats: pharmacological correlation with the 5-HT1B and 5-HT1D subtypes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2004; 369(2): 220-227.
75. Kaumann AJ, Levy FO. 5-hydroxytryptamine receptors in the human cardiovascular system. *Pharmacol Ther.* 2006; 111(3): 674-706.
76. Lamas S, Rodríguez-Puyol D. Endothelial control of vasomotor tone: the kidney perspective. *Semin Nephrol.* 2012; 32(2): 156-166.
77. Ramage AG, Villalón CM. 5- hydroxytryptamine and cardiovascular regulation. *Trends Pharmacol Sci.* 2008; 29: 472-481.