

**VNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA**



**INFLUENCIA DE LA DIABETES EXPERIMENTAL CRÓNICA  
EN RESPUESTAS SEROTONINÉRGICAS A NIVEL  
CARDIOVASCULAR Y RENAL**

**Beatriz Restrepo Cortés**

Salamanca, 2011





Memoria presentada por Beatriz Restrepo Cortés  
para optar al Grado de Doctor

*Salamanca, Febrero de 2011*

*Fdo. Beatriz Restrepo Cortés*





FACULTAD DE FARMACIA  
Departamento de Fisiología y Farmacología  
Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca

Las Doctoras Dña. ASUNCION MORÁN BENITO, Dña. ANA VEGA ORTIZ DE URBINA ANGOSO y Dña. MARIA LUISA MARTIN CALVO

**CERTIFICAN:**

Que la memoria titulada **“Influencia de la diabetes experimental crónica en respuestas serotoninérgicas a nivel cardiovascular y renal”**, que presenta Dña. Beatriz Restrepo Cortés 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 quince de febrero de dos mil once.

Fdo. Asunción Morán

Fdo. Ana Vega Ortiz de Urbina

Fdo. M<sup>a</sup> Luisa Martín



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

**CERTIFICA:**

Que la memoria titulada **“Influencia de la diabetes experimental crónica en respuestas serotoninérgicas a nivel cardiovascular y renal”**, presentado por Dña. Beatriz Restrepo Cortés para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección conjunta de las Doctoras Asunción Morán Benito, Dña. Ana Vega Ortiz de Urbina y Dña. M<sup>a</sup> Luisa Martín Calvo, en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca, a quince de febrero de dos mil once.

Fdo. M<sup>a</sup> Jesús Monte Río





La doctoranda ha disfrutado durante la realización de esta Tesis Doctoral de una Beca para realizar Estudios Doctorales en la Universidad de Salamanca para estudiantes latinoamericanos, financiada por el Grupo Santander.

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

- Título del proyecto: Cambios en la vasoconstricción renal 5-HT<sub>2</sub> y en la expresión de serotonérgicos implicados, inducidos por hipertensión crónica (con L-NAME) o por diabetes experimental (con aloxano), en ratas.  
Entidad financiadora: Junta de Castilla y León  
Investigador responsable: Dra. Dña. M<sup>a</sup> Luisa Martín Calvo
- Título del proyecto: Cambios inducidos en respuestas vasculares a 5-HT y/o en la expresión de receptores serotonérgicos por diabetes experimental crónica de 8 semanas  
Entidad financiadora: Junta de Castilla y León  
Investigador responsable: Dra D<sup>a</sup> Asunción Morán Benito
- Título del proyecto: Efecto del tratamiento antidepresivo con Fluoxetina o con imipramida, en diabetes experimental, con aloxano y en respuestas serotonérgicas moduladoras de actividad simpática in vivo.  
Entidad financiadora: Junta de Castilla y León, Consejería de Sanidad y Bienestar Social  
Investigador responsable: Dra. Dña. M<sup>a</sup> Luisa Martín Calvo
- Título del proyecto: Efectos del tratamiento oral con un antidepresivo y un antagonista 5-HT<sub>2A</sub> sobre las alteraciones metabólicas y determinadas respuestas cardiovasculares serotonérgicas, 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



*A Carlos por acompañarme y comprenderme.*

*A mis hijos por su compañía y cariño.*

*A mis padres: Gilberto y Nelly por hacer de mi lo que soy.*

*A mis hermanos y a toda mi familia por su cariño y apoyo.*

*“La felicidad humana generalmente no se logra con grandes golpes de suerte, que pueden ocurrir pocas veces, sino con pequeñas cosas que ocurren todos los días”*

*(Benjamin Franklin)*



*Ciertamente, la realización de la presente Tesis Doctoral no habría sido posible sin la colaboración estrecha, incondicional y profesional del grupo de investigación al cual me honro en pertenecer; al Laboratorio de Farmacología (Departamento de Fisiología y Farmacología), a la Universidad de Salamanca y a la Universidad Del Quindío que hizo posible mi llegada desde tan lejos. A todos aquellos quiero expresar mi más sentido y profundo agradecimiento:*

*A las Doctoras. Dña. Asunción Morán Benito y Dña. María Luisa Martín Calvo por concederme la oportunidad de trabajar en su equipo de investigación, por todo lo que me habéis enseñado por el tiempo que me habéis dedicado, por vuestra paciencia, pero sobre todo por haberme animado en todo momento, por compartir conmigo momentos de alegría y distensión, tanto dentro como fuera del laboratorio, sin su apoyo y confianza no hubiera sido posible la realización de esta memoria,*

*A la Doctora. Dña. Ana Vega Ortiz de Urbina por su ayuda en la parte experimental y por su amistad.*

*Al Dr. D. Luis San Román del Barrio, por permite formar parte su equipo de investigación desde mi comienzo ha tenido una constante preocupación, tanto por mí como por mi trabajo.*

*A las Doctoras Dña. María José Montero, Dña. María Ángeles Sevilla, Dña. Rosalía Carrón, por su ayuda, sus palabras de aliento, los buenos momentos que compartimos a diario.*

*A la Dra. Mónica García, por su asesoría y entrañable amistad. Con vuestra ayuda y la de mis directoras siempre me he sentido en equipo.*

*A la Dra. Alicia Rodríguez Barbero, por su colaboración en este trabajo.*

*A todos mis compañeros de laboratorio (Cristina, Modar, Catalina, Wassim), que a lo largo de este tiempo me han brindado su apoyo y amistad, en los buenos momentos y en los menos buenos, y con los que he compartido tantas horas de trabajo y también de esparcimiento.*

*A María José Lage, Ana Matas, Manuela Sánchez, Anaïs Holgado. Por su incondicional amistad y cariño durante todos estos años, por los buenos momentos que hemos compartido, por hacerme un huequito en sus vidas.*

*A Javier, Emilia y Bienve por su compañía y aliento.*

*A José Fernando del Servicio de Experimentación Animal, por su ayuda y colaboración en el cuidado y mantenimiento de nuestros animales.*



*A todos los compañeros del Departamento de Fisiología y Farmacología que de alguna manera han hecho posible la realización de mi trabajo.*

*A mi Universidad del Quindío, a sus directivos, mis compañeros de la Facultad de Ciencias de la Salud; a todos que han confiado en mí y me han dado la oportunidad de realizar este trabajo y han hecho posible mi estancia en Salamanca.*

*A Carlos por darme su amor incondicional, por comprenderme, apoyarme, y por tener la virtud de escucharme siempre en este camino de realización profesional y personal.*

*A Carlos Andrés y Beatriz Elena por su compañía, su amor y estímulo en cada momento de mi vida.*

*A mis padres, por haberme animado y apoyado en mis estudios. Por darme todo y hacer de mí lo que soy.*

*A mis hermanos y familia por estar siempre a mi lado, apoyarme en todas las decisiones (acertadas o no tanto), por quererme y demostrármelo cada día,*

*Muchas gracias a todos vosotros, os debo quien soy, y estoy orgullosa de ello.*





---

<b><math>\alpha</math></b> = Receptor $\alpha$ -adrenérgico	<b>PGE<sub>2</sub></b> = Prostaglandina E <sub>2</sub>
<b><math>\beta</math></b> = Receptor $\beta$ -adrenérgico	<b>PGF<sub>2<math>\alpha</math></sub></b> = Prostaglandina F <sub>2<math>\alpha</math></sub>
<b>A</b> = Adrenalina	<b>PGI<sub>2</sub></b> = Prostaciclina
<b>Ac</b> = Adenilatocileclasa	<b>PI</b> = fosfatidilinositol
<b>Ach</b> = Acetilcolina	<b>PIP<sub>3</sub></b> = 3,4,5-fosfatidilinositol trifosfato
<b>AMPc</b> = Adenosín monofosfato cíclico	<b>PKB</b> = Fosfocinasa B
<b>Ang II</b> = Angiotensina II	<b>PKC</b> = Fosfocinasa C
<b>COX</b> = Ciclooxygenasa	<b>PLC</b> = Fosfolipasa C
<b>DA</b> = Dopamina	<b>PAM</b> = Presión arterial media
<b>Da</b> = Dalton	<b>s.c.</b> = Subcutáneo
<b>DM</b> = Diabetes mellitus	<b>SNC</b> = Sistema nervioso central
<b>ECA</b> = Enzima convertidora de angiotensina	<b>STZ</b> = Estreptozotocina
<b>EDCF</b> = Factores constrictores derivados de endotelio	<b>TGF<math>\beta</math><sub>1</sub></b> = Factor de crecimiento tumoral $\beta$ <sub>1</sub>
<b>EDRF</b> = Factores relajantes derivados de endotelio	<b>TPH</b> = Triptófano hidroxilasa
<b>EEG</b> = Electroencefalograma	<b>TXA<sub>2</sub></b> = Tromboxano A <sub>2</sub>
<b>eNOS</b> = Óxido nítrico sintasa endotelial	<b>TXB<sub>2</sub></b> = Tromboxano B <sub>2</sub>
<b>FC</b> = Frecuencia cardíaca	<b>UI</b> = Unidades internacionales
<b>GPCRs</b> = Receptores acoplados a proteínas G	<b>VIP</b> = Péptido intestinal vasoactivo
<b>5-HT</b> = 5-Hidroxitriptamina	<b>VSMC</b> = Células de músculo liso vascular
<b>5-HIAA</b> = Ácido 5-hidroxiindolacético	
<b>5-HTP</b> = 5- Hidroxitriptofano hidrolasa	
<b>HIOMT</b> = Hidroxiindol-O-metiltransferasa	
<b>i.p.</b> = Intraperitoneal	
<b>i.v.</b> = Intravenoso	
<b>i.a.</b> = Intraarterial	
<b>IP<sub>3</sub></b> = Inositol trifosfato	
<b>LAAD</b> = Descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos	
<b>LCF</b> = Líquido cefalorraquídeo	
<b>LSD</b> = Dietilamina del ácido lisérgico	
<b>MAO</b> = Monoaminoxidasas	
<b>MDMA</b> = Metilendioximetanfetamina	
<b>NA</b> = Noradrenalina	
<b>NADPH</b> = Nicotín adenosín difosfato	
<b>NAT</b> = N-acetiltransferasa	
<b>NO</b> = Óxido nítrico	
<b>NOS</b> = Óxido nítrico sintasa	



# **fNDiCE**



---

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>I.1.- 5-Hidroxitriptamina</b>	<b>3</b>
1.- Antecedentes	3
2.- Localización, síntesis y degradación de 5-HT	4
3.- Receptores serotoninérgicos y mecanismos de acción	8
4.- Acciones farmacológicas asociadas a 5-HT	20
5.- Interacción sistema serotoninérgico-adrenérgico-colinérgico	33
<b>I.2.- La Diabetes</b>	<b>37</b>
1.- Páncreas e insulina	40
2.- Complicaciones de la diabetes	42
<b>I.3.- Serotonina, diabetes y sistema cardiovascular</b>	<b>49</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>59</b>
<b>III. ARTICULOS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>63</b>
<b>III.1- 5-Hidroxitriptamina-Sistema adrenérgico</b>	<b>65</b>
<b>Artículo 1</b>	<b>67</b>
1.- Resultados y discusión	77
<b>Artículo 2</b>	<b>83</b>
1.- Resultados y discusión	121
<b>III.2 – 5-Hidroxitriptamina-Sistema colinérgico</b>	<b>127</b>
<b>Artículo 3</b>	<b>129</b>
1.- Resultados y discusión	141
<b>III.3 – 5-Hidroxitriptamina-Territorio Vascular Renal</b>	<b>147</b>
<b>Artículo 4</b>	<b>149</b>
1.- Resultados y discusión	179
<b>IV. CONCLUSIONES</b>	<b>187</b>
<b>V. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>191</b>



# I. iNTRoDVCCiÓN

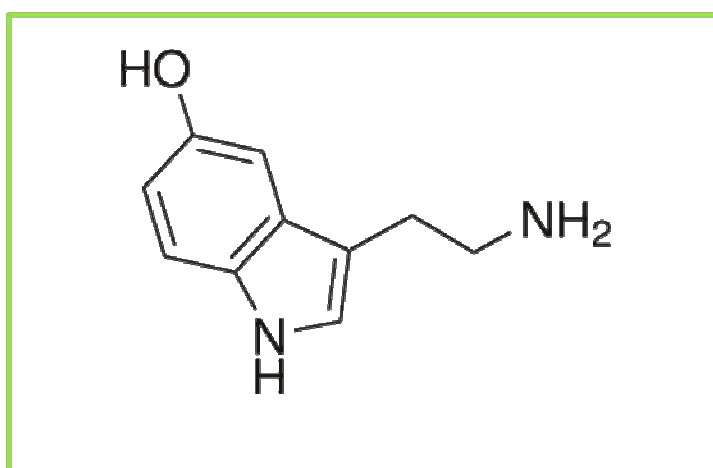




## I.1- 5-HYDROXYTRYPTAMINA (5-HT)

### 1.- Antecedentes.

La serotonina cuyo nombre químico es 3-(2-aminoetil)-1-H-indol-5-ol o 5-hidroxitriptamina (5-HT), y su fórmula química  $C_{10}H_{12}N_2O$  (Figura 1), es una sustancia perteneciente al grupo de las aminas biógenas, con un peso molecular de 176 Da. Actúa como neurotransmisor y como hormona. Está presente en muchas 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.



**Figura 1:** Estructura de la 5-hidroxitriptamina: 3-(2-aminoetil)-1H-indol-5-ol.

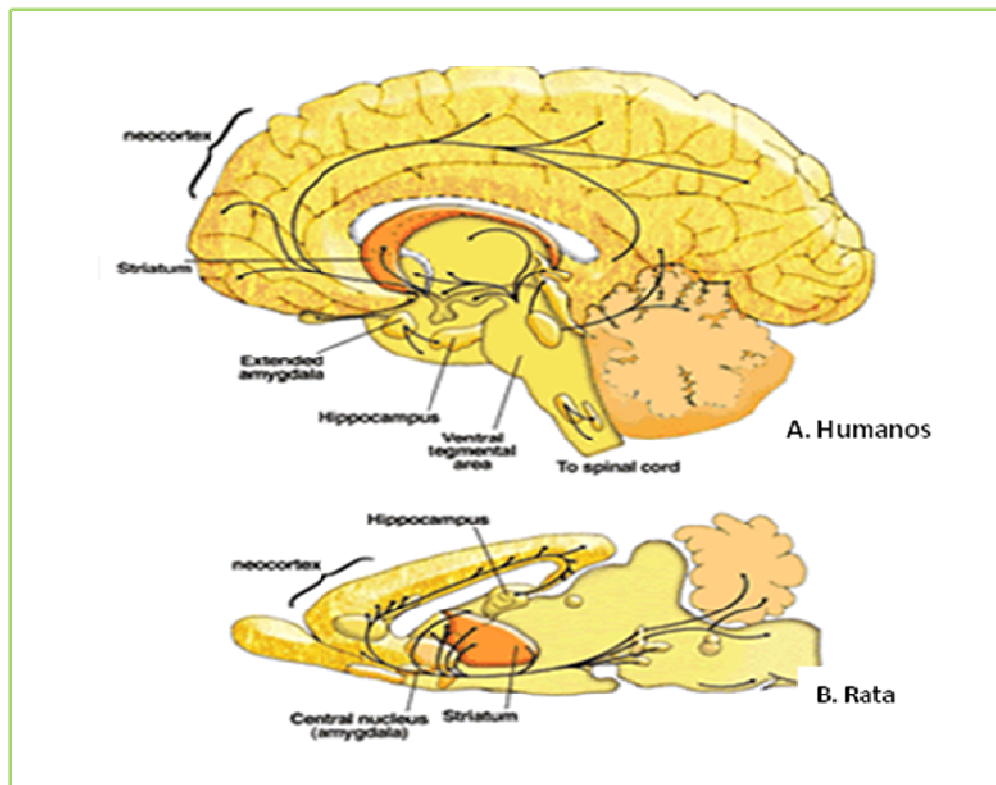
Previamente a la identificación de la serotonina, en un estudio realizado en gato por Brodie (1900) se describió, cómo la inyección de suero sanguíneo causaba vasoconstricción y un reflejo vagal representado por bradicardia e hipotensión, reversibles, así como una parada de la respiración que no se reproducía si se inyectaba plasma.

La 5-hidroxitriptamina, sin embargo, no fue aislada en sangre hasta 1948 siendo caracterizada poco después por Rapport, Page y Green; quienes la aislaron en forma de un complejo cristalino y le dieron el nombre de serotonina, 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.

En 1953 Twarog y Page sugirieron que podría actuar como neurotransmisor a nivel del sistema nervioso central (SNC) y en la actualidad se admite que aunque menos del 5% de la cantidad total de serotonina del organismo reside en el sistema nervioso central, 5-HT es un factor muy importante para el buen funcionamiento del cerebro. Al mismo tiempo 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 la 5-HT era un producto de nuestro cerebro y que tenía importantes efectos conductuales.

## **2.- Localización, síntesis y degradación de 5-HT**

Tiene una amplia distribución en los reinos animal y vegetal. Se puede encontrar en los sistemas neuronales de todos los organismos que van desde la *Drosophila* (Lundell *et al.*, 1996) a los seres humanos (Hornung, 2003). 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).



**Figura 2:** Mapa del cerebro con la ubicación de las células que contienen serotonina y sus axones.

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 (Hills y Jessen, 1995; Walther *et al.*, 2003a; Cote *et al.*, 2003, 2004; Zhang *et al.*, 2004).

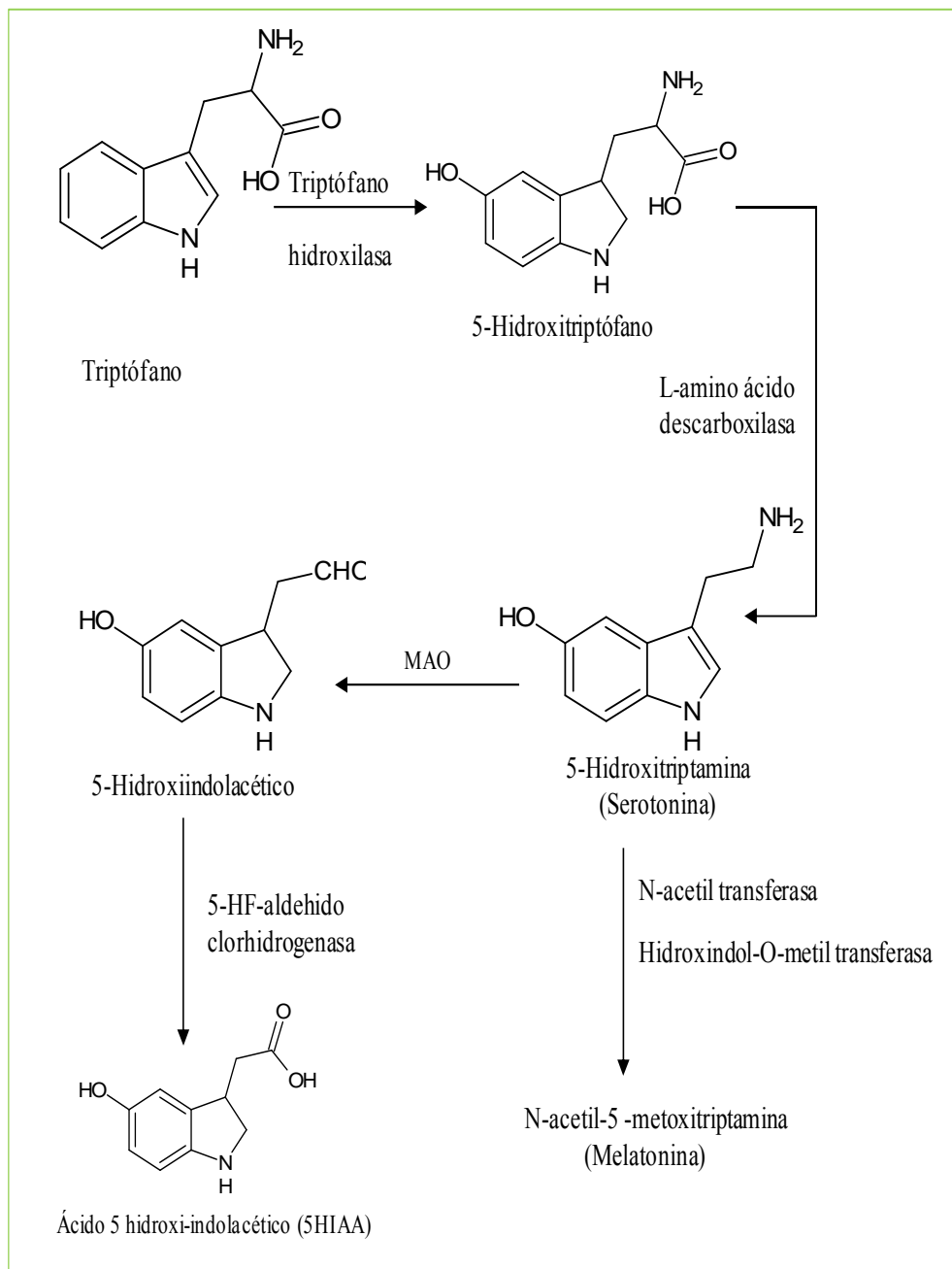
El sistema nervioso central contiene menos del 2% de la serotonina total del organismo (Hills y Jessen, 1995). 5-HT no atraviesa la barrera hematoencefálica, por lo que sus niveles centrales dependen de su síntesis local, siendo el paso inicial de la síntesis, el transporte facilitado del aminoácido 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.

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.

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.

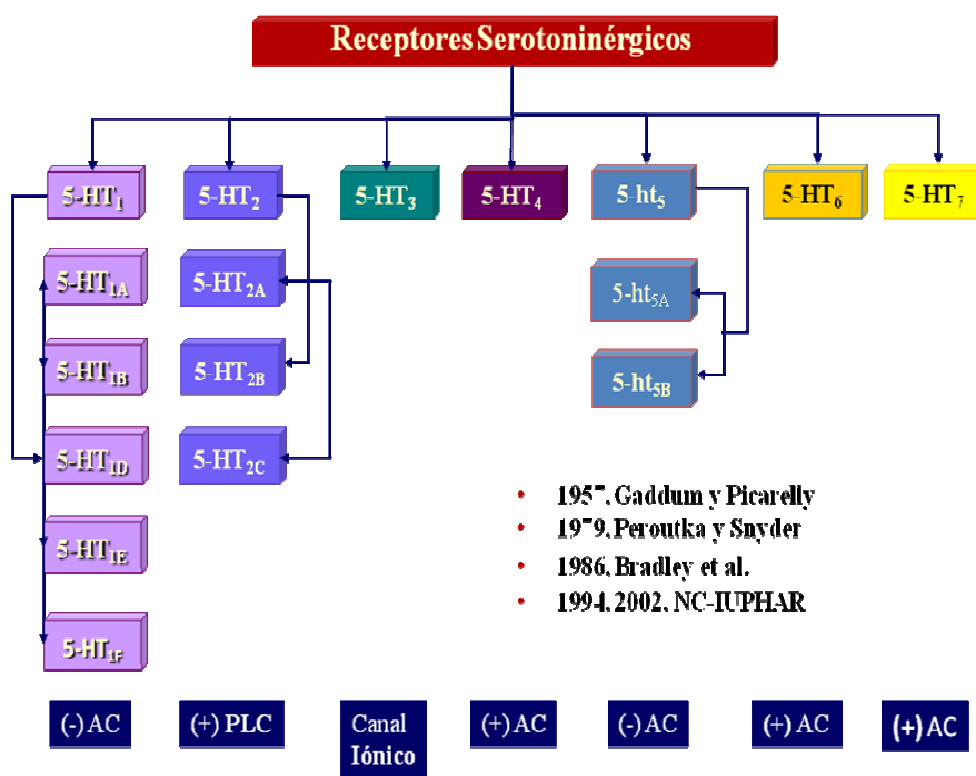
No todas las células que contienen 5-HT, la sintetizan. Las plaquetas no sintetizan 5-HT; acumulan la 5-HT del plasma por un mecanismo de transporte activo que se encuentra en la membrana de las plaquetas. También podemos encontrarla en los mastocitos. En el sistema nervioso, tanto central como periférico, es un neurotransmisor con una gran variedad de receptores, los cuales pueden estar localizados a nivel pre o postsináptico. En la glándula pineal se cree que es el principal precursor de la síntesis de melatonina (Figura 3).



**Figura 3:** Biosíntesis y metabolismo de 5-HT.

### 3.- Receptores serotoninérgicos y mecanismos de acción

La expresión ubicua de los receptores de serotonina en el cuerpo humano permite su papel multifuncional en varios sistemas fisiológicos (Barnes y Sharp, 1999). Se han identificado hasta siete familias principales de receptores (designados como 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5</sub>, 5-HT<sub>6</sub> y 5-HT<sub>7</sub>, Figura 4), denominados así por “The Serotonin Receptor Nomenclature Committee of the Internacional Union of Pharmacology” (NC-IUPHAR) (Hoyer *et al.*, 1994; 2002). Muchos de estos receptores tienen múltiples subtipos (Glennon, 2003; Hannon y Hoyer, 2008). Varios de estos subtipos no tienen reconocida, hasta el momento, una acción fisiológica.



**Figura 4:** Representación esquemática de la clasificación de receptores de 5-HT. 3'-5'-adenosin monofosfato cíclico (AMPe); fosfolipasa C (PLC) (Hoyer *et al.*, 2002).

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 a los receptores de 5-HT fue el publicado por Gaddum y Picarelli en 1957. 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 abolidas por la combinación de ambos compuestos. Dichos autores concluyeron que 5-HT debía actuar a través de dos mecanismos y receptores diferentes: receptores 5-HT-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, permitió la discriminación entre varios tipos de receptores serotoninérgicos, de modo que se especificó la presencia de dos tipos diferentes de receptores (5-HT<sub>1</sub> y 5-HT<sub>2</sub>), según la preferencia de unión, en homogenado de cerebro, por [<sup>3</sup>H]5-HT o por [<sup>3</sup>H]espiperona, respectivamente.

En 1986, se propuso una clasificación y nomenclatura diferente, en la que se distinguían tres subtipos de receptores (Bradley *et al.*, 1986):

a) “5-HT<sub>1</sub>-like” con gran afinidad por 5-carboxamidotriptamina y podían unirse a [<sup>3</sup>H]5-HT.

b) 5-HT<sub>2</sub>, inicialmente denominados y caracterizados como 5-HT-D o musculotrópicos por localizarse en el músculo esquelético, con gran afinidad por ketanserina.

c) 5-HT<sub>3</sub>, 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.

Se han identificado y caracterizado nuevos receptores de 5-HT, que a veces han sido nombrados de diferente forma por distintos grupos de investigación (Levy *et al.*, 1992; Weinshank *et al.*, 1992). Por lo que las nuevas herramientas propias de la biología molecular y su aplicación, junto con las técnicas bioquímicas y funcionales de los últimos años, han llevado 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 Internacional Union of Pharmacology” (NC-IUPHAR) reclasificó los receptores para 5-HT (Hoyer *et al.*, 1994; 2002) en función de:

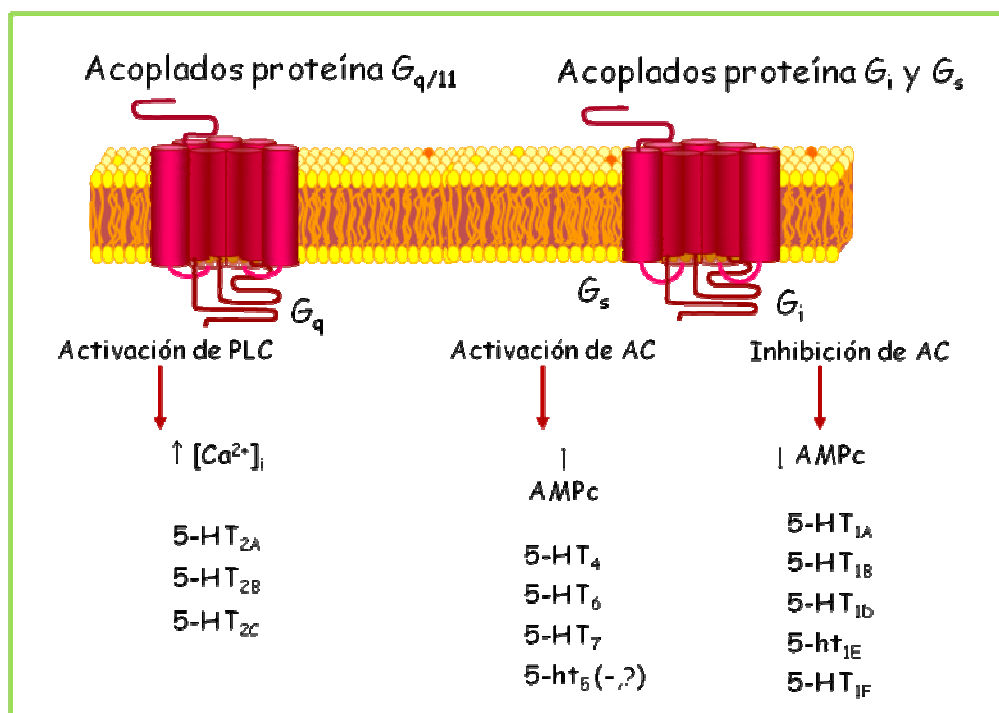
- La estructura molecular (secuencias en la estructura de los genes y receptores para sus componentes de, nucleótidos y aminoácidos, respectivamente).
- El mecanismo de acción y características transduccionales (segundos mensajeros sintetizados de manera subsecuente a la interacción ligando-receptor).
- Su mayor o menos afinidad por la serotonina y criterios operacionales (perfil farmacológico mediante el empleo de agonistas y antagonistas selectivos) (IUPHAR receptor data base, Hoyer *et al.*, 2002, Hannon y Hoyer, 2008).

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. 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 (Hoyer *et al.*, 1994). Aquellos que no cumplan con estos criterios se nombrarán con letras minúsculas.



Básicamente todos los receptores de serotonina, a excepción de los receptores 5-HT<sub>3</sub> (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 (Iismaa *et al.*, 1995). 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 ( $\alpha$ -hélices) de la proteína, hecho que ya se ha observado por técnicas de mutagénesis y receptores quiméricos (Oksenberg *et al.*, 1992; Adham *et al.*, 1994; Wurch *et al.*, 1998).

Los receptores de 5-HT activan, bien a la enzima adenilato ciclasa [que promueve la producción de adenosin monofosfato cíclico (AMP<sub>c</sub>)], la fosfolipasa C [que promueve la producción de inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>)] y aumenta el calcio intracelular [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>] o bien a canales iónicos (como por ejemplo canales de potasio) (Figura 5 y 6). Todos estos sistemas efectores están presentes en todas las células, y por tanto las 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 (Birnbaumer *et al.*, 1990).



**Figura 5:** Estructura del receptor serotonérgico acoplado a proteínas G con siete dominios transmembrana (Hoyer *et al.*, 2002).

### 3.1.- Receptores 5-HT<sub>1</sub>

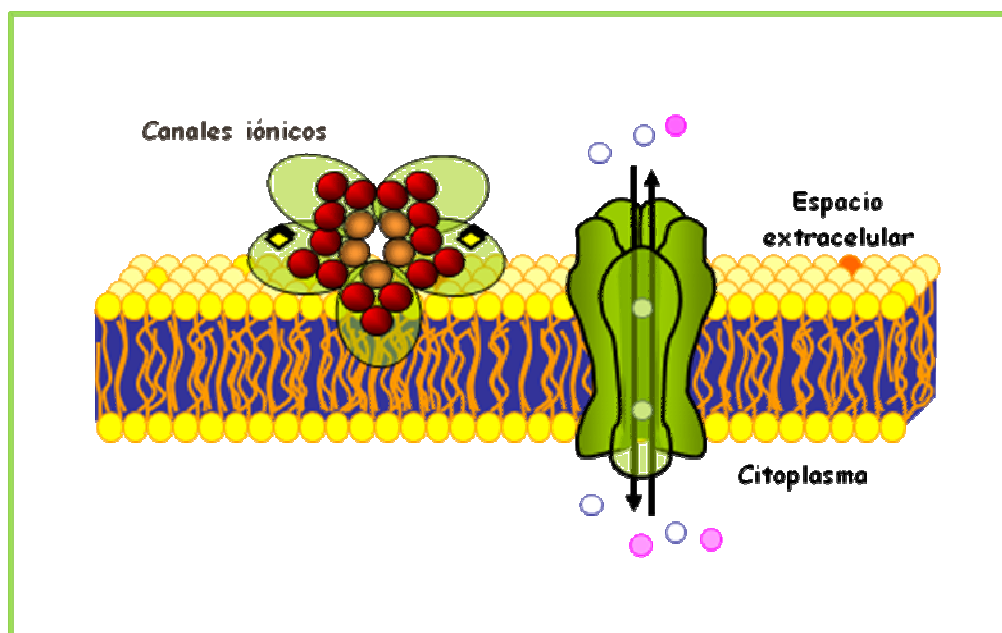
Los receptores 5-HT<sub>1</sub> comprenden cinco subtipos diferentes de receptores, que comparten entre 41-63% de la secuencia genética, y están acoplados a proteínas G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub> que inhiben la formación de cAMP. Uno de ellos es el receptor 5-ht<sub>1E</sub>, cuya denominación en minúscula 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<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> y 5-HT<sub>1D</sub> han sido encontrados en una gran variedad de tejidos. Existen agonistas y antagonistas específicos para 5-HT<sub>1A</sub> y en la actualidad se están desarrollando nuevos compuestos capaces de discriminar entre los subtipos 5-HT<sub>1B</sub> y 5-HT<sub>1D</sub>, 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<sub>1B</sub> y 5-HT<sub>1D</sub> debido a que 5-HT<sub>1B</sub>, en estas especies, exhibe una farmacología única como resultado de una mutación en ASP<sub>123</sub>/ARG<sub>123</sub>. Los receptores 5-HT<sub>1A</sub> inhiben la descarga de las neuronas serotonérgicas así como la liberación de serotonina (IUPHAR receptor database; Pauwels, 2000, Tabla 1).

### **3.2.- Receptores 5-HT<sub>2</sub>**

Esta familia comprende tres subtipos de receptores diferentes, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> y 5-HT<sub>2C</sub> que comparten entre 46-50% de su secuencia genética, y se acoplan preferentemente a G<sub>q/11</sub> para aumentar la hidrólisis de IP<sub>3</sub> y aumentar el Ca<sup>2+</sup> citosólico. De estos tres subtipos, los receptores 5-HT<sub>2B</sub> y 5-HT<sub>2C</sub> tienen una mayor afinidad por 5-HT que cualquiera de los otros receptores identificados hasta hoy. Aunque en la actualidad ya hay disponibles antagonistas selectivos para cada uno de los subtipos, los agonistas no son verdaderamente selectivos (Tabla 2).

### **3.3.- Receptores 5-HT<sub>3</sub>**

El receptor 5-HT<sub>3</sub> 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  $\alpha$  y  $\beta$  en las que sólo un 41% de la secuencia se ha clonado, considerándose también la posibilidad de que sean estructuras heteropentámicas. La subunidad  $\alpha$  ha sido clonada de humanos, ratas y ratones y muestra similitud con el receptor nicotínico de acetilcolina (Tabla 3).



**Figura 6:** Estructura del receptor serotoninérgico 5-HT<sub>3</sub>. (Hoyer *et al.*, 2002).

### 3.4.- Receptores 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5</sub>, 5-HT<sub>6</sub> y 5-HT<sub>7</sub>

Todos ellos se unen preferentemente a proteínas G<sub>s</sub> 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-HT<sub>4</sub> (Tabla 3), así como agonistas y antagonistas selectivos de receptores 5-HT<sub>6</sub> y 5-HT<sub>7</sub> (Tabla 4).

Para el subtipo de receptores 5-HT<sub>5</sub>: 5-HT<sub>5A</sub> y 5-HT<sub>5B</sub> comparten más del 70% de la secuencia aminoacídica en roedores. En los seres humanos, el receptor 5-HT<sub>5A</sub> se expresa exclusivamente en el sistema nervioso central, principalmente en la corteza, el hipocampo y el cerebelo (Grailhe *et al.*, 2001). El receptor 5-HT<sub>5B</sub> no codifica ninguna proteína funcional en los seres humanos. La función precisa de los receptores 5-HT<sub>5</sub> no se conoce, sin embargo, puede presuponerse que los receptores 5-HT<sub>5A</sub> 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<sub>5A</sub> muestran una mayor actividad locomotora y comportamiento exploratorio (Grailhe *et al.*, 2001).

Existen ciertas evidencias que sugieren que los receptores 5-HT<sub>6</sub> desempeñan un papel en la cognición, el aprendizaje, el control del apetito y los trastornos convulsivos (Glennon, 2003). Se expresan en varias áreas del cerebro humano, predominando en el núcleo caudado (Kohen *et al.*, 1996).

Existen algunos receptores de 5-HT, 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 en arterias coronaria de cerdo y despolarización lenta de las neuronas mientérica), pero no se correlacionan con ninguno de los anteriormente descritos (Hoyer *et al.*, 1994, 2002; Martin, 1994; Saxena *et al.*, 1998; Villalón *et al.*, 1997; Villalón y Centurión, 2007). Como su estructura es desconocida, estos receptores se denominan huérfanos en la nomenclatura actual. Uno de estos tipos, sin embargo, es el denominado “5-HT<sub>1-like</sub>” que produce vasodilatación y que se corresponde con los 5-HT<sub>7</sub>.

Desde que en 1994, Hoyer *et al.* propusieron la clasificación de receptores para serotonina en la que se basa la actual realizada por la IUPHAR, el conocimiento de estos receptores ha evolucionado, como es el caso de los receptores 5-HT<sub>1P</sub>, que están presentes en intestino y cuya farmacología es similar a la de los 5-HT<sub>4</sub>, pero que a diferencia de estos últimos son activados por ligandos como los dipéptidos serotoninérgicos (Hannon y Hoyer, 2002).

Del mismo modo, también se ha determinado la existencia de diferentes isoformas producidas por modificaciones transduccionales, así han aparecido hasta 7 isoformas funcionales del receptor 5-HT<sub>2C</sub>, cuatro variantes funcionales del receptor 5-HT<sub>7</sub> (5-HT<sub>7(a)</sub>-5-HT<sub>7(d)</sub>) y cuatro variantes funcionales para el receptor 5-HT<sub>4</sub> (5-HT<sub>4(a)</sub>-5-HT<sub>4(d)</sub>). 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.

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.

<i>Tipo Receptor</i>	<b>5-HT<sub>1</sub></b>					
<i>Subtipo</i>	<b>5-HT<sub>1A</sub></b>	<b>5-HT<sub>1B</sub></b>	<b>r5-HT<sub>1B</sub></b>	<b>5-HT<sub>1D</sub></b>	<b>5-ht<sub>1E</sub></b>	<b>5-ht<sub>1F</sub></b>
<i>Nombre previo</i>	–	5-HT <sub>1Dβ</sub>	–	5-HT <sub>1Dα</sub>	5-HT <sub>1Eα</sub>	5-ht <sub>1Eβ</sub>
<i>Localización</i>	Neuronal: hipocampo, núcleo del rafe	SNC, nervios periféricos VSMC	–	SNC	SNC	SNC
<i>Funciones</i>	Cambios conductuales, hipotensión central	Vasoconstricción, Inhibición trigeminal	Vasoconstricción Auto/Heterorreceptor	Heterorreceptor en aurícula humana	No establecidas	Inhibición trigeminal
<i>Agonistas selectivos</i>	8-OH-DPAT Indorrenato	5-CT> 5-HT> Sumatriptan	CP-93129	PNU1426-33 L694,247	5-HT	Sumatriptan LY344864
<i>Antagonistas selectivos</i>	WAY-100,635	SB224289	GR127935, Cianopindolol	GR127935 BRL15572	Metiotepina	Metisergida
<i>Mecanismo de transducción</i>	Gi/Go (-) Ac Disminución AMPc, cambio en el potencial de membrana					

**Tabla 1:** Clasificación de receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1</sub>, (VSMC = células de músculo liso vascular, SNC = Sistema nervioso central, Ac=Adenilatociclasa).

<b>Tipo Receptor</b>	<b>5-HT<sub>2</sub></b>		
<b>Subtipo</b>	<b>5-HT<sub>2A</sub></b>	<b>5-HT<sub>2B</sub></b>	<b>5-HT<sub>2C</sub></b>
<b>Nombre Previo</b>	D	5-HT <sub>2F</sub>	5-HT <sub>1C</sub>
<b>Localización</b>	Musculatura lisa vascular, plaquetas, SNC, tracto gastrointestinal	Musculatura lisa de íleon, fundus de rata, útero y endotelio	SNC
<b>Funciones</b>	Vasoconstricción agregación plaquetaria, broncoconstricción	Contracción fundus en rata y vasodilatación endotelio dependiente vía NO	Posible participación en la producción de transferrina, erección y regulación del LCF
<b>Agonista selectivos</b>	$\alpha$ -Metil-5-HT, DOI	BW723C86	RS127445 Rauwolscina
<b>Antagonistas selectivos</b>	Ketanserin MDL 100907	SB200646 SB2044741 RS127445	RO-60-0491 Mesulergina SB242084
<b>Mecanismo de transducción</b>	Gq/G <sub>11</sub> (+) PLC Incrementa hidrólisis de PI y eleva [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>		

**Tabla 2:** Clasificación de receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2</sub>, (PI, Fosfatidil inositol, SNC = sistema nervioso central, NO = Oxido nítrico, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> = calcio intracelular, LCF=Líquido cefalorraquídeo, PLC=Fosfolipasa C).

<i>Tipo Receptor</i>	<b>5-HT<sub>3</sub></b>	<b>5-HT<sub>4</sub></b>
<i>Nombre Previo</i>	M	---
<i>Localización</i>	Periferia, SNC	Tracto gastrointestinal, SNC, corazón y vejiga urinaria
<i>Funciones</i>	Neuroexcitación simpática y parasimpática, provoca emesis	Relajación musculatura lisa (esofágica y gastrointestinal), incrementa la amplitud EEG
<i>Agonistas Selectivos</i>	SR57227 m-Clorofenilbiguanida	BIMU8 ML1030 RS67506
<i>Antagonistas Selectivos</i>	Ganisetron Ondansetron Tropisetron	GR113808 SB 204070
<i>Mecanismo de transducción</i>	Asociado canales iónicos Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPasa	Gs (+) Ac Incrementa la formación AMPc

**Tabla 3:** Clasificación de receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>4</sub>, (EEG = electroencefalograma, SNC = sistema nervioso central, AMPc = adenosin monofosfato cíclico, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa = sodio potasio ATPasa, Ac=Adenilatociclasa).



<i>Tipo Receptor</i>	<b>5-ht<sub>5</sub></b>		<b>5-HT<sub>6</sub></b>	<b>5-HT<sub>7</sub></b>
<i>Subtipo</i>	<b>5-ht<sub>5a</sub></b>	<b>5-ht<sub>5b</sub></b>		
<i>Nombre Previo</i>	5-HT <sub>5A</sub>	5-HT <sub>5B</sub>		5-HT <sub>1-like</sub> 5-HT <sub>X</sub>
<i>Localización</i>	SNC	SNC	SNC	SNC, musculatura vascular lisa y gastrointestinal, ganglios simpáticos
<i>Funciones</i>	Simpatoinhibición cardiaca	No establecidas	Posible modulación liberación de Ach en SNC Consolidación de la memoria	Relajación musculatura lisa de vasos sanguíneos y tracto gastrointestinal
<i>Agonistas selectivos</i>	5-HT, Ergotamina	5-HT, Ergotamina	5-MeOT ≥ 5-HT >5-CT	5-CT > 5-HT >5-MeOT LY-215840
<i>Antagonistas selectivos</i>	LSD, 5-CT, SB-699 551-A	LSD, 5-CT, SB-699 551-A	Ro04-6790 SB-357 134 SB- 399 885	Mesulergina Clozapina SB-258719
<i>Mecanismo de transducción</i>	(-) Ac Disminución AMPc		G <sub>s</sub> (+) Ac Aumento del AMPc	

**Tabla 4:** Clasificación de receptores serotoninérgicos 5-ht<sub>5</sub>, 5-ht<sub>6</sub> y 5-HT<sub>7</sub>. (SNC = sistema nervioso central, Ach = acetilcolina, Ac=Adenilatociclasa)

#### **4.- 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), la conducta sexual (ejerce efecto inhibitorio de la liberación hipotalámica de gonadotropinas) y la regulación de la temperatura corporal. 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 (Bellivier *et al.*, 1998; Lucki, 1998; Mann *et al.*, 2001; Cote, 2004):

- Ciclo de sueño y vigilia: el control de este ciclo es una de las primeras acciones que se identificó para 5-HT. Se sabe que el ritmo sueño-vigilia está regulado por el balance adrenérgico-serotonérgico, y que por ejemplo, la administración de antagonistas 5-HT<sub>2</sub>, como la ritanserina y EMD 281014, aumentan el sueño de ondas lentas.
- Trastornos psiquiátricos: La serotonina ha sido implicada en la fisiopatología de los trastornos psiquiátricos que van desde la depresión, ansiedad, trastornos obsesivo-compulsivos hasta trastornos de la alimentación y dependencia (Bellivier *et al.*, 1998; Lucki, 1998, Mann *et al.*, 2001; Jonnakuty y Gragnoli, 2008). Es conocido que niveles plasmáticos de triptófano son significativamente menores en los sujetos con depresión en comparación con sujetos sanos (Coppin *et al.*, 1973; Cowen *et al.*, 1989). Además, estudios en humanos han demostrado que la disminución del triptófano en el cerebro disminuye los niveles centrales de serotonina e induce depresión en cuestión de horas (Lam *et al.*, 1996). Así,

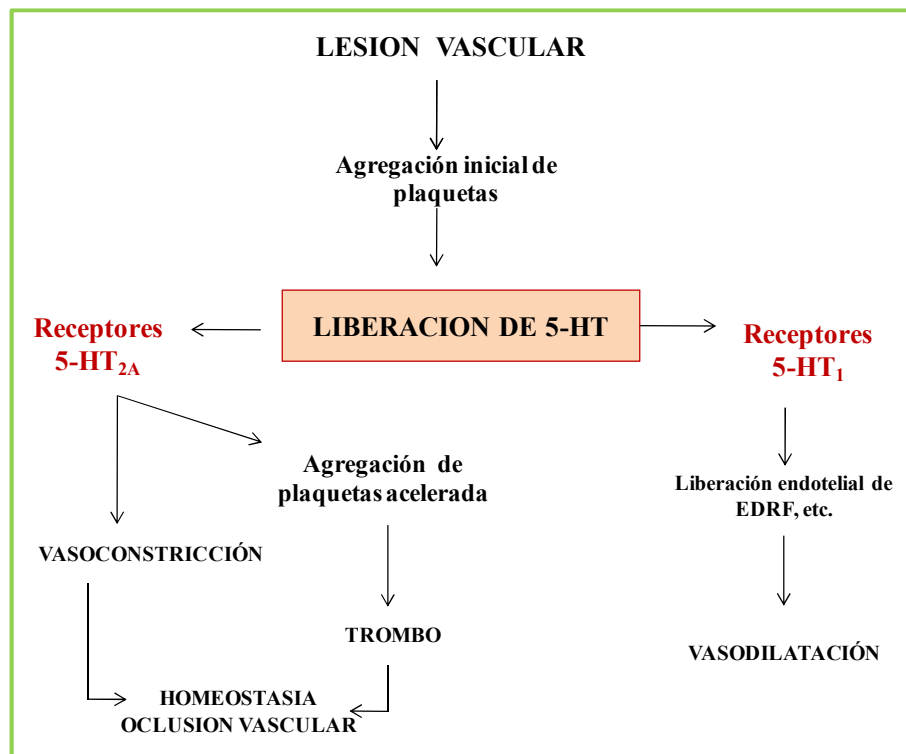
precursores de serotonina, como el L-triptófano, y el 5-hidroxitriptofano (5-HTP) se han utilizado en el tratamiento de estos trastornos basándose en la premisa de que la deficiencia de serotonina a nivel central es la causa subyacente en la depresión (Turner *et al.*, 2006). En la década de los 70-80, varios estudios se llevaron a cabo, en ellos pacientes deprimidos fueron tratados con precursores de serotonina, como el L-triptófano, y 5-HTP. Sin embargo, la eficacia de estos tratamientos no ha sido bien establecida (Meyers, 2000).

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 (Giacalone *et al.*, 1968; Brown *et al.*, 1982; Mehlman *et al.*, 1994). En ratones knock-out del receptor 5-HT<sub>1A</sub> se observó una mayor tendencia a evitar nuevos ambientes, al miedo y a 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 (Parks *et al.*, 1998). Se sugirió que estos efectos pueden deberse a la disminución de la densidad de los receptores 5HT<sub>1A</sub> ya que estos ratones tenían niveles normales de 5-HT y 5-HIAA (Ramboz *et al.*, 1998). Además, los agonistas del receptor 5-HT<sub>1A</sub> han demostrado un potente efecto antiagresivo en roedores y animales agresivos (Moechars *et al.*, 1998; De Boer y Koolhaas, 2005; Jonnakuty y Gragnoli, 2008).

- **Apetito:** 5-HT es el principal mediador inhibitorio del núcleo hipotalámico ventro-medial que regula la ingesta y la saciedad. La hiperserotonergia produce anorexia y la hiposerotonergia exceso de peso (Kaye, 2008; Kumar *et al.*, 2010).
- **Temperatura, funciones endocrinas** [secreción de ACTH, hormonas gonadotropas, hormona del crecimiento y prolactina (5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>)], sensibilidad dolorosa (5-HT<sub>1</sub>), la posición y reflejo postural (5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>), y control central de la actividad emética (5-HT<sub>3</sub>), entre otras funciones, están reguladas por receptores serotoninérgicos (Florez *et al.*, 2008; Hodges y Richerson, 2010).

A nivel periférico también está implicada en la actividad de diversos órganos y sistemas, como son el aparato respiratorio, el sistema gastrointestinal, favorece la agregación plaquetaria y participa en la hemostasia y puede favorecer la liberación de neurotransmisores y estimular terminaciones nerviosas sensitivas:

- **Agregación plaquetaria:** La mayor parte de la serotonina circulante se transporta en los gránulos densos de las plaquetas (Maurer-Spurej *et al.*, 2004). 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-HT<sub>2</sub> y 5-HT<sub>3</sub>. 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 NO y agente relajante endotelio-dependiente (EDRF). El efecto resultante de la liberación de esas sustancias en las células musculares lisas se traduce en vasoconstricción o vasodilatación (Maurer-Spurej *et al.*, 2004). 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 (Maurer-Spurej *et al.*, 2004), sin embargo serotonina puede controlar sus propiedades vasoconstrictoras mediante la liberación del NO (Figura 7). Estudios recientes en ratones knock-out para la triptófano-hidroxilasa 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. (Walther *et al.*, 2003b). En estos ratones la estructura plaquetaria y su capacidad de adhesión no está modificada pero, esta última sí se encuentra disminuida.



**Figura 7:** Esquema de actuación de 5-HT tras ser liberada ante una lesión vascular.

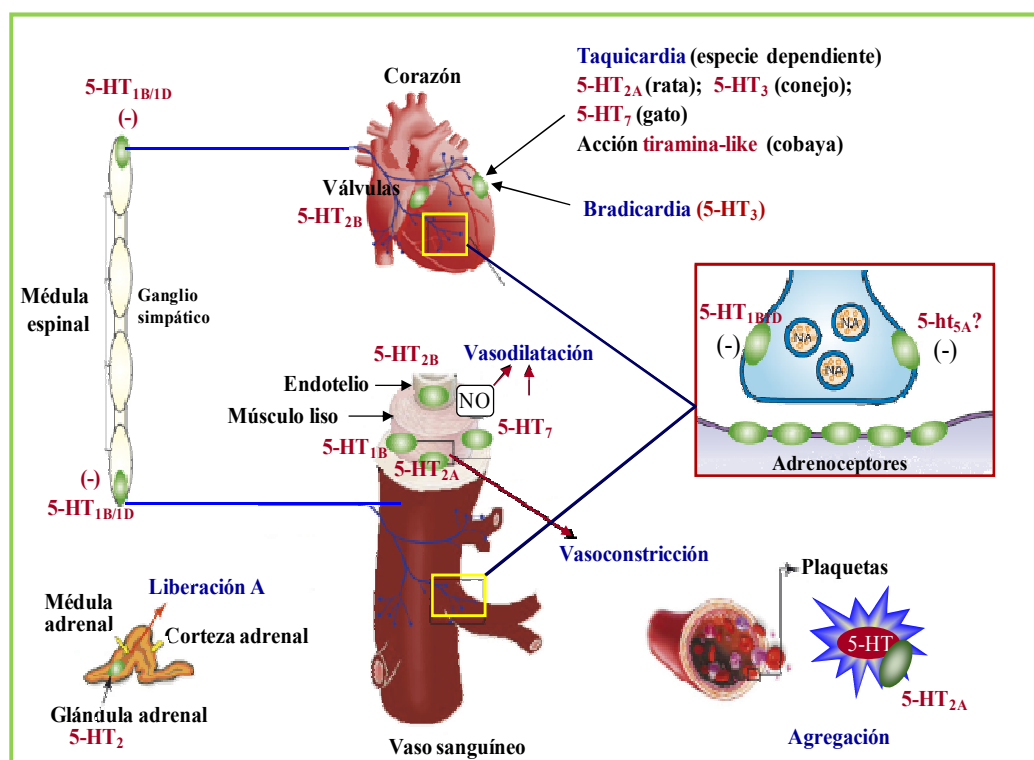
- Tracto gastrointestinal: El 95% de la serotonina se sintetiza dentro de las células enterocromafines del tracto gastrointestinal (Gershon, 1999), donde juega un papel importante como molécula de señalización (Bulbring y Crema, 1958). La serotonina es liberada desde estas células como respuesta a la acetilcolina y estimulación nerviosa simpática, aumentando la presión intraluminal y disminuyendo el pH (Bulbring y Lin, 1958). La serotonina activa los reflejos neuronales y juega un rol vital en la secreción intestinal, en la saciedad y en el peristaltismo. Los sensores neuronales intrínsecos y extrínsecos son activados a través de varios receptores de 5-HT localizados en el axón de las neuronas sensoriales. Las neuronas sensoriales intrínsecas se unen dentro de la pared del tracto gastrointestinal y su activación origina un reflejo peristáltico y secretor (Bulbring y Crema, 1958; Bulbring y Lin, 1958). Las neuronas extrínsecas se unen fuera de la pared gastrointestinal y permiten comunicaciones entre el cerebro y tracto gastrointestinal, vía simpática y parasimpática (Stephen *et al.*,

2006). El rol de la serotonina en el reflejo aferente extrínseco se relaciona con náuseas, vómitos, sensación de dolor, y molestias en el tracto gastrointestinal. El papel preciso de 5-HT en la fisiología gastrointestinal normal no está totalmente dilucidado. Por lo tanto, el papel de 5-HT en los desórdenes de la fisiopatología gastrointestinal, como la inflamación intestinal y el síndrome de intestino irritable es controvertido y está aún bajo investigación intensa. Cabe destacar que el síndrome carcinoide, determinado por hipersecreción tumoral de serotonina, suele causar diarrea (Thorson, 1958; Grahame-Smith, 1967).

- **Metabolismo del hueso:** Existen evidencias que relacionan la regulación neuronal del metabolismo del hueso con vías serotoninérgicas. Recientemente, han descubierto que el osteoblasto primario, el osteocito y el fibroblasto periosteal poseen receptores para 5-HT (Westbroek *et al.*, 2001). Estudios moleculares demuestran que 5-HT puede estimular la hormona paratiroidea mediante el aumento de la actividad de la fosfatasa alcalina (Bliziotis *et al.*, 2001). También han descubierto que los osteoblastos y los osteocitos tienen transportadores de 5-HT. Estos hallazgos en conjunto sugieren que las células óseas tienen vías funcionales serotoninérgicas (Jonnakuty y Gragnoli, 2008).
- **Metabolismo de la glucosa:** Algunos estudios sugieren que la serotonina induce hiperglucemia (Wozniak y Linnoila, 1991), otros, sin embargo han demostrado que la serotonina disminuye la concentración sanguínea de glucosa (Furman y Wilson, 1980; Yamada *et al.*, 1989). 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<sub>2A</sub>, que se expresa tanto en ratas (Guillet-Deniau *et al.*, 1997) como en músculo esquelético humano. La activación de este receptor induce una absorción rápida de glucosa (Hajduch *et al.*, 1999), 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 (Smith y Pogson, 1977). Además, los miotúbulos expuestos a la serotonina no

muestran aumentos en la 3,4,5-fosfatidilinositol trifosfato (PIP3) o la proteína-quinasa B (PKB), los cuales están significativamente elevados en presencia de insulina (Hajduch *et al.*, 1999; Jonnakuty y Gagnoli, 2008). Recientemente se ha demostrado que 5-HT regula la secreción de insulina por acoplamiento covalente a GTPasas dentro de los gránulos de las células  $\beta$ -pancreáticas. (Paulmann *et al.*, 2009). Lustman y colaboradores observaron que los niveles de serotonina aparecen bajos en pacientes diabéticos de tipo 1, especulando en cuanto a si tal deficiencia podría contribuir a la mayor incidencia de trastornos afectivos (Lustman *et al.*, 1986) y neuropsiquiátricos (Ryan *et al.*, 1985) en la diabetes (Herrera *et al.*, 2003). En un estudio posterior se demuestra que la fracción libre de L-triptófano es baja en niños con diabetes tipo 1, además se postula una deficiencia en serotonina central y el aumento de la incidencia de los enfermedades psiquiátricas en pacientes diabéticos tipo 1 (Herrera *et al.*, 2003). Las ratas con diabetes tipo 1 inducida por estreptozotocina (STZ) muestran un bajo nivel de serotonina central con un aumento de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2</sub> en el cerebro (Sandrini *et al.*, 1997).

- Acciones a nivel cardiovascular: La serotonina funciona como una neurohormona en el sistema cardiovascular y sus respuestas son complejas. Desempeña un papel importante en la agregación plaquetaria, la regulación del tono vascular y una variedad de funciones cardíacas, que pueden incluir bradicardia o taquicardia, hipotensión o hipertensión, vasodilatación o vasoconstricción. Estas respuestas 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, la dosis del agonista empleado, las condiciones experimentales y en mayor grado, la naturaleza de los receptores involucrados (5-HT<sub>1</sub> al 5-HT<sub>7</sub>), así como la posibilidad de que aparezcan acciones reflejas o directas (Saxena *et al.*, 1987; Bagdy *et al.*, 1989; Villalón *et al.*, 1997; Morán *et al.*, 1998; Miranda *et al.*, 2000; Villalón y Centurión, 2007; Sánchez-López *et al.*, 2009).



**Figura 8:** Efectos cardiovasculares periféricos de 5-HT (Adaptado de Ramage y Villalón, 2008)

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 cronotrópico e inotrópico en el sistema cardiovascular (Ramage, 2001; Cote *et al.*, 2004; Ramage y Villalón, 2008). Estos efectos están mediados a través de familias de receptores 5-HT<sub>1</sub>, 5HT<sub>2</sub> y 5-HT<sub>3</sub> (Cote *et al.*, 2004; Villalón y Centurión, 2007; Ramage y Villalón, 2008). La activación de receptores 5-HT<sub>1A</sub> pueden causar inhibición simpática central y bradicardia (Ramage, 2001; Ramage y Villalón, 2008), mientras que la activación del receptor 5-HT<sub>2A</sub> media estimulación simpática que conduce a un aumento de la presión arterial y taquicardia (Ramage, 2001; Jones y Blackburn, 2002; Yusuf *et al.*, 2003) (Figura 8).



Receptores 5-HT<sub>3</sub> median lo que se conoce como el reflejo de Von Bezold-Jarish en humanos. El reflejo se produce cuando los receptores 5-HT<sub>3</sub> 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 (Ramage, 2001; Jones y Blackburn, 2002; Yusuf *et al.*, 2003).

Otros mecanismos bradicardizantes incluyen la inhibición simpática cardíaca por los receptores presinápticos 5-HT<sub>1B/1D</sub> y, en el caso de la rata, con un componente adicional de participación de receptores 5-HT<sub>5A/5B</sub> (Morán *et al.*, 1994a; Villalón *et al.*, 1998; Sánchez-López *et al.*, 2003).

Los receptores 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub>, 5-HT<sub>4</sub> y 5-HT<sub>7</sub> están presentes en las células vasculares del músculo liso y células endoteliales (Nilsson *et al.*, 1999). 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 (Nilsson *et al.*, 1999). Sin embargo, el receptor/es responsables estas acciones aún no está clarificado.

La activación de receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2</sub> localizados a nivel de músculo liso, como ocurre en la mayor parte de los grandes vasos, origina vasoconstricción, hecho ampliamente demostrado ya que su inhibición antagoniza dicha vasoconstricción (Gradin *et al.*, 1986); en cambio, los localizados a nivel endotelial originan vasodilatación como han demostrado algunos autores (Vanhoutte 1987a, 2000; Cote *et al.*, 2004; Ramage y Villalón, 2008) quienes proponen para esta vasodilatación, mecanismos serotoninérgicos que inducen liberación del factor relajante endotelial.

Serotonina media efectos inotrópico y cronotrópico positivos a través de los receptores 5-HT<sub>4</sub> presentes en los miocitos cardíacos (Cote *et al.*, 2003, 2004). Ratones knock-out para la triptófano hidroxilasa 1 (TPH 1), que desarrollan miocardiopatía, muestran concentraciones de serotonina que oscilan del 4-8% respecto a los normales (Cote *et al.*, 2003), no observándose, sin embargo

alteraciones morfológicas cardiacas en estos ratones; a diferencia de los ratones Knock-out para el receptor 5HT<sub>2B</sub>, que desarrollan defectos morfogenéticos cardiacos que conducen a la muerte embrionaria o neonatal (Nebigil *et al.*, 2000).

Se reconoce para esta amina biógena cierto papel en la regulación y control de los niveles de presión arterial, al menos a nivel central (Villalón y Centurión, 2007; Ramage y Villalón, 2008), habiéndose visto que la activación de determinados receptores, como son los 5-HT<sub>1A</sub> 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 (Vanhoutte, 1983), como pueden ser la hipertensión sistémica pulmonar y la enfermedad periférica vascular (Frishman y Grewall, 2000).

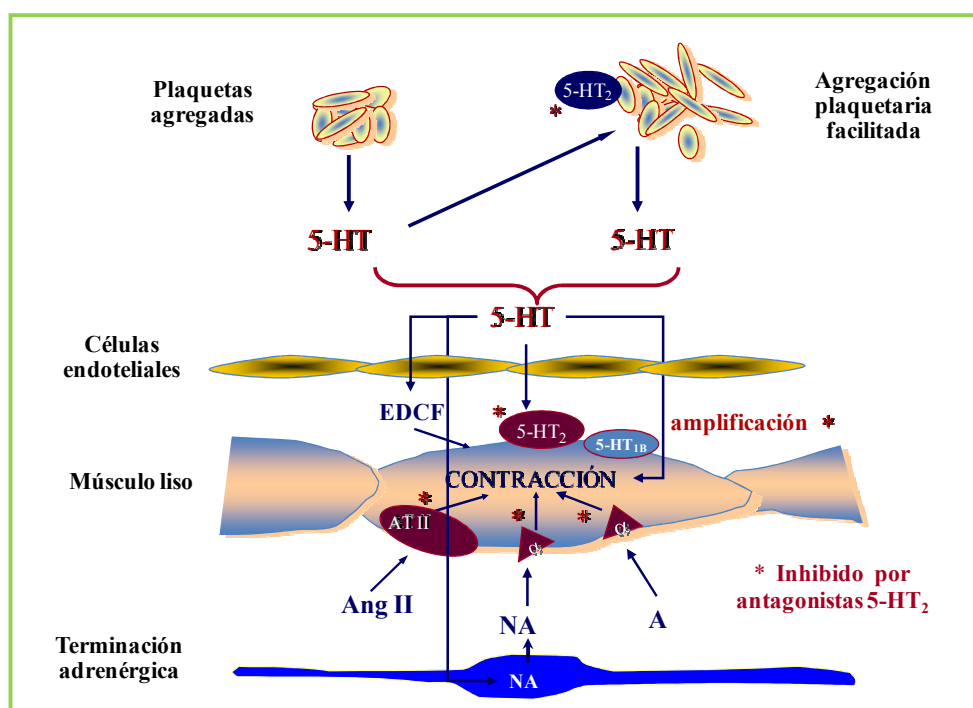
En condiciones *in vitro*, serotonina es capaz de provocar contracción de la mayor parte de los grandes vasos de conductancia, pero con diferencias en la sensibilidad; de este modo, podemos decir que las arterias cerebrales y coronarias son las que originan una mayor respuesta ante la activación serotoninérgica; en cambio, en microcirculación, el efecto constrictor directo de serotonina aparece sobre todo a nivel de vénulas (Altura, 1981); 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 (Van Nueten *et al.*, 1985a,b) (Figura 9).



**Figura 9:** Estructura de los vasos sanguíneos y receptores serotoninérgicos en las diferentes capas.

Se han descrito acciones constrictoras de 5-HT provocadas por la activación directa a nivel del músculo liso vascular de receptores 5-HT<sub>1</sub> o 5-HT<sub>2</sub> (Van Nueten *et al.*, 1985a; Feniuk y Humphrey, 1989), por activación de los receptores adrenérgicos (Vanhoutte *et al.*, 1981; Villalón y Centurión, 2007), o de otros agentes vasoconstrictores como angiotensina II o prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) (Van Nueten *et al.*, 1985a,b; Frishman *et al.*, 1995). Algunos estudios muestran que en humanos, en las arterias coronarias, se expresan en gran cantidad los receptores 5-HT<sub>2</sub> y 5-HT<sub>1B</sub>, moderadamente los receptores 5-HT<sub>1F</sub> y 5-HT<sub>1A</sub>, mientras que hay una baja expresión de los receptores 5-HT<sub>1D</sub> (Nilsson *et al.*, 1999); y en las arterias cerebrales (arteria temporal y occipitales) se expresan receptores 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub>, 5-HT<sub>4</sub> y 5-HT<sub>7</sub>; en ambos casos, estudios farmacológicos han mostrado que las respuestas vasoconstrictoras están mediadas a través de los receptores 5-HT<sub>1B</sub> y 5-HT<sub>2A</sub> (Kaumann *et al.*, 1994; Verheggen *et al.*, 1998, 2004; Ramage y Villalón 2008).

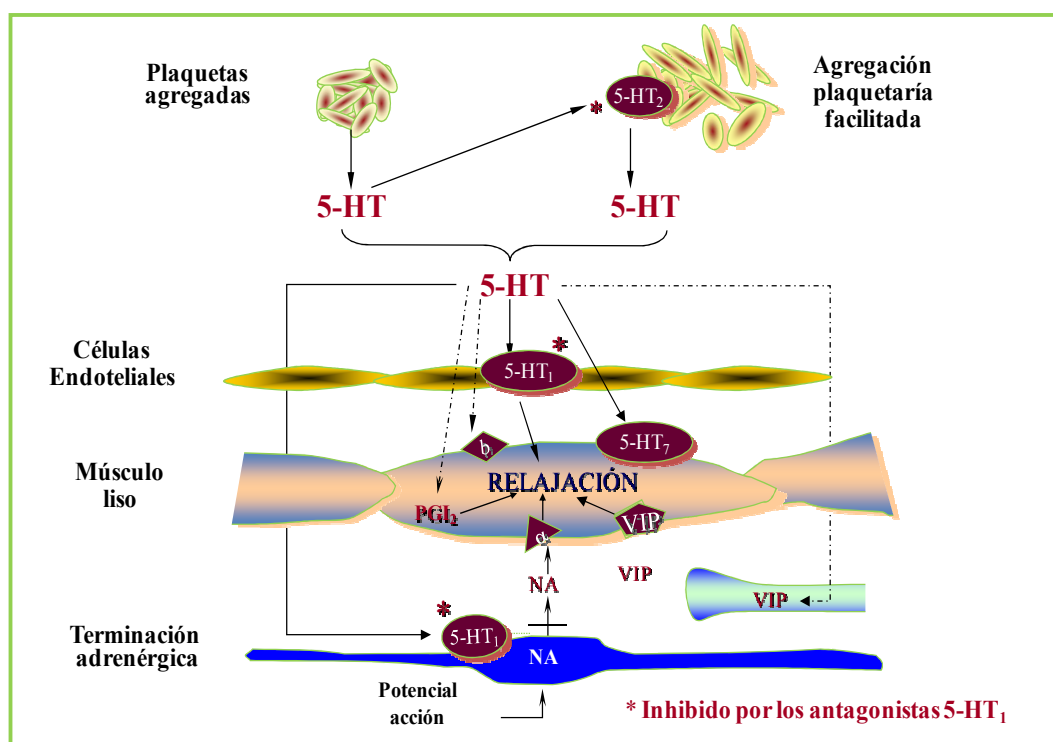
En la vena porta de roedores, 5-HT también ejerce un efecto vasoconstrictor, tanto en las preparaciones endotelio-dependiente como endotelio-independiente, a través de la activación de los receptores 5-HT<sub>1D/1B</sub> y 5-HT<sub>2A</sub>, pero no por una liberación de noradrenalina (NA) (Datté y Offoumou, 2004). Otros estudios señalan que el endotelio contrarresta parcialmente la respuesta vasoconstrictora a 5-HT en la arteria cerebral media de cabra (Miranda *et al.*, 1993), vena safena de conejo (Valentín *et al.*, 1996), arteria uterina humana (Karlsson *et al.*, 1998) y arteria carótida de conejo (Miranda *et al.*, 2000) (Figura 10).



**Figura 10:** Efectos vasoconstrictores directos e indirectos de 5-HT, ( $\alpha$  = adrenoceptor  $\alpha$ ; AngII = angiotensina II, A = adrenalina, NA = noradrenalina).

En lo referente a las acciones vasodilatadoras, el efecto de serotonina está especialmente marcado cuando el tono simpático está aumentado, aunque también se ha mostrado la presencia directa de receptores serotoninérgicos en células endoteliales (Verbeuren *et al.*, 1991) que puede facilitar la liberación de óxido nítrico tras activación de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> y 5-HT<sub>2B</sub> (Fozard y Kalkman, 1994; Schmuck *et al.*, 1996; Glusa y Pertz, 2000). En el caso de

cultivos de células endoteliales de aorta de oveja se ha demostrado la activación, al menos en parte, de la oxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) por parte de 5-HT (Mc Duffie *et al.*, 1999), 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<sub>1B</sub> y 5-HT<sub>2B</sub> (Ishida *et al.*, 1998). 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-HT<sub>7</sub> en el músculo liso vascular (Ullmer *et al.*, 1995; Verheggen *et al.*, 2004) cuya activación implica vasodilatación mediada por un aumento del AMPc (Schoeffter *et al.*, 1996; Terron y Falcon-Neri, 1999; Centurión *et al.*, 2004) (Figura 11).



**Figura 11:** Efectos vasodilatadores directos e indirectos de 5-HT, ( $\alpha$  = adrenoceptor  $\alpha$ ,  $\beta$  = adrenoceptor  $\beta$ , NA = noradrenalina, VIP = péptido intestinal vasoactivo, PGI<sub>2</sub> = prostaciclina) (Vanhoutte, 1987a).

En otros 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 a 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<sub>2B</sub> y/o 5-HT<sub>2C</sub> (Fernández *et al.*, 2000b). Sin embargo, en la vasculatura del tren posterior en ratas, esta vasoconstricción está ligada a la activación de receptores 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>2C</sub> (Calama *et al.*, 2004). Las respuestas vasodilatadoras a este nivel se producen por la activación de receptores 5-HT<sub>1B/1D</sub> (Calama *et al.*, 2002), los cuales llevan a una liberación de adrenalina a nivel de las cápsulas suprarrenales, seguida de una vasodilatación provocada por la activación de receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos (Calama *et al.*, 2003).

A nivel renal coexisten respuestas tanto vasoconstrictoras como vasodilatadoras (Shoji *et al.*, 1989; Verbeke *et al.* 1996; Morán *et al.*, 1997, 2008). Este efecto dual se ha observado tanto al perfundir 5-HT en la arteria renal de perro (Takahashi *et al.*, 1992) como por administración local de 5-HT en riñón hidronefrótico (Endlich *et al.*, 1993). 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 1991, Verbeuren *et al.* sugirieron la existencia de receptores 5-HT<sub>1A</sub> a nivel endotelial que mediaban la vasodilatación producida por 8-OH-DPAT y por algunos antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos (Verbeuren *et al.*, 1991, 1993). De igual manera, en riñón de perros anestesiados Tian *et al.* (2002) sugieren vasodilatación renal, mediada por un aumento en la liberación de NO, producida por un agonista de los receptores 5-HT<sub>2</sub>, DOI. En estudios de riñón autoperfundido *in situ* se demuestra la implicación de receptores 5-HT<sub>2</sub> en la vasoconstricción provocada tanto por serotonina como por Ang II (Morán *et al.*, 1997; 2008). 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<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>2B</sub> en arterias renales aisladas de rata (Watts y Thompson, 2004), mientras que en anillos de arterias renales de conejo se ha mostrado la existencia de receptores 5-HT<sub>1B</sub> y 5-HT<sub>1D</sub> (Hinton *et al.*, 2000). Estudios realizados en nuestro laboratorio, en riñón autoperfundido *in situ* de ratas hipertensas por L-NAME, demuestran la implicación de receptores 5-HT<sub>2A</sub> en la vasoconstricción provocada por serotonina (Morán *et al.*, 2009).

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<sub>1B</sub> y 5-HT<sub>2A</sub>, asociados los dos a una inhibición de la adenilato ciclasa (Schoeffter *et al.*, 1995; Nebigil *et al.*, 1995). La serotonina estimula la producción de TGF- $\beta$ <sub>1</sub> y la síntesis de colágeno (Kasho *et al.*, 1998). 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 (fosfocinasa C) y otras cinasas, pero también la producción de especies reactivas de oxígeno (Greene *et al.*, 2000).

### **5.- Interacción sistema serotoninérgico-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 (Humphrey *et al.*, 1983).

Desde hace años existen estudios que demuestran una interacción entre el sistema colinérgico y serotoninérgico (Dilsaver, 1986). 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 Ach en hipocampo de rata que puede ser controlada localmente por receptores 5-HT<sub>1B</sub> (Consolo *et al.*, 1994; Jeltsch-David *et al.*, 2008; Rutz *et al.*, 2006;), 5-HT<sub>3</sub> (Gil-Bea *et al.*, 2004) y 5-HT<sub>4</sub> (Millan *et al.*, 2004; Belcheva *et al.*, 2007; Ge y Barnes, 1996; BIRTHELMER *et al.*, 2002), que puede ser facilitada a través de la activación de receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>3</sub>. También hay evidencia de que una denervación serotoninérgica del hipocampo es capaz de facilitar la liberación de acetilcolina. En la corteza, la liberación de la Ach puede ser controlada localmente por receptores 5-HT<sub>1B</sub> e inhibidores 5HT<sub>3</sub>, mientras que la activación sistémica de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>4</sub> induce efectos de facilitación. Por último, en el estriado, la inhibición local del tono colinérgico puede estar mediada por receptores 5-HT<sub>1</sub> y 5-HT<sub>2</sub> (Gillet *et al.*, 1985).

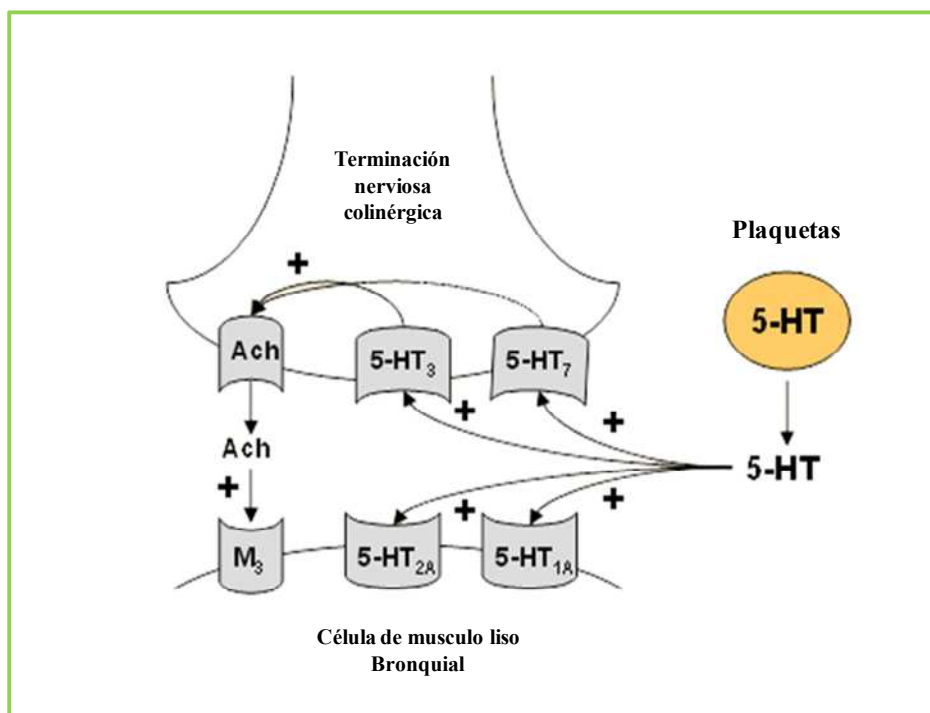
La interacción de serotonina con los receptores 5-HT<sub>3</sub> origina una estimulación de las terminaciones del nervio vago que trae como consecuencia una hipotensión y bradicardia extremas, fenómeno conocido como reflejo de Von Bezold-Jarisch. A este nivel, en ratas desmeduladas existen mecanismos serotoninérgicos inhibidores de la neurotransmisión colinérgica de tipo 5-HT<sub>2</sub> y potenciadores de tipo 5-HT<sub>3</sub> (Morán *et al.*, 1994a). 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 (Cazzola *et al.*, 1995).

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, en numerosos estudios se ha establecido la existencia de interacción entre ambos sistemas a nivel de SNC (Pedigo *et al.*, 1981; Allgaier *et al.*, 1995) y periférico (Saxena y Villalón, 1991; Jones *et al.*, 1995b; Fernández *et al.*, 2000a; Morán *et al.*, 1994b, 1998, 2008, 2009, 2010; García *et al.*, 2005, 2006, 2007). 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<sub>2A</sub> (Blessing y Seaman, 2003). 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 demostrándose una inhibición en la liberación de NA en varios tejidos de diferentes especies: en vena safena humana y de perro (Göthert *et al.*, 1996; Molderings *et al.*, 1990; Medhurst *et al.*, 1997), aurículas humanas (Molderings *et al.*, 1996), vena cava y vasculatura renal de rata (Molderings *et al.*, 1987; Charlton *et al.*, 1986), arterias cerebrales de la especie bovina (Barrus *et al.*, 1992) y en ratas normoglucémicas y diabéticas (Morán *et al.*, 1998; Fernández *et al.*, 2000a; García *et al.*, 2005, 2006)

Estudios en arteria pulmonar de conejo muestran que receptores 5-HT<sub>4</sub> y 5-HT<sub>1B/1D</sub> median la liberación de acetilcolina que, a su vez, activan receptores muscarínicos pre y/o postsinápticos en los nervios simpáticos que originan inhibición de la liberación de NA (Molderings *et al.*, 2006). A nivel pulmonar se ha demostrado la implicación de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos en las respuestas contráctiles a 5-HT (Ogawa *et al.*, 1995), 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  $\alpha_1$ -adrenérgicos, mientras que la inhibición de NO endógeno potencia el componente de la contracción mediado exclusivamente a través de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> (Shaw *et al.*, 2000).



**Figura 12:** Acción de 5-HT a nivel de músculo liso bronquial (Adaptado de Cazzola y Matera, 2000).

A nivel del corazón, serotonina favorece la liberación de NA por la estimulación de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 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 (Morán *et al.*, 1994b; Villalón *et al.*, 1995b; Villalón y Centurión, 2007; Ramage y Villalón, 2008) estando mediada dicha inhibición por los receptores 5-HT<sub>1</sub>, especialmente los 5-HT<sub>1D</sub> (Morán *et al.*, 1998). Sin embargo, se reconocen mecanismos que aumentan la liberación de adrenalina, mediados por receptores 5-HT<sub>3</sub> (Morán *et al.*, 1994b). Otros autores (Sánchez-López *et al.*, 2009) muestran como, también en ratas desmeduladas, 5-HT induce una inhibición simpática cardiaca mediada por receptores 5-HT<sub>1</sub> y 5-HT<sub>5A/5B</sub>.

Estudios realizados con plaquetas humanas determinaron que NA juega un papel importante en el control del funcionamiento de los receptores 5HT<sub>1</sub>. NA, por activación de la PKC mediada por receptores  $\alpha$ - y  $\beta$ -adrenérgicos, regula la fosforilación de receptores 5-HT<sub>1</sub>, 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-HT<sub>1</sub> y en el control y efectividad de fármacos en trastornos de ansiedad (Trincavelli *et al.*, 2008; Yoshioka *et al.*, 1995; Bandoh *et al.*, 2004).

## I.2. LA 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 (Mc Cance *et al.*, 1997; Perry *et al.*, 2001; Kuzuya *et al.*, 2002), que quedó de la siguiente forma:

1. Diabetes mellitus tipo 1.
2. Diabetes mellitus tipo 2.

Otros tipos específicos de diabetes:

3. Diabetes gestacional.
4. Alteración del metabolismo o de la homeostasis de la glucosa.

<b><i>Diabetes mellitus tipo 1</i></b>	<p>Caracterizada por destrucción de la célula beta, que habitualmente lleva a déficit absoluto de insulina. Hay dos formas:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Diabetes mellitus mediada por procesos autoinmunes. La destrucción de las células <math>\beta</math> resulta de un proceso autoinmune</li> <li>• Diabetes mellitus idiopática: etiología desconocida</li> </ul>
<b><i>Diabetes mellitus tipo 2</i></b>	<p>Caracterizada por resistencia insulínica, que habitualmente 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>
<b><i>Homeostasia de la glucosa alterada</i></b>	<p>Es un estado metabólico intermedio entre la normalidad y la diabetes. Es factor de riesgo para diabetes y enfermedad cardiovascular.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Glucemia basal alterada: glucemia plasmática basal por encima de los valores normales y menor que el valor diagnóstico de diabetes.</li> <li>• Tolerancia alterada a la glucosa: glucemia mayor que los valores normales y menor que la procedente del diagnóstico de diabetes tras sobrecarga de 75 gramos de glucosa.</li> </ul>
<b><i>Diabetes gestacional</i></b>	<p>Sin cambios en la definición.</p>
<b><i>Otros tipos específicos</i></b>	<p>Diabetes causada por otras etiologías identificables:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Defectos genéticos en la función de las células beta.</li> <li>• Defectos genéticos en la acción de la insulina.</li> <li>• Enfermedades del páncreas exocrino.</li> <li>• Endocrinopatías.</li> <li>• Fármacos y drogas.</li> <li>• Infección.</li> <li>• Formas raras de diabetes relacionados con procesos autoinmunes.</li> <li>• Otros síndromes genéticos.</li> </ul>

**Tabla 6:** Características de los distintos tipos de diabetes

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 6).

La prevalencia global de diabetes en el año 2000 fue de 171 millones de personas afectadas en todo el mundo y está previsto que esta cifra se eleve a 366 millones personas para el año 2030 debido, sobre todo, al aumento de la edad y cambios en los estilos de vida de la población. Según el informe de la OMS titulado “Global Burden of Diabetes 1995-2025”: El aumento de prevalencia entre 1995 y 2025 no será homogéneo en todos los países, así el mayor aumento lo presentarán China (68%) e India (59%). Los países Iberoamericanos y del Caribe, así como otras islas de Asia experimentarán un aumento del 41%. En Oriente Medio aumentará un 30%, mientras que este incremento será menor en los países de Antigua Economía Socialista de Europa (26%) y, en los países propios de una Economía de Mercado, como es el caso de España, el incremento será de un 28%. Estas cifras resultan más dramáticas si se tiene en cuenta que por cada caso de diabetes diagnosticado hay uno sin diagnosticar (Wild *et al.*, 2004).

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.

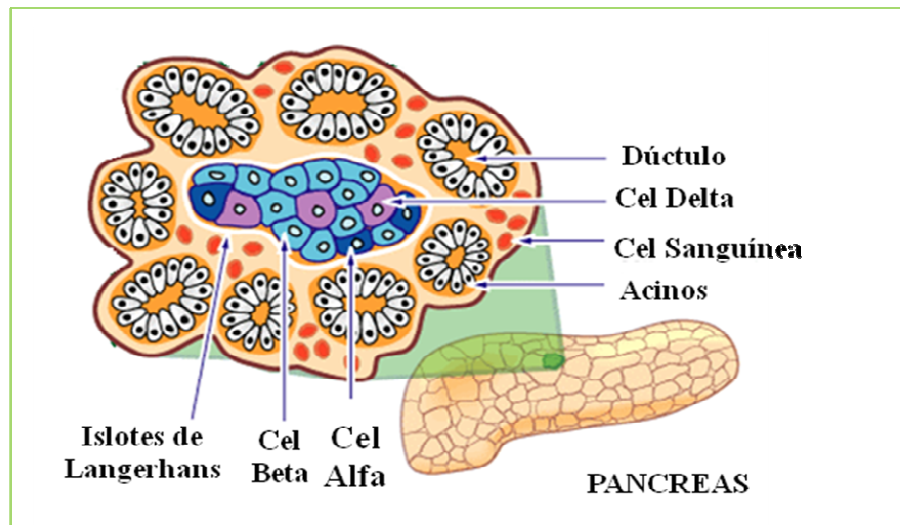
La morbilidad en pacientes diabéticos es mucho mayor que en sujetos que no padecen esta enfermedad, siendo común la aparición de alteraciones renales, oculares, cardiovasculares, y neurológicas.

## **1.- Páncreas e insulina**

El órgano responsable de la diabetes 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:

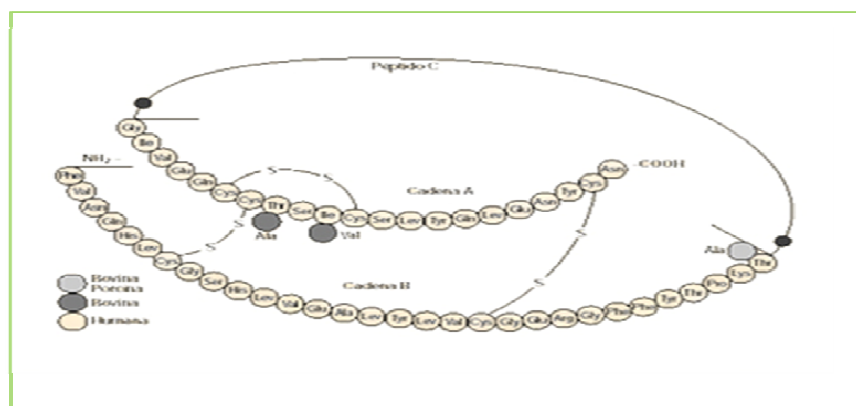
- *Los acinos (páncreas exocrino)*: son los encargados de la secreción de jugos digestivos al duodeno.
  
- *Los islotes de Langerhans (páncreas endocrino)* (Figura 13): el páncreas humano tiene de dos a tres millones de islotes de aproximadamente 0,3 mm cada uno. Se encuentran organizados alrededor de pequeños capilares hacia los que las células secretan las hormonas que producen. Los cuatro tipos de células son:
  - Células  $\beta$ : (60%) que secretan insulina y péptido C.
  - Células  $\alpha$ : (25%) que secretan glucagón.
  - Células  $\gamma$ : (10%) que secretan somatostatina.
  - Células PP: que secretan una hormona de función no muy aclarada que se llama polipéptido pancreático.



**Figura 13:** Anatomía fisiológica del páncreas (cel: célula).

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) (Sanger, 1988, 2001), 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 14).



**Figura 14:** Estructura de la insulina.

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 postraduccionales 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  $\beta$  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* (Goeddel *et al.*, 1979), 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 (Cote *et al.*, 2004). 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 (Moorhouse *et al.*, 1966) 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 (Kappelle *et al.*, 1993,1994; Cote *et al.*, 2004). 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 la conclusión de importantes modificaciones del sistema serotoninérgico central (Jamnicky *et al.*, 1993; Sandrini *et al.*, 1997). Lackovic *et al.*, en 1990, demostraron que la cantidad de serotonina sintetizada en cerebro es mayor en ratas diabéticas no tratadas con insulina; 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 (Bellush y Reid, 1994). También, se ha demostrado que en animales con DM inducida hay cambios hormonales, tales como la elevación de la concentración de corticosterona en plasma (Bellush *et al.*, 1991).

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 (destrucción de glóbulos rojos). 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 A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) y 5-HT (Hodgson *et al.*, 1992; James y Hodgson, 1995a, b).

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 (Hodgson *et al.*, 1990; Miranda *et al.*, 2000, 2002). También en la diabetes se ven modificaciones a las respuestas contráctiles, a la estimulación por un campo eléctrico 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 (Agrawal y McNeil., 1987; Abebe y McLeod., 1990) y otros proponen que estas respuestas están atenuadas (Ralevic *et al.*, 1995; Takiguchi *et al.*, 1998).

Entre las microangiopatías más frecuentes está la nefropatía diabética, que se manifiesta claramente por glomerulosclerosis 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 (Ang II, endotelina, 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 (Lehmann y Schleicher, 2000; Raptis y Viberti, 2001).

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 (Marre *et al.*, 1993) como en animales de experimentación (Cooper *et al.*, 1986) 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 (Keynan *et al.*, 2000) y los prostanoideos que juegan un papel importante en el mantenimiento de la función renal, homeostasis de los líquidos corporales, y la presión arterial. Los prostanoideos corticales renales derivados de ciclooxigenasas (COX), concretamente COX-2, en particular PGI<sub>2</sub> y PGE<sub>2</sub>, juegan un papel crítico en el mantenimiento de la presión arterial y la función renal en los estados de volumen contraído. Estudios en animales muestran que, en ratas diabéticas por STZ, la síntesis renal de PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, y tromboxano B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>) está incrementada (Craven *et al.*, 1987; Hao y Breyer, 2008). 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 (Komers *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2002; Dey *et al.*, 2004), o en riñones de pacientes diabéticos (Khan *et al.*, 2001).

Las macroangiopatías que más frecuentemente se producen son hipertensión arterial, hiperlipemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hiperlipemia combinada y arterioesclerosis.

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 (Félétou *et al.*, 1994; Oyama *et al.*, 1986) como en el hombre (Johnstone *et al.*, 1993; Van Etten *et al.*, 2002). 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 nicotin adenosin difosfato (NADPH) oxidasa en las células musculares lisas o endoteliales aumentan el estrés oxidativo en los vasos sanguíneos y llevan a una degradación de NO (Cameron *et al.*, 2001; Lassègue y Clempus, 2003).

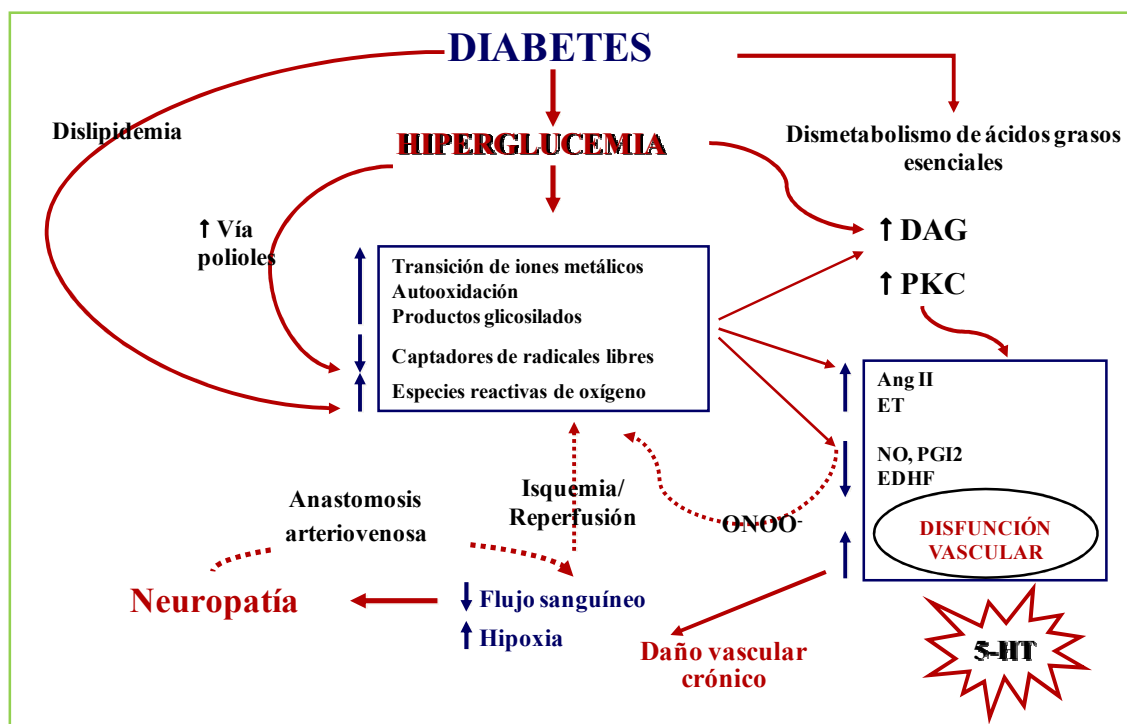
Existen estudios que han demostrado que realmente hay alteraciones a nivel de la vasodilatación producida por el endotelio. De esta forma Pieper *et al.*, en 1997 mostraron que la relajación producida por el óxido nítrico estaba disminuida en la DM, y que este déficit se reparaba con la administración de L-arginina, un precursor del NO, lo que lleva a sugerir una posible asociación entre el desarrollo de la enfermedad y el déficit de NO. 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 (Cosentino *et al.*, 1997). Otros estudios sugieren que, probablemente, el responsable principal de este comportamiento del enzima es el cofactor de la óxido nítrico sintasa (NOS), la tetrahidrobiopterina (Milstien y Katusic, 1999; Cameron *et al.*, 2001). Otros autores señalan modificaciones en los niveles de endotelina-1 en diabetes experimental (Takeda *et al.*, 1991; James y Hodgson, 1995a).

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 (Bank y Aynedjan, 1993), la hiperfiltración

glomerular es inhibida por un inhibidor de la NOS (Bank y Aynedjan, 1993; Tolins *et al.*, 1993) y la expresión de la NOS está aumentada a nivel glomerular en rata diabética (Choi *et al.*, 1997; Veelken *et al.*, 2000). 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 (Mayhan *et al.*, 1991; Tesfamariam *et al.*, 1989; Shimizu *et al.*, 1993).

Los prostanoïdes derivados de la COX juegan un papel crítico en la modulación del flujo sanguíneo renal y la tasa de filtración glomerular (Hao y Breyer, 2008). En condiciones normales, los prostanoïdes parecen ejercer poca influencia sobre el flujo sanguíneo renal y la tasa de filtración glomerular (Hao y Breyer, 2008). 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 (Arisz *et al.*, 1976; Walshe y Venuto, 1979; Antillon *et al.*, 1990; Hao y Breyer, 2008). 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 TXA<sub>2</sub>.

Angulo *et al.*, 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. En este sentido, Pieper *et al.* (1998a, b) 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 (Figura 15).



**Figura 15:** Complicaciones producidas en la diabetes (Adaptado de Camerón *et al.*, 2001)

La existencia de una DM prolongada produce modificaciones en los niveles de diferentes neurotransmisores, así como de sus precursores y enzimas que los degradan. Algunos estudios muestran la elevación de los niveles plasmáticos de adrenalina, noreadrenalina y de dopamina- $\alpha$ -hidroxilasa, así como reducción en la síntesis y metabolismo de dopamina y serotonina, perdiéndose en parte las respuestas de esta amina ante el estrés (Bellush *et al.*, 1991).

### **I.3.- SEROTONINA, DIABETES Y SISTEMA CARDIOVASCULAR**

La diabetes es una enfermedad que, como ya se ha mencionado, causa y exacerba macro y microangiopatías, las cuales contribuyen al deterioro vascular asociado a la enfermedad, que a largo plazo originan complicaciones cardiovasculares importantes, entre las cuales se destacan la hipertensión arterial y la insuficiencia renal, que tienen 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 su papel en la agregación plaquetaria, ii) en la población de receptores serotoninérgicos y iii) en las respuestas vasculares inducidas por serotonina en diferentes vasos sanguíneos y su regulación endotelial.

La diabetes crónica está asociada 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> en el cerebro de ratas (Sandrini *et al.*, 1997). Sin embargo, en la DM las tasas plasmáticas de 5-HT están aumentadas (Barradas *et al.*, 1988; Malyszko *et al.*, 1995, Martín *et al.*, 1995), debido al aumento de la agregación plaquetaria, ya que las plaquetas son la principal fuente de serotonina a nivel periférico (Murray *et al.*, 1983; Malyszko *et al.*, 1995; Hasegawa *et al.*, 2002). Recientemente, Ni *et al.*, (2008) revelan la existencia de un sistema local serotoninérgico en las arterias periféricas, pero el papel fisiológico de la 5-HT en la regulación del tono vascular aún no está claro. La activación serotoninérgica en los pacientes diabéticos se confirma porque se dobla la cantidad de 5-HIAA, principal metabolito de 5-HT, que se excreta urinariamente.

Las modificaciones de la expresión de receptores 5-HT han sido estudiadas, sobre todo, a nivel de SNC, (Villalón y Centurión, 2007; Ramage y Villalón, 2008) donde un aumento de receptores 5-HT<sub>1A</sub> (córtex y tronco encefálico) y de 5-HT<sub>2</sub> (córtex frontal) ha sido demostrado en ratas en las que se había inducido diabetes por administración de STZ (Sandrini *et al.*, 1997; Sumiyoshi *et al.*, 1997). Se piensa que

este aumento en la expresión de receptores aparece como un fenómeno de compensación a la disminución de la concentración de serotonina a nivel local (Sandrini *et al.*, 1997), hecho que ha sido comprobado en pacientes diabéticos (5-HT<sub>1C</sub>, DM tipo 2) por técnicas de tomografía de emisión de electrones (Price *et al.*, 2002). A nivel periférico, y al contrario de lo que ocurre a nivel central, la densidad en sitios de unión de la [<sup>3</sup>H]-ketanserina no está modificada en aorta de rata diabética mientras que sí que lo está la reactividad a serotonina (James *et al.*, 1994; James y Hodgson, 1995b).

Teniendo en cuenta los potentes efectos vasoconstrictores de la serotonina en el conjunto de vasos sanguíneos, muchos trabajos se han dirigido a evaluar las modificaciones de sus respuestas en diversas preparaciones arteriales, en la evolución de la diabetes experimental. Los resultados obtenidos muestran bien una inhibición o bien una potenciación de la vasoconstricción producida por 5-HT, siendo estas respuestas muy diferentes en función del lecho vascular estudiado y la especie animal de la que se trate.

En aortas de ratas diabéticas, han sido descritas tanto respuestas aumentadas como disminuidas a la serotonina (Sikorski *et al.*, 1993; James y Hodgson, 1995a; Orié *et al.*, 1993; Hattori *et al.*, 1995). En otros vasos sanguíneos las respuestas son más homogéneas. Así, en el tren posterior autoperfundido *in situ*, siempre hay una respuesta inhibitoria, sea cual sea el agente diabetogéno (estreptozotocina o aloxano) utilizado (Sikorski *et al.*, 1991; James *et al.*, 1995). En arteria pulmonar y carótida, tomadas de conejo o de cerdo diabéticos, la respuesta vasoconstrictora está aumentada (El-Kasef, 1996; Bagwell *et al.*, 2000; Miranda *et al.*, 2000, 2002). En contraste, otros estudios describen disminuciones de la respuesta contráctil a 5-HT en arteria aorta de ratas diabéticas (Orié *et al.*, 1993; Sikorski *et al.*, 1993; James *et al.*, 1994; Hattori *et al.*, 1995). Existen pocos datos sobre las modificaciones en las respuestas vasculares a serotonina a nivel renal durante el desarrollo de la diabetes. Mientras que en arterias renales de conejo sí que ha sido descrita una clara potenciación de la respuesta a 5-HT (Miranda *et al.*, 2002), la respuesta en riñón aislado de rata es mucho más compleja, donde se ha visto que puede aparecer una potenciación de la respuesta para las dosis más bajas de 5-HT utilizadas y una inhibición para las concentraciones más elevadas



(Hodgson *et al.*, 1990), o bien, como otros autores han demostrado, no haber modificaciones en la respuesta (Beenen *et al.*, 1996; Boston *et al.*, 1997). Se han estudiado muy diversos mecanismos para dar cuenta de estas modificaciones en la reactividad vascular a 5-HT durante la diabetes, sobre todo en la modulación de las respuestas vía el NO, las prostaglandinas y el endotelio (Miranda *et al.*, 2000, 2002), la potenciación por TXA<sub>2</sub> (Hodgson *et al.*, 1990), anomalías en la vía de la PKC (Hattori *et al.*, 1995) o en la cascada de la COX (James y Hodgson, 1995b). Normalmente, los trabajos realizados han sido durante las primeras semanas después de la inducción de la diabetes, lo que se puede considerar como la fase precoz de la enfermedad.

Las vasoconstricciones producidas por serotonina en aorta se reproducen con  $\alpha$ -metil-5-HT y son inhibidas por ketanserina y por tanto están ligadas a los receptores 5-HT<sub>2</sub> (James *et al.*, 1994). La densidad de estos receptores no parece estar aumentada en aorta de ratas diabéticas. La complejidad de las respuestas vasculares a 5-HT, incluyendo receptores con acción vasodilatadora, endoteliales o no, no ha sido considerada en estos trabajos, que en su mayoría se han realizado antes de la aparición de moléculas específicas para los distintos tipos de receptores.

Las propiedades de serotonina en células mesangiales, células importantes en la evolución hacia la nefropatía diabética, han llevado a Takahashi *et al.*, (2002) a evaluar los efectos de un antagonista de receptores 5-HT<sub>2A</sub>, sarpogrelato, en esta patología. Los resultados muestran un efecto beneficioso de dicho antagonista ya que la albuminuria de un pequeño grupo de pacientes con DM tipo 2 se ha disminuido en el tercer mes de tratamiento. Estos datos demuestran que las tasas elevadas de 5-HT en la diabetes participan probablemente en la nefropatía diabética a través de los receptores 5-HT<sub>2A</sub>. Es posible que una parte de dichos efectos beneficiosos provenga de la inhibición de las respuestas hemodinámicas ligadas a 5-HT.

Existen claras evidencias que apuntan a que además de los efectos directos de la serotonina a nivel cardiovascular, ocurren algunas modificaciones vasculares inducidas por acciones inhibitoras o potenciadoras de esta amina biógena sobre el sistema nervioso autónomo.

La diabetes origina alteraciones en los niveles de 5-HT tanto a nivel periférico como central, habiéndose visto que con la alteración de serotonina en cerebro se ven alterados también otros neurotransmisores o neuromoduladores como son las  $\beta$ -endorfinas (Kolta *et al.*, 1986).

La 5-HT afecta la función renal (Shoji *et al.*, 1989; Morán *et al.*, 1997, 2008, 2009; Tian *et al.*, 2002), pero las acciones encontradas en este lecho vascular renal varían mucho en cuanto al efecto (vasoconstricción / vasodilatación) y la magnitud de la respuesta. Los estudios realizados previamente por nosotros para analizar los cambios hemodinámicos inducidos por 5-HT en varios lechos vasculares autoperfundidos de rata han confirmado la variabilidad de estas acciones, según el lecho vascular analizado (Fernández *et al.*, 2000b; Calama *et al.*, 2002; Morán *et al.*, 1997, 2008, 2009). Incluso, en el mismo lecho vascular, los efectos inducidos por la 5-HT depende de varios factores, tales como las dosis utilizadas o la existencia de patologías, como la hipertensión o la diabetes (Calama *et al.*, 2003, 2004; Morán *et al.*, 2008, 2009, 2010; García *et al.*, 2005, 2006).

Parece probable que, como se muestra en otros estudios realizados por nosotros (García, 2005), la acción vasoconstrictora de 5-HT en el lecho vascular renal en la diabetes está vinculada a los cambios en las vías de señalización intracelular, pero el mecanismo exacto aún no ha sido dilucidado. Algunos estudios señalan, en riñón perfundido de ratas diabéticas, que la activación de receptores de TXA<sub>2</sub> aumentan los efectos vasoconstrictores de 5-HT (Hodgson *et al.*, 1990). Otros, sin embargo, describen anomalías en la cascada de las ciclooxigenasas en diversas patologías, como la nefropatía diabética o la hipertensión renal (James y Hodgson, 1995b; Hao y Breyer, 2008).

Los estudios en animales mostraron que, en ratas diabéticas tipo 1 inducida por STZ, se incrementa la síntesis renal de prostanoïdes (Craven *et al.*, 1987; Hao y Breyer, 2008). Varios estudios han reportado un incremento en la expresión de COX-2 en la rama gruesa ascendente y la mácula densa, tanto en ratas con diabetes tipo I inducida por STZ y ratas diabética tipo II Zucker (Komers *et al.*, 2001, 2005; Cheng *et al.*, 2002;

Dey *et al.*, 2004). Estudios han mostrado que la inhibición selectiva de la COX-2 reduce significativamente la hiperfiltración glomerular en las ratas diabéticas por STZ, lo cual es consistente con que prostanoideos derivados de COX-2 aumenten la hiperfiltración en el riñón diabético (Komers *et al.*, 2001, 2005; Hao y Breyer, 2008; Yar *et al.*, 2010).

El papel de la 5-HT en la neurotransmisión colinérgica y sus efectos cardiovasculares ha recibido considerable atención durante muchos años. Receptores centrales 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>7</sub> juegan un papel fisiológico en la regulación de los reflejos cardiovasculares (Ramage and Villalón, 2008). Algunos estudios han propuesto acciones despolarizantes, con un aumento en la actividad vagal mediada por la activación de receptores 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>2</sub> (Wang *et al.*, 1998), y receptores 5-HT<sub>4</sub> (Tonini *et al.*, 1991) o 5-HT<sub>1A</sub> en diferentes especies animales (Sporton *et al.*, 1991; Shephard *et al.*, 1994; Skinner *et al.*, 2002; Kellet *et al.*, 2005; Villalón y Centurión, 2007). Otros datos han sugerido un efecto inhibitor serotonérgico en la liberación de acetilcolina a través de la activación de los receptores 5-HT<sub>1</sub> (Tonini *et al.*, 1992). Nuestro grupo ha demostrado que, en ratas desmeduladas, los mecanismos serotonérgicos implicados en la neurotransmisión colinérgica presináptica y cardíacas pueden inhibir o facilitar la liberación de acetilcolina a través de la activación de los receptores 5-HT<sub>1</sub> y 5HT<sub>3</sub>, respectivamente (Morán *et al.*, 1994). También hemos demostrado que en ratas diabéticas de cuatro semanas se inducen cambios en la naturaleza y en el subtipo de receptor involucrado en la bradicardia vagal producida por estimulación eléctrica. La activación de receptores 5-HT<sub>1A</sub> produce aumento de la bradicardia inducida vagalmente, mientras que la atenuación de la bradicardia se debe a la activación de receptores 5-HT<sub>1D</sub>, siendo la naturaleza de estas respuestas pre- y post sináptica (García *et al.*, 2007).

Estas respuestas están relacionadas con hiper o hiposensibilización, y pueden incluir cambios en la expresión de los receptores muscarínicos (Belmonte *et al.*, 1997; Miranda *et al.*, 2002; Coulson *et al.*, 2002). Otros estudios han sugerido que la diabetes induce cambios en la transmisión colinérgica (Lishner *et al.*, 1987; McDowell *et al.*, 1994). Esta disfunción parasimpática en el corazón diabético puede llevar a un

desequilibrio autonómico que puede predisponer el corazón a las arritmias ventriculares y muerte súbita (Park *et al.*, 2009).

Igualmente, se ha visto que en la diabetes hay alteraciones a nivel del sistema nervioso simpático de tal modo que las respuestas vasoconstrictoras frecuencia-dependientes a la estimulación eléctrica de nervios simpáticos están claramente atenuadas en preparaciones de ratas diabéticas por estreptozotocina (Ralevic *et al.*, 1995). Los cambios funcionales en el sistema nervioso simpático se han reportado en animales y humanos diabéticos. Los estudios realizados en diferentes condiciones experimentales han demostrado la existencia de receptores serotoninérgicos en terminales nerviosas simpáticas pre y post-ganglionares en ratas, *in vitro e in vivo* (Villalón *et al.*, 1995a, b, c; Morán *et al.*, 1994, 1998; García *et al.*, 2005, 2006), así como en gatos (Jones *et al.*, 1995b).

No obstante, es importante destacar que la diabetes inducida en animales de experimentación no tiene los mismos efectos en todas las especies, así por ejemplo ya ha sido demostrado como en una diabetes experimental inducida por aloxano en ratas y conejos las respuestas de preparaciones *in vitro* de aorta es diferente, de tal modo que en las preparaciones de aorta de rata, pero no en las de conejo, hay una importante disminución de la respuesta a diferentes agentes vasoconstrictores como NA y 5-HT (Head *et al.*, 1987); sin embargo, en los estudios realizados sobre las acciones vasodilatadoras de acetilcolina en este mismo trabajo se ve que, además de no haber diferencias entre ratas y conejos, la diabetes no origina modificaciones en esta relajación endotelio-dependiente. Esto contrasta con otros estudios que demuestran vasodilataciones modificadas dependientes de endotelio en diabetes (Bassenge, 1992); y que en anillos aórticos de ratas diabéticas, después de dos semanas de inducción de la diabetes, las respuestas relajantes vasculares endotelio-dependientes a Ach están disminuidas (Sikorski *et al.*, 1993).

Todo esto demuestra que serotonina ejerce diferentes acciones cardiovasculares dependientes de la especie, del tono vascular, de la naturaleza y del receptor involucrado, de la dosis y, sobre todo, de las condiciones experimentales, como es la

duración del estado diabético (Fink y Göther, 2007; Villalón y Centurión, 2007; Ramage y Villalón, 2008).



## II. OBJETIVOS





Tal como queda reflejado en la introducción de esta Memoria, 5-hidroxitriptamina participa en un elevado número de respuestas fisiológicas y patológicas y ejerce una compleja participación a nivel cardiovascular, ejerciendo así numerosas acciones (Vanhoutte *et al.*, 1981; Van Zwieten *et al.*, 1992; Villalón *et al.*, 1993; Villalón y Centurión, 2007; Ramage y Villalón, 2008).

La vasoconstricción y potenciación de otros agentes vasoconstrictores, la vasodilatación y los efectos inotrópicos y cronotrópicos positivos, son algunas de las acciones descritas para esta amina biógena (Saxena y Villalón, 1991; Vanhoutte *et al.*, 1985, 1987a,b; Ramage y Villalón, 2008), justificadas en algunos casos, por la existencia, cada vez más aceptada, de una interacción entre las vías serotoninérgicas, adrenérgicas y colinérgicas.

Por su parte, la diabetes constituye un importante problema de salud que transcurre con alteración de la respuesta a los diferentes lechos vasculares y a diversos agentes contracturantes o relajantes. En la diabetes experimental se han detectado mayores niveles circulantes de 5-HT y se ha demostrado hipo o hiper-reactividad vascular arterial hacia esta amina biógena.

Nuestro grupo de investigación ha desarrollado en los últimos años 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 semanas:

- 5-hidroxitriptamina modula la neurotransmisión colinérgica cardíaca, inhibiendo o facilitando la liberación de acetilcolina. Los mecanismos inhibidores implican la activación de receptores 5-HT<sub>2</sub> en ratas normoglucémicas, y receptores 5-HT<sub>1D</sub> en ratas diabéticas de 4 semanas, mientras que los potenciadores corresponden a receptores 5-HT<sub>3</sub> en ratas normoglucémicas y 5HT<sub>1A</sub> en ratas diabéticas (Morán *et al.*, 1994; García *et al.*, 2007).
- 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<sub>1D</sub>, mientras que los potenciadores conllevan la activación de receptores 5-HT<sub>3</sub> (Morán *et al.*, 1994, 1998).
- Determinados antagonistas de receptores 5-HT<sub>1</sub>/5-HT<sub>2</sub>, ejercen efectos inhibidores de la transmisión simpática vascular en ratas, por mecanismos no directamente relacionados con el antagonismo de receptores serotoninérgicos (Fernández *et al.*, 2000a).
- Se ha demostrado igualmente un efecto inhibitor de 5-HT sobre la neurotransmisión simpática cardíaca en ratas desmeduladas normotensas, en el cual participan receptores 5-HT<sub>1</sub> de naturaleza presináptica, siendo el subtipo 5-HT<sub>1B</sub> el más implicado en dicha acción en el caso de roedores (Villalón *et al.*, 1999).
- 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 inhibitora mediada por activación de receptores presinápticos 5-HT<sub>1A</sub> por la vía del NO (García *et al.*, 2005, 2006).

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

- En riñón autoperfundido *in situ* de rata normoglucémica, 5-hidroxitriptamina ejerce efectos vasoconstrictores mediados por la activación de receptores 5-HT<sub>2C</sub>, que implican un incremento en la formación de angiotensina II (Ang II) (Morán *et al.*, 1997, 2008), por una mayor actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (Fernández, 1999).
- En riñón autoperfundido *in situ* de rata hipertensa por N<sup>ω</sup>-Nitro-L-arginina (L-NAME), 5-hidroxitriptamina ejerce efectos vasoconstrictores mediados por la activación local de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> (Morán *et al.*, 2009).
- 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-HT<sub>2</sub>, estando mediadas mayoritariamente por los subtipos 5-HT<sub>2A/2B</sub> (Fernández *et al.*, 2000b).
- En el tren posterior autoperfundido de ratas normotensas, la vasoconstricción serotoninérgica está ligada a la activación de receptores 5-HT<sub>2A</sub> (Calama *et al.*, 2002), mientras que, en ratas espontáneamente hipertensas, la vasoconstricción esta mediada por los subtipos 5-HT<sub>2A/2C</sub> (Calama *et al.*, 2004).
- En el tren posterior autoperfundido, serotonina induce también respuestas vasodilatadoras por activación de receptores 5-HT<sub>1B/1D</sub> (Calama *et al.*, 2002), 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<sub>2</sub>-adrenérgicos (Calama *et al.*, 2003).

Siguiendo en esta línea de investigación, en este trabajo de Tesis Doctoral se plantea, como **objetivo general**, determinar el tipo y subtipos de receptores serotoninérgicos y, de mediadores endoteliales, en respuestas cardiovasculares

serotonérgicas que afectan a la neurotransmisión adrenérgica, colinérgica y en el lecho vascular renal, en una situación de hiperglucemia (de ocho semanas).

Los **objetivos específicos** marcados en este trabajo son:

1. Determinar, en ratas hiperglucémicas desmeduladas, la influencia que 5-hidroxitriptamina y otros agonistas serotonérgicos, ejercen sobre las respuestas vasculares obtenidas por estimulación simpática total y por administración de noradrenalina exógena; establecer la naturaleza de dichas acciones analizando el tipo y/o subtipos de receptores serotonérgicos implicados y, comparar los resultados que se obtengan con los de ratas normoglucémicas.
2. Establecer la posible participación de mediadores endoteliales u otros mediadores en las acciones que serotonina y otros agonistas serotonérgicos ejercen sobre los efectos presores obtenidos por estimulación simpática total en ratas hiperglucémicas de ocho semanas.
3. Estudiar, en ratas hiperglucémicas desmeduladas, las acciones de 5-HT, así como de agonistas y antagonistas serotonérgicos, implicados en las respuestas colinérgicas cardiacas obtenidas por estimulación eléctrica vagal y por administración de acetilcolina exógena. Los resultados se analizarán en comparación con los previamente obtenidos en situación de normoglucemia.
4. Determinar, en riñón autoperfundido *in situ*, las modificaciones del flujo vascular provocadas por 5-HT y agonistas serotonérgicos en ratas diabéticas de ocho semanas, comparándolo con ratas normoglucémicas, y estableciendo el tipo/s y/o subtipo/s de receptores serotonérgicos implicados en dichas acciones.
5. Analizar si las respuestas serotonérgicas, a nivel renal, son acciones directas o indirectas inducidas por otros mediadores vasculares, confirmando la naturaleza de dichos mediadores mediante técnicas de biología molecular.

# III. ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN



### III.1

## 5-HIDROXITRIPTAMINA SISTEMA ADRENÉRGICO

- ARTÍCULO 1
- ARTÍCULO 2





# ARTÍCULO 1

**Pharmacological profile of 5-hydroxytryptamine-induced inhibition on  
the pressor effect elicited by sympathetic stimulation in long-term  
diabetic pithed rats**

A. Morán, B. Restrepo, A.V. Ortiz de Urbina, M. García, M.L. Martín,

L. San Román.

Eur J Pharmacol 2010, 643(1):70-7





## Cardiovascular Pharmacology

## Pharmacological profile of 5-hydroxytryptamine-induced inhibition on the pressor effect elicited by sympathetic stimulation in long-term diabetic pithed rats

Asunción Morán<sup>a,\*</sup>, Beatriz Restrepo<sup>a,b</sup>, Ana Vega, Ortiz de Urbina<sup>a</sup>, Mónica García<sup>a</sup>,  
 María Luisa Martín<sup>a</sup>, Luis San Román<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Farmacología, Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain

<sup>b</sup> Grupo de Enfermedades Cardiovasculares y Metabólicas. Facultad Ciencias de la Salud, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 29 January 2010

Received in revised form 19 May 2010

Accepted 7 June 2010

Available online 12 June 2010

## Keywords:

5-Hydroxytryptamine

Long-term experimental diabetes

5-HT<sub>1A</sub> receptor

5-HT<sub>2A</sub> receptor

Pre-junctional inhibition

## ABSTRACT

We analysed the type and/or subtype of 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptors involved in the inhibitory mechanisms of 5-HT on the pressor responses induced by stimulation of sympathetic vasopressor outflow in long-term diabetic pithed rats. Diabetes was induced in male Wistar rats by a single subcutaneous injection of alloxan. Eight weeks later, rats were anaesthetized, pre-treated with atropine, and pithed. The effect of 5-HT on the pressor responses elicited by stimulation of the sympathetic outflow was analysed in eight-week alloxan-induced diabetic pithed rats. 5-HT (20 µg/kg/min) reduced the pressor action obtained by electrical stimulation of the sympathetic outflow. However, there was no effect on exogenous noradrenaline-induced pressor responses. 5-CT (5 µg/kg/min), 8-OH-DPAT (5 µg/kg/min), and α-methyl-5-HT (5 µg/kg/min), selective 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptor agonists, respectively, reproduced the 5-HT inhibitory action. Nevertheless, infusion of 5 µg/kg/min of 1-phenylbiguanide, CGS-12066B, L-694,247, BW273C86 or MK212 (5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonists, respectively) had no effect on the pressor responses elicited by stimulation of the sympathetic outflow. Methiothepin (100 µg/kg) and a cocktail of WAY-100,635 (100 µg/kg) and spiperone (125 µg/kg) blocked the 5-HT inhibitory effect on the pressor action obtained by sympathetic stimulation. Moreover, WAY-100,635 abolished the 8-OH-DPAT inhibitory effect and spiperone blocked α-methyl-5-HT action. In conclusion, this study revealed that long-term experimental diabetes induces changes in the receptor type/subtype involved in the 5-HT inhibitory action on the sympathetic pressor responses produced by electrical stimulation. This is mainly mediated by pre-junctional 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Diabetes mellitus causes and exacerbates macroangiopathies and microangiopathies, which contribute to the vascular deterioration associated with this disease. However, the pathological processes underlying vascular complications are incompletely understood. Several reports have suggested a possible role for 5-hydroxytryptamine (5-HT) in the pathophysiology of diabetic complications. Chronic diabetes is associated with a decrease in the cerebral concentration of 5-HT, and with an increase in the number of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors in the rat brain (Sandrini et al., 1997). Diabetes reduces the 5-HT concentration in the gut and platelets of alloxan-treated rats, which is reversed by treatment with the serotonin precursor 5-hydroxytryptophan (Cicin-

Sain and Jernej, 1996). In contrast, increased 5-HT levels in plasma are related to the development of diabetic nephropathy (Kasho et al., 1998). Miranda et al. (2000, 2002) also suggested the existence of a diabetes-induced hyper-reactivity of renal and carotid arteries to 5-HT in rabbits. Recently, a study carried out in non-insulin-dependent patients with diabetes mellitus suggested the potential benefits of the 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonist sarpogrelate in the treatment of diabetic nephropathy (Ogawa et al., 1999; Doggrell, 2004).

Serotonin exerts different cardiovascular responses, including bradycardia and tachycardia, hypotension and hypertension, vasodilatation and vasoconstriction (Villalón and Centurión, 2007; Ramage and Villalón, 2008), dependent upon the animal species, basal vascular tone, experimental conditions, dosage and, above all, the nature of the receptors involved (Fink and Göthert, 2007). We reported that 5-HT modulates cardiovascular responses to sympathetic stimulation in normoglycaemic (Morán et al., 1994, 1998; Fernández et al., 2000) and short-term (four-week) diabetic animals (García et al., 2005, 2006). Other authors (Villalón et al., 1998), working in normoglycaemic pithed male Wistar rats, have shown the involvement of 5-HT<sub>1A</sub> receptors, and

\* Corresponding author. Laboratorio de Farmacología, Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, ES-37007 Salamanca, Spain. Tel.: +34 23 294530; fax: +34 23 294515.

E-mail address: [amoran@usal.es](mailto:amoran@usal.es) (A. Morán).

5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>1D</sub> receptors in rodents on the pre-junctional inhibition of electrically induced sympathetic outflow.

Dysfunction of the autonomic nervous system is common in diabetes mellitus. Moreover, functional changes in the sympathetic nervous system have been reported in animal and human diabetic subjects. Studies conducted under different experimental conditions have demonstrated the existence of regulatory 5-HT receptors on post-ganglionic and possibly pre-ganglionic sympathetic nerve terminals in rats *in vitro* and *in vivo* (Villalón et al., 1995a, b, c) as well as in cats (Jones et al., 1995). We showed that, *in vivo*, in normoglycaemic and four-week diabetic pithed rats, 5-HT inhibits sympathetic transmission in the systemic vascular system by activation of 5-HT<sub>1</sub> receptors (Morán et al., 1994, 1998; García et al., 2005, 2006).

The present study was carried out to determine the effects of 5-HT in the pressor responses induced by stimulation of sympathetic vasopressor outflow in pithed atropine-treated alloxan-diabetic rats. We analysed the possible changes induced by long-term diabetes in vascular reactivity to 5-HT in comparison with a short-term diabetic group of animals (García et al., 2005, 2006) and with the results previously obtained by our research team in normoglycaemic rats (Morán et al., 1994, 1998). We also determined the 5-HT type/subtype receptors involved in these changes.

## 2. Material and methods

### 2.1. Ethical approval of the study protocol

Housing conditions and experimental procedures were in accordance with regulations provided by the European Union on the use of animals for scientific purposes (86/609/EEC, Article 5, Appendix II). This was enacted by Spanish legislation on 14 March 1988 (R.D.223/1988).

### 2.2. Animal preparation

Two hundred and-fifteen male Wistar rats (250–350 g) were used in the present study. Rats were kept and supplied by the Animal House of the Faculty of Pharmacy of the University of Salamanca (P.A.E.-SA001; Salamanca, Spain).

Diabetes was induced in 190 rats by a single injection of alloxan (150 mg/kg, s.c.) dissolved in 0.9% NaCl (physiological saline). Rats were then maintained on tap-water and regular food *ad libitum* for 8 weeks. A second group of 25 rats was maintained under the same conditions for the same time period to serve as age-matched controls. Body weight, systolic blood pressure, heart rate and blood glucose levels were determined before and at 2, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 and 56 days after alloxan administration. Only rats with elevated blood glucose levels (>11 mM) at all time points were considered diabetic. Blood pressure and heart rate were measured in awake rats periodically using the tail-cuff method with a photoelectric sensor (Niprem 546, Cibertec S.A, Madrid, Spain). Several determinations were made in each session for each rat. Values were considered valid if five consecutive measurements did not differ by 10 mm Hg.

Diabetic and normoglycaemic rats were anaesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg, i.p.). After cannulation of the trachea, rats were pithed by inserting a stainless steel rod through the orbit and foramen magnum (Gillespie and Muir, 1967; García et al., 2005, 2006) and artificial respiration carried out with room air by a Harvard respiratory pump (1 ml air/100 g, 50 strokes/min). The right and the left jugular veins were cannulated for the infusion of agonists and for the administration of antagonists respectively. The left carotid artery was connected to a PRS 205 amplifier (Cibertec, Madrid, Spain) displaying the recordings on one channel of a Leticia Polygraph 4000 (Cibertec) to record blood pressure. Heart rate was measured by analysis of blood pressure data by a CAR 1000 tachograph (Cibertec) connected to the same PRS 205 amplifier.

The entire sympathetic outflow from the spinal cord was stimulated using a Cibertec Stimulator CS-9. Two electrodes were employed: one was connected to the pithing rod (stimulating electrode), while the other one (indifferent electrode) was inserted (s.c.) into a leg. Before electrical stimulation, rats were treated with heparin (1000 U/kg) and then d-tubocurarine (2 mg/kg, i.v.) to prevent electrically induced muscular twitching, as well as atropine (1 mg/kg, i.v.) to prevent the cholinergic effects.

### 2.3. Experimental protocols

After reaching a stable haemodynamic condition for  $\geq 10$  min, baseline values of mean blood pressure (MBP) were determined. Then, sympathetic vasopressor outflow was stimulated by applying trains of 25 s, consisting of monophasic pulses of 1-ms duration and supra-maximal intensity ( $27.5 \pm 2.5$  V for diabetic rats and  $15 \pm 3$  V for normoglycaemic rats) at increasing frequencies (0.1, 0.5, 1 and 5 Hz).

Thus, the control stimulation–response curve (S–R curve E0) was completed in  $\sim 20$  min. At this point, rats were divided into five groups. Each group was then split into subgroups, taking into account that each rat was used to evaluate only one dose of agonist or antagonist. Each dose was repeated five times, up to a total of five experiments.

The first group was used to confirm the results from our previous works (Morán et al., 1994, 1998, García et al., 2005, 2006) in normoglycaemic-control rats. In this group ( $n = 25$ ), each rat received a continuous intravenous infusion (using the Harvard model 122 pump (Cibertec)) of one of the following: saline solution (1 ml/h,  $n = 5$ , control group for all the agonist treatments); 5-HT (20  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ,  $n = 5$ ); the selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8-hydroxydipropylamino-tretalin hydrobromide (8-OH-DPAT) (5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ,  $n = 5$ ); L-694,247 (5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ,  $n = 5$ ), a selective non-rodent 5-HT<sub>1B</sub> receptor and 5-HT<sub>1D</sub> receptor agonist; or the selective 5-HT<sub>2</sub> receptor agonist  $\alpha$ -methyl-5-HT (20  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ,  $n = 5$ ). After 5 min of the corresponding infusion, three new S–R curves (E1, E2 and E3) were obtained as described above for the S–R curve E0. Each infusion was maintained for 1 h.

In the first alloxan-treated diabetic group ( $n = 80$ ), each rat received a continuous intravenous infusion of one of the following: saline solution (1 ml/h,  $n = 5$ , control group for all the agonist treatments); 5-HT (20, 40 or 80  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ,  $n = 15$ ); the selective 5-HT<sub>1</sub> receptor agonist 5-carboxamidotryptamine maleate (5-CT) (5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ,  $n = 5$ ); the selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT (5, 10 or 20  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ,  $n = 15$ ); the selective rodent 5-HT<sub>1B</sub> receptor agonist CGS-12066B (5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ,  $n = 5$ ); the selective non-rodent 5-HT<sub>1B</sub> receptor and 5-HT<sub>1D</sub> receptor agonist L-694,247 (5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ,  $n = 5$ ); the selective 5-HT<sub>2A/2B/2C</sub> receptor agonist  $\alpha$ -methyl-5-HT (2.5, 5, 10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ,  $n = 15$ ); the selective rodent 5-HT<sub>2B</sub> receptor agonist BW 723C86 (5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ,  $n = 5$ ); the selective rodent 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonist MK 212 (5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ,  $n = 5$ ); or the selective 5-HT<sub>3</sub> receptor agonist 1-phenylbiguanide (5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ,  $n = 5$ ). The S–R curves were constructed in the same conditions as for the infusions in the normoglycaemic-control group.

The second diabetic group ( $n = 35$ ) was run in parallel with the above group to investigate, during the continuous infusion of saline solution (1 ml/h), the effect *per se* of the non-selective 5-HT<sub>1</sub> receptor antagonist methiothepin (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $n = 5$ ); the selective 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonist ritanserin (1 mg/kg,  $n = 5$ ); the selective 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist MDL-72222 (2 mg/kg,  $n = 5$ ); the selective 5-HT<sub>7</sub> receptor antagonist pimozone (1 mg/kg,  $n = 5$ ); the selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist WAY-100,635 (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $n = 5$ ); the selective 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist spiperone (125  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $n = 5$ ); or the selective 5-HT<sub>2B/2C</sub> receptor antagonist SB 206553 (500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $n = 5$ ) on the electrically induced pressor responses. All the antagonists were administered 5 min before saline infusion.

The third alloxan-treated group was used to analyse the 5-HT<sub>1</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptor subtype involved in the inhibitory 5-HT effect. These rats (n = 55) were subdivided into several treatment subgroups: methiothepin (100 µg/kg), ritanserin (1 mg/kg) MDL-72222 (2 mg/kg) or pimoziide (1 mg/kg) 5 min before the infusion of 5-HT (20 µg/kg/min, n = 5 for each antagonist); WAY-100,635 (100 µg/kg) 5 min before the infusion of 5-HT (20 µg/kg/min, n = 5) or 8-OH-DPAT (5 µg/kg/min, n = 5); spiperone (125 µg/kg) 5 min before the infusion of 5-HT (20 µg/kg/min, n = 5) or α-methyl 5-HT (5 µg/kg/min, n = 5); SB 206553 (500 µg/kg) 5 min before the infusion of 5-HT (20 µg/kg/min, n = 5) or α-methyl 5-HT (5 µg/kg/min, n = 5). The other subgroup received an "antagonist cocktail" of WAY-100,635 (100 µg/kg) + spiperone (0.125 mg/kg) 5 min before the infusion of 5-HT (20 µg/kg/min, n = 5).

In the last group (n = 20), blood pressure dose–response curves by intravenous administration of exogenous noradrenaline (NA) (0.01, 0.05, 0.1 and 0.5 µg/kg) were constructed before (E'0) and during (E'1, E'2 and E'3) the continuous infusion of saline solution (1 ml/h, n = 5), 5-HT (20 µg/kg/min, n = 5), 8-OH-DPAT (5 µg/kg/min, n = 5), or α-methyl 5-HT (5 µg/kg/min, n = 5), respectively. Accordingly, four dose–response curves for NA were obtained per rat. The infusions were started 5 min after the first curve–response (E'0) was elicited and were maintained over 1 h.

## 2.4. Drugs used

Apart from the anaesthetic (pentobarbital sodium; Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA), the drugs used in the present study were as follows.

Heparin sodium was from Roche (Madrid, Spain). Alloxan, monohydrate noradrenaline bitartrate, and d-tubocurarine hydrochloride were from Sigma. 5-Hydroxytryptamine creatinine sulphate complex (5-HT), methiothepin mesylate, 5-carboxamidotryptamine maleate (5-CT), 7-trifluoromethyl-4-(4-methyl-1-piperazinyl) pyrrolo[1,2-a]-quinoxaline dimaleate (CGS-12066B dimaleate), 1-phenylbiguanide, methiothepin, and tropanyl 3,5-dichlorobenzoate (MDL-72222) were from Sigma-Aldrich. 2-[5-[3-(4-methylsulfonylamino)benzyl]-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-1H-indol-3-yl]ethanamine (L-694,247), 6-[2-[4-[Bis(4-fluorophenyl)methyl]ene]-1-piperidinyl]-7-methyl-5H-thiazolo[3,2-a] pyrimidin-5-one (ritanserin), α-methyl-5-hydroxytryptamine maleate (α-methyl-5-HT), α-methyl-5-(2-thienylmethoxy)-1H-indole-3-ethanamine hydrochloride (BW723C86 hydrochloride), 6-chloro-2-(1-piperazinyl) pyrazine hydrochloride (MK212 hydrochloride), 1-[1-[4,4-Bis(4-fluorophenyl)butyl]-4-piperidinyl]-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-one (pimoziide), (S)-N-ter-butyl-3-(4-(2-methoxyphenyl)-piperazin-1-yl)-2-phenylpropanamide dihydrochloride (WAY-100,635), 8-[4-(4-fluorophenyl)-4-oxobutyl]-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4,5] decan-4-one hydrochloride (spiperone hydrochloride), 3,5-dihydro-5-methyl-N-3-pyridinylbenzo [1,2-b:4,5-b']dipyrrole-1(2H)-carboxamide hydrochloride (SB-06553 hydrochloride), and 8-hydroxy-2-dipropylaminotetralin hydrobromide (8-OH-DPAT) were from Research Biochemicals

**Table 1**

Values of body weight, systolic blood pressure, heart rate and glycaemia in control and diabetic rats.

	Body weight (g)	Systolic blood pressure (mm Hg)	Heart rate (bpm)	Glycaemia (mM)	n
<b>Control rats</b>					
Initial time	219 ± 9.0	118 ± 5.0	375 ± 10.0	5.6 ± 0.2	20
8 weeks after	424 ± 16.0	130 ± 4.0	392 ± 15.0	4.8 ± 0.1	20
<b>Diabetic rats</b>					
Initial time	192 ± 10.0	124 ± 5.0	310 ± 6.0	5.6 ± 0.1	165
8 weeks after	309 ± 11.8 <sup>a</sup>	151 ± 3.7 <sup>a</sup>	365 ± 10.0	20.1 ± 0.7 <sup>a</sup>	165

Results are means ± S.E.M. for "n" rats.

<sup>a</sup> Significantly different from the corresponding value in control rats, P < 0.05.

International, Natick, MA, USA. Atropine sulphate was from Scharlau (Barcelona, Spain).

All drugs were dissolved in distilled water at the time of experimentation, with the exception of ritanserin (dissolved in 0.04 mol/l of lactic acid) and pimoziide (dissolved in 0.01 mol/l HCl).

## 2.5. Statistical analyses

Modifications in MBP were expressed as mm Hg above the mean control blood pressure measured before electrical stimulation and as the stabilized maximum post-stimulation.

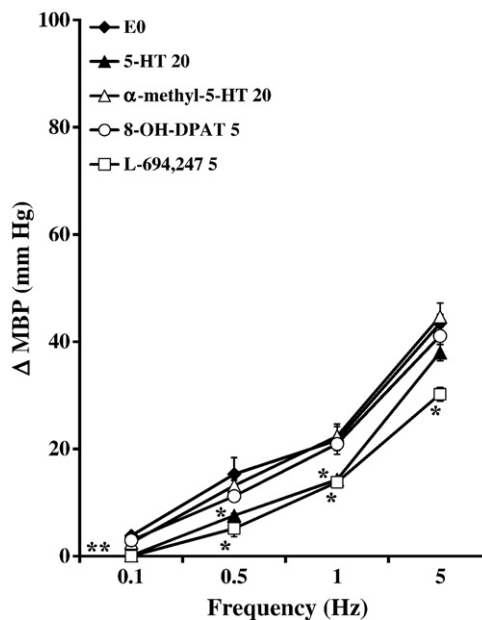
Data are mean ± S.E.M. of at least five experiments. Comparison of the results from the experimental groups and their corresponding control group was carried out by ANOVA followed by the Newman–Keuls multiple comparison test. The differences were considered significant if P < 0.05. Data obtained for S–R curves E1, E2 and E3 were essentially identical so, for simplicity, only the S–R curve corresponding to E2 stimulation or E'2 NA-administration are shown in the figures.

## 3. Results

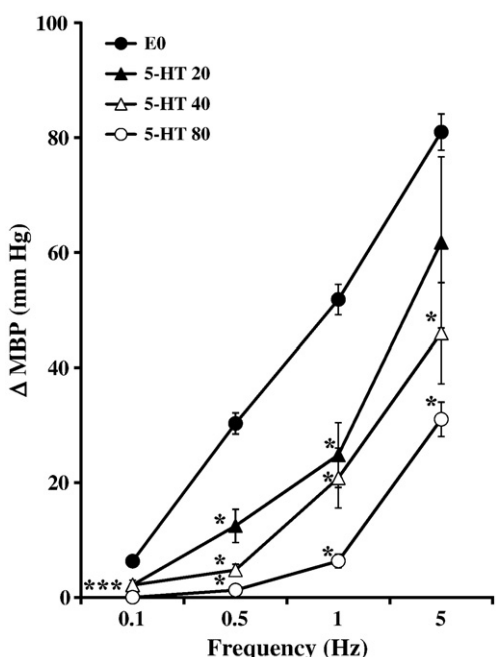
### 3.1. Systemic haemodynamic variables

Alloxan-induced diabetes elicited a marked increase in serum glucose and failure of the rats to increase their body weight in comparison with control rats. Table 1 shows the mean values of body weight, systolic blood pressure, heart rate and glycaemia before and 8 weeks after the induction of diabetes for rats in the diabetic group and in the control group.

The mean resting blood pressure and heart rate in chronic diabetic anaesthetized pithed rats were 43.6 ± 1.8 mm Hg and 340 ± 4 beats/minute (bpm), respectively; they were 39 ± 1.0 mm Hg and 330 ± 6 bpm, respectively, for normoglycaemic anaesthetized pithed rats. These values were not significantly altered by the intravenous infusion of saline, the 5-hydroxytryptamine receptor agonists (5-HT, 5-CT, CGS-12066B, 8-OH-DPAT, L-694,247, α-methyl-5-HT, BW 723C86, MK 212 and 1-phenylbiguanide) or the 5-HT receptors antagonists (methiothepin, ritanserin, MDL-72222, pimoziide, WAY-100,635, spiperone and SB 206553).



**Fig. 1.** Effect of intravenous infusion of saline (1 ml/h), 5-HT (20 µg/kg/min), 8-OH-DPAT (5 µg/kg/min), L-694,247 (5 µg/kg/min) and α-methyl-5-HT (20 µg/kg/min) on electrically induced pressor responses in normoglycaemic pithed rats. Data are mean ± S.E.M. \*P < 0.05 vs E0 control.



**Fig. 2.** Effect of intravenous infusions of 5-HT (20, 40 and 80 µg/kg/min) on electrically induced pressor responses in eight-week diabetes pithed rats (S-R E2). Data are mean  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$  vs E0 control.

Basal heart rate remained unchanged before and throughout all infusions of agonists and antagonists.

### 3.2. Effects of physiological saline or 5-HT receptor agonists (5-HT, 8-OH-DPAT, L-694,247 and $\alpha$ -methyl-5-HT) on the electrically induced increases in MBP in control normoglycaemic rats

Electrical stimulation of the pre-ganglionic sympathetic outflow from the spinal cord in normoglycaemic pithed rats resulted in frequency-dependent increases in MBP. At the frequencies used, the increases in MBP in S-R curve E0 were  $3.8 \pm 0.5$ ;  $15.3 \pm 3.1$ ;  $21.6 \pm 2.6$  and  $43.4 \pm 1.7$  mm Hg (Fig. 1). These rises in MBP remained stable in S-R curves E1, E2 and E3 in control rats receiving an infusion (1 ml/h,  $n = 5$ ) of saline solution. Continuous infusion of 5-HT (20 µg/kg/min,  $n = 5$ ) inhibited the sympathetic-induced pressor responses (Fig. 1). Likewise, intravenous infusion of the selective non-rodent 5-HT<sub>1B</sub> receptor and 5-HT<sub>1D</sub> receptor agonist L-694,247 (5 µg/kg/min,  $n = 5$ ) also inhibited the sympathetic-induced pressor responses (Fig. 1). Continuous infusion of the selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT (5 µg/kg/min,  $n = 5$ ) or the selective 5-HT<sub>2</sub> receptor agonist  $\alpha$ -methyl-5-HT (20 µg/kg/min,  $n = 5$ ) failed to inhibit the pressor responses evoked by sympathetic stimulation.

### 3.3. Effects of physiological saline or 5-HT receptor agonists (5-HT, 5-CT, 8-OH-DPAT, CGS-12066B, L-694,247, $\alpha$ -methyl-5-HT, BW 723C86, MK 212 and 1-phenylbiguanide) on the electrically induced increases in MBP in long-term diabetic rats

Electrical stimulation of the pre-ganglionic sympathetic outflow from the spinal cord in chronic diabetic pithed rats resulted in frequency-dependent increases in MBP. At the frequencies used, the increases in MBP in S-R curve E0 were  $6.4 \pm 0.3$ ;  $29.8 \pm 1.6$ ;  $51.4 \pm 2.4$  and  $80.6 \pm 2.9$  mm Hg. These increases in MBP remained stable in S-R curves E1, E2 and E3 in control rats receiving an infusion (1 ml/h,  $n = 5$ ) of saline solution (data not shown).

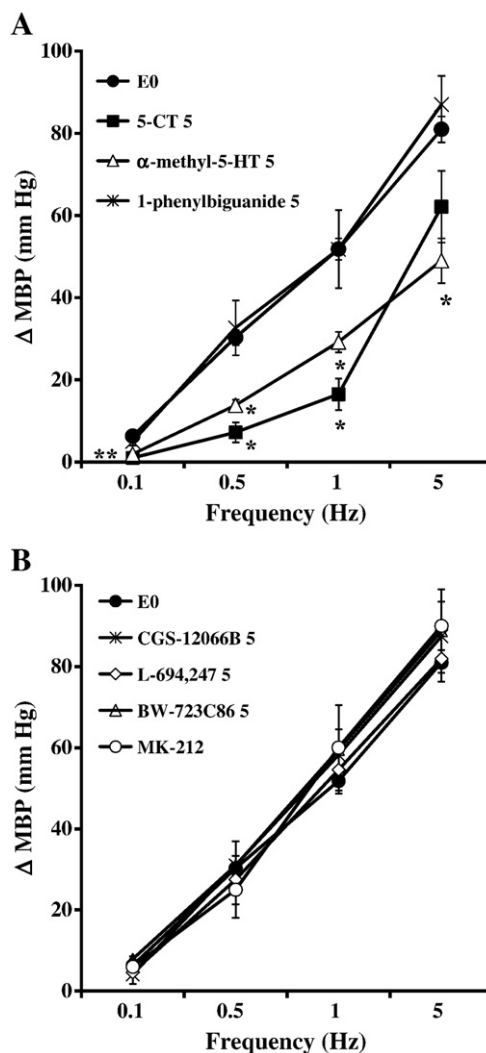
Continuous infusion of 5-HT (20, 40 and 80 µg/kg/min,  $n = 15$ ) inhibited the sympathetic-induced pressor responses (Fig. 2) and the doses of 5-HT 5 and 10 µg/kg/min have no effect (data not shown). The

inhibition was more pronounced at lower stimulation frequencies in a dose-dependent way. Likewise, intravenous infusion of the selective 5-HT<sub>1</sub> receptor agonist 5-CT (5 µg/kg/min,  $n = 5$ ), the selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT (5, 10 and 20 µg/kg/min,  $n = 15$ ) or the selective 5-HT<sub>2A, 2B, 2C</sub> receptor agonist  $\alpha$ -methyl-5-HT (2.5, 5 and 10 µg/kg/min,  $n = 15$ ) inhibited the sympathetic-induced pressor responses (Figs. 3A, 4A and B).

By contrast, CGS-12066B (5 µg/kg/min,  $n = 5$ ), L-694,247 (5 µg/kg/min,  $n = 5$ ), BW 723C86 (5 µg/kg/min,  $n = 5$ ), MK 212 (5 µg/kg/min,  $n = 5$ ), (Fig. 3B) and 1-phenylbiguanide (5 µg/kg/min,  $n = 5$ ) failed to inhibit the pressor responses evoked by the sympathetic stimulation (Fig. 4A).

### 3.4. Effect of 5-hydroxytryptamine receptor antagonists on the 5-HT-, 8-OH-DPAT- and $\alpha$ -methyl-5-HT-induced sympathoinhibitory effect in eight-week diabetic rats

Pre-treatment of chronic diabetic pithed rats with the non-selective 5-HT<sub>1</sub> receptor antagonist methiothepin (100 µg/kg,  $n = 5$ ) produced a marked inhibition *per se* of the pressor response in S-R curve E0 (Fig. 5). This inhibitory effect was similar to the inhibition produced by 5-HT (20 µg/kg/min), so the action produced on



**Fig. 3.** Effect of intravenous infusions of (A) 5-CT (5 µg/kg/min),  $\alpha$ -methyl-5-HT (5 µg/kg/min), or 1-phenylbiguanide (5 µg/kg/min) and (B) L-694,247 (5 µg/kg/min), CGS-12066B (5 µg/kg/min), BW 723C86 (5 µg/kg/min) or MK212 (5 µg/kg/min) on electrically induced pressor responses in eight-week diabetes pithed rats (S-R E2). Data are mean  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$  vs E0 control.

electrically induced pressor responses by 5-HT (20 µg/kg/min) could not be elicited after intravenous treatment with methiothepin (100 µg/kg, n = 5) (Fig. 5).

The inhibitory effect of 5-HT (20 µg/kg/min) was partially blocked after intravenous treatment with the selective 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonist ritanserin (1 mg/kg, n = 5); the selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist WAY-100,635 (100 µg/kg, n = 5) or the selective 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist spiperone (125 µg/kg, n = 5) (Fig. 6A and B). By themselves, these agents did not modify the pressor responses obtained by electrical stimulation (data not shown). Moreover, the 5-HT-induced inhibition was completely blocked after intravenous administration of WAY-100,635 (100 µg/kg) + spiperone (125 µg/kg) (Fig. 6A). The inhibitory effect of 8-OH-DPAT (5 µg/kg/min, n = 5) was completely abolished by 100 µg/kg of WAY-100,635 (Fig. 7A), and the inhibitory action of α-methyl-5-HT (5 µg/kg/min, n = 5) was completely blocked by 125 µg/kg of spiperone. However, the inhibitory effect of α-methyl-5-HT was not modified after intravenous pre-treatment with the 5-HT<sub>2B/2C</sub> receptor antagonist (0.5 mg/kg, n = 5) SB206553 (Fig. 7B).

The selective 5-HT<sub>2B/2C</sub> antagonist SB206553 (0.5 mg/kg, n = 5), the selective 5-HT<sub>3</sub> antagonist MDL-72222 (2 mg/kg, n = 5) and the

selective 5-HT<sub>7</sub> antagonist pimozi (1 mg/kg, n = 5), did not modify *per se* the pressor responses in S–R curve E0, and could not antagonize the inhibitory effect of 20 µg/kg/min of 5-HT (n = 5 for each antagonist) (Fig. 6B).

### 3.5. Effects of saline solution, 5-HT or 8-OH-DPAT or α-methyl-5-HT on the noradrenaline-induced increases in MBP in long-term diabetic rats

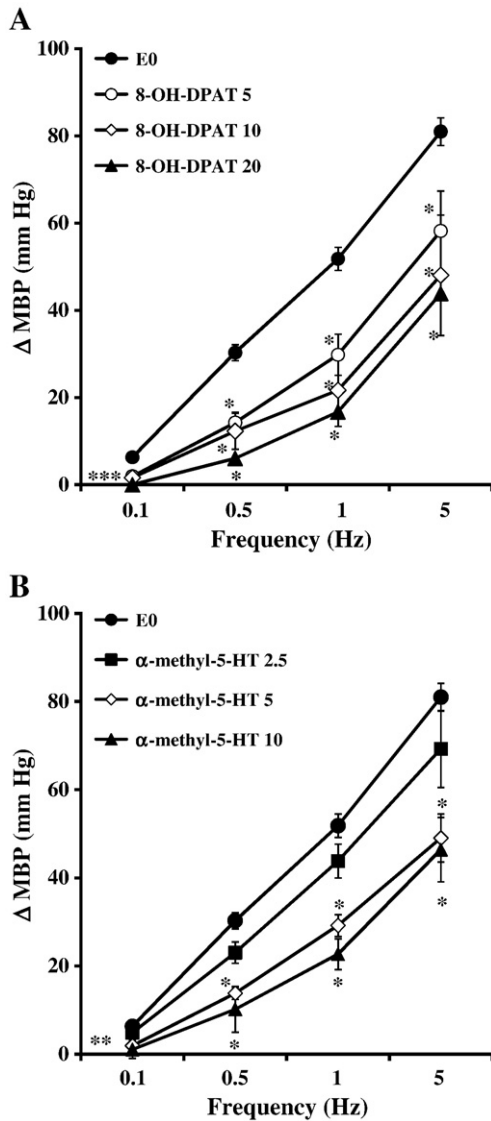
The increases in MBP (in S–R curve E'0) caused by exogenous NA (0.01–0.5 µg/kg) in eight-week diabetic pithed rats were 5.7 ± 0.6, 10.6 ± 1.5, 20.4 ± 5.2 and 46.3 ± 8.2 mm Hg. These increases in MBP remained stable in S–R curves E'1, E'2 and E'3 in control rats receiving an infusion of 1 ml/h of saline (n = 5). Continuous infusion of 5-HT (20 µg/kg/min, n = 5), 8-OH-DPAT (5 µg/kg/min, n = 5) or α-methyl-5-HT (5 µg/kg/min, n = 5) failed to inhibit the pressor responses to exogenous administration of NA (Fig. 8).

## 4. Discussion

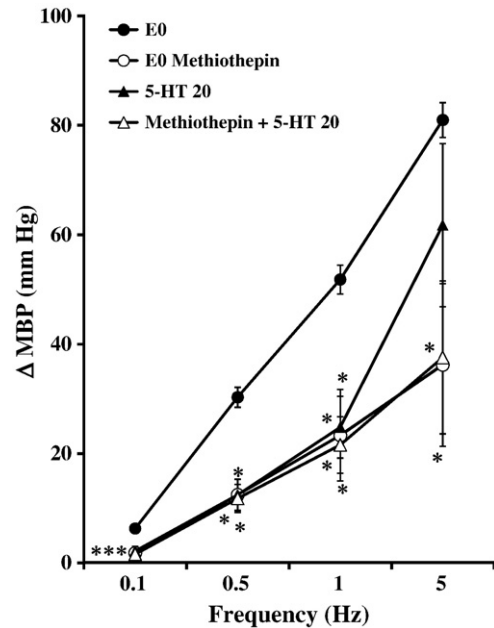
Previous findings from our research team and others suggest that experimental hyperglycaemia and hypertension induce significant changes in 5-HT modulation of sympathetic vascular neurotransmission (García et al., 2005, 2006; Ni et al., 2008; Morán et al., 2009).

In the present work, we studied the effect of long-term experimental chemical diabetes on the inhibitory action of 5-HT on the pressor responses elicited by sympathetic stimulation in pithed rats. The diabetogenic agent used was alloxan. This drug induces a syndrome resembling type-1 diabetes mellitus (Agrawal et al., 1987) and is commonly used as an experimental model of diabetes in animals (Chan et al., 2000; Miranda et al., 2002; García et al., 2005, 2006).

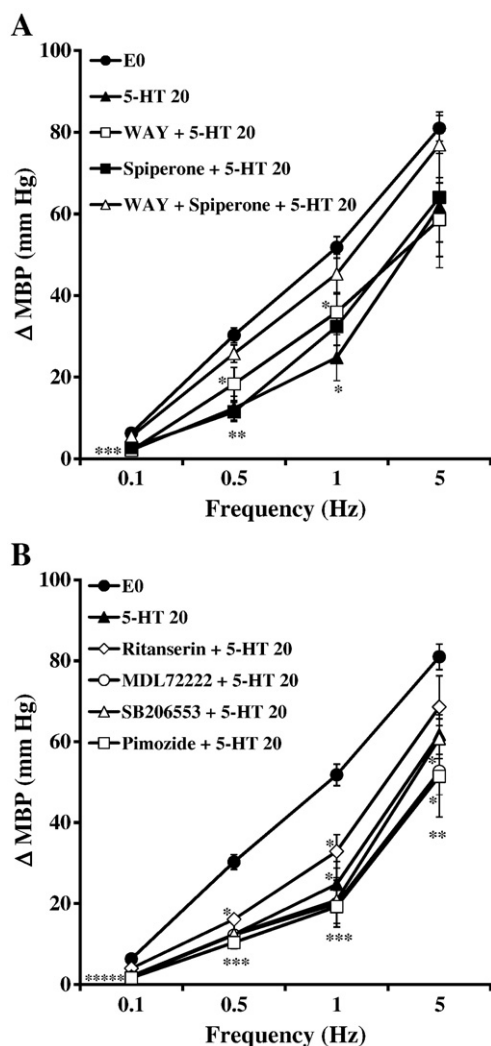
In our experiments in diabetic rats, it was necessary to use a supra-maximal voltage higher than the used in normoglycaemic rats and the increases in MBP in chronic diabetic rats was higher than that obtained in normoglycaemic rats and four-week-old diabetic rats (García et al., 2005, 2006). The differences between diabetic rats and normoglycaemic rats could be due to a dysfunction of the autonomic nervous system, though this hypothesis is controversial because several authors have proposed an increased vascular reactivity to adrenoceptors agents



**Fig. 4.** Effect of intravenous infusions of (A) 8-OH-DPAT (5, 10 and 20 µg/kg/min) and (B) α-methyl-5-HT (2.5, 5 and 10 µg/kg/min) on electrically induced pressor responses in eight-week diabetes pithed rats (S–R E2). Data are mean ± S.E.M. \*P < 0.05 vs E0 control.



**Fig. 5.** Effect of the intravenous administration of methiothepin (100 µg/kg) on the inhibitory effect of 5-HT (20 µg/kg/min) on electrically induced pressor responses in eight-week diabetes pithed rats (S–R E2). Data are mean ± S.E.M. \*P < 0.05 vs E0 control. #P < 0.05 vs E0 methiothepin.



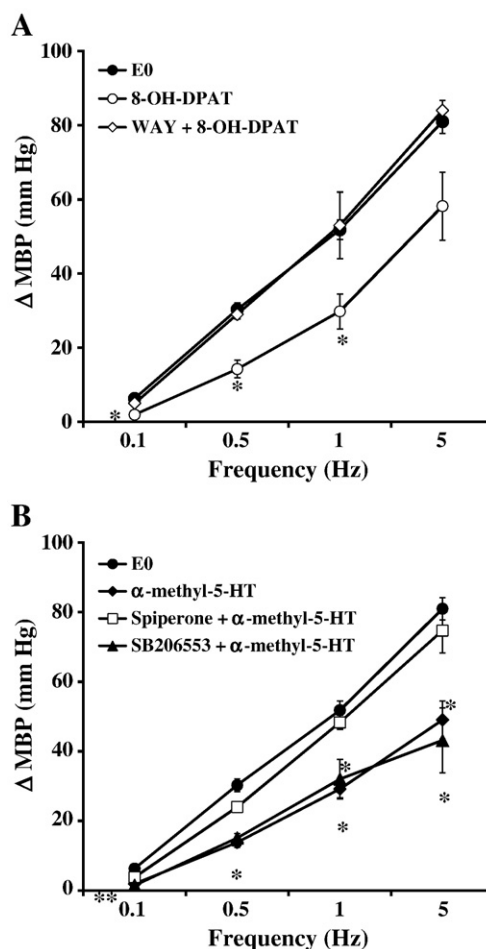
**Fig. 6.** Effect of intravenous administration of (A) WAY-100,635 (100 μg/kg), spiperone (125 μg/kg) or WAY-100,635 (100 μg/kg) plus spiperone (125 μg/kg) and (B) ritanserin (1 mg/kg), SB206553 (0.5 mg/kg), MDL-72222 (2 mg/kg) or pimoizide (1 mg/kg) on the inhibitory effect of 5-HT (20 μg/kg/min) on electrically induced pressor responses in eight-week diabetes pithed rats (S-R E2). Data are mean ± S.E.M. \**P*<0.05 vs E0 control.

(Taylor et al., 1994), whereas others have demonstrated attenuation of sympathetic contractile responses (Andersson et al., 1992) or even no changes (Ralevic et al., 1993).

This work revealed that in chronic diabetic rats, as well as in normoglycaemic Wistar rats, 5-HT interferes with adrenergic neurotransmission and reduces the increases in blood pressure obtained by sympathetic stimulation. However, it does not affect the increases in blood pressure elicited by exogenous administration of NA.

The 5-HT doses used induced significant inhibition of the pressor responses at all stimulation frequencies. The inhibitory action was greater at low stimulation frequencies, (80%) reduction, in both diabetic rats as in normoglycaemic. This increase in inhibitory effect already proposed by our research team and others (Docherty, 1988; Morán et al., 1994; García et al., 2005) and the nature of the receptors led us to hypothesize that the existence of experimental diabetes does not modify the inhibitory action of 5-HT on the increases in blood pressure obtained by sympathetic stimulation or the pre-junctional nature of these receptors (García et al., 2005, 2006).

The selective 5-HT<sub>1/7</sub> receptor agonist 5-CT induced a marked inhibition in eight-week diabetic (hyperglycaemic) rats (Wood et al., 2000). However, the 5-HT<sub>2</sub> receptor agonist α-methyl-5-HT (Baxter et al., 1995) induced significant inhibition of the pressor effect obtained



**Fig. 7.** Effect of intravenous administration of (A) WAY-100,635 (100 μg/kg) on the inhibition produced by infusion of 8-OH-DPAT (5 μg/kg/min) and (B) spiperone (125 μg/kg) or SB206553 (0.5 mg/kg) on the inhibition produced by α-methyl-5-HT (5 μg/kg/min) on electrically induced pressor responses in eight-week diabetes pithed rats (S-R E2). Data are mean ± S.E.M. \**P*<0.05 vs E0 control.

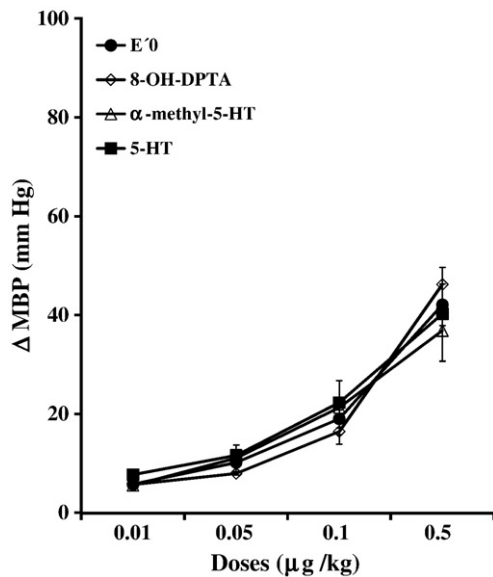
by electrical stimulation of sympathetic outflow in chronic diabetic rats; this effect was not described before in normoglycaemic or in four-week-old diabetic rats (Morán et al., 1994, 1998; García et al., 2005, 2006).

None of the following agonists induced any effect on the sympathetic pressor responses induced by electrical stimulation: the 5-HT<sub>1B</sub> receptor agonist CGS-12066B (Tomkins and O'Neill, 2000), the 5-HT<sub>1D</sub> receptor agonist L-694,247 (Bühlen et al., 1996), the selective 5-HT<sub>2B</sub> receptor agonist BW-723C86 (Kennett et al., 1996, 1997), the 5-HT<sub>2C</sub> selective agonist MK212 (Hemrick-Luecke and Fuller, 1996) or the 5-HT<sub>3</sub> receptor agonist 1-phenylbiguanide (Chen et al., 1991). These results led us to completely exclude involvement of these serotonergic receptor types/subtypes in 5-HT inhibitory action on the pressor effect induced by sympathetic stimulation.

Therefore, we hypothesize that the eight-week hyperglycaemic state in rats produces significant changes in the serotonergic receptors involved in 5-HT inhibitory activity: 5-HT<sub>1</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors are responsible for the inhibition on the pressor responses induced by electrical stimulation. These results are partly in accordance with our previous works in normoglycaemic and four-week-old diabetic rats (Morán et al., 1994, 1998; García et al., 2005, 2006) and with others (Villalón et al., 1995a, b, c) or even in other species (McGrath, 1997).

The non-selective 5-HT<sub>1</sub> antagonist methiothepin (Hoyer et al., 1994) blocked the electrically induced pressor responses *per se*, and this inhibitory effect may be accounted for by the affinity of this antagonist for α<sub>1</sub>-adrenoceptors (Leysen et al., 1985; Fernández et al.,





**Fig. 8.** Effect of continuous infusion of 5-HT (20 μg/kg/min), 8-OH-DPAT (5 μg/kg/min) and α-methyl-5-HT (5 μg/kg/min) on increases in mean blood pressure induced by exogenous intravenous administration of noradrenaline in eight-week diabetes pithed rats (S-R E'2) from the E'0 dose-response curve. Data are mean ± S.E.M. There were no statistically significant differences from the corresponding E'0 control values ( $P < 0.05$ ).

2000). In this context, the inhibition of electrically induced pressor responses by 5-HT (20 μg/kg/min) could not be elicited after intravenous treatment with methiothepin (100 μg/kg) because of the marked inhibition produced by methiothepin itself.

Pre-treatment with selective antagonists such as WAY-100,635, a selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist (Rodgers and Cole, 1994), the 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonist ritanserin (Ogawa et al., 2002) or the selective 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist spiperone (Hoyer et al., 1994) partially blocked the inhibitory effect of 5-HT. Intravenous pre-treatment with the 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist MDL7222 (Richardson et al., 1986), the selective 5-HT<sub>2B/2C</sub> antagonist SB206553 (Kogan et al., 2002) or the 5-HT<sub>7</sub> receptor antagonist pimozone (Roth et al., 1994) did not modify the inhibitory action induced by 5-HT. Hence, neither 5-HT<sub>3</sub> receptors nor 5-HT<sub>7</sub> receptors are devoid of any action in the inhibitory effect of 5-HT on the sympathetic electrically induced pressor responses induced in eight-week hyperglycaemic rats.

The inhibitory effect of 5-HT is mimicked by the selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT (Yoshitake and Kehr, 2004). 5-HT and 8-OH-DPAT, which display a similar agonist potency for this receptor subtype ( $pEC_{50}$  values of 8.2 and 8.6, respectively) (Hoyer et al., 1994) inhibited, with an apparently similar intensity, the pressor effect obtained by electrical stimulation. Castillo et al. (1994) proposed that 8-OH-DPAT inhibitory action could be explained by the activation of α<sub>2</sub>-presynaptic receptors by this agonist. However, the total reversibility of the 8-OH-DPAT-induced inhibitory effect after the administration of WAY-100,635 and with the partial blocking obtained with this antagonist on the inhibitory effect of 5-HT confirms the participation of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor subtype on this inhibitory activity. All of these results support the hypothesis that the 5-HT<sub>1A</sub> receptor subtype is involved in the inhibitory effect induced by 5-HT on the sympathetic electrically stimulated pressor responses.

In eight-week diabetic rats, the inhibitory action induced by 5-HT was reproduced by α-methyl-5-HT. Pre-treatment with the selective 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist spiperone (Hoyer et al., 1994) completely reversed the inhibition induced by α-methyl-5-HT. However, intravenous pre-treatment with the 5-HT<sub>2B/2C</sub> receptor antagonist SB206563 (0.5 mg/kg) did not modify the α-methyl-5-HT inhibitory effect. Besides, the 5-HT inhibitory effect (20 μg/kg/min) was partially blocked

by intravenous administration of spiperone (125 μg/kg). These data confirm that the 5-HT<sub>2</sub> receptor inhibition induced by 5-HT is mainly due to activation of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor.

Simultaneous pre-treatment with the antagonists WAY-100,635 and spiperone led to total reversal of the inhibitory responses induced by 20 μg/kg/min of 5-HT. Consequently, all of these data strongly suggest that 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> are the receptors involved in the serotonergic inhibitory response on vascular sympathetic outflow in the eight-week hyperglycaemic in rats.

The present data are in contrast with our previous results in normoglycaemic rats in which 5-HT<sub>1D</sub> receptors were mainly involved in the inhibitory action (although this inhibition was also modulated by 5-HT<sub>1A</sub> receptors) (Morán et al., 1998). According to our previous results in four-week-old diabetic rats (García et al., 2005, 2006) and in contrast to the situation seen in normoglycaemic rats, eight-week alloxan-induced hyperglycaemia in rats leads to major involvement of the 5-HT<sub>1A</sub> receptors, whereas activation of the 5-HT<sub>1D</sub> receptor is devoid of this inhibitory effect in diabetes.

The inhibition induced by activation of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor in diabetic rats over eight weeks was not observed in diabetic rats over four weeks or in normoglycaemic rats. It is well known that 5-HT<sub>2</sub> receptor activation by 5-HT in big blood vessels induces vasoconstriction, and that this effect is antagonized by 5-HT<sub>2</sub> receptor blockade (Gradin et al., 1986; Umrani et al., 2003). However, Vanhoutte (1987, 2000) proposed that, at the endothelial level, this receptor activation induces vasodilatation due to release of endothelium-derived relaxant factor (EDRF).

The differences between long-term diabetic rats and short-term diabetic rats or normoglycaemic rats can be related to modifications in vascular reactivity or in the changes in sensitivity of the peripheral nervous system or to endothelial dysfunction provoked by diabetes over eight weeks (De Vriese et al., 2000; Miranda et al., 2000, 2002). However, the current study is in accordance with some data by Sandrini et al. (1997) pointing to an increase in the 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptor population in alloxan-treated diabetic rats.

All the agonists used in the present study had a higher potency at lower stimulation frequencies. These results are consistent with those reported by Villalón et al. (1995a,b), following the pattern of other pre-junctional modulators of NA release from sympathetic nerves.

As we reported in normoglycaemic and diabetic rats (Morán et al., 1994, 1998; García et al., 2005, 2006), the agonists used failed to inhibit the pressor responses evoked by intravenous administration of NA. We thus confirm the mainly pre-junctional nature of this inhibition. Nevertheless, this hypothesis, as has been proposed in anaesthetized cats (Jones et al., 1995) and rats (Ireland and Jordán, 1987), does not exclude the possible ganglionic location of these receptors.

## 5. Conclusion

The present study suggests that the long-term hyperglycaemic state induces changes in the receptor type/subtype involved in the 5-HT inhibitory action on the sympathetic pressor responses induced by electrical stimulation. This inhibitory effect is mainly mediated by pre-junctional 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors in eight-week diabetic pithed rats.

## References

- Agrawal, D.K., Bhimji, S., McNeill, J.H., 1987. Effect of chronic experimental diabetes on vascular smooth muscle function in rabbit carotid artery. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 9, 584–593.
- Andersson, D., Brunkwall, J., Bergqvist, D., Edvinsson, E., 1992. Diminished contractile responses to neuropeptide Y of arteries from diabetic rats. *J. Auton. Nerv. Syst.* 37, 215–222.
- Baxter, G., Kennett, G., Blaney, F., Blackburn, T., 1995. 5-HT<sub>2</sub> receptor subtypes: a family reunited? *TIPS* 16, 105–110.

- Bühlen, M., Fink, K., Böing, C., Göthert, M., 1996. Evidence for presynaptic location of inhibitory 5-HT<sub>1D</sub> beta-like autoreceptors in the guinea-pig brain cortex. *Naunyn Sch. Arch. Pharmacol.* 353, 281–289.
- Castillo, C., Ibarra, M., Terron, J.A., Villalón, C.M., 1994. Direct effects of indorenate and 8-OH-DPAT on the blood pressure of pithed rats. *Drug Develop. Res.* 33, 20–25.
- Chan, N.N., Vallance, P., Colhoun, H.M., 2000. Nitric oxide and vascular responses in type I diabetes. *Diabetologia* 43, 1137–1147.
- Chen, J., Van Praag, H.M., Gardner, E.L., 1991. Activation of 5-HT<sub>3</sub> receptor by 1-phenylbiguanide increases dopamine release in the rat nucleus accumbens. *Brain Res.* 543, 354–357.
- Cicin-Sain, L., Jernej, B., 1996. Reduction of gastrointestinal serotonin in alloxan-diabetic rats: reversal by 5-hydroxytryptophan treatment. *Behav. Brain Res.* 73, 285–288.
- De Vriese, A.S., Verbeuren, T.J., Van de Voorde, J., Lameire, N.H., Vanhoutte, P.M., 2000. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br. J. Pharmacol.* 130, 963–974.
- Docherty, J.R., 1988. Investigation of cardiovascular 5-HT receptors subtypes in the rat. *Naunyn Schmied Arch. Pharmacol.* 337, 1–8.
- Doggrell, S.A., 2004. Sarpogrelate: cardiovascular and renal clinical potential. *Expert Opin. Investig. Drugs* 13, 865–874.
- Fernández, M.M., Calama, E., Morán, A., Martín, M.L., San Román, L., 2000. Characterization of mechanisms involved in presynaptic inhibition of sympathetic pressor effects induced by some 5-HT<sub>1</sub> receptor antagonists. *J. Auton. Pharmacol.* 20, 313–323.
- Fink, K.B., Göthert, M., 2007. 5-HT receptor regulation of neurotransmitter release. *Pharmacol. Rev.* 59, 360–417.
- García, M., Morán, A., Calama, E., Martín, M.L., Barthelmebs, M., San Román, L., 2005. 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.* 145, 593–601.
- García, M., Morán, A., Martín, M.L., Barthelmebs, M., San Román, L., 2006. The nitric oxide synthesis/pathway mediates the inhibitory serotonergic responses of the pressor effect elicited by sympathetic stimulation in diabetic pithed rats. *Eur. J. Pharmacol.* 537, 126–134.
- Gillespie, J.S., Muir, J.C., 1967. A method of stimulating the complete sympathetic outflow from the spinal cord to blood vessels in the pithed rat. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 30, 78–87.
- Gradin, K., Dahlof, C., Persson, B., 1986. A low dietary sodium intake reduces neuronal noradrenaline release and the blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Naunyn Schmied Arch. Pharmacol.* 332, 364–369.
- Hemrick-Luecke, S.K., Fuller, R.W., 1996. Involvement of 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the elevation of rat serum corticosterone concentrations by quipazine and MK-212. *Eur. J. Pharmacol.* 311, 207–211.
- Hoyer, D., Clarke, D.E., Fozard, J.R., Hartig, P.R., Martin, G.R., Mylecharane, E.J., Saxena, P.R., Humphrey, P.P., 1994. International Union of Pharmacology classification of receptors of 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacol. Rev.* 46, 157–203.
- Ireland, S.J., Jordán, C.C., 1987. Pharmacological characterization of 5-hydroxytryptamine-induced hyperpolarization of the rat superior cervical ganglion. *Br. J. Pharmacol.* 92, 417–427.
- Jones, J.F.X., Martin, G.R., Ramage, A.G., 1995. Evidence that 5-HT<sub>1D</sub> receptors mediate inhibition of sympathetic ganglionic transmission in anaesthetized cats. *Br. J. Pharmacol.* 116, 1715–1717.
- Kasho, M., Sakai, M., Sasahara, T., Anami, Y., Matsumura, T., Takemura, T., Matsuda, H., Kobori, S., Shichiri, M., 1998. Serotonin enhances the production of type IV collagen by human mesangial cells. *Kidney Int.* 54, 1083–1092.
- Kennett, G.A., Wood, M.D., Bright, F., Cilia, J., Piper, D.C., Gager, T., Thomas, D., Baxter, G.S., Forbes, I.T., Ham, P., 1996. Effects of the 5-HT<sub>2B</sub> receptor agonist, BW 723C86, on three rat models of anxiety. *Br. J. Pharmacol.* 117, 1443–1450.
- Kennett, G.A., Wood, M.D., Bright, F., Trail, B., Riley, G., Holland, V., Avenell, K.Y., Stean, T., Upton, N., Bromidge, S., Forbes, I.T., Brown, A.M., Middlemiss, D.N., Blackburn, T.P., 1997. BW 723C86, a 5-HT<sub>2B</sub> receptor agonist, causes hyperphagia and reduced grooming in rats. *Neuropharmacol.* 36, 233–240.
- Kogan, H.A., Marsden, C.A., Fone, K.C., 2002. DR 4004, a putative 5-HT<sub>7</sub> receptor antagonist, also has functional activity at the dopamine receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 449, 105–112.
- Leysen, J.E., Gommeren, W., Van Gompel, P., Wynants, J., Janssen, P.F., Laduron, P.M., 1985. Receptor-binding properties in vitro and in vivo of ritanserin: a very potent and long acting serotonin-5<sub>2</sub> antagonist. *Mol. Pharmacol.* 27, 600–611.
- McGrath, M.A., 1997. 5-HT and neurotransmitter release in canine blood vessels. *Cir. Res.* 41, 428–435.
- Miranda, F.J., Alabadi, J.A., Llorens, S., Ruiz de Apodaca, R.F., Centeno, J.M., Alborch, E., 2000. Diabetes-induced changes in endothelial mechanisms implicated in rabbit carotid arterial response to 5-hydroxytryptamine. *Eur. J. Pharmacol.* 401, 397–402.
- Miranda, F.J., Alabadi, J.A., Llorens, S., Ruiz de Apodaca, R.F., Centeno, J.M., Alborch, E., 2002. Experimental diabetes induces hyperreactivity of rabbit renal artery to 5-hydroxytryptamine. *Eur. J. Pharmacol.* 439, 121–127.
- Morán, A., Velasco, C., Salvador, T., Martín, M.L., San Román, L., 1994. Inhibitory 5-hydroxytryptamine receptors involved in pressor effects obtained by stimulation of sympathetic outflow from spinal cord in pithed rats. *Br. J. Pharmacol.* 113, 1358–1362.
- Morán, A., Fernández, M.M., Velasco, C., Martín, M.L., San Román, L., 1998. Characterization of prejunctional 5-HT<sub>1</sub> receptors that mediate the inhibition of pressor effects elicited by sympathetic stimulation in the pithed rats. *Br. J. Pharmacol.* 123, 1205–1213.
- Morán, A., de Urbina, A.V., Martín, M.L., Rodríguez-Barbero, A., San Román, L., 2009. Characterization of the contractile 5-hydroxytryptamine receptor in the autoperfused kidney of L-NAME hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* 620, 90–96.
- Ni, W., Zhou, H., Diaz, J., Murphy, D.L., Haywood, J.R., Watts, S.W., 2008. Lack of the serotonin transporter does not prevent mineralocorticoid hypertension in rat and mouse. *Eur. J. Pharmacol.* 589, 225–227.
- Ogawa, S., Takeuchi, K., Sugimura, K., Sato, C., Fukuda, M., Lee, R., Ito, S., Sato, T., 1999. The 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonist sarpogrelate reduces urinary and plasma levels of thromboxane A<sub>2</sub> and urinary albumin excretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 26, 461–464.
- Ogawa, S., Takeuchi, K., Sugimura, K., Sato, C., Fukuda, M., Lee, R., Ito, S., Sato, T., 2002. Profiles of R 9654, the active form of novel 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist R 102444. *Eur. J. Pharmacol.* 457, 107–112.
- Ralevic, V., Belai, A., Burnstock, G., 1993. Impaired sensory-motor nerve function in the isolated mesenteric arterial bed of streptozotocin-diabetic and ganglioside-treated streptozotocin-diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* 110, 1105–1111.
- Ramage, A.G., Villalón, C.M., 2008. 5-Hydroxytryptamine and cardiovascular regulation. *Trends Pharmacol. Sci.* 29, 472–481.
- Richardson, B.P., Engel, G., Donatsch, P., Stadler, P.A., 1986. The pharmacology and function of 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Trends Neurosci.* 9, 424–428.
- Rodgers, R.J., Cole, J.C., 1994. Anxiolytic-like effect of (S)-Way 100135, a 5HT<sub>1A</sub> receptor antagonist in the murine. Elevated plus-maze test. *Eur. J. Pharmacol.* 261, 321–330.
- Roth, B.L., Craigo, S.C., Choudhar, M.S., Uluer, A., Monsma Jr., F.J., Shen, Y., Meltzer, H.Y., Sibley, D.R., 1994. Binding of typical and atypical antipsychotic agents to 5-hydroxytryptamine 6 and 5-hydroxytryptamine-7 receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268, 1403–1410.
- Sandrini, M., Vitale, G., Vergoni, A.V., Ottani, A., Bertolini, A., 1997. Streptozotocin-induced diabetes provokes changes in serotonin concentration and on 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2D</sub> receptors in the rat brain. *Life Sci.* 60, 1393–1397.
- Taylor, P.D., Oon, B.B., Thomas, C.R., Poston, L., 1994. 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.* 111, 35–41.
- Tomkins, D.M., O'Neill, M.F., 2000. Effect of 5-HT(1B) receptor ligand on self-administration of ethanol in an operant procedure in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 66, 129–136.
- Umrani, D.N., Bodiwala, D.N., Goyal, R.K., 2003. Effect of sarpogrelate on altered STZ-diabetes induced cardiovascular responses to 5-hydroxytryptamine in rats. *Mol. Cel. Biochem.* 249, 53–57.
- Vanhoutte, P.M., 1987. Endothelium and responsiveness of vascular smooth muscle. *J. Hypertens.* 5, 115–120.
- Vanhoutte, P.M., 2000. Say NO to ET. *J. Auton. Nerv. Syst.* 81, 271–277.
- Villalón, C.M., Centurión, D., 2007. Cardiovascular responses produced by 5-hydroxytryptamine a pharmacological update on the receptor/mechanisms involved and therapeutic implications. *Naunyn-Schmied Arch. Pharmacol.* 376, 45–63.
- Villalón, C.M., Contreras, J., Ramirez-San Juan, E., Castillo, C., Perusquia, M., Lopez-Munoz, F.J., Terron, J.A., 1995a. 5-Hydroxytryptamine inhibits pressor responses to preganglionic sympathetic nerve stimulation in pithed rats. *Life Sci.* 57, 803–812.
- Villalón, C.M., Contreras, J., Ramirez-San Juan, E., Castillo, C., Perusquia, M., Terrón, J.A., 1995b. Characterization of prejunctional 5-HT receptors mediating inhibition of sympathetic vasopressor responses in the pithed rats. *Br. J. Pharmacol.* 116, 3330–3336.
- Villalón, C.M., Contreras, J., Ramírez-San Juan, E., Terrón, J.A., 1995c. 5-HT receptors mediating inhibition of pressor responses to electrical sympathetic stimulation in pithed rats. *Br. J. Pharmacol.* 114, 161.
- Villalón, C.M., Centurión, D., Rabelo, G., De Vries, P., Saxena, P.R., Sánchez-López, A., 1998. The 5-HT<sub>1</sub>-like receptors mediating inhibition of sympathetic vasopressor outflow in the pithed rat: operational correlation with the 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, and 5-HT<sub>1D</sub> subtypes. *Br. J. Pharmacol.* 124, 1001–1011.
- Wood, M., Chaubey, M., Atkinson, P., Thomas, D.R., 2000. Antagonist activity of meta-chlorophenylpiperazine and partial agonist activity of 8-OH-DPAT at the 5-HT(7) receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 12, 1–8.
- Yoshitake, T., Kehr, J., 2004. 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.* 74, 288–295.

## Resultados y discusión. Artículo 1

Resultados previos de nuestro equipo de investigación y de otros sugieren que la hiperglucemia y la hipertensión experimental inducen cambios significativos en la modulación de la neurotransmisión simpática vascular de 5-HT (García *et al.*, 2005,2006; Ni *et al.*, 2008; Morán *et al.*, 2009).

En este trabajo, se estudió el efecto de la diabetes experimental a largo plazo en la acción inhibitoria de 5-HT sobre la respuesta presora inducida por estimulación simpática en ratas desmeduladas. El agente diabetógeno utilizado fue el aloxano, el cual induce un síndrome parecido a la DM tipo 1 y se usa comúnmente como un modelo experimental de diabetes en los animales (Agrawal *et al.*, 1987; Chan *et al.*, 2000; Miranda *et al.*, 2002; García *et al.*, 2005; 2006).

Ocho semanas después de la administración del aloxano, las ratas fueron anestesiadas, pretratadas con atropina y desmeduladas. En ese modelo experimental, analizamos el efecto de 5-HT sobre las respuestas presoras obtenidas por estimulación eléctrica del flujo simpático total.

5-HT (20  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ) disminuyó el efecto presor obtenido por estimulación eléctrica del flujo simpático. Sin embargo, serotonina no modificó las respuestas obtenidas por administración de NA exógena

5-CT (5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ), 8-OH-DPAT (5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ) y  $\alpha$ -metil-5-HT (5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ), agonistas selectivos de receptores 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> respectivamente, fueron capaces de reproducir la acción inhibitoria producida por 5-HT.

Sin embargo, la perfusión de 5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  de 1-fenilbiguanida, CGS-12066B, L-694,247, BW273C86 o MK212 (agonistas selectivos de los receptores 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> y 5-HT<sub>2C</sub>, respectivamente) no tuvieron ningún efecto sobre las respuestas presoras inducidas por estimulación simpática total.

Metiotepina (100 µg/kg) y WAY-100,635 (100 µg/kg) + espiperona (125 µg/kg) bloquearon el efecto inhibitor producido por 5-HT. Además, WAY-100,635 bloqueo completamente el efecto inhibitor de 8-OH-DPAT mientras que espiperona revirtió la acción producida por  $\alpha$ -metil-5-HT.

En nuestros experimentos en ratas diabéticas, fue necesario el uso de un voltaje supramáximal superior al utilizado en ratas normoglucémicas y el aumento de la presión arterial media (PAM) en ratas con diabetes crónica (de ocho semanas) fue mayor que el obtenido en ratas normoglucémicas y ratas diabéticas de cuatro semanas (García *et al.*, 2005, 2006). Las diferencias entre las ratas diabéticas y ratas normoglucémicas podría deberse a una disfunción del sistema nervioso autónomo, aunque esta hipótesis es controvertida debido a que algunos autores han propuesto un aumento de la reactividad vascular a agentes adrenérgicos (Taylor *et al.*, 1994), otros han demostrado una atenuación de las respuestas simpáticas contráctiles (Andersson *et al.*, 1992) o incluso, otros autores no han obtenido ninguna modificación (Ralevic *et al.*, 1993).

Este trabajo reveló que en ratas Wistar con diabetes crónica, así como ocurría en ratas normoglucémicas, 5-HT interfiere con la neurotransmisión adrenérgica y reduce el aumento de presión arterial obtenida por estimulación simpática. Sin embargo, no afecta a los aumentos de presión arterial provocados por la administración de NA exógena.

Las dosis usadas de 5-HT inducen una inhibición significativa de las respuestas presoras a todas las frecuencias de estimulación. Esta acción inhibitora fue mayor a las frecuencias de estimulación más bajas, llegando a una inhibición del 80%, tanto en ratas diabéticas como en ratas normoglucémicas. Este incremento en el efecto inhibitor propuesto por nosotros y por otros investigadoras (Docherty, 1988; Morán *et al.*, 1994; García *et al.*, 2005) y la naturaleza presináptica de los receptores nos llevó a la hipótesis de que la existencia de diabetes experimental no modifica la acción inhibitora de 5-HT sobre los incrementos de presión arterial obtenidos por estimulación simpática (García *et al.*, 2005, 2006).

El agonista selectivo de receptores 5-HT<sub>1/7</sub>, 5-CT (Wood *et al.*, 2000), indujo una marcada inhibición en ratas diabéticas de ocho semanas. Del mismo modo, el

agonista de receptores 5-HT<sub>2</sub>,  $\alpha$ -metil-5-HT, (Baxter *et al.*, 1995) indujo una inhibición significativa del efecto presor obtenido por estimulación eléctrica del flujo simpático en ratas con diabetes crónica. Este efecto de  $\alpha$ -metil-5-HT no ha sido descrito ni en ratas normoglucémicas ni en ratas diabéticas de cuatro semanas (Morán *et al.*, 1994, 1998; García *et al.*, 2005, 2006).

Ninguno de los agonistas mencionados a continuación produce ningún efecto sobre las respuestas presoras simpática inducida por estimulación eléctrica: CGS-12066B (agonista selectivo de receptores 5-HT<sub>1B</sub>) (Tomkins y O'Neill, 2000), L-694, 247 (agonista selectivo de receptores 5-HT<sub>1D</sub>) (Bühlen *et al.*, 1996), BW-723C86 (agonista selectivo de receptores 5-HT<sub>2B</sub>) (Kennett *et al.*, 1996; 1997), MK212 (agonista selectivo 5-HT<sub>2C</sub>) (Hemrick-Luecke y Fuller, 1996) y 1-fenilbiguanida (agonista selectivo de receptores 5-HT<sub>3</sub>) (Chen *et al.*, 1991). Estos resultados nos llevaron a excluir por completo la participación de estos tipos/subtipos de receptores serotoninérgicos en la acción inhibidora de 5-HT sobre el efecto presor inducido por estimulación simpática.

Por lo tanto, nuestra hipótesis de trabajo es que el estado hiperglucémicos en ratas de ocho semanas produce cambios significativos en los receptores serotoninérgicos implicados en la actividad inhibidora de 5-HT: los receptores 5-HT<sub>1</sub> y 5-HT<sub>2</sub> son responsables de esta acción inhibidora. Estos resultados están, en parte, de acuerdo con trabajos previos realizados por nosotros en ratas normoglucémicos y diabéticas de cuatro semanas (Morán *et al.*, 1994, 1998; García *et al.*, 2005, 2006) y con otros (Villalón *et al.*, 1995a,b,c) o incluso estudios realizado en otras especies animales (McGrath, 1997).

El antagonista no selectivo de receptores 5-HT<sub>1</sub>, metiotepina (Hoyer *et al.*, 1994) bloqueó *per se* la respuesta presora inducida eléctricamente, y este efecto inhibitor puede explicarse por la afinidad de este antagonista por los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos (Leysen *et al.*, 1985; Fernández *et al.*, 2000). En este contexto, la inhibición de las respuestas presoras inducida eléctricamente por 5-HT (20  $\mu$ g/kg/min) no pudo ser obtenida después del tratamiento intravenoso con metiotepina (100  $\mu$ g/kg) debido a la marcada inhibición producida por la propia metiotepina.

El pretratamiento con antagonistas selectivos tales como WAY-100,635, antagonista selectivo de receptores 5-HT<sub>1A</sub> (Rodgers y Cole, 1994), ritanserina, antagonista selectivo de receptores 5-HT<sub>2</sub> (Ogawa *et al.*, 2002) o espiperona, antagonista selectivo de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> (Hoyer *et al.*, 1994) bloqueó parcialmente el efecto inhibitor de 5-HT. El pretratamiento intravenoso con el antagonista selectivo de los receptores 5-HT<sub>3</sub>, MDL7222 (Richardson *et al.*, 1986), con el antagonista selectivo 5-HT<sub>2B/2C</sub>, SB206553 (Kogan *et al.*, 2002) o con el antagonista selectivo de receptores 5-HT<sub>7</sub>, pimozide (Roth *et al.*, 1994) no modificaron la acción inhibitora inducida por 5-HT. Por lo tanto, los receptores 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>7</sub> no contribuyen al efecto inhibitor que 5-HT tiene sobre las respuestas presoras simpáticas inducida eléctricamente en ratas hiperglucémicas de ocho semanas.

El efecto inhibitor de 5-CT es reproducido por el agonista selectivo de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 8-OH-DPAT (Yoshitake y Kehr, 2004). 5-CT y 8-OH-DPAT, que muestran una potencia agonista similar para este subtipo de receptor (valores pEC<sub>50</sub> de 8.2 y 8.6, respectivamente) (Hoyer *et al.*, 1994) inhiben, con una intensidad aparentemente similar, el efecto presor obtenido por estimulación eléctrica. Castillo *et al.*, (1994) propuso que la acción inhibitora de 8-OH-DPAT podría explicarse por la activación de receptores  $\alpha_2$ -presinápticos producida por este agonista. Sin embargo, la reversibilidad total del efecto inhibitor inducido por 8-OH-DPAT tras la administración de WAY-100,635 y el bloqueo parcial obtenido con este antagonista sobre el efecto inhibitor de 5-HT confirma la participación del subtipo de receptor 5-HT<sub>1A</sub> en esta actividad inhibitora. Todos estos resultados apoyan nuestra hipótesis de que el subtipo de receptor 5-HT<sub>1A</sub> está involucrado en el efecto inhibitor inducido por 5-HT en las respuestas presoras simpáticas producidas por estimulación eléctrica.

En las ratas diabéticas de ocho semanas, la acción inhibitora de 5-HT fue reproducida por  $\alpha$ -metil-5-HT. El tratamiento previo con el antagonista selectivo de receptores 5-HT<sub>2A</sub>, espiperona (Hoyer *et al.*, 1994) revirtió completamente la acción inhibitora de  $\alpha$ -metil-5-HT. Sin embargo, el pretratamiento intravenoso con el antagonista selectivo de receptores 5-HT<sub>2B/2C</sub>, SB206563 (0.5 mg/kg) no modificó el efecto inhibitor de  $\alpha$ -metil-5-HT. Además, el efecto inhibitor de 5-HT (20  $\mu$ g/kg/min) fue parcialmente bloqueado por la administración intravenosa de espiperona (125

$\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Estos datos confirman que la inhibición producida por 5-HT, a través de los receptores 5-HT<sub>2</sub>, se debe principalmente a la activación del receptor 5-HT<sub>2A</sub>.

El pretratamiento simultáneo con el antagonista WAY-100,635 y espiperona llevó a la reversión total de la respuesta inhibitoria inducida por 20  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  de 5-HT. En consecuencia, todos estos datos sugieren que los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub> son los principales implicados en la respuesta inhibitoria que serotonina ejerce sobre el flujo simpático vascular en ratas hiperglucémicas de ocho semanas.

Estos resultados contrastan con nuestros resultados previos en ratas normoglucémicas, en las cuales el subtipo 5-HT<sub>1D</sub> era el principal involucrado en esta acción inhibitoria (aunque esta inhibición fue también modulada por los receptores 5-HT<sub>1A</sub>) (Morán *et al.*, 1998). La hiperglucemia de ocho semanas inducida por aloxano en ratas da lugar a una participación importante de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, mientras que los receptores 5-HT<sub>1D</sub> carecen de activación en este efecto inhibitorio en la diabetes; al igual que ocurría en una situación de hiperglucemia de cuatro semanas (García *et al.*, 2005, 2006) y en contraste con la situación vista en animales normoglucémicos (Morán *et al.*, 1998).

La inhibición inducida por activación de receptores 5-HT<sub>2A</sub> en ratas diabéticas durante ocho semanas no se observó en ratas diabéticas de cuatro semanas ni en ratas normoglucémicas. Es bien conocido que la activación de los receptores 5-HT<sub>2</sub> por serotonina en los grandes vasos sanguíneos induce vasoconstricción, y que este efecto es antagonizado bloqueando dichos receptores (Gradin *et al.*, 1986; Umrani *et al.*, 2003). Sin embargo, Vanhoutte (1987, 2000) propuso que, a nivel endotelial, la activación de este receptor induce vasodilatación debido a la liberación de EDRF.

Las diferencias entre las ratas diabéticas a largo plazo y las ratas diabéticas a corto plazo o ratas normoglucémicas puede estar relacionado con cambios en la reactividad vascular o con los cambios en la sensibilidad del sistema nervioso periférico o la disfunción endotelial provocada por la diabetes de más de ocho semanas (De Vriese *et al.*, 2000; Miranda *et al.*, 2000, 2002). Nuestros resultados coinciden con otros resultados que apuntan a un incremento en la población de receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2</sub> en ratas diabéticas tratadas con aloxano (Sandrini *et al.*, 1997).

Todos los agonistas utilizados en el presente estudio tenían una mayor potencia a bajas frecuencias de estimulación, como ya fue reportado por Villalón *et al.* (1995a,b), siguiendo el modelo de otros moduladores presinápticos de la liberación de NA de los nervios simpáticos.

Como ya hemos descrito previamente en ratas normoglucémicas y diabéticas (Morán *et al.*, 1994, 1998; García *et al.*, 2005, 2006), los agonistas utilizados no fueron capaces de inhibir las respuestas presora evocada por la administración intravenosa de NA exógena, confirmando la naturaleza presináptica de esta inhibición. Pero esta hipótesis no excluye la posible ubicación ganglionar de estos receptores, como se ha propuesto en gatos anestesiados (Jones *et al.*, 1995) y ratas (Irlanda y Jordán, 1987).



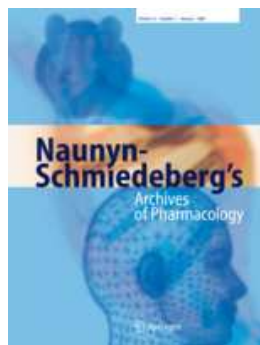
# ARTÍCULO 2

**The cyclooxygenase and nitric oxide synthesis/pathways mediate the  
inhibitory serotonergic response on the pressor effect elicited by  
sympathetic stimulation in long-term diabetic rats**

B. Restrepo, A.V. Ortiz de Urbina, C. López, M. L. Martín, L. San Román,  
M. García, A. Morán.

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2011  
(Enviado a publicar)





From: naunyn@amc.nl  
To: amoran@usal.es  
Subject: Manuscript submitted - Naunyn-00021-2011

Dear Prof. Morán Benito,

Thank you for submitting your manuscript entitled “The cyclooxygenase and nitric oxide synthesis/pathways mediate the inhibitory serotonergic response on the pressor effect elicited by sympathetic stimulation in long-term diabetic rats” to Naunyn-Schmiedeberg Archives of Pharmacology. It has been assigned manuscript number Naunyn-00021-2011 and forwarded to the responsible field editor.

The editor will inform you as soon as possible regarding the outcome of the editorial process for your manuscript. As this is the peak vacation season of editors and referees, please be aware that the editorial process may take a little longer than usual. However, rest assured that we will do our best to evaluate your manuscript as quickly as possible.

In the meantime you can log onto <http://mc.manuscriptcentral.com/naunyn> using your user ID and password. There you can see which editor is handling your manuscript and what its current status is.

If you have any questions regarding the editorial process, please feel free to contact your editor or the journal office.

Yours sincerely  
Prof. Martin C. Michel  
Editor-in-Chief  
Afd. Farmacologie  
AMC  
Meibergdreef 15  
1105 AZ Amsterdam  
The Netherlands



Naunyn-Schmiedeberg



**The cyclooxygenase and nitric oxide synthesis/pathways mediate the inhibitory serotonergic response on the pressor effect elicited by sympathetic stimulation in long-term diabetic rats**

Journal:	<i>Naunyn-Schmiedeberg Archives of Pharmacology</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original
Keywords:	5-HT, nitric oxide, eicosanoids, cardiovascular pharmacology

SCHOLARONE™  
Manuscripts

Preview



**The cyclooxygenase and nitric oxide synthesis/pathways mediate the inhibitory serotonergic response on the pressor effect elicited by sympathetic stimulation in long-term diabetic rats**

B. Restrepo<sup>1,2</sup>, A.V. Ortiz de Urbina<sup>1</sup>, C. López<sup>1</sup>, M. L. Martín<sup>1</sup>, L. San Román<sup>1</sup>, M. García<sup>1</sup>, A. Morán<sup>1,\*</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio de Farmacología, Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain.

<sup>2</sup> Grupo de Enfermedades Cardiovasculares y Metabólicas. Facultad Ciencias de la Salud, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia.

\*Asunción Morán Benito, Laboratorio de Farmacología  
Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Farmacia  
Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno  
ES-37007 Salamanca (Spain)  
E-mail: amoran@usal.es  
Tel.: 34-923-294530, Fax: 34-923-294515

**Short running title:** 5-HT sympatho-inhibition modulated by COX and NO

## Abstract

### Purpose

The goal of this study is to investigate the mechanisms involved in the 5-hydroxytryptaminergic inhibitory action on the pressor responses elicited by sympathetic stimulation in long-term diabetic pithed rats.

### Methods

Diabetes was induced in male Wistar rats by a single s.c. injection of alloxan. Eight weeks later, the animals were anaesthetized, pretreated with atropine, and pithed. 5-HT action and indirect mechanisms involved were analyzed on the pressor responses induced by stimulation of the sympathetic outflow.

### Results

In eight-week diabetic animals, 5-hydroxytryptamine (5-HT) ( $20 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) exerts an inhibitory action on the pressor effect obtained by electrical stimulation of the sympathetic outflow, which is reproduced by 8-hydroxydipropylaminotretalin hydrobromide (8-OH-DPAT) ( $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ), and  $\alpha$ -methyl-5-HT ( $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ), selective 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptor agonists.

Bolus injection of either a guanylyl cyclase inhibitor, 1*H*-[1,2,4] Oxadiazolo[4,3-*a*]quinoxalin-1-one (ODQ) ( $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), or a NO production inhibitor, N- $\omega$ -L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME), ( $10 \text{mg kg}^{-1}$ ) prior to the infusion of 8-OH-DPAT ( $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) reversed the inhibitory effect caused by 8-OH-DPAT on the electrically-induced pressor responses.

The inhibitory effect produced by infusion of  $\alpha$ -methyl 5-HT ( $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) was abolished in the presence of indomethacin ( $2 \text{mg kg}^{-1}$ ), a non-selective cyclooxygenase (COX) inhibitor, or FR 122047 ( $1.5 \text{mg kg}^{-1}$ ) or nimesulide ( $1.5 \text{mg kg}^{-1}$ ), selective COX-1 and COX-2 inhibitors respectively, in long term diabetic pithed rats.



## Conclusions

Our results indicate that 5-HT inhibition on the pressor responses induced by electrical stimulation is mediated both by nitric oxide and cyclooxygenase pathways in long-term diabetic rats.

**Keywords:** 5-HT, nitric oxide, eicosanoids, cardiovascular pharmacology.

**Abbreviations:** Bpm, beats minute<sup>-1</sup>; COX, cyclooxygenase; 5-HT, 5-hydroxytryptamine; 8-OH-DPAT, 8-hydroxydipropylaminotretalin hydrobromide; L-NAME, N- $\omega$ -L-arginine methyl ester hydrochloride; NO, nitric oxide; NOS, nitric oxide synthase; NA, noradrenaline; ODQ, 1*H*-[1,2,4] Oxadiazolo[4,3-*a*]quinoxalin-1-one; S-R curve, stimulation-response curve; EDRF, Endothelium-derived relaxing factor.

## **Introduction**

Depending on the animal species, basal vascular tone, experimental conditions, dosage and, above all, the nature of the receptors involved, 5-hydroxytryptamine (5-HT) may exert different cardiovascular responses, including bradycardia and tachycardia, hypotension and hypertension, vasodilatation and vasoconstriction (Fink and Göthert 2007; Villalón et al. 2007; Ramage and Villalón 2008).

We have already reported that 5-HT modulates cardiovascular responses to sympathetic stimulation in normoglycaemic (Morán et al. 1994, 1998; Fernández et al. 2000), short-term (García et al. 2005, 2006) and long-term (chronic) diabetic animals (Morán et al. 2010). Also, Villalón et al. (1998), working in normoglycaemic pithed male Wistar rats, have shown the involvement of 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>1D</sub> receptors on the pre-junctional inhibition of electrically-induced sympathetic outflow.

Several studies have suggested a possible role for 5-hydroxytryptamine in the pathophysiology of diabetic complications, such as nervous system alterations and diabetes-related vascular complications.

Chronic diabetes is associated with both a decrease in the cerebral concentration of 5-HT and an increase in the number of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors in the rat brain (Sandrini et al. 1997). Also, diabetes (induced by alloxan) in rats, reduces the 5-HT concentration in the gut and platelets, which is reversed by treatment with the serotonin precursor 5-hydroxytryptophan (Cicin and Jernej 1996). In contrast, increased 5-HT levels in plasma are related to the development of diabetic nephropathy (Kasho et al. 1998). Miranda et al. (2000, 2002), also suggested the existence of a diabetes-induced hyper-reactivity of renal and carotid arteries to 5-HT in rabbits. Recently, a study carried out in non-insulin-dependent patients with diabetes mellitus suggested the potential benefits of the 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonist sarpogrelate in the treatment of diabetic nephropathy (Ogawa et al. 1999; Doggrel 2004).

Dysfunction of the autonomic nervous system is common in diabetes mellitus. Moreover, functional changes in the sympathetic nervous system have been reported in animals and human diabetic subjects. Studies conducted under different experimental conditions have demonstrated the existence of regulatory 5-HT receptors on postganglionic and possibly pre-ganglionic sympathetic nerve terminals both in rats, *in vitro* and *in vivo*, (Villalón et al. 1995a, 1995b, 1995c) and cats (Jones et al. 1995). We showed *in vivo* that in long term diabetic pithed rats, 5-HT inhibits sympathetic transmission in the systemic vascular system by prejunctional activation of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors (Morán et al. 2010).

Endothelium contributes to the regulation of vascular reactivity through the release of different constrictor or relaxant substances, the equilibrium of which results in vascular tone. Diabetes induces vascular and endothelium dysfunctions (De Vriese et al. 2000). Microvascular alterations due to the diabetogenic state have been related to modifications in the vascular synthesis and concentrations of both prostanoids and nitric oxide in different species (Bagi et al. 2006; Choi et al. 1997)

Our group has already demonstrated that in short-term diabetic animals, the nitric oxide synthesis/pathway mediates the 5-HT inhibitory action on the pressor responses elicited by electrical stimulation, whereas the nitric oxide (NO) is completely devoid of any action in normoglycaemic animals (García et al. 2006).

Having into account all the previous facts, the present study was carried out to determine, in long-term diabetic pithed rats, the indirect mechanisms by which activation of prejunctional 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptor inhibits sympathetic transmission in the systemic vascular system. To do so, we analyzed the possible involvement of the cyclooxygenase (COX) or/and NO pathways (synthesis) on the serotonergic prejunctional inhibition of electrically induced sympathetic outflow.

## **Material and methods**

A total of 160 male Wistar rats (250-350 g) were used in our experiments. Rats were kept and supplied by the Animalarium of the Faculty of Pharmacy at the University of Salamanca (PAE-SA001). Housing conditions and experimental procedures were in accordance with European Union regulations on the use of animal for scientific purpose (86/609/EEC, Article 5, Appendix II) and enacted by Spanish legislation on March 14, 1988 (R.D.223/1988).

### **Diabetes induction**

Diabetes was induced in 135 animals, by a single injection of alloxan ( $150 \text{ mg kg}^{-1}$ , s.c.) in NaCl 0.9%. Then, the animals were maintained on tap water and regular food ad libitum for 8 weeks. A second group of 25 rats was maintained under the same conditions for the same time period to serve as age-matched controls.

Body weight, systolic blood pressure, heart rate and blood glucose levels were determined before and at 2, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 and 56 days after alloxan administration. Only rats with elevated blood glucose levels ( $>11 \text{ mM}$ ) at all time points were considered diabetic. Blood glucose levels were determined by test strips (Accu-Chek®). Systolic blood pressure and heart rate were measured in awake rats periodical using the tail-cuff method with a photoelectric sensor (NIPREM 546, Cibertec S.A. Madrid, Spain) along the study. Several determinations were made in each session for each animal and values were considered valid if five consecutive measurements did not differ by 10 mm Hg.

Normal rats served as controls; both groups (control and alloxan-diabetic rat) were all aged-matched.

## Animal preparation

All the animals were anaesthetized with sodium pentobarbital ( $60 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.p), and had their trachea cannulated. The rats were pithed by inserting a stainless steel rod through the orbit and foramen magnum (Gillespie and Muir 1967; García et al. 2005, 2006; Morán et al. 2010) and artificially respired with room air by a Harvard respiratory pump ( $1 \text{ ml air } 100 \text{ g}^{-1}$ ;  $50 \text{ strokes min}^{-1}$ ).

The right and the left jugular veins were cannulated for the infusion of agonists and for the administration of antagonists respectively and the left carotid artery was connected to a PRS 205 amplifier (Cibertec, Spain), displaying the blood pressure recordings on one channel of a Leticia Polygraph 4000 (Cibertec, Spain). Heart rate was measured by analysis of the blood pressure data with a Car 1000 tachograph (Cibertec, Spain) connected to the same PRS 205 amplifier.

The entire sympathetic outflow from the spinal cord was stimulated using a Cibertec Stimulator CS-9.

Two electrodes were employed: one was connected to the pithing rod (the stimulating electrode), while the other one (the indifferent electrode) was inserted subcutaneously into a leg.

Before electrical stimulation, the animals were treated with heparin ( $1000 \text{ UI kg}^{-1}$ ), and then received dtubocurarine ( $2 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.v.) to prevent electrically-induced muscular twitching, and atropine ( $1 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.v.) to prevent cholinergic effects.

## Experimental protocols

After reaching a stable haemodynamic condition for  $\geq 10 \text{ min}$ , baseline values of mean blood pressure and heart rate were determined. Then, sympathetic vasopressor outflow was stimulated by applying trains of  $25 \text{ s}$ , consisting of monophasic pulses of  $1 \text{ ms}$  duration and supra-maximal intensity ( $27.5 \pm 2.5 \text{ V}$  for diabetic rats and  $15 \pm 3 \text{ V}$  for normoglycaemic animals) at increasing frequencies ( $0.1, 0.5, 1$  and  $5 \text{ Hz}$ ).

Thus, the control stimulation-response curve (S-R curve E0) was completed in 20 min. At this point, rats were divided into different groups; each group was split into different subgroups, taking into account that each animal was used to evaluate only one respective dose of agonist or antagonist. Each dose was repeated up to a total of five experiments.

The first group represented the confirmation group for results previously obtained by us (Morán et al. 1994, 1998, 2010). This group (n= 75) was subdivided into three different subgroups: the normoglycaemic one and the two long-term diabetic ones.

In the normoglycaemic subgroup (n=25) each rat received a continuous intravenous infusion (using the Harvard model 122 pump (Cibertec)) of one of the following: saline solution (1 ml h<sup>-1</sup>, n=5, control group for all the agonist treatments); 5-HT (20 µg kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, n=5); the selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist, 8-hydroxydipropylaminotetralin hydrobromide (8-OH-DPAT) (5 µg kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, n=5); 2-[5-[3-(4- methylsulfonylamino) benzyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-1H-indol-3-yl]ethanamine (L-694,247) (5 µg kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, n=5), a selective non-rodent 5-HT<sub>1B</sub> receptor and 5-HT<sub>1D</sub> receptor agonist; or a selective 5-HT<sub>2A/2B/2C</sub> receptor agonist, α-methyl-5-HT (20 µg kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, n=5). After 5 min of the corresponding infusion, three new S-R curves (E1, E2 and E3) were obtained as described above for the S-R curve E0. Each infusion was maintained for 1 h.

In the first subgroup of alloxan-treated long-term diabetic group (n=25), each rat received a continuous intravenous infusion of one of the following: saline solution (1 ml h<sup>-1</sup>, n=5, control group for all the agonist treatments); 5-HT (20 µg kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, n=5); the selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist, 8-OH-DPAT (5 µg kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, n=5); the selective non-rodent 5-HT<sub>1B</sub> receptor and 5-HT<sub>1D</sub> receptor agonist, L-694,247 (5 µg kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, n=5); or the selective 5-HT<sub>2A/2B/2C</sub> receptor agonist, α-methyl-5-HT (5 µg kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, n=5). The S-R curves were constructed in the same conditions as for the infusions in the normoglycaemic control group.

In the second subgroup (n=20) of long-term diabetic rats, blood pressure dose-response curves by intravenous administration of exogenous noradrenaline (NA) (0.01, 0.05, 0.1

and  $0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) were constructed before (E'0) and during (E'1, E'2, and E'3) the continuous infusion of saline solution ( $1 \text{ ml h}^{-1}$ ,  $n=5$ ); 5-HT ( $20 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ,  $n=5$ ); 8-OH-DPAT ( $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ,  $n=5$ ); or  $\alpha$ -methyl-5-HT ( $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ,  $n=5$ ), respectively. Accordingly, four dose-response curves for NA were obtained per rat. The infusions were started 5 min after the first dose-response curve (E'0) was elicited and were maintained over 1 h.

The second group ( $n=40$ ) of experiments was performed in long-term diabetic rats, the animals received either a selective inhibitor of soluble guanylyl cyclase, 1H-[1,2,4] Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) ( $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ , i.v.) or a non-selective COX inhibitor, indomethacin ( $2 \text{ mg kg}^{-1}$ ,  $n=5$ ), 10 minutes after the corresponding curve  $E_{0\text{ODQ}}$  or  $E_{0\text{indomethacin}}$  was completed. Then, the animals were subdivided into four treatment groups for each agent: infusion of saline ( $1 \text{ ml h}^{-1}$ ,  $n=5$  for each), 5-HT ( $20 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ,  $n=5$  for each), 8-OH-DPAT ( $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ,  $n=5$  for each); or  $\alpha$ -methyl-5-HT ( $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ,  $n=5$  for each). After 5 min, of the infusion, three new S-R curves (E1, E2 and E3) were obtained as described above for the S-R curve E0. Each infusion was maintained for 1 h.

In the third group ( $n=30$ ) of experiments on long-term diabetic rats, the animals received either a nitric oxide synthase (NOS) inhibitor, L-arginine HCl, N- $\omega$ -L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.v.), or L-arginine ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.v.) 30 minutes after the intravenous administration L-NAME ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ), or D-arginine ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.v.), 30 minutes after the intravenous administration L-NAME ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Then, the corresponding curve  $E_{0\text{L-NAME}}$  or  $E_{0\text{L-arginine}}$  or  $E_{0\text{D-arginine}}$  was completed (30 minutes after the administration of L-NAME or 10 minutes after the administration of either L-arginine or D-arginine). Then, the animals were subdivided into two treatment subgroups for each (L-NAME, L-NAME+L-arginine and L-NAME+D-arginine): infusion of either saline solution ( $1 \text{ ml h}^{-1}$ ,  $n=5$  for each), or 8-OH-DPAT ( $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ,  $n=5$  for each). Then experiments were performed as previously described.

The fourth group: long-term diabetic rats ( $n= 20$ ) received an intravenous dose of 1-[4, 5-bis (4-methoxyphenyl)-2-thiazolyl]-4-methylpiperazine hydrochloride (FR 122047)

(1.5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), a selective COX-1 inhibitor, or 3-n-propylxantine, N-(4-Nitro-2-phenoxyphenyl)methanesulfonamide (nimesulide), (1.5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), a COX-2 inhibitor. Then, the animals were subdivided into two treatment groups for each inhibitor: infusion of saline (1 ml  $\text{h}^{-1}$ , n=5 for each) or  $\alpha$ -methyl-5-HT (5  $\mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ , n=5 for each). After 5 min, of the infusion, three new S-R curves (E1, E2 and E3) were obtained as described above for the S-R curve E0. Each infusion was maintained for 1 h.

### Drugs employed

Apart from the anaesthetic (pentobarbital sodium, Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA), the drugs used in the present study were as follows:

Heparin sodium (Roche Madrid, Spain). Alloxan, monohydrate noradrenaline bitartrate, d-tubocurarine hydrochloride. 5-Hydroxytryptamine creatinine sulphate complex (5-HT), L-arginine HCl, N- $\omega$ -Larginine methyl ester hydrochloride (L-NAME), 3-n-propylxantine, N-(4-Nitro-2-phenoxyphenyl)methanesulfonamide (nimesulide) (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, U.S.A.). Atropine sulphate (Scharlau, Barcelona, Spain). D-arginine hydrochloride crystalline, 8-hydroxydipropylaminotetralin hydrobromide (8-OH-DPAT), 1H-[1,2,4] Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ), 2-[5-[3-(4-methylsulfonylamino)benzyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-1H-indol-3-yl]ethanamine (L-694,247),  $\alpha$ -methyl-5-hydroxytryptamine maleate ( $\alpha$ -methyl-5-HT), 1-[4, 5-bis (4-methoxyphenyl)-2-thiazolyl]-4-methylpiperazine hydrochloride (FR 122047 hydrochloride), (Research Biochemicals International, Natick, MA, U.S.A.). 1-(4-Chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1-H-indole (indomethacin) (Merck, Sharp and Dohme). All drugs used were dissolved in distilled water at the time of experiments, with the exception of nimesulide, which was dissolved in ethanol 50%.



## Expression and analysis of results

Modifications in mean blood pressure were expressed as mmHg above the mean control blood pressure measured before electrical stimulation and as the stabilized maximum post-stimulation.

Data are mean  $\pm$  S.E.M. of at least five experiments. Comparison of the results from the experimental groups and their corresponding control group was carried out by ANOVA followed by the Newman-Keuls multiple comparison test. The differences were considered significant if  $P < 0.05$ . Data obtained for S-R curves E1, E2 and E3 were essentially identical so, for simplicity, only the S-R curve corresponding to E2 stimulation or E'2 NA-administration are shown in the figures.

## Results

### Systemic haemodynamic variables

Alloxan-induced diabetes elicited a marked increase in serum glucose and systolic blood pressure and failure of the rats to increase their body weight in comparison with control rats. Table 1 shows the mean values of body weight, systolic blood pressure, heart rate and glycaemia before and eight weeks after the induction of diabetes for rats in diabetic group and in the control group.

The mean resting blood pressure and heart rate in long-term diabetic anaesthetized pithed rats were  $43.6 \pm 1.8$  mm Hg and  $340 \pm 4$  bpm, respectively; they were  $39 \pm 1.0$  mm Hg,  $330 \pm 6$  bpm, respectively for normoglycaemic anaesthetized pithed rats. These values were altered by the intravenous infusion of L-NAME or in the joint presence of L-NAME plus D-arginine, the mean blood pressure values were increased to  $68 \pm 3$  mm Hg for normoglycaemic anaesthetized pithed rats and  $72.2 \pm 4$  mm Hg for diabetic anaesthetized pithed rats; whereas these values were not significantly altered by the bolus intravenous administration of ODQ, L-NAME + L-arginine, indomethacin, FR122047 and nimesulide. Likewise, the intravenous infusion of saline or the 5-

hydroxytryptamine receptor agonists (5-HT, 8-OH-DPAT, L-694,247 or  $\alpha$ -methyl-5-HT) did not significantly altered mean blood pressure or heart rate values. Basal heart rate remained unchanged before and throughout all infusions of the agonists and antagonists.

Effects of physiological saline or 5-HT receptor agonists (5-HT, 8-OH-DPAT, L-694,247, and  $\alpha$ -methyl-5-HT) on the electrically induced increases in mean blood pressure in control normoglycaemic pithed rats.

Electrical stimulation of the pre-ganglionic sympathetic outflow from the spinal cord in normoglycaemic pithed rats resulted in frequency-dependent increases in mean blood pressure. At the frequencies used, the increases in mean blood pressure in S-R curve E0 were  $3.8 \pm 0.5$ ;  $15.3 \pm 3.1$ ;  $21.6 \pm 2.6$  and  $43.4 \pm 1.7$  mm Hg (Fig. 1A). These rises in mean blood pressure remained stable in S-R curves E1, E2 and E3 in control rats receiving an infusion ( $1 \text{ ml h}^{-1}$ ;  $n=5$ ) of saline solution. Continuous infusion of 5-HT ( $20 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ;  $n=5$ ) inhibited the sympathetic-induced pressor responses (Fig. 1A). Likewise, intravenous infusion of the selective non-rodent 5-HT<sub>1B</sub> receptor and 5-HT<sub>1D</sub> receptor agonist L-694,247 ( $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ;  $n=5$ ) also inhibited the sympathetic-induced pressor responses (Fig. 1A). Continuous infusion of the selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist, 8-OH-DPAT ( $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ;  $n=5$ ) or the selective 5-HT<sub>2</sub> receptor agonist  $\alpha$ -methyl-5-HT ( $20 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ;  $n=5$ ) failed to inhibit the pressor responses evoked by sympathetic stimulation (Fig. 1A).

Effects of physiological saline or 5-HT receptor agonists (5-HT, 8-OH-DPAT, L-694,247, and  $\alpha$ -methyl-5-HT) on the electrically induced increases in mean blood pressure in long-term diabetic rats

Electrical stimulation of the pre-ganglionic sympathetic outflow from the spinal cord in long-term diabetic pithed rats resulted in frequency-dependent increases in mean blood pressure. At the frequencies used, the increases in mean blood pressure in S-R curve E0 were  $6.4 \pm 0.3$ ;  $29.8 \pm 1.6$ ;  $51.4 \pm 2.4$  and  $80.6 \pm 2.9$  mm Hg. These increases in mean

blood pressure remained stable in S-R curves E1, E2 and E3 in control rats receiving an infusion ( $1 \text{ ml h}^{-1}$ ;  $n=5$ ) of saline solution (data not shown).

Continuous infusion of 5-HT ( $20 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ;  $n=5$ ) inhibited the sympathetic-induced pressor responses (Fig. 1B). The inhibition was more pronounced at lower stimulation frequencies in a dose-dependent way (data not shown). Likewise, intravenous infusion of the selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT ( $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ;  $n=5$ ) or the selective 5-HT<sub>2A/2B/2C</sub> receptor agonist,  $\alpha$ -methyl-5-HT ( $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ;  $n=5$ ) inhibited the sympathetic-induced pressor responses (Fig 1B).

By contrast, L-694,247 ( $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ;  $n=5$ ) a selective non-rodent 5-HT<sub>1B</sub> receptor and 5-HT<sub>1D</sub> receptor agonist, failed to inhibit the pressor responses evoked by sympathetic stimulation (Fig. 1B).

Effects of saline solution, 5-HT, 8-OH-DPAT, and  $\alpha$ -methyl-5-HT on the noradrenaline-induced increases in mean blood pressure in long-term diabetic rats

The increases in mean blood pressure (in S-R curve E'0) caused by exogenous NA ( $0.01$ - $0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) in eight-week diabetic pithed rats were  $5.7 \pm 0.6$ ,  $10.6 \pm 1.5$ ,  $20.4 \pm 5.2$  and  $46.3 \pm 8.2 \text{ mm Hg}$ . These increases in mean blood pressure remained stable in S-R curves E'1, E'2 and E'3 in control rats receiving an infusion of  $1 \text{ ml h}^{-1}$  of saline ( $n=5$ ). Continuous infusion of 5-HT ( $20 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ;  $n=5$ ), 8-OH-DPAT ( $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ;  $n=5$ ) or  $\alpha$ -methyl-5-HT ( $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ;  $n=5$ ) failed to inhibit the pressor responses to exogenous administration of NA (data not shown).

Effects of physiological saline or 5-HT in the presence of ODQ or indomethacin on the electrically induced increases in mean blood pressure in long-term diabetic rats

The intravenous administration of either the inhibitor of the soluble guanylyl cyclase, ODQ ( $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) or the non-selective COX inhibitor, indomethacin ( $2 \text{ mg kg}^{-1}$ ) did not modify the E0 stimulation-response curve ( $E0_{\text{ODQ}}$  or  $E0_{\text{Indomethacin}}$ ) (Fig. 2).

In long-term diabetic rats, the inhibitory effect of 5-HT ( $20 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ;  $n=5$  for each antagonist) was partially blocked after pre-treatment either with the inhibitor of soluble

guanylyl cyclase, ODQ ( $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) (Fig. 3), or with the non-selective COX inhibitor, indomethacin ( $2 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (Fig. 3).

Effects of physiological saline or 8-OH-DPAT infusion in the presence of ODQ or indomethacin on the electrically induced increases in mean blood pressure in long-term diabetic rats

The inhibitory effect of 5-HT ( $20 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ;  $n=5$ ) was reproduced by administration the selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist, 8-OH-DPAT ( $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ;  $n=5$ ) (Fig. 1B). The intravenous bolus administration of soluble guanylyl cyclase inhibitor, ODQ ( $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) was able to abolish the inhibitory effect of the continuous infusion of the selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist, 8-OH-DPAT ( $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ;  $n=5$  for each antagonist) on the sympathetic-induced pressor responses (Fig. 4), but this inhibitory effect was not modified by the non-selective COX inhibitor, indomethacin ( $2 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (Fig. 4).

Effect of intravenous administration of L-NAME on the sympathoinhibitory effect produced by the infusion of 8-OH-DPAT in long-term diabetic rats

Electrical stimulation of the preganglionic sympathetic outflow from the spinal cord in long-term diabetic pithed rats resulted in frequency-dependent increases in mean blood pressure. At the frequencies used, the increases in mean blood pressure in the E0 stimulation-response curve were  $15.9 \pm 2.1$ ;  $40.2 \pm 4.2$ ;  $60.9 \pm 6.8$  and  $91.2 \pm 9.0$  mmHg. Intravenous bolus administration of the NOS inhibitor, L-NAME, produced a rise in the frequency-dependent increases in mean blood pressure obtained by electrical stimulation (Fig.5). These rises in mean blood pressure remained stable in the E1, E2 and E3 stimulation in control animals receiving an infusion ( $1 \text{ ml h}^{-1}$ ;  $n=5$ ) of saline solution.

Intravenous bolus administration of L-NAME was able to abolish the inhibitory effect of the continuous infusion of 8-OH-DPAT ( $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ;  $n=5$ ) on the sympathetic-induced pressor responses.

Effect of L-arginine or D-arginine in the presence of L-NAME on the 8-OH-DPAT induced sympathoinhibitory effect in long-term diabetic rats.

Pre-treatment of diabetic pithed rats with L-arginine ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ), a substrate for NOS, 30 minutes after the intravenous administration of L-NAME ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) led to a decrease in mean blood pressure, obtaining a similar value to that of the rats that had not received L-NAME ( $49.1 \pm 1.3 \text{ mm Hg}$ ).

The  $E_{0\text{L-arginine}}$  curve showed similar increases in mean blood pressure to those of  $E_0$  (data not shown), and slightly lower than the values for  $E_{0\text{L-NAME}}$ . In these experimental conditions, intravenous infusion of selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist, 8-OH-DPAT ( $5 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ; n=5) continued to produce the inhibitory effect on the mean blood pressure increases obtained by electrical stimulation (Fig. 5).

Intravenous administration of D-arginine ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ) 30 minutes after the intravenous administration of L-NAME ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) did not modify the augmentation in mean blood pressure produced after the administration of L-NAME ( $64.1 \pm 4.8 \text{ mm Hg}$ ).

The  $E_{0\text{D-arginine}}$  curve showed similar increases in mean blood pressure to those of  $E_{0\text{L-NAME}}$  (data not shown). The intravenous infusion of the selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT ( $5 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ; n=5) in the presence of D-Arginina + L-NAME failed to inhibit the pressor responses elicited by sympathetic stimulation (Fig. 5).

Effects of physiological saline or the selective 5-HT<sub>2</sub> agonist,  $\alpha$ -methyl-5-HT in the presence of ODQ or indomethacin on the electrically induced increases in mean blood pressure in long-term diabetic rats.

The inhibitory effect of 5-HT ( $20 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ; n=5) was reproduced by administration the selective 5-HT<sub>2</sub> receptor agonist,  $\alpha$ -methyl-5-HT ( $5 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ; n=5) (Fig. 1B) in long-term diabetic rats.

Intravenous bolus administration of COX inhibitor (both COX-1 and COX-2) indomethacin ( $2 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ ) was able to abolish the inhibitory effect of the continuous infusion of  $\alpha$ -methyl-5-HT ( $5 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ; n=5) on the sympathetic-induced pressor

responses (Fig. 6). However, the inhibitor of soluble guanylylcyclase, ODQ ( $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) did not modify the effect inhibitory of  $\alpha$ -methyl-5-HT ( $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ;  $n=5$ ) (Fig. 6).

Effects of physiological saline or antagonist  $\alpha$ -methyl-5-HT in the presence of the selective COX-1 inhibitors, FR122047, or the COX-2 inhibitor, nimesulide on the electrically induced increases in mean blood pressure in long-term diabetic rats

The intravenous administration of either the COX-1 inhibitor, FR122047 ( $1.5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) or the COX-2 inhibitor, nimesulide ( $1.5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) did not modify the E0 stimulation-response curve ( $E0_{\text{FR122047}}$  or  $E0_{\text{nimesulide}}$ ) (Fig. 2).

Both the pretreatment of the eight-week diabetic pithed rats with the COX-1 inhibitor FR 122047 ( $1.5 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.v.) or COX-2 inhibitor, nimesulide ( $1.5 \text{ mg kg}^{-1}$ , i.v.) were able to completely abolish the inhibitory effect of the continuous infusion of selective 5-HT<sub>2</sub> receptor agonist,  $\alpha$ -methyl-5-HT ( $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ;  $n=5$  for each selective COX inhibitor) on the sympathetic-induced pressor responses (Fig. 7).

## **Discussion**

In the present work, we determined that the activation of 5-HT receptors induces the release of several mediators, which modify the serotonergic responses in long term diabetic rats. To accomplish this, the diabetogenic agent used was alloxan. This drug induces a syndrome resembling type 1 diabetes mellitus (Miranda et al. 2000, 2002; Chan et al. 2000; García et al. 2005, 2006; Morán et al. 2010).

In our experiments, in long-term diabetic rats, supramaximal voltage was necessarily higher than the used in normoglycaemic rats. Increases in mean blood pressure obtained in long-term diabetic rats were also higher than in normoglycaemic and four-week diabetic rats (Morán et al. 1994, 2010; García et al. 2005, 2006). The differences between diabetic and normoglycaemic rats could be due to a dysfunction of the autonomic nervous system, though this hypothesis is controversial: several authors proposed an increased vascular reactivity to adrenoceptors agents (Taylor et al. 1994),

whereas others demonstrated attenuation of sympathetic contractile responses (Andersson et al. 1992) or even no changes (Ralevic et al. 1993).

5-HT interferes with adrenergic neurotransmission and reduces the increases in blood pressure obtained by sympathetic stimulation either in normoglycaemic or short/long-term diabetic animals (Morán et al. 1994, 1998, 2010; García et al. 2005, 2006); the 5-HT inhibitory action on the pressor responses obtained by sympatho-stimulation are mainly mediated by prejunctional 5-HT<sub>1</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors (depending on the glycaemic state). In alloxan-induced long-term hyperglycaemic rats, there is a major involvement of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors (Morán et al. 2010). These data are in contrast with the already reported either in normoglycaemic or short-term diabetic rats: in normoglycaemic rats, Villalón et al. (1998) reported that both 5-HT<sub>1A</sub>, rodent 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>1D</sub> receptors were involved in the 5-HT inhibitory effect; and our group showed that the serotonergic inhibitory effect was mainly mediated by 5-HT<sub>1D</sub> receptors (Morán et al. 1998); whereas, in short-term diabetes (García et al. 2005), only the 5-HT<sub>1A</sub> receptor is involved in the serotonergic prejunctional inhibition of electrically induced sympathetic outflow.

In this work, we analysed, in long-term diabetic pithe rats pretreated with atropine, the possible indirect mechanism involved in the 5-HT inhibitory action on the pressor responses induced by sympathostimulation, mediated via 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptor activation (Morán et al. 2010).

Endothelium plays an important role in the regulation of vascular tone. Endothelium-dependent relaxation is enhanced early after the onset of diabetes in several vascular beds (Bhardwaj and Moore 1988; Heygate et al. 1995; Pieper et al. 1998a) or in endothelial cell cultures (McDuffie et al. 1999; Ishida et al. 1998) due, in some cases, to enhanced NO production (Choi et al. 1999) or enhanced sensitivity of vascular smooth muscle cells to NO (Yamada et al. 1995). However, other authors showed an impaired NO relaxation during diabetes probably due to an increased oxidative stress (Leo et al. 2011; Angulo et al. 1998) or to decrease of NO production or responsiveness of vascular smooth muscle cells to NO (Sikorski et al. 1993; Taylor et al. 1995; Bolego et al. 2006).

Based on these facts and other results by us, where we showed an involvement of NO in the inhibitory effect of 5-HT on the electrically-induced pressor responses in short-term diabetes animals (García et al. 2006); in this work, we analysed, in long-term diabetic pithed rats, the possible role of NO pathway/synthesis on the reported inhibitory serotonergic responses of the pressor effect elicited by sympathetic stimulation (Morán et al, 2010).

Both in diabetic and normoglycaemic control rats, intravenous administration of L-NAME, a NO synthase inhibitor, significantly augmented mean blood pressure and the increases in mean blood pressure obtained by electrical stimulation, due to the inhibitory effect of basal NO release produced by this agent (Rees et al. 1990).

In long-term hyperglycaemic state, the presence of L-NAME partially reversed the inhibitory effect produced by 5-HT, and completely abolished 8-OH-DPAT effect. However, L-NAME was not able to modify the inhibitory effect produced by  $\alpha$ -methyl-5-HT, a 5-HT<sub>2</sub> receptor agonist. Therefore, we suggest that the inhibitory serotonergic responses, via 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation, is mediated by the NO pathway, as occurred in four-week (short-term) diabetic pithed rats (García et al. 2005, 2006). Miranda et al. (2000; 2002) also described endothelial alterations in serotonergic responses during experimental diabetes in rabbits, and other authors (Pieper et al. 1998a, 1998b; Fitzgerald and Brands 2000; Komers and Anderson 2003) had previously demonstrated the existence of endothelial dysfunction in diabetic rats due to enhanced NO production.

Our data were confirmed by the administration of L-arginine, a NO synthase substrate (Palmer et al. 1988a, 1988b; Tousoulis et al. 1999; García et al. 2005, 2006), after the administration of L-NAME, which reduced the augmentation in mean blood pressure to control values. Likewise, the inhibitory effect on the pressor responses elicited by electrical stimulation produced by 5-HT and 8-OH-DPAT was fully reversed in the presence of both L-NAME and L-arginine. In contrast, the administration of D-arginine (Tousoulis et al. 1999), the non-active isomere of L-arginine, after the administration of L-NAME did not modify the inhibitory responses produced by intravenous perfusion of



5-HT and 8-OH-DPAT. All these data suggest the direct involvement of the NO pathway in the inhibitory serotonergic effect of the pressor effect elicited by sympathetic stimulation in long-term diabetic pithed rats

These results were confirmed by the pretreatment with ODQ, a guanylyl cyclase inhibitor (Bryan-Lluka et al. 2004; Chen et al. 2005; García et al. 2005, 2006): the inhibitory action produced by the selective 5-HT<sub>1A</sub> agonist, 8-OH-DPAT, was completely reversed in the presence of ODQ in long-term hyperglycaemia. However, ODQ was not able to modify the inhibitory effect produced by  $\alpha$ -methyl-5-HT, a 5-HT<sub>2</sub> receptor agonist. However, in normoglycaemic rats (García et al. 2006), ODQ did not abolish the inhibitory effect produced by either L-694,247 or 8-OH-DPAT, selective 5-HT<sub>1D</sub> and 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists.

These data demonstrate, as already described by other authors and ourselves in different experimental conditions in diabetic state (Ralevic et al. 1995; García et al. 2005, 2006), that 5-HT is directly related to the alterations produced during the development of diabetes and reveals the participation of endothelium derived relaxing factor (EDRF) in the vascular serotonergic responses in hyperglycaemic rats.

As previously reported (Morán et al. 2010), in eight-week diabetic rats, the inhibitory action induced by 5-HT was, as well, reproduced by  $\alpha$ -methyl-5-HT, a selective 5-HT<sub>2</sub> receptor agonist. To study the possible role of indirect mechanisms involved in this action, we examined the participation of arachidonic acid derivatives, via cyclooxygenase activation in the 5-HT modulatory action previously reported.

Activation of COX-1 and COX-2 (cyclooxygenase pathway) leads to the production of thromboxanes and prostaglandins (Vane et al. 1998). Szerafin et al. (2006) described that COX-2 expression and prostaglandin-mediated bradikinin-induced dilatation in coronary arteries are increased in diabetic patients. Also, in perfused kidneys of experimental streptozotocin-induced diabetic rats, vasorelaxant metabolites derived from arachidonic are increased (Kamata et al. 2006).

Accordingly, we performed our experiments in the presence indomethacin, a non-selective COX inhibitor (Moncada and Vane 1981) to analyse the arachidonic pathway on the serotonergic inhibitory action. Indomethacin was able to partly abolish the 5-HT inhibitory action and completely blocked the effect produced by the selective 5-HT<sub>2A</sub> receptor agonist,  $\alpha$ -methyl-5-HT. However, indomethacin was not able abolish the effect produced by the selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist, 8-OH-DPAT. 5-HT<sub>2A</sub> mediated inhibition was also reversed by both FR 122047, a selective and potent COX-1 inhibitor (Ochi and Goto 2001, 2002) and nimesulide, a COX-2 inhibitor (Kiff et al. 1991; Abdelrahman and Suleimani 2008).

These data suggest that endothelial arachidonic acid derivates must have vasodilator influence (probably due to prostacyclin formation) in long-term diabetic arteries in our experimental model. Our results are in agreement with others previously reported indicating a decrease in the activity of vasoconstrictor prostanoids (Makino and Kamata 1998; Miranda et al. 2000, 2002) and an enhancement in the activity of vasodilator prostanoids (Okumura et al. 2000; Alabadi et al. 2001) during diabetes.

In summary, all these data suggest that experimental long-term diabetes induces changes in the mediators involved in 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> mediated inhibition on the pressor responses elicited by sympathostimulation. While in short-term diabetes the main mediator involved in NO released by 5-HT<sub>1A</sub> activation, in long-term diabetes there are two mediators involved: NO via 5-HT<sub>1A</sub> activation and products released by activation of COX pathway via 5-HT<sub>2A</sub> activation.

### Conclusion

In conclusion, our results suggest that in long-term experimental diabetes the inhibitory serotonergic effect of the pressor responses obtained by electrical stimulation of sympathetic outflow, via 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptor activation would be mediated by the NO pathway/guanylyl cyclase activation and cyclooxygenase pathway, respectively. Based on these and our previous results, the alloxan-induced diabetes in rats (short- and long-term diabetes) is an appropriate model to study the role of 5-HT and its receptors

in the development and progression of the autonomic and endothelial dysfunction due to type 1 diabetes mellitus

### Acknowledgements

This study was supported by grants from the University of Salamanca (USAL) and Junta de Castilla y León (JCYL) Research Programme (reference number SAN673/SA05/08).

### Conflicts of interest

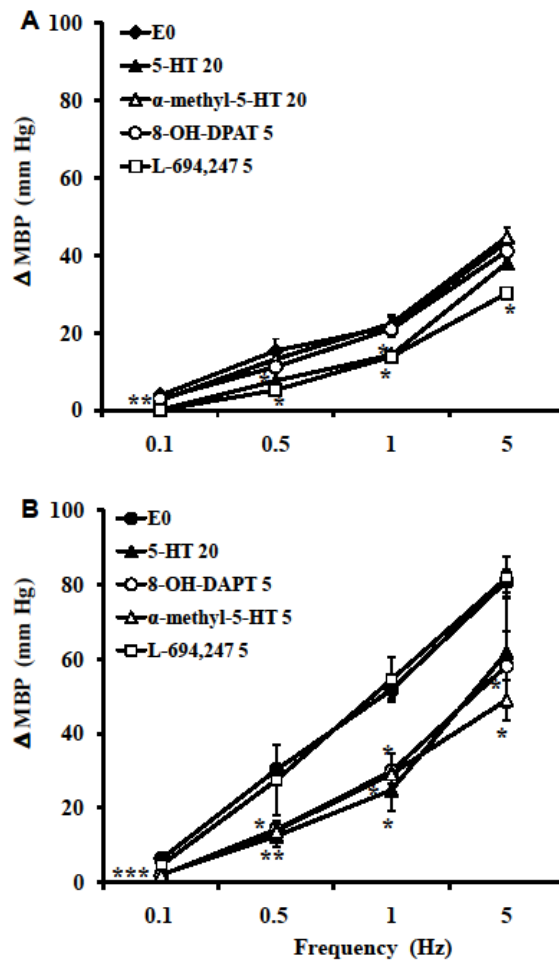
The authors state that they have no conflict of interest

**Table 1.** Values of body weight, systolic blood pressure, heart rate and glycaemia in control and diabetic rats.

	Body weight (g)	Systolic blood pressure (mmHg)	Heart rate (bpm)	Glycaemia (mM)	n
<i>Control rats</i>					
Initial time	219 ± 9.0	118 ± 5.0	375 ± 10.0	5.6 ± 0.2	25
8 weeks after	424 ± 16.0	130 ± 4.0	392 ± 15.0	4.8 ± 0.1	25
<i>Diabetic rats</i>					
Initial time	192 ± 10.0	124 ± 5.0	310 ± 6.0	5.6 ± 0.1	135
8 weeks after	309 ± 11.8*	157 ± 1.7*	365 ± 10.0	20.1 ± 0.7*	135

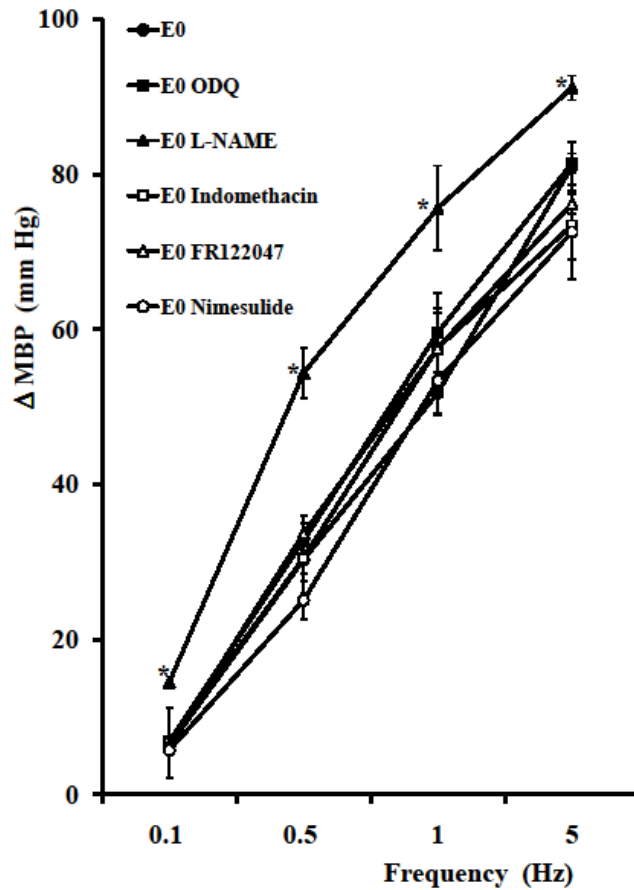
Results are means ± S.E.M. for "n" rats

\*Significantly different from the corresponding value in control rats, P< 0.05.



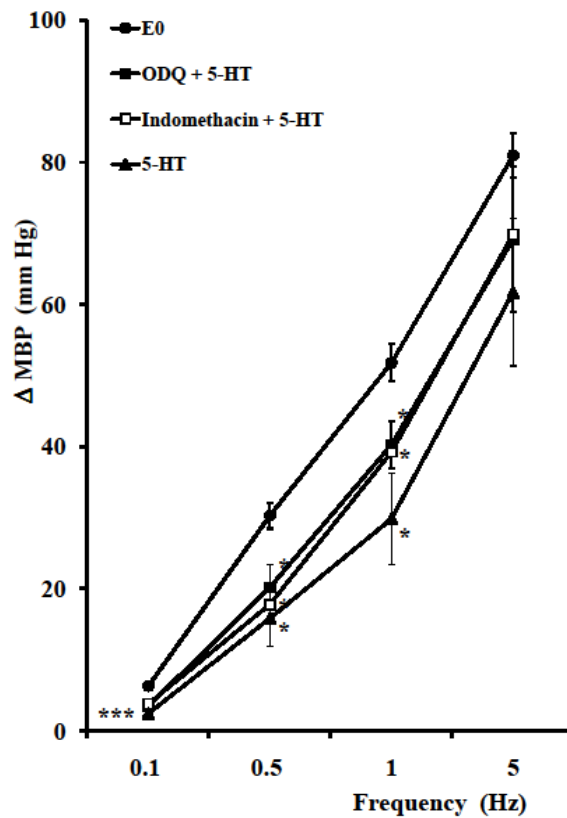
**Fig. 1**

Effect of i.v. infusion of (A) saline ( $1 \text{ ml h}^{-1}$ ), 5-HT ( $20 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ), 8-OH-DPAT ( $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ), L-694,247 ( $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) and  $\alpha$ -methyl-5-HT ( $20 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) on electrically-induced pressor responses in normoglycaemic pithed rats. (B) saline ( $1 \text{ ml h}^{-1}$ ), 5-HT ( $20 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ), 8-OH-DPAT ( $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ), L-694,247 ( $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) and  $\alpha$ -methyl-5-HT ( $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) on electrically-induced pressor responses in eight-week diabetic pithed rats. Data are means  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$  vs corresponding control (E0).



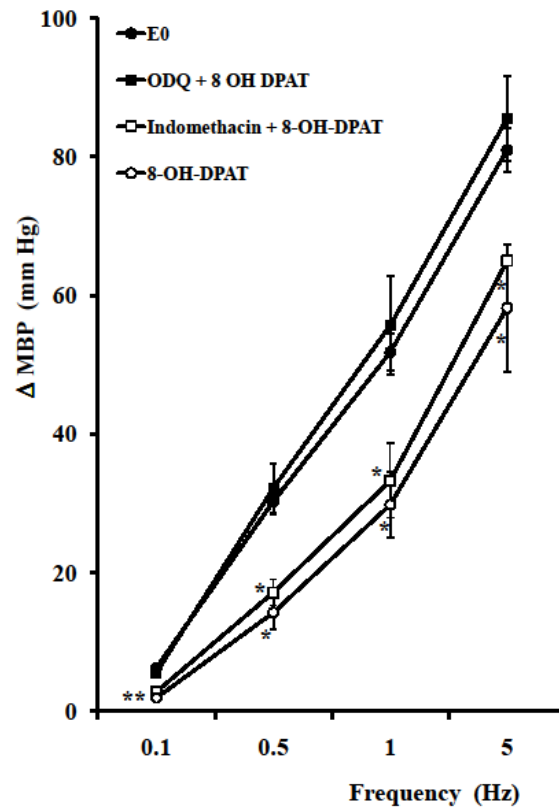
**Fig. 2**

Effect of i.v. infusion of saline ( $1 \text{ ml h}^{-1}$ ) on electrically induced pressor responses before and after intravenous bolus administration of ODQ ( $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) or L-NAME ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) or indomethacin ( $2 \text{ mg kg}^{-1}$ ) or FR122047 ( $1.5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) or nimesulide ( $1.5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) in eight-week diabetic pithe rats. Data are means  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$  vs corresponding control (E0).



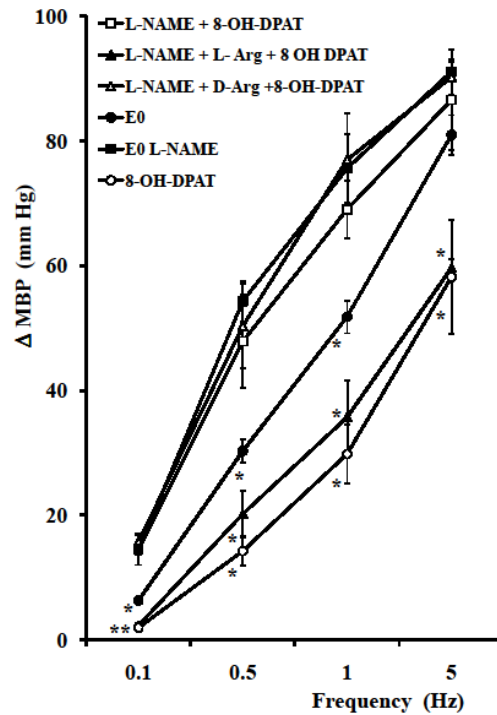
**Fig. 3**

Effect of the i.v. infusion of 5-HT ( $20 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) on electrically induced pressor responses in the presence of ODQ ( $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) or indomethacin ( $2 \text{mg kg}^{-1}$ ) in eight-week diabetic pithe rats. Data are means  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$  vs corresponding control (E0).



**Fig. 4**

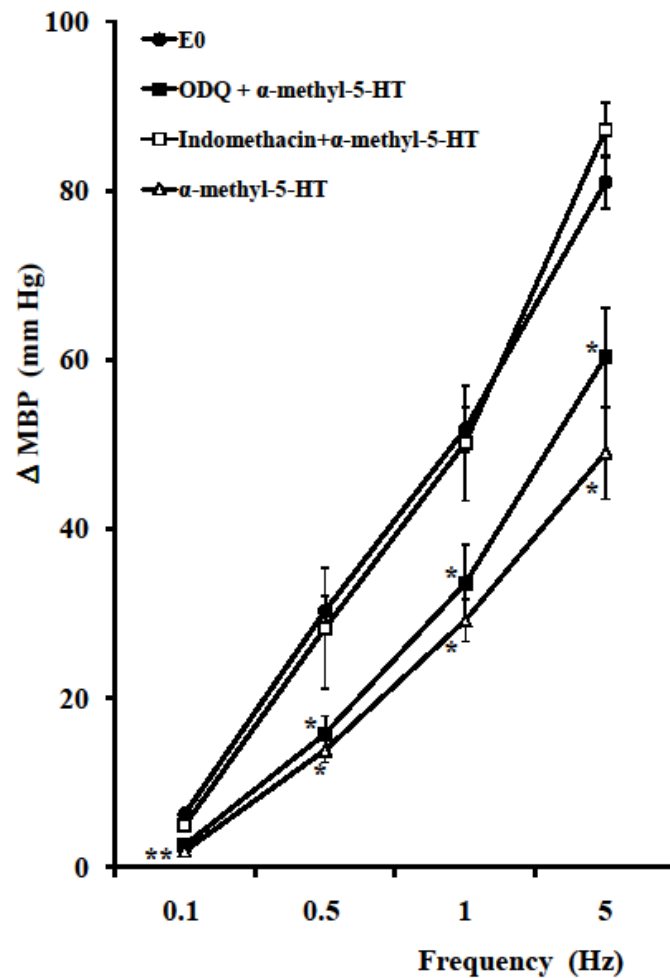
Effect of the i.v. infusion of 8-OH-DAPT ( $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) on electrically induced pressor responses in the presence of ODQ ( $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) or indomethacin ( $2 \text{mg kg}^{-1}$ ) in eight-week diabetic pithed rats. Data are means  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$  vs corresponding control (E0).



**Fig. 5**

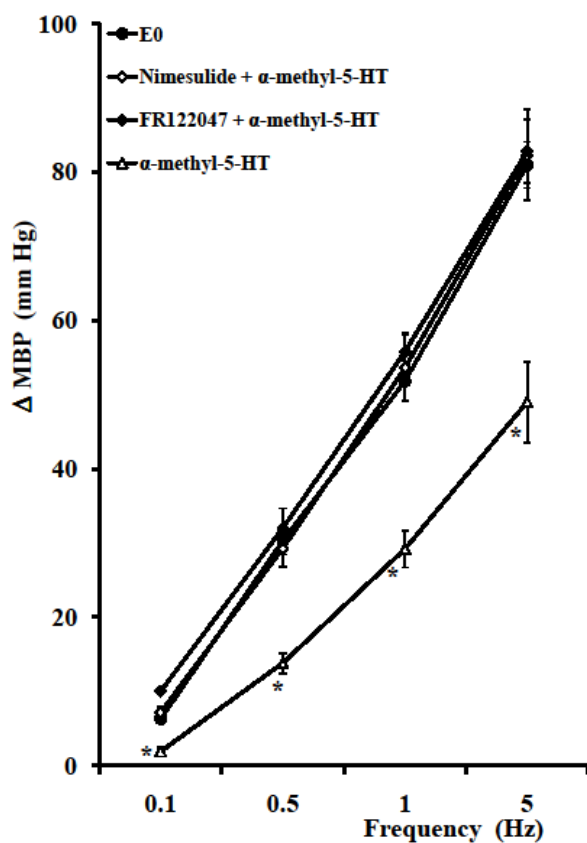
Effect of the i.v. infusion of 8-OH-DPAT ( $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) in the absence or presence of L-NAME ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) or L- arginine ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ) or D-arginine ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ) pretreated with L-NAME ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) on electrically induced pressor responses in eight-week diabetic pithed rats. Data are means  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$  vs corresponding control ( $E0_{\text{L-NAME}}$ ).





**Fig. 6**

Effect of the i.v. infusion of  $\alpha$ -methyl-5-HT ( $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) on electrically induced pressor responses in the presence of ODQ ( $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) or indomethacin ( $2 \text{mg kg}^{-1}$ ) in eight-week diabetic pithed rats. Data are means  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$  vs corresponding control (E0).



**Fig. 7**

Effect of the i.v. infusion of  $\alpha$ -methyl-5-HT ( $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) on electrically induced pressor responses in the presence of FR122047 ( $1.5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) or nimesulide ( $1.5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) in eight-week diabetic pithe rats. Data are means  $\pm$ S.E.M. \*  $P < 0.05$  vs corresponding control (E0).

## References

- Abdelrahman AM, Al Suleimani YM (2008). Four-week administration of nimesulide, a cyclooxygenase-2 inhibitor, improves endothelial dysfunction in the hindlimb vasculature of streptozotocin-induced diabetic rats. *Arch Pharm Res* 31:1584-1589.
- Alabadi JA, Miranda FJ, Lloréns S, Ruiz de Apodaca RF, Centeno JM, Alborch E (2001). Diabetes potentiates acetylcholine-induced relaxation in rabbit renal arteries. *Eur J Pharmacol* 415:225-232.
- Andersson D, Brunkwall J, Bergqvist D, Edvinsson E (1992). Diminished contractile responses to neuropeptide Y of arteries from diabetic rats. *J Auton Nerv Syst* 37: 215-222.
- Angulo J, Rodríguez-Mañas L, Peiró C, Neira M, Marín J, Sánchez-Ferrer CF (1998). Impairment of nitric oxide-mediated relaxations in anaesthetized autoperfused streptozotocin-induced diabetic rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 358:29-37.
- Bagi Z, Erdei N, Papp Z, Edes I, Koller A (2006). Up-regulation of vascular cyclooxygenase-2 in diabetes mellitus. *Pharmacological Reports* 58: 52-56.
- Bhardwaj R, Moore PK (1988). Increased vasodilator response to acetylcholine of renal blood vessels from diabetic rats. *J Pharm Pharmacol* 40: 739-742.
- Bolego C, Vegeto E, Pinna C, Maggi A, Cignarella A (2006). Selective agonists of estrogen receptor isoforms: new perspectives for cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:2192-2199.
- Bryan-Lluka LJ, Papacostas MH, Paczkowski FA, Wanstall JC (2004). Nitric oxide donors inhibit 5-HT uptake in the human 5-HT transporter (SERT). *Br J Pharmacol* 143: 63-70.
- Chan NN, Vallance P, Colhoun HM (2000). Nitric oxide and vascular responses in type I diabetes. *Diabetologia* 43: 1137-1147.
- Chen SJ, Chen KH, Wu CC (2005). Nitric oxide-cyclic GMP contributes to abnormal activation of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in the aorta from rats with endotoxic shock. *Shock* 23: 179-185.
- Choi KC, Kim NH, An MR, Kang DG, Kim SW, Lee J (1997). Alterations of intrarenal renin-angiotensin and nitric oxide systems in streptozotocin diabetic rats. *Diabetologia* 39: 793-799.
- Choi KC, Lee SC, Kim SW, Kim NH, Lee JU, Kang YJ (1999). Role of nitric oxide in the pathogenesis of diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Intern Med* 14:32-41.
- Cičin-Sain L, Jernej B (1996). Reduction of gastrointestinal serotonin in alloxan-diabetic rats: reversal by 5-hydroxytryptophan treatment. *Behav Brain Res* 73:285-288.
- De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van De Voorde J, Lameire NH, Vanhoutte PM (2000). Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol* 130: 963-974.
- Doggrell SA. 2004. Sarpogrelate: cardiovascular and renal clinical potential. *Expert Opin Investig Drugs* 13:865-874.
- Fernández MM, Calama E, Morán A, Martín ML, San Román L (2000). Characterization of mechanisms involved in presynaptic inhibition of sympathetic pressor effects induced by some 5-HT<sub>1</sub> receptor antagonists. *J Auton Pharmacol* 20: 313-323.
- Fink KB, Göthert M (2007). 5-HT receptor regulation of neurotransmitter release. *Pharmacol Rev* 59:360-417.

- Fitzgerald SM, Brands MW (2000). Nitric oxide may be required to prevent hypertension at the onset of diabetes. *Am J Physiol* 279: E762-E768.
- García M, Morán A, Calama E, Martín ML, Barthelmebs M, San Román L (2005). 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* 145: 593-601.
- García M, Morán A, Martín ML, Barthelmebs M, San Román L (2006). The nitric oxide synthesis/pathway mediates the inhibitory serotonergic responses of the pressor effect elicited by sympathetic stimulation in diabetic pithed rats. *Eur J Pharmacol* 537: 126-134.
- Gillespie JS, Muir JC (1967). A method of stimulating the complete sympathetic outflow from the spinal cord to blood vessels in the pithed rat. *Br J Pharmacol Chemother* 30: 78-87.
- Heygate KM, Laurence IG, Bennett MA, Thurston H (1995). Impaired endothelium-dependent relaxation in isolated resistance arteries of spontaneously diabetic rats. *Br J Pharmacol* 116: 3251-3259.
- Ishida T, Kawashima S, Hirata K, Yokoyama M (1998). Nitric oxide is produced via 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>2B</sub> receptor activation in human coronary artery endothelial cells. *Kobe J Med Sci* 44: 51-63.
- Jones KL, Horowitz M, Wishart MJ, Maddox AF, Harding PE, Chatterton BE (1995). Relationships between gastric emptying, intragastric meal distribution and blood glucose concentrations in diabetes mellitus. *J Nucl Med* 36:2220-2228.
- Kamata K, Hosokawa M, Matsumoto T, Kobayashi T (2006). Altered arachidonic acid-mediated responses in the perfused kidney of the streptozotocin-induced diabetic rat. *J Smooth Muscle Res* 42:171-87.
- Kasho M, Sakai M, Sasahara T, Anami Y, Matsumura T, Takemura T, Matsuda H, Kobori S, Shichiri M (1998). Serotonin enhances the production of type IV collagen by human mesangial cells. *Kidney Int* 54:1083-1092.
- Kiff RJ, Gardiner SM, Compton AM, Bennett T (1991). Selective impairment of hindquarters vasodilator responses to bradykinin in conscious Wistar rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Br J Pharmacol* 103:1357-1362.
- Komers R, Anderson S (2003). Paradoxes of nitric oxide in the diabetic kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F1121-F1137.
- Leo CH, Hart JL, Woodman OL (2010). Impairment of both nitric oxide-mediated and EDHF-type relaxation in small mesenteric arteries from rats with streptozotocin-induced diabetes. *Br J Pharmacol* (in press).
- Makino A, Kamata K (1998). Possible modulation by endothelin-1, nitric oxide, prostaglandin I<sub>2</sub> and thromboxane A<sub>2</sub> of vasoconstriction induced by an alpha-agonist in mesenteric arterial bed from diabetic rats. *Diabetologia* 41:1410-1418.
- McDuffie JE, Coaxum SD, Maleque MA (1999). 5-Hydroxytryptamine evokes endothelial nitric oxide synthase activation in bovine aortic endothelial cell cultures. *Proc Soc Exp Biol Med* 221: 386-390.
- Miranda FJ, Alabadi JA, Llorens S, Ruiz De Apodaca RF, Centeno JM, Alborch E (2000). Diabetes-induced changes in endothelial mechanisms implicated in rabbit carotid arterial response to 5-hydroxytryptamine. *Eur J Pharmacol* 401: 397-402.
- Miranda FJ, Alabadi JA, Llorens S, Ruiz De Apodaca RF, Centeno JM, Alborch E (2002). Experimental diabetes induces hyperreactivity of rabbit renal artery to 5-hydroxytryptamine. *Eur J Pharmacol* 439: 121-127.

- Moncada S, Vane JR (1981). Prostacyclin: its biosynthesis, actions and clinical potential. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 294:305-329.
- Morán A, Fernández MM, Velasco C, Martín ML, San Román L (1998). Characterization of prejunctional 5-HT<sub>1</sub> receptors that mediate the inhibition of pressor effects elicited by sympathetic stimulation in the pithed rats. *Br J Pharmacol* 123: 1205-1213.
- Morán A, Restrepo B, Ortiz de Urbina AV, García M, Martín ML, San Román L (2010). Pharmacological profile of 5-hydroxytryptamine-induced inhibition on the pressor effect elicited by sympathetic stimulation in long-term diabetic pithed rats. *Eur J Pharmacol* 643: 70-77.
- Morán A, Velasco C, Salvador T, Martín ML, San Román L (1994). Inhibitory 5-hydroxytryptamine receptors involved in pressor effects obtained by stimulation of sympathetic outflow from spinal cord in pithed rats. *Br J Pharmacol* 113:1358-1362
- Ochi T, Goto T (2001). Anti-inflammatory activity of a novel selective cyclooxygenase-2 inhibitor, FR140423, on type II collagen-induced arthritis in Lewis rats. *Prostaglandins Other Lipid Media* 66:317-327.
- Ochi T, Goto T (2002). Differential effect of FR122047, a selective cyclo-oxygenase-1 inhibitor, in rat chronic models of arthritis. *Br J Pharmacol* 135:782-788.
- Ogawa S, Takeuchi K, Sugimura K, Sato C, Fukuda M, Lee R, Ito S, Sato T (1999). The 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonist sarpogrelate reduces urinary and plasma levels of thromboxane A<sub>2</sub> and urinary albumin excretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26:461-464.
- Okumura M, Imanishi M, Yamashita T, Yamamura Y, Kim S, Iwao H, Tanaka S, Fujii S (2000). Renal production of thromboxane and prostaglandins in a rat model of type 2 diabetes. *Life Sci* 66:371-377.
- Palmer RM, Ashton DS, Moncada S (1988a). Vascular endothelial cells synthesize NO from L-arginine. *Nature* 333: 664-666.
- Palmer RM, Ashton DS, Moncada S (1988b). L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 153: 1251-1256.
- Pieper GM, Dembry K, Siebeneich W (1998a). Long-term treatment in vivo with NOX-101, a scavenger of nitric oxide, prevents diabetes-induced endothelial dysfunction. *Diabetologia* 41: 1220-1226.
- Pieper GM, Adams MB, Roza AM (1998b). Pancreatic transplantation reverses endothelial dysfunction in experimental diabetes. *Surgery* 123: 89-95.
- Ralevic V, Belai A, Burnstock G (1993). Impaired sensory-motor nerve function in the isolated mesenteric arterial bed of streptozotocin-diabetic and ganglioside-treated streptozotocin-diabetic rats. *Br J Pharmacol* 110: 1105-1111.
- Ralevic V, Belai A, Burnstock G (1995). Effects of streptozotocin-diabetes on sympathetic nerve, endothelial and smooth muscle function in the rat mesenteric arterial bed. *Eur J Pharmacol* 296: 193-199.
- Ramage AG, Villalón CM (2008). 5-hydroxytryptamine and cardiovascular regulation. *Trends Pharmacol Sci* 29:472-481.
- Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S (1990). Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 101: 746-752.

- Sandrini M, Vitale G, Vergoni AV, Ottani A, Bertolini A (1997). Streptozotocin-induced diabetes provokes changes in serotonin concentration and on 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors in the rat brain. *Life Sci.* 60: 1393-1397.
- Sikorski BW, James GM, Glance SD, Hodgson WC, King RG (1993). Effect of endothelium on diabetes-induced changes in constrictor responses mediated by 5-hydroxytryptamine in rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol* 22:423-30.
- Szerafin T, Erdei N, Fülöp T, Pasztor ET, Edes I, Koller A, Bagi Z (2006). Increased cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin-mediated dilation in coronary arterioles of patients with diabetes mellitus. *Circ Res* 99: e12-17.
- Taylor PD, Oon BB, Thomas CR, Poston L (1994). 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.* 111, 35-41.
- Taylor PD, Graves JE, Poston L (1995). Selective impairment of acetylcholine-mediated endothelium-dependent relaxation in isolated resistance arteries of the streptozotocin-induced diabetic rat. *Clin Sci (Lond)* 88:519-524.
- Tousoulis D, Tentolouris C, Crake T, Katsimaglis G, Stefanadis C, Toutouzas P, Davies GJ (1999). Effects of L- and D-arginine on the basal tone of human diseased coronary arteries and their responses to substance P. *Heart (British Cardiac Society)* 81: 505-511.
- Vane JR, Bakhle, YS, Bottin RM (1998). Cyclooxygenases 1 and 2: *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:97-120
- Villalón CM, Contreras J, Ramirez-San Juan E, Castillo C, Perusquia M, Lopez-Munoz FJ, Terrón JA (1995a). 5-hydroxytryptamine inhibits pressor responses to preganglionic sympathetic nerve stimulation in pithed rats. *Life Sci* 57: 803-812.
- Villalón CM, Contreras J, Ramirez-San Juan E, Castillo C, Perusquia M, Terrón JA (1995b). Characterization of prejunctional 5-HT receptors mediating inhibition of sympathetic vasopressor responses in the pithed rats. *Br J Pharmacol* 116: 3330-3336.
- Villalón CM, Contreras J, Ramírez-San Juan E, Terrón JA (1995c). 5-HT receptors mediating inhibition of pressor responses to electrical sympathetic stimulation in pithed rats. *Br J Pharmacol* 114: P161.
- Villalón CM, Centurión D, Rabelo G, De Vries P, Saxena PR, Sánchez-López A (1998). The 5-HT<sub>1</sub>-like receptors mediating inhibition of sympathetic vasopressor outflow in the pithed rat: operational correlation with the 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, and 5-HT<sub>1D</sub> subtypes. *Br J Pharmacol* 124: 1001-1011
- Villalón CM, Centurión D (2007). Cardiovascular responses produced by 5-hydroxytryptamine: a pharmacological update on the receptors/mechanisms involved and therapeutic implications. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 376: 45-63.
- Yamada K, Nakano H, Nakayama M, Nozaki O, Miura Y, Nishimura M, Tsuchida H, Mimura N (1995). Endothelium-dependent relaxation in peripheral vasculature and kidney of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Diabetes Complications.* 9:203-207.

## Resultados y discusión. Artículo 2

En el presente trabajo, estudiamos el mecanismo indirecto involucrado en la acción inhibitoria de 5-hidroxitriptamina sobre el efecto presor producido por estimulación simpática en ratas desmeduladas con diabetes crónica (a largo plazo). Para lograr este objetivo se utilizó un modelo experimental de inducción de diabetes en rata. El agente diabetogénico utilizado fue el aloxano, que induce un síndrome parecido a la DM tipo 1 (Chan *et al.*, 2000; Miranda *et al.*, 2000, 2002; García *et al.*, 2005, 2006; Morán *et al.*, 2010).

La diabetes se indujo en ratas Wistar macho por una inyección subcutánea de aloxano, y ocho semanas después, los animales fueron anestesiados, pretratados con atropina, y desmedulados. La acción de 5-HT y los mecanismos indirectos involucrados fueron analizados en las respuestas presoras inducidas por estimulación eléctrica del flujo simpático.

En los animales diabéticos de ocho semanas, 5-hidroxitriptamina (5-HT) ( $20 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) ejerce una acción inhibitoria sobre el efecto presor obtenido por estimulación eléctrica del flujo simpático, el cual es reproducido por 8 hydroxydipropylaminotretalin hydrobromide (8-OH-DPAT) ( $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ), y  $\alpha$ -metil-5-HT ( $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ), agonistas selectivos de receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2</sub>, respectivamente.

La administración intravenosa, en bolus, del inhibidor de la guanilato ciclasa, tal como 1H-[1,2,4] Oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ) ( $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), o de un inhibidor de la producción de NO, N- $\omega$ -L-Arginina metil éster hidroclorehidrato (L-NAME), ( $10 \text{mg kg}^{-1}$ ) previamente a la perfusión intravenosa de 8-OH-DPAT ( $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) revierten el efecto inhibitorio causado por 8-OH-DPAT sobre las respuestas presoras inducidas eléctricamente.

El efecto inhibitorio producido por  $\alpha$ -metil-5-HT ( $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) fue revertido en presencia de indometacina, ( $2 \text{mg kg}^{-1}$ ), un inhibidor no selectivo de las ciclooxigenasas (COX), o los inhibidores selectivos de COX-1 y COX-2, FR 122047

(1.5 mg kg<sup>-1</sup>) y nimesulida (1.5 mg kg<sup>-1</sup>) respectivamente, en ratas desmeduladas y diabéticas a largo plazo.

En nuestros experimentos, en ratas diabéticas a largo plazo, fue necesario usar un voltage supramáximal superior al utilizado en ratas normoglucémicas. Los incrementos de PAM obtenidos en ratas diabéticas a largo plazo también fue más alto que en las ratas normoglucémicas y diabéticas de cuatro semanas (Morán *et al.*, 1994; García *et al.*, 2005, 2006; Morán *et al.*, 2010). Las diferencias entre las ratas diabéticas y ratas normoglucémicas podría deberse a una disfunción del sistema nervioso autónomo, aunque esta hipótesis es controvertida debido a que algunos autores han propuesto un aumento de la reactividad vascular a agentes adrenérgicos (Taylor *et al.*, 1994), otros han demostrado una atenuación de las respuestas simpáticas contráctiles (Andersson *et al.*, 1992) o incluso, otros autores no han obtenido ninguna modificación (Ralevic *et al.*, 1993).

5-HT interfiere con la neurotransmisión adrenérgica y disminuye los incrementos de presión arterial obtenidos por estimulación simpática en animales normoglucémicos y diabéticos a corto y largo plazo (Morán *et al.*, 1994, 1998, 2010; García *et al.*, 2005, 2006); la acción inhibitoria de 5-HT sobre las respuestas presoras obtenidas por estimulación simpática son principalmente mediadas por la activación de receptores presinápticos 5-HT<sub>1</sub> y 5-HT<sub>2</sub> (dependiendo del estado glucémico), siendo los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub> los principalmente implicados (Morán *et al.*, 2010). Estos datos contrastan con otros ya reportados en ratas normoglucémicas o diabéticas a corto plazo: Villalón *et al.*, (1998) demostró que los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> y 5-HT<sub>1D</sub> están involucrados en el efecto inhibitorio de 5-HT, y nuestro grupo describió que el efecto inhibitorio serotoninérgico está principalmente mediado por receptores 5-HT<sub>1D</sub> (Morán *et al.*, 1994) en animales normoglucémicos. Sin embargo, en la diabetes experimental a corto plazo (García *et al.*, 2005), sólo el subtipo de receptores 5-HT<sub>1A</sub> está implicado en la inhibición presináptica de serotonina sobre los incrementos de PAM inducidos por estimulación eléctrica.

En este trabajo se analizó, en ratas diabéticas a largo plazo, desmeduladas y pretratadas con atropina, si existe algún mecanismo indirecto que participe en la acción



inhibidora de serotonina, mediada por la activación de receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub> (Morán *et al.*, 2010).

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 (Bhardwaj y Moore, 1988; Heygate *et al.*, 1995; Pieper *et al.*, 1998a) o en cultivos de células endoteliales (Ishida *et al.*, 1998; McDuffie *et al.*, 1999) debido, en algunos casos, al aumento en la producción de NO (Choi *et al.*, 1999) o a una mayor sensibilidad de las células del músculo liso vascular al NO (Yamada *et al.*, 1995). Sin embargo, otros autores demostraron un deterioro de la relajación debida a NO durante la diabetes, probablemente por un aumento del estrés oxidativo (Angulo *et al.*, 1998; Leo *et al.*, 2011), por una disminución en la producción del NO o por una alteración en la capacidad de respuesta de las células vasculares del músculo liso al NO (Sikorski *et al.*, 1993; Taylor *et al.*, 1995; Bolego *et al.*, 2006).

En base a estos hechos y, a nuestros resultados previos, donde se muestra una participación del NO en el efecto inhibitor que 5-HT ejerce sobre las respuestas presoras inducidas eléctricamente en los animales diabéticos a corto plazo (García *et al.*, 2006), en este trabajo, nosotros analizamos, en ratas desmeduladas y diabéticas a largo plazo, el posible papel de la vía/síntesis del NO sobre las respuestas inhibitoras serotoninérgica en el efecto presor producido por estimulación simpática (Morán *et al.*, 2010).

Tanto en ratas diabéticas como en normoglucémicas, la administración intravenosa de L-NAME, un inhibidor de la NOS, aumentó significativamente la PAM y los incrementos de presión arterial media obtenidos por estimulación eléctrica. Este hecho es debido al efecto inhibitor en la liberación basal de NO producido por este agente (Rees *et al.*, 1990).

En el estado de hiperglucemia a largo plazo, la presencia de L-NAME revirtió parcialmente el efecto inhibitor producido por 5-HT, y bloqueo completamente el efecto inhibitor de 8-OH-DPAT. Pero L-NAME no fue capaz de modificar la respuesta inhibitor producida por  $\alpha$ -metil-5-HT, a través de la activación de receptores 5-HT<sub>2</sub>. Por lo tanto, sugerimos que la respuesta inhibitoria serotoninérgica, por activación del

receptor 5-HT<sub>1A</sub>, esta mediada por la vía del NO, como ocurrió en las ratas desmeduladas diabéticas de cuatro semanas (a corto plazo) (García *et al.*, 2005,2006). Miranda *et al.*, (2000, 2002) también describieron alteraciones del endotelio en respuestas serotoninérgicas durante la diabetes experimental en conejos, y otros autores (Pieper *et al.*, 1998a, b; Fitzgerald y Brands, 2000; Komers y Anderson, 2003) han demostrado previamente la existencia de disfunción endotelial en ratas diabéticas, debido a una mayor producción de NO.

Para confirmar estos resultados en ratas diabéticas de ocho semanas se administró L-arginina, un sustrato de la NOS (Palmer *et al.*, 1988a, b; Tousoulis *et al.*, 1999; García *et al.*, 2005, 2006), después de la administración de L-NAME, lo que redujo el aumento de la PAM a valores control. Del mismo modo, el efecto inhibitorio producido por 5-HT y 8-OH-DPAT se revirtió totalmente en presencia de L-NAME y L-arginina. Por el contrario, la administración de D-arginina (Tousoulis *et al.*, 1999), el isómero inactivo de la L-arginina, después de la administración de L-NAME no modificó las respuestas inhibitorias producidas por la perfusión intravenosa de 5-HT y 8-OH-DPAT. Todos estos datos sugieren la participación directa de la vía del NO en el efecto inhibitorio de serotonina sobre las respuestas presoras inducidas por estimulación simpática en ratas desmeduladas diabéticas a largo plazo.

La participación del NO en la acción serotoninérgica inhibitoria de las respuestas presoras obtenidas por estimulación eléctrica se confirmó con el pretratamiento con ODQ, un inhibidor de la guanilato ciclasa (Ralevic *et al.*, 1995; Bryan-Lluka *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005): la acción inhibitoria producida por el agonista selectivo de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 8-OH-DPAT, se revirtió completamente en presencia de ODQ en ratas hiperglucémicas a largo plazo. Sin embargo, ODQ no fue capaz de modificar el efecto inhibitorio producido por  $\alpha$ -metil-5-HT, agonista selectivo de receptores 5-HT<sub>2</sub>. En ratas normoglucémicas (García *et al.*, 2006), ODQ no bloqueó el efecto inhibitorio producido por L-694, 247 y 8-OH-DPAT, agonistas selectivos de los receptores 5-HT<sub>1D</sub> y 5-HT<sub>1A</sub>, respectivamente.

Estos datos demuestran, como ya se ha descrito por otros autores y por nuestro grupo en diferentes condiciones experimentales durante la diabetes (Ralevic *et al.*, 1995; García *et al.*, 2005, 2006) que 5-HT está directamente relacionada con las

alteraciones producidas durante el desarrollo de la enfermedad y revela la participación de EDRF en las respuestas vasculares serotoninérgicas en ratas hiperglucémicas.

Como nuestro grupo ya demostró anteriormente (Morán *et al.*, 2010), en ratas diabéticas de ocho semanas, la acción inhibitoria inducida por 5-HT fue, también, reproducida por  $\alpha$ -metil-5-HT, un agonista selectivo de receptores 5-HT<sub>2</sub>. Para estudiar los posibles mecanismos indirectos involucrados en esta acción, se analizó la participación de los derivados del ácido araquidónico, a través de la activación de la vía de las COX en la acción moduladora de 5-HT reportada previamente.

La activación de la COX-1 y COX-2 conduce a la producción de tromboxanos y prostaglandinas (Vane *et al.*, 1998). Szerafin *et al.*, (2006) 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 STZ se ha visto que están incrementados los metabolitos con acción vasodilatadora derivados del ácido araquidónico (Kamata *et al.*, 2006).

En consecuencia, hemos realizado parte de nuestros experimentos en presencia de indometacina, un inhibidor no selectivo de las COX (Moncada y Vane, 1981) para analizar la vía del araquidónico en la acción inhibitoria serotoninérgica. Indometacina fue capaz de revertir parcialmente la acción inhibitoria de 5-HT y bloquear completamente el efecto producido por el agonista selectivo de receptores 5-HT<sub>2A</sub>,  $\alpha$ -metil-5-HT. Pero indometacina no fue capaz de bloquear el efecto inhibitorio producido por el agonista selectivo de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 8-OH-DPAT. La inhibición mediada por receptores 5-HT<sub>2A</sub> también fue revertida tanto por un potente y selectivo inhibidor de la COX -1, FR122 047 (Ochi y Goto, 2001, 2002), como por nimesulida, un inhibidor de la COX-2 (Kiff *et al.*, 1991; Abdelrahman y Suleimani, 2008). Estos datos sugieren que derivados endoteliales del ácido araquidónico deben tener influencia vasodilatadora (probablemente debido a la formación de prostaciclina) en las arterias de ratas diabéticas a largo plazo en nuestro modelo experimental. Nuestros resultados están de acuerdo con datos anteriormente reportados que indican una disminución en la actividad de prostanoides vasoconstrictores (Makino y Kamata, 1998; Miranda *et al.*, 2000, 2002)

y un aumento en la actividad de prostanoideos vasodilatadores (Okumura *et al.*, 2000; Alabadí *et al.*, 2001) durante la diabetes.

Todos estos datos sugieren que la diabetes experimental a largo plazo produce cambios en los mediadores implicados en la acción inhibitoria que 5-HT ejerce a través de la activación de receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub> sobre las respuestas presoras inducidas por estimulación simpática. Mientras que en la diabetes a corto plazo el principal mediador implicado es la liberación del NO por activación de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, en la diabetes a largo plazo hay dos vías implicadas: la vía del NO por activación de receptores 5-HT<sub>1A</sub> y productos liberados por activación de la vía de las COX a través de receptores 5-HT<sub>2A</sub>.

III.2

**5-HIDROXITRIPTAMINA  
SISTEMA COLINÉRGICO**

• ARTÍCULO 3



# ARTÍCULO 3

**Peripheral 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>7</sub> serotonergic receptors modulate  
parasympathetic neurotransmission in long-term diabetic rats**

B. Restrepo, M. L. Martín, L. San Román, A. Morán.

Diabetes Experimental Research 2011  
(en prensa)





## Research Article

# Peripheral 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>7</sub> Serotonergic Receptors Modulate Parasympathetic Neurotransmission in Long-Term Diabetic Rats

Beatriz Restrepo,<sup>1,2</sup> María Luisa Martín,<sup>1</sup> Luis San Román,<sup>1</sup> and Asunción Morán<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Farmacología, Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain

<sup>2</sup>Grupo de Enfermedades Cardiovasculares y Metabólicas, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia

Correspondence should be addressed to Asunción Morán, amoran@usal.es

Received 13 September 2010; Revised 18 November 2010; Accepted 26 December 2010

Academic Editor: Mark A. Yorek

Copyright © 2010 Beatriz Restrepo et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

We analyzed the modulation of serotonin on the bradycardia induced *in vivo* by vagal electrical stimulation in alloxan-induced long-term diabetic rats. Bolus intravenous administration of serotonin had a dual effect on the bradycardia induced either by vagal stimulation or exogenous Ach, increasing it at low doses and decreasing it at high doses of 5-hydroxytryptamine (5-HT), effect reproduced by 5-carboxamidotryptamine maleate (5-CT), a 5-HT<sub>1/7</sub> agonist. The enhancement of the bradycardia at low doses of 5-CT was reproduced by 5-HT<sub>1A</sub> agonist 8-hydroxy-2-dipropylaminotetralin hydrobromide (8-OH-DPAT) and abolished by WAY-100,635, 5-HT<sub>1A</sub> antagonist. Pretreatment with 5-HT<sub>1</sub> antagonist methiothepin blocked the stimulatory and inhibitory effect of 5-CT, whereas pimozone, 5-HT<sub>7</sub> antagonist, only abolished 5-CT inhibitory action. In conclusion, long-term diabetes elicits changes in the subtype of the 5-HT receptor involved in modulation of vagally induced bradycardia. Activation of the 5-HT<sub>1A</sub> receptors induces enhancement, whereas attenuation is due to 5-HT<sub>7</sub> receptor activation. This 5-HT dual effect occurs at pre- and postjunctional levels.

## 1. Introduction

The role of 5-hydroxytryptamine (5-HT) in cholinergic neurotransmission and parasympathetic cardiovascular effects has received considerable attention over many years. Central 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, and 5-HT<sub>7</sub> receptors have a physiological role in the regulation of cardiovascular reflexes, controlling changes in parasympathetic (vagal) drive to the heart [1]. Recently, Ni et al. [2] revealed the existence of a local 5-hydroxytryptaminergic system in peripheral arteries, but the physiological role of 5-HT in the regulation of vascular tone remains unclear. Some studies have proposed potent depolarizing actions, with an increase in vagal activity mediated by activation of 5-HT<sub>3</sub> and 5-HT<sub>2</sub> [3], 5-HT<sub>4</sub> [4], or 5-HT<sub>1A</sub> receptors in different animal species [5–9]. Other reports have suggested an inhibitory serotonergic effect on acetylcholine (Ach) release via activation of 5-HT<sub>1</sub> receptors [10].

We have shown that, in pithed rats, the serotonergic mechanisms involved in cardiac cholinergic neurotransmission are presynaptic and that they can dually inhibit or facilitate acetylcholine release via activation of 5-HT<sub>2</sub> or 5HT<sub>3</sub> receptors, respectively [11]. We have also shown that experimental diabetes elicits changes in the nature and 5-HT receptor type/subtype involved in vagal bradycardia stimulated by electrical means [12].

Diabetes mellitus (DM) is considered to be an important public health problem owing to its increasing prevalence and because it causes and exacerbates macro- and microvascular complications. These are associated with severe debilitating complications that include a diabetic autonomic neuropathy characterized in part by impaired cardiac parasympathetic responsiveness. Such parasympathetic dysfunction in the diabetic heart may lead to an autonomic imbalance that may predispose the heart to ventricular arrhythmias and sudden death [13]. Long-term diabetes reduces the body's ability to finely regulate heart rate (HR); this is attributed to profound

1

2

disturbances in autonomic function [14] which are probably due to parasympathetic dysfunction [12, 15]. Several studies conducted under different conditions have supported the theory that, during the development of diabetes, there are impaired myocardial responses to muscarinic activation by acetylcholine. These responses are related to hyper- or hyposensitization and may include changes in expression of muscarinic receptors [16–18]. Other studies have suggested that diabetes induces changes in cholinergic transmission [15, 19].

The aim of the present study was to analyze the possible changes induced by experimental long-term diabetes to 5-HT on the *in vivo* cardiac response to activation of parasympathetic nerves. This was achieved by examining the serotonergic receptors involved in the cholinergic cardiac responses to vagal electrical stimulation or by the administration of exogenous acetylcholine during experimental alloxan-induced diabetes.

## 2. Material and Methods

The housing conditions of the rats and experimental procedures were in accordance with regulations set by the European Union on the use of animal for scientific purposes (86/609/EEC, Article 5, Appendix II) and enacted by Spanish legislation on March 14, 1988 (R.D.223/1988).

**2.1. Animal Preparation.** Two hundred fifty-five male Wistar rats (250–350 g) were used in the present study. Rats were supplied and maintained by the Animalarium of the Faculty of Pharmacy at the University of Salamanca (Spain; PAE-SA001). Diabetes was induced by a single injection of alloxan (150 mg/kg, s.c.) dissolved in 0.9% NaCl. Rats were maintained on tap water, and food was available *ad libitum* for 8 weeks. A second group of animals were kept as control normoglycaemic group for eight weeks. Body weight, systolic blood pressure, heart rate, and blood glucose levels were determined before and at 2, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, and 56 days after alloxan administration. Only rats with elevated blood glucose levels (>11 mM) at all time points were considered to be diabetic. Blood glucose levels were determined by test strips (Accu-Chek). Systolic blood pressure and heart rate were measured in awake rats periodically using the tail-cuff method with a photoelectric sensor (NIPREM 546, Cibertec S.A., Madrid, Spain). Several determinations were made in each session for each rat. Values were considered to be valid if five consecutive measurements were within 10 mmHg.

Eight-week diabetic rats and four-week diabetic rats were anaesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg, i.p.). After cannulation of the trachea, rats were pithed by inserting a stainless steel rod through the orbit and foramen magnum [20]. They were then artificially respirated with room air using a Harvard respiratory pump (1 mL air/100 g, 50 strokes/min; Harvard Apparatus, South Natick, MA, USA). The right and left jugular veins were cannulated for the infusion of agonists and antagonists, respectively.

Arterial blood pressure was monitored from the left carotid artery cannula using a pressure transducer connected to a PRS 206 amplifier (Cibertec). Heart rate was measured by analyses of blood pressure data with a CAR 306 cardiota-chograph (Cibertec). Data on blood pressure and heart rate were shown on a Letica Polygraph 4000 (Cibertec).

Both vagus nerves were isolated, ligated at the cervical level, and cut rostrally to the ligature to prevent afferent and efferent vagal reflexes. Electrical stimulation was applied as square wave pulses from a Cibertec Stimulator CS-9 (supramaximal intensity:  $15 \pm 3$  V; 1 msec; 3, 6, and 9 Hz for 15 s at 5-min intervals) with a platinum bipolar electrode connected to the caudal stump of the right cervical vagus nerve.

Before electrical stimulation, rats were treated with heparin (1000 UI/kg). Then, they were given D-tubocurarine (2 mg/kg, i.v.), to avoid electrically induced muscular twitching, and atenolol (1 mg/kg, i.v.), to prevent sympathetic effects. Rats were kept warm ( $37.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ) with a heating lamp.

**2.2. Experimental Protocols.** After the hemodynamic status of the rats had been stable for  $\geq 10$  min, baseline values for mean blood pressure (MBP) and heart rate were determined.

A platinum bipolar electrode was applied to the caudal stump of the right cervical vagus nerve and electrical stimulation applied as square wave pulses from a Cibertec stimulator applying trains of 15 s which consisted of pulses of 1 msec duration and supramaximal intensity ( $15 \pm 3$  V) at increasing frequencies (3, 6, and 9 Hz). Thus, the control stimulation response curve was completed in  $\sim 15$  min. At this point, rats were divided into seventh agonist or antagonist treatment groups ( $n = 5$  rats/group).

The first group of experiments was conducted in normoglycaemic (kept in parallel during eight weeks) and four-week diabetic rats to confirm previous data from our research team [11, 12]. Each group was subdivided in two. The first subgroup received an i.v. bolus of saline solution (1 mL/kg;  $n = 5$ ) as a control for that groups of experiments or 5-HT (5, 10, 50, 100, and 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $n = 5$  for each dose). Five minutes after the treatment, a new stimulation response curve was obtained. In the second subgroup ( $n = 10$ ), the effects of saline solution (1 mL/kg;  $n = 5$ ) or 5-HT (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $n = 5$ ) on the bradycardia induced by exogenous acetylcholine (1, 5, and 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) were investigated. In this group, acetylcholine was administered before (control curve) and 5 min after pretreatment with saline solution or 5-HT.

In the first long-term alloxan-treated diabetic group ( $n = 80$ ), rats received an i.v. bolus of one of the following: (i) saline solution (1 mL/kg,  $n = 5$ , control group for all the agonist treatments); (ii) 5-HT at 5, 10, 50, 100, and 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( $n = 25$ ); (iii) 5-carboxamidotryptamine maleate (5-CT; selective 5-HT<sub>1/7</sub> receptor agonist) at 5, 10, 50, 100, and 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( $n = 25$ ); (iv) 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of  $\alpha$ -methyl-5-hydroxytryptamine (selective 5-HT<sub>2</sub> receptor agonist  $n = 5$ ); (v) 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of 1-phenylbiguanide (selective 5-HT<sub>3</sub> receptor agonist;  $n = 5$ ); (vi) 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of 8-hydroxydipropylaminotretalin hydrobromide (8-OH-DPAT;

selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist;  $n = 5$ ); (vii) 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of CGS-12066B (agonist of the rodent 5-HT<sub>1B</sub> receptor;  $n = 5$ ); (viii) 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of L-694,247 (selective agonist for nonrodent 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>1D</sub> receptors;  $n = 5$ ). Five minutes after the corresponding administration, a new stimulation response curve was obtained.

The second long-term alloxan-treated diabetic group ( $n = 30$ ) was run in parallel with the group described above. The effect of saline solution (1 mL/kg), 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of methiothepin ( $n = 5$ ), a nonselective 5-HT<sub>1</sub> receptor antagonist, or 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of WAY-100,635 ( $n = 5$ ), a selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist, or 1 mg/kg of GR55562 ( $n = 5$ ), a selective 5-HT<sub>1B</sub> receptor antagonist, or 1 mg/kg of BRL-15572 ( $n = 5$ ), a selective 5-HT<sub>1D</sub> receptor antagonist, and 1 mg/kg of pimoziide ( $n = 5$ ), a selective 5-HT<sub>7</sub> receptor antagonist, was observed.

The third long-term alloxan-treated diabetic group ( $n = 25$ ) was used to determine which receptor subtype was involved in regulating the effect of 5-HT on heart rate. Methiothepin (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), WAY-100,635 (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), GR55562 (1 mg/kg), BRL-15572 (1 mg/kg), or pimoziide (1 mg/kg) were, respectively, administered 5 min before 5-CT (10, 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $n = 10$ ), 8-OH-DPAT (50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $n = 5$ ), CGS-12066B (50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $n = 5$ ), or L-694,247 (50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $n = 5$ ), respectively. Five minutes after each treatment, a new stimulation response curve was obtained.

In the fourth group, rats received an i.v. bolus of atropine (0.3 or 0.5 mg/kg,  $n = 5$  for each dose) before electrical stimulation to confirm that cholinergic responses were induced by electrical stimulation.

In the final group of long-term diabetic rats ( $n = 30$ ), the effects of saline solution (1 mL/kg;  $n = 5$ ), 5-HT (10 and 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $n = 5$  for each dose), 5-CT (10 and 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $n = 5$  for each dose), and 8-OH-DPAT (50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $n = 5$ ) were examined on the bradycardia induced by exogenous acetylcholine (1, 5, and 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), which was administered before (control curve) and 5 min after drug pretreatment.

**2.3. Drugs Used.** The anaesthetic (pentobarbital sodium) was obtained from Sigma-Aldrich, (St. Louis, MO, USA). Heparin sodium was from Roche (Madrid, Spain). Alloxan and d-tubocurarine hydrochloride were purchased from Sigma-Aldrich. 5-hydroxytryptamine creatinine sulphate complex (5-HT), methiothepin mesylate, 5-carboxamidotryptamine maleate (5-CT), 7-trifluoromethyl-4-(4-methyl-1-piperazinyl)pyrrolo[1,2-a]-quinoxaline dimaleate (CGS-12066B dimaleate), 2-[5-[3-(4-methylsulfonylamino)benzyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-1H-indol-3-yl]ethanamine (L-694,247),  $\alpha$ -methyl-5-hydroxytryptamine maleate ( $\alpha$ -methyl-5-HT), 1-[1-[4,4-Bis(4-fluorophenyl)butyl]-4-piperidinyl]-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-one (pimoziide), (S)-N-ter-butyl-3-(4-(2-methoxyphenyl)-piperazin-1-yl)-2-phenylpropanamide dihydrochloride (WAY-100,635), 8-hydroxy-2-dipropylaminotetralin hydrobromide (8-OH-DPAT), and 3-[4-(4-chlorophenyl) piperazin-1-yl]-1,1-diphenyl-2-propanol hydrochloride (BRL-12572) hydrochloride were purchased from Tocris Cookson Limited

(Ellisville, MO, USA). Atropine sulphate was from Scharlau (Barcelona, Spain), and atenolol was from Sigma-Aldrich.

All drugs used were dissolved in distilled water at the time of experimentation, with the exception of BRL-15572 (dissolved in 20% propylene glycol) and pimoziide (dissolved in 0.01 M HCl).

**2.4. Statistical Analyses.** Data are mean  $\pm$  SEM of at least five experiments ( $n = 5$ ). Comparison of results between experimental groups and their corresponding control group were undertaken using ANOVA followed by the Newman-Keuls multiple comparison test. Differences were considered to be statistically significant if  $P < .05$ .

### 3. Results

**3.1. Systemic Hemodynamic Variables.** Alloxan-induced diabetes elicited a marked increase in serum glucose levels and systolic blood pressure. Diabetic rats failed to increase their body weight compared with control rats. Table 1 shows the mean values of body weight, systolic blood pressure, heart rate, and glycaemia before and 8 weeks after the induction of diabetes for rats in the diabetic group and in the control group.

Resting blood pressure and heart rate were  $43.2 \pm 2$  mmHg and  $270 \pm 4.9$  beats per minute, respectively, in eight-week diabetic anaesthetized pithed rats and  $40.5 \pm 1.5$  mmHg and  $290 \pm 5.0$  beats per minute in anaesthetized four-week diabetic rats. These values were not altered significantly by the i.v. administration of a saline bolus, 5-HT receptor agonists (5-HT, 5-CT, 8-OH-DPAT, CGS-12066B, L-694,247,  $\alpha$ -methyl-5-HT, and 1-phenylbiguanide) or the 5-HT receptor antagonists (methiothepin, pimoziide, BRL-15572, GR55562, and WAY-100,635) (data not shown).

**3.2. Effects of Physiological Saline or 5-HT on Vagally Induced Bradycardia in Normoglycaemic and Four-Week Diabetic Rats.** Electrical stimulation of the right vagus nerve in normoglycaemic and four-week diabetic rats resulted in frequency-dependent bradycardia. In both groups the decrease in heart rate remained stable after i.v. administration of a bolus of saline solution (1 mL/kg).

In normoglycaemic rats, the lowest doses of 5-HT (5, 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $n = 10$ ) did not modify the vagally induced bradycardia at the frequencies tested; the administration of 50 and 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( $n = 10$ ) caused an attenuation of the bradycardia, and the highest dose of 5-HT (200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $n = 5$ ) resulted in an increase of the vagally induced bradycardia (Figure 1(a)).

In four-week diabetic rats, the lowest doses of 5-HT (10 and 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $n = 10$ ) did not significantly modify the vagally induced bradycardia in the stimulation frequency range tested (Figure 1(b)). However, high doses of 5-HT (100 and 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $n = 10$ ) caused an increase in the bradycardia, although this was only significant at the stimulation frequency of 3 Hz (Figure 1(b)).

TABLE 1: Values of body weight, systolic blood pressure, heart rate, and glycaemia in control and diabetic rats.

	Body weight (g)	Systolic blood pressure (mmHg)	Heart rate (bpm)	Glycaemia (mM)	<i>n</i>
<i>Control rats</i>					
Initial time	219 ± 9.0	118 ± 5.0	375 ± 10.0	5.6 ± 0.2	40
8 weeks after	424 ± 16.0	130 ± 4.0	392 ± 15.0	4.8 ± 0.1	40
<i>Diabetic rats</i>					
Initial time	192 ± 10.0	124 ± 5.0	310 ± 6.0	5.6 ± 0.1	175
8 weeks after	309 ± 11.8*	157 ± 0.7*	365 ± 10.0	20.1 ± 0.7*	175

Results are means ± SEM for “*n*” rats

\*Significantly different from the corresponding value in control rats,  $P < .05$ .

The stimulatory actions on vagal stimulation-induced bradycardia in diabetic rats were also observed after administration of exogenous acetylcholine (data not shown).

**3.3. Effects of Physiological Saline or 5-HT on Vagally Induced Bradycardia in Long-Term Diabetic Rats.** Electrical stimulation of the right vagus nerve in diabetic rats resulted in frequency-dependent bradycardia. This electrically-induced bradycardia, in the long-term diabetic rats, was less pronounced than the bradycardia obtained under identical conditions in four-week diabetic rats. These differences were statistically significant at all stimulation frequencies (3, 6, and 9 Hz) (Figure 2). The decrease in heart rate remained stable after i.v. bolus administration of saline solution (1 mL/kg,  $n = 5$ ). However, these effects caused by electrical stimulation of the vagus nerve were completely blocked by prior administration of atropine (0.5 mg/kg,  $n = 10$ ) (data not shown), confirming the cholinergic nature of the responses to electrical stimulation.

Low doses of 5-HT (5 and 10 µg/kg,  $n = 10$ ) caused a significant increase in the vagally induced bradycardia at all stimulation frequencies tested (Figure 2). However, high doses of 5-HT (100 and 200 µg/kg,  $n = 10$ ) caused a significant decrease in bradycardia at all stimulation frequencies tested (Figure 2).

**3.4. Effects of i.v. Bolus Administration of 5-HT Receptor Agonists (5-CT, 8-OH-DPAT, CGS-12066B, L-694,247,  $\alpha$ -methyl-5-HT, and 1-phenylbiguanide) on Vagally Induced Bradycardia in Long-Term Diabetic Rats.** In eight-week diabetic rats, the bradycardic effects induced by vagal electrical stimulation were modified by 5-CT (a selective 5-HT<sub>1/7</sub> receptor agonist) depending on the dose administered. At low doses (5 and 10 µg/kg), 5-CT enhanced electrically induced bradycardia (Figure 3), whereas high doses (50, 100, and 200 µg/kg) inhibited electrically induced bradycardia (Figure 3).

The enhanced bradycardic effect induced by low doses of 5-CT was reproduced by administration of the selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist, 8-OH-DPAT (50 µg/kg) (Figure 4). This effect was significant at all stimulation frequencies tested. However, i.v. bolus administration of the selective 5-HT<sub>1B</sub> receptor agonist, CGS-12066B (50 µg/kg), and the selective 5-HT<sub>1D</sub> receptor agonist, L-694,247 (50 µg/kg), had no effect on the bradycardic responses evoked by electrical

stimulation of the vagus nerve (data not shown). Administration of the selective 5-HT<sub>2</sub> receptor agonist,  $\alpha$ -methyl-5-HT (150 µg/kg), or selective 5-HT<sub>3</sub> receptor agonist, 1-phenylbiguanide (150 µg/kg), did not modify the decreases in heart rate induced by vagal electrical stimulation (Figure 3).

**3.5. Effect of i.v. Bolus Administration of 5-HT Receptor Antagonists (Methiothepin, WAY-100,635, and Pimozide) on Vagally Induced Bradycardia in Long-Term Diabetic Rats.** In eight-week diabetic pithed rats, administration of either the selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist, WAY-100,635 (100 µg/kg,  $n = 5$ ), or the nonselective 5-HT<sub>1</sub> receptor antagonist methiothepin (100 µg/kg,  $n = 5$ ) or the selective 5-HT<sub>7</sub> receptor antagonist, pimozide (1 mg/kg,  $n = 5$ ), did not significantly modify the heart rate induced by vagal electrical stimulation (data not shown).

Pretreatment with methiothepin (100 µg/kg) blocked the potentiating and inhibitory effect of 5-CT on the bradycardia induced by vagal stimulation in diabetic rats (Figure 5).

Pretreatment with WAY-100,635 (100 µg/kg) reduced the enhancement of the bradycardic effect caused by low doses of 5-CT (10 µg/kg; Figure 3) and abolished the effects of 8-OH-DPAT (50 µg/kg,  $n = 5$ ; Figure 4).

Administration of the selective 5-HT<sub>7</sub> receptor antagonist pimozide (1 mg/kg) did not modify the potentiating effect of the lowest 5-CT doses (10 µg/kg,  $n = 5$ ; Figure 6). However, it abolished the inhibitory action of high doses of 5-CT (100 µg/kg,  $n = 5$ ; Figure 6).

**3.6. Effects of Saline, 5-HT, 5-CT, and 8-OH-DPAT on the Bradycardia Induced by Exogenous Acetylcholine Administration in Long-Term Diabetic Rats.** Exogenous administration of acetylcholine (5 and 10 µg/kg) in long-term hyperglycemic rats produced a significantly increased bradycardia compared with normoglycemic rats. However, the bradycardia was less pronounced than in short-term diabetic rats (Figure 7).

In a group of rats, bradycardia was induced by exogenous administration of the muscarinic agonist acetylcholine (1, 5, and 10 µg/kg), resulting in dose-dependent decreases in heart rate. These bradycardic effects, in eight-week diabetic rats, remained stable after i.v. bolus administration of saline (1 mL/kg,  $n = 5$ ). However, administration of 5-HT (10 µg/kg,  $n = 5$ ), 5-CT (10 µg/kg,  $n = 5$ ), or 8-OH-DPAT (50 µg/kg,  $n = 5$ ) enhanced the bradycardia, whereas i.v. bolus administration of higher doses of 5-HT

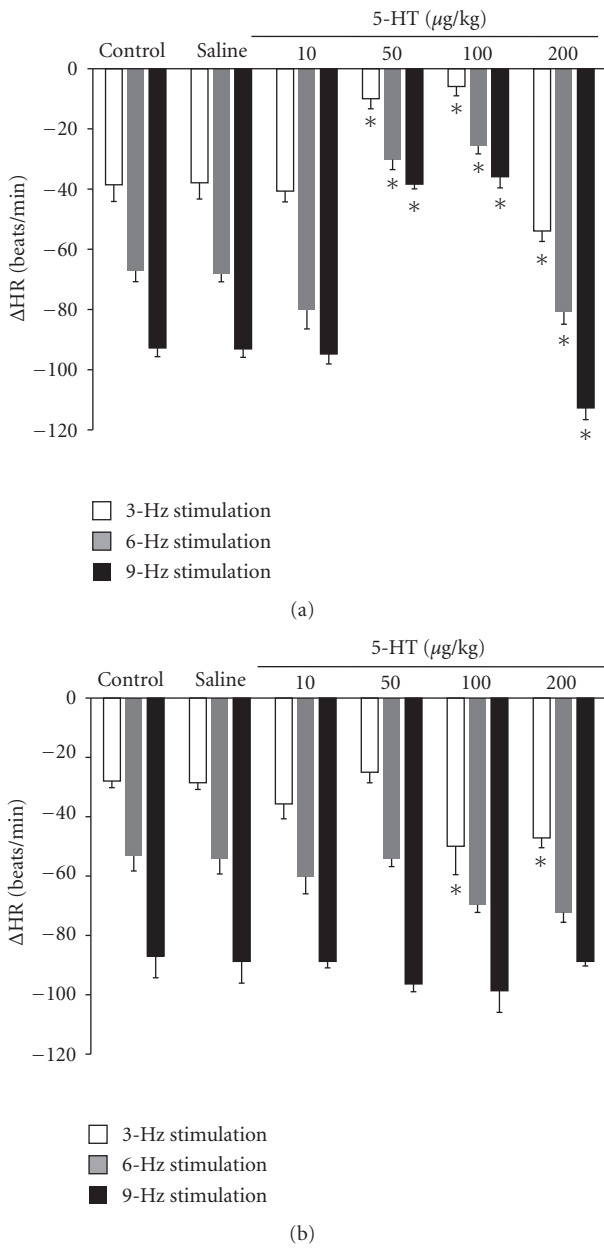


FIGURE 1: Change in heart rate response ( $\Delta HR$ ) evoked by electrical stimulation of the peripheral end of the right vagus in atenolol (1 mg/kg), pretreated (a) normoglycaemic and (b) four-week diabetic pithed rats before (control;  $n = 5$ ) and after i.v. administration of a bolus of 1 mL/kg saline solution or 10, 50, 100, 200  $\mu\text{g/kg}$  of 5-hydroxytryptamine (5-HT) to normoglycaemic rats ( $n = 5$ ) or 10, 50, 100, 200  $\mu\text{g/kg}$  of 5-HT to four-week diabetic rats ( $n = 5$ ). \* $P < .05$  compared with saline (control).

(100  $\mu\text{g/kg}$ ,  $n = 5$ ) or 5-CT (100  $\mu\text{g/kg}$ ,  $n = 5$ ) inhibited the bradycardia induced by administration of exogenous acetylcholine (Figure 8).

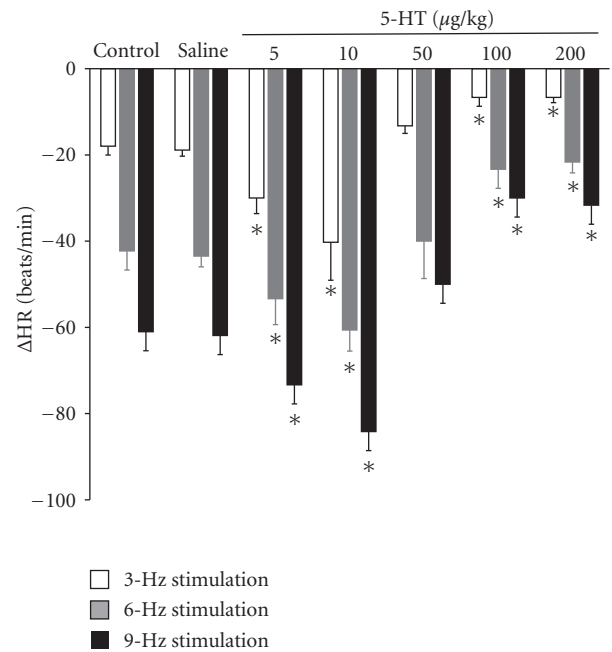


FIGURE 2: Changes in heart rate ( $\Delta HR$ ) evoked by electrical stimulation of the peripheral end of the right vagus in atenolol (1 mg/kg) pretreated long-term diabetic pithed rats after i.v. administration of a bolus of 1 mL/kg of saline solution, 5, 10, 50, 100, and 200  $\mu\text{g/kg}$  of 5-HT. \* $P < .05$  compared with saline.

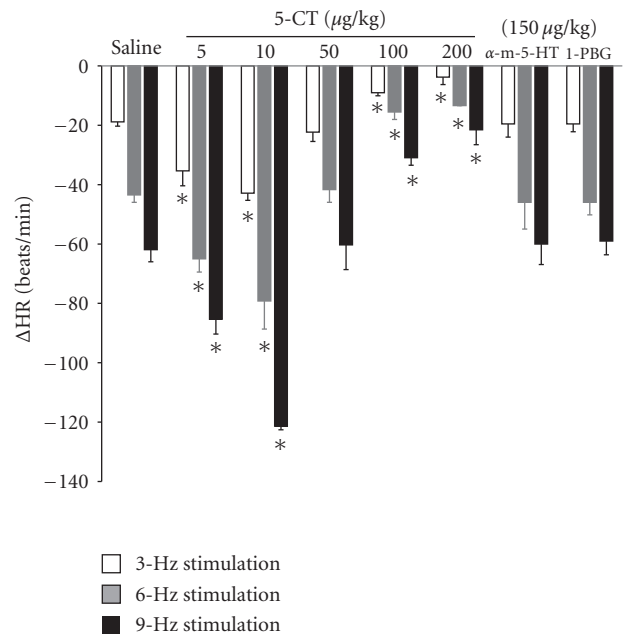


FIGURE 3: Changes in heart rate ( $\Delta HR$ ) evoked by electrical stimulation of the peripheral end of the right vagus in atenolol (1 mg/kg) pretreated diabetic pithed rats after i.v. administration of a bolus of 1 mL/kg of saline solution, 5, 50, and 200  $\mu\text{g/kg}$  of 5-carboxamidotryptamine (5-CT;  $n = 5$  for each dose),  $\alpha$ -methyl-5-HT ( $\alpha$ -m-5-HT; 150  $\mu\text{g/kg}$ ), or 1-phenylbiguanide (1-PBG; 150  $\mu\text{g/kg}$ ). \* $P < .05$  compared with saline.

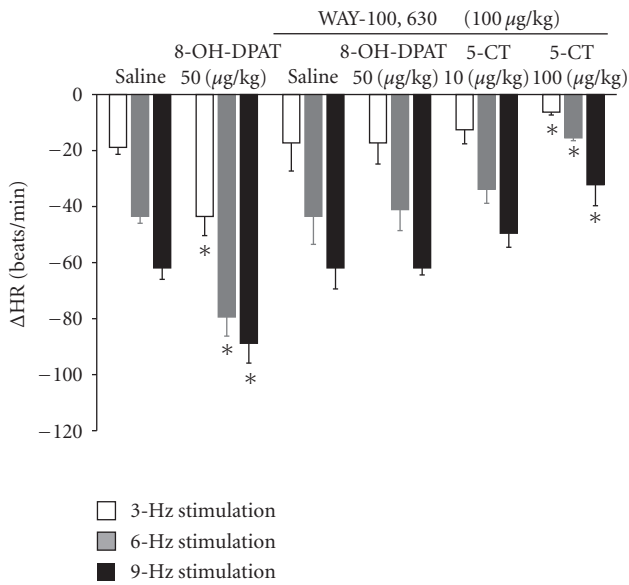


FIGURE 4: Changes in heart rate ( $\Delta$ HR) after i.v. administration of a bolus of 8-hydroxydipropylaminotretalin hydrobromide (8-OH-DPAT, 50  $\mu$ g/kg;  $n = 5$ ) and response after i.v. administration of a bolus of WAY-100,635 (100  $\mu$ g/kg) on the effect of 8-hydroxydipropylaminotretalin hydrobromide (8-OH-DPAT, 50  $\mu$ g/kg;  $n = 5$ ) and 5-carboxamidotryptamine (5-CT, 10, 100  $\mu$ g/kg;  $n = 10$ ) on bradycardia induced by vagal electrical stimulation in diabetic pithed rats. \* $P < .05$  compared with saline.

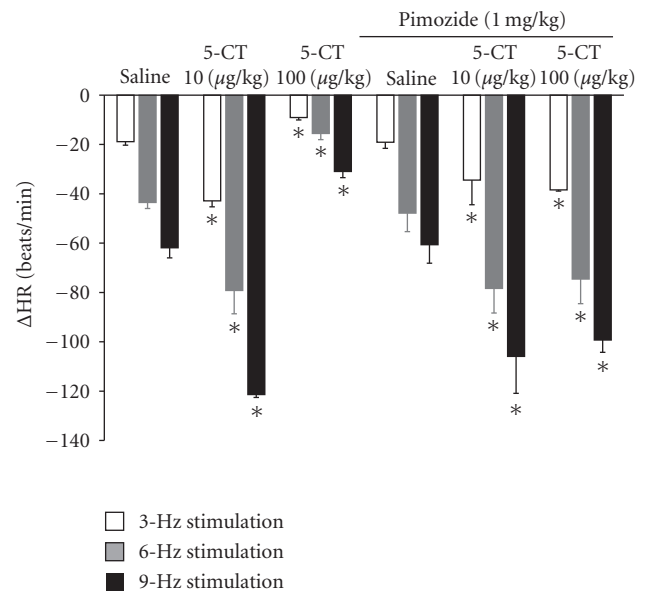


FIGURE 6: Changes in heart rate ( $\Delta$ HR) after i.v. administration of a bolus of 5-carboxamidotryptamine (5-CT, 10, 100  $\mu$ g/kg) and response after i.v. administration of a bolus of pimozide (1 mg/kg) on the enhanced effect and inhibitory effect of 5-CT (10, 100  $\mu$ g/kg) on bradycardia by vagal electrical stimulation in diabetic pithed rats. \* $P < .05$  compared with saline.

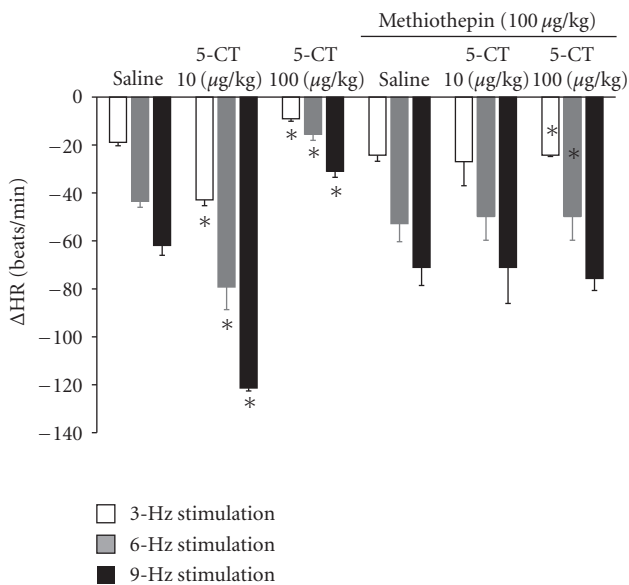


FIGURE 5: Changes in heart rate ( $\Delta$ HR) after i.v. administration of a bolus of 5-carboxamidotryptamine (5-CT, 10, 100  $\mu$ g/kg) and response after i.v. administration of a bolus of methiothepin (100  $\mu$ g/kg) on the enhanced and inhibitory effect of 5-CT (10, 100  $\mu$ g/kg) on bradycardia by vagal electrical stimulation in diabetic pithed rats. \* $P < .05$  compared with saline.

#### 4. Discussion

In the present study, we examined the changes induced by experimental long-term diabetes to 5-HT on the *in vivo* cardiac response to activation of parasympathetic nerves. This was achieved by examining the serotonergic receptors involved in the cholinergic cardiac responses induced by vagal electrical stimulation or by the administration of exogenous acetylcholine during experimental alloxan-induced diabetes.

Alloxan is a diabetogenic agent which induces a syndrome in animals resembling type 1 diabetes mellitus characterized by hyperglycemia, hypercholesterolemia, glycosuria, and raised levels of glycosylated hemoglobin in erythrocytes [12, 17, 21–24]. This agent, in our experiments, did not modify heart rate, as previously indicated by Lee et al. [25], Zola et al. [26], and Howarth et al. [27].

Herein, we showed that there was no significant difference in basal heart rate among the three study groups (normoglycemic, long-term, and short-term diabetic rats) as reported by us and others [11, 12, 28]. This is in contrast with reports that describe a reduced intrinsic heart rate [29] and parasympathetic tonus in diabetes [30].

We showed that, in long-term diabetic rats, the bradycardic effect produced by electrical stimulation of the vagus nerve (at all stimulation frequencies) was lower than the observed in short-term diabetic rats and was impaired compared with normoglycemic rats [11, 12]. In 2007, Ago et al. [31], using diabetic rats, showed an increase in heart rate induced by vagal stimulation using stimulation frequencies higher than those used by us (16, 32, and 64 Hz).

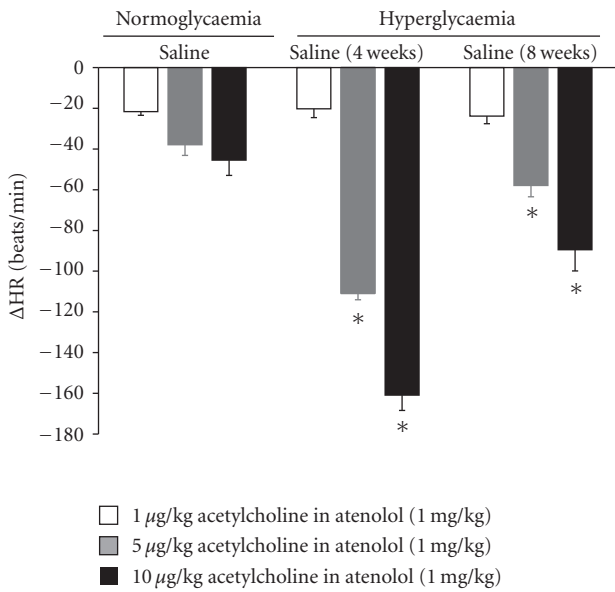


FIGURE 7: Changes in heart rate ( $\Delta$ HR) evoked by exogenous administration of 1, 5, and 10  $\mu$ g/kg acetylcholine in atenolol (1 mg/kg) pretreated in normoglycaemic, four-week, and long-term diabetic pithed rats after i.v. administration of a bolus of 1 mL/kg. \* $P < .05$  compared with normoglycaemic group.

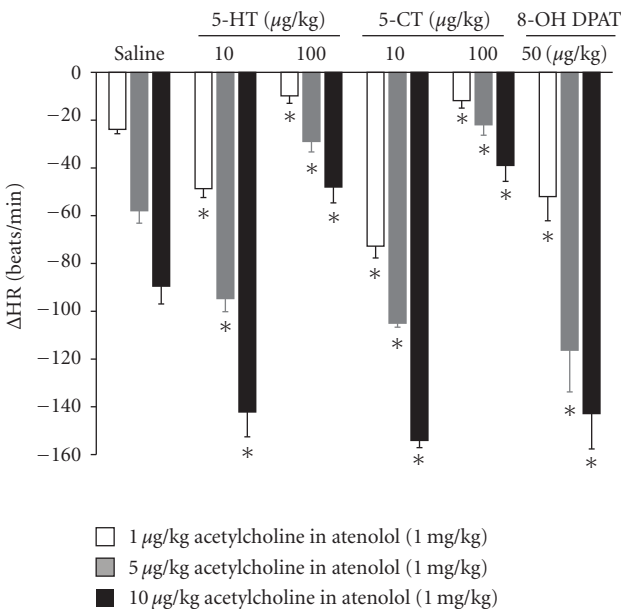


FIGURE 8: Changes in heart rate ( $\Delta$ HR) evoked by exogenous administration of 1, 5, and 10  $\mu$ g/kg acetylcholine in atenolol (1 mg/kg) pretreated in long-term diabetic pithed rats after i.v. administration of a bolus of 1 mL/kg of saline solution, 5-hydroxytryptamine (5-HT, 10 and 100  $\mu$ g/kg;  $n = 10$ ), 5-carboxamidotryptamine (5-CT 10 and 100  $\mu$ g/kg;  $n = 10$ ), or 8-hydroxydipropylaminotretalin hydrobromide (8-OH-DPAT 50  $\mu$ g/kg;  $n = 5$ ). \* $P < .05$  compared with saline.

We also demonstrated that administration of exogenous acetylcholine (5 and 10  $\mu$ g/kg) in long-term hyperglycaemic rats produced a more pronounced bradycardia than in normoglycaemic rats (statistically significant difference). However, the bradycardia was less pronounced than in short-term diabetic rats. Our research team and others have suggested that chemically induced diabetes may elicit functional defects in cardiac cholinergic nerves [11, 32–34]. In the heart, inhibitory  $M_2$  muscarinic receptors on the nerves limit acetylcholine release [35–37]. The increased inhibition of acetylcholine release by inhibitory neuronal  $M_2$  muscarinic receptors during experimental diabetes has been described extensively in different experimental models, including rat lungs [16], the ileum and trachea from diabetic rats [18], the urinary bladder [38], and even in human cardiac atrium [39]. Therefore, in the present study, we examined the changes induced by long-term diabetes in the action that 5-HT exerts on the *in vivo* cardiac response to parasympathetic nerves activation.

5-HT is the well-characterized endogenous ligand for all 5-HT receptors. 5-HT had a dual effect on the bradycardia induced by electrical stimulation in experimental long-term diabetic rats. This dual effect was reproduced by the selective 5-HT<sub>1/7</sub> receptor agonist 5-CT [40]: at low doses (5 and 10  $\mu$ g/kg), 5-HT and 5-CT increased the bradycardia, whereas higher doses (100 and 200  $\mu$ g/kg) of 5-HT or 5-CT decreased the bradycardic effect at all stimulation frequencies. In contrast, administration of  $\alpha$ -methyl-5-HT (a selective 5-HT<sub>2A/2B/2C</sub> receptor agonist) [41] or 1-phenylbiguanide (a selective 5-HT<sub>3</sub> receptor agonist) [42, 43] had no effect on vagally induced bradycardia in diabetic rats. These findings suggest that, in experimental long-term (eight-week) diabetes, the serotonergic effects on bradycardia are mediated through activation of the 5-HT<sub>1</sub> receptors but not through activation of the 5-HT<sub>2</sub> or 5-HT<sub>3</sub> receptors. We had previously demonstrated that, in normoglycaemic pithed rats, 5-HT<sub>2</sub> receptors are involved in the inhibition of vagally induced bradycardia and that the 5-HT<sub>3</sub> receptor is required for stimulatory action [11]. Therefore, we propose that, in experimental diabetes, as in normoglycaemia [11, 12], the serotonergic system interferes with cholinergic cardiac transmission, producing enhancement and inhibition of the bradycardic effect induced by vagal stimulation.

Several authors have hypothesized that, at gastrointestinal level, in normoglycaemic animals, 5-HT<sub>1</sub> receptors are involved in the reduction of acetylcholine release [10, 44]. To determine which 5-HT<sub>1</sub> receptor subtype is responsible for the action observed in this paper, we used antagonists and selective 5-HT<sub>1</sub> agonists in our experimental model of diabetes.

In long-term diabetic rats, we noted that the increases observed in the vagally induced bradycardia after administration of low doses of 5-HT and 5-CT (selective 5-HT<sub>1/7</sub> receptor agonist) were mimicked, at all stimulation frequencies, by the selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT [45].

However, and unlike the effects observed in four-week diabetic rats, L-694,247, a selective agonist for nonrodent

5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>1D</sub> receptors [46], failed to mimic the inhibitory action on vagally induced bradycardia elicited by high doses of 5-CT. Also, CGS-12066B, a rodent 5-HT<sub>1B</sub> receptor agonist [47], had no effect on vagally induced bradycardia. These findings suggest that the 5-HT<sub>1A</sub> receptor subtype is involved in regulating the stimulatory effect observed.

Regarding the antagonists utilized, the selective 5-HT<sub>1A</sub> antagonist WAY-100,635 [48] and the selective 5-HT<sub>7</sub> receptor antagonist pimoziide [49] did not affect the vagally induced bradycardia in long-term diabetic rats. However, the vagally induced bradycardia was slightly enhanced by methiothepin (nonselective 5-HT<sub>1</sub> receptor antagonist) [50]. These findings are consistent with reports describing an intrinsic effect on acetylcholine release in rat striatal slices for methiothepin [51].

We have previously indicated a dual effect for 5-CT in four-week diabetic rats [12]. This effect was reproduced in eight-week diabetic rats, but the receptor subtype involved in the inhibitory effect was different. Furthermore, in the present study we showed that, in long-term diabetic rats (8 weeks), (i) methiothepin [40], a nonselective 5-HT receptor antagonist, blocked the enhanced and inhibitory effects of 5-CT on the vagally induced bradycardia; (ii) 8-OH-DPAT (selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist) could enhance the bradycardia produced by vagal stimulation; (iii) the action of 8-OH-DPAT was abrogated by WAY-100,635 (selective 5-HT<sub>1A</sub> antagonist) [52]; (iv) pimoziide (selective 5-HT<sub>7</sub> antagonist) [49] blocked the inhibitory effect of high doses of 5-CT; (v) after pretreatment with pimoziide, 5-CT could increase the bradycardia produced by vagal stimulation at all doses tested.

Diabetes mellitus is associated with severe debilitating complications that include diabetic autonomic neuropathy characterized in part by impaired cardiac parasympathetic responsiveness [13]. Parasympathetic dysfunction in the diabetic heart may lead to an autonomic imbalance which may predispose the heart to ventricular arrhythmias and sudden death. Our findings suggest a possible peripheral action of serotonergic receptors in modulating cholinergic transmission, in addition to the well-known central 5-HT<sub>1A</sub> receptor regulation in cardiovascular effects [7, 53]. Also, the role of 5-HT<sub>7</sub> receptors in facilitating vagal outflow activation to the heart [1, 8, 54] has been suggested.

We also showed that the dual effect (stimulatory and inhibitory actions) of the vagally induced bradycardia caused by 5-HT and 5-CT persisted if the bradycardia was elicited by exogenous acetylcholine in long-term diabetic rats.

These results confirm the pre- and postjunctional nature of these serotonergic actions in long-term diabetes. Nevertheless, these findings are in contrast with results described by our research team in normoglycaemic rats [11] and were similar to those found in four-week diabetic pithed rats [12],

The present study showed that long-term diabetes changed the responses to 5-HT on the *in vivo* cardiac response to activation of parasympathetic nerves. Peripheral 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptors may have a physiological role in the regulation of cardiovascular reflexes, controlling changes in parasympathetic (vagal) drive to the heart. In this line,

in the nucleus tractus solitaries, Oskutyte et al. [55] have reported the presence of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptors, which play an important role in cardiovascular reflex activation of parasympathetic outflow to the heart.

In conclusion, experimental long-term diabetes induces changes in the nature and the type/subtype of 5-HT receptors involved in vagal bradycardia induced by electrical stimulation. Activation of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor subtype induces enhancement of vagally induced bradycardia, whereas attenuation of this bradycardia is due to activation of the 5-HT<sub>7</sub> receptor subtype. The effects induced by 5-HT occur at the pre- and postjunctional level in long-term diabetic pithed rats. Based on these and our previous results, the alloxan-induced diabetes in rats (short- and long-term diabetes) is an appropriate model to study the role of 5-HT and its receptors in the development and progression of the autonomic and endothelial dysfunction due to diabetes mellitus type 1. Further investigation is warranted to determine whether 5-HT<sub>7</sub> receptors play a pathophysiological role in the autonomic dysfunction due to this chronic disease.

## References

- [1] A. G. Ramage and C. M. Villalón, "5-hydroxytryptamine and cardiovascular regulation.," *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 29, no. 9, pp. 472–481, 2008.
- [2] W. Ni, T. J. Geddes, J. R. C. Priestley, T. Szasz, D. M. Kuhn, and S. W. Watts, "The existence of a local 5-hydroxytryptaminergic system in peripheral arteries," *British Journal of Pharmacology*, vol. 154, no. 3, pp. 663–674, 2008.
- [3] Y. Wang, A. G. Ramage, and D. Jordan, "Presynaptic 5-HT<sub>3</sub> receptors evoke an excitatory response in dorsal vagal preganglionic neurones in anaesthetized rats," *Journal of Physiology*, vol. 509, no. 3, pp. 683–694, 1998.
- [4] M. Tonini, C. A. Rizzi, L. Manzo, and L. Onori, "Novel enteric 5-HT<sub>4</sub> receptors and gastrointestinal prokinetic action," *Pharmacological Research*, vol. 24, no. 1, pp. 5–14, 1991.
- [5] S. C. E. Sporton, S. L. Shephard, D. Jordan, and A. G. Ramage, "Microinjections of 5-HT<sub>1A</sub> agonists into the dorsal motor vagal nucleus produce a bradycardia in the atenolol-pretreated anaesthetized rat," *British Journal of Pharmacology*, vol. 104, no. 2, pp. 466–470, 1991.
- [6] S. L. Shephard, D. Jordan, and A. G. Ramage, "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," *British Journal of Pharmacology*, vol. 111, no. 2, pp. 616–624, 1994.
- [7] M. R. Skinner, A. G. Ramage, and D. Jordan, "Modulation of reflexly evoked vagal bradycardias by central 5-HT<sub>1A</sub> receptors in anaesthetized rabbits," *British Journal of Pharmacology*, vol. 137, no. 6, pp. 861–873, 2002.
- [8] D. O. Kellett, A. G. Ramage, and D. Jordan, "Central 5-HT<sub>7</sub> receptors are critical for reflex activation of cardiac vagal drive in anaesthetized rats," *Journal of Physiology*, vol. 563, no. 1, pp. 319–331, 2005.
- [9] C. M. Villalón and D. Centurión, "Cardiovascular responses produced by 5-hydroxytryptamine: a pharmacological update on the receptors/mechanisms involved and therapeutic implications," *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, vol. 376, no. 1-2, pp. 45–63, 2007.
- [10] M. Tonini, T. Coccini, L. Onori, S. M. Candura, C.



- A. Rizzi, and L. Manzo, "The influence of neuronal 5-hydroxytryptamine receptor antagonists on non-cholinergic ganglionic transmission in the guinea-pig enteric excitatory reflex," *British Journal of Pharmacology*, vol. 107, no. 1, pp. 5–7, 1992.
- [11] A. Moran, C. Velasco, M. L. Martín, and L. S. Roman, "Pharmacological characterization of 5-HT receptors in parasympathetic innervation of rat heart," *European Journal of Pharmacology*, vol. 252, no. 2, pp. 161–166, 1994.
- [12] M. García, A. Morán, M. L. Martín, A. V. Ortiz de Urbina, and L. San Román, "Diabetes-induced changes in 5-hydroxytryptamine modulation of vagally induced bradycardia in rat heart," *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, vol. 34, no. 11, pp. 1199–1206, 2007.
- [13] H. J. Park, Y. Zhang, C. Du et al., "Role of SREBP-1 in the development of parasympathetic dysfunction in the hearts of type 1 diabetic akita mice," *Circulation Research*, vol. 105, no. 3, pp. 287–294, 2009.
- [14] J. G. McLeod, "Autonomic dysfunction in peripheral nerve disorders," *Current Opinion in Neurology and Neurosurgery*, vol. 5, no. 4, pp. 476–481, 1992.
- [15] T. S. McDowell, M. W. Chapleau, G. Hajduczuk, and F. M. Abboud, "Baroreflex dysfunction in diabetes mellitus. I. Selective impairment of parasympathetic control of heart rate," *American Journal of Physiology—Heart and Circulatory Physiology*, vol. 266, no. 1, pp. H235–H243, 1994.
- [16] K. E. Belmonte, D. B. Jacoby, and A. D. Fryer, "Increased function of inhibitory neuronal M muscarinic receptors in diabetic rat lungs," *British Journal of Pharmacology*, vol. 121, no. 7, pp. 1287–1294, 1997.
- [17] J. A. Alabadi, F. J. Miranda, S. Lloréns, R. F. Ruiz de Apodaca, J. M. Centeno, and E. Alborch, "Diabetes potentiates acetylcholine-induced relaxation in rabbit renal arteries," *European Journal of Pharmacology*, vol. 415, no. 2-3, pp. 225–232, 2001.
- [18] F. R. Coulson, D. B. Jacoby, and A. D. Fryer, "Increased function of inhibitory neuronal M<sub>2</sub> muscarinic receptors in trachea and ileum of diabetic rats," *British Journal of Pharmacology*, vol. 135, no. 6, pp. 1355–1362, 2002.
- [19] M. Lishner, S. Akselrod, V. Mor Avi, O. Oz, M. Divon, and M. Ravid, "Spectral analysis of heart rate fluctuations. A non-invasive, sensitive method for the early diagnosis of autonomic neuropathy in diabetes mellitus," *Journal of the Autonomic Nervous System*, vol. 19, no. 2, pp. 119–125, 1987.
- [20] J. S. Gillespie and T. C. Muir, "A method of stimulating the complete sympathetic outflow from the spinal cord to blood vessels in the pithed rat," *British Journal of Pharmacology*, vol. 30, no. 1, pp. 78–87, 1967.
- [21] D. K. Agrawal, S. Bhimji, and J. H. McNeill, "Effect of chronic experimental diabetes on vascular smooth muscle function in rabbit carotid artery," *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, vol. 9, no. 5, pp. 584–593, 1987.
- [22] Y. Öztürk, V. M. Altan, and N. Yildizoğlu-Ari, "Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions," *Pharmacological Reviews*, vol. 48, no. 1, pp. 69–112, 1996.
- [23] N. N. Chan, P. Vallance, and H. M. Colhoun, "Nitric oxide and vascular responses in Type I diabetes," *Diabetologia*, vol. 43, no. 2, pp. 137–147, 2000.
- [24] F. J. Miranda, J. A. Alabadi, S. Lloréns, R. F. Ruiz de Apodaca, J. M. Centeno, and E. Alborch, "Experimental diabetes induces hyperreactivity of rabbit renal artery to 5-hydroxytryptamine," *European Journal of Pharmacology*, vol. 439, no. 1–3, pp. 121–127, 2002.
- [25] J. H. Lee, M. Konarska, and R. McCarty, "Physiological responses to acute stress in alloxan and streptozotocin diabetic rats," *Physiology and Behavior*, vol. 45, no. 3, pp. 483–489, 1989.
- [26] B. E. Zola, B. Miller, G. L. Stiles, P. S. Rao, E. H. Sonnenblick, and F. S. Fein, "Heart rate control in diabetic rabbits: blunted response to isoproterenol," *American Journal of Physiology—Endocrinology and Metabolism*, vol. 255, no. 5, pp. E636–E641, 1988.
- [27] F. C. Howarth, M. Jacobson, M. Shafiqullah, M. Ljubisavljevic, and E. Adegate, "Heart rate, body temperature and physical activity are variously affected during insulin treatment in alloxan-induced type 1 diabetic rat," *Physiological Research*. In press.
- [28] N. Akiyama, K. Okumura, Y. Watanabe et al., "Altered acetylcholine and norepinephrine concentrations in diabetic rat hearts. Role of parasympathetic nervous system in diabetic cardiomyopathy," *Diabetes*, vol. 38, no. 2, pp. 231–236, 1989.
- [29] P. Lo Giudice, A. Careddu, G. Magni, T. Quagliata, L. Pacifici, and P. Carminati, "Autonomic neuropathy in streptozotocin diabetic rats: effect of acetyl-L-carnitine," *Diabetes Research and Clinical Practice*, vol. 56, no. 3, pp. 173–180, 2002.
- [30] B. Martinez-Nieves, H. L. Collins, and S. E. DiCarlo, "Autonomic and endothelial dysfunction in experimental diabetes," *Clinical and Experimental Hypertension*, vol. 22, no. 6, pp. 623–634, 2000.
- [31] Y. Ago, S. Nakamura, N. Kajita et al., "Ritanserin reverses repeated methamphetamine-induced behavioral and neurochemical sensitization in mice," *Synapse*, vol. 61, no. 9, pp. 757–763, 2007.
- [32] K. C. Tomlinson, S. M. Gardiner, R. A. Hebden, and T. Bennett, "Functional consequences of streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular reference to the cardiovascular system," *Pharmacological Reviews*, vol. 44, no. 1, pp. 103–150, 1992.
- [33] D. R. Tomlinson and A. P. M. Yusof, "Autonomic neuropathy in the alloxan-diabetic rat," *Journal of Autonomic Pharmacology*, vol. 3, no. 4, pp. 257–263, 1983.
- [34] J. Roquebert, A. Moran, P. Demichel, and M. F. Sauvage, "Pharmacological characterization of dopamine receptors in parasympathetic innervation of rat heart," *European Journal of Pharmacology*, vol. 200, no. 1, pp. 59–63, 1991.
- [35] N. Yonehara, K. Saito, S. Uchida, Y. Noguchi, and H. Yoshida, "Effects of muscarinic agonists and antagonists on the negative chronotropic responses to the vagus nerve stimulation," *Japanese Journal of Pharmacology*, vol. 29, no. 5, pp. 797–799, 1979.
- [36] P. Fuchs and H. Fuder, "The determination of presynaptic K(A) values of methacholine and pilocarpine and of a presynaptic receptor reserve in the rat perfused heart," *British Journal of Pharmacology*, vol. 84, no. 1, pp. 35–46, 1985.
- [37] G. T. Wetzel and J. H. Brown, "Presynaptic modulation of acetylcholine release from cardiac parasympathetic neurons," *American Journal of Physiology*, vol. 248, no. 1, pp. H33–H39, 1985.
- [38] Y. C. Tong, J. T. Cheng, and W. C. Wan, "Effects of Ba-Wei-Die-Huang-Wan on the cholinergic function and protein expression of M muscarinic receptor of the urinary bladder in diabetic rats," *Neuroscience Letters*, vol. 330, no. 1, pp. 21–24, 2002.
- [39] V. Oberhauser, E. Schwertfeger, T. Rutz, F. Beyersdorf, and L. C. Rump, "Acetylcholine release in human heart atrium influence of muscarinic autoreceptors, diabetes, and age," *Circulation*, vol. 103, no. 12, pp. 1638–1643, 2001.

- [40] D. Hoyer, D. E. Clarke, J. R. Fozard et al., "International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin)," *Pharmacological Reviews*, vol. 46, no. 2, pp. 157–203, 1994.
- [41] G. Baxter, G. Kennett, F. Blaney, and T. Blackburn, "5-HT<sub>2</sub> receptor subtypes: a family re-united?" *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 16, no. 3, pp. 105–110, 1995.
- [42] S. J. Ireland and M. B. Tyers, "Pharmacological characterization of 5-hydroxytryptamine-induced depolarization of the rat isolated vagus nerve," *British Journal of Pharmacology*, vol. 90, no. 1, pp. 229–238, 1987.
- [43] J. Chen, H. M. van Praag, and E. L. Gardner, "Activation of 5-HT<sub>3</sub> receptor by 1-phenylbiguanide increases dopamine release in the rat nucleus accumbens," *Brain Research*, vol. 543, no. 2, pp. 354–357, 1991.
- [44] S. B. Dando, M. R. Skinner, D. Jordan, and A. G. Ramage, "Modulation of the vagal bradycardia evoked by stimulation of upper airway receptors by central 5-HT<sub>1</sub> receptors in anaesthetized rabbits," *British Journal of Pharmacology*, vol. 125, no. 2, pp. 409–417, 1998.
- [45] D. N. Middlemiss and J. R. Fozard, "8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin discriminates between subtypes of the 5-HT<sub>1</sub> recognition site," *European Journal of Pharmacology*, vol. 90, no. 1, pp. 151–153, 1983.
- [46] M. S. Beer, J. A. Stanton, Y. Bevan et al., "L-694,247: a potent 5-HT(1D) receptor agonist," *British Journal of Pharmacology*, vol. 110, no. 3, pp. 1196–1200, 1993.
- [47] D. M. Tomkins and M. F. O'Neill, "Effect of 5-HT<sub>1B</sub> receptor ligands on self-administration of ethanol in an operant procedure in rats," *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, vol. 66, no. 1, pp. 129–136, 2000.
- [48] E. A. Forster, I. A. Clifed, D. J. Bill et al., "A pharmacological profile of the selective silent 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist, WAY-100635," *European Journal of Pharmacology*, vol. 281, no. 1, pp. 81–88, 1995.
- [49] B. L. Roth, S. C. Craigo, M. S. Choudhary et al., "Binding of typical and atypical antipsychotic agents to 5-hydroxytryptamine-6 and 5-hydroxytryptamine-7 receptors," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 268, no. 3, pp. 1403–1410, 1994.
- [50] D. Centurion, A. Sanchez-Lopez, M. I. Ortiz, P. de Vries, P. R. Saxena, and C. M. Villalon, "Mediation of 5-HT-induced internal carotid vasodilatation in GR127935- and ritanserin-pretreated dogs by 5-HT<sub>7</sub> receptors," *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, vol. 362, no. 2, pp. 169–176, 2000.
- [51] M. J. Ramírez, E. Cenarruzabeitia, B. Lasheras, and J. del Rio, "5-HT<sub>2</sub> receptor regulation of acetylcholine release induced by dopaminergic stimulation in rat striatal slices," *Brain Research*, vol. 757, no. 1, pp. 17–23, 1997.
- [52] R. Mostany, A. Pazos, and M. E. Castro, "Autoradiographic characterisation of [S]GTPγS binding stimulation mediated by 5-HT<sub>1B</sub> receptor in postmortem human brain," *Neuropharmacology*, vol. 48, no. 1, pp. 25–33, 2005.
- [53] G. H. Dreteler, W. Wouters, and P. R. Saxena, "Comparison of the cardiovascular effects of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist flesinoxan with that of 8-OH-DPAT in the rat," *European Journal of Pharmacology*, vol. 180, no. 2-3, pp. 339–349, 1990.
- [54] S. P. H. Alexander, A. Mathie, and J. A. Peters, "Guide to Receptors and Channels (GRAC), 3rd edition," *British Journal of Pharmacology*, vol. 153, no. 2, pp. S1–S196, 2008.
- [55] D. Oskutyte, D. Jordant, and A. G. Ramage, "Evidence that 5-hydroxytryptamine<sub>7</sub> receptors play a role in the mediation of afferent transmission within the nucleus tractus solitarius in anaesthetized rats," *British Journal of Pharmacology*, vol. 158, no. 5, pp. 1387–1394, 2009.

### Resultados y discusión. Artículo 3

En el presente artículo, estudiamos los cambios inducidos por 5-HT en la diabetes experimental a largo plazo sobre la respuesta cardíaca *in vivo* por activación de los nervios parasimpáticos. Esto se logró mediante el examen de los receptores serotoninérgicos implicados en las respuestas colinérgicas cardíaca inducida por estimulación eléctrica vagal, o por administración de Ach exógena durante la diabetes experimental (a largo plazo) inducida por aloxano en ratas.

El aloxano es un agente diabetógeno que induce un síndrome en los animales que se asemeja a la diabetes mellitus tipo 1 caracterizado por hiperglucemia, hipercolesterolemia, glucosuria y niveles elevados de hemoglobina glicosilada en los eritrocitos (Agrawal *et al.*, 1987; Öztürk *et al.*, 1996; Chan *et al.*, 2000; Miranda *et al.*, 2002; Alabadí *et al.*, 2001; García *et al.*, 2007). Este agente, en nuestros experimentos, no modifica la frecuencia cardíaca, según lo indicado previamente por Lee *et al.* (1989), Zoha *et al.* (1988) y Howarth *et al.* (2010).

La administración intravenosa en *bolus* de serotonina tuvo un doble efecto sobre la bradicardia inducida, tanto por estimulación vagal como por administración exógena de Ach. 5-hidroxitriptamina (5-HT) incrementó la bradicardia a dosis bajas y la disminuyó a dosis altas; este efecto es reproducido por el agonista selectivo de receptores 5-HT<sub>1/7</sub>, maleato de 5 carboxamidotriptamina (5-CT).

El aumento de la bradicardia a dosis bajas de 5-CT fue reproducido por un agonista 5-HT<sub>1A</sub>, bromohidrato de 8-hidroxi-2-dipropylaminotetralina (8-OH-DPAT) y bloqueado por el antagonista selectivo de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, WAY-100,635.

El pretratamiento con un antagonista no selectivo de receptores 5-HT<sub>1</sub>, metiotepina, bloquea el efecto estimulante e inhibidor de 5-CT; sin embargo, pimozide, antagonista selectivo de receptores 5-HT<sub>7</sub>, sólo bloqueó su acción inhibidora.

En nuestras condiciones experimentales no hubo diferencias significativas en la frecuencia cardíaca (FC) basal entre los tres grupos de estudio (ratas normoglucémicas,

diabéticas a corto y a largo plazo) como previamente ha sido demostrado por otros grupos y por nosotros mismos (Akiyama *et al.*, 1989; Morán *et al.*, 1994; García *et al.*, 2007). Sin embargo, estos resultados contrastan con estudios realizados por otros grupos, donde describen una disminución tanto del ritmo cardiaco (Lo Giudice *et al.*, 2002) como del tono parasimpático durante la diabetes (Martínez-Nieves *et al.*, 2000).

El efecto bradicardizante producido por estimulación eléctrica del nervio vago (a todas las frecuencias de estimulación) fue menor que el observado en las ratas diabéticas a corto plazo y mayor que en ratas normoglucémicas (Morán *et al.*, 1997; García *et al.*, 2007). Ago *et al.* (2007) utilizando ratas diabéticas, mostraron incremento en la FC inducida por estimulación vagal usando frecuencias de estimulación más altas que las utilizadas por nosotros (16, 32 y 64 Hz).

La administración de Ach exógena (5 y 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) en ratas hiperglucémicas a largo plazo produce una bradicardia más pronunciada que en las ratas normoglucémicas (diferencias estadísticamente significativas). Sin embargo, la bradicardia fue menos pronunciada que en las ratas diabéticas a corto plazo. Nuestro equipo de investigación y otros han sugerido que la diabetes inducida químicamente puede provocar defectos funcionales cardíacos en los nervios colinérgicos (Tomlinson *et al.*, 1982, 1983; Roquebert *et al.*, 1991; Morán *et al.*, 1997). A nivel cardiaco, inhibidores de los receptores muscarínicos  $M_2$  limitan la liberación de acetilcolina de los nervios (Yonehara *et al.*, 1979; Fuchs y Fuder, 1985; Wetzel y Brown, 1985). El hecho de que la inhibición de la liberación de acetilcolina por inhibidores neuronales de receptores muscarínico  $M_2$  este aumentada durante la diabetes ha sido descrito ampliamente en diferentes modelos experimentales, incluyendo pulmón de rata (Belmonte *et al.*, 1997), león y tráquea de ratas diabéticas (Coulson *et al.*, 2002), vejiga urinaria (Tong *et al.*, 2002) o incluso, aurícula humana (Oberhauser *et al.*, 2001). En base a estos antecedentes, en el presente estudio, se examinaron los cambios inducidos por la diabetes a largo plazo 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 a largo plazo. Este doble efecto fue

reproducido por el agonista selectivo de receptores 5-HT<sub>1/7</sub>, 5-CT (Hoyer *et al.*, 1994): a dosis bajas (5 y 10 µg/kg), 5-HT y 5-CT incrementan la bradicardia, mientras que las dosis más altas (100 y 200 µg/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, (un agonista selectivo de los receptores 5-HT<sub>2A/2B/2C</sub>) (Baxter *et al.*, 1995) o de 1-fenilbiguanida, (un agonista selectivo del receptor 5-HT<sub>3</sub>) (Ireland y Tyers, 1987; Chen *et al.*, 1991), no tienen efecto sobre la bradicardia inducida vagalmente en ratas diabéticas. Esto sugiere que, en la diabetes experimental a largo plazo (ocho semanas), los efectos serotoninérgicos sobre la bradicardia están mediados por activación de los receptores 5-HT<sub>1/7</sub>, pero no a través de la activación de receptores 5-HT<sub>2</sub> y 5-HT<sub>3</sub>. Previamente, nuestro grupo ha demostrado que, en ratas normoglucémicas desmeduladas, los receptores 5-HT<sub>2</sub> están involucrados en la inhibición de la bradicardia inducida vagalmente, mientras que los receptores 5-HT<sub>3</sub> son los requeridos para la acción estimulante (Morán *et al.*, 1997). Por lo tanto, proponemos que, en la diabetes experimental, al igual que ocurre en situación de normoglucemia (Morán *et al.*, 1997; García *et al.*, 2007), el sistema serotoninérgico interfiere con la transmisión colinérgica cardíaca, produciendo aumento o inhibición de la bradicardia inducida por estimulación vagal; aunque los receptores implicados no son los mismos.

Varios autores han planteado la hipótesis de que, a nivel gastrointestinal, en los animales normoglucémicos, los receptores 5-HT<sub>1</sub> están involucrados en la reducción de la liberación de acetilcolina (Dando *et al.*, 1998; Tonini *et al.*, 1992).

Para determinar el subtipo de receptor 5-HT<sub>1</sub> responsable de la acción observada en este trabajo, hemos utilizado agonistas y antagonistas selectivos de los diferentes subtipos de receptores 5-HT<sub>1</sub> en nuestro modelo experimental de diabetes.

En las ratas diabéticas a largo plazo, hemos observado que los incrementos en la bradicardia inducida vagalmente tras la administración de dosis bajas de 5-HT y 5-CT (agonista selectivo de los receptores 5-HT<sub>1/7</sub>) fueron reproducidos, a todas las frecuencias de estimulación, por el agonista selectivo de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 8-OH-DPAT (Middlemiss y Fozard, 1983).

Sin embargo a diferencia de los efectos observados en ratas diabéticas de cuatro semanas, L-694,247, un agonista selectivo 5-HT<sub>1B/1D</sub> (Beer *et al.*, 1993), no es capaz de reproducir la acción inhibitoria producida por altas dosis de 5-CT sobre la bradicardia inducida vagalmente. Del mismo modo, CGS-12066B, un agonista de los receptores de 5-HT<sub>1B</sub> (Tomkins *et al.*, 2000), no tuvo efecto sobre bradicardia inducida vagalmente, lo que sugiere que el subtipo de receptor 5-HT<sub>1A</sub> es el principal responsable del aumento de la bradicardia inducida por estimulación vagal.

Para comprobar este hecho se utilizaron antagonistas selectivos de los diferentes subtipos de receptores: así, el antagonista selectivo de receptores 5-HT<sub>1A</sub>, WAY-100,635 (Forster *et al.*, 1995) y el antagonista selectivo de receptores 5-HT<sub>7</sub>, pimozone (Roth *et al.*, 1994) no modifican la bradicardia inducida por estimulación vagal en ratas diabéticas a largo plazo. Sin embargo, la bradicardia inducida vagalmente fue ligeramente incrementada por metiotepina (antagonista no selectivo de los receptores 5-HT<sub>1</sub>) (Centurión *et al.*, 2000). Este hecho está de acuerdo con estudios que describen un efecto intrínseco de metiotepina sobre la liberación de Ach en cortes del estriado de rata (Ramírez *et al.*, 1997).

Hemos indicado previamente un doble efecto para 5-CT en ratas diabéticas de cuatro semanas (García *et al.*, 2007). Este efecto se reprodujo en ratas diabéticas de ocho semanas, pero el subtipo de receptores involucrado en el efecto inhibitorio fue diferente. Por otra parte, en el presente estudio hemos demostrado que, en ratas diabéticas a largo plazo (8 semanas):

- Metiotepina (Hoyer *et al.*, 1994), un antagonista no selectivo de receptores serotoninérgicos, bloqueó los efectos estimulantes e inhibidores de 5-CT sobre la bradicardia inducida por estimulación vagal.
- 8-OH-DPAT (agonista selectivo del receptor 5-HT<sub>1A</sub>) incrementó la bradicardia producida por estimulación vagal.
- La acción de 8-OH-DPAT fue bloqueada por WAY-100,635 (antagonista selectivo 5-HT<sub>1A</sub>) (Mostany *et al.*, 1990).

- Pimozide, antagonista selectivo de receptores 5-HT<sub>7</sub>, (Roth *et al.*, 1994), bloqueó el efecto inhibitor de altas dosis de 5-CT.
- Después del pretratamiento con pimozide, 5-CT pudo incrementar la bradicardia producida por estimulación vagal a todas las dosis utilizadas.

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 (Park *et al.*, 2009). 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, además de la ya conocida regulación central de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> en los efectos cardiovasculares (Dreteler *et al.*, 1990; Skinner *et al.*, 2002). Otros autores han sugerido un papel de los receptores 5-HT<sub>7</sub> en la activación del flujo vagal en el corazón (Kellet *et al.*, 2005; Alexander *et al.*, 2008; Ramage y Villalón, 2008).

También hemos mostrado que el efecto dual producido por 5-HT y 5-CT (acciones estimulantes e inhibitorias) sobre la bradicardia inducida por estimulación vagal, persiste cuando la bradicardia es provocada por Ach exógena en ratas diabéticas a largo plazo.

Estos resultados confirman la naturaleza pre- y postsináptica de estas acciones serotoninérgicas en ratas diabéticas a largo plazo, de modo similar a lo que ocurría en ratas desmeduladas y diabéticas de cuatro semanas (García *et al.*, 2007). Sin embargo, estos resultados difieren de los descritos por nuestro grupo en ratas normoglucémicas (Morán *et al.*, 1997).

El presente estudio demostró que la diabetes a largo plazo cambia las respuestas de 5-HT a nivel cardiaco *in vivo* por activación de los nervios parasimpáticos. Los receptores periféricos 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>7</sub> pueden tener un papel fisiológico en la regulación de los reflejos cardiovasculares, controlando cambios en la acción parasimpática (vagal) del corazón. En esta línea, en el núcleo del tracto solitario,

Oskutyte *et al.* (2009) han descrito la presencia de receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>7</sub>, los cuales juegan un papel importante en la activación refleja del flujo parasimpático cardiaco.



III.3

5-HIDROXITRIPTAMINA  
TERRITÓRIO VASCULAR  
RENAL

- ARTÍCULO 4



# ARTÍCULO 4

## **Participation of cyclooxygenase pathway in the vasoconstriction induced by 5-HT in the *in situ* autoperfused kidney of long-term diabetic rats**

B. Restrepo, M. García, A. Rodríguez-Barbero, L. San Román,  
M. L. Martín, A. Morán.

Eur J Pharmacol 2011  
(en revisión)



**Participation of cyclooxygenase pathway in the vasoconstriction induced by 5-HT in the *in situ* autoperfused kidney of long-term diabetic rats**

Beatriz Restrepo <sup>a,b</sup>, Mónica García<sup>a</sup>, Alicia Rodríguez-Barbero<sup>c</sup>, Luis San Román<sup>a</sup>, María Luisa Martín<sup>a</sup>, Asunción Morán <sup>a,\*</sup>.

<sup>a</sup> Laboratorio de Farmacología, Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain.

<sup>b</sup> Grupo de Enfermedades Cardiovasculares y Metabólicas. Facultad Ciencias de la Salud, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia.

<sup>c</sup> Departamento de Fisiología y Farmacología, Instituto “Reina Sofía” de investigación Nefrológica, Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain.

\*Asunción Morán Benito, Laboratorio de Farmacología  
Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Farmacia  
Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno  
ES-37007 Salamanca (Spain)  
E-mail: amoran@usal.es  
Tel.: 34-923-294530, Fax: 34-923-294515

**Abstract**

We attempted to characterize the 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptor type/subtype and mediator mechanisms involved in the contractile effects of 5-HT in the *in situ* autoperfused kidney of long-term diabetic rats.

Diabetes was induced in male Wistar rats by a single subcutaneous injection of alloxan. Intra-arterial (i.a.) bolus injection of 5-HT (0.00000125 to 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) increased renal perfusion pressure in a dose dependent way but did not affect the systemic blood pressure in long-term diabetic rats.

The selective 5-HT<sub>2</sub> receptor agonist,  $\alpha$ -methyl-5-HT, caused a local vasoconstrictor effect in the *in situ* autoperfused rat kidney similar to 5-HT. However, BW723C86, a selective 5-HT<sub>2B</sub> receptor agonist, m-CPP (1-(3-chlorophenyl)piperazine), a selective 5-HT<sub>2B/2C</sub> receptor agonist, the 5-HT<sub>1</sub> receptor agonist, 5-carboxamidotryptamine (5-CT), and the selective 5-HT<sub>3</sub> receptor agonist, 1-phenylbiguanide did not modify the renal perfusion pressure.

In long-term diabetic rats, vasoconstriction elicited by 5-HT and  $\alpha$ -methyl-5-HT was significantly decreased by ritanserin (a 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonist), spiperone (a 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist), and the cyclooxygenase (COX) inhibitors, indomethacin (nonselective COX inhibitor), FR 122047 or nimesulide (selective COX-1 and COX-2 inhibitors, respectively), but was not modified by pretreatment with SB 206553 (3,5-Dihydro-5-methyl N3 pyridinylbenzo [1,2.b:4,5-b']dipyrrole(1H)-carboxamide hydrochloride), a non-selective 5-HT<sub>2C</sub> receptor antagonist, prazosin, propranolol, enalapril or losartan.

The results of protein expression support these results: COX-1 and COX-2 are expressed in renal tissue. Inducible COX (COX-2) is overexpressed in long-term diabetes.

Our data suggest that, in the *in-situ* autoperfused kidney of long-term diabetic rats, 5-HT vasoconstrictor action is mediated, through cyclooxygenase pathway, by local activation of 5-HT<sub>2A</sub> receptors.

**Keywords:** 5-hydroxytryptamine; 5-HT<sub>2A</sub> receptor; autoperfused rat kidney; long-term diabetes; cyclooxygenase pathway.

## 1. Introduction

Diabetes and hypertension are both associated with an increased risk of renal disease. 5-hydroxytryptamine (5-HT) affects renal function (Shoji et al., 1989; Morán et al., 1997, 2008, 2009; Tian et al., 2002); however, the action of this amine in renal vasculature is controversial regarding both the effect (vasoconstriction/vasodilatation) and the magnitude of the response. Studies performed previously by us to evaluate 5-HT-induced haemodynamic changes in several autoperfused rat vascular beds confirmed the variability of these actions depending on the vascular bed analyzed (Fernández et al., 2000; Calama et al., 2002; Morán et al., 1997, 2008, 2009). Even, in the same vascular bed, 5-HT effects depend on several factors, such as the doses used or the existence of pathologies like hypertension or diabetes (Calama et al., 2003, 2004, 2005; García et al., 2005, 2006; Morán et al., 2008, 2009, 2010).

During diabetes, 5-HT vasoconstrictor effect is enhanced in renal, pulmonary or coronary arteries of rabbits and pigs (Miranda et al., 2002; El-Kashef, 1996; Miranda et al., 2000; Bagwell et al., 2000), but variable results were found in aortas of diabetic rats (Orie et al., 1993; Sikorski et al., 1993; James et al., 1994; Hattori et al., 1995).

There is evidence that increases in 5-HT plasma levels may be related to the development of diabetic nephropathy through 5-HT<sub>2A</sub> receptor activation in mesangial cells (Eto et al., 1997; Kasho et al., 1998); moreover, serum concentrations of serotonin are elevated in rabbit renal artery during diabetes (Miranda et al., 2002)

It seems likely that, as previously shown by us in pithed rats (García et al., 2006), 5-HT vasoconstrictor action in renal vascular bed during diabetes is linked to changes in intracellular signaling pathways. Nevertheless, the exact mechanism has not yet been elucidated.

In Krebs-perfused diabetic rat kidneys, the activation of vascular TXA<sub>2</sub> receptors increases 5-HT vasoconstrictor effect to a greater extent than in control kidneys (Hodgson et al., 1990). Others, however, describe abnormalities in the cascade of COX in several pathologies, such as diabetic nephropathy or renal hypertension (James et al., 1995; Hao and Breyer, 2008).

In streptozotocin-induced type 1 diabetic rats, renal synthesis of prostanoids is increased (Craven et al., 1987; Hao and Breyer, 2008). COX-2 expression is also increased in the

thick ascending limbs and macula densa in both type I streptozotocin diabetic and type II diabetic Zucker rats (Komers et al., 2001, 2005; Cheng et al., 2002; Dey et al., 2004). Selective COX-2 inhibition significantly reduces glomerular hyperfiltration in streptozotocin-induced diabetic rats, which is consistent with the fact that COX-2-derived prostanoids increase hyperfiltration in diabetic kidney (Komers et al., 2001, 2005; Hao and Breyer, 2008; Yar et al., 2010).

In light of the above, in this work we aimed to determine if long-term diabetic state induces changes in the 5-HT receptor type/subtype involved in the 5-HT local vasoconstrictor effect in the in-situ autoperfused rat kidney and analyze the possible involvement of direct/indirect mechanisms.



## **2. Materials and methods**

### *2.1. Ethical approval of the study protocol*

Housing conditions and experimental procedures were in accordance with regulations provided by the European Union on the use of animals for scientific purposes (86/609/EEC, Article 5; Appendix II). This was enacted by Spanish legislation on 14 March 1988 (R.D. 223) and 10 October 2005 (R.D.1201).

Male Wistar rats (250-350 g) were used in the present study. Rats were kept and supplied by the Animal House of the Faculty of Pharmacy of the University of Salamanca (PAE-SA001; Salamanca, Spain).

### *2.2. Diabetes induction and animal maintenance*

The rats were divided into two groups: normoglycaemic and diabetic rats. Diabetes was induced by a single injection of alloxan (150 mg/kg, s.c.) in 0.9% NaCl (physiological saline). Rats were then maintained on tap water and regular food *ad libitum* for 8 weeks. Normal rats served as controls, and both groups, control and alloxan-diabetic rats, were all aged-matched. Body weight, systolic blood pressure, heart rate and blood glucose levels were determined before and at 2, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 and 56 days after alloxan administration. Only rats with elevated blood glucose levels (>11 mM) at all time points were considered diabetic. Blood glucose levels were determined by test strips (Accu-Chek®). Systolic blood pressure and heart rate were measured in awake rat periodical using the tail-cuff method with a photoelectric sensor (NIPREM 546, Cibertec S.A, Madrid, Spain) along the study. Several determinations were made in each session for each animal and values were considered valid if five consecutive measurements did not differ by 10 mmHg.

### *2.3. Animal preparation*

Diabetic and normoglycaemic rats were anaesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/ kg, i.p.). After the induction of anaesthesia, a tracheotomy was carried out and catheters placed in the right and left carotid arteries. The right carotid artery was cannulated for measurement of blood pressure using a Spectramed model P23xL

pressure transducer and Grass model 7 Physiograph recorders. The penis vein was cannulated for drug administration. Rats were kept warm with a heating lamp.

Rats were prepared for *in-situ* perfusion of the left kidney according to the method of Fink and Brody (1978). Vascular beds were perfused using an extracorporeal circuit and a constant-flow Gilson peristaltic pump. The left carotid artery was cannulated with the inflow end of the extracorporeal flow line. The abdominal aorta was exposed by a midline laparotomy and deflection of the intestines to the right side of the rat. A loose tie was placed around the aorta between the left renal artery and the origin of the right renal and superior mesenteric arteries. Additional ties were placed around the aorta 1 cm below the left renal artery and 1 cm above the iliac bifurcation. Heparin sodium (5 mg/kg, i.v.) was given. An intravenous infusion of normal (0.9%) saline was initiated at a rate of 2 ml/h and continued throughout the experiment.

When the aortic tie above the left renal artery was tightened, blood immediately began to flow from the carotid artery to the left renal artery; the circuit was established without interruption of blood flow to the kidney. Blood was pumped from the right carotid artery to an aortic pouch from which the left renal artery was the only outlet (Fink and Brody, 1978; Dupont et al., 1986; Roquebert et al., 1992; Morán et al., 2008, 2009)

The distal portion of the external circuit was connected to a Spectramed model P23xL pressure transducer for measurement of perfusion pressure, which was recorded on a Grass model 7 Physiograph recorder.

At the beginning of each experiment, flow was adjusted to render the perfusion pressure equal to the systemic pressure. Flow was kept constant throughout the experiment and changes in perfusion pressure reflected changes in vascular resistance. The flow rate through the renal vascular bed ranged from 2 ml/min to 2.9 ml/min (Roquebert et al., 1992; Morán et al., 1997, 2008, 2009). In all experiments, atropine (1 mg/kg, i.v.) was administered before saline infusion was started to block the cholinergic effect.

#### *2.4. Experimental protocols*

Experiments were carried out after a 15 min period to allow blood pressure and perfusion pressure to stabilize. Five rats were used to evaluate each dose of agonist or antagonist, and each animal preparation to evaluate only one agonist or antagonist.

The first group of experiments was carried out to confirm results from our laboratory (Morán et al., 2008) in normoglycaemic control rats. In this group (n=25), 5-HT (n=5), the selective 5-HT<sub>1</sub> receptor agonist, 5-carboxamidotryptamine maleate (5-CT) (n=5), the selective 5-HT<sub>2</sub> receptor agonist,  $\alpha$ -methyl-5-HT (n=5), and the selective 5-HT<sub>3</sub> receptor agonist, 1-phenylbiguanide (n=5), were administered locally at doses of 0.00000125, 0.000125, 0.00125, 0.0125, 0.025, 0.05 and 0.1  $\mu$ g/kg via the distal cannula intra-arterially (i.a.) by bolus injection of a maximum volume of 10  $\mu$ l using a microsyringe (Exmire microsyringe), with a gap of 5 min between administration of each drug dose. Saline solution (10  $\mu$ l) was administered (i.a.) in the control group (n=5) in the same way.

In the first alloxan-treated diabetic group (n=35), each rat received: 5-HT (n=5), 5-CT (n=5),  $\alpha$ -methyl-5-HT (n=5), the selective 5-HT<sub>2B</sub> receptor agonist,  $\alpha$ -methyl-5-(2-thienylmethoxy)-1H-indole-3-ethanamine hydrochloride (BW723C86) (n=5), the non-selective 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonist, 1-(3-chlorophenyl) piperazine dihydrochloride (m-CPP) (n=5), and 1-phenylbiguanide (n=5) were administered locally at doses of 0.00000125, 0.000125, 0.00125, 0.0125, 0.025, 0.05 and 0.1  $\mu$ g/kg by bolus injection (i.a.) of a maximum volume of 10  $\mu$ l, with a gap of 5 min between administration of each drug dose. Saline solution (10  $\mu$ l) was administered (i.a.) in the diabetic groups (n=5) in an identical fashion.

The second alloxan-treated diabetic group (n=30) was run in parallel with the group described above to investigate the 5-HT<sub>2</sub> receptor subtype involved in 5-HT renal vascular effects. Several 5-HT<sub>2</sub> antagonists were administered (i.v.) 10 min before the corresponding dose–response curve of the agonist was obtained. The dose of each antagonist was selected after our previous experience (Fernández et al., 2000; Calama et al., 2002; Morán et al., 2008, 2009). 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonist, ritanserin (1 mg/kg), the 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist, spiperone (0.125 mg/kg), and the 5-HT<sub>2B/2C</sub> antagonist, 3,5-dihydro-5-methyl-N-3-pyridinylbenzo[1,2-b:4,5-b']dipyrrole(1H)-carboxamide hydrochloride SB206553 (0.5 mg/kg), were administered before administration of  $\alpha$ -methyl-5-HT (n=15, five rats for each antagonist) or 5-HT (n=15, five rats for each antagonist).

The third alloxan-treated diabetic group (n=70) was performed to analyze the mechanisms involved in the serotonergic effect by using various antagonists. The dose

of each antagonist was selected after consideration of recommendations of authors and our previous experience (Morán et al., 1997, 2008; Fernández et al., 2000; Ochi and Goto, 2001, 2002). The antagonists were administered intravenously as follows: non-selective cyclooxygenase (COX) inhibitor, 1-(4-Chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indole, indomethacin (2 mg/kg), the selective COX-1 inhibitor, 1-[4, 5-bis (4-methoxyphenyl)-2-thiazolyl]-4-methylpiperazine hydrochloride, FR 122047 (1.5 mg/kg), the selective COX-2 inhibitor, N-(4-Nitro-2-phenoxyphenyl)methanesulfonamide nimesulide (1.5 mg/kg), the  $\alpha_1$  antagonist, prazosin (2 mg/kg), a non-selective  $\beta$ -blocker propranolol (5 mg/kg), the angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril (1 mg/kg) and the AT<sub>1</sub> antagonist, losartan (1 mg/kg), were administered 10 min before administration of  $\alpha$ -methyl-5-HT (n=35, five rats for each antagonist) or 5-HT (n=35 five rats for each antagonist).

### 2.5. Western blot analyses

Renal tissue (from both normoglycaemic and long-term diabetic rats) was lysed on ice-cold lysis buffer and solubilized protein concentrations were determined as previously described (Rodríguez-Barbero et al., 2001). Protein samples were separated by SDS-PAGE and membranes blocked before incubation with the primary antibodies: COX-1 (11) and COX-2 (C-20) (Santa Cruz Biotechnology). Anti-alpha-tubulin (I-19) (Santa Cruz Biotechnology) antibody was used to confirm loading of comparable amount of protein in each lane. After incubation with HRP-conjugated secondary antibodies, bands were visualized by a luminol-based detection system with p-iodophenol enhancement. Protein expression was analyzed by densitometry using Scion Image software (Scion).

### 2.6. Drugs used

The following drugs were used: Alloxan, monohydrate and pentobarbital sodium (Sigma-Aldrich), heparin sodium (Roche), atropine sulphate (Scharlau), 5-hydroxytryptamine-creatinine sulphate (5-HT; Sigma-Aldrich), 5-carboxamidotryptamine maleate (5-CT; Sigma-Research Biochemicals International),  $\alpha$ -methyl-5-hydroxytryptamine maleate (Sigma-Research Biochemicals International),  $\alpha$ -methyl-5-(2-thienylmethoxy)-1H-indole-3-ethanamine hydrochloride (BW723C86; Sigma-Research Biochemicals International), 1-(3-chlorophenyl)piperazine

dihydrochloride (m-CPP; Sigma-Research Biochemicals International), 1-phenylbiguanide (1-PBG; Sigma-Research Biochemicals International), ritanserin (Janssen Pharmaceutical), spiperone hydrochloride (Sigma-Aldrich) and 3,5-Dihydro-5-methyl-N-3pyridinylbenzo[1,2.b:4,5-b']dipyrrole (1H)-carboxamide hydrochloride, SB206553, (Sigma-Research Biochemicals International), 1-(4-Chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1-H-indole (indomethacin; Tocris Cookson Ltd), N-(4-Nitro-2-phenoxyphenyl) methanesulfonamide (nimesulide; Sigma-Aldrich), 1-[4,5-bis (4-methoxyphenyl)-2-thiazolyl]-4-methylpiperazine hydrochloride (FR122047 hydrochloride; Biogen Scientific, Madrid, Spain), D-L-propranolol hydrochloride (ICI Pharmaceuticals), enalapril maleate (Merck, Sharp and Dohme), prazosin (Pfizer), losartan (Merck). All drugs used were dissolved in distilled water at the time of the experiments, with the exception of ritanserin, m-CPP and nimesulide, which were dissolved in 0.04 mol/l lactic acid, 0.01 M HCl, and ethanol 50% respectively.

### 2.7. Statistics

Data are means  $\pm$  S.E.M. of five experiments. Changes in renal vascular resistance are reported as increases, in mmHg, and in perfusion pressure in comparison with control values. Statistical significance was calculated with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman-Keuls multiple comparison test.  $P < 0.05$  was considered significant.

### 3. Results

#### 3.1. Systemic haemodynamic variables

Alloxan-induced diabetes elicited a marked increase in serum glucose and systolic blood pressure and failure of the rats to increase their body weight in comparison with control rats. Table 1 show the mean values of body weight, systolic blood pressure, heart rate and glycaemia before and 8 weeks after the induction of diabetes for rats in diabetic group and in the control group. These values did not change significantly during the experiments and remained stable after intravenous (1 ml/kg) or intra-arterial (10  $\mu$ l) administration of the vehicle saline solution, HCl 0.01 mol/l, lactic acid 0.04 mol/l or ethanol 50%.

#### 3.2 Renal vascular effects of the 5-hydroxytryptamine receptor agonists 5-HT, 5-CT, $\alpha$ -methyl-5-HT, and 1-phenylbiguanide in normoglycaemic anesthetized rats

Mean resting blood pressure, perfusion pressure, and heart rate in normoglycaemic anesthetized rats were  $90.5 \pm 5.4$  mm Hg and  $91.4 \pm 3.2$  mm Hg and  $390.3 \pm 12.1$  beats/minute (bpm), (n=25) respectively. These values did not change significantly during the experiments, and remained stable after intravenous (1 ml/kg) or i.a. (10  $\mu$ l) administration of the vehicle saline solution or HCl 0.01 mol/l.

Local i.a. injection of graded doses of 5-HT and of the selective 5-HT<sub>2</sub> agonist,  $\alpha$ -methyl-5-HT, (0.00000125, 0.000125, 0.00125, 0.0125, 0.025, 0.05 and 0.1  $\mu$ g/kg, n=5 for each compound) had no effect on systemic blood pressure, but increased the perfusion pressure in the *in-situ* autoperfused rat kidney in a dose-dependent way (Fig. 1A, 1B).

Neither systemic blood pressure nor perfusion pressure was modified by local administration of similar doses of the selective 5-HT<sub>1</sub> receptor agonist 5-CT (n=5) or the selective 5-HT<sub>3</sub> receptor agonist 1-phenylbiguanide (n=5) (data not shown).

#### 3.3. Renal vascular effects of the 5-HT receptor agonists 5-HT, 5-CT, $\alpha$ -methyl-5-HT, m-CPP, BW723C86 and 1-phenylbiguanide in long-term diabetic rats

Mean resting blood pressure, perfusion pressure, and heart rate in long-term diabetic rats were  $147.6 \pm 1.7$  mm Hg,  $146.2 \pm 1.8$  mm Hg and  $345 \pm 10.0$  bpm (n=135), respectively. These values did not change significantly during the experiments and

remained stable after i.v. (1 ml/kg) or i.a. (10  $\mu$ l) administration of the vehicle saline solution, HCl 0.01 mol/l, lactic acid 0.04 mol/l, or ethanol 50%.

Local i.a. injection of graded doses of 5-HT (0.00000125, 0.000125, 0.00125, 0.0125, 0.025, 0.05 and 0.1  $\mu$ g/kg) (n=5) had no effect on systemic blood pressure but increased perfusion pressure in the *in-situ* autoperfused rat kidney in a dose-dependent fashion (6.3  $\pm$  0.5, 9.4  $\pm$  0.6, 14.5  $\pm$  0.6, 18.4  $\pm$  0.6, 23.6  $\pm$  1.4, 29.6  $\pm$  1.9, and 35.6  $\pm$  2.1 mm Hg, respectively) (Fig. 1A, 2). At doses of 0.00000125, 0.000125, 0.00125, 0.0125, 0.025, 0.05 and 0.1  $\mu$ g/kg (n=5), the selective 5-HT<sub>2</sub> agonist,  $\alpha$ -methyl-5-HT, increased perfusion pressure by 6.3  $\pm$  0.6, 9.2  $\pm$  1.3, 14.7  $\pm$  2.7, 19.8  $\pm$  2.3, 24.7  $\pm$  2.3, 38.1  $\pm$  2.5, and 44.1  $\pm$  2.0 mm Hg, respectively (Fig. 1B, 2), without modifying systemic blood pressure.

Neither systemic blood pressure nor perfusion pressure was modified by local administration of similar doses of either the selective 5-HT<sub>1</sub> receptor agonist, 5-CT (n=5), or the selective 5-HT<sub>3</sub> receptor agonist 1-phenylbiguanide (n=5) (Fig. 2), or the selective 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonist m-CPP (n=5) or the selective 5-HT<sub>2B</sub> receptor agonist BW723C86 (n=5) (Fig. 2).

#### *3.4. Effect of selective 5-HT receptor antagonists (ritanserin, spiperone and SB206553) on the 5-HT- or $\alpha$ -methyl-5-HT renal vasoconstrictor-induced effect in long-term diabetic rats*

Intravenous administration of the different antagonists tested (ritanserin (1mg/kg); spiperone (0.125 mg/kg) or SB206553 (0.5 mg/kg)) did not induce changes in mean blood pressure or perfusion pressure (data not shown).

However, pretreatment with 1 mg/kg of the 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonist, abolished the vasoconstrictor responses induced both by 5-HT (n=5) (Fig. 3) and  $\alpha$ -methyl-5-HT (n=5) (Fig. 4) in renal vasculature.

This blockage was reproduced by the selective 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist, spiperone (0.125 mg/kg, n=5 for each agonist), which significantly blocked the renal vasoconstrictor responses induced by i.a. administration of 5-HT (Fig. 3) or  $\alpha$ -methyl-5-HT (Fig. 4).

The effects of 5-HT and  $\alpha$ -methyl-5-HT were also tested after treatment with SB206553, a 5-HT<sub>2B/2C</sub> antagonist (0.5 mg/kg, n=5 for each agonist). The local renal

vasoconstriction induced by 5-HT and  $\alpha$ -methyl-5-HT was not modified 10 min after i.v. pretreatment with the 5-HT<sub>2B/2C</sub> receptor antagonist SB206553 (Fig. 3, 4).

*3.5. Effect of other antagonists (indomethacin, FR122047, nimesulide, prazosin, propranolol, enalapril or losartan) on the 5-HT or  $\alpha$ -methyl-5-HT renal vasoconstrictor-induced effect in long-term diabetic rats*

Pretreatment with either 2 mg/kg of the non-selective cyclooxygenase (COX) inhibitor (COX-1 and COX-2) indomethacin, or the selective COX-1 inhibitor, FR 122047 hydrochloride (1.5 mg/kg), or the selective COX-2 inhibitor, nimesulide (1.5 mg/kg) abolished the renal vasoconstrictor responses to either 5-HT (n=5 for each antagonist) (Fig. 4) or  $\alpha$ -methyl-5-HT (n=5 for each antagonist) (Fig. 5).

The effects of 5-HT and  $\alpha$ -methyl-5-HT were also tested after treatment with either the  $\alpha_1$  antagonist, prazosin (2 mg/kg), or the non-selective  $\beta$ -blocker propranolol (5 mg/kg), or the angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril (1 mg/kg) or antagonist AT<sub>1</sub> losartan (1 mg/kg) (data not shown).

No changes in mean blood pressure or perfusion pressure were observed after administration of any of these antagonists (data not shown).

*3.6. Study of the expression of COX in the kidney tissue in control and long-term diabetic rats.*

We examined the expression of COX-1 and COX-2 in kidneys of control and diabetic rats by Western blot analysis. No difference in COX-1 protein expression was observed between the Control, 4 weeks and 8 weeks diabetic kidneys (Fig. 6). However, expression of COX-2 protein was higher in kidneys from 8 weeks diabetic rats compared with control and 4 weeks diabetic rats.



#### 4. Discussion

This study aimed to characterize the 5-HT receptor type/subtype and the mechanisms involved in serotonergic vascular responses in the *in situ* autoperfused kidney of long-term diabetic rats.

Alloxan, used as diabetogenic agent, induces a syndrome resembling type-1 Diabetes Mellitus (Agrawal et al., 1987) and is commonly used as an experimental model of diabetes (Miranda et al., 2002; García et al., 2006; Morán et al., 2010).

The technique used in our experiments, following the method of Fink and Brody (1978), allowed continuous measurement of renal blood flow in rat, permitting therefore the evaluation of rapid changes in renal blood flow induced by direct i.a. administration of drugs. Direct local renal action of 5-HT and possible indirect actions induced by the release of humoral vasoactive agents can be evaluated (Morán et al., 2009).

Cardiovascular reactivity to 5-HT during experimental diabetes showed marked variations in different vascular beds (Miranda et al., 2000; García et al., 2005, 2006; Morán et al., 2010). Constrictor responses to 5-HT in kidneys of diabetic rats were significantly increased (Hogson et al., 1990), whereas responses to 5-HT were reduced in rat hindquarters (Sikorski et al., 1991) and isolated aorta from diabetic rats (James et al., 1994; James and Hodgson, 1995). We and other authors have described that these variations also occur in experimental models of hypertension, where reactivity to 5-HT is increased in isolated kidneys and in the *in situ* autoperfused rat kidney (Tuncer and Vanhoutte, 1991; Boston et al., 1997; Morán et al., 2009); however, hypertension does not induce any changes in pithed rats (Haeusler and Finch, 1972; Cavaliere et al., 1980). In this study, local i.a. administration of 5-HT in intact diabetic rats significantly augmented the renal perfusion pressure in a dose-dependent manner, which was significantly increased compared to normoglycaemic rats. Our data are consistent, on one hand, with findings in rabbit renal artery (Miranda et al., 2002), in the *in situ* autoperfused rat kidney (Shoji et al., 1989; Endlich et al., 1993), in short and long-term diabetic pithed rats (García et al., 2006; Morán et al., 2010) and, on the other hand, with Van Buren et al. (1998) data, who reported an increase in the sensitivity of the basilar artery to 5-HT in short-term diabetic rats.

In long-term diabetic rats, 5-HT vasoconstrictor action in the *in situ* autoperfused rat kidney is due to 5-HT<sub>2</sub> receptor activation, since this effect was reproduced by similar

doses of 5-HT<sub>2</sub> receptor agonist,  $\alpha$ -methyl-5-HT (Baxter et al., 1995) and completely prevented by pretreatment with the selective 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonist, ritanserin (Awouters et al., 1988). Neither the selective 5-HT<sub>1</sub> receptor agonist, 5-CT (Nowak et al., 1993; Wool et al., 2000) nor the selective 5-HT<sub>3</sub> receptor agonist, 1-phenylbiguanide, (Cheng et al., 2002), reproduced the serotonergic vasoconstrictor action. Similar results have also been described by us in normoglycaemic and hypertensive rats (Morán et al., 1997, 2008, 2009); and are in agreement with data from other authors using conscious, normoglycaemic, hypertensive and diabetic rats (Zink et al., 1990; Ramage and Villalón, 2008; Kobayashi et al., 2008).

In this experimental model, 5-HT administration did not induce any vasodilator effect at any of the used doses, as already occurred in normoglycaemic and hypertensive rats (Morán et al., 2008, 2009). However, our group has described both vasodilator and vasoconstrictor actions for 5-HT in autoperfused hindquarters of anesthetized rat depending on the doses used (Calama et al., 2002). Also, other authors have described a dual effect for serotonin (vasodilator and vasoconstrictor actions) at renal vascular level (Shoji et al., 1989; Endlich et al., 1993).

Accordingly, we focused on the determination of the 5-HT receptors subtypes involved in the serotonergic vasoconstrictor effect in long-term diabetic rats. Both 5-HT and  $\alpha$ -methyl-5-HT vasoconstriction was more marked in diabetic rats than in normoglycaemic rats. In contrast with our previous observations in normoglycaemic rats (Morán et al., 2008), i.a. administration of the selective 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonist, m-CPP, did not reproduce the vasoconstrictor effect observed with 5-HT or  $\alpha$ -methyl-5-HT. Neither did the administration of the selective 5-HT<sub>2B</sub> receptor agonist, BW723C86. Therefore, 5-HT<sub>2B/2C</sub> receptor subtypes are devoid of any serotonergic vasoconstrictor action in the in situ autoperfused kidney of long-term diabetic rats.

This fact was confirmed using selective antagonists: the selective 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonist, ritanserin (Awouters et al., 1988) and the selective 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist, spiperone, (Hoyer et al., 1994) prevented the vasoconstrictor effect induced by either 5-HT or  $\alpha$ -methyl-5-HT. The selective 5-HT<sub>2B/2C</sub> receptor antagonist, SB206553 (Kennett et al., 1996) did not inhibit either  $\alpha$ -methyl-5-HT or 5-HT vasoconstrictor action.

Therefore, we surmise that 5-HT<sub>2A</sub> receptor subtype is mainly involved in the 5-HT induced renal vasoconstriction in long-term diabetic animals; whereas in the normoglycaemic rat model the main receptor subtype involved was 5-HT<sub>2C</sub> (Morán et al., 1997, 2008). Vanhoutte et al. showed that responses to serotonin are modulated by the endothelium (Vanhoutte and Houston, 1985; Houston and Vanhoutte, 1986). So, this change in receptor subtype could be due to endothelial changes, which are widely known to occur during diabetes, or to the augmented renal reactivity to 5-HT already described in diabetic SHR animals (Boston et al., 1997). Moreover, the long-term diabetic state in rats led to a hypertension similar to that induced by L-NAME where we have already determined similar results due to expression and activation of 5-HT<sub>2A</sub> receptors in renal artery (Morán et al., 2009). In this line, Kobayashi et al. (2008) indicate that sarproglate, a 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist, improves glomerular endothelial function in rats with streptozotocin-induced diabetic nephropathy.

Our results are in agreement with those obtained by Zink et al. (1990) using conscious rats, by Tuncer and Vanhoutte (1991) in isolated perfused kidney, and with more recent studies carried out in isolated renal artery, where 5-HT<sub>2A</sub> receptor subtype was reported to be the main responsible for the 5-HT-pressor responses (Watts and Thompson, 2004). However, our results differ from data reported by Shoji et al. (1989), Endlich et al. (1993) and Tian et al. (2002), where 5-HT was found to have a dual effect (vasoconstrictor and vasodilator actions) at renal vascular level. Since alterations in endothelium and prostaglandins, or in their interaction with 5-HT have been longly reported in different vascular beds of normoglycaemic, hypertensive or diabetic models of mice, rats or dogs (Blackshear et al., 1991; Endlich et al 1993; Tuncer and Vanhoute, 1991; Guo et al., 2005; Morán et al., 2009), we analyzed if any indirect mechanisms were involved in this serotonergic vasoconstrictor effect. To do so, we tested the effect of different antagonists (the  $\alpha_1$  antagonist, prazosin, the non-selective  $\beta$ -blocker, propranolol, the angiotensin converting enzyme inhibitor, enalapril, the AT1 antagonist, losartan or the inhibitors of the cyclooxygenase pathway (COX-1 and COX-2): indomethacin, FR 122047 and nimesulide, at doses commonly used to inhibit renal prostaglandin production) on the renal vasoconstrictor effect of 5-HT and  $\alpha$ -methyl-5-HT. The vasoconstriction was completely blocked by inhibitors of cyclooxygenase

pathway at all the doses tested, and was not modified by pretreatment with prazosin, propranolol, enalapril or losartan.

Therefore, we propose that, in the in-situ autoperfused kidney of long-term diabetic rats, 5-HT vasoconstrictor action is mediated by activation of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor that leads to the cyclooxygenase pathway activation.

To confirm our results, we carried out cyclooxygenase protein expression studies in kidney tissue. Two isoforms of COX are identified, COX-1 and COX-2. The first one is constitutively expressed in most tissues. In the normal adult kidney, COX-1 has been localized in arteries and arterioles, glomeruli and collecting ducts (Smith and Bell, 1978). In contrast, COX-2 operates as an inducible enzyme and its expression can be markedly increased by inflammation, diabetes or physical stimuli (Komers et al., 2001, 2005; Guo et al., 2005; Hao and Breyer, 2008). In mesangial cells, multiple stimuli can induce COX-2 expression, among them mediators that bind to G-protein-coupled seven-transmembrane receptors such as 5-hydroxytryptamine (Stroebel and Goppelt-Struebe, 1994; Goppelt-Struebe and Stroebel, 1998; Goppelt-Struebe et al., 1999). Our studies revealed both COX-1 and COX-2 expression in the kidney tissue, as already reviewed by Harris and Breyer (2001). COX-2, inducible isoform, is overexpressed after eight week of diabetes induction in rats. Similar results have already been reported by Nacci et al. (2009) in aorta of eight-week streptozotocin diabetic mice and in other diabetic models, such as type I and type II Zucker diabetic rats (Komers et al., 2001, 2005; Cheng et al., 2002, Dey et al., 2004). Moreover, renal prostanoid synthesis has been shown to be increased in streptozotocin diabetic rats (Craven et al., 1987; Miranda et al., 2002). Also, in human diabetic kidneys, an increased expression of COX-2 has been demonstrated (Khan et al., 2001; Hao and Breyer, 2008).

Despite Tuncer and Vanhoutte (1991) findings, who reported that responses to 5-HT in kidneys of SHR rats are not affected by the cyclooxygenase inhibitor indomethacin, our results, in a diabetic model, suggest a role for COX-2 derived prostaglandins in the pathogenesis of renal hemodynamic changes to 5-HT during diabetes.

## **5. Conclusion**

In conclusion, our data suggest that, long-term diabetes induces changes in the 5-HT receptor subtype and in the indirect mechanisms involved in the serotonergic effect in

the in situ autoperfused rat kidney. In long-term diabetic rats, 5-HT renal vasoconstrictor action is mediated by local 5-HT<sub>2A</sub> receptor activation and by an increase in prostanoid formation.

**Acknowledgements**

This study was supported by grants from the University of Salamanca (USAL) and Junta de Castilla y León (JCYL) Research Programme (reference number SAN673/SA05/08).

**Conflicts of interest**

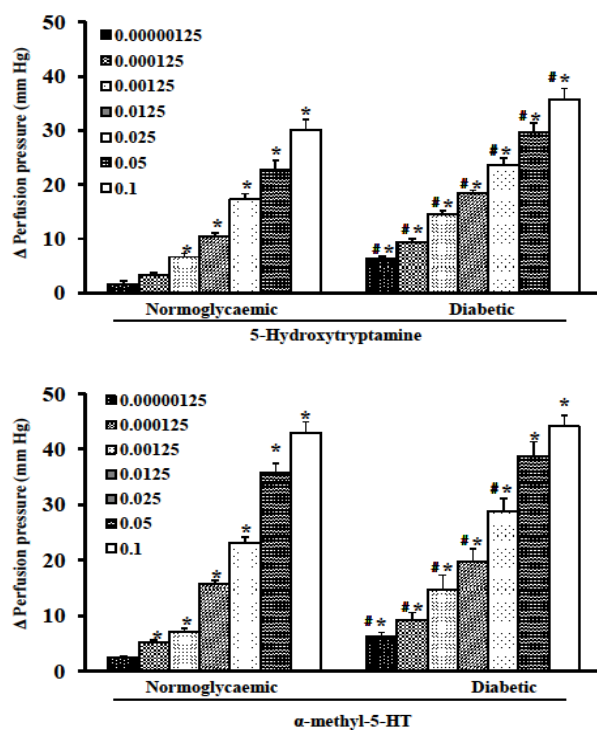
The authors state that they have no conflict of interest.

**Table 1.** Values of body weight, systolic blood pressure, heart rate and glycaemia in control and diabetic rats.

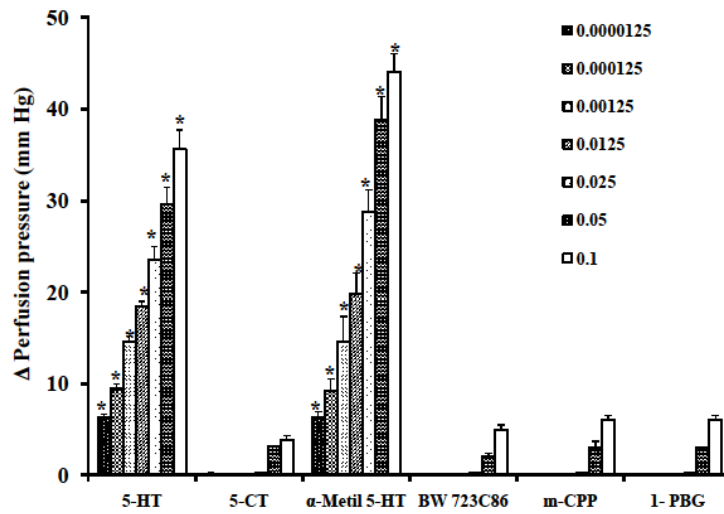
	Body weight (g)	Systolic blood pressure (mmHg)	Heart rate (bpm)	Glycaemia (mM)	n
<i>Control rats</i>					
Initial time	219 ± 9.0	88.5 ± 5.0	375 ± 10.0	5.6 ± 0.2	25
8 weeks after	424 ± 16.0	90.5 ± 4.0	390 ± 12.1	4.8 ± 0.1	25
<i>Diabetic rats</i>					
Initial time	192 ± 10.0	124 ± 5.0	310 ± 6.0	5.6 ± 0.1	135
8 weeks after	309 ± 11.8 <sup>a</sup>	147 ± 1.7 <sup>a</sup>	340 ± 10.0	20.1 ± 0.7 <sup>a</sup>	135

Results are means ± S.E.M. for "n" rats

<sup>a</sup>Significantly different from the corresponding value in control rats, P < 0.05.

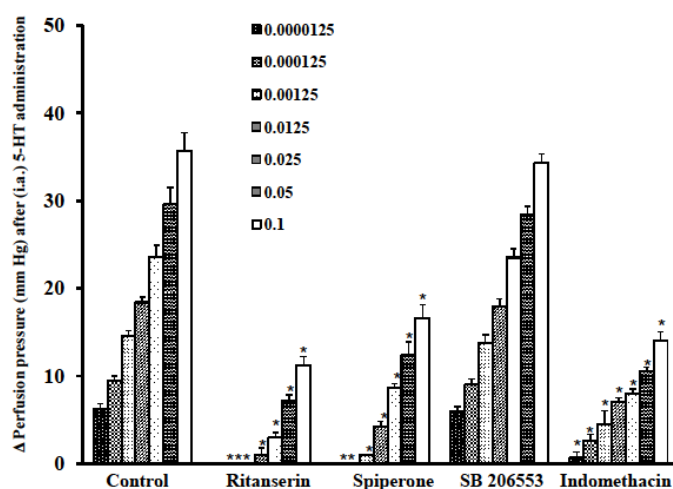


**Fig. 1.** Effect of intra-arterial renal administration in normoglycaemic and alloxan-induced diabetic rats of different doses of: (A) 5-HT (0.00000125-0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) (B)  $\alpha$ -methyl-5-HT (0.00000125-0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) on perfusion pressure in the *in-situ* autoperfused rat kidney in. Data are means  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$  with respect to basal perfusion pressure. #  $P < 0.05$  vs normoglycaemic group.

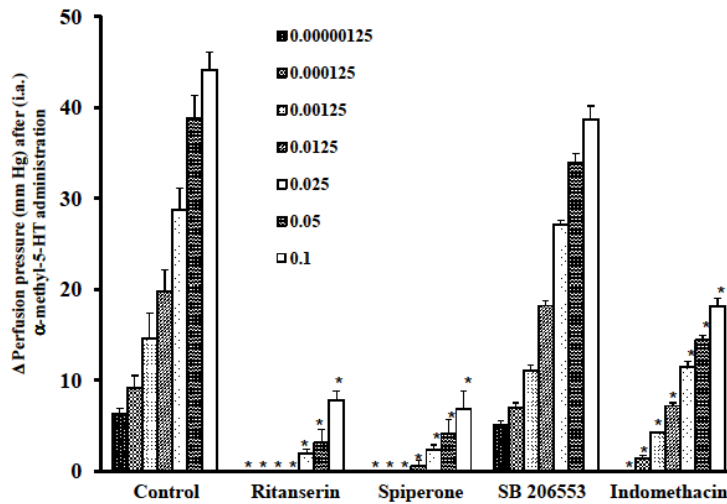


**Fig. 2.** Effect of intra-arterial renal administration of different doses of 5-HT receptor agonists (0.00000125–0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) on perfusion pressure in the *in-situ* autoperfused rat kidney. 5-HT (5-hydroxytryptamine), 5-CT (5-Carboxamidotryptamine),  $\alpha$ -methyl-5-HT, BW723C86 ( $\alpha$ -methyl-5-(2-thienylmethoxy)-1H-indole-3-ethanamine hydrochloride), m-CPP (1-(3-chlorophenyl)piperazine dihydrochloride) and 1-phenylbiguanide (1-PBG). Data are means  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$  with respect to basal perfusion pressure.

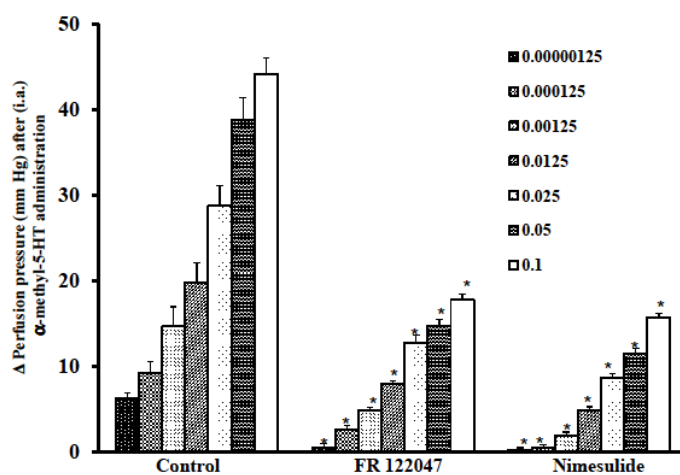




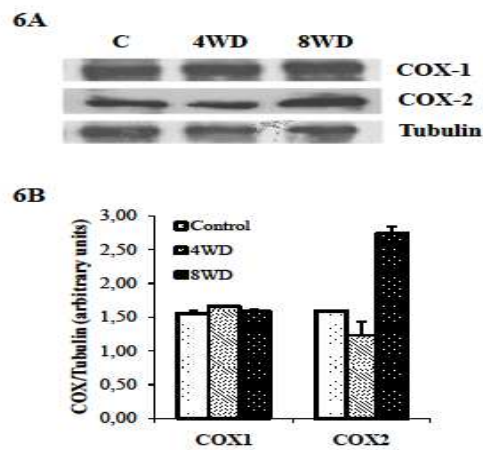
**Fig. 3.** Effect of pretreatment with ritanserin (1 mg/kg), spiperone (0.125 mg/kg), SB206553 (0.5 mg/kg) or indomethacin (2 mg/kg) on the renal vasoconstrictor effect induced by intra-arterial administration of 5-HT (0.00000125-0.1  $\mu$ g/kg) in the *in-situ* autoperfused rat kidney. Data are means  $\pm$  S.E.M. \* $P$ <0.05 vs the saline group (control), which received identical 5-HT doses without antagonist pretreatment.



**Fig. 4.** Effect of pretreatment with ritanserin (1 mg/kg), spiperone (0.125 mg/kg), SB206553 (0.5 mg/kg) or indomethacin (2 mg/kg) on the renal vasoconstrictor effect induced by intra-arterial administration of  $\alpha$ -methyl-5-HT (0.00000125-0.1  $\mu$ g/kg) in the *in-situ* autoperfused rat kidney. Data are means  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$  vs the saline group (control), which received identical  $\alpha$ -methyl-5-HT doses without antagonist pretreatment.



**Fig. 5.** Effect of pretreatment with FR122047 (1.5 mg/kg) or nimesulide (1.5 mg/kg), on the renal vasoconstrictor effect induced by intra-arterial administration of  $\alpha$ -methyl-5-HT (0.00000125–0.1  $\mu$ g/kg) in the *in-situ* autoperfused rat kidney. Data are means  $\pm$  S.E.M. \*P<0.05 vs the saline group (control), which received the same  $\alpha$ -methyl-5-HT doses without antagonist pretreatment.



**Fig. 6.** COX expression in kidney diabetics rats: (A) Total protein extracts from control (C) and four (4WD) or 8 (8WD) weeks diabetic rats were analyzed by Western blot to detect COX-1 and COX-2 protein expression. Loading control included anti-tubulin antibody. A representative blot from three independent experiments is shown. Blots were analyzed by densitometric analysis. (B) The ratio of COX *versus* Tubulin is depicted in the graph.

## References

- Agrawal, D.K., Bhimji, S., Mcneill, J.H., 1987. Effect of chronic experimental diabetes on vascular smooth muscle function in rabbit carotid artery. *J Cardiovasc Pharmacol* 9, 584-593.
- Awouters, F., Niemengeers, C.J.E., Megens, A.A.H.P., Meert, T.J., Janssen, P.A.J., 1988. The pharmacological profile of ritanserin, very specific central serotonin S<sub>2</sub> antagonist. *Drug Dev Res* 1, 67-73.
- Bagwell, C.A., Brophy, C., 2000. Enhanced arterial contractile responses in diabetic hypercholesterolemic pig carotid arteries. *Int J Surg Investig* 6, 477-481.
- Baxter, G., Kennett, G., Blaney, F., Blackburn, T., 1995. 5-HT receptor subtypes: a family re-united? *Trends Pharmacol. Sci.* 16, 105-110. Baylis, C., Mitruka, Brij, Deng, A., 1992. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest* 90, 278-281.
- Blackshear, J.L., Orlandi, C., Hollenberg, N.K., 1991. Constrictive effect of serotonin on visible renal arteries: a pharmacangiographic study in anesthetized dogs. *J Cardiovasc Pharmacol.* 17, 68-73.
- Boston, P.C. and Hodgson, W.C., 1997. Changes in reactivity towards 5-hydroxytryptamine in the renal vasculature of the diabetic spontaneously hypertensive rat. *Journal of Hypertension.* 15,769-774
- Calama, E., Fernández, M.M., Morán, A., Martín, M.L., San Román, L., 2002. Vasodilatador and vasoconstrictor responses induced by 5-hydroxytryptamine in the in situ blood autoperfused hindquarters of the anaesthetized rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 366, 110-116.
- Calama, E., García, M., Jarque, M.J., Morán, A., Martín, M.L., San Román, L., 2003. 5-Hydroxytryptamine-induced vasodilator responses in the hindquarters of the anaesthetized rat, involve beta-2-adrenoceptors. *J Pharm Pharmacol* 55, 1371-1378.
- Calama, E., Morán, A., Ortiz de Urbina, A.V., Martín, M.L., San Román, L., 2004. Vasoconstrictor responses to 5-hydroxytryptamine in the autoperfused hindquarters of spontaneously hypertensive rats. *Pharmacology* 71, 66-72.
- Calama, E., Morán, A., Ortiz De Urbina, A.V., Martin, M.L., San Roman, L., 2005. m-CPP, a 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonist that modifies the perfusion pressure of the hindquarter vascular bed of anesthetized rat. *Pharmacology* 73, 70-75.
- Cavaliere, T.A., Taylor, D.G., Kerwin, L.J., Antonaccio, M.J., 1980. Cardiovascular effects of alloxan diabetes in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Pharmacology* 20, 211-223.
- Cheng, H.F., Wang, C.J., Moeckel, G.W., Zhang, M.Z., McKanna, J.A., Harris, R.C., 2002. Cyclooxygenase-2 inhibitor blocks expression of mediators of renal injury in a model of diabetes and hypertension. *Kidney Int* 62, 929-939
- Craven, P.A, Caines, M.A, DeRubertis, F.R., 1987. Sequential alterations in glomerular prostaglandin and thromboxane synthesis in diabetic rats: relationship to the hyperfiltration of early diabetes. *Metabolism* 36, 95-103
- Dey, A., Williams, R.S., Pollock, D.M., Stepp, D.W., Newman, J.W., 2004. Altered kidney CYP2C and cyclooxygenase-2 levels are associated with obesity-related albuminuria. *Obes Res* 12, 1278-89
- Dupont, A.G., Lefebvre, R.A., Bogaert, M.G., 1986. Inhibition of noradrenergic neurotransmission by apomorphine and pergolide in the in situ autoperfused renal and superior mesenteric vascular beds. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 333, 229-234.

El-Kashef, H., 1996. Hyperglycemia increased the responsiveness of isolated rabbit's pulmonary arterial rings to serotonin. *Pharmacology* 53, 151-159.

Endlich, K., Kúhn, R., Stinhausen, M., Dussel, R., 1993. Visualization of serotonin effects on renal vessels of rats. *Kidney Int* 43, 314-323.

Eto, Y., Nitta, K., Uchida, K., Tsutsui, T., Natori, K., Kawashima, A., Yumura, W., Nihei, H., 1997. Anti-mitogenic effects of sarpogrelate in cultured rat mesangial cells. *Life Sci* 60, PL193-199

Fernández, M.M., Morán, A., Martín, M.L., San Román, L., 2000. Mesenterio vasoconstrictor responses to 5-hydroxytryptamine in the in situ blood autoperfused rat mesentery: involvement of 5-HT<sub>2B</sub> and/or 5-HT<sub>2C</sub> receptor activation. *Eur J Pharmacol* 40, 221-227.

Fink, G.D., Brody, M.J., 1978. Continuous measurement of renal blood flow changes to renal nerve stimulation and intra-arterial drug administration in rat. *Am J Physiol* 234, H219-H222.

García, M., Morán, A., Calama, E., Martín, M.L., Barthelmebs, M., Román, L.S., 2005. 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* 145, 593-601.

García, M., Morán, A., Martín, M.L., Barthelmebs, M., San Román, L., 2006. The nitric oxide synthesis/pathway mediates the inhibitory serotonergic responses of the pressor effect elicited by sympathetic stimulation in diabetic pithed rats. *Eur J Pharmacol* 537, 126-134.

Guo, Z. Sua, W., Allena, S., Panga, H., Daugherty, A., Smarta, E., Gong, M.C., 2005. COX-2 up-regulation and vascular smooth muscle contractile hyperreactivity in spontaneous diabetic db/db mice. *Cardiovascular Research* 67, 723-735.

Haeusler, G., Finch, L., 1972. Vascular reactivity to 5-hydroxytryptamine and hypertension in the rat. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 272, 101-116.

Hao, C.M., Breyer, M.D., 2008. Physiological regulation of prostaglandins in the kidney. *Annu Rev Physiol* 70, 357-377.

Hattori, Y., Kawasaki, H., Kanno, M., Fukao, M., 1995. Enhanced 5-HT<sub>2</sub> receptor mediated contractions in diabetic rat aorta: participation of Ca<sup>2+</sup> channels associated with protein kinase C activity. *J Vasc Res* 32, 220-229.

Hodgson, W.C., King, R., Boura, A.L., 1990. Augmented potentiation of renal vasoconstrictor responses by TXA<sub>2</sub> receptor stimulation in the alloxan diabetic rats. *J Pharm Pharmacol* 42, 423-427.

Houston, D.S., Vanhoutte, P.M., 1986. Serotonin and the vascular system: role in health and disease, and implications for therapy. *Drugs* 31, 149-163

Hoyer, D., Clarke, D.E., Fozard, J.R., Hartig, P.R., Martin, G.R., Mylecharane, W.J., Saxena, P.R., Humphrey, P.P.A., 1994. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacol Rev* 46, 158-203.

James, G.M., Hodgson, W.C., Davis, E.A., Haynes, J.M. 1994. Attenuated 5-hydroxytryptamine receptor-mediated responses in aortae from streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Pharmacol* 111, 370-376

James, G.M., Hodgson, W.C., 1995. Attenuated 5-HT<sub>2</sub> receptor-mediated responses in hindquarters of diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 294, 109-115.

Kasho, M., Sakai, M., Sasahara, T., Anami, Y., Matsumura, T., Takemura, T., Matsuda, H., Kobori, S., Shichiri, M., 1998. Serotonin enhances the production of type IV collagen by human mesangial cells. *Kidney Int* 54, 1083-1092.

- Kennett, G.A., Wood, M.D., Bright, F., Cilia, J., Piper, D.C., Gager, T., Thomas, D., Baxter, G.S., Forbes, I.T., Ham, P., Blackburn, T.P., 1996. In vitro and in vivo profile of SB 206553, a potent 5-HT<sub>2C</sub>/5-HT<sub>2B</sub> receptor antagonist with anxiolytic-like properties. *Br J Pharmacol* 117, 427-434.
- Khan, K.N., Stanfield, K.M., Harris, R.K., Baron, D.A., 2001. Expression of cyclooxygenase-2 in the macula densa of human kidney in hypertension, congestive heart failure, and diabetic nephropathy. *Renal Fail* 23, 321-330.
- Kobayashi, S., Satoh, M., Namikoshi, T., Haruna, Y., Fujimoto, S., Arakawa, S., Komai, N., Tomita, N., Sasaki, T., Kashihara, N., 2008. Blockade of serotonin 2A receptor improves glomerular endothelial function in rats with streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Clin Exp Nephrol* 12, 119-125.
- Komers, R., Lindsley, J.N., Oyama, T.T., Schutzer, W.E., Reed, J.F., 2001. Immunohistochemical and functional correlations of renal cyclooxygenase-2 in experimental diabetes. *J Clin Invest* 107, 889-898.
- Komers, R., Zdychova, J., Cahova, M., Kazdova, L., Lindsley, J.N., Anderson, S., 2005. Renal cyclooxygenase-2 in obese Zucker (fatty) rats. *Kidney Int* 67, 2151-2158.
- Miranda, F.J., Alabadi, J.A., Llorens, S., Ruiz De Apodaca, R.F., Centeno, J.M., Alborch, E., 2000. Diabetes-induced changes in endothelial mechanisms implicated in rabbit carotid arterial response to 5-hydroxytryptamine. *Eur J Pharmacol* 401, 397-402.
- Miranda, F.J., Alabadi, J.A., Llorens, S., Ruiz De Apodaca, R.F., Centeno, J.M., Alborch, E., 2002. Experimental diabetes induces hyperreactivity of rabbit renal artery to 5-hydroxytryptamine. *Eur J Pharmacol* 439, 121-127.
- Morán, A., Velasco, C., Martín, M.L., San Román, L., 1997. Renal vasoconstrictor response to 5-hydroxytryptamine in the situ autoperfused rat kidney: involvement of angiotensin II and the 5-HT<sub>2</sub> receptor activation. *Eur J Pharmacol* 330, 205-211.
- Morán, A., Ortiz de Urbina, A.V., Martín, M.L., García, M., Rodríguez-Barbero, A., Dorado, F., San Román, L., 2008. Characterization of contractile 5-hydroxytryptamine receptor subtypes in the in situ autoperfused kidney in the anaesthetized rat. *Eur J Pharmacol* 592, 133-137.
- Morán, A., Ortiz de Urbina, A.V., Martín, M.L., Rodríguez-Barbero, A., San Román, L., 2009. Characterization of the contractile 5-hydroxytryptamine receptor in the autoperfused kidney of L-NAME hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 620, 90-96.
- Morán, A., Restrepo, B., Ortiz de Urbina, A.V., García, M., Martín, M.L., San Román, L., 2010. Pharmacological profile of 5-hydroxytryptamine-induced inhibition on the pressor effect elicited by sympathetic stimulation in long-term diabetic pithed rats. *Eur J Pharmacol* 643, 70-77.
- Nacci, C., Tarquinio, M., De Benedictis, L., Mauro, A., Zigrino, A., Carratù, M.R., Quon, M.J., Montagnani, M., 2009. Endothelial dysfunction in mice with streptozotocin-induced type 1 diabetes is opposed by compensatory overexpression of cyclooxygenase-2 in the vasculature. *Endocrinology* 150, 849-61.
- Nowak, H.P., Mahle, C.D., Yocca, F.D., 1993. [<sup>3</sup>H]-5-carboxamidotryptamine labels 5HT<sub>1D</sub> binding sites in bovine substantia nigra. *Br J Pharmacol* 109, 1206-1211.
- Ochi, T., Goto, T., 2001. Anti-inflammatory activity of a novel selective cyclooxygenase-2 inhibitor, FR140423, on type II collagen-induced arthritis in Lewis rats. *Prostaglandins Other Lipid Media* 66, 317-327.
- Ochi, T., Goto, T., 2002. Differential effect of FR122047, a selective cyclo-oxygenase-1 inhibitor, in rat chronic models of arthritis. *Br J Pharmacol* 135, 782-788.

- Orie, N.N., Aloamaka, C.P., Antai, A.B., 1993. Enhanced Na-K ATPase activity in the aorta may explain the unaltered contractile responses to KCl in diabetes mellitus. *Indian J Physiol Pharmacol* 37,199-203.
- Ramage, AG., Villalón, C.M., 2008. 5-hydroxytryptamine and cardiovascular regulation. *Trends Pharmacol Sci* 29, 472-481.
- Rodriguez-Barbero, A., Obrero, J., Eleno, N., Rodriguez-Pena, A., Duwel, A., Jerkic, M., Sanchez-Rodriguez, A., Bernabeu, C., Lopez-Novoa, J.M., 2001. Endoglin expression in human and rat mesangial cells and its upregulation by TGF-beta 1. *Biochem Biophys Res Commun* 282, 142-147.
- Roquebert, J., Morán, A., Demichel, P., 1992. Effect of quinpirole on neurogenic vasoconstriction in the in situ autoperfused hindquarters and renal vascular beds of the rat. *J Auton Pharm* 12, 291-298.
- Shoji, T., Tamaki, T., Fukui, K., Iwao, H., Abe, Y., 1989. Renal hemodynamic response to 5-hydroxytryptamine (5-HT): involvement of the 5-HT receptor subtypes in the canine kidney. *Eur J Pharmacol* 171, 129-228.
- Sikorski, B.W., Hodgson, W.C., King, R.G., 1991. Thromboxane A2 receptor stimulation similarly potentiates pressor responses to 5-hydroxytryptamine in perfused hindquarters of non-diabetic and alloxan diabetic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 18, 237-244.
- Sikorski, B.W., James, G.M., Glance, S.D., Hodgson, W.C., King, R.G., 1993. Effect of endothelium on diabetes-induced changes in constrictor responses mediated by 5-hydroxytryptamine in rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol* 22, 423-430.
- Smith, W.L., Bell, T.G., 1978. Immunohistochemical localization of the prostaglandin-forming cyclooxygenase in renal cortex. *Am J Physiol* 235, F451-457.
- Tian, R.X., Kimura, S., Kondou, N., Fujisawa, Y., Zhou, M.S., Yoneyama, H., Kosaka, H., Rahman, M., Nishiyama, A., Abe, Y., 2002. DOI, a 5-HT<sub>2</sub> receptor agonist, induces renal vasodilatation via nitric oxide in anesthetized dogs. *Eur J Pharmacol* 437, 79-84.
- Tuncer, M., Vanhoutte, P.M., 1991. Role of prostanoids in the increased vascular responsiveness and delayed tachyphylaxis to serotonin in the kidney of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 9, 623-629.
- Van Buren, T., Vleeming, W., Krutzen, M.M., Van de Kuil, T., Gispen, W.H., De Wildt DJ., 1998. Vascular responses of isolated mesenteric resistance and basilar arteries from short- and long-term diabetic rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 358, 663-670.
- Vanhoutte, P.M., Houston, D.C., 1985. Platelets, endothelium, and vasospasm. *Circulation* 72, 728-734.
- Watts, S.W., Thompson, J.M., 2004. Characterization of the contractile 5-hydroxytryptamine receptor in the renal artery of the normotensive rat. *J Pharmacol Exp Ther* 309, 165-172.
- Wool, M., Chaubey, M., Atkinson, P., Thomas, D.R., 2000. Antagonist activity of meta-chlorophenylpiperazine and partial agonist activity of 8-OH-DPAT at the 5-HT<sub>7</sub> receptor. *Eur J Pharmacol* 396, 1-8.
- Yar, A.S., Menevse, S., Alp, E., Helvacioğlu, F., Take, G., 2010. The effects of resveratrol on cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 mRNA and protein levels in diabetic rat kidneys. *Mol Biol Rep* 37, 2323-2331.
- Zink, M.H., Pergola, P.E., Doane, J.F., Sved, A.F., Alper, R.H., 1990. Quipazine increases renin release by peripheral hemodynamic mechanism. *J Cardiovasc Pharmacol* 15, 1-9.



## Resultados y discusión. Artículo 4

Este estudio tuvo como objetivo caracterizar el tipo/subtipo de receptores 5-HT y los mecanismos serotoninérgicos implicados en las respuestas vasculares en riñón autoperfundido *in situ* de ratas diabéticas a largo plazo. El agente diabetógeno utilizado fue el aloxano, que induce un síndrome semejante a la diabetes mellitus tipo 1 (Agrawal *et al.*, 1987), y se usa, comúnmente, como un modelo experimental de diabetes en animales (Miranda *et al.*, 2002; García *et al.*, 2006; Morán *et al.*, 2010).

La inyección intraarterial (i.a.) de diferentes dosis de 5-HT (0,00000125 a 0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) aumentó la presión de perfusión renal de manera dosis dependiente, pero no modificó la presión arterial sistémica en las ratas diabéticas a largo plazo.

El agonista selectivo del receptor 5-HT<sub>2</sub>,  $\alpha$ -metil-5-HT, provocó un efecto vasoconstrictor local en el riñón autoperfundido *in situ* de rata, similar al producido por 5-HT. Sin embargo, BW723C86, un agonista selectivo de receptores 5-HT<sub>2B</sub>, m-CPP (1-(3-clorofenil) piperazina), un agonista selectivo de receptores 5-HT<sub>2B/2C</sub>, 5-carboxamidotryptamine (5-CT), agonista selectivo de receptores 5-HT<sub>1</sub>, y 1-fenilbiguanida, agonista selectivo de receptores 5-HT<sub>3</sub>, no modificaron la presión de perfusión renal.

El efecto vasoconstrictor producido por 5-HT y  $\alpha$ -metil-5-HT disminuyó significativamente en presencia de ritanserina (antagonista selectivo de receptores 5-HT<sub>2</sub>), espiperona (antagonista selectivo 5-HT<sub>2A</sub>), indometacina (inhibidor no selectivo de COX), FR122047 (inhibidores selectivos de COX-1) o nimesulida (inhibidor selectivo de la COX-2) en ratas diabéticas a largo plazo. Sin embargo, dicha acción vasoconstrictora no fue modificada ni por el pretratamiento con SB206553 (3,5-dihidro-5-metil- N3pyridinylbenzo [1,2-b: 4,5-b ' ] dipyrrole (1H)-carboxamida clorhidrato), antagonista no selectivo de receptores 5-HT<sub>2C</sub>, prazosina (bloqueante  $\alpha_1$ -adrenérgico), propranolol (bloqueante  $\beta$ -adrenérgico no selectivo), enalapril (inhibidor de la ECA) o losartán (antagonista de receptores AT<sub>1</sub>).

Los resultados del análisis de expresión de proteínas confirma estos resultados: COX-1 y COX-2 se expresan en el tejido renal. La COX inducible (COX-2) está sobre-expresada en la diabetes a largo plazo.

La técnica utilizada en nuestros experimentos (Morán *et al.*, 2009), según el método descrito por Fink y Brody (1978), permite la medición continua del flujo sanguíneo renal en rata, lo que, como consecuencia, permite evaluar los cambios rápidos en el flujo sanguíneo renal inducido por la administración i.a. de diferentes fármacos. Así, se puede evaluar la acción directa local renal de 5-HT y posibles acciones indirectas inducidas por la liberación de agentes vasoconstrictores o vasodilatadores humorales.

La reactividad cardiovascular a 5-HT en la diabetes experimental muestra marcadas variaciones en diferentes lechos vasculares (Miranda *et al.*, 2000; García *et al.*, 2005, 2006; Morán *et al.*, 2010). Las respuestas constrictoras a 5-HT en riñón de rata diabética por aloxano aumentaron significativamente en comparación con los controles (Hogson *et al.*, 1990), mientras que respuestas a 5-HT disminuyeron en el tren posterior de rata diabética por aloxano (Sikorski *et al.*, 1991) y en aorta aislados de ratas diabéticas por STZ (James *et al.*, 1994; James y Hodgson, 1995). Nosotros y otros autores ya hemos descrito que esta variación (en la respuesta a serotonina) también se observa en otros modelos experimentales, como la hipertensión, donde la reactividad a 5-HT esta aumentada, tanto en riñón aislado como en riñón auperfundido *in situ* de rata (Tuncer y Vanhoutte, 1991; Boston *et al.*, 1997; Morán *et al.*, 2009). Sin embargo, la hipertensión no induce ningún cambio en ratas desmeduladas (Haeusler y Finch, 1972; Cavaliere *et al.*, 1980).

En este estudio, la administración local i.a. de 5-HT en ratas diabéticas aumentó significativamente la presión de perfusión renal de manera dosis-dependiente; el efecto vasoconstrictor fue significativamente mayor que el encontrado en ratas normoglucémicas. Nuestros datos están de acuerdo con los resultados de Miranda *et al.* (2002) en arteria renal, y con otros resultados en el riñón autoperfundido de rata (Shoji *et al.*, 1989; Endlich *et al.*, 1993); y también son consistentes con nuestros resultados previos en ratas desmeduladas diabéticas a corto (4 semanas) y largo plazo (8 semanas) (García *et al.*, 2006; Morán *et al.*, 2010); apoyados por los resultados de Van

Buren *et al.* (1998), quienes proponen un aumento en la sensibilidad de la arteria basilar a 5-HT en ratas diabéticas a corto plazo.

En las ratas diabéticas a largo plazo, la acción vasoconstrictora de 5-HT en riñón autoperfundido *in situ* de rata se debe a la activación de receptores 5-HT<sub>2</sub>, ya que este efecto fue completamente bloqueado con el pretratamiento con el antagonista selectivo de receptores 5-HT<sub>2</sub>, ritanserina (Awouters *et al.*, 1988) y reproducido con dosis similares del agonista 5-HT<sub>2</sub>,  $\alpha$ -metil-5-HT (Baxter *et al.*, 1995). Ni el agonista selectivo de receptores 5-HT<sub>1</sub>, 5-CT (Nowak *et al.*, 1993; Wool *et al.*, 2000) ni el agonista selectivo de receptores 5-HT<sub>3</sub>, 1-fenilbiguanida (Cheng *et al.*, 2002), fueron capaces de reproducir la acción vasoconstrictora de 5-HT. Estos resultados también han sido descritos por nosotros en ratas normoglucémicas e hipertensas (Morán *et al.*, 1997, 2008, 2009); y están de acuerdo con datos de otros autores utilizando ratas conscientes, normoglucémicas, hipertensas y diabéticas (Zink *et al.*, 1990; Ramage y Villalón, 2008; Kobayashi *et al.*, 2008).

En este modelo experimental, la administración de 5-HT no produjo efectos vasodilatadores a ninguna de las dosis utilizadas, como ocurría en ratas normoglucémicas e hipertensas (Morán *et al.*, 2008, 2009). Sin embargo, nuestro grupo ha descrito tanto acciones vasodilatadoras y vasoconstrictoras de 5-HT en el tren posterior autoperfundido de rata anestesiada en función de las dosis utilizadas (Calama *et al.*, 2002). Además, otros autores han descrito un doble efecto de serotonina (acciones vasodilatadoras y vasoconstrictoras) a nivel vascular renal (Shoji *et al.*, 1989; Endlich *et al.*, 1993).

En consecuencia, nos hemos centrado en la determinación del tipo/subtipos de receptores serotoninérgicos implicados en el efecto vasoconstrictor en ratas diabéticas a largo plazo. La acción vasoconstrictora de 5-HT y  $\alpha$ -metil-5-HT, en ratas diabéticas, fue superior a la encontrada en ratas normoglucémicas. Ni la administración i.a. del agonista selectivo de receptores 5-HT<sub>2C</sub>, m-CPP, ni la administración intraarterial de BW723C86 (agonista selectivo del receptor 5-HT<sub>2B</sub>) fueron capaces de reproducir el efecto vasoconstrictor de 5-HT o  $\alpha$ -metil-5-HT. Por lo tanto, los receptores 5-HT<sub>2B/2C</sub> carecen de acción vasoconstrictora serotoninérgica en el riñón autoperfundido *in situ* de ratas diabéticas a largo plazo.

Este hecho fue confirmado utilizando antagonistas selectivos: tanto el antagonista selectivo de receptores 5-HT<sub>2</sub>, ritanserina (Awouters *et al.*, 1988) como el antagonista selectivo de receptores 5-HT<sub>2A</sub>, espiperona (Hoyer *et al.*, 1994) bloquearon el efecto vasoconstrictor inducido por  $\alpha$ -metil-5-HT y 5-HT. Sin embargo, el antagonista selectivo de receptores 5-HT<sub>2B/2C</sub>, SB206553 (Kennett *et al.*, 1996) no inhibió la acción vasoconstrictora. En vista de lo anterior, sugerimos que los receptores 5-HT<sub>2A</sub> son los que están principalmente involucrados en la vasoconstricción renal inducida por 5-HT en los animales diabéticos a largo plazo.

Así, proponemos que la acción vasoconstrictora de 5-HT en riñón autoperfundido *in situ* de ratas diabéticas a largo plazo está principalmente mediada por activación de receptores 5-HT<sub>2A</sub>; mientras que en el modelo de rata normoglucémicas el subtipo de receptor principalmente implicado fue el 5-HT<sub>2C</sub> (Morán *et al.*, 1997, 2008). Este cambio en el subtipo de receptor podría deberse a los cambios endoteliales que se producen durante la diabetes o al aumento de la reactividad renal a 5-HT que ya ha sido descrito en animales diabéticos SHR (Boston *et al.*, 1997). Vanhoutte *et al.* han demostrado que las respuestas a serotonina están moduladas por el endotelio (Vanhoutte y Houston, 1985; Houston y Vanhoutte, 1986). Por otra parte, el estado diabético a largo plazo en ratas origina una hipertensión arterial similar a la inducida por L-NAME ya descrita anteriormente por nuestro grupo (Morán *et al.*, 2009), en la que ya hemos descrito resultados similares debidos a la activación y expresión de receptores 5-HT<sub>2A</sub> en la arteria renal. En esta línea, Kobayashi *et al.* (2008) indican que sarpogrelato, un antagonista del receptor 5-HT<sub>2A</sub>, mejora la función endotelial glomerular en ratas con nefropatía diabética inducida por STZ.

Nuestros resultados están de acuerdo con los obtenidos por Zink *et al.* (1990) utilizando ratas conscientes, y por Tuncer y Vanhoutte (1991) en riñón aislado perfundido, y con estudios más recientes llevados a cabo en la arteria renal aislada, donde ya se reportó que el subtipo de receptores 5-HT<sub>2A</sub> son los principales responsables del efecto constrictor de 5-HT (Watts y Thompson, 2004). Sin embargo, nuestros resultados difieren de los datos reportados por Shoji *et al.* (1989), Endlich *et al.* (1993) y Tian *et al.* (2002), donde 5-HT tiene un efecto dual (acciones vasoconstrictoras y vasodilatadoras) a nivel vascular renal. En los últimos años se han descrito

alteraciones en endotelio, en prostaglandinas y en su interacción con 5-HT o con el sistema serotoninérgico, en diferentes lechos vasculares en modelos de ratones, ratas y perros normoglucémicos, hipertensos o diabéticos (Blackshear *et al.*, 1991; Endlich *et al.*, 1993; Tuncer y Vanhoute, 1991, Guo *et al.*, 2005; Morán *et al.*, 2009); por ello, nuestro grupo analizó si algún mecanismo indirecto está involucrado en este efecto vasoconstrictor serotoninérgico. Para ello, estudiamos el efecto de prazosina (antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico), de propranolol ( $\beta$ -bloqueante no selectivo), de enalapril (inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina), de losartan (antagonista AT1), o de inhibidores de la vía de las ciclooxigenasas: indometacina (inhibidor no selectivo de COX), FR122047 (inhibidor selectivo COX-1) y nimesulida (inhibidor selectivo COX-2), sobre el efecto vasoconstrictor renal de 5-HT y  $\alpha$ -metil-5-HT. La vasoconstricción fue completamente bloqueada por los inhibidores de la vía de las ciclooxigenasas, y no fue modificada por el pretratamiento con prazosina, propranolol, enalapril o losartán.

Por lo tanto, proponemos que, en el riñón autoperfundido *in situ* de ratas diabéticas a largo plazo, la acción vasoconstrictora de 5-HT está mediada por la activación del receptor 5-HT<sub>2A</sub> que conduce a la activación de la vía de la ciclooxigenasa.

Para confirmar nuestros resultados, se llevó a cabo el estudio de expresión de proteínas de ciclooxigenasas en tejido renal. COX-1 es expresada constitutivamente en la mayoría de los tejidos. En el riñón adulto normal, COX-1 se ha localizado en las arterias y arteriolas, glomérulos y túbulos colectores (Smith y Bell, 1978). Por el contrario, COX-2 actúa como enzima inducible y su expresión se puede aumentar considerablemente por la inflamación, por la diabetes o por estímulos físicos (Komers *et al.*, 2001, 2005; Guo *et al.*, 2005; Hao y Breyer, 2008). Nuestros estudios revelan expresión tanto de COX-1 como de COX-2 en el tejido renal. La isoforma inducible, COX-2, esta sobreexpresada después de ocho semanas de inducción de la diabetes en ratas. Resultados similares han sido reportados por Nacci *et al.* (2009) en la aorta de ratones diabéticos por estreptozotocina de ocho semanas, y en otros modelos de diabetes, tales como ratas Zucker diabéticas, tipo I y tipo II (Komers *et al.*, 2001, 2005; Cheng *et al.*, 2002, Dey *et al.*, 2004). Por otra parte, se ha demostrado que la síntesis de prostanoides renales está incrementada en ratas diabéticas por estreptozotocina (Craven

*et al.*, 1987; Miranda *et al.*, 2002.). Incluso, se ha demostrado en riñones diabéticos humanos, un incremento en la expresión de COX-2 (Khan *et al.*, 2001; Hao y Breyer, 2008). A pesar de que Tuncer y Vanhoutte (1991) describieron que las respuestas a 5-HT en riñones de ratas SHR no se ven afectadas por indometacina, nuestros resultados, en este modelo de diabetes, sugieren un papel de las prostaglandinas derivadas de COX-2 en la patogénesis de los cambios hemodinámicos renales a 5-HT durante la diabetes.

## IV. CONCLUSIONES





1. La hiperglucemia a largo plazo origina cambios en el tipo y subtipos de receptores implicados en la acción inhibitoria de serotonina sobre las respuestas presoras obtenida por estimulación simpática total, en ratas. El efecto inhibitor está mediado por la activación presináptica de receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub>.
2. La acción inhibitoria de serotonina sobre las respuestas obtenidas por estimulación eléctrica del flujo simpático total, por activación de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> está mediada por la vía del óxido nítrico/guanilato ciclasa, mientras que la producida por activación 5HT<sub>2A</sub> implica la vía de las ciclooxigenasas.
3. 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 pre y postsináptica de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> (potenciadores de la bradicardia) y receptores 5-HT<sub>7</sub> (inhibidores de la acción bradicardizante).
4. La hiperglucemia a largo plazo induce cambios en el subtipo de receptor y en los mecanismos indirectos implicados en la acción serotoninérgica en riñón autoperfundido *in situ*. En ratas diabéticas a largo plazo, la acción vasoconstrictora inducida por serotonina está mediada por activación local de receptores 5-HT<sub>2A</sub>, modulando la vía de las ciclooxigenasas.

En resumen, la diabetes experimental a largo plazo induce cambios en el tipo y subtipos de receptores y en los mecanismos serotoninérgicos implicados en la regulación de funciones cardiovasculares y renales.



## V. BIBLIOGRAFÍA



- Abebe, W., McLeod, K.M., (1990). Protein kinase C mediated contractile responses of arteries from diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.*, 101:465-471.
- Adham, N., Tamm, J.A., Salon, J.A., Vaysse, P.J.J., Weinshank, R.L., Banchek, T.A., (1994). A single point mutation increases the affinity of serotonin 5-HT<sub>1D $\alpha$</sub> , 5-HT<sub>1D $\beta$</sub> , 5-HT<sub>1E</sub> and 5-HT<sub>1F</sub> receptors of  $\alpha$ -adrenergic antagonists. *Neuropharmacology*. 33: 387-391.
- Agawal, D.K., McNeil, J.H., (1987). Vascular responses to agonists in rat mesenteric artery from diabetic rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 65:1484-1490.
- Allgaier, C., Warnke, P., Stangj, A.P., Feuerstein, T.J., (1995). Effects of 5-HT receptor agonist on depolarization-induced (3H)-noradrenaline release in rabbit hippocampus and human neocortex. *Br. J. Pharmacol.*, 116: 1769-1774.
- Altura, B.M., (1981). Pharmacology of venules: some current concepts and clinical potential. *J. Cardiovas. Pharmacol.* 3: 1413-1428.
- Angulo, J., Rodríguez-Mañas, L., Peiró, C., Neira, M., Marín, J., Sánchez-Ferrer, C.F., (1998). Impairment of nitric oxide-mediated relaxations in anaesthetized autoperfused streptozotocin-induced diabetic rats. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.* 358: 29-37.
- Antillon, M., Cominelli, F., Lo, S., Morán, M., Somberg, K., Reynolds, T., Zipser, R.D., (1990). Effects of oral prostaglandins on indomethacin-induced renal failure in patients with cirrhosis and ascites. *J. Rheumatol. Suppl.* 20: 46-49.
- Arisz, L., Donker, A.J., Brentjens, J.R., Van Der Hem, G.K., (1976). The effect of indomethacin on proteinuria and kidney function in the nephrotic syndrome. *Acta Med. Scand.*, 199(1-2): 121-125.
- Bagdy, G., Calogero, A.E., Murphy, D.L., Szemerédi, K., (1989). Serotonin agonists cause parallel activation of the sympatho adrenal medullary system and the Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Axis in conscious rats. *Endocrinology.*, 125: 2664-2669.
- Bagwell, C.A., Brophy, C., (2000). Enhanced arterial contractile responses in diabetic hypercholesterolemic pig carotid arteries. *Int. J. Surg. Investig.*, 1: 477-481.
- Bandoh, T., Hayashi, M., Ino, K., Takada, S., Ushizawa, D., Hoshi, K., (2004). Acute effect of milnacipran on the relationship between the locus coeruleus noradrenergic and dorsal raphe serotonergic neuronal transmitters. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 14(6): 471-478.
- Bank, N., Aynedjian, H.S. (1993). Role of EDRF (nitric oxide) in diabetic renal hyperfiltration. *Kidney Int.* 43(6):1306-1312.
- Banting, F.G., Best, C.H., (1990). Pancreatic extracts, (1922). *J. Lab. Clin. Med.*, 115(2): 254-272.
- Barnes, N.M., Sharp, T., (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology.*, 38: 1083-1152.
- Barradas, M.A., Gills, D.S., Fonseca, V.A., Mikhailidis, D.P., Dandona, P., (1988). Intraplatelet serotonin in patients with diabetes mellitus and peripheral vascular disease. *Eur. J. Clin. Invest.*, 18(4): 399-404.
- Bassenge, E., (1992). Clinical relevance of endothelium derived relaxing factor (EDRF). *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 34: 37S-42S.
- Barrús, M.T., Marín, J., Villamor, J., Balfagón, G., (1992). Receptors involved in the modulation of 5-hydroxytryptamine release in bovine cerebral arteries. *J. Pharm. Pharmacol.*, 44(10): 824-829.

- Beenen, O.H., Mathy, M.J., Pfaffendorf, M., Van Zwieten, P.A., (1996). Vascular responsiveness in isolated perfused kidneys of diabetic hypertensive rats. *J. Hypertens.*, 14(9): 1125-1130.
- Belcheva, I., Tashev, R., Belcheva, S., (2007). Hippocampal asymmetry in serotonergic modulation of learning and memory in rats. *Laterality.*, 12(6): 475-486.
- Bellivier, F., Leboyer, M., Courtet, P., Buresi, C., Beaufils, B., Samolyk, D., Allilaire, J.F., Feingold, J., Mallet, J., Malafosse, A., (1998). Association between the tryptophan hydroxylase gene and manic-depressive illness. *Arch. Gen. Psychiatry.*, 55: 33-37.
- Bellush, L.L., Reid, S.G., (1994). Metabolic and neurochemical profiles in insulin-treated diabetic rats. *Am. J. Physiol.*, 266: R87-R94.
- Bellush, L.L., Reid, S.G., North, D., (1991). The functional significance of biochemical alterations in streptozotocin-induced diabetes. *Physiol. Behav.*, 50: 973-981.
- Belmonte, K.E., Jacoby, D.B., Fryer, A.D., (1997). Increased function of inhibitory neuronal M<sub>2</sub> muscarinic receptors in diabetic rat lungs. *Br. J. Pharmacol.*, 121: 1287-1294.
- Birnbaumer, L., Abramowitz, J., Brown, A.M., (1990). Receptor-effector coupling by G proteins. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1031: 163-224.
- Birtheimer, A., Dommès, E., Jeltsch, H., Cassel, J.C., Jackisch, R., (2002). Septal grafts and evoked acetylcholine release in the rat hippocampus after 192 IgG-saporin lesions. *Neuroreport.*, 13(7): 973-976.
- Blessing, W.W., Seaman, B., (2003). 5-Hydroxytryptamine 2A receptors regulate sympathetic nerves constricting the cutaneous vascular bed in rabbits and rats. *Neuroscience.*, 117: 939-948.
- Bliziotis, M.M., Eshleman, A.J., Zhang, X.W., Wiren, K.M., (2001). Neurotransmitter action in osteoblasts: Expression of a functional system for serotonin receptor activation and reuptake. *Bone.*, 29: 477-486.
- Boston, P.C., Hodgson, W.C., (1997). Changes in reactivity towards 5-hydroxytryptamine in the renal vasculature of the diabetic spontaneously hypertensive rat. *Journal of Hypertension*, 15:769-774.
- 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., (1986). Proposals for the classification and nomenclature of functional receptors for 5-hydroxytryptamine. *Neuropharmacology.*, 25(6): 563-576.
- Brodie, T., (1900). The immediate action of an intravenous injection of blood serum. *J. Physiol. (London).*, 26: 48-71.
- Brown, G.L., Ebert, M.H., Goyer, P.F., Jimerson, D.C., Klein, W.J., Bunney, W.E., Goodwin, F.K., (1982). Aggression, suicide, and serotonin: Relationships to CSF amine metabolites. *Am. J. Psychiatry.*, 139: 741-746.
- Bulbring, E., Crema, A., (1958). Observations concerning the action of 5 hydroxytryptamine on the peristaltic reflex. *Br. J. Pharmacol.*, 13: 444-457.
- Bulbring, E., Lin, R.C.Y., (1958). The effect of intraluminal application of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxytryptophan on peristalsis, the local production of 5-hydroxytryptamine and its release in relation to intraluminal pressure and propulsive activity. *J. Physiol.*, 140: 381-407.
- Calama, E., Fernández, M.M., Morán, A., Martín, M.L., San Román, L., (2002). Vasodilatador and vasoconstrictor responses induced by 5-hydroxytryptamine in the in situ blood autoperfused hindquarters of the anaesthetized rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 366: 110-116.

- Calama, E., García, M., Jarque, M.J., Morán, A., Martín, M.L., San Román, L., (2003). 5-Hydroxytryptamine-induced vasodilator responses in the hindquarters of the anaesthetized rat, involve beta-2-adrenoceptors. *J. Pharm. Pharmacol.*, 55(10): 1371-1378.
- Calama, E., Morán, A., Ortiz de Urbina, A.V., Martín, M.L., San Román, L., (2004). Vasoconstrictor responses to 5-hydroxytryptamine in the autoperfused hindquarters of spontaneously hypertensive rats. *Pharmacology*, 71(2): 66-72.
- Cameron, N.E., Eaton, S.E., Cotter, M.A., Tesfaye, S., (2001). Vascular factors and metabolic interactions in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetologia*, 44(11): 1973-1988.
- Cazzola, I., Matera, M.G., (2000). 5-HT modifiers as a potential treatment of asthma. *Trends. Pharmacol. Sci.*, 21(1): 13-16.
- Cazzola, M., Matera, M.G., D'amato, G., Rossi, F., (1995). Effects of serotonin on airways: recent developments. *Allergy*, 50(1): 1-10.
- Centurión, D., Glusa, E., Sanchez-Lopez, A., Valdivia, L.F., Saxena, P.R., Villalón, C.M., (2004). 5-HT<sub>7</sub>, but not 5-HT<sub>2B</sub>, receptors mediate hypotension in vagosympathectomized rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 502(3): 239-242.
- Charlton, K.G., Bond, R.A., Clarke, D.E., (1986). An inhibitory prejunctional 5-HT<sub>1-like</sub> receptor in the isolated perfused rat kidney. Apparent distinction from the 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>1C</sub> subtypes. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 332: 8-15.
- Cheng, H.F., Wang, C.J., Moeckel, G.W., Zhang, M.Z., McKanna, J.A., Harris, R.C., (2002). Cyclooxygenase-2 inhibitor blocks expression of mediators of renal injury in a model of diabetes and hypertension. *Kidney Int.*, 62:929-939.
- Choi, K.C., Kim, N.H., An, M.R., Kang, D.G., Kim, S.W., Lee, J., (1997). Alterations of intrarenal renin-angiotensin and nitric oxide systems in streptozotocin diabetic rats. *Diabetologia*, 39: 793-799.
- Consolo, S., Bertorelli, R., Russi, G., Zambelli, M., Ladinsky, H., (1994). Serotonergic facilitation of acetylcholine release in vivo from rat dorsal hippocampus via serotonin 5-HT<sub>3</sub> receptors. *J. Neurochem.*, 62(6): 2254-2261.
- Cooper, M.D., Allen, T.J., Jerums, G., Doyle, A.E., (1986). Accelerated progression of diabetic nephropathy in the spontaneously hypertensive streptozotocin diabetic rat. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 13: 655-662.
- Coppen, A., Eccleston, E.G., Peet, M., (1973). Total and free tryptophan concentration in the plasma of depressive patients. *Lancet*, 2: 60-63.
- Cosentino, F., Hishikawa, K., Katusic, Z.S., Lüscher, T.F., (1997). High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic cells. *Circulation*, 96: 25-28.
- Cote, F., Fligny, C., Fromes, Y., Mallet, J., Vodjdani, G., (2004). Recent advances in understanding serotonin regulation of cardiovascular function. *Trends. Mol. Med.*, 10: 232-238.
- Cote, F., Thevenot, E., Fligny, C., Fromes, Y., Darmon, M., Ripoché, M.A., Bayard, E., Hanoun, N., Saurini, F., Lechat, P., Dandolo, L., Hamon, M., Mallet, J., Vodjdani, G., (2003). Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 13525-13530.

- Coulson, F.R., Jacoby, D.B., Fryer, A.D., (2002). Increased function of inhibitory neuronal M<sub>2</sub> muscarinic receptors in trachea and ileum of diabetic rats. *Br. J. of Pharmacology.*, 135: 1355-1362.
- Cowen, P.J., Parry-Billings, M., Newsholme, E.A., (1989). Decreased plasma tryptophan levels in major depression. *J. Affect. Disord.*, 16: 27-31.
- Craven, P.A., Caines, M.A., De Rubertis, F.R., (1987). Sequential alterations in glomerular prostaglandin and thromboxane synthesis in diabetic rats: relationship to the hyperfiltration of early diabetes. *Metabolism.*, 36(1): 95-103.
- Datté, J.Y., Offoumou, M.A., (2004). Involvement of nitric oxide in fading 5-hydroxytryptamine-induced vasoconstriction in rat isolated vena portae smooth muscle. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 7: 1-7.
- De Boer, S.F., Koolhaas, J.M., (2005). 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptor agonists and aggression: a pharmacological challenge of the serotonin deficiency hypothesis. *Eur. J. Pharmacol.*, 526(1-3): 125-139.
- Dey, A., Williams, R.S., Pollock, D.M., Stepp, D.W., Newman, J.W., Hammock, B.D., Imig, J.D. (2004). Altered kidney CYP2C and cyclooxygenase-2 levels are associated with obesity-related albuminuria. *Obes Res*, 12(8):1278-1289.
- Dilsaver, S., (1986). Cholinergic mechanisms in depression. *Brain. Res. Rev.*, 11: 285-216.
- El-Kashef, H., (1996). Hyperglycemia increased the responsiveness of isolated rabbit's pulmonary arterial rings to serotonin. *Pharmacology.*, 53: 151-159.
- Endlich, K., Kühn, R., Stinhausen. M., Dussel, R., (1993). Visualization of serotonin effects on renal vessels of rats. *Kidney. Int.*, 43: 314-323.
- Féléto, M., Moreau, N., Duhault, J., (1994). Vascular responsiveness in young, diabetic, and aging hyperinsulinemic rats. *Life Sci.*, 54(23): 1801-1813.
- Feniuk, W., Humphrey, P.P.A., (1989). Mechanisms of 5-hydroxytryptamine-induced vasoconstriction, in: *The Peripheral Actions of 5-Hydroxytryptamine*, ed: J. R. Fozard, (Oxford Medical Publications) p. 354
- Fernández, M.M. (1999). Implicaciones serotoninérgicas cardiovasculares in vivo: neurotransmisión simpática y territorios vasculares autoperfundidos en rata. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.
- Fernández, M.M., Calama, E., Morán, A., Martín, M.L., San Román, L., (2000a). Characterization of mechanisms involved in presynaptic inhibition of sympathetic pressor effects induced by some 5-HT<sub>1</sub> receptor antagonists. *J. Auton. Pharmacol.*, 20: 313-323.
- Fernández, M.M., Morán, A., Martín, M.L., San Román, L., (2000b). Mesenteric vasoconstrictor responses to 5-hydroxytryptamine in the in situ blood autoperfused rat mesentery: involvement of 5-HT<sub>2B</sub> and/or 5-HT<sub>2C</sub> receptor activation. *Eur. J. Pharmacol.*, 401(2): 221-227.
- Fink, K.B., Göthert, M., (2007). 5-HT receptor regulation of neurotransmitter release. *Pharmacol. Rev.*, 59: 360-417.
- Fozard, J.R., Kalkman, H.O., (1994). 5-Hydroxytryptamine and the initiation of migraine: new perspectives. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 350: 225-229.
- Florez, J., Armijo, J.A., Mediavilla, A. (2008). Farmacología humana 5ª edición. Ed. Elsevier Masson, Madrid.



- Frishman, W.H., Grewall, P., (2000). Serotonin and the heart. *Ann. Med.*, 32(3): 195-209.
- Frishman, W.H., Huberfeld, S., Okin, S., Wang, Y.H., Kimar, A., Shareef, B., (1995). Serotonin and serotonin antagonism in cardiovascular and non-cardiovascular tissue. *J. Clin. Pharmacol.*, 35: 541-572.
- Furman, B.L., Wilson, G.A., (1980). Further studies on the effects of 5-hydroxytryptophan on plasma glucose and insulin in the mouse. *Diabetologia.*, 19: 386-390.
- Gaddum, J.H., Picarelli, Z.P., (1957). Two kinds of tryptamine receptors. *Br. J. Pharmacol.*, 12: 323-328.
- García, M., (2005). Influencia de la diabetes experimental en respuestas serotoninérgicas a nivel cardiovascular y renal. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.
- García, M., Morán, A., Calama, E., Martín, M.L., Barthelmebs, M., San Román, L. (2005). Diabetes-induced changes in the 5-hydroxytryptamine inhibitory receptors involved in the pressor effect elicited by sympathetic stimulation in the pithed rat. *Br. J. of Pharmacol.*, 145: 593-601.
- García, M., Morán, A., Martín, M.L., Barthelmebs, M., San Román, L., (2006). The nitric oxide synthesis/pathway mediates the inhibitory serotonergic responses of the pressor effect elicited by sympathetic stimulation in diabetic pithed rats. *Eur. J. of Pharmacol.*, 537: 126-134.
- García, M., Morán, A., Martín, M.L., Ortiz de Urbina, A.V., San Román, L., (2007). Diabetes-induced changes in 5-hydroxytryptamine modulation of vagally induced bradycardia in rat heart. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 34: 1199-1206.
- Ge, J., Barnes, N.M., (1996). 5-HT<sub>4</sub> receptor-mediated modulation of 5-HT release in the rat hippocampus in vivo. *Br. J. Pharmacol.*, 117(7): 1475-1480.
- Gershon, M.D., (1999). Review article: Roles played by 5-hydroxytryptamine in the physiology of the bowel. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 13: 15-30.
- Giacalone, E., Tansella, M., Valzelli, L., Garattini, S., (1968). Brain serotonin metabolism in isolated aggressive mice. *Biochem. Pharmacol.*, 17: 1315-1327.
- Gil-Bea, F.J., Domínguez, J., García-Alloza, M., Marcos, B., Lasheras, B., Ramírez, M.J., (2004). Facilitation of cholinergic transmission by combined treatment of ondansetron with flumazenil after cortical cholinergic afferentation. *Neuropharmacol.*, 47(2): 225-232.
- Gillet, G., Ammor, S., Fillion, G., (1985). Serotonin inhibits acetylcholine release from rat striatum slices: evidence for a presynaptic receptor-mediated effect. *J. Neurochem.*, 45(6): 1687-1691.
- Glennon, R.A. (2003). Higher-end serotonin receptors: 5-HT<sub>(5)</sub>, 5-HT<sub>(6)</sub>, and 5-HT<sub>(7)</sub>. *J. Med. Chem.*, 46: 2795-2812.
- Glusa, E., Pertz, H.H., (2000). Further evidence that 5-HT-induced relaxation of pig pulmonary artery is mediated by endothelial 5-HT<sub>2B</sub> receptors. *Br. J. Pharmacol.*, 130: 692-698.
- 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., (1979). Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 76: 106-110.
- Göthert, M., Fink, K., Frölich, D., Likungu, J., Molderings, G., Schlicker, E., Zentner, J., (1996). Presynaptic 5-HT auto- and heteroreceptors in the human central and peripheral nervous system. *Behav. Brain Res.*, 73(1-2): 89-92.

- Gradin, K., Dahlof, C., Persson, B., (1986). A low dietary sodium intake reduces neuronal noradrenaline release and the blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 332(4): 364-369.
- Grahame-Smith, D.G. (1967). The biosynthesis of 5-hydroxytryptamine in carcinoid tumours and intestine. *Clin. Sci.*, 33: 147-158.
- Grailhe, R., Grabtree, G.W., Hen, R., (2001). Human 5-HT<sub>(5)</sub> receptors: The 5-HT<sub>(5A)</sub> receptor is functional but the 5-HT<sub>(5B)</sub> receptor was lost during mammalian evolution. *Eur. J. Pharmacol.*, 418: 157-167.
- 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., (2000). 5-HT<sub>(2A)</sub> receptors stimulate mitogen-activated protein kinase via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in rat renal mesangial cells. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 278(4): F650-658.
- Guillet-Deniau, I., Burnol, A.F., Girard, J., (1997). Identification and localization of a skeletal muscle serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor coupled to the Jak/STAT pathway. *J. Biol. Chem.*, 272: 14825-14829.
- Hajduch, E., Rencurel, F., Balendran, A., Batty, I.H., Downes, C.P., Hundal, H.S., (1999). Serotonin (5-Hydroxytryptamine), a novel regulator of glucose transport in rat skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, 274: 13563-13568.
- Hamlin, K.E., Fischer, F.E., (1951). The synthesis of 5-hydroxytryptamine. *J. Am. Chem Soc.*, 73:5007-5008.
- Hannon, J., Hoyer, D., (2008). Molecular biology of 5-HT receptors. *Behavioural Brain Research.*, 195: 198-213.
- Hao, C.M., Breyer, M.D., (2008). Physiological regulation of prostaglandins in the kidney. *Annu. Rev. Physiol.*, 70: 357-377.
- Hasegawa, Y., Suehiro, A., Higasa, S., Namba, M., Kakishita, E., (2002). Enhancing effect of advanced glycation end products on serotonin-induced platelet aggregation in patients with diabetes mellitus. *Thromb. Res.*, 107(6): 319-323.
- Hattori, Y., Kawasaki, H., Kanno, M., Fukao, M., (1995). Enhanced 5-HT<sub>2</sub> receptor mediated contractions in diabetic rat aorta: participation of Ca<sup>2+</sup> channels associated with protein kinase C activity. *J. Vasc. Res.*, 32(4): 220-229.
- Head, R.J., Longhurst, P.A., Panek, R.L., Stitzel, E., (1987). A contrasting effect of the diabetic state upon the contractile responses of aortic preparations from rats and rabbits. *Br. J. Pharmacol.*, 91: 275-286.
- Herrera, R., Manjarrez, G., Nishimura, E., Hernandez, J., (2003). Serotonin-related tryptophan in children with insulin-dependent diabetes. *Pediatr. Neurol.*, 28: 20-23.
- Hills, J.M., Jessen, R.K., (1995). Transmission:  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), 5-hydroxytryptamine (5-HT<sub>1</sub>) and dopamine. En: *Autonomic neuroeffector mechanisms*. 465-470.
- Hinton, J.M., Hill, P., Jeremy, J., Garland, C., (2000). Signalling pathways activated by 5-HT<sub>(1B)</sub>/5-HT<sub>(1D)</sub> receptors in native smooth muscle and primary cultures of rabbit renal artery smooth muscle cells. *J. Vasc. Res.*, 37(6): 457-468.
- Hodges, M.R., Richerson, G.B., (2010). The role of medullary serotonin (5-HT) neurons in respiratory control: contributions to eupneic ventilation, CO<sub>2</sub> chemoreception, and thermoregulation. *J. Appl. Physiol.*, 108(5): 1425-1432.

- Hodgson, W.C., King, R.G., Boura, A.L., (1990). Augmented potentiation of renal vasoconstrictor responses by TXA<sub>2</sub> receptor stimulation in the alloxan diabetic rats. *J. Pharm. Pharmacol.*, 42: 423-427.
- Hodgson, W.C., Sokorski, B.W., King, R.G., (1992). Cardiovascular sensitivity changes to eicosanoids in rats with experimentally induced diabetes mellitus. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 19: 9-15.
- Hornung, J.P., (2003). The human raphe nuclei and the serotonergic system. *J. Chem. Neuroanat.*, 26: 331-343.
- Hoyer, D., Clarke, D.E., Fozard, J.R., Hartig, P.R., Martin, G.R., Mylecharane, E.J., Saxena, P.R., Humphrey, P.P., (1994). International Union of Pharmacology classification of receptors of 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacol. Rev.*, 46: 157-203.
- Hoyer, D., Hannon, J.P., Martin, G. R., (2002). Molecular pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 71(4): 533-554.
- Humphrey, P.P.A., Feniuk, W., Watts, A.D., (1983). Prejunctional effects of 5-hydroxytryptamine on noradrenergic nerves in the cardiovascular system. *Fed. Proc.*, 42: 218-222.
- Iismaa TP, Biden TJ, Shine J, (1995). G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Cell Biol*, 4(2):195-202.
- Ishida, T., Kawashima, S., Hirata, K., Yokoyama, M., (1998). Nitric oxide is produced via 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>2B</sub> receptor activation in human coronary artery endothelial cells. *Kobe. J. Med. Sci.*, 44: 51-63.
- IUPHAR Receptor Database (<http://www.iuphar-db.org/iuphar-rd/>). Izumi J, Washizuka M., Miura, N., Hiraga, Y., Ikeda, Y., (1994). Hippocampal serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor enhances acetylcholine release in conscious rats. *J. Neurochem.*, 62: 1804-1808.
- James, G.M., Hodgson, W.C., Davis, E.A., Haynes, J.M., (1994). Attenuated 5- hydroxytryptamine receptor-mediated responses in aortae from streptozotocin-induced diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.*, 111(1): 370-376.
- James, G.M., Hodgson, W.C., (1995a). Attenuated 5-HT<sub>2</sub> receptor-mediated responses in hindquarters of diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 294: 109-115.
- James, G.M., Hodgson, W.C., (1995b). Potentiation by endothelin-1 of 5-hydroxytryptamine responses in aortae from streptozotocin-diabetic rats: a role for thromboxane A<sub>2</sub>. *Br. J. Pharmacol.*, 114: 1236-1240.
- Jamnicky, B., Muck-Seler, D., Slijepcevic, M., (1993). Favourable effect of tryptophan/ insulin treatment on serotonergic imbalance in alloxan diabetic rats. *Comp. Biochem. Physiol.*, 105A: 267-273.
- Jeltsch-David, H., Koenig, J., Cassel, J.C., (2008). Modulation of cholinergic functions by serotonin and possible implications in memory: general data and focus on 5-HT<sub>(1A)</sub> receptors of the medial septum. *Behav. Brain. Res.*, 195(1): 86-97.
- Johnstone, M.T., Creager, S.J., Scales, K.M., Cusco, J.A., Lee, B.K., Creager, M.A., (1993). Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation.*, 88(6): 2510-2616.
- Jones, B.J., Blackburn, T.P., (2002). The medical benefit of 5-HT research. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 71(4): 555-568.
- Jones, K.L., Horowitz, M., Wishart, M.J., Maddox, A.F., Harding, P.E., Chatterton, B.E., (1995a). Relationships between gastric emptying intragastric meal distribution and blood glucose concentrations in diabetes mellitus. *J. Nucl. Med.*, 36: 2220-2228.

- Jones, J.F.X., Martín, G.R., Ramage, A.G., (1995b). Evidence that 5-HT<sub>1D</sub> receptors mediate inhibition of sympathetic ganglionic transmission in anaesthetized cats. *Br. J. Pharmacol.*, 116: 1715-1717.
- Jonnakuty, C., Gagnoli, C., (2008). What do we know about serotonin?. *J. Cell. Physiol.*, 217: 301-306.
- Kappelle, A.C., Biessels, G., Branvenboer, B., Van Burent, T., Traber, J., De Wildt, D.J., Gispen, W.H., (1994). Beneficial effect of the Ca<sup>2+</sup> antagonist, nimodipine, on existing diabetic neuropathy in the BB/Wor rat. *Br. J. Pharmacol.*, 111: 887-893.
- Kappelle, A.C., Biessels, G., Van Buren, T., Erkelens, D.J., De Wildt, D.J., Gispen, W.H., (1993). Effects of nimodipine on sciatic nerve blood flow and vasa nervorum responsiveness in diabetic rat. *Eur. J. Pharmacol.*, 250: 43-49.
- Karlsson, C., Bodelsson, G., Bodelsson, M., Stjernquist, M., (1998). Endothelium-derived prostanoids reduce 5-hydroxytryptamine-induced contraction in the human uterine artery. *Hum. Reprod.*, 13(7): 1947-1951.
- Kasho, M., Sakai, M., Sasahara, T., Anami, Y., Matsumura, T., Takemura, T., Matsuda, H., Kobori, S., Shichiri, M., (1998). Serotonin enhances the production of type IV collagen by human mesangial cells. *Kidney Int.*, 54: 1083-1092.
- Kaumann, A.J., Frenken, M., Posival, H., Brown, A.M., (1994). Variable participation of 5-HT<sub>1-like</sub> receptors and 5-HT<sub>2A</sub> receptors in serotonin-induced contraction of human isolated coronary arteries. 5-HT<sub>1-like</sub> receptors resemble cloned 5-HT<sub>1Dβ</sub> receptors. *Circulation.*, 90: 1141-1153.
- Kaye, W., (2008). Neurobiology of anorexia and bulimia nervosa. *Physiol. Behav.*, 94(1):121-135.
- Kellet, D.O., Ramage, A.G., Jordan, D., (2005). Central 5-HT<sub>7</sub> receptors are critical for reflex activation of cardiac vagal drive in anaesthetized rats. *J. Physiology.*, 563: 319-331.
- Keynan, S., Hirshberg, B., Levin-Iaina, N., Wexler, I.D., Dahan, R., Reinhartz, E., Ovadia, H., Wollman, Y., Chernihovskiy, T., Iaina, A., Raz, I., (2000). Renal nitricoxide production during early phase of experimental diabetes mellitus. *Kidney international.*, 58: 740-747.
- Khan, K.N., Stanfield, K.M., Harris, R.K., Baron, D.A., (2001). Expression of cyclooxygenase-2 in the macula densa of human kidney in hypertension, congestive heart failure, and diabetic nephropathy. *Ren. Fail.*, 23(3-4): 321-330.
- 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., (1996). Cloning characterization and chromosomal localization of a human 5-HT<sub>6</sub> serotonin receptor. *J. Neurochem.*, 66: 47-56.
- Kolta, M.G., Soliman, K.F., Williams, B.B., (1986). Role of 5-hydroxytryptamine in the regulation of brain neuropeptides in normal and diabetic rat. *Horm. Res.*, 23(2): 112-121.
- Komers, R., Lindsley, J.N., Oyama, T.T., Schutzer, W.E., Reed, J.F., Mader, S.L., Anderson, S., (2001). Immunohistochemical and functional correlations of renal cyclooxygenase-2 in experimental diabetes. *J. Clin. Invest.*, 107(7): 889-898.
- Komers, R., Zdychová, J., Cahová, M., Kazdová, L., Lindsley, J.N., Anderson, S., (2005). Renal cyclooxygenase-2 in obese Zucker (fatty) rats. *Kidney Int.*, 67(6): 2151-2158.
- Kumar, K.K., Tung, S., Iqbal, J., (2010). Bone loss in anorexia nervosa: leptin, serotonin, and the sympathetic nervous system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1211: 51-65.
- 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., (2002). Committee of the Japan Diabetes

- Society on the diagnostic criteria of diabetes mellitus Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 55(1): 65-85.
- Lakovic, Z., Salkovic, M., Kici, Z., Relja, M., (1990). Effect of long-lasting diabetes mellitus on rat and human brain monoamines. *J. Neurochem.*, 54: 143-147.
- Lam, R.W., Zis, A.P., Grewal, A., Delgado, P.L., Charney, D.S., Krystal, J.H., (1996). Effects of rapid tryptophan depletion in patients with seasonal affective disorder in remission after light therapy. *Arch. Gen. Psychiatry.*, 53: 41-44.
- Lassègue, B., Clempus, R.E., (2003). Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 285(2): R277-297.
- Lehmann, R., Schleicher, E.D., (2000). Molecular mechanism of diabetic nephropathy. *Clin. Chim. Act.*, 297(1-2): 135-144.
- Levy, F.O., Gudermann, T., Perez-Reyes, E., Birnbaumer, M., Kaumann, A.J., Birnbaumer, L., (1992). Molecular cloning of a human serotonin receptor (5-HT<sub>1D</sub>) with a pharmacological profile resembling that of the 5-HT<sub>1D</sub> subtype. *J. Biol. Chem.*, 267: 7553-7562.
- Lishner, M., Akselrod, S., Avi, V.M., Oz, O., Divon, M., Ravid, M., (1987). Spectral analysis of heart rate fluctuations. A non-invasive, sensitive method for the early diagnosis of autonomic neuropathy in diabetes mellitus. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 19(2): 119-125.
- Lucki, I., (1998). The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biol. Psychiatry.*, 44: 151-162.
- Lundell, M.J., Chu-LaGriff, Q., Doe, C.Q., Hirsh, J., (1996). The engrailed and huckebein genes are essential for development of serotonin neurons in the Drosophila CNS. *Mol. Cell. Neurosci.*, 7: 46-61.
- Lustman, P.J., Griffith, L.S., Clouse, R.E., Cryer, P.E., (1986). Psychiatric illness in diabetes mellitus. Relationship to symptoms and glucose control. *J. Nerv. Ment. Dis.*, 174: 736-742.
- Malysko, J., Malyszko, J., Mysliwiec, M., (1995). Blood platelet function, plasma serotonin and lipid metabolism in patients with diabetic nephropathy. *Pol. Arch. Med. Wewn.*, 94(1): 26-31.
- Mann, J.J., Brent, D.A., Arango, V., (2001). The neurobiology and genetics of suicide and attempted suicide: A focus on the serotonergic system. *Neuropsychopharmacology.*, 24: 467-477.
- Marre, M., Berrut, G., Bouhanick, B., (1993). Hypertension and diabetes mellitus. *Biomed. Pharmacother.*, 47: 61-66.
- Martín, F.J., Miguez, J.M., Aldegunde, M., Atienza, G., (1995). Platelet serotonin transport is altered in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci.*, 56(21): 1807-1815.
- Martín, G.R., (1994). Vascular receptors for 5-hydroxytryptamine: distribution, function and classification. *Pharmacol. Ther.*, 62: 283-324.
- Maurer-Spurej, E., Pittendreigh, C., Solomons, K., (2004). The influence of selective serotonin reuptake inhibitors on human platelet serotonin. *Thromb. Haemost.*, 91: 119-128.
- Mayhan, W.G., Simmons, L.K., Sharpe, G.M., (1991). Mechanisms of impaired responses of cerebral arterioles during diabetes mellitus. *Am. J. Physiol.*, 260: H319-H326.
- McDowell, T.S., Hajduczuk, G., Abboud, F.M., Chapleau, M.W., (1994). Baroreflex dysfunction in diabetes mellitus 1. Selective impairment of parasympathetic control of heart rate. *Am. J. Physiol.*, 266: H235-243.

- McDuffie, J.E., Coaxum, S.D., Maleque, M.A., (1999). 5-Hydroxytryptamine evokes endothelial nitric oxide synthase activation in bovine aortic endothelial cell cultures. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 221: 386-390.
- McGrath, M.A., (1977). 5-HT and neurotransmitter release in canine blood vessels. *Cir. Res.*, 41: 428-435.
- McCance, D.R., Hanson, R.L., Pettitt, D.J., Bennett, P.H., Hadden, D.R., Knowler, W.C., (1997). Diagnosing diabetes mellitus: do we need new criteria?. *Diabetologia.*, 40: 247-255.
- Medhurst, A.D., Brown, A.M., Kaumann, A.J., Parsons, A.A., (1997). 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.*, 355(4): 475-482.
- Mehlman, P.T., Higley, J.D., Faucher, I., Lilly, A.A., Taub, D.M., Vickers, J., Suomi, S.J., Linnoila, M., (1994). Low CSF 5-HIAA concentrations and severe aggression and impaired impulse control in nonhuman primates. *Am. J. Psychiatry.*, 151: 1485-1491.
- Meyers, S., (2000). Use of neurotransmitter precursors for treatment of depression. *Altern. Med. Rev.*, 5: 64-71.
- Millan, M.J., Gobert, A., Roux, S., Porsolt, R., Meneses, A., Carli, M., Di Cara, B., Jaffard, R., Rivet, J.M., Lestage, P., Mocaer, E., Peglion, J.L., Dekeyne, A., (2004). The serotonin<sub>1A</sub> receptor partial agonist S15535 [4-(benzodioxan-5-yl)-1-(indan-2-yl)piperazine] enhances cholinergic transmission and cognitive function in rodents: a combined neurochemical and behavioral analysis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 311(1): 190-203.
- Milstein, S., Katusic, Z., (1999). Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 263(3): 681-684.
- Miranda, F.J., Alabadi, J.A., Llorens, S., Ruiz De Apodaca, R.F., Centeno, J.M., Alborch, E., (2000). Diabetes-induced changes in endothelial mechanisms implicated in rabbit carotid arterial response to 5-hydroxytryptamine. *Eur. J. Pharmacol.*, 401: 397-402.
- Miranda, F.J., Alabadi, J.A., Llorens, S., Ruiz De Apodaca, R.F., Centeno, J.M., Alborch, E., (2002). Experimental diabetes induces hyper-reactivity of rabbit renal artery to 5-hydroxytryptamine. *Eur. J. Pharmacol.*, 439: 121-127.
- Miranda, F.J., Torregrosa, G., Salom, J.B., Alabadi, J.A., Jover, T., Barberá, M.D., Alborch, E., (1993). Endothelial modulation of 5-hydroxytryptamine-induced contraction in goat cerebral arteries. *Gen Pharmacol.*, 24(3): 649-653.
- Moechars, D., Lorent, K., Dewachter, I., Baekelandt, V., De Strooper, B., Van Leuven F., (1998). Transgenic mice expressing an alpha-secretion mutant of the amyloid precursor protein in the brain develop a progressive CNS disorder. *Behav. Brain. Res.*, 95: 55-64.
- Molderings, G.J., Brüss, M., Göthert, M., (2006). Functional and molecular identification of 5-hydroxytryptamine receptors in rabbit pulmonary artery: involvement in complex regulation of noradrenaline release. *Pharmacol. Rep.*, 58(2): 188-199.
- Molderings, G.J., Fink, K., Schlicker, E., Göthert, M., (1987). Inhibition of noradrenaline release via presynaptic 5-HT<sub>1B</sub> receptors of the rat vena cava. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, 336(3): 245-250.
- Molderings, G.J., Frölich, D., Likungu, J., Göthert, M., (1996). Inhibition of noradrenaline release via presynaptic 5-HT<sub>1D</sub> alpha receptors in human atrium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, 353(3): 272-280.

- Molderings, G.J., Werner, K., Likungu, J., Göthert, M., (1990). Inhibition of noradrenaline release from the sympathetic nerves of the human saphenous vein via presynaptic 5-HT receptors similar to the 5-HT<sub>1D</sub> subtype. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 342(4): 371-377.
- Moorhouse, J.A., Carter, S.A., Doupe, J., (1966). Vascular responses in diabetic peripheral neuropathy.
- Morán, A., de Urbina A.V., Martín, M.L., Rodríguez-Barbero, A., San Román, L., (2009). Characterization of the contractile 5-hydroxytryptamine receptor in the autoperfused kidney of L-NAME hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 620: 90-96.
- Morán, A., Fernández, M.M., Velasco, C., Martín, M.L., San Román, L., (1998). Characterization of prejunctional 5-HT<sub>1</sub> receptors that mediate the inhibition of pressor effects elicited by sympathetic stimulation in the pithed rats. *Br. J. Pharmacol.*, 123: 1205-1213.
- Morán, A., Ortiz de Urbina, A.V., Martín, M.L., García, M., Rodríguez-Barbero, A., Dorado, F., San Román, L., (2008). Characterization of contractile 5-hydroxytryptamine receptor subtypes in the in situ autoperfused kidney in the anaesthetized rat. *Eur. J. Pharmacol.*, 592(1-3): 133-137.
- Morán, A., Velasco, C., Martín, M.L., San Román, L., (1994a). Pharmacological characterization of 5-HT receptors in parasympathetic innervation of rat heart. *Eur. J. Pharmacol.*, 252: 161-166.
- Morán, A., Velasco, C., Martín, M.L., San Román, L., (1997). 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.*, 330(2-3): 205-211.
- Morán, A., Velasco, C., Salvador, T., Martín, M.L., San Román, L., (1994b). Inhibitory 5-hydroxytryptamine receptors involved in pressor effects obtained by stimulation of sympathetic outflow from spinal cord in pithed rats. *Br. J. Pharmacol.*, 113: 1358-1362.
- Morán, A., Restrepo, B., de Urbina, A.V., García, M., Martín, M.L., Román, L., (2010). Pharmacological profile of 5-hydroxytryptamine-induced inhibition on the pressor effect elicited by sympathetic stimulation in long-term diabetic pithed rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 643(1): 70-77.
- Murray, J., Kaneko, J.J., Rucker, R.B., (1983). Experimental diabetes and platelet aggregation in the rat. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 41: 283-291.
- Nebigil, C.G., Choi, D.S., Dierich, A., Hickel, P., Le Meur, M., Messaddeq, N., Launay, J.M., Maroteaux, L., (2000). Serotonin <sub>2B</sub> receptor is required for heart development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 97(17): 9508-9513.
- Nebigil, C.G., Garnovskaya, M.N., Spurney, R.F., Raymond, J.R., (1995). Identification of a rat glomerular mesangial cell mitogenic 5-HT<sub>2A</sub> receptor. *Am. J. Physiol.*, 268: F122-127.
- Ni, W., Geddes, T.J., Priestley, J.R.C., Szasz, T., Kuhn, D.M., Watts, S.W., (2008a). The existence of a local 5-hydroxytryptaminergic system in peripheral arteries. *Br. J. of Pharmacology.*, 154: 663-674.
- Nilsson, T., Longmore, J., Shaw, D., Pantev, E., Bard, J.A., Brancheck, T., Edvinsson, L., (1999). Characterisation of 5-HT receptors in human coronary arteries by molecular and pharmacological techniques. *Eur. J. Pharmacol.*, 372(1): 49-56.
- Ogawa, Y., Takenaka, T., Onodera, S., Tobise, K., Tekeda, A., Hirayama, T., Morit, K., Kikuchi, K., (1995). Comparison of the 5-hydroxytryptamine-induced contraction of rat pulmonary artery to that of aorta in vitro. *Jpn. Circ. J.*, 59: 89-97.

- Oksenberg, D., Marters, S.A., O'Dowd, B.F., Jin, H., Havlik, S., Peroutka, S.J., Aaskenazi, A., (1992). A single amino-acid difference confers major pharmacological variation between human and rodent 5-HT<sub>1B</sub> receptors. *Nature.*, 360: 161-163.
- Orie, N.N., Aloamaka, C.P., Antai, A.B., (1993). Enhanced Na-K ATPase activity in the aorta may explain the unaltered contractile responses to KCl in diabetes mellitus. *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, 37: 199-203.
- Oyama, Y., Kawasaki, H., Hattori, Y., Kanno, M., (1986). Attenuation of endothelium-dependent relaxation in aorta from diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* 132(1): 75-78.
- 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., (2009). Role of SREBP-1 in the development of parasympathetic dysfunction in the hearts of type 1 diabetic Akita mice. *Circ. Res.*, 105: 287-294.
- Parks, C.L., Robinson, P.S., Sibille, E., Shenk, T., Toth, M., (1998). Increased anxiety of mice lacking the serotonin<sub>1A</sub> receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 95:10734-10739.
- Paulmann, N., Grohmann, M., Voigt, J.P., Bert, B., Vowinkel, J., Bader, M., Skelin, M., Jevsek, M., Fink, H., Rupnik, M., Walther, D.J., (2009). Intracellular serotonin modulates insulin secretion from pancreatic beta-cells by protein serotonylation. *PLoS. Biol.*, 7(10): e1000229.
- Pauwels, P.J., (2000). Diverse signaling by 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptors. *Biochem. Pharmacol.*, 60(12): 1743-1750.
- Pedigo, N.W., Yamamura, H.I., Nelson, D.L., (1981). Discrimination of multiple (3H)-5-hydroxytryptamine-binding sites by the neuroleptics spiperone in rat brain. *J. Neurochem.*, 36:220-226
- Peroutka, S.J., Snyder, S.H., (1979). Multiple serotonin receptors: differential binding of [3H] 5-hydroxytryptamine, [3H] lysergic acid diethylamide and [3H] spiroperidol. *Mol. Pharmacol.*, 16(3): 687-699.
- Perry, R.C., Shankar, R.R., Fineberg, N., McGill, J., Baron, A.D., (2001). Early Diabetes Intervention Program (EDIP). HbA1c measurement improves the detection of type 2 diabetes in high-risk individuals with nondiagnostic levels of fasting plasma glucose: the Early Diabetes Intervention Program (EDIP). *Diabetes Care*, 3: 465-471.
- Pieper, G.M., Adams, M.B., Roza, A.M., (1998b). Pancreatic transplantation reverses endothelial dysfunction in experimental diabetes. *Surgery.*, 123: 89-95.
- Pieper, G.M., Dembry, K., Siebeneich, W., (1998a). Long-term treatment in vivo with NOX-101, a scavenger of nitric oxide, prevents diabetes-induced endothelial dysfunction. *Diabetologia.*, 41: 1220-1226.
- Pieper, G.M., Siebeneich, W., Moore-Hilton, G., Roza, A.M., (1997). Reversal by L-arginine of a dysfunctional arginine/nitric oxide pathway in the endothelium of the genetic diabetic BB rat. *Diabetologia.*, 40: 910-915.
- Price, J.C., Kelley, D.E., Ryan, C.M., Meltzer, C.C., Drevets, W.C., Mathis, C.A., Mazumdar, S., Reynolds, C.F., (2002). Evidence of increased serotonin<sub>1A</sub> receptor binding in type 2 diabetes: a positron emission tomography study. *Brain, Res.*, 927: 97-103.
- Ralevic, V., Belai, A., Burnstock, G., (1995). Effects of streptozotocin-diabetes on sympathetic nerve, endothelial and smooth muscle function in the rat mesenteric arterial bed. *Eur. J. Pharmacol.*, 296: 193-199.



- Ramage, A.G., Villalón, C.M., (2008). 5-hydroxytryptamine and cardiovascular regulation, *Trends in Pharmacological Science.*, 29: 472-481.
- Ramage, A.G., (2001). Central cardiovascular regulation and 5-hydroxytryptamine receptors. *Brain. Res. Bull.*, 56(5): 425-439.
- Ramboz, S., Oosting, R., Amara, D.A., Kung, H.F., Blier, P., Mendelsohn, M., Mann, J.J., Brunner, D., Hen, R., (1998). Serotonin receptor 1A knockout: An animal model of anxiety-related disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 95: 14476-14481.
- Rapport, M.M., Green, A.A., Page, I.H., (1948). Partial purification of the vasoconstrictor in beef serum. *J. Biol. Chem.*, 174: 735-741.
- Raptis, A.E., Viberti, G., (2001). Pathogenesis of diabetic nephropathy. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.*, 109(2): S424-437.
- Rutz, S., Riegert, C., Rothmaier, A.K., Buhot, M.C., Cassel, J.C., Jackisch, R., (2006). Presynaptic serotonergic modulation of 5-HT and acetylcholine release in the hippocampus and the cortex of 5-HT<sub>1B</sub>-receptor knockout mice. *Brain. Res. Bull.*, 70(1): 81-93.
- Ryan, C., Vega, A., Drash, A., (1985). Cognitive deficits in adolescents who developed diabetes early in life. *Pediatrics.*, 75:921-927.
- Sánchez-López, A., Centurión, D., Lozano-Cuenca, J., Muñoz-Islas, E., Cobos-Puc, L.E., Villalón, C.M., (2009). Role of serotonin receptors in vascular tone in the pithed rat. *Arch. Cardiol. Mex.*, 2: 83-94
- Sánchez-Lopez, A., Centurión, D., Vázquez, E., Arulmani, U., Saxena, P.R., Villalón, C.M., (2003). Pharmacological profile of the 5-HT-induced inhibition of cardioaccelerator sympathetic outflow in pithed rats: correlation with 5-HT<sub>1</sub> and putative 5-HT<sub>5A/5B</sub> receptors. *Br. J. Pharmacol.*, 140(4): 725-735.
- Sandrini, M., Vitale, G., Vergoni, A.V., Ottani, A., Bertolini, A., (1997). Streptozotocin-induced diabetes provokes changes in serotonin concentration and on 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors in the rat brain. *Life Sci.*, 60: 1393-1397.
- Sanger, F., (1988). Sequences, sequences and sequences. *Annu. Rev. Biochem.*, 57: 1-28.
- Sanger, F., (2001). The early days of DNA sequences. *Nat. Med.*, 7(3): 267-268.
- Saxena, P.R., Bolt, G.R., Dhasmana, K.M., (1987). Serotonin agonists and antagonists in experimental hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 10: S12-S18.
- Saxena, P.R., De Vries, P., Villalón, C.M., (1998). 5-HT<sub>1</sub>-like receptors: a time to bid goodbye. *Trends. Pharmacol. Sci.*, 19(8): 311-316.
- Saxena, P.R., Villalón, C.M., (1991). 5-hydroxytryptamine, a chamaleon in the heart. *Trends. Pharmacol. Sci.*, 12: 223-227.
- Schoeffter, P., Pfeilschifter, J., Bobirnac, I., (1995). 5-Hydroxytryptamine 5-HT<sub>1B</sub> receptors inhibiting cyclic AMP accumulation in rat renal mesangial cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 351(1): 35-39.
- Schoeffter, P., Ullmer, C., Bobirnac, I., Gabbiani, G., Lubbert, H., (1996). Functional, endogenously expressed 5-hydroxytryptamine 5-HT<sub>7</sub> receptors in human vascular smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.*, 117: 993-994.

- Schumuck, K., Ullmer, C., Kalkman, H.O., Probst, A., Lübbert, H., (1996). Activation of meningeal 5-HT<sub>2B</sub> receptors: an early step in the generation of migraine headache? *Eur. J. Neurosci.*, 8: 959-967.
- Shaw, A.M., Brown, J.I., Burton, D.C., Macdonald, A., (2000). Role of the 5-HT<sub>2A</sub> 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.*, 13: 277-285.
- Shepherd, S.L., Jordan, D., Ramage, A.G., (1994). 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.*, 111(2): 616-624.
- Shimizu, H., Mori, M., Saito, T., (1993). An increase of serum remnant-like particles in non-insulin-dependent diabetic patients with microalbuminuria. *Clin Chim Acta.*, 221(1-2):191-196.
- Shoji, T., Tamaki, T., Fukui, K., Iwao, H., Abe, Y., (1989). Renal hemodynamic responses to 5-hydroxytryptamine (5-HT): involvement of the 5-HT receptor subtypes in the canine kidney. *Eur. J. Pharmacol.*, 171(2-3): 219-228.
- Sikorski, B.W., Hodgson, W.C., King, R.G., (1991). Thromboxane A<sub>2</sub> receptor stimulation similarly potentiates pressor responses to 5-hydroxytryptamine in perfused hindquarters of non-diabetic and alloxan diabetic rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 18(4): 237-244.
- Sikorski, B.W., James, G.M., Glance, S.D., Hodgson, W.C., King, R.G., (1993). Effect of endothelium on diabetes-induced changes in constrictor responses mediated by 5-hydroxytryptamine in rat aorta. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 22: 423-430.
- Skinner, M.R., Ramage, A.G., Jordan, D., (2002). Modulation of reflexly evoked vagal bradycardias by central-5-HT<sub>1A</sub> receptors in anaesthetized rabbits". *Br. J. of Pharmacol.*, 137: 861-873.
- Smith, S.A., Pogson, C.L., 1977. Tryptophan and the control of plasma glucose concentrations in the rat. *Biochem. J.*, 168: 495-506.
- Sporton, S.C., Shepherd, S.L., Jordan, D., Ramage, A.G., (1991). Microinjections of 5-HT<sub>1A</sub> agonists into the dorsal motor vagal nucleus produce a bradycardia in the atenolol-pretreated anaesthetized rat. *Br. J. Pharmacol.*, 104(2): 466-470.
- Stephen, J., McPhee, W., Ganong, F., (2006). Pathophysiology of disease: An introduction to clinical medicine. *Mc-Graw Hill Professional*, 784 p.
- Sumiyoshi, T., Ichikawa, J., Meltzer, H.Y., (1997). The effect of streptozotocin-induced diabetes on dopamine<sub>2</sub>, serotonin<sub>1A</sub> and serotonin<sub>2A</sub> receptors in the rat brain. *Neuropsychopharmacology.*, 16(3):183-190.
- Takahashi, T., Hisa, H., Satoh, S., (1992). Serotonin induced vasoconstriction in dog kidney. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 20(5): 779-784.
- Takahashi, T., Yano, M., Minami, J., Haraguchi, T., Koga, N., Higashi, K., Kobori, S., (2002). Sarpogrelate hydrochloride, a serotonin<sub>2A</sub> receptor antagonist, reduces albuminuria in diabetic patients with early-stage diabetic nephropathy. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 58: 123-129.
- Takeda, Y., Miyamori, Y., Yoneda, T., Takeda, R., (1991). Production of endothelin-1 from the mesenteric arteries of streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci.*, 48: 2553-2556.
- Takiguchi, Y., Satoh, H., Hashimoto Nakashima, M., (1998). Changes in vascular reactivity in experimental diabetic rats: comparison with hypothyroid rats. *Blood vessels.*, 25: 250-260.

- The Expert Committee On The Diagnosis And Classification Of Diabetes Mellitus, (2000). Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, S4-S19.
- The Expert Committee On The Diagnosis and Classification Of Diabetes Mellitus. (1997). Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of *Diabetes Mellitus*. *Diabetes Care*, 20, 1183-1197.
- Terron, J.A., Falcon-Neri, A., (1999). Pharmacological evidence for the 5-HT<sub>7</sub> receptor mediating smooth muscle relaxation in canine cerebral arteries. *Br. J. Pharmacol.*, 127: 609-616.
- Tesfamariam, B., Jakubowski, J.A., Cohen, R.A., (1989). Contraction of diabetic rabbit aorta caused by endothelium-derived PGH<sub>2</sub>-TXA<sub>2</sub>. *Am. J. Physiol.*, 257: H1327-H1333.
- Thorson, A.H., (1958). Studies on carcinoid disease. *Acta Med. Scand. Suppl.*, 334: 111-132.
- Tian, R.X., Kimura, S., Kondou, N., Fujisawa, Y., Zhou, M.S., Yoneyama, H., Kosaka, H., Rahman, M., Nishiyama, A., Abe, Y., (2002). DOI, a 5-HT<sub>2</sub> receptor agonist, induces renal vasodilation via nitric oxide in anesthetized dogs. *Eur. J. Pharmacol.*, 437(1-2): 79-84.
- Tolins, J.P., Shultz, P.J., Raji, L., Brown, D.M., Mauer, S.M., (1993) Abnormal renal hemodynamic response to reduced renal perfusion pressure in diabetic rats: role of NO. *Am J Physiol.*, 265(6 Pt 2):F886-895.
- Tonini, M., Coccini, T., Onori, L., Candura, S.M., Rizzi, C.A., Manzo, L., (1992). The influence of neuronal 5-hydroxytryptamine receptor antagonists on non-cholinergic ganglionic transmission in the guinea-pig enteric excitatory reflex. *Br. J. of Pharmacol.*, 107: 5-7.
- Tonini, M., Rizzi, C.A., Manzo, L., Onori, L., (1991). Novel enteric 5-HT<sub>4</sub> receptors and gastrointestinal prokinetic action. *Pharmacol. Res.*, 24(1): 5-14.
- Trincavelli, M.L., Cuboni, S., Montali, M., Santaguida, S., Lucacchini, A., Martini, C., (2008). Norepinephrine-mediated regulation of 5HT<sub>1</sub> receptor functioning in human platelets. *Neurochem. Res.*, 33(7): 1292-1300.
- Turner, E.H., Loftis, J.M., Blackwell, A.D., (2006). Serotonin a la carte: Supplementation with the serotonin precursor 5-hydroxytryptophan. *Pharmacol. Ther.*, 109: 325-338.
- Twarog, B.M., Page, I.H., (1953). Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am. J. Physiol.*, 175(1): 157-161.
- Ullmer, C., Schmuck, K., Kalkman, H.O., Lubbert, H., (1995). Expression of serotonin receptor mRNAs in blood vessels. *FEBS. Lett.*, 370: 215-221.
- Valentin, J.P., Bonnafous, R., John, G.W., (1996). Influence of the endothelium and nitric oxide on the contractile responses evoked by 5-HT<sub>1D</sub> receptor agonists in the rabbit isolated saphenous vein. *Br. J. Pharmacol.*, 119(1): 35-42.
- Van Etten, R.W., de Koning, E.J., Verhaar, M.C., Gaillard, C.A., Rabelink, T.J., (2002). Impaired NO-dependent vasodilation in patients with Type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus is restored by acute administration of folate. *Diabetologia.*, 45(7): 1004-1010.
- Van Nueten, J.M., Janssens, W.J., Vanhoutte, P.M., (1985a). Serotonin and vascular smooth muscle, in: Serotonin and the Cardiovascular System. Ed. P.M. Vanhoutte (Raven Press), pg. 95.

- Van Nueten, J.M., Janssens, W.J., Vanhoutte, P.M., (1985b). Serotonin and vascular reactivity. *Pharmacol. Res. Commun.*, 17: 585-608.
- Vanhoutte, P.M., (1981). Pharmacology of the blood vessel wall. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 3(6): 1359-1369.
- Vanhoutte, P.M., (1983). 5-hydroxytryptamine and vascular disease. *Fed. Proc.*, 42(2): 233-237.
- Vanhoutte, P.M., (1987a). Endothelium and responsiveness of vascular smooth muscle. *J. Hypertens. Suppl.*, 5(5): S115-120.
- Vanhoutte, P.M. (1987b). Cardiovascular effects of serotonin. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 10(3), S8-S11.
- Vanhoutte, P.M., (2000). Say NO to ET. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 81: 271-277.
- Vanhoutte, P.M., Houston, D.C., (1985). Platelets, endothelium, and vasospasm. *Circulation.*, 72: 728-734.
- Van Zwieten, P.A., Blauw, G.J., van Brummelen, P., (1992). Serotonergic receptors and drugs in hypertension. *Pharmacol Toxicol.*, 70: S17-22.
- Veelken, R., Hilgers, K.F., Hartner, A., Haas, A., Bohmer, K.P., Sterzel, R.B., (2000). Nitric oxide synthase isoforms and glomerular hyperfiltration in early diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 11(1): 71-79.
- Verbeke, M., Smöllich, B., Van de Voorde, J., De Ridder, L., Lameire, N., (1996). Beneficial influence of ketanserin on autoregulation of blood flow in post-ischemic kidneys. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 7(4): 621-627.
- Verbeuren, T.J., Mennecier, P., Laubine, M., (1991). 5-Hydroxytryptamine-induced vasodilatation in the isolated perfused rat kidney: are endothelial 5-HT<sub>1A</sub> receptors involved ?. *Eur. J. Pharmacol.*, 201:17-27.
- Verbeuren, T.J., (1993). Vasodilator effect of tertatolol in isolated perfused rat kidney: involvement of endothelial 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Cardiology.*, 83(1): 5-9.
- Verheggen, R., Hundeshagen, A.G., Browin, A.M., Schindler, M., Kaumann, A.J., (1998). 5-HT<sub>1B</sub> receptor-mediated contractions in human temporal artery: evidence from selective antagonists and 5-HT receptor mRNA expression. *Br. J. Pharmacol.*, 117: 283-289.
- Verheggen, R., Meier, A., Werner, I., Wienekamp, A., Kruschat, T., Brattelid, T., Olav Levy, F., Kaumann, A., (2004). Functional 5-HT receptors in human occipital artery. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 369: 391-401.
- Villalón, C.M., Centurión, D., del Mar Fernández, M., Morán, A., Sánchez-López, A., (1999). 5-Hydroxytryptamine inhibits the tachycardia induced by selective preganglionic sympathetic stimulation in pithed rats. *Life Sci.*; 64(20):1839-47.
- Villalón, C.M., Centurión, D., (2007). Cardiovascular responses produced by 5-hydroxytryptamine: a pharmacological update on the receptors/mechanisms involved and therapeutic implications. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. of Pharmacol.*, 376: 45-63.
- Villalón, C.M., Contreras, J., Ramírez-San Juan, E., Castillo, C., Perusquia, M., Lopez-Munoz, F.J., Terrón, J.A., (1995a). 5-hydroxytryptamine inhibits pressor responses to preganglionic sympathetic nerve stimulation in pithed rats. *Life. Sci.*, 57: 803-812.

- Villalón, C.M., Contreras, J., Ramírez-San Juan, E., Castillo, C., Perusquia, M., Terrón, J.A., (1995b). Characterization of prejunctional 5-HT receptors mediating inhibition of sympathetic vasopressor responses in the pithed rats. *Br. J. Pharmacol.*, 116: 3330-3336.
- Villalón, C.M., Contreras, J., Ramírez-San Juan, E., Terrón, J.A., (1995c). 5-HT receptors mediating inhibition of pressor responses to electrical sympathetic stimulation in pithed rats. *Br. J. Pharmacol.*, 114: P161.
- Villalón, C.M., De Vries, P., Saxena, P.R., (1997). Serotonin receptor as cardiovascular targets. *Drug. Discov. Today*, 2: 294-300.
- Villalón, C.M., Terrón, J.A., Hong, E., Saxena, P.R. (1993). Efectos cardiovasculares de agonistas y antagonistas de los receptores a la serotonina (Parte 1). *Arch. Inst. Cardiol. Mex.*, 63, 441-447.
- Villalón, C.M., López-Muñoz, F.J., Perusquia, M., Terrón, J.A., (1998). External carotid effects of 2-(2-aminoethyl)-quinoline (D-1997) in vagosympathectomized dogs. *Eur. J. Pharmacol.*, 356(1): 15-23.
- Walshe, J.J., Venuto, R.C., (1979). Acute oliguric renal failure induced by indomethacin: possible mechanism. *Ann. Intern. Med.*, 91(1): 47-49.
- Walther, D.J., Peter, J.U., Bashammakh, S., Hortnagl, H., Voits, M., Fink, H., Bader, M., (2003). Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science*, 299: 276.
- Wang, Y., Ramage, A.G., Jordan, D., (1998). Presynaptic 5-HT<sub>3</sub> receptors evoke an excitatory response in dorsal vagal preganglionic neurone in anaesthetized rats. *J. Physiology*, 509: 683-694.
- Watts, S.W., Thompson, J.M., (2004). Characterization of the contractile 5-hydroxytryptamine receptor in the renal artery of the normotensive rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 309: 165-172.
- Weinshank, R.L., Zgombick, J.M., Macchi, M.J., Branchek, T.A., Hartig, P.R., (1992). Human serotonin 1D receptor is encoded by a subfamily of two distinct genes: 5-HT<sub>1Dα</sub> and 5-HT<sub>1Dβ</sub>. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA.*, 89: 3630-3634.
- Westbroek, I., Van Der Plas, A., De Rooij, K.E., Klein-Nulend, J., Nijweide, P.J., (2001). Expression of serotonin receptors in bone. *J. Biol. Chem.*, 276: 28961-28968.
- Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., King, H., (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 27(5): 1047-1053.
- Wintersteiner, O., Vignesud, V., Du and Jensen, H., (1928). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 32: 397-411.
- Wozniak, K.M., Linnoila, M., (1991). Hyperglycemic properties of serotonin receptor antagonists. *Life. Sci.*, 49: 101-109.
- Wurch, T., Copaert, F.C., Pauwels, P.J., (1998). Chimeric receptor analysis of the ketanserin binding site in the human 5-Hydroxytryptamine<sub>1D</sub> receptor: importance of the second extracellular loop and fifth transmembrane domain in antagonist binding. *Mol. Pharmacol.*, 54: 1088-1096.
- Yamada, J., Sugimoto, Y., Kimura, I., Takeuchi, N., Horisaka, K., (1989). Serotonin-induced Serotonin-induced hypoglycemia and increased serum insulin levels in mice. *Life. Sci.*, 45(20): 1931-1936.
- Yar, A.S., Menevse, S., Alp, E., Helvacioğlu, F., Take, G., (2010). The effects of resveratrol on cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 mRNA and protein levels in diabetic rat kidneys. *Mol. Biol. Rep.*, 37(5): 2323-2331.

- Yoshioka, M., Matsumoto, M., Numazawa, R., Togashi, H., Smith, C.B., Saito, H., (1995). Changes in the regulation of 5-hydroxytryptamine release by alpha2-adrenoceptors in the rat hippocampus after long-term desipramine treatment. *Eur. J. Pharmacol.*, 294(2-3): 565-570.
- Yusuf, S., Al-Saady, N., Camm, A.J., (2003). 5-hydroxytryptamine and atrial fibrillation: how significant is this piece in the puzzle. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.*, 14(2): 209-214.
- Zhang, X., Beaulieu, J.M., Sotnikova, T.D., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., (2004). Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis. *Science.*, 305: 217.