

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA

UNIVERSITÉ LOUIS PASTEUR

FACULTÉ DE MÉDECINE

**LAB. PHARMACOLOGIE ET PHYSIOLOGIE
RÉNOVASCULAIRES**



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

Mónica García Domingo

2005

UNIVERSITE LOUIS PASTEUR, Strasbourg, France
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA, España

Laboratoire de Physiologie et Pharmacologie Rénovasculaires (EMI, INSERM 0015)
Laboratorio de Farmacognosia y Farmacología ; Dpto. Fisiología y Farmacología

THESE EN COTUTELLE

présentée pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR DE STRASBOURG
ET
DOCTOR EN FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

Discipline: **Sciences du Vivant**
Domaine: **Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie**

Par

Mónica GARCIA DOMINGO
(DEA par l'Université de Salamanca)

*INFLUENCE DU DIABETE SUCRE EXPERIMENTAL SUR
LA REPONSE CARDIOVASCULAIRE ET RENALE A LA
SEROTONINE*

SOUTENUE LE 18 MARS 2005 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN :

Pour l'Université Louis Pasteur

V. SCHINI-KERTH	Rapporteur interne
J.M. LOPEZ-NOVOA	Rapporteur externe
J.P. DE LA CRUZ CORTES	Rapporteur externe
M. BARTELMEBS	Directeur de thèse
L. SAN ROMÁN	Directeur de thèse

Pour l'Universidad de Salamanca

J.M. LOPEZ-NOVOA	Presidente
J.P. DE LA CRUZ CORTES	1 ^{er} Vocal
V. SCHINI-KERTH	2 ^{er} Vocal
C. VELASCO	3 ^{er} Vocal
M.A. SEVILLA	Secretario

DIRECTEURS DE THESE:

M. BARTHELMEBS, A. MORAN, M.L. MARTIN, L. SAN ROMAN

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Fisiología
y Farmacología



UNIVERSITÉ LOUIS PASTEUR
FACULTÉ DE MÉDECINE
Lab. de Pharmacologie et Physiologie
Rénovasculaires



INFLUENCIA DE LA DIABETES
EXPERIMENTAL EN RESPUESTAS
SEROTONÉRGICAS A NIVEL
CARDIOVASCULAR Y RENAL

Mónica García Domingo

2005

Memoria que para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca y la

Pasteur de Strasbourg, presenta **Mónica García Domingo**



Salamanca, Enero 2005

Bº del Director del Departamento

Salamanca, Enero, 2005

o.: José Juan García Marín

Los Doctores D. Luis San Román del Barrio, Dña. M^a Luisa Martín Calvo, Dña. Asunción Morán Benito y
Dña. Mariette Barthelmebs,

CERTIFICAN,

Que la presente Tesis Doctoral, realizada por la Licenciada en Farmacia **Mónica García Domingo**, ha sido desarrollada bajo su dirección, en régimen de cotutela entre la Universidad de Salamanca y la Universidad Louis Pasteur de Strasbourg, El desarrollo experimental se ha realizado alternativamente en el Laboratorio de Farmacognosia y Farmacología del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Farmacia de Salamanca, y en el Laboratoire de Pharmacologie et Physiologie Renovasculaires de la Faculté de Médecine de Strasbourg, y considerándolo finalizado, autorizan su presentación para que sea juzgada por el tribunal correspondiente.

Salamanca, enero de dos mil cinco

Fdo.: Luis San Román

Fdo.: M^a Luisa Martín

Fdo.: Asunción Morán

Fdo.: Mariette Barthelmebs

A mi padre, Alfredo
A mi primo, Jose Antonio

A mi madre, Sara
A mi hermana, Ana Belén

*“Caminante, son tus huellas el camino, y nada más;
caminante, no hay camino, se hace camino al andar.
Al andar se hace camino y al volver la vista atrás
se ve la senda que nunca se ha de pisar.
Caminante no hay camino, sino estelas en la mar”*
(Antonio Machado)

Ufff...tanto que agradecer, y a tanta gente, que se hace difícil comenzar a escribir. Solamente que espero que todos los que habéis estado a mi lado en este tiempo quedéis reflejados.

Al Dr. D. Luis San Román por permitirme, hace ya unos años, iniciar en su laboratorio la vida de investigadora, y porque desde mi comienzo ha tenido una constante preocupación, tanto por mí como por mi trabajo.

Al Dr. Jean-Jacques Helwig que aceptó que realizará una estancia breve en su laboratorio, y que posteriormente permitió que continuara con una ilusión, ahora casi cumplida, un proyecto de Tesis Doctoral en cotutela0.

A las Dras. María Luisa Martín Calvo, Asunción Morán Benito y Mariette Barthelmebs, que han sido durante estos años muchos más que mis directoras de Tesis; ellas lo saben, han guiado mi camino en la investigación, pero también han aguantado mis angustias, me han sabido aconsejar, ayudar...y con las que también he compartido momentos de alegría y distensión, tanto dentro como fuera del laboratorio, (...je vous remercie pour votre soutien).

A los Dres. Rosalía Carrón, M^a José Montero, Ana Vega Ortiz de Urbina, M^a Angeles Sevilla y Thierry Massfelder porque todos los días, con una sonrisa, preguntan cómo van las cosas. A María José Cavero, a Javier y a Danielle porque han tenido siempre todos los productos y papeleos a punto cuando los he necesitado, (...pour demander chaque matin, avec un sourire, comment ça va).

A mis compañeros de los dos laboratorios, tanto los que continúan trabajando en ellos como los que ya se fueron, Mar, Felipe, Noelia, M^a Jesús, Miriam, Carmen, Sylvie, Sandra, Eric, Isabelle y Héléne porque han dado esa nota de color a los ratillos de café y charlas de “collègues”.

A Elena Calama, Estela, Eva, Virginie, Anne-Cécile, Samuel y Marion, a los que un día cuando llegue a los laboratorios conocí como investigadores pero que, posteriormente, me hicieron un huequito en su vida y que me han dado su amistad y apoyo durante estos años...ellos saben lo que las aprecio (...vous savez comment je vous apprécie).

A Sanse, César, Javi, Carlos, Javichi, Fran, Pilar, Reyes, Ana, Cécile, Silvia, Tristan, Tito y todos mis amigos porque en estos años han sabido aguantarme, llamarme y escucharme, por esas “soirées” interminables, por esos “pinchos y tapas”...por las risas diarias que hemos tenido; muy especialmente a Jorge que en estos últimos tiempos está siendo un gran apoyo para mí.

A mis infinitos compañeros de piso, sobre todo, Elena Toranzo, Aldara, Rosa, Eloína, Susana y Carmen...por esa “vida en familia” que hemos conseguido tener en Salamanca.

A mi “famille strasbourgeoise”... a mis “sobrinos franceses” Manoa, Yoann y “tous les enfants” de Tito y, por supuesto, a Louise, por aceptarme en su casa y quererme como a una hija más, de tal modo que su familia ha pasado a ser también la mía, (...pour m’aimer comme si j’étais sa fille).

A mi padre, a mi madre y a mi hermana porque “la unión hace la fuerza”, durante estos últimos años pasados hemos podido verlo. Agradecerles a ellos algo en concreto es difícil, ya que me han ofrecido siempre su apoyo incondicional en mis decisiones, me han sabido aconsejar, escuchar, y me han dado todo lo que tienen para que hoy yo este aquí. A toda mi familia y, en especial, a mis abuelas, Esther, que nos ha dejado ya, y Teresa.

Muchas gracias a todos por quererme tal y como soy, por apoyarme y por confiar en mí.

A = Adrenalina	L-NAME = Metiléster de L-arginina
Ach = Acetilcolina	L-NNA = N- ω -nitro-L-arginina
AD = Aldehído deshidrogenasa	LSD = Dietilamina del ácido lisérgico
ADN = Ácido desoxiribonucleico	M = Mujer
AMPc = Adenosín monofosfato cíclico	MAO = Monoaminooxidasas
Ang II = Angiotensina II	MDMA = Metilendioximetanfetamina
ANOVA = Análisis de la varianza	NA = Noradrenalina
ARN = Ácido ribonucleico	NADPH = Nicotín adenosín difosfato
ASP/ARG = Aspartato/Arginina	NO = Óxido nítrico
Bmax = Densidad máxima (de receptores)	NOS = Óxido nítrico sintasa
bp = Pares de bases	iNOS = Óxido nítrico sintasa inducible
CE₅₀ = Concentración eficaz 50	nNOS = Óxido nítrico sintasa neuronal
COX = Ciclooxygenasa	NPNa = Nitroprusiato de sodio
DA = Dopamina	ODQ = 1H-[1,2,4]Oxadiazol[4,3-a]quinoxalin-1-ona
DM = Diabetes mellitus	PCR = Reacción de polimerización en cadena
DMSO = Dimetilsulfóxido	PGH₂ = Prostaglandina H ₂
ECA = Enzima convertidora de angiotensina	PGI₂ = Prostaciclina
EDCF = Factores constrictores derivados de endotelio	PKC = Fosfocinasa C
EDHF = Factor de hiperpolarización derivado de endotelio	PLC = Fosfolipasa C
EDRF = Factores relajantes derivados de endotelio	PAM = Presión arterial media
E_{max} = Efecto máximo	ppm = Pulsos por minuto
eNOS = Óxido nítrico sintasa endotelial	RT = Transcripción inversa
FC = Frecuencia cardiaca	s.c. = Subcutáneo
FE = Fenilefrina	sem = Error estándar de la media
GAPDH = Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	SN = Sistema nervioso
GMPC = Guanosín monofosfato	SNC = Sistema nervioso central
GPCRs = Receptores acoplados a proteínas G	SRII = Inhibidor de la recaptación de serotonina
H = Hombre	TGF = Factor de crecimiento tumoral
5-HIAA = Ácido 5-hidroxiindolacético	TH = Triptófano hidroxilasa
i.p. = Intraperitoneal	TXA₂ = Tromboxano A ₂
i.v. = Intravenoso	UI = Unidades internacionales
IP₃ = Inositol trifosfato	VIP = Péptido intestinal vasoactivo
KO = "Knock-out", con eliminación de..	VSMC = Células de músculo liso vascular
LAAD = Descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos	
LCR = Líquido cefalorraquídeo	

Agonistes	Type/subtype de récepteur	Antagonistes	Type/subtype de récepteur
5-HT	Tous les récepteurs 5-HT	Methiothepin	5-HT _{1,2,5,6,7}
5-CT	5-HT _{1,7}	Ritansérine	5-HT ₂
α-methyl-5-HT	5-HT ₂	Mesulergine	5-HT ₇
1-phenylbiguanide	5-HT ₃	MDL-72222	5-HT ₃
8-OH-DPAT	5-HT _{1A}	WAY-100,635	5-HT _{1A}
CGS-12066B	5-HT _{1B}	BRL-15572	5-HT _{1D}
L-694,247	5-HT _{1D}	AGONISTES ET ANTAGONISTES SÉROTONÉRGIQUES	
DOI	5-HT ₂		
BW723C86	5-HT _{2B}		
<i>m</i> -CPP	5-HT _{2C}		

Agonistas	Tipo/subtipos de receptor	Antagonistas	Tipo/subtipo de receptor
5-HT	Todos los receptores 5-HT	Metiotepina	5-HT _{1,2,5,6,7}
5-CT	5-HT _{1,7}	Ritanserina	5-HT ₂
α-metil-5-HT	5-HT ₂	Mesulergina	5-HT ₇
1-fenilbiguanida	5-HT ₃	MDL-72222	5-HT ₃
8-OH-DPAT	5-HT _{1A}	WAY-100,635	5-HT _{1A}
CGS-12066B	5-HT _{1B}	BRL-15572	5-HT _{1D}
L-694,247	5-HT _{1D}	AGONISTAS Y ANTAGONISTAS SEROTONÉRGICOS	
DOI	5-HT ₂		
BW723C86	5-HT _{2B}		
<i>m</i> -CPP	5-HT _{2C}		

Autres produits utilisés	Actions
Indométacine	Inhibiteur de la voie de la cyclo-oxygenase (COX)
Glibenclamide	Inhibiteur des canaux K ⁺ -ATP dépendants
L-NNA	Inhibiteur de la NO synthase
L-NAME	Inhibiteur de la NO synthase
ODQ	Inhibiteur de la guanylyl cyclase

Otros compuestos utilizados	Acciones
Indometacina	Inhibidor de las ciclooxigenasas (COX)
Glibenclamida	Inhibidor de canales de K ⁺ -ATP dependientes
L-NNA	Inhibidor de la óxido nítrico sintasa
L-NAME	Inhibidor de la óxido nítrico sintasa
ODQ	Inhibidor de la GC

----- *Indice* -----

INTRODUCCIÓN	3
I.- 5-Hidroxitriptamina	3
1.- Apuntes históricos	3
2.- Localización, síntesis y degradación	4
3.- Receptores serotoninérgicos y mecanismos de acción	6
4.- Acciones farmacológicas de 5-HT	18
5.- Interacción sistema serotoninérgico-adrenérgico-colinérgico	21
6.- Receptores serotoninérgicos-cardiovascular	24
II.- Diabetes	29
1.- Páncreas e insulina	32
2.- Complicaciones de la diabetes	35
III.- Serotonina, diabetes y sistema cardiovascular	40
OBJETIVOS	47
MATERIAL Y MÉTODOS	53
I.- Inducción de la diabetes experimental	54
II.- Estudios <i>in vivo</i>: Ratas desmeduladas	57
1.- Estimulación simpática	58
1.1.- Preparación del animal	58
1.2.- Protocolo experimental	59
1.2.1.- Ratas normoglucémicas	59
1.2.2.- Ratas hiperglucémicas	62
2.- Estimulación colinérgica	69
2.1.- Preparación del animal	69
2.2.- Protocolo experimental	70
2.2.1.- Ratas hiperglucémicas	70
III.- Estudios <i>in vitro</i>: Riñón aislado perfundido	75
1.- Estudio de las respuestas vasoconstrictoras	78
1.1.- Ratas normoglucémicas	78
1.2.- Ratas hiperglucémicas	79

2.- Estudio de las respuestas vasodilatadoras	79
2.1.- Ratas normoglucémicas	80
2.2.- Ratas hiperglucémicas	81
IV.- Técnicas de biología molecular (RT-PCR)	84
1.- Aislamiento de vasos sanguíneos	84
2.- Extracción del ARN	84
3.- Síntesis del ADNc por transcripción inversa	85
4.- Amplificación del ADNc por PCR	85
RESULTADOS	91
I.- Diabetes inducida por estreptozotocina o aloxano	91
II.- Estimulación simpática	99
1.- Comprobación de acciones serotoninérgicas en ratas normoglucémicas	100
2.- Acciones serotoninérgicas en ratas hiperglucémicas	105
3.- Mecanismos indirectos implicados en las acciones de serotonina en ratas normoglucémicas	133
4.- Mecanismos indirectos implicados en las acciones de serotonina en ratas hiperglucémicas	153
III.- Estimulación colinérgica	173
1.- Ratas hiperglucémicas	173
IV.- Riñón aislado perfundido	191
1.- Características del riñón aislado perfundido de rata	191
2.- Respuestas vasculares renales inducidas por 5-HT y agonistas 5-HT ₂	191
3.- Respuestas vasodilatadoras renales por Ach, NPNa y agonistas 5-HT ₁	192
4.- Diabetes inducida por estreptozotocina	195
5.- Efecto agudo de 10 mM de glucosa	195
6.- Influencia de la diabetes en las respuestas vasoconstrictoras renales	196
7.- Influencia de la diabetes en las respuestas vasodilatadoras renales	196
V.- RT-PCR cuantitativa	217
DISCUSIÓN	225

	<i>Índice</i>
CONCLUSIONES	255
BIBLIOGRAFÍA	259
ANEXO: Resumen en francés	293

----- *Introducción* -----

I.- 5-HYDROXYTRYPTAMINA (5-HT)

1.- 5-Hidroxitriptamina, apuntes históricos

La 5-hidroxitriptamina (serotonina, 5-HT) es un neurotransmisor y una hormona presente en muchas especies, incluyendo al hombre, que juega un papel importante en 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.

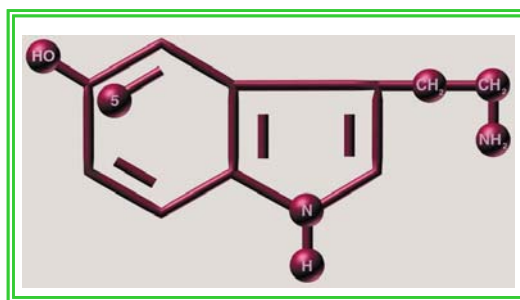


Figura 1: Estructura de la 5-hidroxitriptamina:
3-(2-aminoetil)-1H-indol-5-ol.

Fue al principio del siglo pasado cuando Brodie (1900) describió, en un estudio realizado en gato, 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 *et al.*, quienes la denominaron según su acción vascular original (*sero* = suero y *tonin* = vasoconstricción: “serotonina”).

Fue obtenida sintéticamente por primera vez por Hamlin y Fischer en 1951, siendo a mediados de esta década cuando se sugirió que podría actuar como neurotransmisor a nivel del sistema nervioso central. Aunque menos del 5% de la cantidad total de serotonina del organismo reside en el sistema nervioso central, 5-HT es un factor muy importante para el buen funcionamiento del cerebro, razón por la cual fue reconocida como sustancia neurotransmisora (Twarog y Page, 1953). 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 tiene importantes efectos conductuales.

Paralelamente, se aisló otra sustancia endógena procedente de las células enterocromafines (presente en la mucosa intestinal) a la que se denominó *enteramina* (Ersparmer y Asero, 1952). La función observada para la enteramina constituía fundamentalmente la contracción de músculo liso. Posteriores investigaciones demostraron que enteramina y serotonina eran química y farmacológicamente similares (Ersparmer, 1954).

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

Se encuentra ampliamente distribuida en los reinos animal y vegetal. En los mamíferos la podemos encontrar en células enterocromafines del tracto gastrointestinal, plaquetas, pared de los vasos sanguíneos, pulmones, corazón, etc., y en SNC, actuando como neurotransmisor.

El 95% de su síntesis ocurre a nivel periférico, concretamente a nivel intestinal, y se produce a partir de L-triptófano procedente de la dieta y que es captado por las células enterocromafines para sufrir una serie de transformaciones, dependiendo la regulación de esta síntesis, de la cantidad de triptófano disponible y de diferentes factores que controlan la actividad de la triptófano-hidroxilasa (Hills y Jessen, 1995). La combinación del grupo hidroxilo en la posición 5 del núcleo indol y una amina nitrogenada primaria actuando como aceptador de un protón del pH fisiológico, hacen de 5-HT una sustancia hidrofílica y que, por tanto, no traspasa la barrera hematoencefálica, de tal forma que los 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. Se localiza principalmente en núcleos del rafe, glándula pineal y otras neuronas (Figura 2).

La 5-HT puede ser liberada al lumen intestinal debido a estímulos nerviosos o alimentarios, e interactuar con receptores localizados en el músculo liso intestinal o ir a la circulación portal. También podemos localizarla en neuronas entéricas. En sangre, la mayor parte de 5-HT no se encuentra circulante sino almacenada en las plaquetas por un mecanismo de transporte activo (ya que ellas no son capaces de sintetizarla). Durante la agregación plaquetaria es liberada en grandes cantidades y actúa, localmente, en células endoteliales y células del músculo liso vascular. También podemos encontrarla en 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. La degradación se produce principalmente por las MAO (monoaminooxidasas).

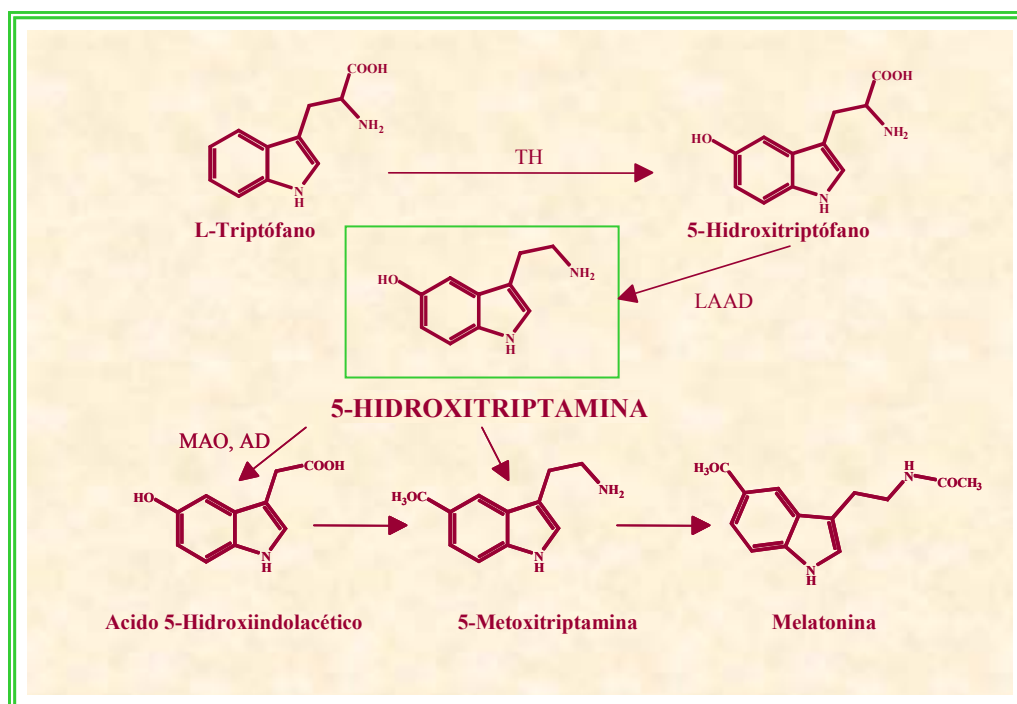


Figura 2: Biosíntesis y metabolismo de 5-HT.

3.- Receptores serotoninérgicos y mecanismos de acción

La clasificación y nomenclatura de los receptores serotoninérgicos 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.

A finales de los años 50, Gaddum y Picarelli encontraron indicios de más de un tipo de receptores para serotonina, de acuerdo, por un lado, con diferentes tipos de antagonismos de dibenzilina y morfina frente a la acción de 5-HT en músculo liso de íleon de cobaya, y por otro lado, con la liberación de acetilcolina. De este modo, los receptores fueron inicialmente denominados 5-HT-D (musculotrópicos), localizados en el músculo esquelético y 5-HT-M (neurotrópicos), localizados en ganglios parasimpáticos y que mediaban la liberación de acetilcolina en terminaciones nerviosas postsinápticas; ésta fue la primera evidencia de la existencia de diferentes tipos de receptores para serotonina.

La introducción de las 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-HT₁ y 5-HT₂), según la preferencia de unión, en homogenado de cerebro, por [³H]5-HT o [³H]espiperona respectivamente.

En 1986, Bradley *et al.*, propusieron una clasificación y nomenclatura diferente para los receptores de 5-HT, en la que se identificaron tres subtipos distintos de receptores: a) “5-HT₁-like” que tenían gran afinidad por 5-carboxamidotriptamina y podían unirse a [³H]5-HT; b) 5-HT₂ que eran idénticos a los anteriormente caracterizados como 5-HT-D y que tenían gran afinidad por ketanserina; c) 5-HT₃, cuyo mecanismo de transducción está asociado a canales iónicos y corresponden a los anteriormente caracterizados como 5-HT-M.

Sin embargo, la introducción de 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. Se han identificado y caracterizado nuevos receptores de 5-HT, que a veces han sido nombrados de diferente forma por distintos grupos de investigación (Ej.: los receptores 5-HT_{1B} también conocidos como 5-HT_{1Dβ} o S12) (Levy *et al.*, 1992; Weinshank *et al.*, 1992).

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) basándose en criterios estructurales (estructura molecular), operacionales (agonistas) y transduccionales (mecanismo de transducción intracelular) y establecieron la existencia de siete clases de receptores diferentes: 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃ y 5-HT₇ (bien caracterizados), 5-HT₄ (no clonados), 5-HT₅ y 5-HT₆ (clonados pero cuyas características operacionales y transduccionales no se conocen). Ha sido a esta clasificación de Hoyer *et al.* (1994) a la que se ha adaptado la nueva información obtenida de estudios con receptores recombinantes y nativos. De este modo y de acuerdo con esta clasificación, un receptor se nombrará con letras mayúsculas cuando sus características estructurales y operacionales se hayan definido bien y se haya establecido como receptor endógeno; los que no cumplan este criterio se nombrarán con letras minúsculas.

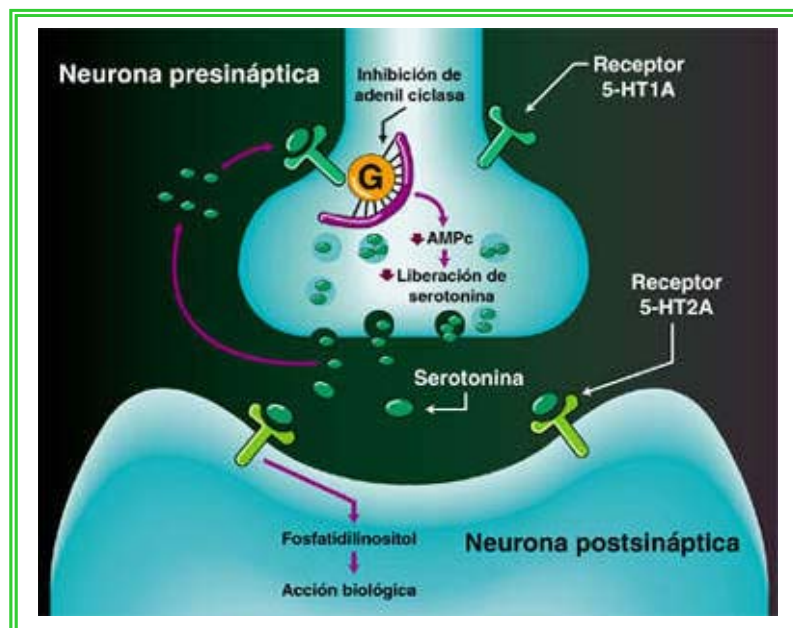


Figura 3: Sinapsis serotoninérgica.

Básicamente, todos los receptores de serotonina, a excepción de los receptores 5-HT₃ (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 estos 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. También está claro que los sitios de unión para los diferentes agonistas y antagonistas están localizados en las regiones transmembrana (α -hélices) de la proteína, hecho que ya se ha observado por técnicas de mutagénesis y receptores quiméricos (Adham *et al.*, 1994; Oksenberg *et al.*, 1992; Wurch *et al.*, 1998).

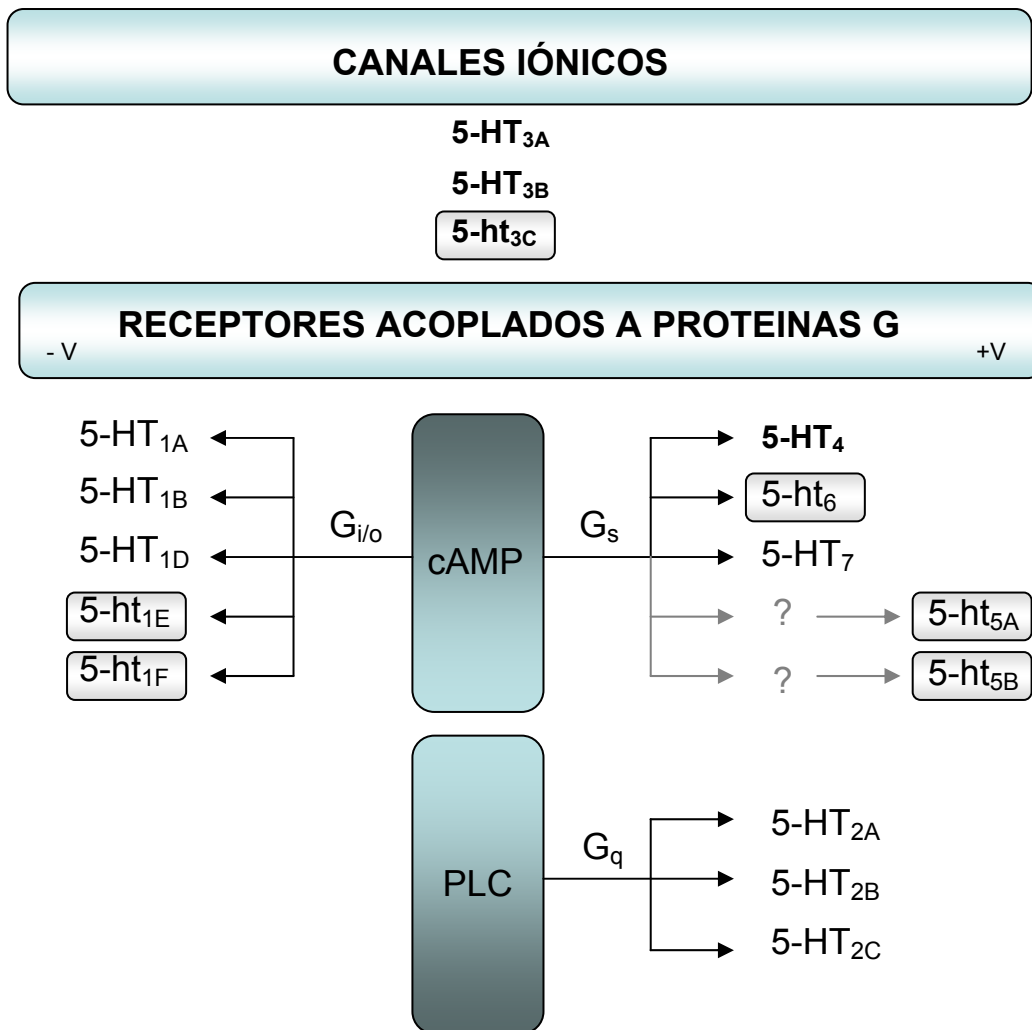


Figura 4: Representación esquemática de la clasificación de receptores de 5-HT. Los receptores representados en minúscula no tienen una función fisiológica determinada. 3'-5'-adenosin monofosfato ciclico (cAMP); fosfolipasa C (PLC); positiva (+V); negativa (-V) (Hanon y Hoyer, 2002).

Los receptores de 5-HT activan, bien a la enzima adenilato ciclasa [que promueve la producción de adenosin monofosfato cíclico (AMP_c)], bien a la fosfolipasa C [que promueve la producción de inositol trifosfato (IP_3)] y aumenta el calcio intracelular [Ca^{2+}_i] o bien a canales iónicos (como por ejemplo canales de potasio). 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).

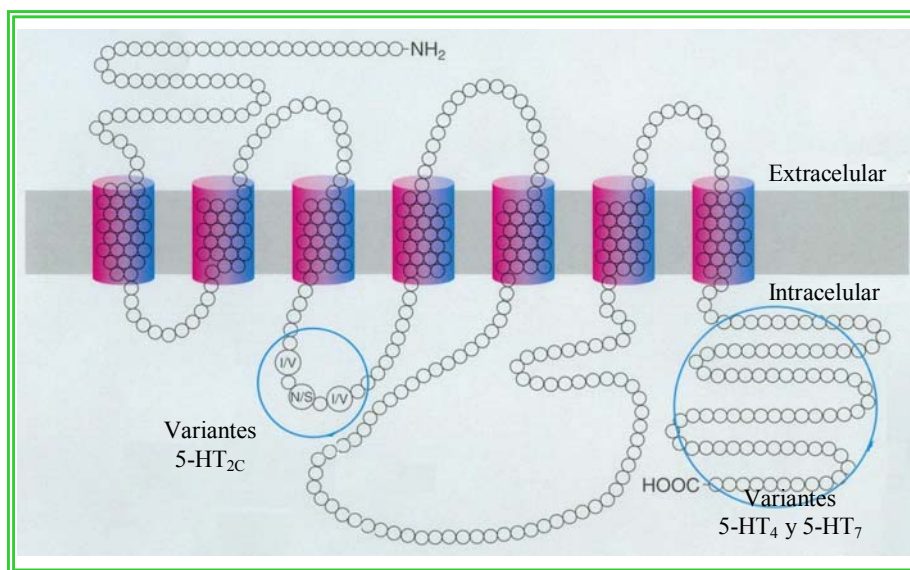


Figura 5: Estructura general de receptores serotoninérgicos 5-HT_{1,2,4} y 7, 5-HT₅ y 5-HT₆ (tomado de Martin y Eglén, 1998).

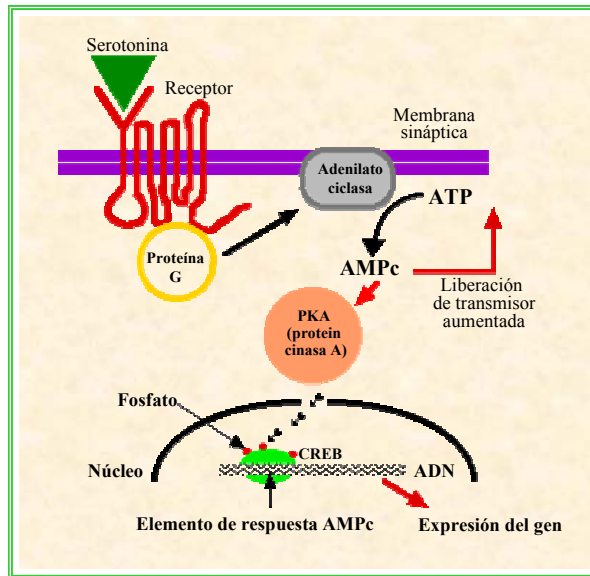


Figura 6: Representación esquemática de la señal de transducción de un receptor serotoninérgico acoplado a proteínas G con 7 dominios transmembrana.

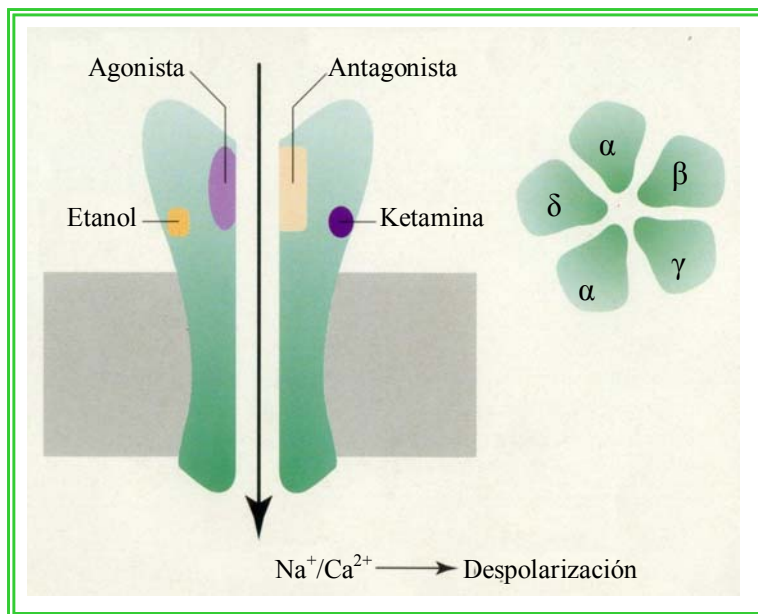


Figura 7: Estructura del receptor serotoninérgico 5-HT₃ (tomado de Martin y Eglén, 1998).

3.1.- Receptores 5-HT₁

Los receptores 5-HT₁ comprenden cinco subtipos diferentes de receptores, que comparten entre 41-63% de la secuencia genética, y están acoplados a proteínas G_i/G_o que inhiben la formación de cAMP. Uno de ellos, es el receptor 5-HT_{1E}, cuya denominación en minúscula indica que aunque el gen que codifica para este receptor ha sido identificado su papel fisiológico no ha sido aún bien definido. En contraste, los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} y 5-HT_{1D} han sido encontrados en una gran variedad de tejidos. Existen agonistas y antagonistas específicos para 5-HT_{1A} y en la actualidad se están desarrollando nuevos compuestos capaces de discriminar entre los subtipos 5-HT_{1B} y 5-HT_{1D}, siendo esta tarea difícil debido a la identidad farmacológica tan próxima que poseen. Únicamente en roedores ha sido posible diferenciar la farmacología de 5-HT_{1B} y 5-HT_{1D} debido a que 5-HT_{1B} en estas especies exhibe una farmacología única como resultado de una mutación en ASP₁₂₃/ARG₁₂₃.

3.2.- Receptores 5-HT₂

Comprende esta familia tres subtipos de receptores diferentes, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C} que comparten entre 46-50% de su secuencia genética, y se acoplan preferentemente a G_q/G₁₁ para aumentar la hidrólisis de inositol trifosfato y aumentar el calcio citosólico. De estos tres subtipos, los receptores 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C} 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.

3.3.- Receptores 5-HT₃

El receptor 5-HT₃ es el único miembro de esta familia de receptores que pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a canales iónicos. 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 α y β subunidades en las que sólo un 41% de la secuencia se ha clonado, considerándose también la posibilidad de que sean estructuras heteropentaméricas. La subunidad α ha sido clonada de humanos, ratas y ratones y muestra similitud con el receptor nicotínico de acetilcolina.

3.4.- Receptores 5-HT₄, 5-ht₅, 5-HT₆ y 5-HT₇

Todos ellos se unen preferentemente a proteínas G_s 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. Es importante decir que los dos subtipos de receptores 5-ht₅: 5-ht_{5A} y 5-ht_{5B} comparten más del 70% de la secuencia aminoacídica en roedores, pero todavía no se ha encontrado una función fisiológica en humanos. En la actualidad existen agonistas selectivos de receptores 5-HT₄, así como agonistas y antagonistas selectivos de receptores 5-HT₆ y 5-HT₇. Para 5-ht₅ aún no se han encontrado ligandos selectivos.

3.5.- Otros receptores de 5-HT: receptores huérfanos y otras isoformas

Existen algunos receptores de 5-HT que han sido definidos farmacológicamente pero para los cuales no se ha identificado el gen que los codifica. Como su estructura es desconocida, estos receptores se denominan como huérfanos en la nomenclatura actual. Uno de estos tipos, sin embargo, es el denominado “5-HT_{1-like}” que produce vasodilatación y que se corresponde con los 5-HT₇.

Desde que en 1994, Hoyer *et al.* propusieran la clasificación de receptores para serotonina en la que se basa la actual realizada por la IUPHAR, el conocimiento de estos receptores no ha evolucionado, como es el caso de los receptores 5-HT_{1P}, que están presentes en intestino y cuya farmacología es similar a la de los 5-HT₄, pero que a

diferencia de estos últimos son activados por ligandos como los dipéptidos 5-HT (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_{2C}, cuatro variantes funcionales del receptor 5-HT₇ (5-HT_{7(a)}-5-HT_{7(d)}) y cuatro variantes funcionales para el receptor 5-HT₄ (5-HT_{4(a)}-5-HT_{4(d)}). Aunque todas estas isoformas no presentan grandes diferencias en cuanto a características operacionales, están distribuidas en diferentes zonas, tanto a nivel central como a nivel periférico.

Se sigue especulando 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.

Tipo Receptor	5-HT₁				
Subtipo	5-HT _{1A}	5-HT _{1B}	5-HT _{1D}	5-HT _{1E}	5-HT _{1F}
Nombre previo		5-HT _{1Dβ}	5-HT _{1Dα}	5-HT _{1Eα}	5-HT _{1Fβ} 5-HT ₆
Localización central	Hipocampo, núcleo del rafe, septum y amígdala	Hipocampo, sustancia negra, cordón espinal, rafe, estriado, globo pálido	Estriado, núcleo accumbens, rafe dorsal, hipocampo, sustancia negra, putamen, ganglios trigeminales	Putamen, córtex, tubérculo olfativo, amígdala	Córtex, tálamo, bulbo olfativo, hipocampo, cordón espinal
Localización periférica	Heterorreceptor colinérgico en plexo mientérico	Terminaciones autonómicas, VSMC	VSMC, terminaciones nerviosas	Encontrado mRNA en tejido vascular	Útero, mesenterio, VSMC
Funciones	Facilita la liberación de NA y Ach, hipotensión. Autorreceptor	Autorreceptor en hipocampo. Heterorreceptor colinérgico y adrenérgico. Contracción de músculo liso vascular	Autorreceptor a nivel central. Heterorreceptor gabaérgico y colinérgico. Media simpatoinhibición. Media vasoconstricción	No establecidas	Neuroinhibición trigeminal
Agonistas selectivos	8-OH-DPAT U92016 (+)UH301	CP93129 (roedor)	PNU109291	Ninguno	LY334370 LY334864 BRL54443
Antagonistas selectivos	WAY-100,635 (-)UH301 NAD299	GR55562 SB216641 SB236057 NAS181(roedor)	BRL15572	Ninguno	Ninguno
Localización cromosómica en humanos	5q11.2-q13	6q13	1p34.3-36.3	6q14-15	3p13-p14.1
Mecanismo de transducción	(-) AC	(-) AC	(-) AC	(-) AC	(-) AC

Tabla 1: Clasificación de receptores serotoninérgicos 5-HT₁, (VSMC = células de músculo liso vascular).

Tipo Receptor	5-HT₂		
Subtipo	5-HT _{2A}	5-HT _{2B}	5-HT _{2C}
Nombre previo	D	5-HT _{1F}	5-HT _{1C}
Localización central	Córtex, hipocampo, estriado, bulbo olfativo, cordón espinal	Cerebelo, septum lateral, hipotálamo	Plexo coroideo, médula, estriado, hipocampo, hipotálamo, cordón espinal
Localización periférica	Musculatura lisa vascular y bronquial, plaquetas, tracto gastrointestinal, endotelio	Musculatura lisa de íleon, fundus de rata, útero, vascular, endotelio	
Funciones	Vasoconstricción. Agregación plaquetaria. Broncoconstricción. Neuroinhibición	Vasodilatación endotelio dependiente vía NO. Media el efecto mitogénico de 5-HT en embriogénesis	Posible participación en la producción de transferrina. Regulación del LCR
Agonista selectivos	Ninguno	BW723C86	Ro600175
Antagonistas selectivos	Ketanserina	RS127445	RS 102221 SB242084
Localización cromosómica en humanos	13q14-q21	2q36.3-2q37.1	Xq24
Mecanismo de transducción	Incrementa hidrólisis de PI y eleva [Ca ²⁺] _i	Incrementa hidrólisis de PI y eleva [Ca ²⁺] _i	Incrementa hidrólisis de PI y eleva [Ca ²⁺] _i

Tabla 2: Clasificación de receptores serotoninérgicos 5-HT₂, (LCR = líquido cefalorraquídeo).

<i>Tipo receptor</i>	5-HT₃	5-HT₄
<i>Nombre previo</i>	M	
<i>Localización central</i>	Estriado, hipocampo, globo pálido, sustancia negra, tronco encefálico	Estriado, tronco encefálico, tálamo, hipocampo, bulbo olfativo, sustancia negra
<i>Localización periférica</i>	Neuronas simpáticas postganglionares, neuronas sensoriales	Músculo cardiaco, neuronas parasimpáticas en plexo mientérico, músculo liso vascular y esofágico
<i>Funciones</i>	Neuroexcitación simpática y parasimpática. Provoca emesis	Relajación musculatura lisa (esofágica, gastrointestinal y vascular). Incrementa la amplitud EEG. Neuroexcitación colinérgica mientérica. Aumenta la contractilidad de miocitos. Facilita la liberación de dopamina a nivel de estriado
<i>Agonistas selectivos</i>	2-Me-5-HT <i>m</i> -CPB	BIMU8 RS67506 ML10302 SC53116 RS67506
<i>Antagonistas selectivos</i>	Ondansetrona Tropisetrona Granisetrona	GR 113808 SB 204070 RS100235
<i>Localización cromosómica en humanos</i>	Subunidad A: 11q Subunidad B: 11q 23.1	5Q31-33
<i>Mecanismo transducción</i>	Asociado canales iónicos	Incrementa la formación AMPc

Tabla 3: Clasificación de receptores serotoninérgicos 5-HT₃ y 5-HT₄, (EEG = electroencefalograma).

<i>Tipo receptor</i>	5-ht₅		5-HT₆	5-HT₇
<i>Subtipo</i>	5-ht _{5A}	5-ht _{5B}		
<i>Nombre previo</i>	5-HT _{5A}	5-HT _{5B}		5-HT _{1-like} 5-HT _X
<i>Localización central</i>	Hipocampo, córtex, cerebelo, bulbo olfativo, cordón espinal	Hipocampo, córtex, cerebelo, bulbo olfativo, cordón espinal	Putamen, tubérculo olfativo, núcleo accumbens, córtex, hipocampo	Hipocampo, hipotálamo, tálamo, núcleos del rafe, colículo superior
<i>Localización periférica</i>			Ganglios cervicales superiores	Musculatura lisa vascular y gastrointestinal, ganglios simpáticos
<i>Funciones</i>	No establecidas	No establecidas	Modulación liberación de Ach en SNC	Relajación musculatura lisa vascular y gastrointestinal
<i>Agonistas selectivos</i>	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Ninguno
<i>Antagonistas selectivos</i>	Ninguno	Ninguno	Ro04679 Ro630563 SB271046	SB258719
<i>Localización cromosómica en humanos</i>	7q36	2q11-q13	1p35-36	10q23.3-24.3
<i>Mecanismo transducción</i>	No establecido	No establecido	Preferente: incremento de la formación AMPc	Preferente: incremento de la formación AMPc

Tabla 4: Clasificación de receptores serotoninérgicos 5-ht₅, 5-ht₆ y 5-HT₇.

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. Así, 5-HT cumple una función de primer orden en la regulación de la motilidad gastrointestinal, participa en los procesos de agregación plaquetaria ya que es almacenada y secretada por las plaquetas; y 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. Puede actuar como neurotransmisor, ejerciendo una acción inmediata, o bien como modulador de otros neurotransmisores.

Entre las acciones de 5-HT, a nivel central, podemos destacar efectos sobre 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), la regulación de la temperatura corporal y regulación de la ansiedad, así como en procesos depresivos y en procesos psicóticos:

- 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-HT₂, como la ritanserina, aumentan el sueño de ondas lentas.
- Agresividad e impulsividad: en estudios realizados en humanos se ha demostrado que hay una correlación entre el 5-HIAA (metabolito procedente de la degradación de 5-HT) del líquido cefalorraquídeo e impulsividad y agresividad (Brown y Linnoila, 1990). Diversos autores han demostrado que los ratones KO para 5-HT_{1B} generan agresividad extrema, y en humanos también se ha visto que una mutación de punto en el gen que codifica para la MAO_A se relaciona con retraso mental y agresividad (Brunner *et al.*, 1993), hecho que se ha confirmado

posteriormente también en roedores (Cases *et al.*, 1995). Todos estos trabajos ponen de manifiesto que anomalías de 5-HT se correlacionan con comportamientos agresivos.

- Ansiedad y depresión: en este sentido los fármacos eficaces contra la depresión son en su mayoría inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SRII), además la acción directa de 5-HT sobre receptores 5-HT_{1A} ha demostrado una implicación directa en la ansiedad y depresión, hecho demostrado en ratones con eliminación de este receptor (Parks *et al.*, 1998; Ramboz *et al.*, 1998), y también el uso de agonistas selectivos de receptores 5-HT₂, como el *m*-CPP, se ha relacionado con ansiedad.
- 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.
- Temperatura, funciones endocrinas [secreción de ACTH, hormonas gonadotropas, hormona del crecimiento y prolactina (5-HT₁, 5-HT₂)], sensibilidad dolorosa (5-HT₁), la posición y reflejo postural (5-HT₁, 5-HT₂), control central de la actividad emética (5-HT₃), etc.

A nivel periférico también está implicada en la actividad de diversos órganos y sistemas, como son el aparato respiratorio (a nivel bronquial produce broncoconstricción), el sistema gastrointestinal (tanto en la pared del estómago como del intestino puede provocar fenómenos de contracción y relajación), favorece la agregación plaquetaria y participa en la hemostasia, siendo la agregabilidad plaquetaria mucho mayor en el caso de la existencia de diabetes, y puede favorecer la liberación de neurotransmisores desde las terminaciones nerviosas y estimular terminaciones nerviosas sensitivas:

- En células enterocromafines: 5-HT se libera por estiramiento mecánico, causado por los alimentos o por la estimulación vagal eferente. En la pared gastrointestinal produce tanto relajación como contracción, debida a estimulación directa de receptores 5-HT₂ y a la estimulación de

terminaciones nerviosas en el músculo intestinal y esofágico (5-HT₄), y en neuronas ganglionares, a través de los receptores 5-HT₃. En el caso de carcinoma de células enterocromafines se liberan grandes cantidades de 5-HT que son las responsables de los problemas cardiovasculares (espasmo coronario, fibrosis endocárdica e hipotensión) que acompañan a esta enfermedad.

- Agregación plaquetaria: como ya se ha mencionado anteriormente, 5-HT no se sintetiza en las plaquetas, sino que es captada por éstas y almacenada en gránulos. Su función a este nivel se muestra en el siguiente esquema:

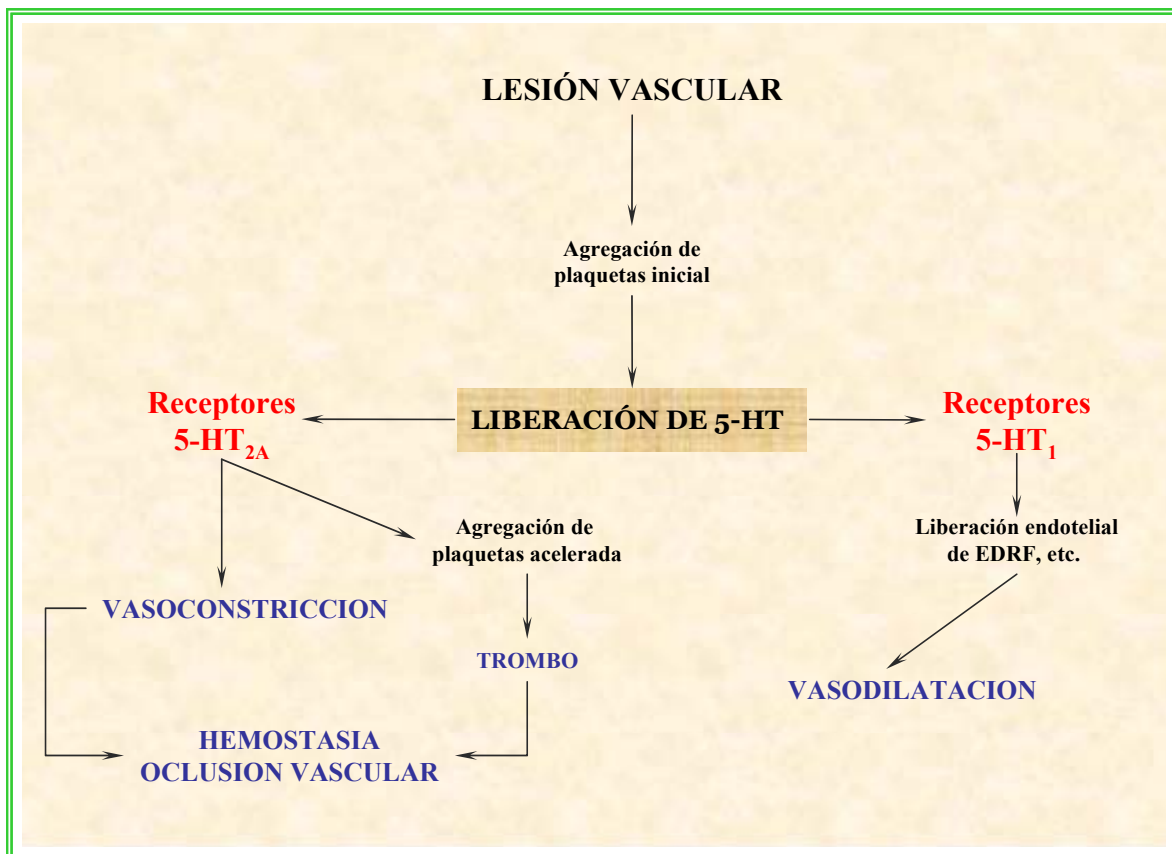


Figura 8: Esquema de actuación de 5-HT tras ser liberada ante una lesión vascular.

5.-Interacción del sistema serotoninérgico con el sistema adrenérgico y 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 esta 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).

Hay estudios que demuestran que una interacción entre el sistema colinérgico y serotoninérgico a nivel neuronal afecta a desórdenes afectivos (Dilsaver, 1986). Se considera que serotonina está relacionada con la liberación de acetilcolina en diversas zonas del cerebro: a nivel de estriado (Gillet *et al.*, 1985), en cortex cerebral (Bianchi *et al.*, 1990) y en hipocampo (Maura *et al.*, 1989) donde por medio de estudios de microdiálisis *in vivo* se ha demostrado que la liberación de acetilcolina, al menos parcialmente, está mediada por los receptores 5-HT_{1A} (Izumi *et al.*, 1994; Wilkinson *et al.*, 1994).

A nivel cardiaco, la interacción de serotonina con los receptores 5-HT₃ origina una estimulación de las terminaciones del nervio vago que trae como consecuencia una hipotensión y bradicardia extremas, fenómeno conocido como reflejo de Bezold-Jarisch. A este nivel, en ratas desmeduladas existen mecanismos serotoninérgicos inhibidores de la neurotransmisión colinérgica de tipo 5-HT₂ y potenciadores de tipo 5-HT₃ (Morán *et al.*, 1994a).

En pulmón, 5-HT origina tanto constricción como relajación de vías aéreas en cerdo, principalmente facilitando postsinápticamente la neurotransmisión colinérgica, aunque también actúa directamente en el músculo liso (Cazzola *et al.*, 1995).

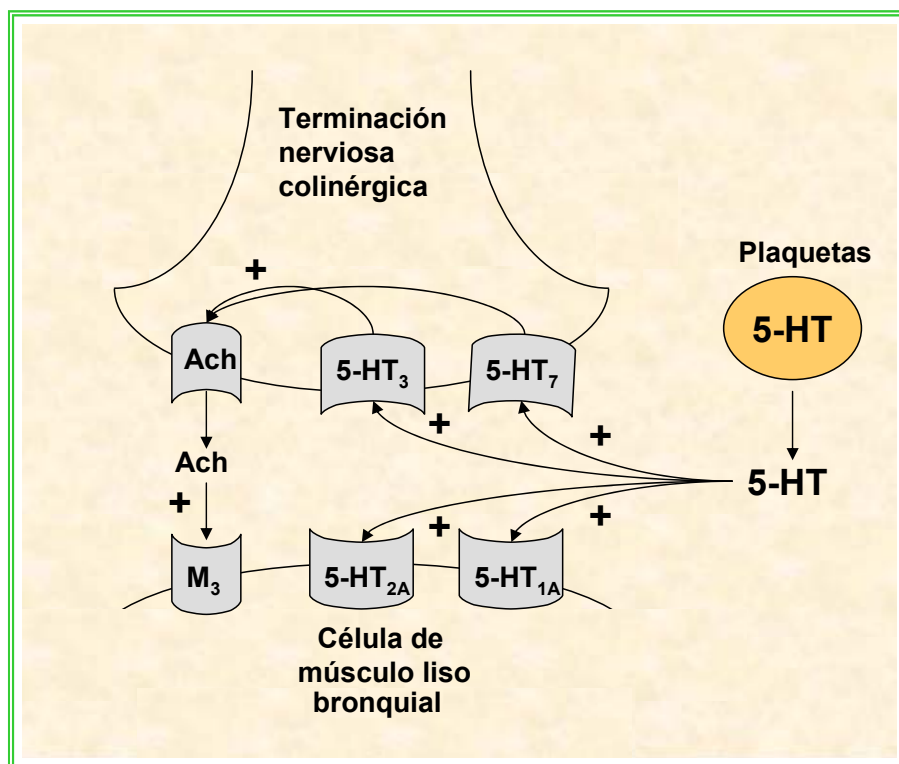


Figura 9: Acción de 5-HT a nivel de músculo liso bronquial (tomado de Cazzola y Matera, 2000).

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; Morán *et al.*, 1994b, 1998; Jones *et al.*, 1995; Fernández, 1999). En la actualidad en varias especies animales se ha puesto de manifiesto la interacción entre el sistema simpático y serotonérgico, al menos parcialmente, ya que la vasoconstricción cutánea que se produce por MDMA está mediada por la liberación de 5-HT, y la subsiguiente estimulación de receptores 5-HT_{2A} (Blessing y Seaman, 2003), lo que hace pensar que dicha interacción entre estos sistemas pueda estar ligada también a alteraciones emocionales y psicológicas.

A nivel pulmonar se ha demostrado la implicación de los receptores α_1 -adrenérgicos en las respuestas contráctiles a 5-HT (Ogawa *et al.*, 1995), estando implicado en dicha contracción el óxido nítrico, de tal modo que en presencia de NO

endógeno la respuesta contráctil de 5-HT está mediada por los receptores α_1 -adrenérgicos, mientras que la inhibición de NO endógeno potencia el componente de la contracción mediado exclusivamente a través de los receptores 5-HT_{2A} (Shaw *et al.*, 2000). En tejido gingival Kerezoudis *et al.* (1994) han mostrado que serotonina es capaz de modificar los niveles de vasoconstricción producidos por el sistema adrenérgico.

De hecho, el sistema serotoninérgico juega un papel fundamental en la fase de simpatoinhibición que se produce cuando hay un shock hemorrágico, ya que metisergida (antagonista de receptores 5-HT₁/5-HT₂) es capaz de bloquear esa fase de la respuesta ante el shock en conejos (Evans *et al.*, 1992).

A nivel del corazón, serotonina favorece la liberación de NA por la estimulación de receptores 5-HT_{1A}, y como consecuencia tiene efectos inotrópicos y cronotrópicos positivos. Además puede producirse bradicardia acompañada de hipertensión por respuesta refleja vagal. En ratas desmeduladas la serotonina induce una inhibición presináptica de la transmisión simpática (Morán *et al.*, 1994b; Villalón *et al.*, 1995) estando dicha inhibición mediada por los receptores 5-HT₁, especialmente los 5-HT_{1D} (Morán *et al.*, 1998). Sin embargo se reconocen mecanismos que aumentan la liberación de adrenalina y que están mediados por receptores 5-HT₃ (Morán *et al.*, 1994b), y estudios realizados por otros autores (Sanchez-López *et al.*, 2003) muestran como, también en ratas desmeduladas, 5-HT induce una simpatoinhibición cardíaca, que parece estar mediada por receptores 5-HT₁ y 5-HT_{5A/5B}, quedando totalmente desvinculados de esta inhibición simpática serotoninérgica a nivel cardíaco los receptores 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₆, 5-HT₇, α -adrenérgicos o la vía de las prostaglandinas.

6.-Receptores serotoninérgicos y acciones a nivel cardiovascular

La 5-hidroxitriptamina ejerce cambios complejos a nivel cardiovascular, 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, así como la posibilidad de que aparezcan acciones reflejas o directas (Saxena *et al.*, 1987; Bagdy *et al.*, 1989; Villalón *et al.*, 1993; Miranda *et al.*, 2000). Es conocido que la activación de los receptores serotoninérgicos 5-HT₂ localizados a nivel de músculo liso, como ocurre en la mayor parte de los grandes vasos, origina vasoconstricción, hecho ampliamente demostrado ya que la inhibición de estos receptores 5-HT₂ puede antagonizar la vasoconstricción serotoninérgica (Gradin *et al.*, 1986), en cambio los localizados a nivel endotelial originan vasodilatación como ha mostrado Vanhoutte (1987a, 2000) quien propone para esta vasodilatación, mecanismos serotoninérgicos que inducen liberación del factor relajante endotelial.

Se reconoce para esta amina biógena cierto papel en la regulación y control de los niveles de presión arterial, al menos a nivel central (Minson *et al.*, 1990), habiéndose visto que la activación de determinados receptores, como son los 5-HT_{1A} centrales originan hipotensión. Aunque también hay estudios que han puesto de manifiesto su papel como poderoso autacoide vasoactivo que se libera en la agregación plaquetaria en respuesta a diferentes procesos (inflamación, infecciones, etc.) y que juega un papel importante en la fisiopatología de diversas enfermedades vasculares (Vanhoutte, 1983), como pueden ser la hipertensión sistémica pulmonar y la enfermedad periférica vascular (Frishman y Grewall, 2000).



Figura 10: Estructura de los vasos sanguíneos y receptores serotoninérgicos en las diferentes capas.

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).

Se han descrito acciones constrictoras de 5-HT provocadas por la activación directa a nivel del músculo liso vascular de receptores 5-HT₁ o 5-HT₂ (Van Nueten *et al.*, 1985a; Feniuk y Humphrey, 1989), por activación de los receptores adrenérgicos (Vanhoutte *et al.*, 1981), o de otros agentes vasoconstrictores como angiotensina II o prostaglandina F_{2α} (Van Nueten *et al.*, 1985b; Frishman *et al.*, 1995). Estudios recientes muestran que en humanos, en las arterias coronarias, se expresan en gran cantidad los

receptores 5-HT₂ y 5-HT_{1B}, moderadamente los receptores 5-HT_{1F} y 5-HT_{1A}, mientras que hay una baja expresión de los receptores 5-HT_{1D} (Nilsson *et al.*, 1999); y en las arterias cerebrales (arteria temporal y occipitales) se expresan receptores 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT₄ y 5-HT₇; en ambos casos estudios farmacológicos han mostrado que las respuestas vasoconstrictoras están mediadas a través de los receptores 5-HT_{1B} y 5-HT_{2A} (Kaumann *et al.*, 1994; Verheggen *et al.*, 1998, 2004). En la vena porta de roedores, 5-HT también ejerce un efecto vasoconstrictor, tanto en las preparaciones endotelio-dependiente o endotelio-independiente, a través de la activación de los receptores 5-HT_{1D/1B} y 5-HT_{2A}, pero no por una liberación de NA (Datté y Offoumou, 2004).

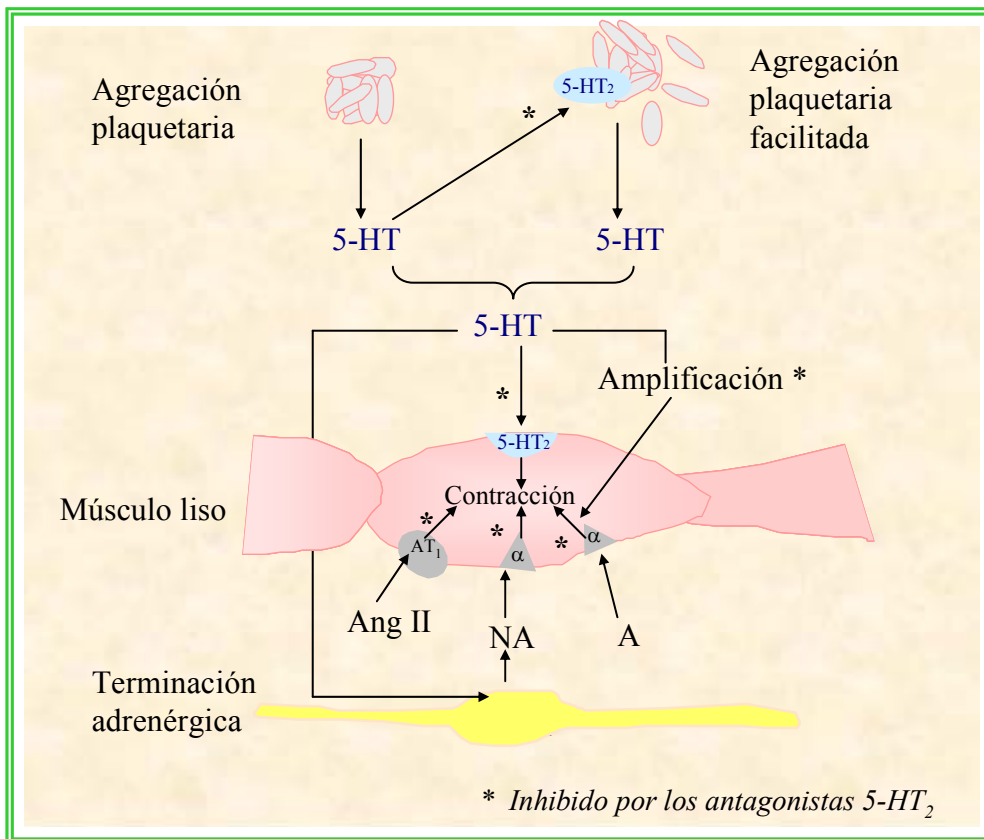


Figura 11: Efectos vasoconstrictores directos e indirectos de 5-HT, (α = adrenoceptor α ; AngII = angiotensina II, A = adrenalina, NA = noradrenalina).

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) o bien por facilitar la liberación de óxido nítrico tras activación

de receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} y 5-HT_{2B} (Fozard y Kalman, 1994; Schmuck *et al.*, 1996; Kakoki *et al.*, 199; 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 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_{1B} y 5-HT_{2B} (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-HT₇ 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 *et al.*, 1999; Centurión *et al.*, 2004).

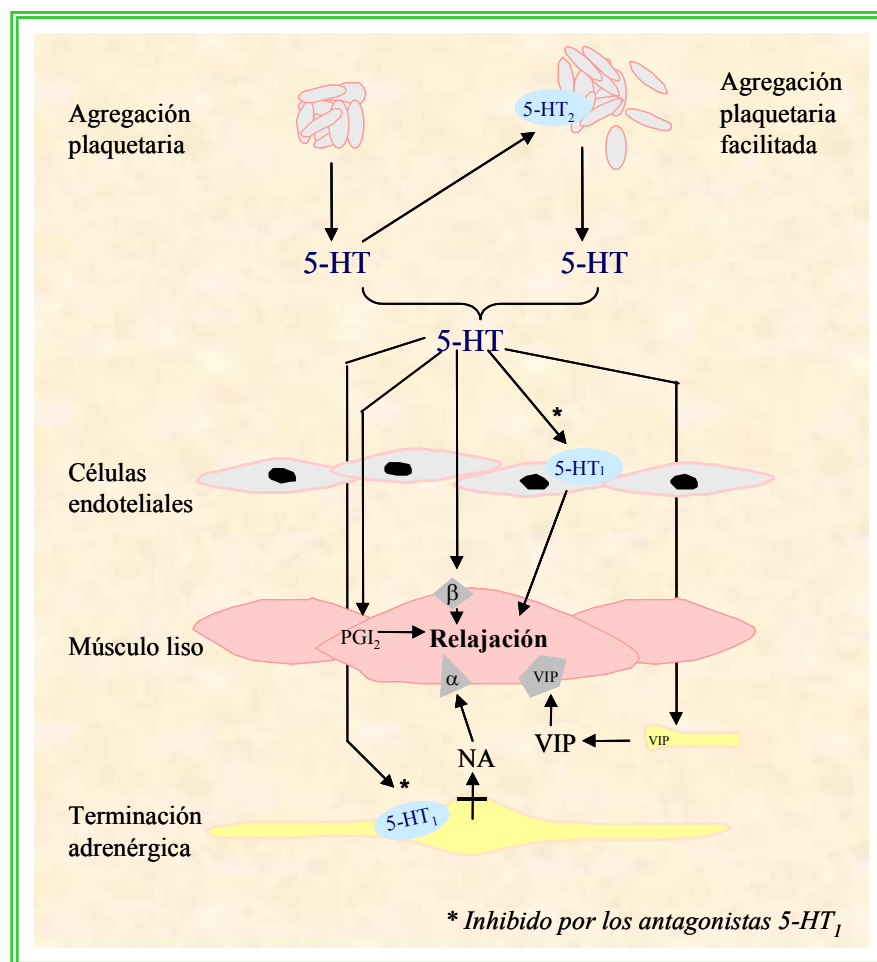


Figura 12: Efectos vasodilatadores directos e indirectos de 5-HT, (α = adrenoceptor α , β = adrenoceptor β , NA = noradrenalina, VIP = péptido intestinal vasoactivo, PGI₂ = prostaciclina) (Vanhoutte, 1985).

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 la ciclooxigenasa 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_{2B} y/o 5-HT_{2C} (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_{2A} (Calama *et al.*, 2002), mientras que en ratas espontáneamente hipertensas la vasoconstricción está ligada a los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} (Calama *et al.*, 2004). Las respuestas vasodilatadoras a este nivel se producen por la activación de receptores 5-HT_{1B/1D} (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_2 -adrenérgicos (Calama *et al.*, 2003).

A nivel renal también coexisten respuestas tanto vasoconstrictoras como vasodilatadoras. 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 sugirió la existencia de receptores 5-HT_{1A} a nivel endotelial que mediaban la vasodilatación producida por 8-OH-DPAT y por algunos antagonistas β -adrenérgicos (Verbeuren *et al.*, 1991, 1993). Un estudio realizado en nuestro laboratorio en riñón autoperfundido *in situ* demuestra la implicación de receptores 5-HT₂ en la vasoconstricción provocada tanto por serotonina como por angiotensina II (Morán *et al.*, 1997). Recientemente, con el desarrollo de agonistas y antagonistas selectivos, se ha mostrado la existencia de diferentes subtipos de receptores según la especie animal usada, así, en rata se ha visto la existencia de receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2B} en arterias renales aisladas (Watts y Thompson, 2004), mientras que en anillos que provienen de arterias renales de conejo se ha mostrado la existencia de receptores 5-HT_{1B} y 5-HT_{1D} (Hinton *et al.*, 2000).

La serotonina también ejerce su efecto en células mesangiales; de este modo, en este tipo de células, se ha descrito la existencia de receptores 5-HT_{1B} y 5-HT_{2A}, asociados los dos a una inhibición de la adenilato ciclasa (Schoeffter *et al.*, 1995; Nebigil *et al.*, 1995). La serotonina estimula la producción de TGF- β 1 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). La serotonina, sin embargo, no parece ejercer ningún efecto sobre los podocitos (Nitschke *et al.*, 2000).

II. 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 (McCance *et al.*, 1997; Reports of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1997 y 2000), que quedó de la siguiente forma:

1. Diabetes mellitus tipo 1.
2. Diabetes mellitus tipo 2.
3. Otros tipos específicos de diabetes.
4. Diabetes gestacional.

5. Alteración del metabolismo o de la homeostasis de la glucosa.

Las características de cada una de ellas quedan expresadas en las tablas 5 y 6.

<i>Diabetes mellitus tipo 1</i>	<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"> • Diabetes mellitus mediada por procesos autoinmunes. La destrucción de las células β resulta de un proceso autoinmune. • Diabetes mellitus idiopática: etiología desconocida.
<i>Diabetes mellitus tipo 2</i>	<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>
<i>Homeostasia de la glucosa alterada</i>	<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"> • Glucemia basal alterada: glucemia plasmática basal por encima de los valores normales y menor que el valor diagnóstico de diabetes. • 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.
<i>Diabetes gestacional</i>	<p>Sin cambios en la definición.</p>
<i>Otros tipos específicos</i>	<p>Diabetes causada por otras etiologías identificables:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Defectos genéticos en la función de las células beta. • Defectos genéticos en la acción de la insulina. • Enfermedades del páncreas exocrino. • Endocrinopatías. • Fármacos y drogas. • Infección. • Formas raras de diabetes relacionadas con procesos autoinmunes. • Otros síndromes genéticos.

Tabla 5: Características de los distintos tipos de diabetes.

Las dos formas más comunes de diabetes son la diabetes mellitus tipo 1 y la diabetes mellitus 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 y con antecedentes familiares de diabetes, aunque no todos dependen de la insulina exógena (Tabla 6).

	DM1	DM2
Sexo	H=M	M>H
Edad de diagnóstico	<30 años	>40 años
Aparición de síntomas	Brusca	Solapada
Peso	No obeso	Obeso (80%)
Periodo de remisión	A veces	Raro
Propensión cetosis	Sí	No
Tratamiento insulínico	Frecuentemente indispensable	Habitualmente no requerido
Herencia	Coincidencia gemelos idénticos (40-50%)	Coincidencia gemelos idénticos (90%)
Genética	Asociada a determinados cromosomas (cromosoma 6) (cromosoma 11?)	Polimorfismo genético en el gen insulina
Autoanticuerpos	85-90%	No
Inmunidad celular antipancreática	Sí	No
Etiología vírica	Posible	No
Insulinitis inicial	50-75%	No
Endocrinopatías múltiples asociadas	Sí	No
Niveles de insulinemia	Disminuidos o nulos	Variables

Tabla 6: Diferencias fundamentales entre DM tipo 1 y DM tipo 2, (H = hombre, M = mujer).

En el mundo occidental la prevalencia de la diabetes mellitus se estima que oscila entre el 2 y el 6% de la población, aunque se cree que hay un 50 % de casos sin diagnosticar. Esta prevalencia varía en función del tipo de diabetes: en la DM de tipo 1, que se caracteriza por ser una patología que afecta a la secreción de insulina y que mejora notablemente con la administración externa de la misma, la prevalencia se estima en un 0,2%, mientras que en la DM tipo 2, que no es insulino-dependiente la prevalencia se estima en un 6% de la población, aumentando ésta con la edad.

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. La diabetes tipo 2, que es la más frecuente, afecta a unos 135 millones de personas en todo el mundo; y está en progresión constante por muy diversas razones como los malos hábitos alimentarios, el sedentarismo, el sobrepeso y el envejecimiento de la población, y está llegando al extremo de ser considerada por la OMS como una “pandemia moderna”. En los países desarrollados es una de las primeras causas de muerte. En España representa el tercer lugar entre las causas de defunción en mujeres y el séptimo en el caso de los hombres. En la mayor parte de los casos no es la diabetes la responsable directa de estas muertes, sino las complicaciones que ésta origina; en pacientes que sufren DM de tipo 2 la primera causa de defunción es el infarto de miocardio, que representa entre un 50-60% de muerte, y en sujetos que sufren DM tipo 1 la primera causa de muerte es la insuficiencia renal por nefropatía diabética.

1.- Páncreas e insulina

El órgano responsable de esta patología 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)*: el páncreas humano tiene de dos a tres millones de islotes de aproximadamente 0,3 mm cada uno. Se encuentran organizados alrededor de pequeños capilares hacia los que las células secretan las hormonas que producen. Los cuatro tipos de células son:
 - Células β : (60%) que secretan insulina y péptido C.
 - Células α : (25%) que secretan glucagón.
 - Células γ : (10%) que secretan somatostatina.
 - Células PP: que secretan una hormona de función no muy aclarada que se llama polipéptido pancreático.

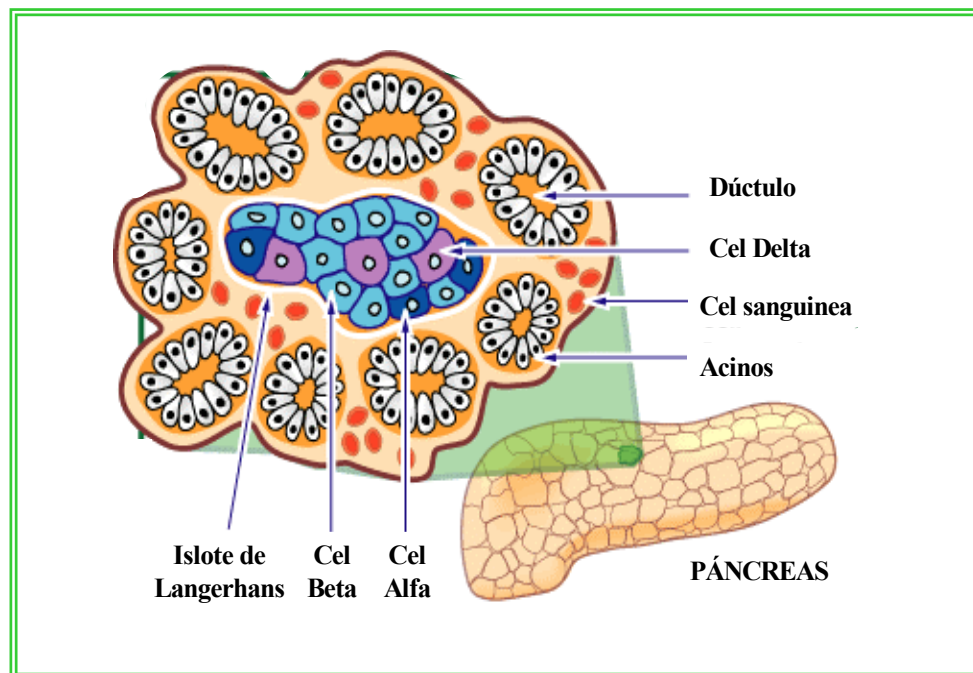


Figura 13: Anatomía fisiológica del páncreas (cel: célula).

En 1921 Frederick G. Banting (Premio Nobel, 1923) y su ayudante Charles H. Best (Banting y Best, 1990) aislaron la insulina del páncreas de un mono, la cual permitió vivir durante varias semanas a un perro con diabetes y, un año más tarde (1922) se llevó a cabo el primer ensayo en humanos. 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; Sanger, 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.

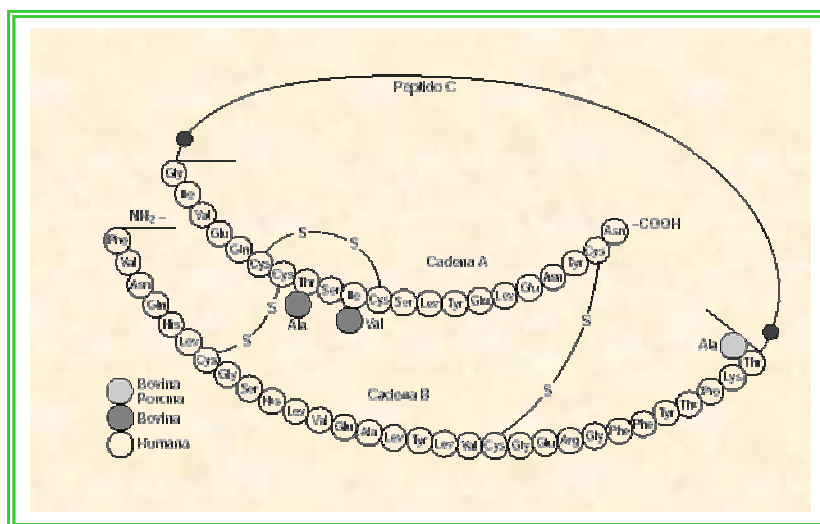


Figura 14: Estructura de la insulina.

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

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

duradera) y posteriormente la insulina porcina. A partir de 1979, y gracias a las técnicas de ADN recombinante fue posible producir insulina humana en *Escherichia coli* (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 o autonómicos. Su prevalencia aumenta con el tiempo de evolución de la enfermedad y con la edad del paciente. 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 se origina desmielinización de las fibras nerviosas, que se cree que es la causa principal de las neuralgias que sufre el 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. La etiología de la disminución de flujo sanguíneo que se produce durante la diabetes y los mecanismos implicados en dicha reducción son aún muy desconocidos, y han comenzado a ser un importante objeto de estudio en la neuropatía diabética ya que se ha visto que las respuestas de vasos de los nervios, 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). 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 diabetes mellitus 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 hemolisis (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 TXA₂ y 5-HT (Hodgson *et al.*, 1992; James y Hodgson, 1995a y b).

Las alteraciones cardiovasculares se pueden producir a nivel de grandes vasos (macroangiopatías) o de pequeños vasos (microangiopatías). Estudios realizados

recientemente 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). 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 glomeruloesclerosis que evoluciona siempre hacia insuficiencia renal. La diabetes es la responsable de un 30% de las insuficiencias renales graves que necesitan tratamiento con diálisis y de un 16% de los trasplantes de riñón. La evolución del riñón hacia la nefropatía diabética se manifiesta clínicamente inicialmente 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 (angiotensina 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. Estudios realizados recientemente 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 diabetes mellitus 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, que por técnicas de Western Blot realizadas por Choi *et al.*, (1997) se ha demostrado que a este nivel las tres isoformas de la enzima implicada en la síntesis de NO (eNOS, iNOS y nNOS) están aumentadas una semana después de inducir la diabetes, lo que puede contribuir a la aparición de las primeras alteraciones de filtración glomerular. Sin embargo, estos resultados contrastan con el de otros autores que muestran por estudios histológicos que la nNOS está disminuida en la mácula densa, sin estar alterada la eNOS en las primeras fases del desarrollo de la diabetes (Keynan *et al.*, 2000).

Las alteraciones oculares afectan a los nervios oculomotores y ópticos, aunque la estructura mayoritariamente afectada es la retina (siendo la retinopatía diabética la causa de ceguera más frecuente en los países industrializados). Esta retinopatía se produce por un engrosamiento de la pared de los capilares de la retina, habiéndose demostrado que en la retina de rata diabética hay una menor expresión y modificaciones estructurales de las proteínas G de células endoteliales (Sobrevia y Mann, 1997).

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 (Feletou *et al.*, 1994; Oyama *et al.*, 1986) como en el hombre (Johnstone *et al.*, 1993; Van Etten *et*

al., 2002). La cantidad de óxido nítrico disponible, que es un factor de riesgo común con la propia hiperglucemia producida por la diabetes u otras alteraciones metabólicas que se producen como consecuencia de la enfermedad; la glucosilación de proteínas y la sobreexpresión de NADPH oxidasa en las células musculares lisas o endoteliales, aumentan el estrés oxidativo en los vasos sanguíneos y llevan a una degradación de NO (Lassègue y Clempus, 2003).

Existen estudios que han demostrado que realmente hay alteraciones a nivel de la vasodilatación producida por endotelio, de esta forma Pieper *et al.*, en 1997 mostraron que la relajación producida por el óxido nítrico estaba disminuida en la diabetes mellitus, 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 óxido nítrico sintasa (NOS) endotelial 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). Estudios más recientes han demostrado que, probablemente, el responsable principal de este comportamiento del enzima, es el cofactor de la NOS, la tetrahidrobiopterina (Milstien y Katusic, 1999). 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 prostanoideos (Mayhan *et al.*, 1991; Tesfamariam *et al.*, 1989; Shimizu *et al.*, 1993). Recientemente, se ha mostrado 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 tromboxano A₂.

Investigaciones recientes llevadas a cabo por Angulo *et al.* (1998) demuestran una importante relación entre las alteraciones endoteliales y las metabólicas en ratas diabéticas por estreptozotocina, en las cuales el grado de hiperglucemia se manipuló por la administración subcutánea de insulina. En este sentido, Pieper *et al.* (1998) 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.

La existencia de una diabetes mellitus 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 epinefrina, norepinefrina y de dopamina- α -hidroxilasa, así como reducción en la síntesis y metabolismo de dopamina y serotonina, perdiéndose en parte las respuestas de 5-HT ante el estrés (Bellush *et al.*, 1991).

III.- SEROTONINA, DIABETES Y SISTEMA CARDIOVASCULAR

La diabetes es una enfermedad que, como ya se ha mencionado, a largo plazo origina complicaciones cardiovasculares importantes, entre las cuales destaca la hipertensión arterial, que tiene una incidencia y prevalencia mucho mayor en individuos con hiperglucemia crónica. Muchos estudios se han interesado por el posible papel de la serotonina en la fisiopatología de las complicaciones de la diabetes. De hecho esta enfermedad se ha asociado a modificaciones i) en las concentraciones de 5-HT y de la agregación plaquetaria, ii) en la población de receptores serotoninérgicos y iii) en las respuestas vasculares inducidas por serotonina en diferentes vasos sanguíneos y su regulación endotelial.

En la diabetes mellitus las tasas plasmáticas de 5-HT están aumentadas (Barradas *et al.*, 1988; Malyszko *et al.*, 1995a; Martín *et al.*, 1995), debido a que hay un

aumento de la agregabilidad plaquetaria, siendo estas plaquetas la principal fuente de serotonina a nivel periférico (Murray *et al.*, 1983; Malyszko *et al.*, 1995b; Hasegawa *et al.*, 2002). Las plaquetas liberan de forma masiva 5-HT y acaban por estar agotadas en esta amina. 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, donde un aumento de receptores 5-HT_{1A} (córtex y tronco encefálico) y de 5-HT₂ (córtex frontal) ha sido demostrado en ratas en las que se había inducido diabetes por administración de estreptozotocina (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). Este aumento de la expresión de receptores de 5-HT a nivel del SNC ha sido confirmado recientemente en pacientes diabéticos (5-HT_{1C}, 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 [³H]-ketanserina no está modificada en aorta de rata diabética mientras que sí que lo está la reactividad a la serotonina (James *et al.*, 1994).

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 las primeras semanas de 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 *et al.*, 1994; 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.*, 1995a). En arteria pulmonar o carótida tomadas de

conejo o de cerdo diabéticos, la respuesta vasoconstrictora está aumentada en ambos casos (El-Kasef, 1996; Bagwell *et al.*, 2000; Miranda *et al.*, 2000).

Hay muy pocos trabajos publicados que se han dedicado al estudio de 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 tromboxano A₂ (Hodgson *et al.*, 1990), anomalías en la vía de la PKC (Hattori *et al.*, 1995) o en la cascada de la COX (James *et al.*, 1995b). Normalmente, los trabajos realizados han sido durante las primeras semanas después de la inducción de la diabetes (2 a 8 semanas), lo que se puede considerar como la fase precoz de la enfermedad.

Las vasoconstricciones producidas por serotonina en aorta se reproducen con α -metil-5-HT y son inhibidas por ketanserina y por tanto están ligadas a los receptores 5-HT₂ (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, metiendo también en juego los receptores con acción vasodilatadora, endoteliales o no, no ha sido considerado 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_{2A}, sarpogrelato, en esta patología. Los resultados muestran un efecto beneficioso de dicho antagonista ya que la albuminuria de un pequeño grupo de pacientes con diabetes mellitus 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_{2A}. 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 β -endorfinas (Kolta *et al.*, 1986).

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 está claramente atenuada en preparaciones de ratas diabéticas por estreptozotocina (Ralevic *et al.*, 1995).

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 (ACh) 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 endotelio-dependientes modificadas 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).

La reactividad del sistema cardiovascular a 5-HT durante el desarrollo de diabetes experimental es muy diferente en función del lecho vascular en que nos encontremos y del agente diabetógeno utilizado. Así por ejemplo las respuestas constrictoras a 5-HT en el tren posterior, en ratas diabéticas por aloxano, están disminuidas (Sikorski *et al.*, 1991) al igual que lo están en aorta aislada de ratas diabéticas por estreptozotocina (James y Hodgson, 1995b), mientras que en riñón, según los autores, encontramos diferentes respuestas: para Hodgson *et al.*, (1990) están aumentadas, comparadas a las controles, pero para Boston *et al.*, (1997) que trabajan en riñón aislado perfundido con solución Krebs no están alteradas las respuestas en diabetes, mientras que con otra enfermedad concomitante como la hipertensión están ligeramente aumentadas.

----- *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, la cual depende de factores tales como la especie animal, las dosis utilizadas, el tono simpático del animal y el tejido utilizado (Villalón *et al.*, 1993).

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), justificadas en algunos casos, por la existencia, cada vez más aceptada, de una interacción entre las vías serotoninérgicas y adrenérgicas.

Los múltiples estudios realizados en los últimos años muestran la elevada complejidad del sistema serotoninérgico. Sin embargo, los conocimientos actuales sobre tipos y subtipos de receptores serotoninérgicos, así como la mayor disponibilidad de agonistas y antagonistas selectivos, facilitan el estudio funcional de tales sistemas receptoriales y permiten un mejor conocimiento de las implicaciones y de los mecanismos de esta amina biógena.

Por su parte, la diabetes constituye un importante problema de salud que transcurre con una alteración de la respuesta de los lechos vasculares 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 hiperreactividad vascular arterial hacia esta amina biógena.

Nuestro grupo de investigación desarrolla una línea de trabajo dedicada al estudio de las acciones cardiovasculares de 5-HT en ratas, centrándose preferentemente en establecer la participación periférica de dicha amina y, los posibles mecanismos serotoninérgicos, en determinadas funciones cardiovasculares. En dichos trabajos, se han utilizado preferentemente técnicas funcionales *in vivo* en ratas normoglucémicas normotensas e hipertensas, 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:

- 5-hidroxitriptamina modula la neurotransmisión colinérgica cardíaca en ratas desmeduladas, inhibiendo o facilitando la liberación de acetilcolina. Los mecanismos inhibidores implican la activación de receptores 5-HT₂, mientras que los potenciadores corresponden a receptores 5-HT₃ (Morán *et al.*, 1994a).
- En la neurotransmisión simpática vascular en ratas normotensas e hipertensas, existen mecanismos presinápticos serotoninérgicos que actúan inhibiendo o facilitando la liberación de noradrenalina, desde las terminaciones nerviosas simpáticas. Los mecanismos inhibidores conllevan la activación de receptores 5-HT₁ (implicando a los 5-HT_{1D} y en menor medida a los 5-HT_{1A}) en ratas normotensas (Morán *et al.*, 1998) y a los 5-HT_{1B} en el caso de ratas hipertensas (García, 1998), mientras que los potenciadores, significativos tan sólo en ratas normotensas, implican receptores 5-HT₃ (Morán *et al.*, 1994b).
- Determinados antagonistas de receptores 5-HT₁/5-HT₂, ejercen efectos inhibidores de la transmisión simpática vascular en ratas, por mecanismos no directamente relacionados con el antagonismo de receptores serotoninérgicos (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-HT₁ de naturaleza presináptica, siendo el subtipo 5-HT_{1B} el más implicado en dicha acción (Villalón *et al.*, 1999).

2.- Acciones vasculares serotoninérgicas y mecanismos implicados, en territorios vasculares autoperfundidos de ratas:

- A nivel renal (en riñón autoperfundido de rata *in situ*), 5-hidroxitriptamina ejerce efectos vasoconstrictores mediados por la

activación de receptores 5-HT₂, principalmente de los subtipos 5-HT_{2B/2C} (Morán *et al.*, 1997). La activación de tales receptores implica un incremento en la formación de angiotensina II (Ang II), tal vez justificada porque 5-HT induce una mayor actividad enzimática de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (Fernández, 1999).

- En el lecho mesentérico autoperfundido *in situ* de rata anestesiada, la administración local de 5-HT induce respuestas vasoconstrictoras provocadas por la activación de receptores 5-HT₂. En dicha activación participan los tres subtipos de este tipo de receptores, aunque principalmente la respuesta vasoconstrictora parece estar mediada por los 5-HT_{2A/2B} (Fernández *et al.*, 2000b).
- En la vasculatura del tren posterior autoperfundido en ratas normoglucémicas y normotensas, la vasoconstricción está ligada a la activación de receptores 5-HT_{2A} (Calama *et al.*, 2002), mientras que en dicha acción vasoconstrictora, en ratas espontáneamente hipertensas, además de los receptores 5-HT_{2A} están implicados los receptores 5-HT_{2C} (Calama *et al.*, 2004).
- Las respuestas vasodilatadoras a este nivel (tren posterior autoperfundido) se producen por la activación de receptores 5-HT_{1B/1D} (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 β₂-adrenérgicos (Calama *et al.*, 2003).

De acuerdo con los antecedentes existentes y los resultados ya obtenidos por nosotros, planteamos que patologías tales como la hipertensión y la diabetes experimental, pueden modificar las acciones vasculares directas y/o indirectas de 5-HT así como la modulación que 5-HT ejerce en la neurotransmisión autonómica.

En consecuencia, en este trabajo de Tesis Doctoral se plantea como **OBJETIVO GENERAL** determinar, el grado de participación de distintos tipos y subtipos de

receptores serotoninérgicos así como de algunos mediadores endoteliales, en respuestas cardiovasculares serotoninérgicas que afectan a la neurotransmisión simpática o a la parasimpática, así como al tono vascular renal, en una situación de hiperglucemia experimental.

En concreto, planteamos los siguientes **objetivos específicos**:

1. Determinar, en ratas hiperglucémicas desmeduladas, la influencia que 5-hidroxitriptamina y otros agonistas serotoninérgicos, ejercen sobre las respuestas vasculares obtenidas por estimulación simpática total o por administración de noradrenalina exógena; establecer la naturaleza de dichas acciones analizando el tipo y/o subtipos de receptores serotoninérgicos implicados y, comparar los resultados que se obtengan con los de ratas normoglucémicas.
2. Tanto en animales normoglucémicos como en ratas hiperglucémicas, se intentará establecer la posible participación de algunos mediadores endoteliales o mecanismos indirectos, en las acciones que 5-HT y agonistas serotoninérgicos, inducen sobre los efectos presores obtenidos por estimulación simpática total.
3. Estudiar, en ratas hiperglucémicas desmeduladas, las acciones de 5-HT, así como de agonistas y antagonistas serotoninérgicos, implicados en las respuestas colinérgicas cardíacas obtenidas por estimulación eléctrica vagal o por administración de acetilcolina exógena. Los resultados se analizarán en comparación con los previamente obtenidos en situación de normoglucemia.
4. Se analizarán funcionalmente, los receptores serotoninérgicos implicados en las acciones vasodilatadoras y/o vasoconstrictoras producidas por 5-HT y otros agonistas selectivos, en riñón aislado perfundido, de animales normo e hiperglucémicos.
5. Por último, se caracterizarán mediante técnicas de biología molecular los receptores serotoninérgicos presentes en la vasculatura renal en comparación con los existentes en aorta torácica, en ambos tipos de animales, analizándose si procede, las diferencias existentes.

----- *Material y métodos* -----

Todos los experimentos realizados en este trabajo se han desarrollado utilizando ratas procedentes del Animalario de la Universidad de Salamanca (nº Registro P.A.E.-SA001), o del Animalario de la Université Louis Pasteur (nº d'agément 67-333) y cumpliendo la normativa vigente para el manejo y utilización de animales de experimentación dispuestas por las normativas europeas (Directiva del Consejo de Europa 86/609/CEE).

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

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

I.- INDUCCIÓN DE LA DIABETES EXPERIMENTAL

1.- Agente diabetógeno: aloxano

En los experimentos realizados *in vivo* para la inducción de la diabetes experimental hemos utilizado ratas Wistar macho de 250-350 g de peso, a las cuales se administró por vía subcutánea una dosis de aloxano de 150 mg/kg (2,4,5,6-tetraoxipirimidina; 5,6-dioxiuracilo), disuelto en NaCl 0,9%. Se destruyen así las células β del páncreas y se origina una diabetes experimental extrapolable a la diabetes mellitus tipo 1 (Murray *et al.*, 1983; Kolta *et al.*, 1986; Head *et al.*, 1987; Altan *et al.*, 1987; Hodgson *et al.*, 1990; Jamnicky *et al.*, 1993; Öztürk *et al.*, 1996; Miranda *et al.*, 2000).

Previamente a la inyección de aloxano se determina la glucemia basal y el peso corporal de todos los animales a tratar, y posteriormente se va haciendo un seguimiento de los mismos en el tiempo. La primera medida de la glucemia y del peso después de la inyección del aloxano se hace a los dos días para confirmar la aparición de la enfermedad (Figura 15). Esta medición de glucemia se hace por extracción de una gota de sangre de la cola de las ratas y su análisis con las tiras reactivas Accutrend Sensor Comfort Glucose para la determinación de glucosa mediante el aparato Accutrend Sensor (Roche).

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

Los animales se mantienen en condiciones controladas y constantes de temperatura, humedad y fotoperiodicidad durante 28 días, en los que disponen de agua y comida a voluntad y se les administra diariamente, por vía subcutánea, insulina Insulatard NPH 100 UI (Novo Nordisk). La dosis administrada (Tabla 7) permite mantener al animal diabético, sin que sus valores de glucemia oscilen mucho.

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

Tabla 7: Dosis de insulina administradas para el mantenimiento de la diabetes.

Durante los 28 días se realizan mediciones de glucemia y de peso, tal y como se muestra en la figura 7, es decir, que periódicamente se confirma que los animales se mantienen diabéticos, y se retiran del experimento aquellos que no lo son.

1.2.- Agente diabético: estreptozotocina

En el caso de los experimentos realizados *in vitro*, para la inducción de la diabetes experimental hemos utilizado ratas Wistar macho de 250-350 g de peso, a las cuales se administró por vía intravenosa (vena caudal o peneana) una dosis de estreptozotocina [(2-deoxi-2-3-(metil)-3-nitrosoureido)-D-glucopiranos] (Sugimoto et al., 1998; Keynan *et al.*, 2000; De Vrieses *et al.*, 2001; Granstam *et al.*, 2003) de 60 mg/kg, disuelta en tampón citrato a pH = 4. De este modo se destruyen gradualmente las células β del páncreas y se origina a las cuatro semanas una diabetes experimental extrapolable a la diabetes mellitus tipo 1. Los animales controles reciben una inyección por vía intravenosa de tampón citrato a pH = 4.

Previamente a la inyección de estreptozotocina se mide la glucemia basal y el peso corporal de todos los animales a tratar, y posteriormente se va haciendo un seguimiento de los mismos en el tiempo. La primera medida de la glucemia y del peso después de la inyección se hace a los tres días para confirmar la aparición de la enfermedad. Esta medición de glucemia se hace por extracción de una gota de sangre de la cola de las ratas y su análisis con las tiras reactivas Bandelettes Glucotide[®] y el

aparato Glucometer 4[®] (Department AMES Bayer Diagnostic). Posteriormente para confirmar el mantenimiento de la enfermedad se hacen mediciones periódicas a los 7, 14, 21 y 28 días. Durante este tiempo los animales se mantienen estabulados en condiciones controladas y constantes de temperatura, humedad y fotoperiodicidad, disponiendo de agua y comida a voluntad, y administrando cada dos días, por vía subcutánea, a aquellos cuya hiperglucemia es superior a 400 mg/dl una inyección de insulina Insulatard NPH 100 UI (Novo Nordisk). La dosis administrada permite mantener al animal diabético, sin que sus valores de glucemia oscilen mucho.

Independientemente del agente diabetógeno utilizado, en ambos casos se trabaja con un grupo control, al que se le administra en el día 0 el vehículo en el que se encuentran disueltos los agentes, es decir, suero fisiológico en el caso de aloxano y tampón citrato a pH=4,5 para el caso de la estreptozotocina; y después los animales se mantienen estabulados en las mismas condiciones que los animales tratados durante los 28 días, realizándose también medidas de glucemia periódicas como se indica en el esquema de la figura 15.

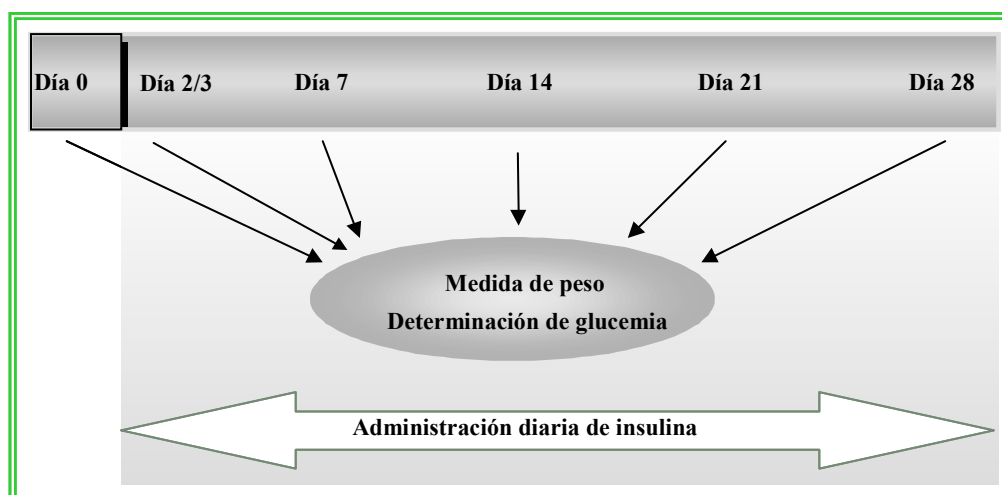


Figura 15: Esquema de medición de glucemia y peso y administración de insulina.

II.- ESTUDIOS *IN VIVO*: RATAS DESMEDULADAS

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

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

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

1. Estudio de la acción propia de los fármacos a nivel cardiovascular, consecuencia de mecanismos simpáticos y parasimpáticos, que dan lugar a variaciones en presión arterial, frecuencia cardíaca, resistencia periférica, etc.
2. Estudio de la modificación que estos fármacos pueden ejercer sobre respuestas previamente inducidas por agentes autonómicos adrenérgicos o colinérgicos.
3. Investigación de respuestas o acciones sobre estimulación nerviosa, simpática o parasimpática, ya sea por estimulación de todo el sistema nervioso autónomo (Gillespie y Muir, 1967) o de tan sólo un segmento determinado de dicho sistema (Gillespie *et al.*, 1970). Esta última modalidad se aplica preferentemente al estudio de sustancias o fármacos relacionados con el sistema simpático, de manera que previa atropinización del animal se consiguen respuestas presoras por estimulación de todo el sistema simpático (Gillespie y Muir, 1967; Zukowska-Grojec *et al.*, 1983; Borkowski y Quinn, 1984), o bien respuestas diferentes en función del segmento espinal que se estimule.

1.- Estimulación simpática

1.1.- Preparación del animal

Los animales se anestesian con pentobarbital sódico (60 mg/kg, i.p.), y se colocan en posición decúbito-supino en la mesa de operaciones, controlando en todo momento la temperatura corporal de los mismos mediante una fuente de calor. Se les practica la traqueotomía, se canulan las venas yugulares derecha e izquierda como vías de administración de fármacos y se aísla la arteria carótida izquierda. Seguidamente se conecta la cánula traqueal a una bomba de respiración (1 ml aire/100g de peso, 50 strokes/min), y se procede a la desmedulación del animal según la técnica descrita por Gillespie y Muir (1967), mediante la inserción de una varilla metálica de 1,5 mm de diámetro, a través del seno orbital y el foramen magnum por todo el cordón espinal hasta la primera vértebra sacra, a una distancia total de aproximadamente 15 cm. De este modo se consigue la destrucción de todo el sistema nervioso central conservando intactos los nervios troncales que salen de él (Zukowska-Grojec *et al.*, 1983).

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

A continuación se procede a la administración, por vía intravenosa, de d-tubocurarina (2 mg/kg) para evitar las posibles contracciones musculares provocadas por la estimulación eléctrica. Transcurridos cinco minutos se administra al animal, también por vía intravenosa, atropina (1 mg/kg) para evitar los posibles efectos colinérgicos.

1.2.- Protocolo experimental

Una vez estabilizado el animal se procede a la estimulación simpática de todo el flujo espinal, denominada estimulación simpática total, que pretende obtener variaciones de presión arterial en los animales, sin que haya alteraciones de la frecuencia cardiaca (Gillespie y Muir, 1967; Zukowska-Grojec *et al.*, 1983; Borkowski y Quinn, 1984; Morán *et al.*, 1994b y 1998; Fernández *et al.*, 2000). Para esta estimulación se conectan al animal dos electrodos, el electrodo de estimulación, que se coloca sobre la varilla utilizada para la desmedulación y que ha sido introducida en todo el cordón espinal, y el electrodo indiferente o de tierra que se coloca subcutáneamente en la pata del animal, formando así un circuito cerrado. Ambos electrodos, a su vez están conectados a un estimulador Cibertec Stimulation CS-9.

La estimulación simpática se realiza aplicando durante 25 segundos pulsos monofásicos de 1 ms de duración a un voltaje de $15 \pm 3V$ para ratas normoglucémicas y $27,5 \pm 2,5 V$ en el caso de ratas diabéticas, realizando una batería creciente de frecuencias a 0,1, 0,5, 1 y 5 Hz en intervalos de 5 min, que permite la obtención de una primera curva estimulación-respuesta que denominamos E0, A continuación se realizan tres nuevas curvas E1, E2 y E3 a intervalos de 5 minutos, perfundiendo (mediante una bomba de perfusión modelo Harvard 122) a través de la vena yugular derecha una infusión de suero fisiológico y/o agonistas serotoninérgicos. Los animales se dividen en varios grupos, en función de los agonistas y/o antagonistas administrados.

1.2.1- Ratas normoglucémicas

Todos los experimentos dedicados al análisis de los receptores implicados en las acciones serotoninérgicas inhibitoras de la transmisión simpática a nivel cardiovascular, en ratas normoglucémicas, fueron realizados en trabajos previos en nuestro laboratorio (Morán *et al.*, 1994b y 1998; Fernández, 1999), de tal modo, que en este trabajo de Tesis se han realizado únicamente los experimentos encaminados a determinar si hay otros mediadores o mecanismos indirectos implicados en dicha inhibición. En concreto,

se analiza la posible implicación de la vía del óxido nítrico, del GMPc, la vía de las ciclooxigenasas, así como los canales de K⁺-ATP dependientes.

Grupo 1 (lotes 1-3), destinados a la evaluación de la posible implicación del NO.

En estos lotes, después de realizar la curva estimulación respuesta E0 se administra por vía intravenosa L-NAME (10 mg/kg), que es un inhibidor de la óxido nítrico sintasa (NOS), realizando a los 30 minutos de la administración la curva estimulación-respuesta control (E0_{L-NAME}). A continuación se perfunde suero fisiológico (1 ml/h), 8-OH-DPAT (20 µg/kg/min) o L-694,247 (1 µg/kg/min), haciendo en todos los casos tres nuevas curvas estimulación-respuesta (Tabla 8).

Tratamiento	Dosis (µg/kg/min)	Tipo/Subtipo de receptor activado	Lotes
Solución Salina	1 ml/h		1
8-OH-DPAT	20	5-HT _{1A}	2
L-694,247	1	5-HT _{1D}	3

Tabla 8: Lotes de animales normoglucémicos tratados con diferentes agonistas serotoninérgicos tras administrar L-NAME en experimentos de estimulación simpática total.

Grupo 2 (lotes 4-6), destinados a evaluar la posible participación del GMPc.

En estos lotes, tras la curva E0 se administra un inhibidor de la guanilato ciclasa, ODQ (10 µg/kg) realizando su curva control correspondiente a los 10 minutos y perfundiendo posteriormente suero fisiológico (1 ml/h), 8-OH-DPAT (20 µg/kg/min) o L-694,247 (1 µg/kg/min) y realizando para cada agonista serotoninérgico las tres curvas estimulación-respuesta en las condiciones anteriormente descritas (Tabla 9).

Tratamiento	Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$)	Tipo/Subtipo de receptor activado	Lotes
Solución Salina	1 ml/h		4
8-OH-DPAT	20	5-HT _{1A}	5
L-694,247	1	5-HT _{1D}	6

Tabla 9: Lotes de animales normoglucémicos tratados con agonistas serotoninérgicos en presencia de ODQ en experimentos de estimulación simpática total.

Grupo 3 (lotes 7-9), para comprobar la posible implicación de la vía de las ciclooxigenasas.

En estos lotes, una vez realizada la curva control para indometacina (2 mg/kg), inhibidor de las ciclooxigenasas, 10 minutos después de su administración por vía intravenosa, se perfunde suero fisiológico (1 ml/h), 8-OH-DPAT (20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) o L-694,247 (1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) y se realizan las tres curvas estimulación-respuesta (Tabla 10).

Tratamiento	Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$)	Tipo/Subtipo de receptor activado	Lotes
Solución Salina	1 ml/h		7
8-OH-DPAT	20	5-HT _{1A}	8
L-694,247	1	5-HT _{1D}	9

Tabla 10: Lotes de animales normoglucémicos tratados con agonistas serotoninérgicos en presencia de indometacina en experimentos de estimulación simpática total.

Grupo 4 (lotes 10-12), para analizar la posible intervención de canales K⁺-ATP dependientes.

En estos lotes, una vez realizada la curva control para glibenclamida (10 mg/kg), inhibidor de los canales de K⁺-ATP dependientes, 10 minutos después de su administración por vía intravenosa, se perfunde suero fisiológico (1 ml/h), 8-OH-DPAT (20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) o L-694,247 (1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) y se realizan las tres curvas estimulación-respuesta (Tabla 11).

Tratamiento	Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$)	Tipo/Subtipo de receptor activado	Lotes
Solución Salina	1 ml/h		10
8-OH-DPAT	20	5-HT _{1A}	11
L-694,247	1	5-HT _{1D}	12

Tabla 11: Lotes de animales normoglucémicos tratados con agonistas serotoninérgicos en presencia de indometacina en experimentos de estimulación simpática total.

1.2.2.- Ratas hiperglucémicas

En estos animales se estudiarán en primer lugar las acciones que diferentes agonistas serotoninérgicos ejercen sobre los efectos presores derivados de la estimulación simpática, así como los tipos y/o subtipos de receptores serotoninérgicos implicados (grupos 1, 2 y 3). A continuación se analizarán, al igual que en ratas normoglucémicas, la posible participación en dichas acciones de la vía del NO, del GMPc, ciclooxigenasas y canales de K⁺-ATP dependientes.

Grupo 1 (lotes 1-14): en este grupo, tras la realización de la curva E0, los animales reciben perfusiones continuas de solución salina (1 ml/h), 5-HT o diferentes dosis de los agonistas serotoninérgicos 5-CT, 8-OH-DPAT, CGS-12066B, L-694,247, α -metil-5-HT y 1-fenilbiguanida. A los 5 minutos de iniciada la perfusión se realizan tres nuevas curvas (E1, E2 y E3) en idénticas condiciones a las descritas para la curva E0 (Tabla 12).

Tratamiento	Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$)	Tipo/Subtipo de receptor activado	Lotes
Solución Salina	1 ml/kg		1
5-HT	5, 10, 80	5-HT_{1,2,3,4,5,6,7}	2, 3, 4
5-CT	5	5-HT₁	5
8-OH-DPAT	5, 10, 20	5-HT_{1A}	6, 7, 8
CGS-12066B	5	5-HT_{1B}	9
L-694,247	5, 20	5-HT_{1D}	10, 11
α-metil-5-HT	5	5-HT₂	12
1-fenilbiguanida	5, 40	5-HT₃	13, 14

Tabla 12: Lotes de animales hiperglucémicos tratados con agonistas serotoninérgicos en experimentos de estimulación simpática total.

Grupo 2 (lotes 15-19): después de la estimulación E0 los animales de estos lotes reciben por vía intravenosa, una dosis de distintos antagonistas serotoninérgicos: metiotepina (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$), ritanserina (1 mg/kg), MDL-72222 (2 mg/kg) y WAY-100,635 (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) realizando una nueva curva control ($E0_{\text{antagonista}}$) 10 minutos después de la administración de cada antagonista. Terminada esta $E0_{\text{antagonista}}$ se perfunden, en presencia de cada antagonista, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ de 5-HT y se realizan las tres curvas de estimulación correspondientes (E1, E2 y E3). El lote 19 de este grupo recibe una perfusión del agonista 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) una vez tratado con WAY-100,635 (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (Tabla 13).

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Tipo/Subtipo de receptor activado	Agonista	Lotes
Metiotepina	0,1	5-HT _{1,2,5,6,7}	5-HT	15
Ritanserina	1	5-HT ₂	5-HT	16
MDL-72222	2	5-HT ₃	5-HT	17
WAY-100,635	0,1	5-HT _{1A}	5-HT	18, 19
			8-OH-DPAT	

Tabla 13: Lotes de animales hiperglucémicos tratados con antagonistas serotoninérgicos y su combinación con agonistas en experimentos de estimulación simpática total.

Grupo 3 (lotes 20-22): en este grupo los incrementos de presión arterial se inducen por la administración exógena de noradrenalina (NA) (0,01, 0,05, 0,1 y 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.),

obteniéndose curvas dosis-respuesta a NA antes (E'0) y después (E'1, E'2 y E'3) de la perfusión continua de solución salina (1 ml/h), de 5-hidroxitriptamina (10 µg/kg/min) o de 8-OH-DPAT (10 µg/kg/min) (Tabla 14).

Tratamiento	Dosis (µg/kg/min)	Tipo/Subtipo de receptor activado	Lote
Solución Salina	1 ml/h		20
5-HT	10	5-HT _{1,2,3,4,5,6,7}	21
8-OH-DPAT	10	5-HT _{1A}	22

Tabla 14: Lotes de animales hiperglucémicos utilizados en los experimentos con administración exógena de NA.

Grupo 4 (lotes 23-26): después de realizar la curva estimulación respuesta E0 se administra por vía intravenosa L-NAME (10 mg/kg), que es un inhibidor de la óxido nítrico sintasa (NOS), realizando a los 30 minutos de la administración la curva estimulación-respuesta control (E0_{L-NAME}). A continuación se perfunde suero fisiológico (1 ml/h), 5-HT (10 µg/kg/min) u 8-OH-DPAT (10 µg/kg/min) (lotes 23-25), haciendo en todos los casos tres nuevas curvas estimulación-respuesta. En el lote 26 se administra WAY 100,635 (100 µg/kg) 10 minutos antes de comenzar la perfusión de serotonina (10 µg/kg/min) (Tabla 15).

Tratamiento	Dosis (µg/kg/min)	Tipo/Subtipo de receptor activado	Lotes
Solución Salina	1 ml/h		23
5-HT	10	5-HT _{1,2,3,4,5,6,7}	24
8-OH-DPAT	10	5-HT _{1A}	25
WAY-100,635+	0,1 mg/kg	5-HT _{1A}	26
8-OH-DPAT	10		

Tabla 15: Lotes de animales hiperglucémicos tratados con diferentes agonistas serotoninérgicos, tras administrar L-NAME, en experimentos de estimulación simpática total.

Grupo 5 (lotes 27-29): en estos lotes, 30 minutos después de la administración de L-NAME (10 mg/kg) por vía intravenosa, se administra L-arginina (100 mg/kg)

realizando su curva control correspondiente y perfundiendo suero fisiológico (1 ml/h), 5-HT (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) u 8-OH-DPAT (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) y se realizan las tres curvas estimulación-respuesta en las mismas condiciones anteriormente descritas (Tabla 16).

Tratamiento	Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$)	Tipo/Subtipo de receptor activado	Lotes
Solución Salina	1 ml/h		27
5-HT	10	5-HT _{1,2,3,4,5,6,7}	28
8-OH-DPAT	10	5-HT _{1A}	29

Tabla 16: Lotes de animales hiperglucémicos tratados con agonistas serotoninérgicos, en presencia de L-NAME+L-arginina, en experimentos de estimulación simpática total.

Grupo 6 (lotes 30-31): en estos lotes, 30 minutos después de la administración de L-NAME (10 mg/kg) por vía intravenosa, se administra D-arginina (100 mg/kg) realizando su curva control correspondiente y perfundiendo suero fisiológico (1 ml/h) o 5-HT (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) y se realizan las tres curvas estimulación-respuesta (Tabla 17).

Tratamiento	Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$)	Tipo/Subtipo de receptor activado	Lotes
Solución Salina	1 ml/h		30
5-HT	10	5-HT _{1,2,3,4,5,6,7}	31

Tabla 17: Lotes de animales hiperglucémicos tratados con agonistas serotoninérgicos, en presencia de L-NAME+D-arginina, en experimentos de estimulación simpática total.

Grupo 7 (lotes 32-33): en estos lotes, tras la curva E0 se administra ODQ (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$), un inhibidor de la guanilato ciclasa, realizando su curva control correspondiente a los 10 minutos y perfundiendo posteriormente suero fisiológico (1 ml/h) u 8-OH-DPAT (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) y realizando para cada agonista serotoninérgico las tres curvas estimulación-respuesta en las condiciones anteriormente descritas (Tabla 18).

Tratamiento	Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$)	Tipo/Subtipo de receptor activado	Lotes
Solución Salina	1 ml/h		32
8-OH-DPAT	10	5-HT _{1A}	33

Tabla 18: Lotes de animales hiperglucémicos tratados con agonistas serotoninérgicos, en presencia de ODQ, en experimentos de estimulación simpática total.

Grupo 8 (lotes 34-35): en estos lotes, una vez realizada la curva control para indometacina (2 mg/kg), inhibidor de las ciclooxigenasas, 10 minutos después de su administración por vía intravenosa, se perfunde suero fisiológico (1 ml/h) u 8-OH-DPAT (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) y se realizan tres nuevas curvas estimulación-respuesta (Tabla 19).

Tratamiento	Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$)	Tipo/Subtipo de receptor activado	Lotes
Solución Salina	1 ml/h		34
8-OH-DPAT	10	5-HT _{1A}	35

Tabla 19: Lotes de animales hiperglucémicos tratados con agonistas serotoninérgicos, en presencia de indometacina, en experimentos de estimulación simpática total.

Grupo 9 (lotes 36-37): en estos lotes, una vez realizada la curva control para glibenclamida (10 mg/kg), inhibidor de los canales de K⁺-ATP dependientes, 10 minutos después de su administración por vía intravenosa, se perfunde suero fisiológico (1 ml/h) u 8-OH-DPAT (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) y se realizan tres nuevas curvas estimulación-respuesta (Tabla 20).

Tratamiento	Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$)	Tipo/Subtipo de receptor activado	Lotes
Solución Salina	1 ml/h		36
8-OH-DPAT	20	5-HT _{1A}	37

Tabla 20: Lotes de animales hiperglucémicos tratados con agonistas serotoninérgicos, en presencia de indometacina, en experimentos de estimulación simpática total.

1.3.- Material utilizado

- ⇒ Ratas Wistar machos de 250-350 g de peso.
- ⇒ Medidor de glucemia Accutrend Sensor (Roche).
- ⇒ Tiras reactivas de medición de glucosa Accutrend Sensor Comfort Glucose.
- ⇒ Transductores de presión arterial Letica.
- ⇒ Amplificador de presión PRS-206 y amplificador de frecuencia CAR-306 de Letica.
- ⇒ Polígrafos de dos canales: Poligraph 2006 y Poligraph 2000 de Letica.
- ⇒ Bomba respiratoria Harvard.
- ⇒ Bomba perfusora Harvard apparatus pump 122.
- ⇒ Estimulador Cibertec CS-9.
- ⇒ Varilla metálica de 1,5 mm de diámetro y 21 cm de longitud.
- ⇒ Material quirúrgico diverso.
- ⇒ Fármacos: maleato de 5-carboxamidotriptamina (5-CT) (RBI), 8-OH-DPAT (RBI), CGS-12066B (RBI), clorhidrato de d-tubocurarina (Sigma), heparina sódica (Roche), L-694,247 (RBI), maleato de metiotepina (Roche), bitartrato de noradrenalina (Sigma), pentobarbital sódico (Sigma), solución salina (NaCl 0,9%), sulfato de atropina (Scharlau), sulfato de serotonina-creatinina (Sigma), WAY-100,635 (Tocris), 1-fenilbiguanida (RBI), α -metil-5-HT (Tocris), ritanserina (Janssen Farmacéutica), MDL-72222 (RBI), L-NAME (Sigma), L-arginina (RBI), D-arginina (Tocris), ODQ (Tocris), indometacina (Merck, Sharp and Dohme), glibenclamida (RBI), insulina (Novo Nordisk) y aloxano (Sigma). Todos los fármacos se disolvían en agua, a excepción de ritanserina que se preparaba en ácido láctico 0,04 mol/l, ODQ que se disolvía en DMSO/NaCl 0,9% (1:1000v/v) y

glibenclamida que se preparaba en polietilenglicol 400 (33%), etanol (33%) y NaOH 0,2 M (csp 100 ml).

1.4.- Expresión y análisis de los resultados

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

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

Todos los datos representan el valor medio \pm sem (error estándar de la media), de al menos cinco experimentos, habiéndose determinado en todos los casos la significancia estadística mediante el análisis de la varianza (ANOVA) para datos múltiples. Las diferencias se consideran significativas cuando $p < 0,05$.

2.- Estimulación colinérgica

2.1.- Preparación del animal

Los animales se anestesian con pentobarbital sódico (60 mg/kg, i.p.), y se colocan en posición decúbito-supino en la mesa de operaciones, manteniendo en todo momento su temperatura corporal mediante una fuente de calor. Se les practica la traqueotomía, se canulan las venas yugulares derecha e izquierda como vías de administración de fármacos y se aísla la arteria carótida izquierda. Seguidamente se conecta la cánula traqueal a una bomba de respiración (1 ml aire/100 g de peso, 50 strokes/min), y se procede a la desmedulación del animal según la técnica descrita por Gillespie y Muir (1967), mediante la inserción de una varilla metálica de 1,5 mm de diámetro, a través del seno orbital y el foramen magnum por todo el cordón espinal hasta la primera vértebra sacra, a una distancia total de aproximadamente 15 cm. De este modo se consigue la destrucción de todo el sistema nervioso central conservando intactos los nervios troncales que salen de él (Zukowska-Grojec *et al.*, 1983).

Posteriormente se hepariniza al animal (1000 UI/kg) y se procede a la canulación de la arteria carótida izquierda que se conectará a un transductor de presión acoplado a un amplificador PRS-206 y un cardiotacómetro CAR-306, incluidos en un POLIGRAPH-2006 de Letica, lo que permite controlar durante todo el experimento la presión arterial y la frecuencia cardíaca del animal. Posteriormente se aíslan ambos nervios vagos y se atan a nivel cervical, cortándolos a nivel de la ligadura hecha, para evitar efectos reflejos vagales tanto aferentes como eferentes.

A continuación se procede a la administración, por vía intravenosa, de d-tubocurarina (2 mg/kg) para evitar las posibles contracciones musculares provocadas por la estimulación eléctrica. Transcurridos cinco minutos se administra al animal, también por vía intravenosa, atenolol (1 mg/kg) para evitar los posibles efectos simpáticos a nivel cardíaco.

2.2. - Protocolo experimental

Una vez estabilizado el animal se procede a la estimulación vagal por medio de un electrodo bipolar de platino que se coloca en la parte cervical distal del nervio vago derecho y se estimula eléctricamente con pulsos en trenes, a intensidad supramaximal de 15 ± 3 V de 1 ms de duración a una frecuencia de 3, 6 y 9 Hz durante 15 segundos a intervalos de 5 min, producidos por un estimulador Cibertec Stimulation CS-9.

Esta primera estimulación permite la obtención de una primera curva estimulación-respuesta que denominamos E0, A continuación se realiza otra nueva curva E1 estimulando a las frecuencias indicadas cada 5 min, después de la administración intravenosa, a través de la vena yugular derecha, de suero fisiológico y/o agonistas serotoninérgicos (Morán *et al.*, 1994a). Los animales se dividen en varios grupos, en función de los agonistas y/o antagonistas administrados.

2.2.1- Ratas hiperglucémicas

Grupo 1 (lotes 1-16), destinados a evaluar la influencia de diferentes agonistas serotoninérgicos.

En este grupo, tras la realización de la curva E0, a los animales se les administra solución salina (1 ml/h), 5-HT o diferentes dosis de los agonistas serotoninérgicos son 5-CT, 8-OH-DPAT, CGS-12066B, L-694,247, α -metil-5-HT y 1-fenilbiguanida (Tabla 21). A los 5 minutos de la administración se realiza una nueva curva, E1, en idénticas condiciones a las descritas para la curva E0,

Tratamiento	Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Tipo/Subtipo de receptor activado	Lotes
Solución Salina	1 ml/kg		1
5-HT	10, 15, 30, 50, 100, 200	5-HT _{1,2,3,4,5,6,7}	2, 3, 4, 5, 6, 7
5-CT	10, 50, 100, 150	5-HT ₁	8, 9, 10, 11
8-OH-DPAT	50	5-HT _{1A}	12
CGS-12066B	50	5-HT _{1B}	13
L-694,247	50	5-HT _{1D}	14
α-metil-5-HT	150	5-HT ₂	15
1-fenilbiguanida	150	5-HT ₃	16

Tabla 21: Lotes de animales hiperglucémicos tratados con agonistas serotoninérgicos en experimentos de estimulación eléctrica colinérgica.

Grupo 2 (lotes 17-20), para evaluar el tipo y/o subtipo de receptores serotoninérgicos implicados.

Después de la estimulación E0 los animales de estos lotes reciben por vía intravenosa, una dosis de distintos antagonistas serotoninérgicos: metiotepina (1 mg/kg), WAY-100,635 (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$), BRL-15572 (1 mg/kg) o mesulergina (1 mg/kg) realizando una nueva curva control ($E0_{\text{antagonista}}$) 5 minutos después de la administración de cada antagonista. Terminada esta $E0_{\text{antagonista}}$ se administran, en presencia de cada antagonista respectivamente 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de 5-CT, 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de 8-OH-DPAT, 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de L-694,247 o 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de 5-CT, y se realiza la curva de estimulación correspondiente E1 (Tabla 22).

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Tipo/Subtipo de receptor activado	Agonista	Lotes
Metiotepina	1	5-HT _{1,2,5,6,7}	5-CT 50	17
WAY-100,635	0,1	5-HT _{1A}	8-OH-DPAT	18
BRL-15572	1	5-HT _{1D}	L-694,247	19
Mesulergina	1	5-HT ₇	5-CT 10	20

Tabla 22: Lotes de animales hiperglucémicos tratados con antagonistas serotoninérgicos y su combinación con agonistas en estimulación eléctrica colinérgica.

Grupo 3 (lotes 21-25), destinados a determinar la naturaleza pre y/o postsináptica de las acciones serotoninérgicas.

En este grupo las variaciones de frecuencia cardíaca se inducen por la administración de acetilcolina exógena (ACh) (1, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.), obteniéndose curvas dosis-respuesta a ACh antes (E'0) y después E'1 de la administración de solución salina (1 ml/h), de 5-CT (10 y 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$), de 8-OH-DPAT (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) o de L-694,247 (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (Tabla 23).

Tratamiento	Dosis ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Tipo/Subtipo de receptor activado	Lote
Solución Salina	1 ml/h		21
5-CT	10, 50	5-HT ₁	22, 23
8-OH-DPAT	50	5-HT _{1A}	24
L-694,247	50	5-HT _{1D}	25

Tabla 23: Lotes de animales hiperglucémicos tratados con agonistas serotoninérgicos en presencia de ACh exógena

Grupo 4 (lote 26): a los animales de estos lotes, previamente a la estimulación eléctrica se les inyectó atropina (0,3 y 0,5 mg/kg) y posteriormente se realizó una curva de estimulación (A'0) para confirmar la naturaleza colinérgica de la respuesta derivada de la estimulación eléctrica.

2.3.- Material utilizado

- ⇒ Ratas Wistar machos de 250-350 g de peso.
- ⇒ Medidor de glucemia Accutrend Sensor (Roche).
- ⇒ Tiras reactivas de medición de glucosa Accutrend Sensor Comfort Glucose.
- ⇒ Transductores de presión arterial Letica.

- ⇒ Amplificador de presión PRS-206 y amplificador de frecuencia CAR-306 de Letica.
- ⇒ Polígrafos de dos canales: Poligraph 2006 y Poligraph 2000 de Letica.
- ⇒ Bomba respiratoria Harvard.
- ⇒ Estimulador Cibertec CS-9.
- ⇒ Electrodo de estimulación.
- ⇒ Material quirúrgico diverso.
- ⇒ Fármacos: maleato de 5-carboxamidotriptamina (5-CT) (RBI), 8-OH-DPAT (RBI), CGS-12066B (RBI), clorhidrato de d-tubocurarina (Sigma), heparina sódica (Roche), L-694,247 (RBI), maleato de metiotepina (Roche), pentobarbital sódico (Sigma), solución salina (NaCl 0,9%), sulfato de atropina (Scharlau), sulfato de serotonina-creatinina (Sigma), WAY-100,635 (Tocris), hidrocloreto de BRL-15572, atenolol (Sigma), acetilcolina (Sigma), 1-fenilbiguanida (RBI), α -metil5-HT (Tocris), hidrocloreto de mesulergina (RBI), insulina (Novo Nordisk) y aloxano (Sigma). Todos los fármacos se disolvían en agua, a excepción de BRL-15572 que se disolvió en propilenglicol al 20%.

2.4.- Expresión y análisis de los resultados

Las variaciones de frecuencia cardíaca obtenidas por estimulación eléctrica o por administración de acetilcolina exógena, se expresan como descensos, en pulsos por minuto (p.p.m.), de la frecuencia cardíaca (FC), obtenida antes de la estimulación y la máxima bradicardia estabilizada conseguida con cada estimulación o administración de Ach.

Todos los datos representan el valor medio \pm sem (error estándar de la media), de al menos cinco experimentos, habiéndose determinado en todos los casos la significancia estadística mediante el análisis de la varianza (ANOVA). Las diferencias se consideran significativas cuando $p < 0,05$.

III.- ESTUDIOS *IN VITRO*: RIÑÓN AISLADO PERFUNDIDO

Los animales (ratas Wistar macho procedentes del animalario de la Facultad de Medicina, Universidad Louis Pasteur, Strasbourg), tanto controles como diabéticos, a los 28 días de haber inducido la diabetes, fueron estabulados en jaulas metabólicas durante dos días, el primero para su acostumbramiento y el segundo para la recogida de muestras. En estos días se hizo una toma de sangre, se midió la ingesta líquida y sólida realizada durante 24 horas, así como el volumen orinado en ese día. Tanto las muestras de sangre como de orina se llevaron a analizar al servicio de Bioquímica del Hospital Civil de Estrasburgo para conocer los siguientes parámetros: sodio plasmático, creatinina plasmática, glucosa en sangre, excreción urinaria de sodio, creatinina y glucosa, y a partir de ellos obtener la filtración glomerular de sodio y su reabsorción, y comparar los datos entre diabéticas y normoglucémicas.

Una vez realizado este estudio, los animales se anestesian con pentobarbital sódico (45 mg/kg, i.p). El animal se coloca en posición decúbito-supino y se procede a la disección y perfusión del riñón derecho (Schmidt y Imbs, 1981; Musso *et al.*, 1989; Barthelmebs *et al.*, 1996). Para ello se aísla el cruce arteria aorta-arteria mesentérica-arteria renal, anudando todas las arterias colaterales que puedan estar próximas (arteria renal izquierda, arteria suprarrenal, etc.). Se canula la arteria aorta a nivel infrarrenal para inicialmente medir la presión del animal y posteriormente la presión de perfusión renal. Del mismo modo se canula la arteria mesentérica como vía de perfusión renal.

Se aísla el riñón derecho y se coloca sobre una bandeja termostatzada a 37°C.

Se inicia la perfusión en circuito abierto, siguiendo una técnica utilizada desde hace tiempo en el laboratorio de Strasbourg (Schmidt-Barthelmebs y Imbs, 1981, Musso *et al.*, 1989, Barthelmebs *et al.*, 1996, Bagaté *et al.*, 2001, Loichot *et al.* 2001), con una solución Tyrode de composición NaHCO₃ 12 mM, NaH₂PO₄ 0,42 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 1,1 mM, glucosa 10 mM, inmediatamente después de la ligadura de la aorta a nivel suprarrenal, para evitar así la isquemia renal.

En este momento se procede a la muerte del animal cortando la aorta a nivel suprarrenal; posteriormente se introducen sendos catéteres en la vena renal derecha, utilizada como vía de expulsión del efluente venoso y en el uréter, que permite la excreción de orina.

Se guarda un periodo de estabilización de 30 minutos, durante los 10 primeros minutos se perfunde una solución de Tyrode modificada: NaHCO_3 12 mM, NaH_2PO_4 0,42 mM, NaCl 39,7 mM, KCl 100 mM, CaCl_2 1,8 mM, MgCl_2 1,1 mM, glucosa 10 mM, con alta concentración de KCl (que permitirá estabilizar las respuestas constrictoras posteriores).

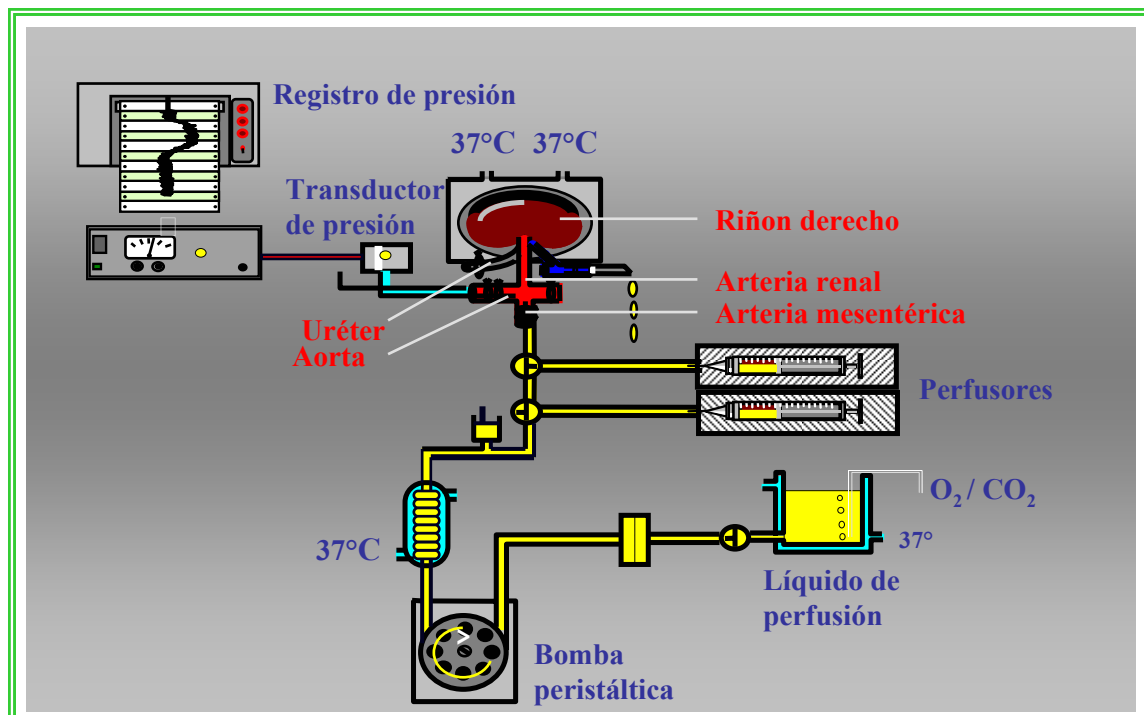


Figura 16: Esquema del montaje de riñón aislado perfundido.

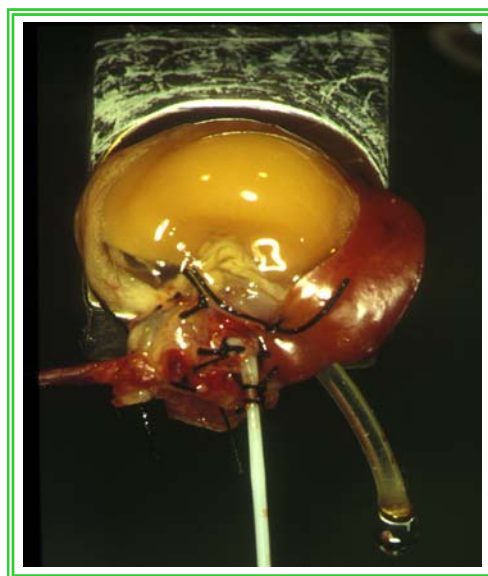


Figura 17: Imagen de riñón aislado perfundido.

En una serie de experimentos en los que se va a estudiar el posible efecto de la modificación de los niveles de glucosa en estado agudo, en el medio de perfusión se utiliza una concentración de glucosa de 5 mM (y no de 10 mM, que es la concentración usada normalmente).

En otra serie de experimentos en los que se va a estudiar la posible implicación del óxido nítrico en las acciones de serotonina y de agonistas serotoninérgicos, se añade al medio de perfusión Tyrode un inhibidor de la NO sintasa a concentraciones de 100 μ M.

Se ajusta el flujo renal a 8 ml/min, mediante la bomba peristáltica, que permite mantener una presión de perfusión renal similar a la presión arterial inicial del animal, y se mantiene constante durante todo el experimento.

La resistencia vascular renal se calcula como el cociente entre la presión de perfusión/flujo renal.

1.- Estudio de las respuestas vasoconstrictoras

Para el estudio de las respuestas vasoconstrictoras se hicieron curvas concentración-respuesta para diferentes agonistas serotoninérgicos ligados a la acción vasoconstrictora de este transmisor endógeno.

Cada concentración se perfunde hasta que se obtiene una respuesta mantenida. En ese momento la infusión se para y se deja que el riñón vuelva al tono basal (presión de perfusión inicial), antes de comenzar la perfusión de la siguiente concentración.

En cada experimento, se hace una sola curva concentración-respuesta a uno de los agonistas de cada tipo de receptores.

La vasoconstricción se expresa posteriormente como incrementos en la resistencia vascular renal.

1.1.- Ratas normoglucémicas

Grupo 1: se realizan curvas concentración-respuesta para 5-HT (en medio de perfusión con glucosa 10 mM y 5 mM), fenilefrina (FE), angiotensina II, α -metil-5-HT, agonista selectivo de receptores 5-HT₂, DOI, agonista de receptores 5-HT_{2A}, BW723C86, agonista selectivo de receptores 5-HT_{2B}, *m*-CPP, agonista selectivo de receptores 5-HT_{2C}, 1-fenilbiguanida, agonista de receptores 5-HT₃ y L-694,247, agonista selectivo de receptores 5-HT_{1D}. Todos ellos se incluyen en el líquido de perfusión Tyrode en la zona próxima al riñón.

FE	fenilefrina	Agonista α -adrenérgico	0,1 – 30 μ M
Ang II	angiotensina II	Agonista AT ₁ - AT ₂	1,5 – 300 nM
5-HT	serotonina	Agonista 5-HT	0,03 – 5 μ M
α -metil-5-HT	α -metil-serotonina	Agonista 5-HT ₂	0,1 – 5 μ M
DOI	(\pm)-1-(2,5-dimetoxi-4-iodofenil)-2-aminopropano	Agonista 5-HT _{2A}	1 – 300 nM
BW723C86		Agonista 5-HT _{2B}	0,03 – 15 μ M
<i>m</i> -CPP	1-(3-chlorofenil)piperazina	Agonista 5-HT _{2C}	0,003 – 10 μ M
1-fenilbiguanida		Agonista 5-HT ₃	1 – 3 μ M
L-694,247	N-[4-[[5-[3-(2-aminoetil)-1H-indol-5-il]-1,2,4oxadiazol-3-il]metil]fenil]-metanosulfonamida	Agonista 5-HT _{1D}	0,03 – 1.5 μ M

Tabla 24: Agonistas y antagonistas serotoninérgicos ensayados en las preparaciones de riñón aislado perfundido.

Grupo 2: en los animales de este grupo, en presencia de L-NNA 100 μ M, un inhibidor de la NO sintasa, se realizó una curva concentración-respuesta para 5-HT.

1.2.- Ratas hiperglucémicas

Grupo 1: En estos experimentos se perfunde FE, 5-HT, α -metil-5-HT, DOI, *m*-CPP o BW723C86 incluidos en el líquido de perfusión Tyrode, en la zona próxima al riñón.

Grupo 2: En presencia de L-NNA 100 μ M, un inhibidor de la NO sintasa, se realizó una curva concentración-respuesta para 5-HT.

2.- Estudio de las respuestas vasodilatadoras

Para evaluar las respuestas vasodilatadoras se induce un tono vascular a nivel renal (ya que el riñón aislado está en estado de dilatación máxima) mediante inyecciones repetidas de Ang II a concentraciones de alrededor de 5 nM, o FE a concentraciones alrededor de 1 μ M, de 15 segundos, cada 2 minutos, para conseguir unos picos de constricción estable de valores aproximados de 40 mm Hg.

Sobre este tono inducido se perfunden sustancias vasodilatadoras en el líquido de perfusión en la zona próxima al riñón, y se comparan las respuestas con la dilatación obtenida a concentraciones supramaximales de agentes vasodilatadores endotelio-dependientes (Ach) o endotelio-independientes (nitroprusiato de sodio, NPNa).

El efecto vasodilatador se expresa en porcentaje de inhibición del tono inducido por FE o por Ang II.

2.1.- Ratas normoglucémicas

Grupo 1: estudio del efecto vasodilatador de la perfusión de acetilcolina (0,03 y 1 μM) (con glucosa 10 mM y 5 mM en el medio de perfusión), como agente vasodilatador endotelio dependiente y de nitroprusiato de sodio (1, 3 y 5 μM) como agente vasodilatador endotelio-independiente.

Grupo 2: en este grupo se estudia el efecto vasodilatador de la perfusión de 5-CT, agonista selectivo de receptores 5-HT_{1/7} (1, 3 y 5 μM), de 8-OH-DPAT, agonista selectivo de receptores 5-HT_{1A} (1, 3 y 5 μM), del agonista selectivo de receptores 5-HT_{1B}, CGS-12066B (0,03, 0,3, 1 y 5 μM) (en presencia de solución Tyrode con concentración de glucosa 5 mM o 10 mM) o del agonista selectivo de receptores 5-HT_{2B}, BW723C86 (0,03 y 3 μM).

Grupo 3: Estudio del efecto de antagonistas selectivos de diferentes receptores de serotonina. En un subgrupo se perfundió mesulergina (3 μM), antagonista selectivo de receptores 5-HT₇, comenzando 10 minutos antes y continuando durante toda la perfusión del agonista selectivo de receptores 5-HT_{1/7}, 5-CT (0,03, 0,3, 1 y 1,5 μM). En otro subgrupo se perfundió WAY-100,635 (0,1 μM), perfusión que se comenzó 10

minutos antes y se continuó durante las diferentes perfusiones de 8-OH-DPAT (1, 3 y 5 μM).

Grupo 4: Estudio de la perfusión de Ach (0,03 y 1 μM) y de CGS-12066B, agonista selectivo de receptores 5-HT_{1B} (0,03, 0,3, 1 y 5 μM) en presencia de la perfusión de L-NNA (100 μM) disuelto en la solución Tyrode, un inhibidor de la NO sintasa, para estudiar la posible implicación del NO en la actividad vasodilatadora de estos compuestos.

2.2.- Ratas hiperglucémicas

Grupo 1: Estudio de las acciones inducidas por la perfusión de Ach (0,03 y 1 μM), NPNa (0,03 y 3 μM), 8-OH-DPAT (1, 3 y 5 μM), agonista selectivo de receptores 5-HT_{1A}, CGS-12066B (0,03, 0,3, 1 y 1,5 μM), agonista selectivo de receptores 5-HT_{1B}, o BW723C86 (0,3, 1 y 1,5 μM), agonista selectivo de receptores 5-HT_{2B}.

Grupo 2: Estudio de las acciones inducidas por la perfusión de Ach (0,03 y 1 μM) y de CGS-12066B, agonista selectivo de receptores 5-HT_{1B} (0,03, 0,3, 1 y 5 μM) en presencia de una perfusión de L-NNA un inhibidor de la NO sintasa (100 μM) disuelto en la solución Tyrode, para estudiar la posible implicación del NO en la actividad vasodilatadora de estos compuestos.

3.- Material utilizado

⇒ Ratas Wistar machos de 250-350 g de peso.

⇒ Medidor de glucemia Glucometer 4[®] (Department AMES Bayer Diagnostic).

- ⇒ Tiras reactivas de medición de glucosa Glucotide[®] (Department AMES Bayer Diagnostic).
- ⇒ Microscopio Nikon.
- ⇒ Transductores de presión arterial Statham P23Db transducer.
- ⇒ Philips PM 8222 Recorder (Philips France).
- ⇒ Material quirúrgico diverso.

- ⇒ Fármacos: maleato de 5-carboxamidotriptamina (5-CT) (RBI), 8-OH-DPAT (RBI), CGS-12066B (RBI), heparina sódica (Roche), L-694,247 (RBI), pentobarbital sódico (Sigma), solución salina (NaCl 0,9%), sulfato de serotonina-creatinina (Sigma), WAY-100,635 (Tocris), acetilcolina (Sigma), 1-fenilbiguanida (RBI), α -metil5-HT (Tocris), DOI (Sigma), hidrocloreuro de BW-723C86 (Tocris), *m*-CPP (RBI), hidrocloreuro de mesulergina (RBI), NPNa (Sigma), L-NNA (Sigma), fenilefrina (Sigma), angiotensina II (Sigma), insulina (Ultratard[®] HM ge 40, Novo Nordisk) y estreptozotocina (Sigma). Todos los fármacos se disolvían en agua, a excepción de ritanserina que se disolvió en DMSO al 0,01%, L-694,247 que se disolvió en HCl/H₂O y L-NNA que se disolvió en HCl 1N.

4.- Expresión y análisis de los resultados

Las variaciones de presión de perfusión obtenidas se expresan como incrementos, en milímetros de mercurio (mm Hg), de la presión de perfusión media obtenida antes y después de la administración de los productos a ensayar.

Las vasodilataciones son estudiadas en el máximo de su respuesta durante la perfusión de cada producto, y se expresan en % de reversión del tono previamente inducido por fenilefrina o angiotensina II. La respuesta máxima (E_{max}) y la concentración eficaz 50 (EC_{50}) se obtienen de los datos derivados de la recta de

regresión obtenida a partir de la curva de cada agonista, mediante el programa GraphPad Prism, GraphPad Software, (San Diego, USA), utilizando la ecuación $E = E_{\max} / (1 + (EC_{50}/C))$, en la que concentración es C y efecto es E.

Todos los datos representan el valor medio \pm sem (error estándar de la media), de al menos cinco experimentos, habiéndose determinado en todos los casos la significancia estadística mediante el análisis de la varianza (ANOVA) para datos múltiples. Las diferencias se consideran significativas cuando $p < 0,05$.

IV.- TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR: EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE LOS RECEPTORES SEROTONÉRGICOS

1.- Aislamiento de vasos sanguíneos

La toma de muestras se hizo a nivel del árbol vascular intrarrenal y de la aorta torácica. Los animales se anestesiaron con éter y se decapitaron. El árbol vascular intrarrenal se preparó según un método elaborado en el laboratorio (Endlich *et al.*, 2000). En concreto, el método de preparación consiste en extraer los riñones, decapsularlos y cortarlos longitudinalmente. Una vez cortados longitudinalmente se presionan sobre un tamiz de porosidad entre 100 y 300 μm y después se lavan con una solución de NaCl 0,9% con el fin de recuperar el árbol vascular intrarrenal. Del mismo modo se realiza la toma de muestras de la aorta torácica.

2.- Extracción del ARN

El ARN total de las muestras se preparó por el método de TRIzol-Reagent según el protocolo dado por el proveedor (Sigma-Aldrich) (Massfelder *et al.*, 2001 y 2002). El TRIzol es una solución monofásica de fenol y de isotiocianato de guanidina que mantiene íntegramente el ARN, destruyendo las células y disolviendo los demás componentes celulares. Las muestras de tejido (arteriolas intrarrenales y aorta, de 50 a 100 mg de cada una) se situaron inmediatamente después de su extracción en 1 ml de TRIzol, a temperatura ambiente, y se trituraron mecánicamente (taladro de Kontes, Sigma) en los 20 minutos siguientes, en una campana de extracción. Para asegurar la disociación de los complejos nucleoproteicos, las muestras se dejaron reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió cloroformo (0,2 ml por muestra) y se agitó fuertemente durante 15 segundos seguido de un periodo de reposo a temperatura ambiente de 2 a 15 minutos. Las muestras se centrifugaron a 12000 g durante 15 minutos a 4°C, lo que permite que el contenido de los tubos se separe en tres

fases: una fase orgánica inferior que contiene las proteínas, una interfase que contiene el ADN y, una fase acuosa superior transparente que contiene exclusivamente el ARN.

El ARN se precipita dentro de esta fase acuosa añadiendo 0,5 ml de isopropanol por cada ml de TRIzol. Los tubos fueron de nuevo agitados, y se dejaron a temperatura ambiente durante 10 minutos, y posteriormente se centrifugaron a 12000 g durante 10 minutos a 4°C. El precipitado del fondo es el ARN que se lavó con una solución de etanol al 75% y se centrifugó durante 5 minutos a 7500 g a 4°C. Se recuperó de nuevo ese precipitado y se secó al aire. Posteriormente se volvió a poner en suspensión en un agua que contiene 0,1% de dietilpirocarbonato, un inhibidor de la nucleasa. La pureza final de las muestras de ARN se calculó por espectrometría (densidad óptica de 260-280 nm). Un resultado igual o superior a 1,7 indica ausencia total de contaminación de nuestra muestra de ARN con ADN.

3.- Síntesis del ADNc por transcripción inversa (RT)

La transcripción inversa (RT) se realizó en un volumen de 40 μ l a 37° C durante 1 hora en presencia de ARN (3 μ g para la aorta, 3 μ g para el árbol arterial intrarrenal), 400 U de transcriptasa inversa (virus de la transcriptasa inversa de la leucemia de rata, Invitrogen), 10 U de inhibidor de la ribonucleasa (RNaseOUT™, Invitrogen), 1 mM de desoxinucleótidos trifosfatos y 1 μ M de trozos de p(dT)₁₅ (trozos específicos de secuencias poliA de ARN mensajero).

4.- Amplificación del ADNc por la reacción de polimerización en cadena (PCR) cuantitativa en tiempo real

El ADNc fue amplificado por el LightCycler® (Roche Diagnostic, Meylan, France), utilizando el kit LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostic). La reacción de polimerización en cadena (PCR) se realizó en un volumen de 20 μ l en presencia de 0,5 μ M de cebadores específicos “sentido” y “antisentido” para los diferentes receptores de 5-HT, 1 μ g BSA, 10 μ l LightCycler FastStart DNA

Master SYBR Green I y 2 μ l de ADNc (50 ng). Los cebadores utilizados están resumidos en la tabla 25 y corresponden a los descritos por Ullmer *et al.*, 1995 (receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}), o han sido identificados por el programa BLASTN a partir de bibliotecas genómicas conocidas (receptores 5-HT_{1D}, 5-HT_{2B}).

Receptor		Secuencia primaria	Tipo de ADNc amplificado
5-HT _{1A}	Sentido Antisentido	GAT GTG TTC AGT TTT GGC CAG G GGA GCG CTC CAA GGC GAT GGC A	195
5-HT _{1B}	Sentido Antisentido	ACT ACA TTT ACC AGG ACT CCA T CAG TGA CCG TGT ACA TGG TGC	228
5-HT _{1D}	Sentido Antisentido	TCT TCA CTC TGC TCG CTC AA ATG GGG AGG ACC AAG GAT AC	227
5-HT _{2A}	Sentido Antisentido	CAT CCT GTA TGG GTA CCG GT AAA GAC CTT CGA ATC ATC CTG	265
5-HT_{2B}	Sentido Antisentido	GGA GAA AAG GCT GCA GTA CG ATA ACC AGG CAG GAC ACA GG	155

Tabla 25: Cebadores utilizados para la reacción de polimerización en cadena a tiempo real.

La reacción de PCR para los receptores de 5-HT y para la GAPDH (utilizada como gen de referencia fueron los siguientes: 95°C durante 10 min seguido de 45 ciclos a 95°C durante 10 s, 60°C durante 5 s, y 72°C durante 12 s. El ADNc se reemplazó por agua libre de nucleasas para PCR como control negativo. Cada muestra se analizó dos veces y cuantificada con el software de análisis del LightCycler[®] de acuerdo con el protocolo del fabricante. La expresión relativa de cada muestra se calculó haciendo una normalización con la GAPDH, y los resultados se expresaron como porcentaje de expresión obtenidos a 0 h puestos al 100%. Los productos obtenidos de la PCR se separaron por electroforesis sobre un gel de agarosa 2% que contiene 0,5 μ g/ml de bromuro de etidio y se identificaron según tamaños para verificar el tamaño esperado para los diferentes receptores de 5-HT (ver Tabla 25).

5.- Material utilizado

- ⇒ Tamiz de porosidad entre 100 y 300 μm .
- ⇒ TRIzol Reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France).
- ⇒ Taladro de Kontes DUALL 20 (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France).
- ⇒ M-MLV transcriptasa inversa (virus de la transcriptasa inversa de la leucemia de rata, Invitrogen).
- ⇒ Inhibidor de la ribonucleasa (RNaseOUTTM, Invitrogen).
- ⇒ Cebadores específicos “sentido” y “antisentido” para los diferentes receptores de 5-HT (Eurobio).
- ⇒ kit LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostic).
- ⇒ LightCycler[®] (Roche Diagnostic, Meylan, France).
- ⇒ CapilaresLightCycler[®] de 20 μl (Roche Diagnostic).
- ⇒ Centrífuga Sigma 3K10 (Bioblock, Illkirch, France).
- ⇒ Ultracentrífuga TL-100 (Beckman).
- ⇒ Cubeta de electroforesis (Biorad).
- ⇒ Conos «RNase Free» (Fisher Scientific).
- ⇒ Micropipetas de 0,5 – 10 μl , 20-200 μl y 100-1000 μl (Lambda).

----- ***Resultados*** -----

I.- DIABETES INDUCIDA POR ESTREPTOZOTOCINA Y ALOXANO

La inducción de hiperglucemia (conseguida casi en el 100% de los animales), tanto con estreptozotocina como con aloxano, determina una pérdida inicial de peso en los animales, que posteriormente se recupera de forma progresiva aunque sin alcanzar en ningún momento los valores de los animales control en el caso del aloxano, mientras que esta pérdida de peso se mantiene durante todo el periodo de estabulación cuando se utiliza estreptozotocina (Figura 18 a,b).

En la inducción de la hiperglucemia con aloxano los animales, al inicio de los experimentos y previamente a la inducción de la diabetes, presentan unos valores de glucemia basal de $90,4 \pm 0,7$ mg/dl. La administración subcutánea de 150 mg/kg de aloxano aumenta estos valores hasta aproximadamente unos 500 mg/dl generándose así ratas hiperglucémicas (Figura 19a) que se mantienen en estos valores de glucemia durante un periodo mínimo de 28 días, con una administración diaria de insulina (Insulatard NPH).

La glucemia basal de los animales a los que posteriormente se administró estreptozotocina fue de $99,5 \pm 2,6$ mg/dl. La inducción de diabetes por este agente origina una hiperglucemia menos marcada con respecto al aloxano en los primeros días después de la inyección; sin embargo pasado el periodo de estabulación de 28 días los valores de hiperglucemia alcanzados son similares, estando en una media de $566,73 \pm 20,17$ mg/dl (Figura 19b).

Las funciones renales de los animales tratados con estreptozotocina, controlados en las jaulas metabólicas, muestran que dichos animales se encuentran en una fase precoz de la evolución de su patología caracterizada por hiperfiltración glomerular, poliuria, polidipsia e hiperfagia (Tabla 26).

Tabla 26: Características de las ratas diabéticas comparadas con las ratas control, 4 semanas después de la inducción de una diabetes insulino-dependiente por inyección de estreptozotocina (60 mg/kg i.v.).

	Diuresis	Excreción de glucosa	Reabsorción fraccional de Na	Aclaramiento de creatinina	Toma de bebida	Toma de comida	Glucemia
	($\mu\text{l/g/día}$)	($\mu\text{mol/g/día}$)	(%)	($\mu\text{l/g/min}$)	($\mu\text{l/g/día}$)	(mg/g/día)	(mM)
Ratas control (10)	15 \pm 2	0,06 \pm 0,01	99,70 \pm 0,04	4,40 \pm 0,20	36 \pm 8	31 \pm 6	7,87 \pm 0,36
Ratas diabéticas (8)	620 \pm 72 ^c	345 \pm 48 ^c	98,73 \pm 0,15 ^c	5,88 \pm 0,30 ^c	868 \pm 89 ^c	159 \pm 7 ^c	34,2 \pm 3,5 ^c

Los resultados se expresan como media \pm sem, para el número de animales indicados entre paréntesis. Fueron comparados por un test *t* de Student. ^c P < 0,001.

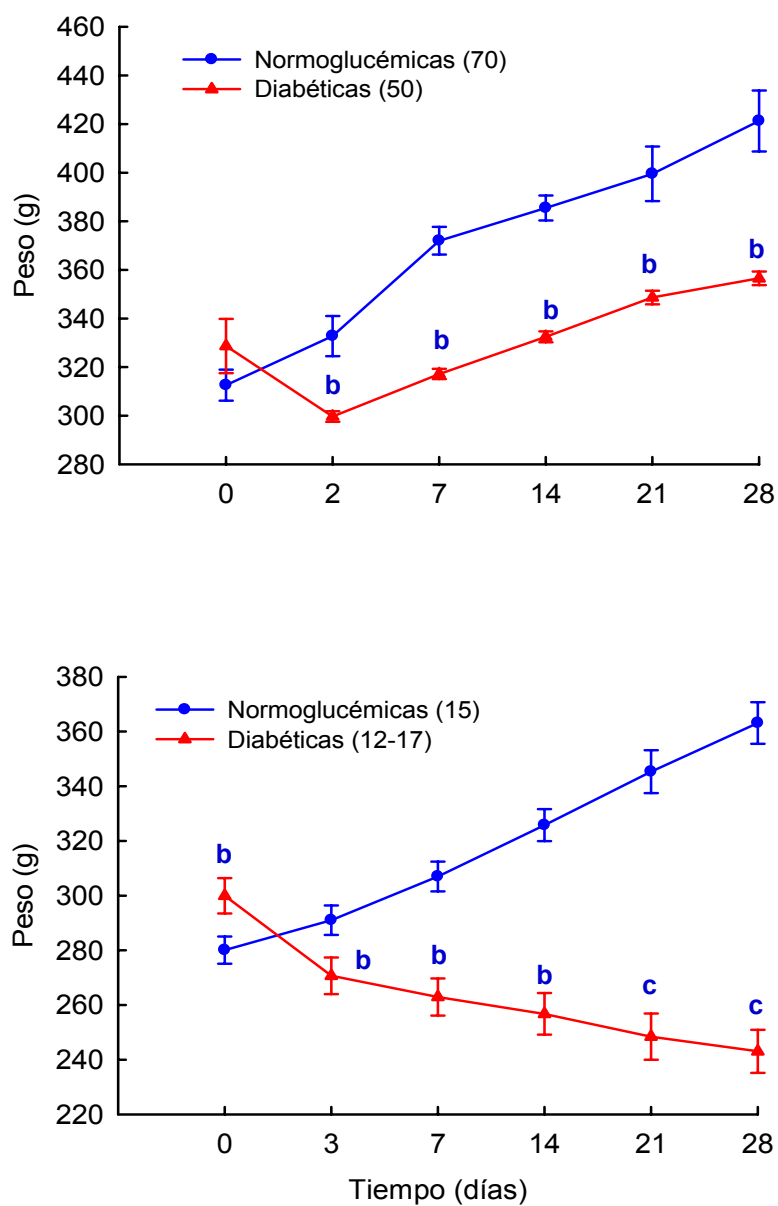


Figura 18: Evolución del peso (g) de ratas normoglucémicas e hiperglucémicas por (a) aloxano o por (b) estreptozotocina, a lo largo de 28 días.

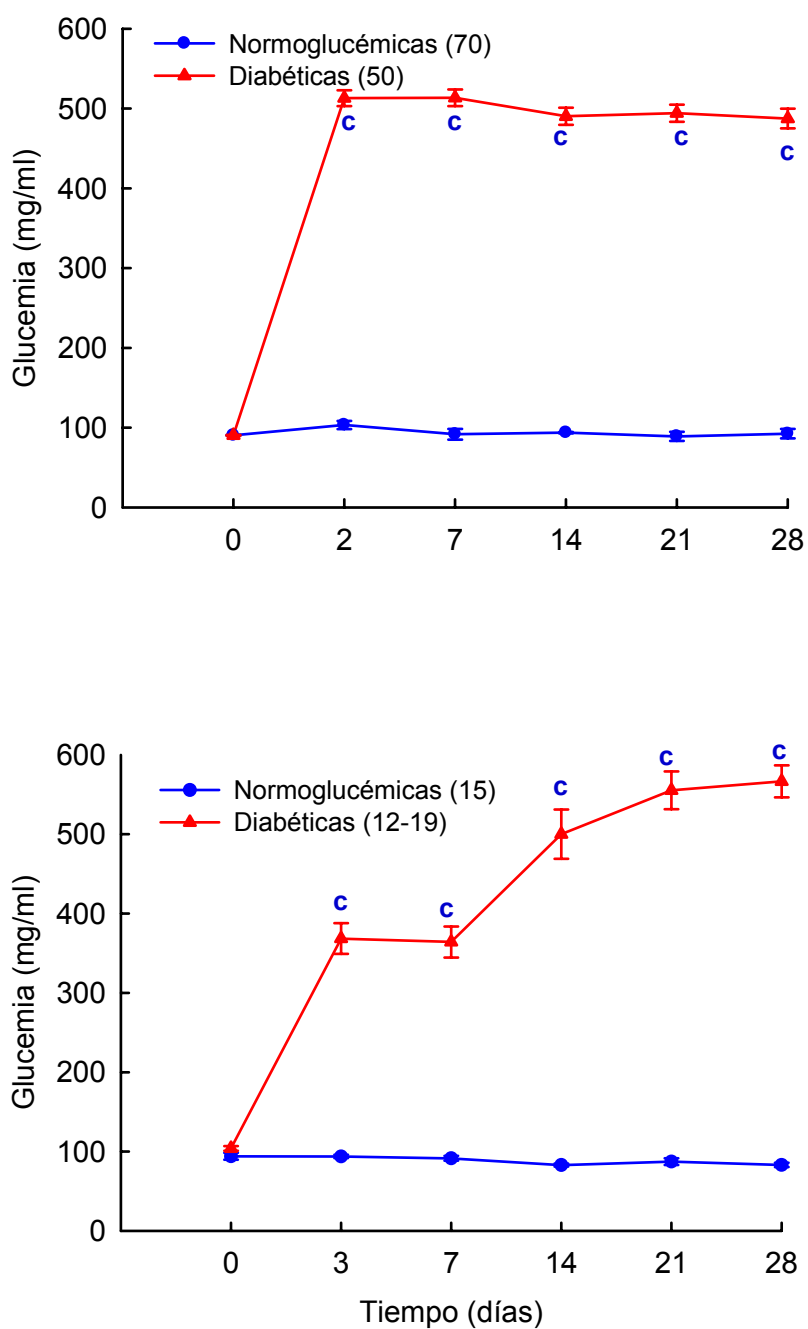


Figura 19: Evolución de la glucemia (mg/dl) de ratas normoglucémicas e hiperglucémicas por (a) aloxano o por (b) estreptozotocina, a lo largo de 28 días.

II.- ESTIMULACIÓN SIMPÁTICA

La estimulación eléctrica de todo el flujo espinal en ratas desmeduladas (pithed), en nuestras condiciones experimentales y a frecuencias de estimulación variables, provoca una estimulación simpática vascular, tal y como ha sido previamente propuesto por otros autores (Gillespie y Muir, 1967; Zukowska-Grojec *et al.*, 1983; Borkowski y Quinn, 1984), e incluso obtenido por nosotros mismos (Morán *et al.*, 1994; Morán *et al.*, 1998; Fernández *et al.*, 2000), que induce incrementos de presión arterial sin cambios apreciables en la frecuencia cardiaca.

En los estudios realizados con ratas normoglucémicas desmeduladas los animales presentan valores de presión arterial media y de frecuencia cardiaca de $47,9 \pm 0,7$ mm Hg y de $295 \pm 3,1$ ppm respectivamente, valores similares a los que presentan los animales diabéticos ($40,9 \pm 1,0$ mm Hg y $269,6 \pm 3,8$ ppm respectivamente). Estos valores se mantienen a lo largo de todos los experimentos, sin presentar modificaciones importantes después de la administración o perfusión de los productos ensayados, a excepción de los animales a los que se les administró L-NAME, ya que éste agente modifica significativamente la presión arterial hasta niveles de $68,2 \pm 3,4$ mm Hg para ratas normoglucémicas y $57,9 \pm 3,8$ mm Hg para ratas hiperglucémicas.

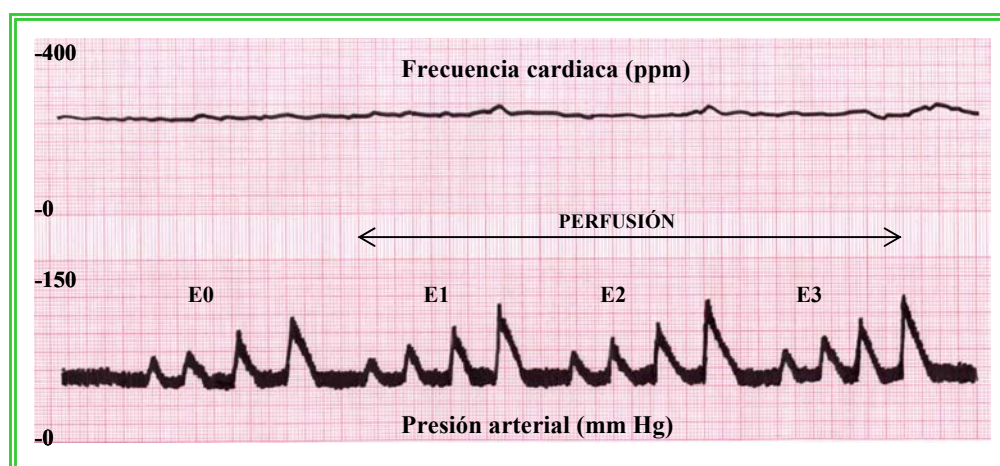


Figura 20: Registro de incrementos de presión arterial obtenidos a las diferentes frecuencias estimulación, en ratas pithed.

1.- Comprobación de las acciones serotoninérgicas inhibitoras en ratas normoglucémicas

En estudios previos en ratas normoglucémicas realizados en nuestro laboratorio, la estimulación eléctrica de todo el cordón espinal produce incrementos de presión arterial media (Δ PAM) caracterizados por ser frecuencia dependiente. A las frecuencias de estimulación utilizadas 0,1, 0,5, 1 y 5 Hz, estos Δ PAM en la curva de estimulación control E0, fueron respectivamente $2,9 \pm 0,1$, $11,2 \pm 0,4$, $20,9 \pm 0,8$, $41,1 \pm 1,3$ mm Hg. Dichos incrementos se mantienen sin cambios significativos en las curvas de estimulación-respuesta E1, E2 y E3, en los animales que reciben 1 ml/h de solución salina. La perfusión continua de serotonina, así como la de los agonistas selectivos de receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{1D}, 8-OH-DPAT y L-694,247 respectivamente, producen una inhibición de los incrementos de presión obtenidos por estimulación eléctrica; sin embargo la perfusión continua del agonista selectivo de receptores 5-HT₃, 1-fenilbiguanida potencia dichos incrementos de presión (Morán et al., 1994, 1998; Fernández, 1999) (Figuras 21 22; tomadas de la Tesis Doctoral de M.M. Fernández, 1999).

Para la validación de los datos anteriores en el tiempo de la realización de nuestro estudio, se repitieron los ensayos en un grupo control al que administramos 20 μ g/kg/min de 5-HT, 20 μ g/kg/min de 8-OH-DPAT o 1 μ g/kg/min de L-694,247. Los efectos inhibitorios inducidos no difieren significativamente de los obtenidos previamente, hecho que nos permitió utilizar el resto de los experimentos, como controles normoglucémicos de nuestro estudio.

Los acciones serotoninérgicas sobre los efectos presores obtenidos por estimulación simpática total, se mantienen constantes desde la estimulación E2, por ello, tanto en la presentación de los resultados previamente mencionados como en los obtenidos en nuestros experimentos, se recogen en las figuras los Δ PAM correspondientes a la estimulación E2 de cada tratamiento comparados con los obtenidos en la estimulación E0.

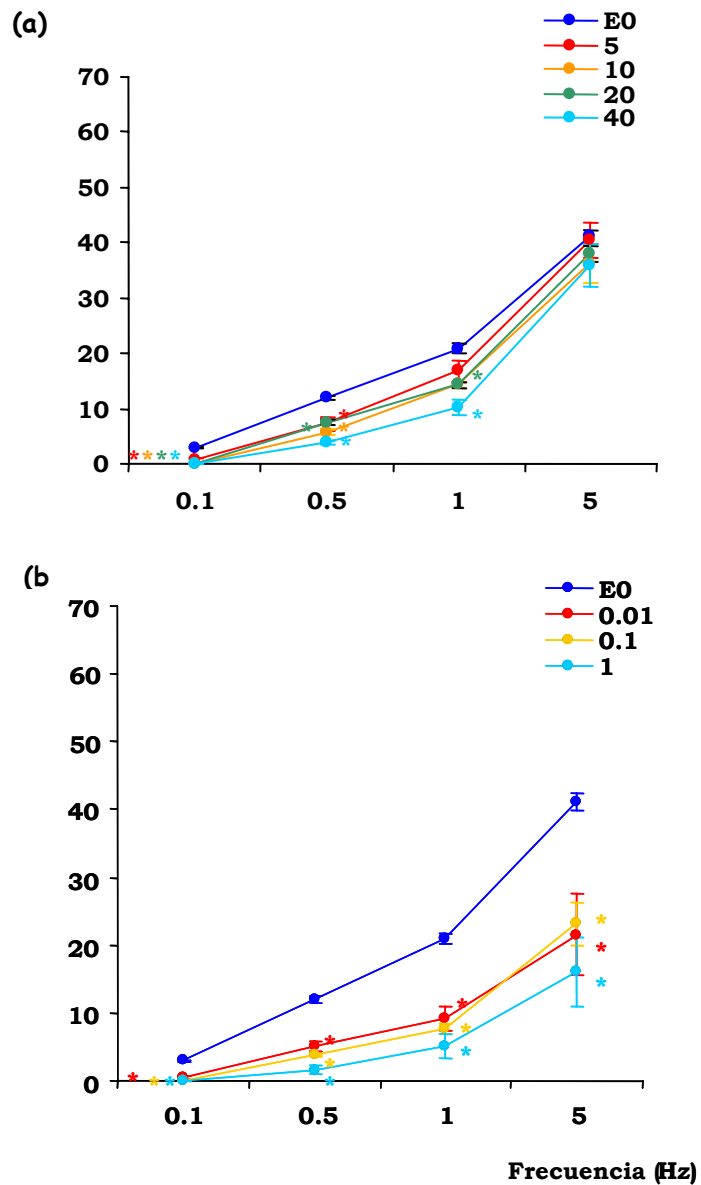
Δ PAM (mm Hg)

Figura 21: Influencia de la perfusión i.v. ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) de (a) 5-HT o (b) 5-CT, sobre la curva estimulación-respuesta E2 obtenida, por estimulación simpática total, en ratas pithed. * $P < 0,05$ respecto a E0 (tomado de Fernández, 1999).

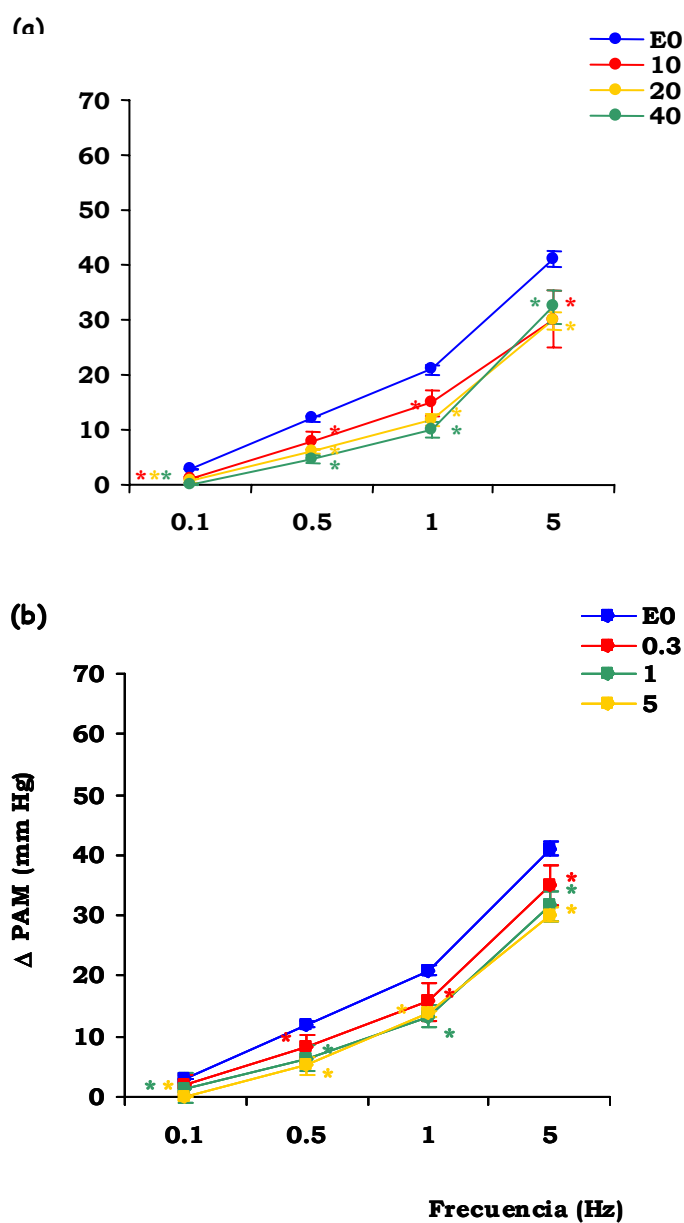
Δ PAM (mm Hg)

Figura 22: Influencia de la perfusión i.v. ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) de **(a)** 8-OH-DPAT o **(b)** L694,247 sobre la curva estimulación-respuesta E2 obtenida, por estimulación simpática total, en ratas pithed. * $P < 0,05$ respecto a E0 (tomado de Fernández, 1999).

2.- Acciones serotoninérgicas en ratas hiperglucémicas

Efecto de la perfusión de solución salina o de 5-HT sobre los incrementos de presión arterial media obtenidos por estimulación simpática total

La estimulación eléctrica de todo el cordón espinal, en ratas hiperglucémicas, provoca incrementos de presión arterial media (Δ PAM) significativamente superiores a los obtenidos en ratas normoglucémicas y, caracterizados por ser frecuencia dependientes. A las frecuencias utilizadas 0,1, 0,5, 1 y 5 Hz, estos Δ PAM, en la curva de estimulación control E0, fueron respectivamente $5,1 \pm 0,2$, $20,8 \pm 0,9$, $37,0 \pm 1,4$ y $68,9 \pm 1,4$ mm Hg. Dichos incrementos se mantienen sin cambios significativos en las curvas de estimulación-respuesta E1, E2 y E3, en los animales que reciben 1 ml/h de solución salina (Figura 20 y Figura 23).

Todas las dosis de 5-hidroxitriptamina ensayadas, 1, 10 y 80 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, que no modifican el valor basal de PAM de los animales, ejercen una acción inhibitoria sobre el efecto presor inducido por estimulación eléctrica. Este efecto inhibitorio, que es dosis-dependiente, es mayor a frecuencias de estimulación bajas. El efecto inhibitorio provocado por la dosis de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ de 5-HT es significativo a la frecuencia de 0,1 Hz, sin embargo, el resto de las dosis ensayadas (10 y 80 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) producen efectos resultan significativos a todas las frecuencias, inhibiendo en más de un 60-80% el efecto presor inducido por la frecuencia de estimulación de 0,1 Hz (Figura 24).

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

Efecto de la perfusión intravenosa de agonistas 5-HT₁ (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}), 5-HT₂ y 5-HT₃ sobre las respuestas presoras obtenidas por estimulación eléctrica

El efecto inhibitorio producido por 5-HT sobre las respuestas presoras obtenidas por estimulación eléctrica del cordón espinal se reproduce con la perfusión intravenosa de 5-CT (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$), agonista 5-HT₁, siendo su efecto inhibitorio a frecuencias de

estimulación bajas (0,1, 0,5 y 1 Hz), superior al de la propia 5-HT (Figura 25). Al inicio de la perfusión de este agonista se obtiene un ligero descenso de la presión basal de los animales que se recupera posteriormente.

Este efecto inhibitor es también reproducido por el agonista selectivo 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT, que presenta una inhibición dosis y tiempo dependiente (5, 10 y 20 µg/kg/min). Ninguna de las dosis ensayadas con este agonista modifica el valor basal de PAM. La inhibición muestra en todos los casos diferencias significativas con respecto a E0, y es especialmente significativa a las frecuencias de estimulación inferiores (Figura 26).

La administración del agonista de receptores 5-HT_{1B}, CGS-12066B (5 µg/kg/min) (Figura 27a) y del agonista de receptores 5-HT_{1D}, L-694,247 (5 y 20 µg/kg/min) (Figura 27b) no modificaron las respuestas presoras obtenidas por estimulación eléctrica.

La perfusión intravenosa del agonista selectivo de receptores 5-HT₂, α-metil-5-HT (5 µg/kg/min) tampoco modifica los incrementos de presión en ninguna de las tres curvas de estimulación (E1, E2 y E3) (Figura 28a).

Ninguno de estos tres agonistas modificaron por si mismos los valores de presión arterial media.

La perfusión del agonista selectivo 5-HT₃, 1-fenilbiguanida, a la dosis de 5 µg/kg/min, provoca un ligero efecto potenciador de las respuestas presoras inducidas por estimulación del cordón espinal, que únicamente resulta significativo para la estimulación de 0,1 Hz. Con dosis superiores (40 µg/kg/min) no se consigue incrementar el efecto potenciador (Figura 28b).

Efecto de los antagonistas de receptores, 5-HT₁, 5-HT_{1A}, 5-HT₂, y 5-HT₃ sobre la inhibición ejercida por los agonistas serotoninérgicos en las respuestas presoras obtenidas por estimulación eléctrica

La administración intravenosa del antagonista selectivo de receptores 5-HT₃, MDL-72222 (2 mg/kg), de ritanserina (1 mg/kg), antagonista selectivo de los receptores 5-HT₂ o de WAY-100,635 (100 µg/kg), antagonista selectivo de receptores 5-HT_{1A}, no modifica los incrementos de presión obtenidos por estimulación (Figura 29).

Sóloamente el antagonista no selectivo metiotepina (0,1 mg/kg, i.v.) y el antagonista selectivo de receptores 5-HT₇ (mesulergina, 1 mg/kg, i.v.) ejercen por sí mismos un efecto inhibitor de la respuesta inducida por la estimulación eléctrica. Esta inhibición es significativa a todas las frecuencias de estimulación (Figura 29).

Del pretratamiento con estos antagonistas únicamente metiotepina (Figura 30), y WAY-100,635 (Figura 31) bloquean la inhibición producida por 5-HT 10 µg/kg/min. El antagonista selectivo WAY-100,635 bloquea igualmente el efecto inhibitor inducido por la perfusión intravenosa de 8-OH-DPAT (10 µg/kg/min) (Figura 32).

Efecto de 5-HT y 8-OH-DPAT sobre las respuestas presoras inducidas por administración de noradrenalina exógena

La designación de la naturaleza pre o postsináptica de la acción inhibitor se realiza mediante los experimentos en los cuales los incrementos de presión arterial son inducidos por administración exógena de noradrenalina. Tal y como se aprecia en la figura 33, la administración intravenosa de NA, a dosis de 0,01, 0,05, 0,1 y 0,5 µg/kg, induce incrementos de presión arterial crecientes con las dosis y constantes a lo largo del tiempo. Tales incrementos, para la curva dosis-respuesta E'0 fueron respectivamente de $15,0 \pm 1,8$, $20,0 \pm 2,3$, $32,0 \pm 4,5$ y $42,7 \pm 5,0$ mm Hg.

Por su parte ninguno de los agonistas inhibitor de la estimulación eléctrica, tal y como se puede apreciar en la figura 34, es capaz de inhibir de forma significativa las respuestas de noradrenalina.

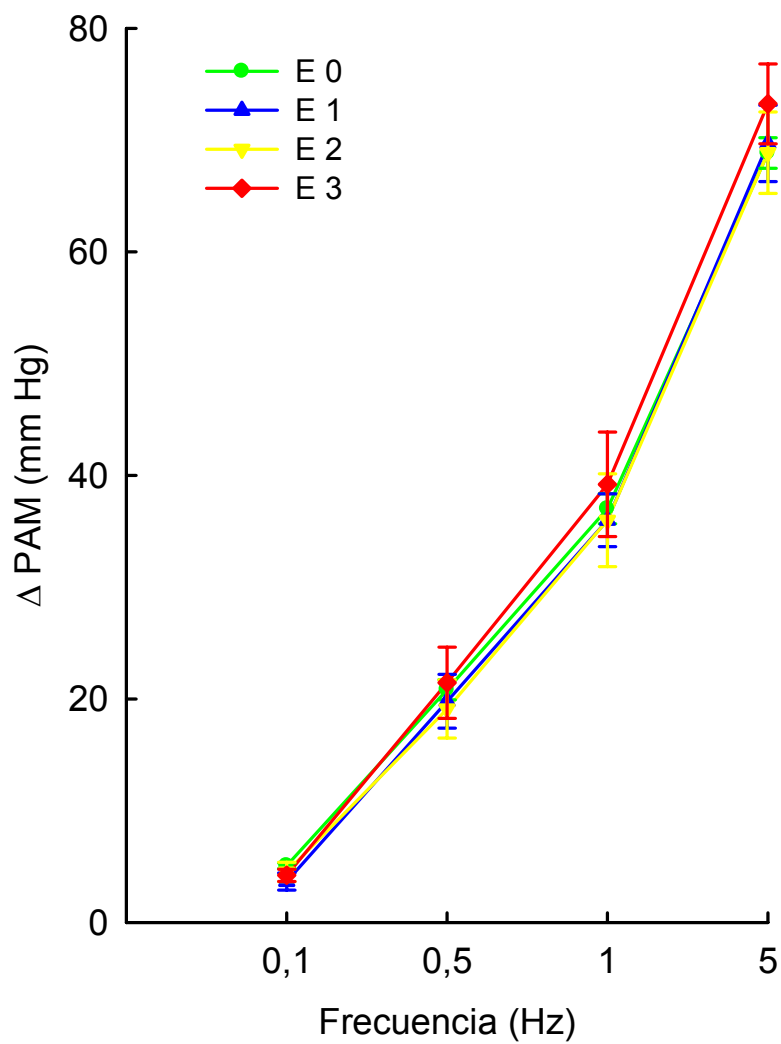


Figura 23: Influencia de la perfusión i.v. de solución salina (1 ml/h) sobre los incrementos de presión arterial media (Δ PAM) inducidos, por estimulación simpática total, en ratas hiperglucémicas pithed. E0 control, E1 primera, E2 segunda y E3 tercera curva estimulación respuesta.

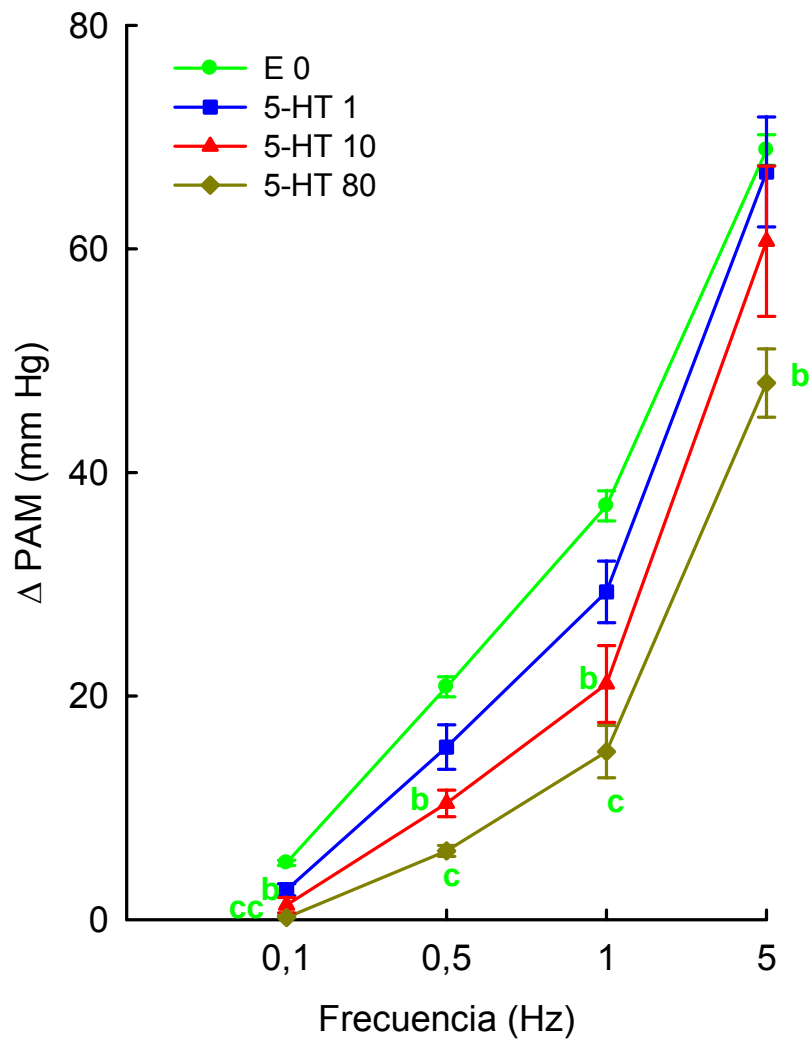


Figura 24: Influencia de la perfusión i.v. de 5-HT ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) sobre los incrementos de presión arterial media (Δ PAM) inducidos, por estimulación simpática total, en ratas hiperglucémicas pithed. a) $P < 0,05$; b) $P < 0,01$ y c) $P < 0,001$ con respecto a E0 (verde).

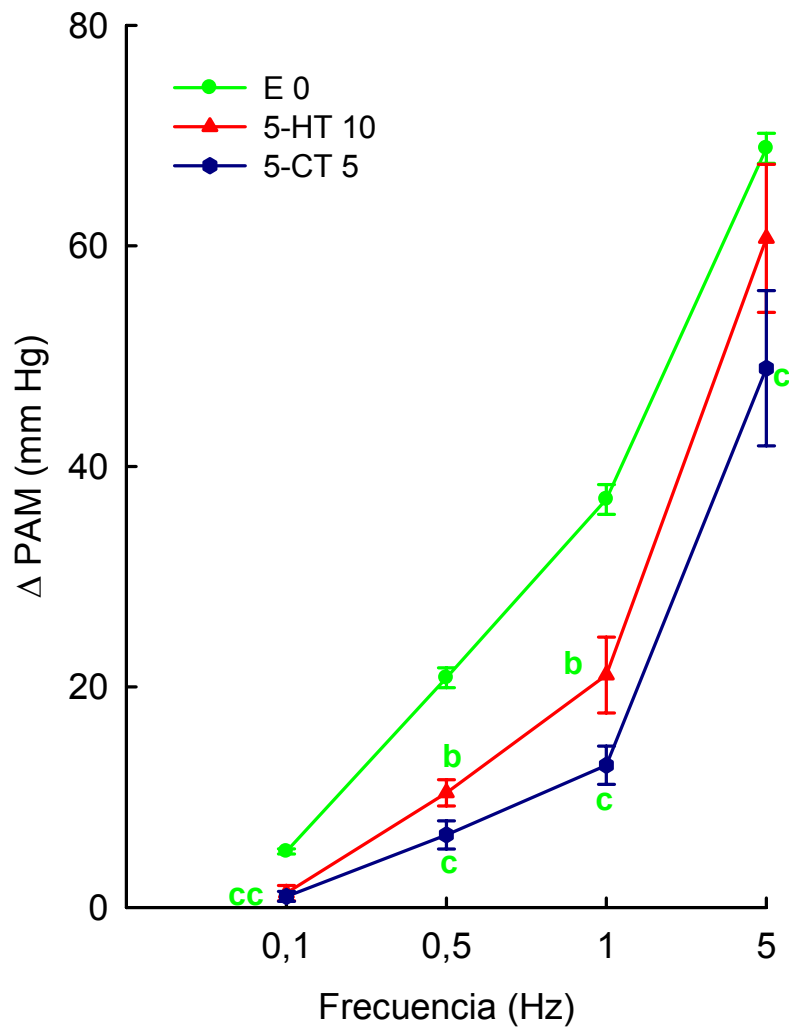


Figura 25: Influencia de la perfusión intravenosa de 5-HT (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) o de 5-CT (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) sobre los incrementos de presión arterial media (Δ PAM) inducidos, por estimulación simpática total, en ratas hiperglucémicas pithed. a) $P < 0,05$; b) $P < 0,01$ y c) $P < 0,001$ con respecto a E0 (verde).

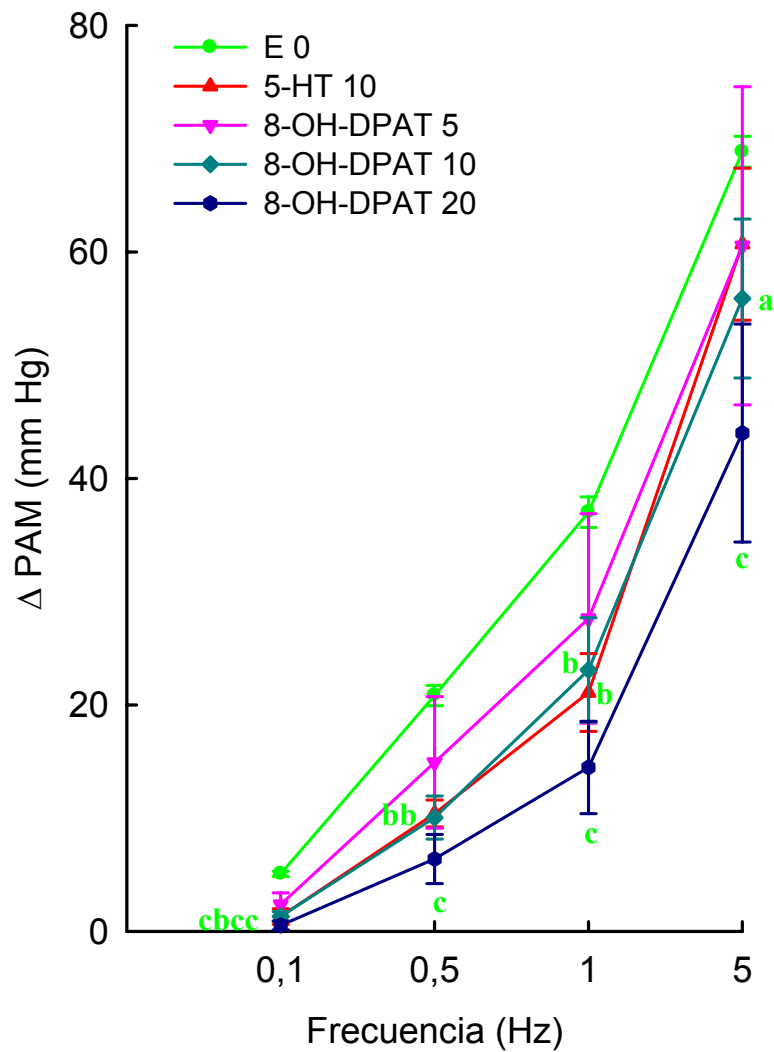


Figura 26: Influencia de la perfusión i.v. de 8-OH-DPAT (5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) o de 5-HT (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) sobre los incrementos de presión arterial media (Δ PAM) inducidos, por estimulación simpática total, en ratas hiperglucémicas pithed. a) $P < 0,05$; b) $P < 0,01$ y c) $P < 0,001$ con respecto a E0 (verde).

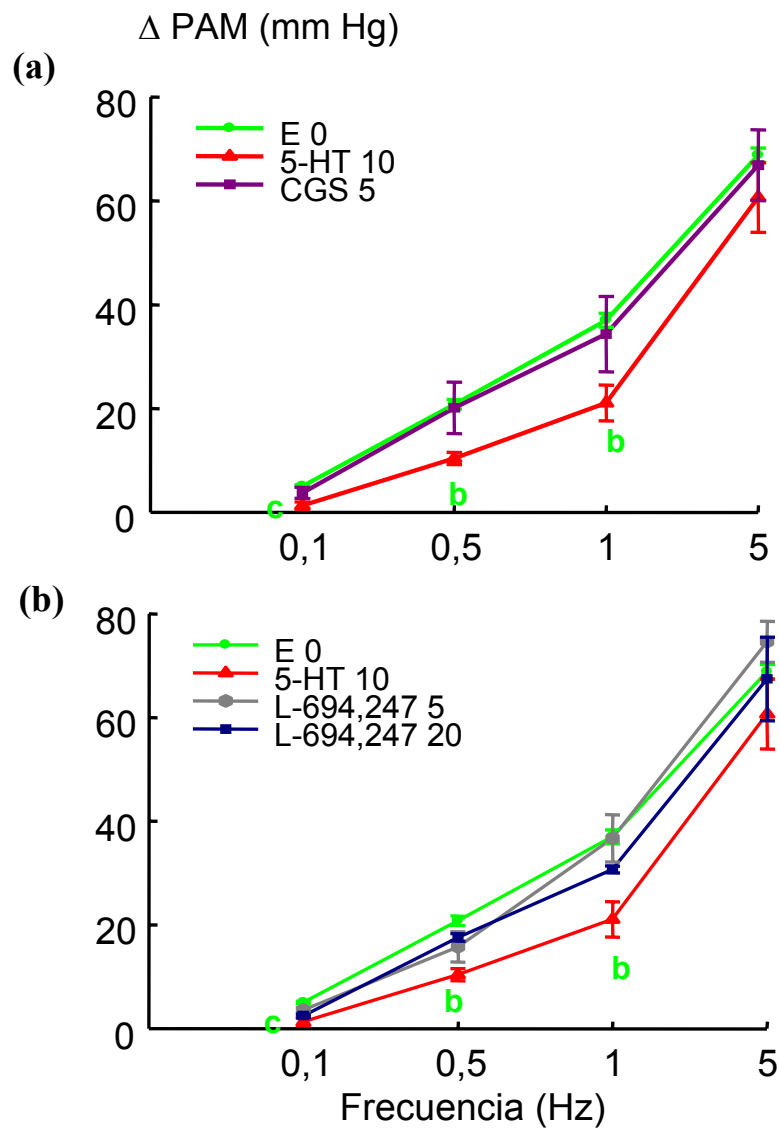


Figura 27: Influencia de la perfusión i.v. de 5-HT (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) y **(a)** CGS-12066B (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$), y **(b)** L-694,247 (5 y 20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) sobre los incrementos de presión arterial media (Δ PAM) inducidos, por estimulación simpática total, en ratas hiperglucémicas pithed. a) $P < 0,05$; b) $P < 0,01$ y c) $P < 0,001$ con respecto a E0 (verde).

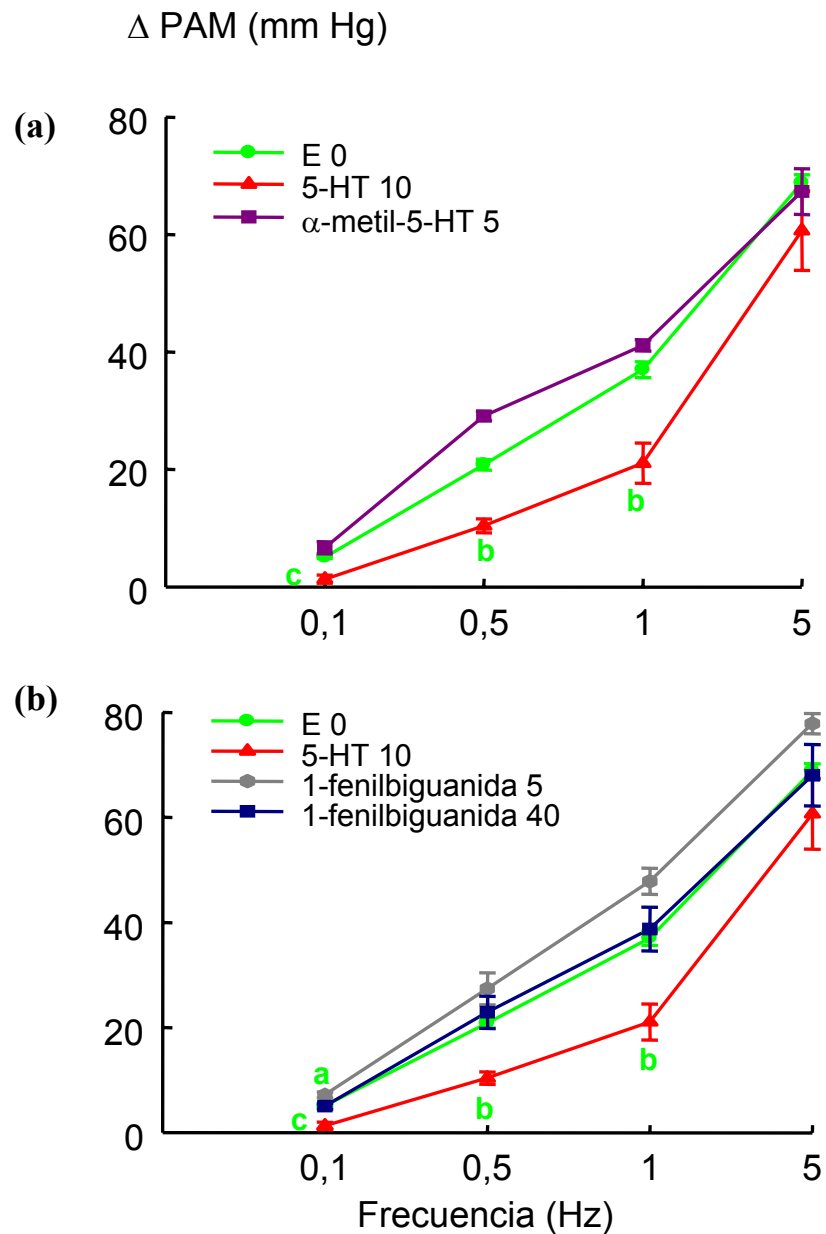


Figura 28: Influencia de la perfusión i.v. de 5-HT (10 μ g/kg/min) y (a) α -metil-5-HT (10 μ g/kg/min) o (b) 1-fenilbiguanida (5 y 40 μ g/kg/min) sobre los incrementos de presión arterial media (Δ PAM) inducidos, por estimulación simpática total, en ratas hiperglucémicas pithed. a) $P < 0,05$; b) $P < 0,01$ y c) $P < 0,001$ con respecto a E0 (verde).

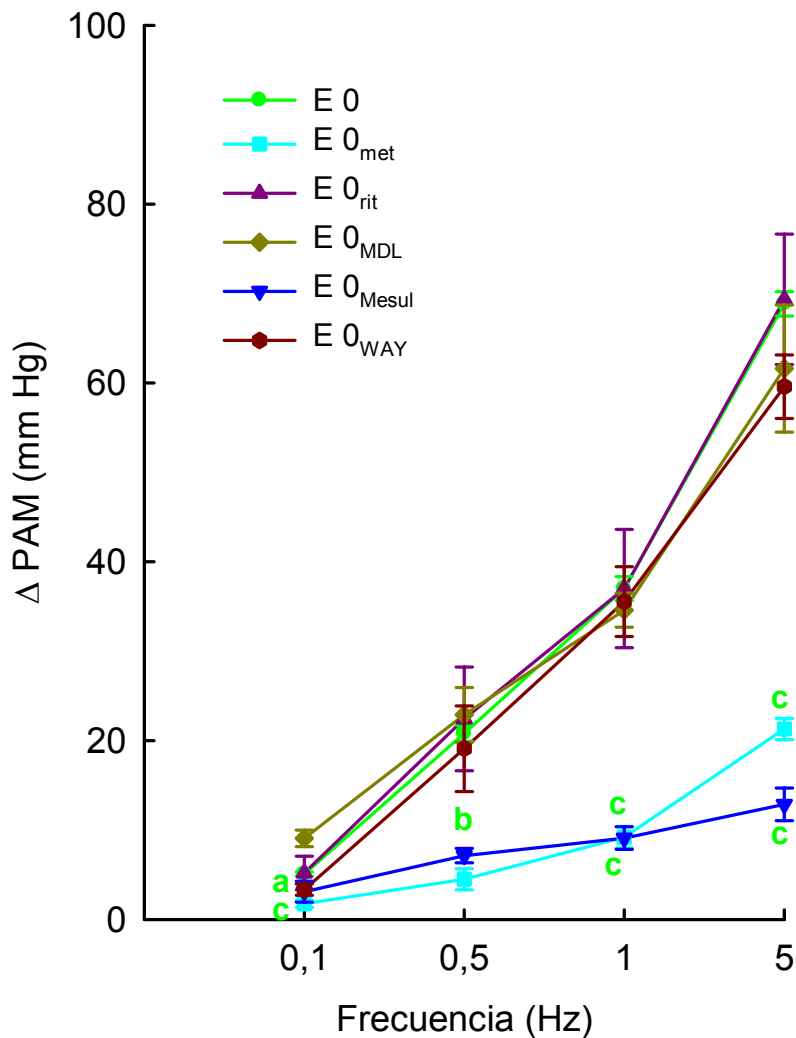


Figura 29: Variaciones en los incrementos de presión arterial media (Δ PAM) obtenidos, por estimulación eléctrica, en la curva de estimulación E0 en ratas hiperglucémicas pithed, inducidos por administración i.v. de MDL-72222 (2 mg/kg), ritanserina (1 mg/kg), WAY-100,635 (100 μ g/kg), mesulergina (1 mg/kg) o metiotepina (0,1 mg/kg). a) $P < 0,05$; b) $P < 0,01$ y c) $P < 0,001$ con respecto a E0 (verde).

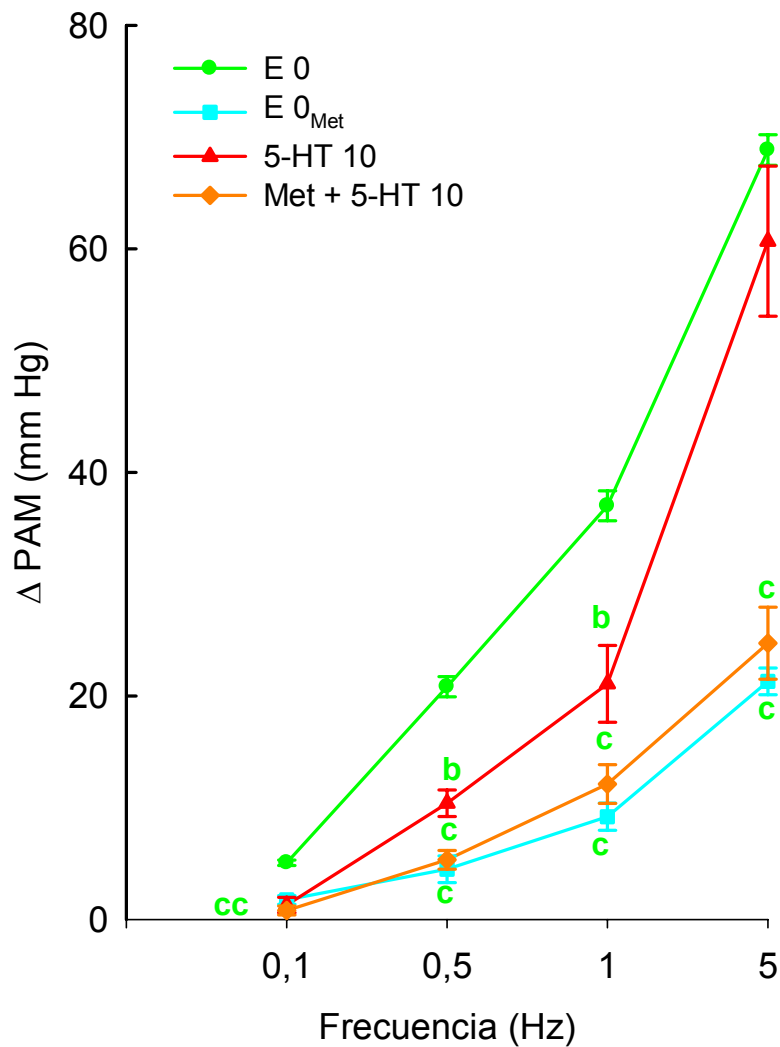


Figura 30: Influencia de la administración i.v. de metiotepina (0,1 mg/kg) sobre la inhibición de la estimulación simpática inducida, por 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ de 5-HT, en ratas hiperglucémicas pithed. a) $P < 0,05$; b) $P < 0,01$ y c) $P < 0,001$ con respecto a E0 (verde) y E0_{met} (celeste).

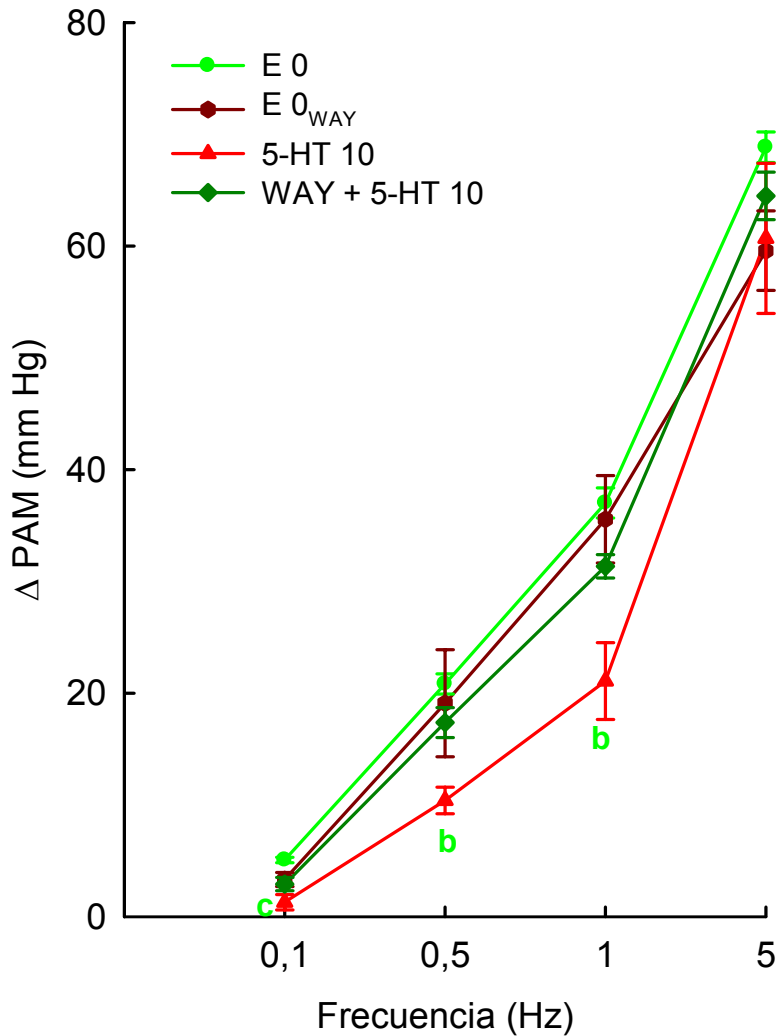


Figura 31: Influencia de la administración i.v. de WAY-100,635 (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) sobre la inhibición de la estimulación simpática inducida, por 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ de 5-HT, en ratas hiperglucémicas pithed. a) $P < 0,05$; b) $P < 0,01$ y c) $P < 0,001$ con respecto a E0 (verde) y E0_{WAY} (granate).

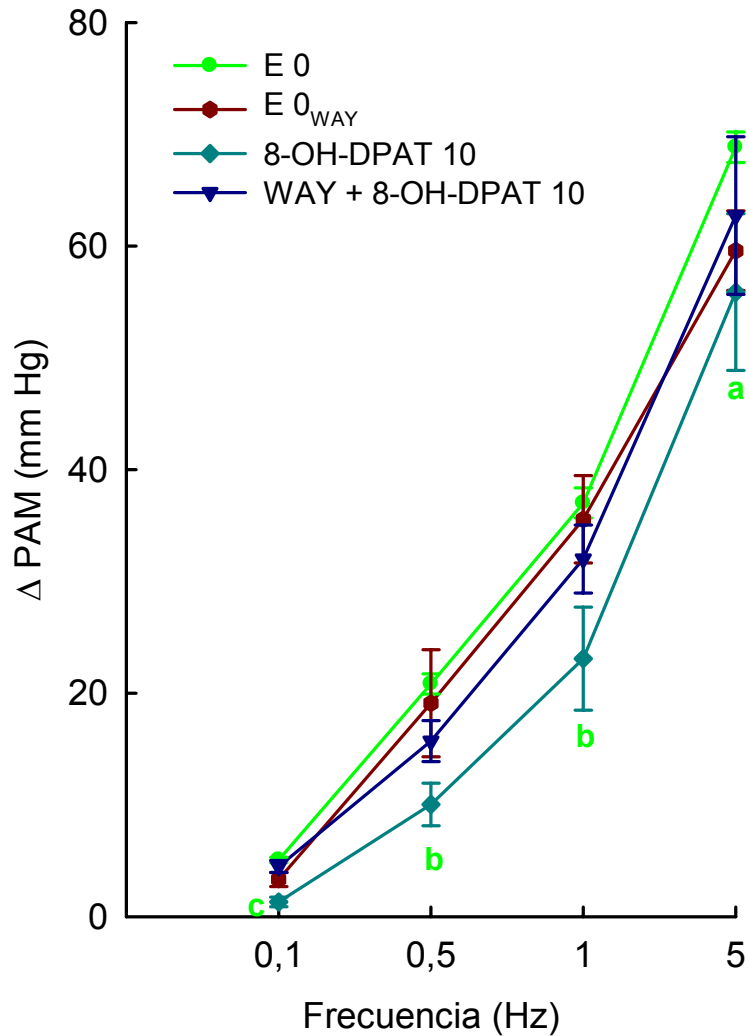


Figura 32: Influencia de la administración i.v. de WAY-100,635 (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) sobre la inhibición de la estimulación simpática inducida, por 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ de 8-OH-DPAT, en ratas hiperglucémicas pithed. a) $P < 0,05$; b) $P < 0,01$ y c) $P < 0,001$ con respecto a E0 (verde) y E0_{WAY} (granate).

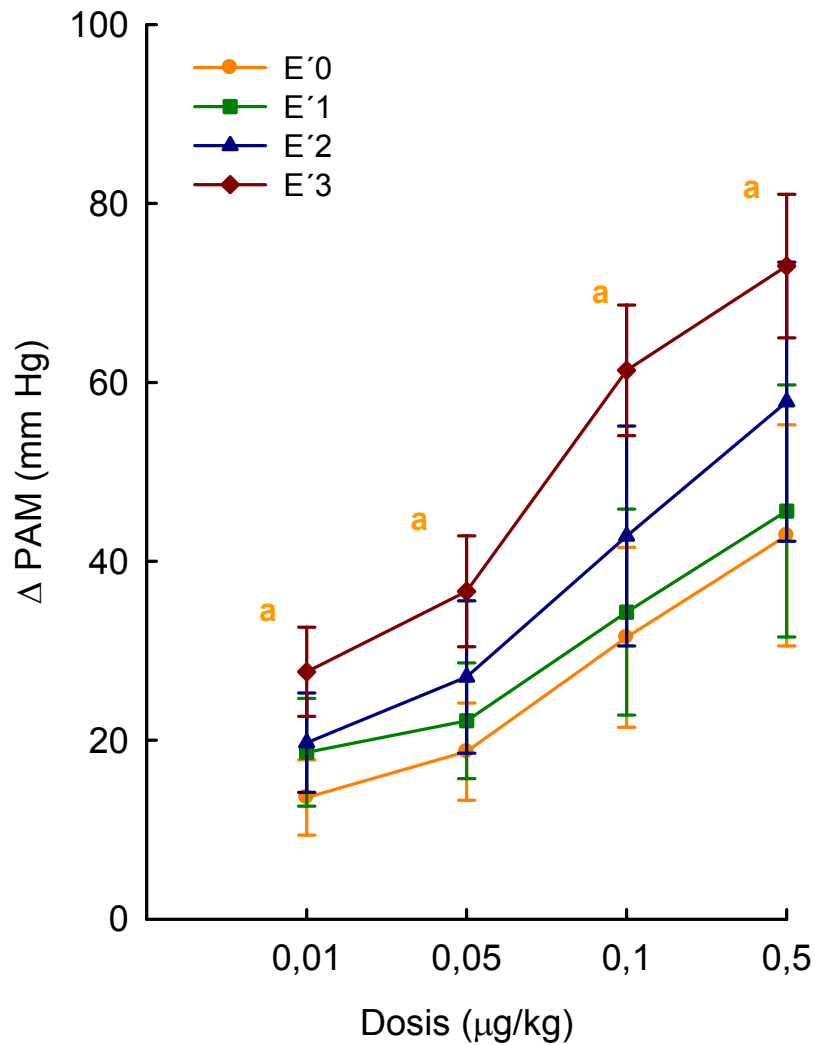


Figura 33: Influencia de la administración de solución salina (1 mg/kg) sobre los incrementos de presión arterial media (Δ PAM) obtenidos por administración de NA exógena. E'0 control, E'1 primera, E'2 segunda y E'3 tercera curva dosis-respuesta de NA exógena en ratas hiperglucémicas pithed. a) $P < 0,05$; b) $P < 0,01$ y c) $P < 0,001$ con respecto a E'0 (naranja).

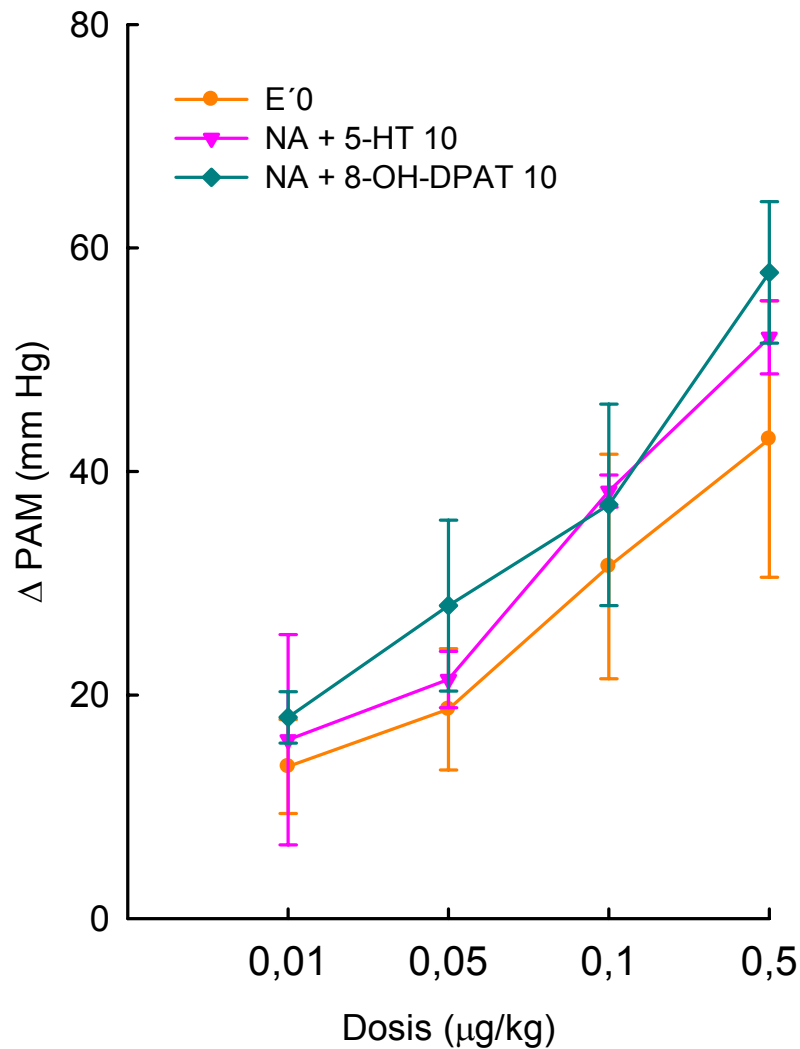


Figura 34: Influencia de la perfusión i.v. (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) de 5-HT o de 8-OH-DPAT sobre los incrementos de presión arterial media (Δ PAM) obtenidos, por administración de NA exógena en ratas hiperglucémicas pithed. a) $P < 0,05$; b) $P < 0,01$ y c) $P < 0,001$ con respecto a E'0 (naranja).

3.- Estudio de los mecanismos indirectos implicados en las acciones serotoninérgica inhibitoras en ratas normoglucémicas

Efecto de la administración de L-NAME sobre los incrementos de presión arterial media obtenidos por estimulación simpática total y, su influencia sobre los efectos inhibidores de agonistas serotoninérgicos

La administración de L-NAME (10 mg/kg) implica un aumento de la presión arterial media sin modificar la frecuencia cardiaca, siendo los valores respectivos de estos dos parámetros $68,2 \pm 3,4$ mm Hg y $291,0 \pm 6,0$ ppm.

La estimulación eléctrica del cordón espinal tras la administración de L-NAME produce a las frecuencias de estimulación 0,1, 0,5, 1 y 5 Hz unos incrementos de presión arterial media en la curva control ($E_{0\text{-L-NAME}}$) que corresponden respectivamente a $8,6 \pm 1,0$, $22,2 \pm 1,9$, $33,8 \pm 2,9$, $55,6 \pm 4,1$ mm Hg (Figura 35), y que resultan significativamente superiores a los obtenidos a las mismas frecuencias (curva E0) en ausencia de L-NAME.

Los incrementos de presión arterial media obtenidos en las curvas E1, E2, y E3 en presencia de L-NAME, tras la perfusión de suero fisiológico (1 ml/h) sufren una ligera disminución con respecto a los valores obtenidos en la curva $E_{0\text{-L-NAME}}$, sin que esta disminución llegue a ser significativa.

En presencia de L-NAME, tanto la perfusión intravenosa del agonista selectivo de receptores 5-HT_{1D}, L-694,247 (1 µg/kg/min) (Figura 35) como la perfusión de 8-OH-DAPT (20 µg/kg/min) (Figura 36) siguen ejerciendo, tal como lo hacían en su ausencia, el mismo efecto inhibitor de los incrementos de presión obtenidos por estimulación.

Efecto de la administración de glibenclamida sobre los incrementos de presión arterial media obtenidos por estimulación simpática total y, su influencia sobre los efectos inhibidores de agonistas serotoninérgicos

La administración de glibenclamida (10 mg/kg) no origina modificaciones de los valores de presión arterial media ni de la frecuencia cardiaca con respecto a los de los

animales controles, de la misma manera que por sí misma no altera significativamente los incrementos de presión arterial media producidos por estimulación eléctrica (Figura 38).

La glibenclamida no modifica las respuestas producidas, tanto por 8-OH-DPAT (20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) (Figura 37) como por L-694,247 (1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) (Figura 38), de tal modo que estos dos agonistas selectivos de receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{1D} respectivamente, continúan inhibiendo las respuestas presoras inducidas por estimulación eléctrica, siendo esta estimulación frecuencia dependiente y mucho más marcada a frecuencias bajas de estimulación.

Efecto de la administración de indometacina sobre los incrementos de presión arterial media, obtenidos por estimulación simpática total, y su influencia sobre los efectos inhibidores de agonistas serotoninérgicos

La administración de indometacina (2 mg/kg) no origina modificaciones de la presión arterial media ni de la frecuencia cardiaca con respecto a los controles, de la misma manera que por sí misma no altera significativamente los incrementos de presión arterial media producidos por estimulación eléctrica (Figura 39).

En presencia de indometacina, 8-OH-DPAT (20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) inhibe los incrementos de presión inducidos por estimulación eléctrica del flujo simpático a frecuencias de estimulación bajas, (Figura 39), no obstante, esta inhibición no es significativa.

Sin embargo, indometacina es capaz de revertir totalmente la inhibición que L-694,247 (1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) produce sobre las respuestas presoras inducidas por estimulación eléctrica (Figura 40).

Efecto de la administración de ODQ sobre los incrementos de presión arterial media obtenidos por estimulación simpática total y, su influencia sobre los efectos inhibidores de agonistas serotoninérgicos

La administración de ODQ no origina modificaciones significativas de la presión arterial media ni de la frecuencia cardiaca con respecto a los de controles. Los incrementos de presión arterial media (E_{0ODQ}) son similares a los incrementos de la E_0 control y se mantienen durante en las tres curvas E1, E2, y E3 en presencia de ODQ, durante la perfusión de suero fisiológico (1 ml/h).

En presencia de ODQ, tanto la perfusión intravenosa del agonista selectivo de receptores 5-HT_{1D}, L-694,247 (1 μ g/kg/min) (Figura 42) como la de 8-OH-DAPT (20 μ g/kg/min) (Figura 41) siguen ejerciendo, de igual modo a como lo hacían en su ausencia, el mismo efecto inhibidor de los incrementos de presión obtenidos por estimulación.

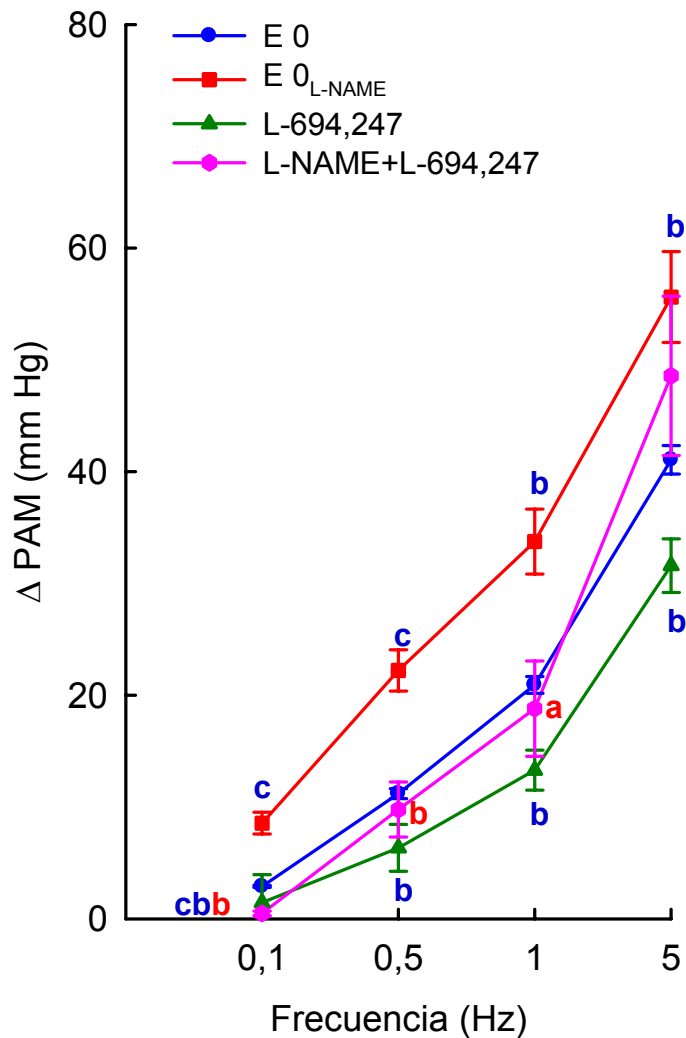


Figura 35: Influencia de la perfusión intravenosa de L-694,247 (1 μ g/kg/min) sobre los incrementos de presión arterial media (Δ PAM) obtenidos, por estimulación simpática total, en ratas normoglucémicas pithed pretratadas con L-NAME (10 mg/kg, i.v.). a) $P < 0,05$; b) $P < 0,01$ y c) $P < 0,001$ con respecto a E0 (azul) y E'0 (rojo).

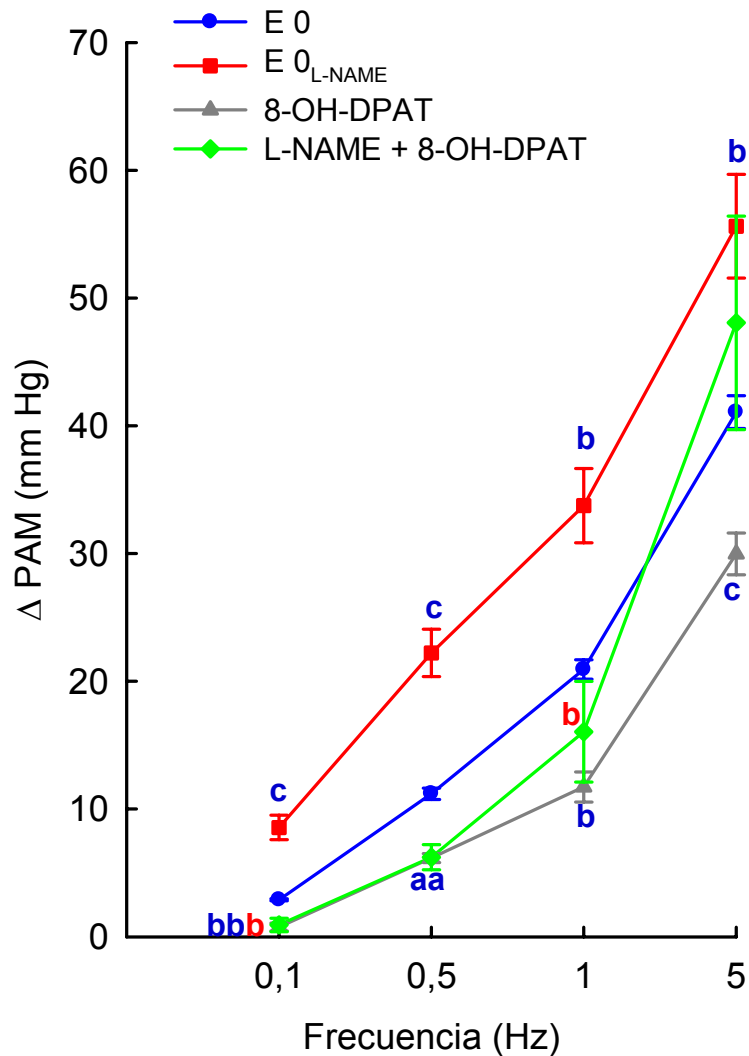


Figura 36: Influencia de la perfusión intravenosa de 8-OH-DPAT (20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) sobre los incrementos de presión arterial media (Δ PAM) obtenidos, por estimulación simpática total, en ratas normoglucémicas pithed pretratadas con L-NAME (10 mg/kg , i.v.). a) $P < 0,05$; b) $P < 0,01$ y c) $P < 0,001$ con respecto a E0 (azul) y E'0 (rojo).

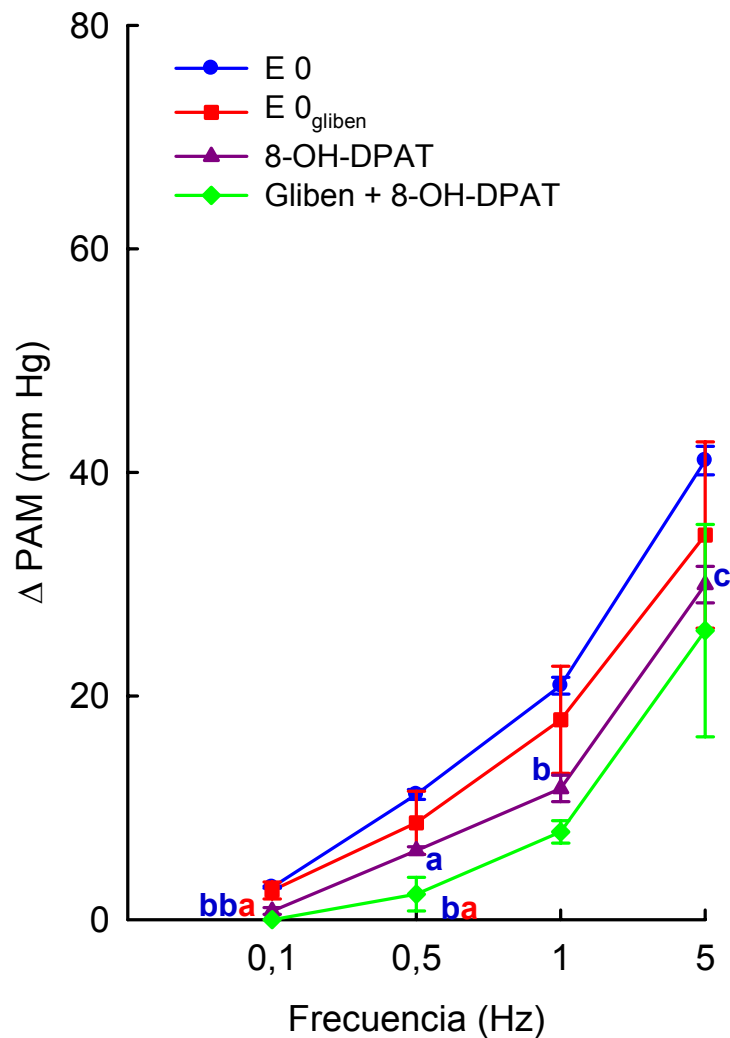


Figura 37: Influencia de la perfusión intravenosa de 8-OH-DPAT (20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) sobre los incrementos de presión arterial media (Δ PAM) obtenidos, por estimulación simpática total, en ratas normoglucémicas pithed pretratadas con glibenclamida (10 mg/kg , i.v.). a) $P < 0,05$; b) $P < 0,01$ y c) $P < 0,001$ con respecto a E0 (azul) y E'0 (rojo).

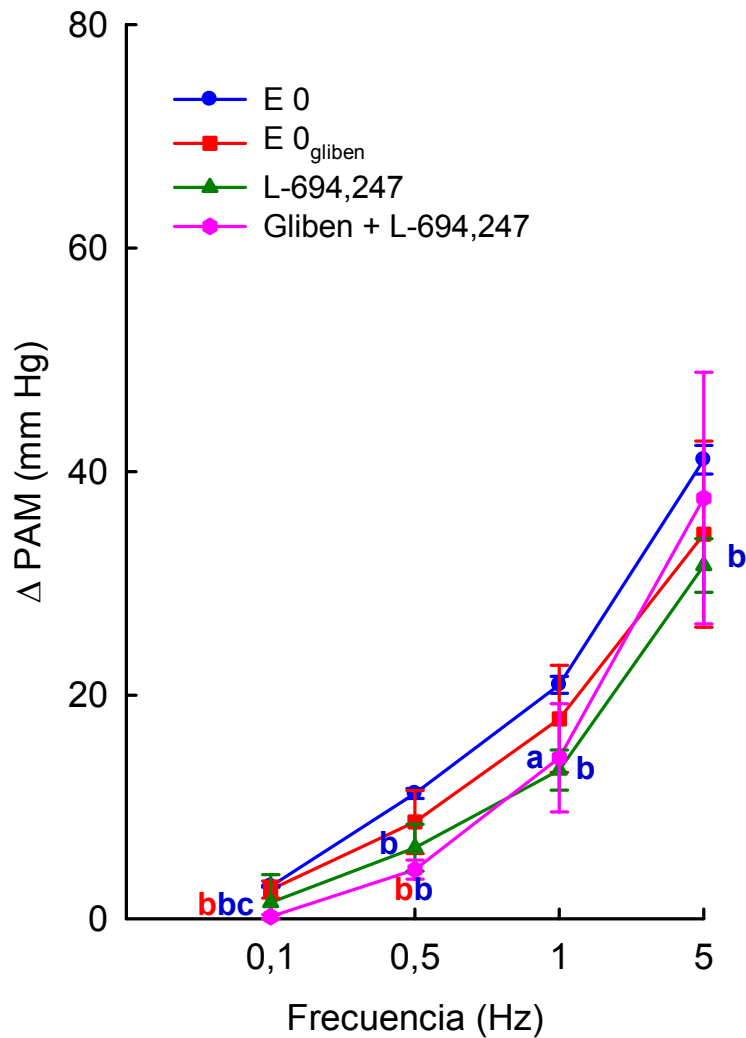


Figura 38: Influencia de la perfusión intravenosa de L-694,247 (1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) sobre los incrementos de presión arterial media (Δ PAM) obtenidos, por estimulación simpática total, en ratas normoglucémicas pithed pretratadas con glibenclamida (10 mg/kg, i.v.) a) $P < 0,05$; b) $P < 0,01$ y c) $P < 0,001$ con respecto a E0 (azul) y E'0 (rojo).

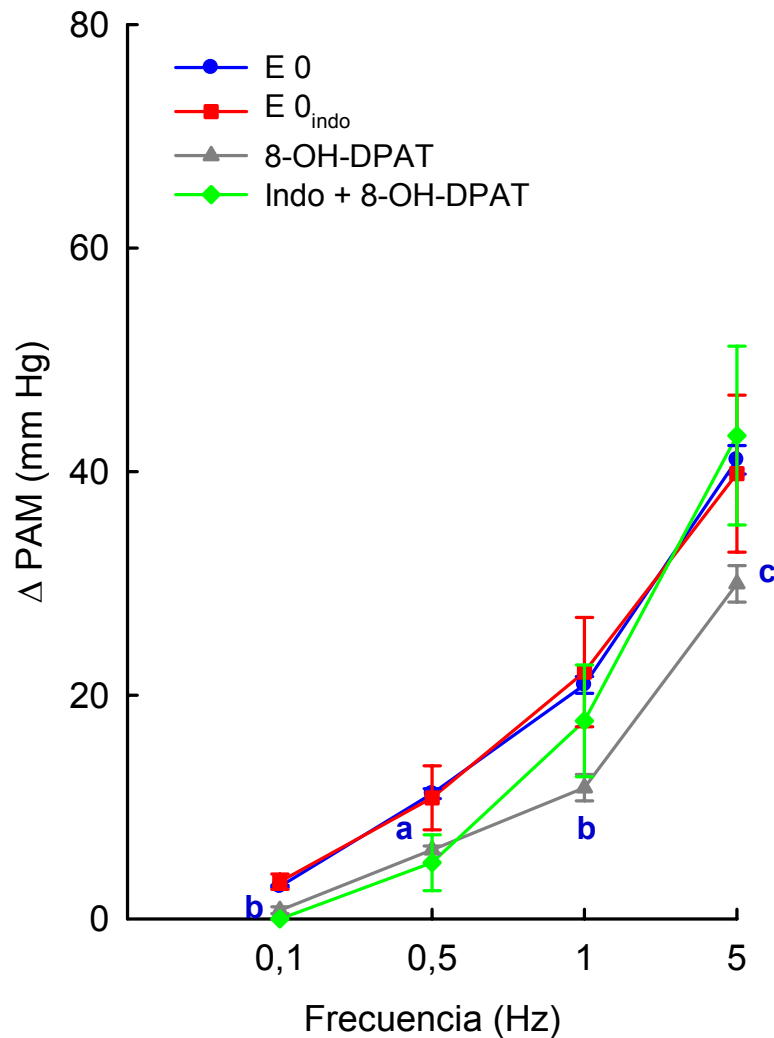


Figura 39: Influencia de la perfusión intravenosa de 8-OH-DPAT (20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) sobre los incrementos de presión arterial media (Δ PAM) obtenidos, por estimulación simpática total, en ratas normoglucémicas pithed pretratadas con indometacina (2 mg/kg, i.v.) a) $P < 0,05$; b) $P < 0,01$ y c) $P < 0,001$ con respecto a E0 (azul) y E'0 (rojo).

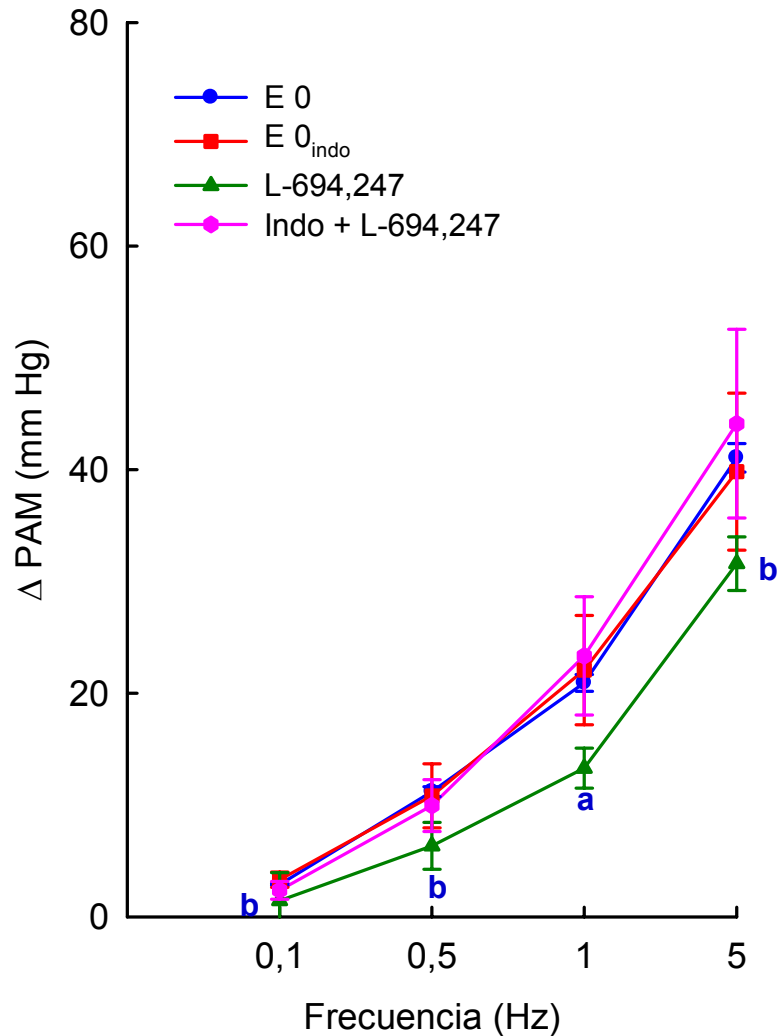


Figura 40: Influencia de la perfusión intravenosa de L-694,247 (1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) sobre los incrementos de presión arterial media (Δ PAM) obtenidos, por estimulación simpática total, en ratas normoglucémicas pithed pretratadas con indometacina (2 mg/kg, i.v.). a) $P < 0,05$; b) $P < 0,01$ y c) $P < 0,001$ con respecto a E0 (azul) y E'0 (rojo).

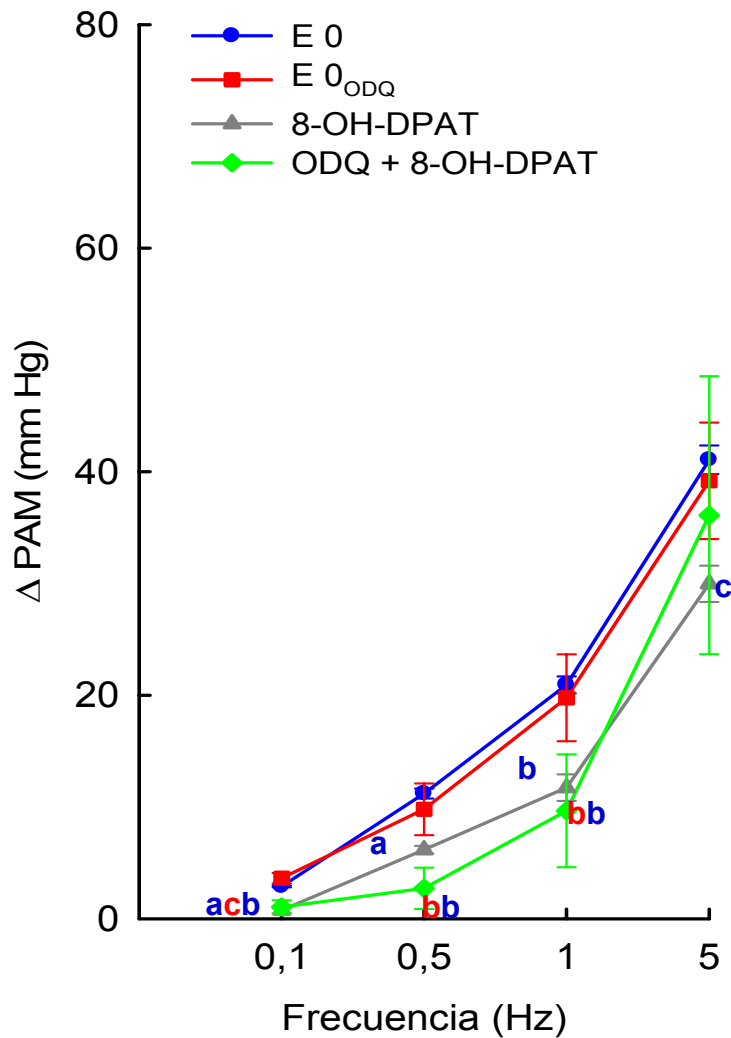


Figura 41: Influencia de la perfusión intravenosa de 8-OH-DPAT (20 μ g/kg/min) sobre los incrementos de presión arterial media (Δ PAM) obtenidos, por estimulación simpática total, en ratas normoglucémicas pithed pretratadas con ODQ (10 μ g/kg, i.v.). a) $P < 0,05$; b) $P < 0,01$ y c) $P < 0,001$ con respecto a E0 (azul) y E'0 (rojo).

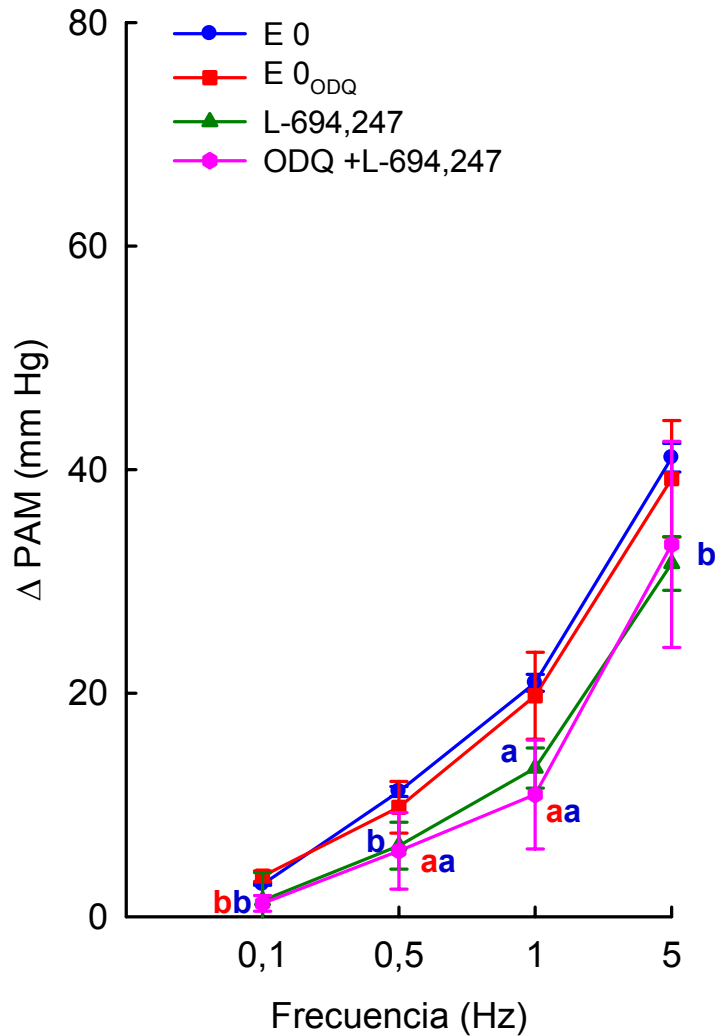


Figura 42: Influencia de la perfusión intravenosa de L-694,247 (1 μ g/kg/min) sobre los incrementos de presión arterial media (Δ PAM) obtenidos, por estimulación simpática total, en ratas normoglucémicas pithed pretratadas con ODQ (10 μ g/kg, i.v.) a) $P < 0,05$; b) $P < 0,01$ y c) $P < 0,001$ con respecto a E0 (azul) y E'0 (rojo).

4.- Estudio de los mecanismos indirectos implicados en las acciones serotoninérgica inhibitoras en ratas hiperglucémicas

Efecto de la perfusión de suero fisiológico, 5-HT y 8-OH-DPAT tras la administración de L-NAME

La administración de L-NAME implica un aumento de la presión arterial media sin modificar la frecuencia cardíaca, siendo los valores respectivos de estos dos parámetros, en estos grupos de animales, $57,9 \pm 3,8$ mm Hg y $271,0 \pm 5,5$ ppm.

La estimulación eléctrica del cordón espinal tras la administración de L-NAME produce a las frecuencias de estimulación 0,1, 0,5, 1 y 5 Hz unos incrementos de presión arterial media en la curva control ($E_{0\text{-L-NAME}}$) que corresponden respectivamente a $6,5 \pm 0,9$, $29,1 \pm 2,8$, $43,6 \pm 3,2$ y $75,2 \pm 3,4$ mm Hg respectivamente (Figura 43), y que resultan ligeramente superiores (pero no estadísticamente significativas las diferencias) a los obtenidos a las mismas frecuencias (curva E0) en ausencia de L-NAME.

Los incrementos de presión arterial media en las curvas, E1, E2 y E3 en presencia de L-NAME, tras la perfusión de suero fisiológico (1 ml/h) sufren una ligera disminución en los valores frente a los obtenidos en la curva $E_{0\text{-L-NAME}}$.

En presencia de L-NAME, ni la perfusión intravenosa de serotonina (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) ni la del agonista selectivo 8-OH-DPAT (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$), modifica los incrementos de presión obtenidos por estimulación (Figuras 43 y 46).

Efecto de la perfusión intravenosa de 5-HT y de 8-OH-DPAT tras la administración de L-arginina en presencia de L-NAME

La administración de L-arginina (100 mg/kg, i.v.) 30 minutos después de administrar L-NAME (10 mg/kg, i.v.), determina un descenso de la presión arterial media recobrando un valor similar ($40,9 \pm 1,0$ mm Hg) al que presentaron todos los animales que no recibieron L-NAME.

La realización de la curva control $E0_{L\text{-arginina}}$, tras la administración de L-arginina, lleva a incrementos de presión arterial media de $5,1 \pm 0,9$, $25,3 \pm 2,5$, $35,7 \pm 3,6$ y $76,3 \pm 7,4$ mm Hg para las frecuencias de estimulación de 0,1, 0,5, 1 y 5 Hz respectivamente. Estos valores no difieren de los de $E0$, y son ligeramente inferiores a los de $E0_{L\text{-NAME}}$ (Figura 44).

En estas condiciones experimentales la perfusión de 5-HT ($10 \mu\text{g/kg/min}$) y de 8-OH-DPAT ($10 \mu\text{g/kg/min}$) provoca un claro efecto inhibitor de los incrementos de presión obtenidos por estimulación (Figuras 44 y 47).

Efecto de la perfusión de 5-hidroxitriptamina tras la administración de D-arginina en presencia de L-NAME

La administración de D-arginina (100 mg/kg , i.v.) 30 minutos después de administrar L-NAME (10 mg/kg), no modifica el incremento de presión arterial media que presentan todos los animales que recibieron L-NAME ($57,9 \pm 3,8$ mm Hg). Los incrementos de presión arterial media que se producen, a las distintas frecuencias de estimulación, en su curva estimulación-respuesta control ($E0_{D\text{-arginina}}$) son de $9,5 \pm 1,8$, $38,0 \pm 4,3$, $54,2 \pm 4,5$ y $81,2 \pm 2,5$ mm Hg.

En estas condiciones experimentales la perfusión de 5-HT ($10 \mu\text{g/kg/min}$) no origina una inhibición significativamente distinta a la curva de estimulación-respuesta $E0_{D\text{-arginina}}$ (Figura 45).

Efecto de la perfusión intravenosa de 8-OH-DPAT después de la administración de ODQ

La administración vía i.v. tipo bolus de ODQ ($10 \mu\text{g/kg}$) no modifica significativamente la presión arterial media de los animales ($41,46 \pm 1,59$ mm Hg), del mismo modo que tampoco es capaz de modificar significativamente los incrementos de presión arterial media ($E0_{ODQ}$) con respecto a la $E0$ control, siendo estos incrementos de

presión para las frecuencias de estimulación de 0,1, 0,5, 1 y 5 Hz los siguientes: $8,5 \pm 0,1$, $27,4 \pm 0,2$, $38,2 \pm 0,5$, $66,5 \pm 0,3$ mm Hg (Figura 48).

En presencia de este inhibidor de la guanilato ciclasa (ODQ) se revierte el efecto inhibitor, producido por la perfusión intravenosa de $10 \mu\text{g/kg/min}$ de 8-OH-DPAT, sobre los incrementos de presión arterial media inducidos por estimulación (Figura 48).

Efecto de la perfusión intravenosa de 8-OH-DPAT después de la administración de indometacina

La administración por vía i.v. tipo bolus de indometacina (2 mg/kg) no modifica significativamente la presión arterial media de los animales ($43,2 \pm 12,5$ mm Hg), del mismo modo que tampoco es capaz de modificar significativamente los incrementos de presión arterial media ($E0_{\text{indo}}$) con respecto a la $E0$ control, siendo estos incrementos de presión para las frecuencias de estimulación de 0,1, 0,5, 1 y 5 Hz los siguientes: $6,9 \pm 0,6$, $22,2 \pm 4,3$, $37,6 \pm 5,7$, $65,6 \pm 6,8$ mm Hg (Figura 49).

En presencia de este inhibidor de la vía de las ciclooxigenasas la perfusión de 8-OH-DPAT ($10 \mu\text{g/kg/min}$) produce un efecto inhibitor sobre los incrementos de presión arterial media inducidos por estimulación (Figura 49), aunque esta inhibición no es significativa.

Efecto de la perfusión intravenosa de 8-OH-DPAT después de la administración de glibenclamida

La administración por vía i.v. tipo bolus de glibenclamida (10 mg/kg) no modifica significativamente la presión arterial media de los animales, del mismo modo que tampoco es capaz de modificar significativamente los incrementos de presión arterial media ($E0_{\text{gliben}}$) con respecto a la $E0$ control, siendo estos incrementos de presión para las frecuencias de estimulación de 0,1, 0,5, 1 y 5 Hz los siguientes: $4,9 \pm 0,3$, $18,8 \pm 1,8$, $42,9 \pm 3,2$, $77,2 \pm 3,9$ mm Hg respectivamente.

En presencia de este inhibidor de los canales de K^+ -ATP dependientes, la perfusión de 8-OH-DPAT (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) produce un efecto inhibitor sobre los incrementos de presión arterial media inducidos por estimulación (Figura 50) similar a la producida en ausencia de glibenclamida, sobre todo a las frecuencias de estimulación más bajas.

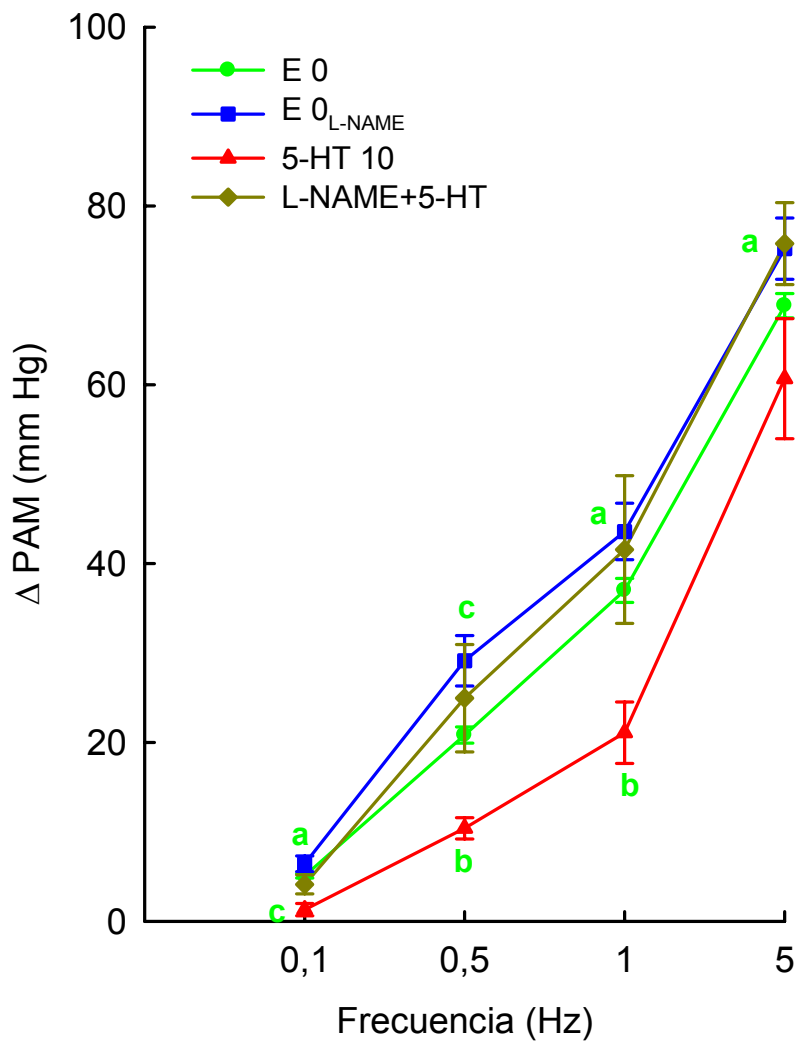


Figura 43: Influencia de la perfusión i.v. de 5-HT (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) sobre los incrementos de presión arterial media (Δ PAM) obtenidos, por estimulación simpática total, en ratas hiperglucémicas pithed pretratadas con L-NAME (10 mg/kg, i.v.) a) $P < 0,05$; b) $P < 0,01$ y c) $P < 0,001$ con respecto a E0 (verde) y E0_{L-NAME} (azul)

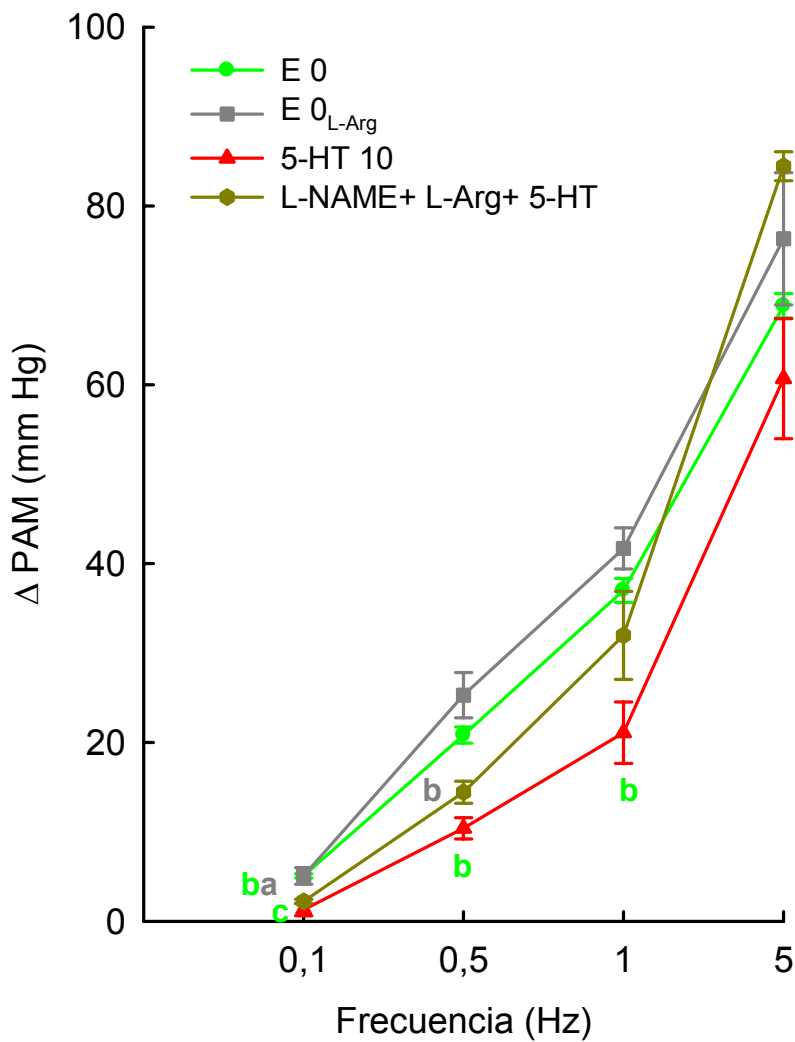


Figura 44: Influencia de la perfusión intravenosa de 5-HT (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) sobre los incrementos de presión arterial media (Δ PAM) obtenidos, por estimulación simpática total, en ratas hiperglucémicas pithed pretratadas con L-NAME (10 mg/kg, i.v.) y L-arginina (100 mg/kg, i.v.). a) $P < 0,05$; b) $P < 0,01$ y c) $P < 0,001$ con respecto a E0 (verde) y E0_{L-arg} (gris).

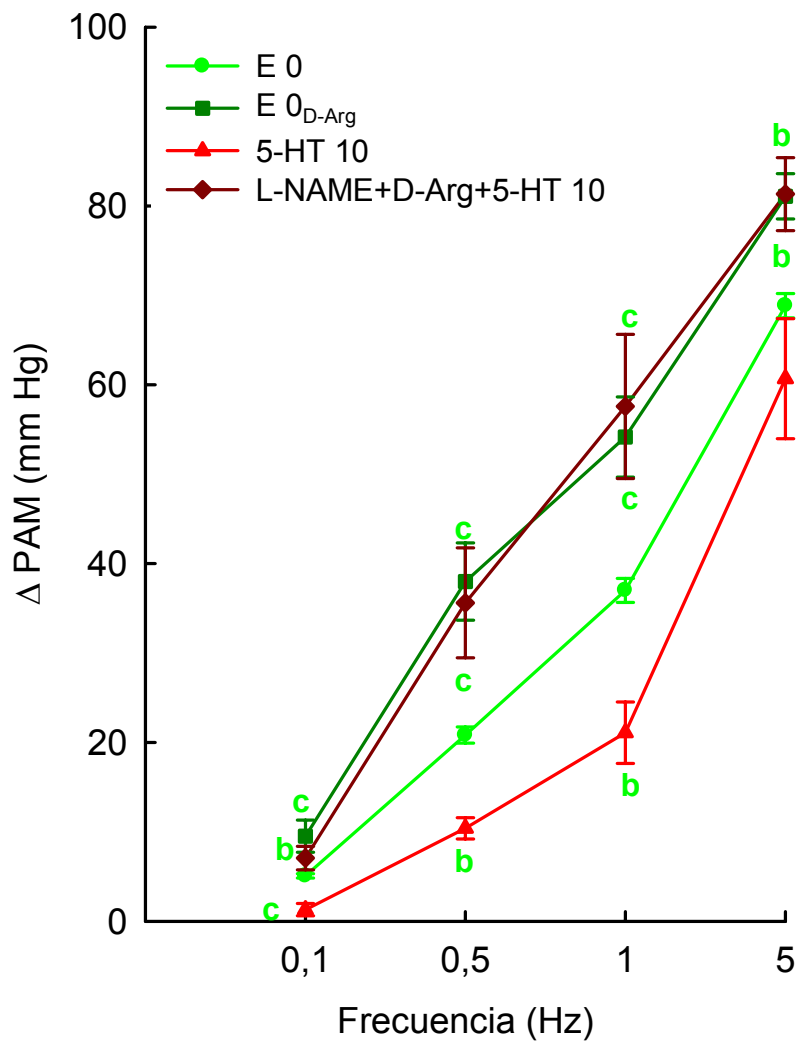


Figura 45: Influencia de la perfusión intravenosa de 5-HT (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) sobre los incrementos de presión arterial media (Δ PAM) obtenidos, por estimulación simpática total, en ratas hiperglucémicas pithed pretratadas con L-NAME (10 mg/kg, i.v.) y D-arginina (100 mg/kg, i.v.). a) $P < 0,05$; b) $P < 0,01$ y c) $P < 0,001$ con respecto a E0 (verde) y E0_{D-arg} (verde oscuro).

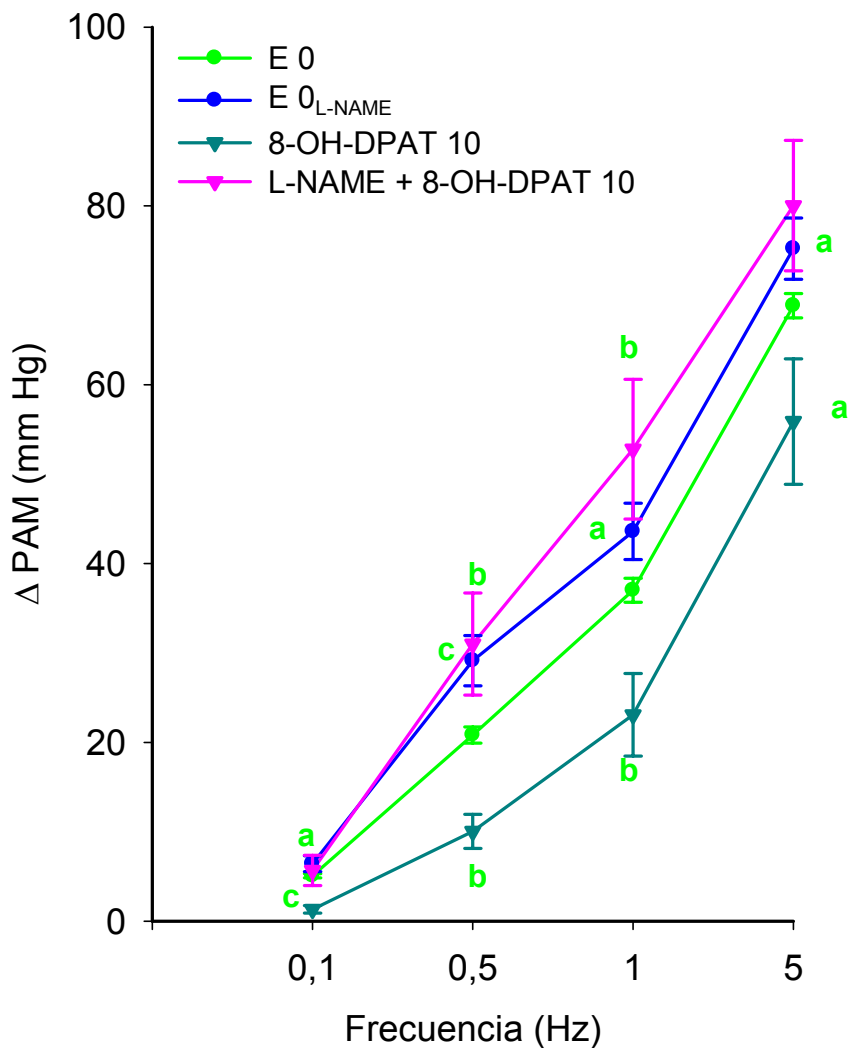


Figura 46: Influencia de la perfusión i.v. de 8-OH-DPAT (10 μ g/kg/min) sobre los incrementos de presión arterial media (Δ PAM) obtenidos, por estimulación simpática total, en ratas hiperglucémicas pithed pretratadas con L-NAME (10 mg/kg, i.v.). a) $P < 0,05$; b) $P < 0,01$ y c) $P < 0,001$ con respecto a E0 (verde) y E0_{L-NAME} (azul).

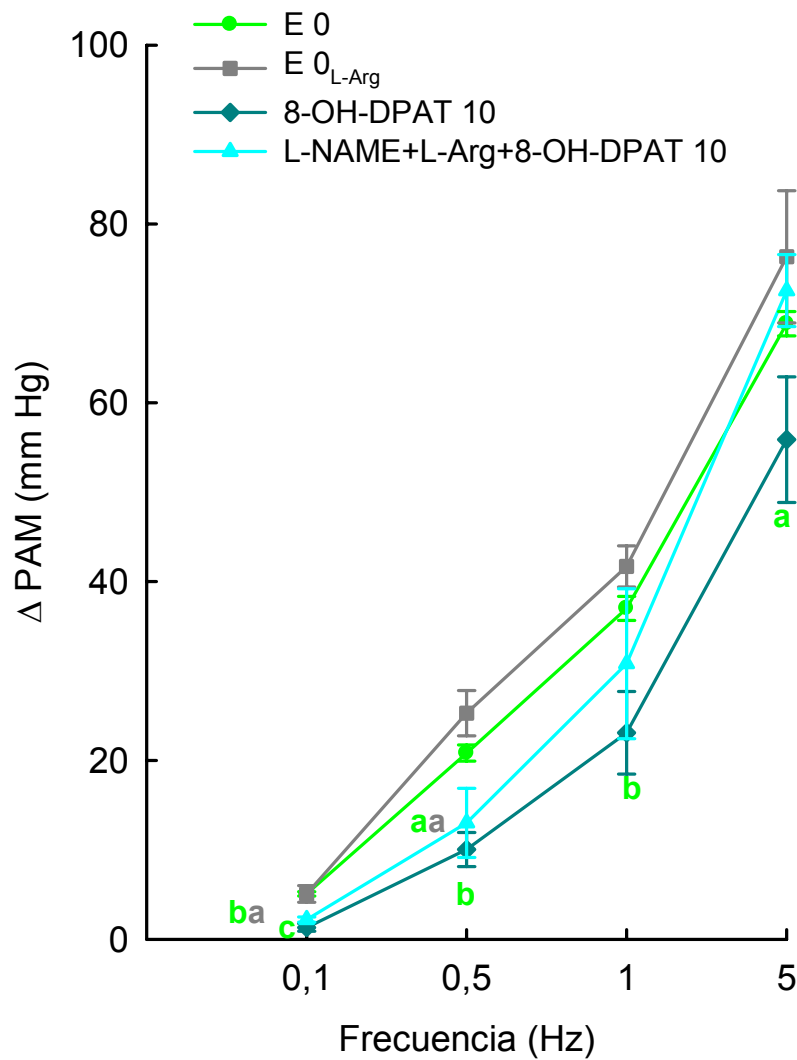


Figura 47: Influencia de la perfusión intravenosa de 8-OH-DPAT (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) sobre los incrementos de presión arterial media (Δ PAM) obtenidos, por estimulación simpática total, en ratas hiperglucémicas pithed pretratadas con L-NAME (10 mg/kg, i.v.) y L-arginina (100 mg/kg, i.v.). a) $P < 0,05$; b) $P < 0,01$ y c) $P < 0,001$ con respecto a E0 (verde) y E0_{L-arg} (gris).

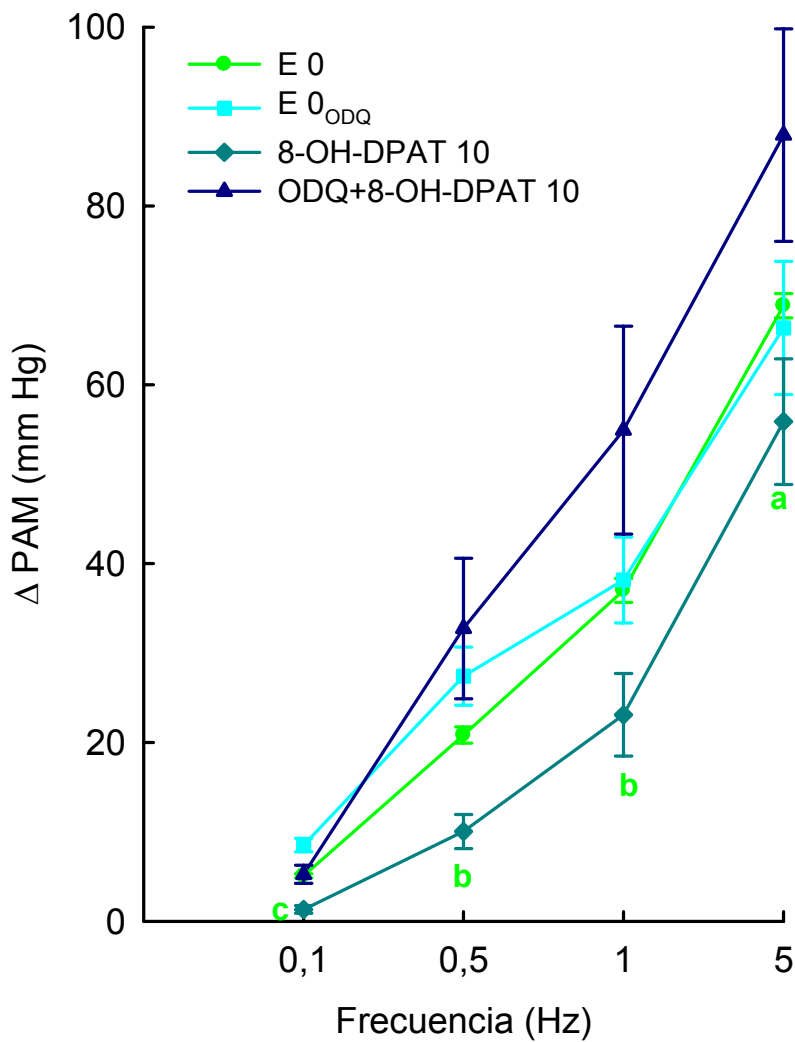


Figura 48: Influencia de la perfusión intravenosa de 8-OH-DPAT (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) sobre los incrementos de presión arterial media (Δ PAM) obtenidos, por estimulación simpática total, en ratas hiperglucémicas pithed pretratadas con ODQ (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.). a) $P < 0,05$; b) $P < 0,01$ y c) $P < 0,001$ con respecto a E0 (verde) y E0_{ODQ} (celeste).

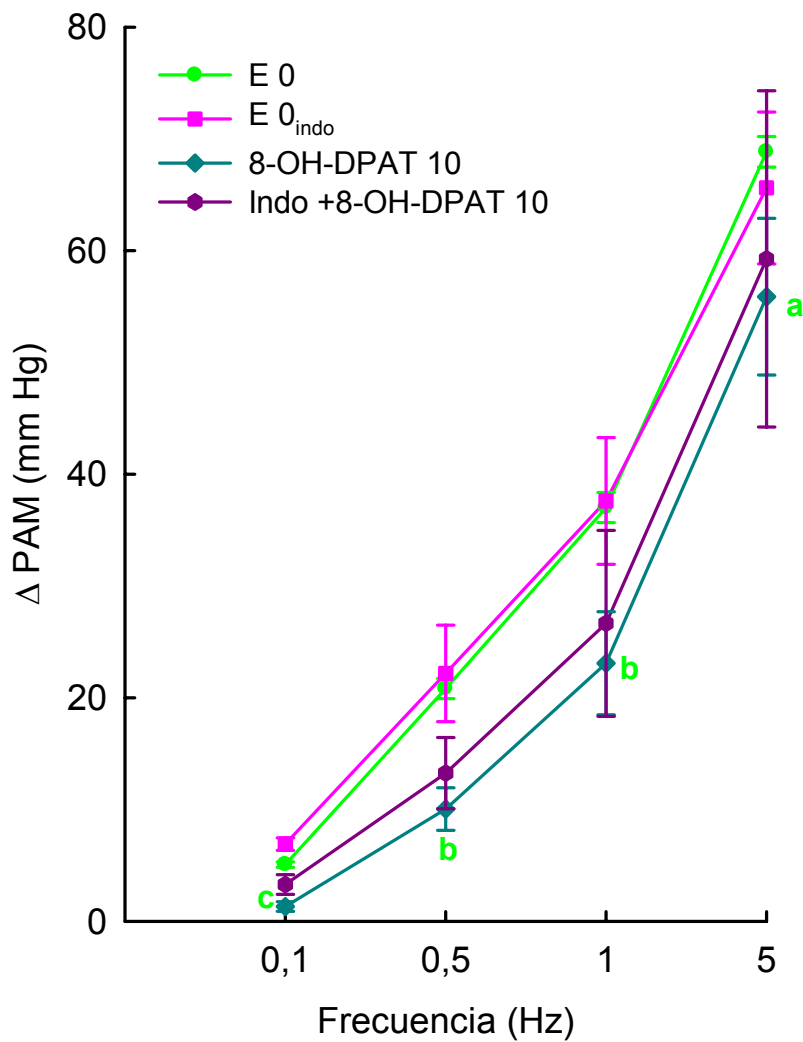


Figura 49: Influencia de la perfusión intravenosa de 8-OH-DPAT (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) sobre los incrementos de presión arterial media (Δ PAM) obtenidos, por estimulación simpática total, en ratas hiper glucémicas pithed pretratadas con indometacina (2 mg/kg, i.v.). a) $P < 0,05$; b) $P < 0,01$ y c) $P < 0,001$ con respecto a E0 (verde) y E0_{Indo} (rosa).

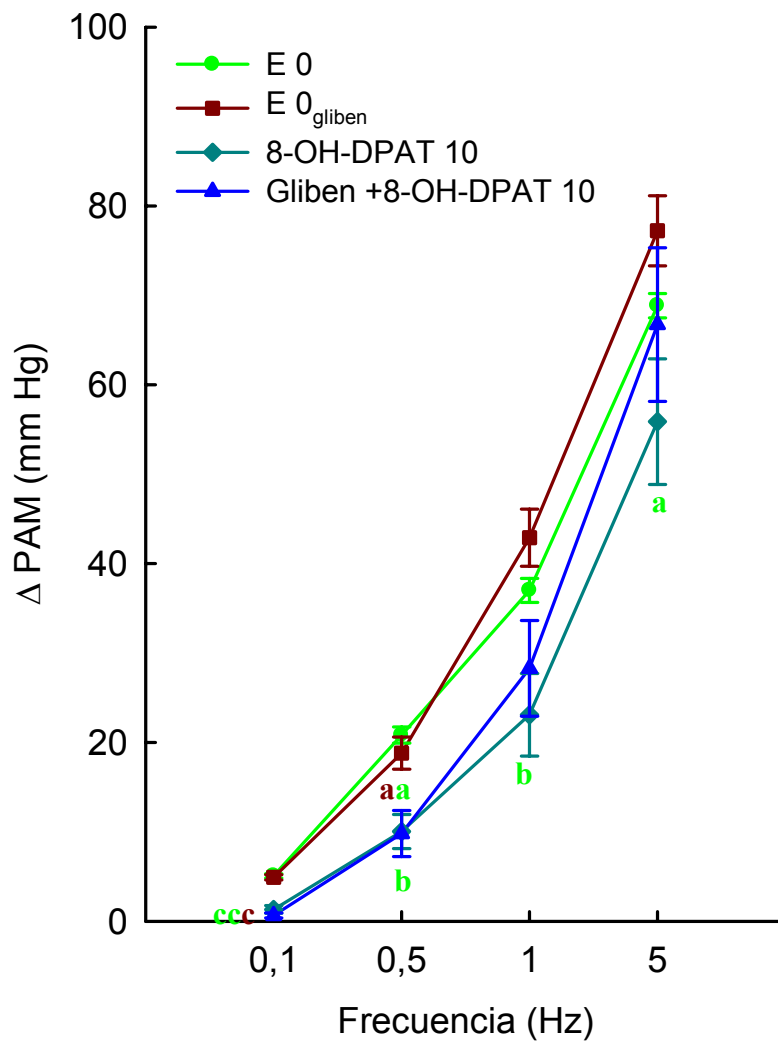


Figura 50: Influencia de la perfusión intravenosa de 8-OH-DPAT (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) sobre los incrementos de presión arterial media (Δ PAM) obtenidos, por estimulación simpática total, en ratas hiperglucémicas pithed pretratadas con glibenclamida (10 mg/kg, i.v.) a) $P < 0,05$; b) $P < 0,01$ y c) $P < 0,001$ con respecto a E0 (verde) y E0_{gliben} (granate).

III.- ESTIMULACIÓN COLINÉRGICA

Estudios realizados hace algún tiempo en nuestro laboratorio, en animales normoglucémicos, pusieron de manifiesto que 5-hidroxitriptamina interfiere con la transmisión colinérgica cardíaca en ratas pithed, mediante mecanismos de naturaleza preferentemente presináptica que implican la activación de receptores 5-HT₂, inhibidores de la liberación de acetilcolina y 5-HT₃, facilitadores de dicha liberación (Morán et al., 1994a).

1.- Ratas hiperglucémicas

Las ratas wistar hiperglucémicas pithed utilizadas en nuestros experimentos presentan valores de frecuencia cardíaca de $289,7 \pm 5,0$ ppm. La disminución de la frecuencia cardíaca obtenida en nuestras condiciones experimentales es producida por una estimulación de las neuronas vagales a nivel cardíaco, preferentemente a nivel preganglionar (Roquebert *et al.*, 1991; Morán *et al.*, 1994a), que lleva a la liberación de acetilcolina. Esta liberación de acetilcolina conlleva una activación postsináptica de receptores colinérgicos, que son los responsables de la bradicardia. Esta acción explica que la bradicardia producida por estimulación eléctrica sea reproducida por acetilcolina exógena y totalmente inhibida tras administración de atropina.

Efecto de la solución salina y de 5-HT sobre la bradicardia obtenida por estimulación eléctrica del nervio vago

La estimulación eléctrica vagal, en ratas hiperglucémicas, a las frecuencias de 3, 6 y 9 Hz provoca una bradicardia frecuencia dependiente. A las frecuencias utilizadas en la curva de estimulación control, la disminución de la frecuencia cardíaca fue respectivamente de $-28,2 \pm 2,2$, $-53,4 \pm 4,80$ y $-87,1 \pm 7,0$ ppm. Dichos descensos se

mantienen sin cambios significativos en los animales que reciben 1 ml/h de solución salina (Figura 51), pero son inferiores a los que se consiguen, en similares condiciones experimentales, en ratas normoglucémicas.

La administración por vía i.v. de dosis bajas de 5-HT (10, 15, 30 y 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) no provoca modificaciones significativas con respecto a la curva de estimulación control, sin embargo dosis más elevadas de 5-HT (100 y 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) originan un aumento de la bradicardia, más marcado a las frecuencias bajas de estimulación (Figura 51).

Efecto de la administración intravenosa de los agonistas de receptores 5-HT₁ (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} y 5-HT_{1D}), 5-HT₂ y 5-HT₃ sobre la bradicardia obtenida por estimulación eléctrica vagal

El efecto bradicardizante producido por estimulación eléctrica vagal se ve modificado tras la administración intravenosa tipo bolus de 5-CT, agonista de receptores 5-HT₁, siendo su efecto dual, es decir, potenciador de la bradicardia a las dosis más bajas administradas (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e inhibidor de dicha bradicardia a dosis altas (100 y 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (Figura 52).

La acción potenciadora de la bradicardia inducida por dosis altas de 5-CT es reproducida por 8-OH-DPAT (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$), agonista selectivo de receptores 5-HT_{1A}, y por CGS-12066B (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$), agonista selectivo de receptores 5-HT₁. En ambos casos, la acción es más marcada a las frecuencias bajas de estimulación. Por su parte, la acción inhibidora es reproducida por el agonista selectivo de receptores 5-HT_{1D}, L-694,247 (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (Figura 53).

Ni el agonista selectivo de receptores 5-HT₂, α -metil-5-HT (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$), ni el agonista selectivo de receptores 5-HT₃, 1-fenilbiguanida (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$) fueron capaces de modificar los descensos de frecuencia cardiaca producidos por estimulación eléctrica vagal (Figura 52).

Efecto de los antagonistas de receptores 5-HT_{1D}, 5-HT_{1A}, 5-HT₇, y el antagonista no selectivo, metiotepina, sobre la bradicardia obtenida por estimulación eléctrica del nervio vago

La administración intravenosa del antagonista no selectivo de receptores de serotonina, metiotepina (0,1 mg/kg), así como de los antagonistas selectivos de receptores 5-HT_{1A} o 5-HT_{1D}, WAY-100,635 (100 µg/kg) y BRL-15572 (2 mg/kg) respectivamente, por sí mismos no modifican el descenso de frecuencia cardíaca producido por estimulación vagal. Sin embargo, mesulergina (1 mg/kg), antagonista selectivo de receptores 5-HT₇, potencia la bradicardia, sobre todo a frecuencias bajas de estimulación (Figura 54).

El tratamiento con mesulergina (1 mg/kg) reduce la acción potenciadora de 5-CT 10 µg/kg y la administración previa de WAY-100,635 (100 µg/kg) revierte la producida por 8-OH-DPAT (50 µg/kg) (Figuras 55 y 56). Por su parte, el pretratamiento con metiotepina (0,1 mg/kg) revierte la acción inhibitoria que 5-CT 50 µg/kg, induce sobre la bradicardia obtenida por estimulación vagal (Figura 55), mientras que BRL-15572 (2 mg/kg) revierte el efecto inhibitorio de L-694,247 (Figura 56).

Efecto de 5-CT, 8-OH-DPAT y L-694,247 sobre las respuestas bradicardizantes inducidas por administración de acetilcolina exógena

La administración intravenosa de diferentes dosis de Ach, (1, 5 y 10 µg/kg), induce una disminución de la frecuencia cardíaca. La disminución dosis-dependiente de la frecuencia cardíaca fue de $-20,8 \pm 3,5$, $-110,8 \pm 22,8$, $-158,0 \pm 32,4$ ppm, respectivamente.

Los agonistas 5-CT (10 µg/kg) y 8-OH-DPAT (50 µg/kg) potencian la bradicardia inducida por la administración de acetilcolina exógena (Figura 57). Por el contrario, el agonista selectivo de receptores 5-HT_{1D}, L-694,247, no inhibe las respuestas bradicardizantes producidas por la administración de acetilcolina exógena (Figura 57).

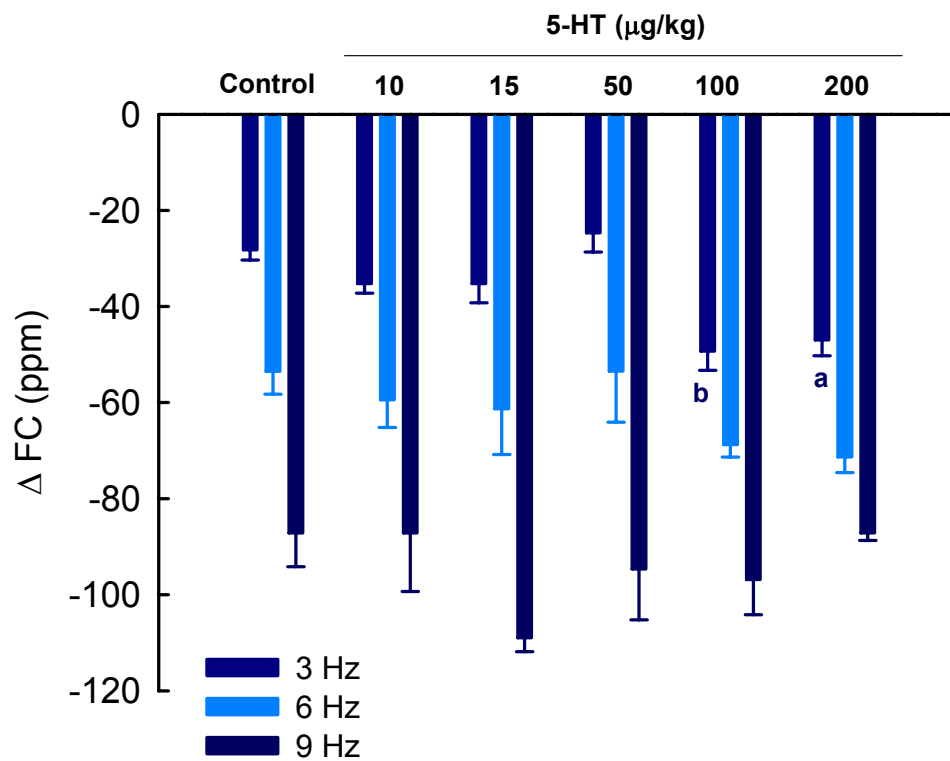


Figura 51: Variaciones de frecuencia cardiaca (Δ FC, ppm) producidas por estimulación eléctrica del nervio vago antes (control) y después de la administración i.v. de 10, 15, 50, 100 o 200 μ g/kg de 5-HT, en ratas hiperglucémicas pithed. a) $P < 0,05$; b) $P < 0,01$ y c) $P < 0,001$ con respecto al control.

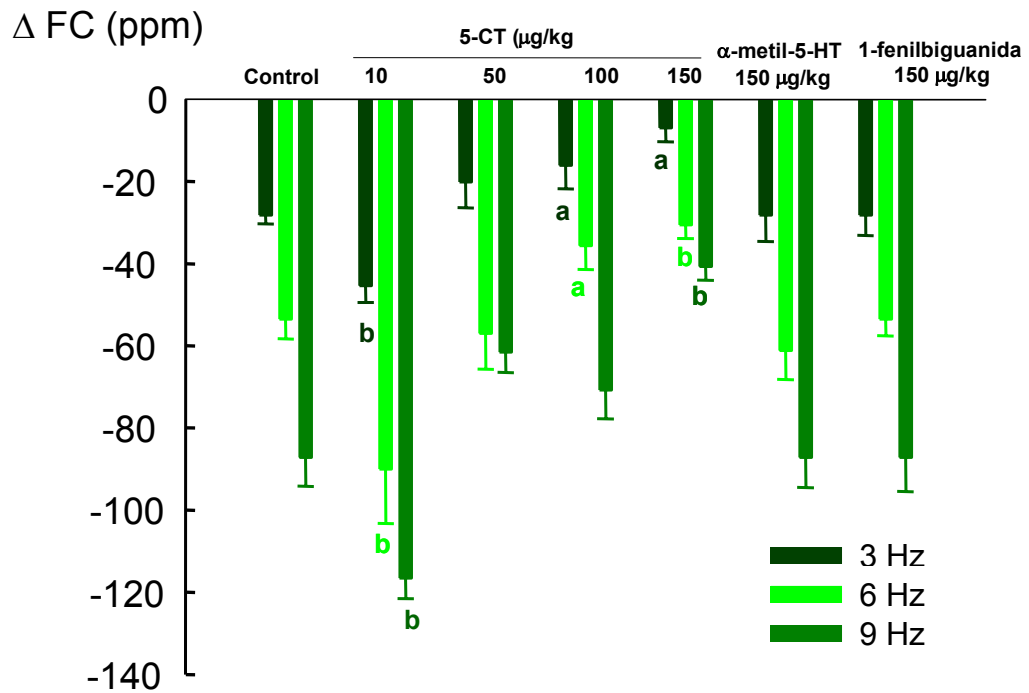


Figura 52: Variaciones de frecuencia cardiaca (Δ FC, ppm) producidas por estimulación eléctrica del nervio vago antes (control) y después de la administración i.v. de 5-CT (10, 50, 100 o 150 μ g/kg), α -metil-5-HT (150 μ g/kg) o 1-fenilbiguanida (150 μ g/kg), en ratas hiperglucémicas pithed. a) $P < 0,05$; b) $P < 0,01$ y c) $P < 0,001$ con respecto al control.

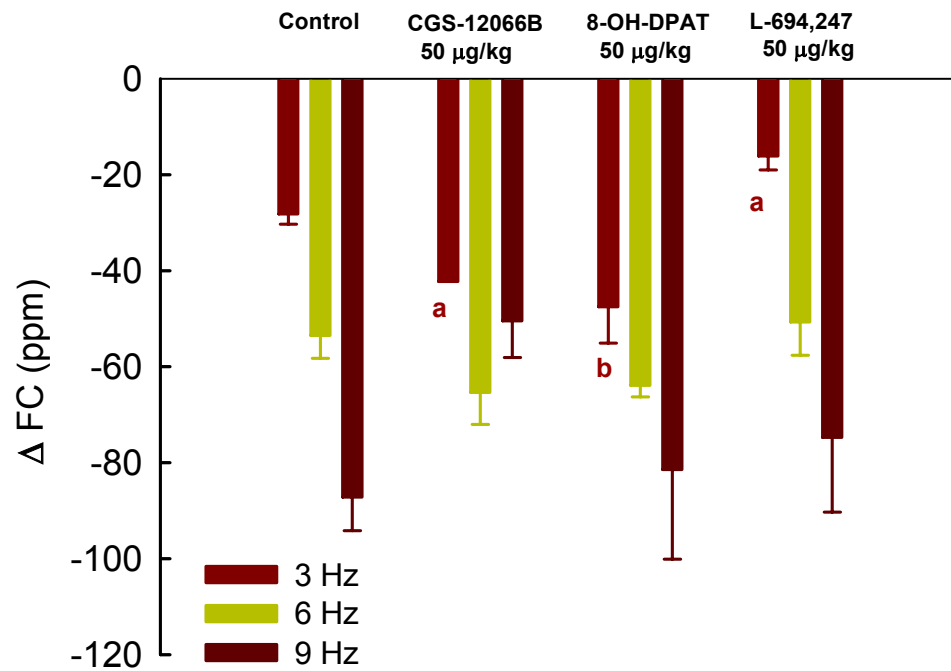


Figura 53: Variaciones de frecuencia cardiaca (Δ FC, ppm) producidas por estimulación eléctrica del nervio vago antes (control) y después de la administración i.v. de 8-OH-DPAT (50 μ g/kg), CGS-12066B (50 μ g/kg) o L-694,247 (50 μ g/kg), en ratas hiperglucémicas pithed. a) $P < 0,05$; b) $P < 0,01$ y c) $P < 0,001$ con respecto al control.

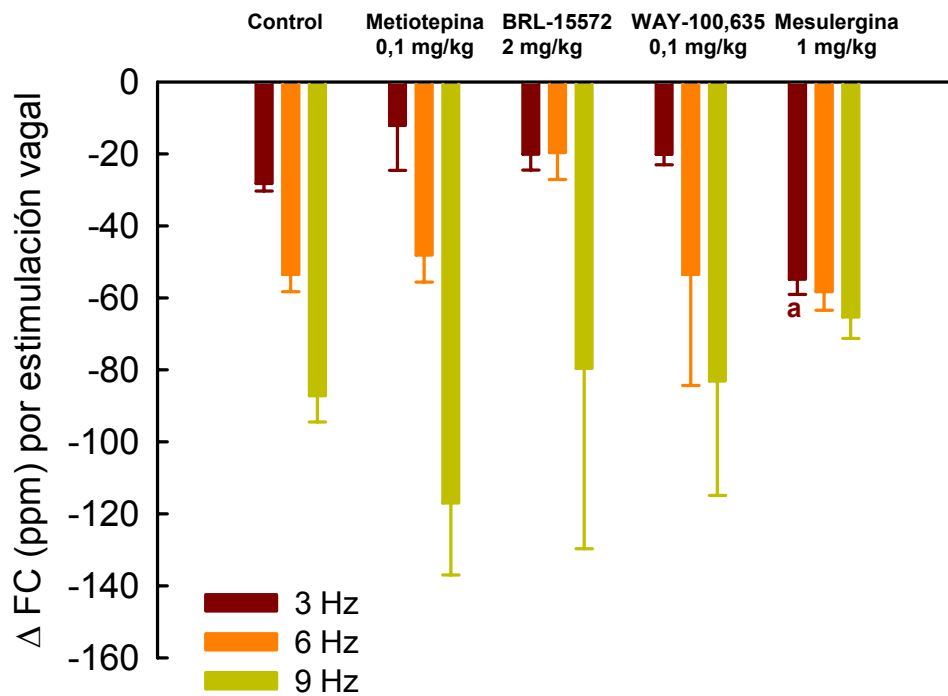


Figura 54: Variaciones de frecuencia cardiaca (Δ FC, ppm) producidas por estimulación eléctrica del nervio vago antes (control) y después de la administración i.v. de los antagonistas serotoninérgicos WAY-100,635 (100 μ g/kg), BRL-15572 (2 mg/kg), metiotepina (0,1 mg/kg) o mesulergina (1 mg/kg), en ratas hiperglucémicas pithed. a) $P < 0,05$; b) $P < 0,01$ y c) $P < 0,001$ con respecto al control.

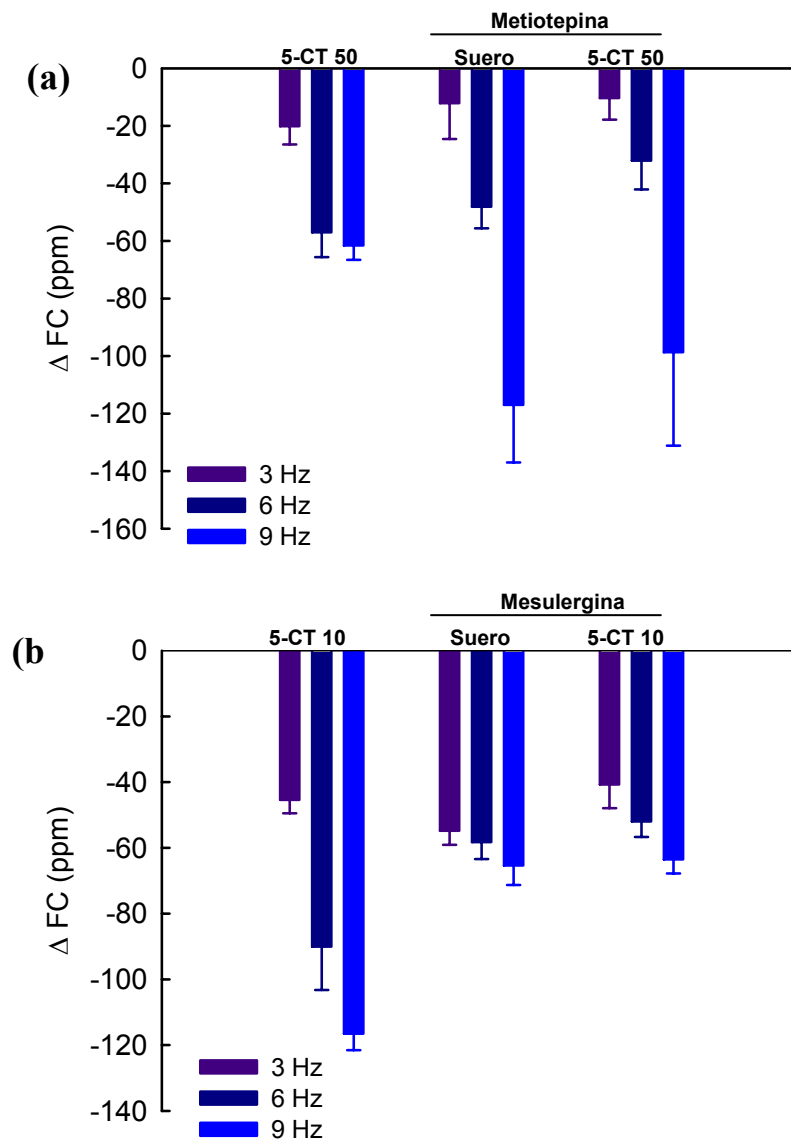


Figura 55: Efecto producido por la administración i.v. de **(a)** metiotepina (0,1 mg/kg) sobre la acción inhibitoria de 5-CT (50 μ g/kg) y **(b)** mesulergina (1 mg/kg) sobre la acción potenciadora de 5-CT (10 μ g/kg), en ratas hiperglucémicas pithed. a) $P < 0,05$; b) $P < 0,01$ y c) $P < 0,001$ con respecto a 5-CT.

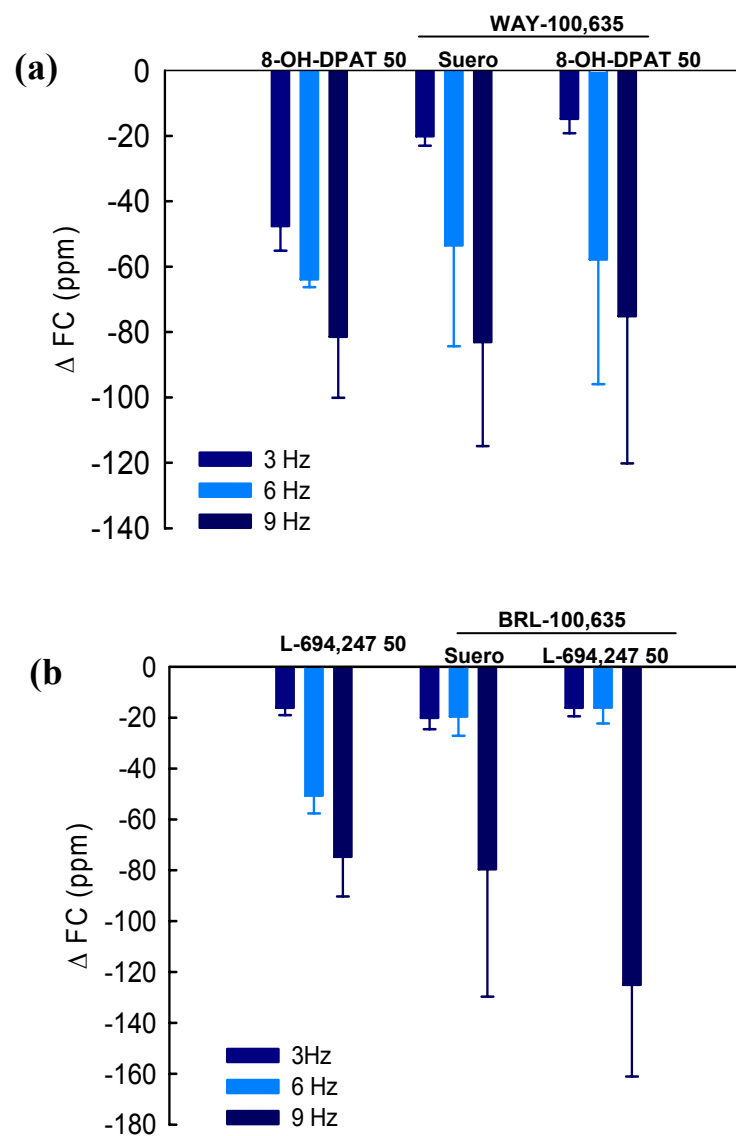


Figura 56: Efecto producido por la administración i.v. de **(a)** WAY-100,635 (0,1 mg/kg) sobre la acción potenciadora de 8-OH-DPAT (50 μ g/kg) y de **(b)** BRL-15572 (2 mg/kg) sobre la acción inhibidora de L-694,247 (50 μ g/kg), en ratas hiperglucémicas pithed. a) $P < 0,05$; b) $P < 0,01$ y c) $P < 0,001$ con respecto al agonista.

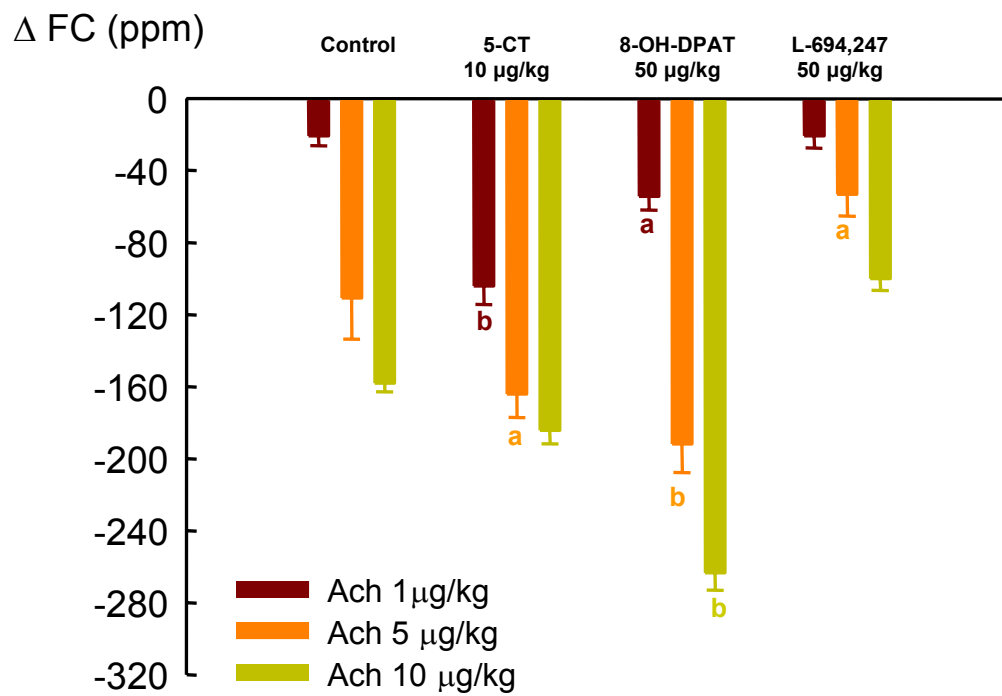


Figura 57: Efecto producido por 10 µg/kg de 5-CT, 50 µg/kg de 8-OH-DPAT o 50 µg/kg de L-694,247 sobre las variaciones de frecuencia cardiaca inducidas por la administración de Ach exógena (1, 5 y 10 µg/kg), en ratas hiperglucémicas pithed. a) $P < 0,05$; b) $P < 0,01$ y c) $P < 0,001$ con respecto al control realizado con Ach exógena E'0 (naranja).

IV.- RIÑÓN AISLADO PERFUNDIDO

1.- Características del riñón aislado perfundido de rata

La tabla 27 muestra las características del riñón aislado perfundido en ratas normoglucémicas e hiperglucémicas por estreptozotocina (28 días). Los riñones aislados se perfundieron a un flujo constante de 8 ml/min, siendo la presión de perfusión menor en el caso de los animales hiperglucémicos que en el caso de los animales normoglucémicos, lo que demuestra una resistencia vascular menor para el caso de ratas con hiperglucemia. Asimismo, estos riñones son mucho más sensibles a la solución despolarizante de KCl (100 nM). En el caso del estudio de las respuestas vasodilatadoras, se indujo un tono vascular de alrededor de 40 mm Hg con fenilefrina, siendo este tono similar en los riñones procedentes de ratas normoglucémicas y en los provenientes de animales hiperglucémicos.

2. Respuestas vasculares renales inducidas por 5-HT y agonistas selectivos de receptores 5-HT₂, en ratas normoglucémicas

5-Hidroxitriptamina

La serotonina (0,03-3 μ M) induce una vasoconstricción dependiente de la concentración en el lecho vascular de riñón aislado (Figura 58). El efecto máximo obtenido con la concentración de 1 μ M, equivale aproximadamente al inducido por la activación de receptores α -adrenérgicos por la fenilefrina, pero es el doble de la vasoconstricción producida por la angiotensina II (Figura 58a, tabla 28). La vasoconstricción producida por 5-HT es completamente antagonizada por la ritanserina, un antagonista de receptores 5-HT₂, sin que llegue en ningún momento a aparecer relajación de estos riñones en los que el tono vascular basal es muy bajo (Figura 58b).

En presencia del inhibidor de la síntesis de NO, L-NNA (100 μ M), la presión de perfusión basal está aumentada en un 30% ($88,4 \pm 4,6$ frente a $67,8 \pm 4,11$ mm Hg, $n=9$, $P > 0,001$). En tales condiciones, las respuestas vasoconstrictoras de 5-HT están potenciadas, con un desplazamiento de factor 3, como lo demuestran los valores de CE_{50} (tabla 28, Figura 58b), sin modificación, en todo caso, de la respuesta máxima.

α -metil-5-HT, DOI y *m*-CPP

El agonista selectivo de receptores 5-HT₂, α -metil-5-HT, reproduce la vasoconstricción renal producida por 5-HT (Figura 59a). Del mismo modo, DOI, un agonista de receptores 5-HT_{2A/2C}, y *m*-CPP, un agonista selectivo de receptores 5-HT_{2C}, inducen vasoconstricciones renales, pero con un efecto máximo muy disminuido, siendo apenas 1/3 y 1/5 de la respuesta provocada por 5-HT (Figura 59a, tabla 28).

BW-723C86

Por el contrario, BW-723C86, agonista selectivo de receptores 5-HT_{2B}, no produjo más que una vasoconstricción insignificante en el lecho vascular de riñón aislado (Figura 59a). Después de la inducción de un tono vascular renal por Ang II (41 ± 3 mm Hg a una concentración de $9,6 \pm 3,1$ nM, $n=4$), BW-723C86 es capaz de inducir una vasodilatación concentración-dependiente que alcanzó un valor de $35,4 \pm 9,2$ % a una concentración de 5 μ M (Figura 59b).

3. Respuestas vasodilatadoras renales inducidas por Ach, NPNa y agonistas de receptores 5-HT₁

Para la evaluación de las respuestas vasodilatadoras renales, se restauró un tono vascular en este lecho, por medio de inyecciones bolus de fenilefrina o de Ang II cada dos minutos. Los picos de constricción media eran de $41,1 \pm 1,7$ y de $42,1 \pm 1,4$ mm Hg respectivamente, para concentraciones de fenilefrina de $1,2 \pm 0,1$ μ M ($n = 24$), y de Ang

II de $7,9 \pm 1,2$ nM (n = 15). No existe ninguna diferencia en el tono vascular producido entre los diferentes grupos experimentales.

Acetilcolina y nitroprusiato de sodio

Con el fin de verificar la funcionalidad del endotelio en nuestras preparaciones de riñón aislado se estudió la respuesta a la acetilcolina. Como era de esperar, la acetilcolina origina una relajación concentración dependiente, inhibida en un 75% en presencia de 100 μ M de L-NNA (Figura 60a). La capacidad vasodilatadora de la acetilcolina es similar para cualquiera de los vasoconstrictores utilizados para inducir el tono renal (fenilefrina o angiotensina II) (Figura 60a). Nitroprusiato de sodio (NPNa, 3 μ M), que activa directamente la vía de la guanilatociclasa en músculo liso vascular, produce una vasodilatación próxima al 80%, resultado coincidente con estudios previos del grupo (Figura 60a).

Vasodilatación inducida por la activación de receptores 5-HT_{1A}

El agonista específico de receptores 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT, produce una relajación vascular renal concentración-dependiente, que llega al $73,0 \pm 5,9$ % de reversión del tono inducido por fenilefrina (Figura 60b). Sin embargo, WAY-100,635 que a una concentración de 0,1 μ M habitualmente bloquea los receptores 5-HT_{1A}, no inhibe más que parcialmente las respuestas vasodilatadoras inducidas por las concentraciones más elevadas de 8-OH-DPAT (Figura 60b). Esto nos llevó a evaluar las respuestas de 8-OH-DPAT en riñones en los que el tono vascular se indujo con otro constrictor, la angiotensina II. En este caso la vasodilatación producida por 8-OH-DPAT tenía un máximo de dilatación de $25,1 \pm 8,2$ % (a 3 μ M, n = 6), respuesta que estaba totalmente inhibida en presencia de 0,1 μ M de WAY-100,635 (Figura 60b).

Vasodilatación inducida por la activación de receptores 5-HT_{1B}

El agonista selectivo de receptores 5-HT_{1B}, CGS-12066B, induce una vasodilatación renal que depende en gran parte de una interacción con los receptores α -adrenérgicos. De hecho, se ve una importante relajación (próxima al 80%) del tono renal inducido por fenilefrina, mientras que esta relajación no es más que $27,3 \pm 1,9\%$ (para $1,5 \mu\text{M}$, $n = 6$) cuando dicho tono es inducido por angiotensina II (Figura 61a). La existencia de L-NNA ($100 \mu\text{M}$) en el medio de perfusión no modifica la respuesta vasodilatadora renal inducida por CGS-12066B (Figura 61a).

Vasodilatación producida por la activación de receptores 5-HT₇

5-CT es un agonista tanto de receptores 5-HT₁ como de receptores 5-HT₇. Nosotros lo utilizamos para probar la eventual respuesta debida a la activación de receptores 5-HT₇, ya que disponemos de un antagonista selectivo de receptores 5-HT₇, la mesulergina. 5-CT produjo una relajación del $40,6 \pm 5,0\%$ ($n = 7$) en un tono inducido por angiotensina II. Un tercio de esta respuesta podría estar ligada a la activación de receptores 5-HT₇, como fue demostrado en presencia de su antagonista, mesulergina ($3 \mu\text{M}$) (Figura 61b).

Agonistas de receptores 5-HT_{1D} y 5-HT₃

L-694,247 ($0,03$ a $3 \mu\text{M}$), agonista selectivo de receptores 5-HT_{1D}, y 1-fenilbiguanida ($0,03$ a $3 \mu\text{M}$), agonista selectivo de receptores 5-HT₃, no produjeron ni respuestas vasodilatadoras (en un tono inducido por fenilefrina) ni respuestas vasoconstrictoras en ausencia de tono inducido.

4. Diabetes inducida por estreptozotocina

Después de la inyección i.v. de estreptozotocina (60 mg/kg, disuelto en tampón citrato, pH = 4), la diabetes se desarrolla rápidamente (Figura 19b). La glucemia se mantiene en niveles elevados los 28 días de estabulación de los animales. El mantenimiento de la hiperglucemia llevaba a una pérdida de peso de los animales con respecto a los controles de su misma edad (Figura 18b).

Las funciones renales fueron evaluadas en 8-10 animales de cada grupo, después de los 28 días de estabulación, justo antes del estudio de la reactividad vascular en el riñón aislado. Para ello, los animales fueron situados en jaulas metabólicas para hacer una toma de orina de 24 horas, seguido de una extracción de sangre. Los resultados muestran que las ratas hiperglucémicas tienen una poliuria, hecho que se demuestra claramente por la presencia de glucosa en orina y también por una disminución de la reabsorción de sodio (tabla 26). Además los animales están en un periodo de polidipsia e hiperfagia. Después de 4 semanas de evolución de la diabetes, el aclaramiento de creatinina está aumentado en un 25% con respecto a los animales control (tabla 26). Podemos decir pues, que las ratas se encuentran en el estadio de hiperfiltración glomerular, característico de la fase precoz de la diabetes mellitus.

5. Efectos agudos de 10 mM de glucosa en las respuestas vasoconstrictoras y vasodilatadoras renales

Debido a que el medio de perfusión para el riñón aislado utilizado en nuestras condiciones de experimentación contiene 10 mM de glucosa, los primeros experimentos realizados fueron para evaluar si una exposición aguda a esta concentración de glucosa tenía, por si misma, un efecto en las respuestas vasoconstrictoras de 5-HT, o en las respuestas vasodilatadoras de Ach o de CGS-12066B. Para ello, a un grupo de riñones procedentes de animales normoglucémicos se le perfundió con un medio de perfusión que contenía una concentración fisiológica de glucosa (5 mM). La Figura 62a muestra como la exposición aguda de este lecho vascular a 10 mM de glucosa aumenta globalmente la respuesta vasoconstrictora de 5-HT. La CE_{50} no está modificada pero la

respuesta máxima está aumentada en un 20% ($E_{max} = 193 \pm 10$ vs 160 ± 7 mm Hg, $n = 6-8$, $P < 0,05$). Las respuestas vasodilatadores renales, por el contrario, tanto las inducidas por Ach (Figura 64a) como por CGS-12066B (Figura 65b), no se ven modificadas por una concentración mayor de glucosa en el medio de perfusión.

6. Influencia de la diabetes mellitus en las respuestas vasoconstrictoras renales

En los riñones procedentes de animales diabéticos, se ve una modificación bifásica de las respuestas a 5-HT. Los efectos vasoconstrictores inducidos por las concentraciones más bajas siguen estando aumentados, mientras que las respuestas a las concentraciones más altas están inhibidas (Figura 62a). En riñones procedentes de animales normoglucémicos la adición de L-NNA produce una potenciación de la respuesta y desplaza la curva hacia la izquierda (Figura 62b, tabla 28). La inhibición de la NO sintasa aumenta de manera importante la resistencia vascular de los riñones procedentes de animales diabéticos, debido a que la presión de perfusión está duplicada (102 ± 15 vs 56 ± 5 mm Hg, $n = 5$; $P < 0,05$).

La diabetes modifica la vasoconstricción producida por α -metil-5-HT de forma similar a como ocurre con 5-HT (Figura 63b), mientras que en DOI se ve únicamente una potenciación de la respuesta en animales diabéticos (Figura 63c) y la respuesta al *m*-CPP se mantiene invariable (Figura 63d, tabla 28).

7. Influencia de la diabetes en las respuestas vasodilatadoras renales

Con ninguno de los vasodilatadores estudiados, Ach (Figura 64a), nitroprusiato de sodio (Figura 64b), el agonistas de receptores 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT (Figura 65a), o el agonista de receptores 5-HT_{1B}, CGS-12066B (Figura 65b), hemos visto diferencias entre la vasodilatación inducida en el lecho vascular renal de las ratas diabéticas con respecto al de las ratas normoglucémicas. Hay una contribución del NO a la vasodilatación del CGS-12066B, ya que en presencia de 100 mN de L-NNA su respuesta vasodilatadora está inhibida (Figura 64b).

Tabla 27: Características del riñón aislado perfundido de ratas normoglucémicas y diabéticas.

	Presión de perfusión renal (mm Hg)	Resistencia vascular renal (mm Hgxmin/ml)	Vasoconstricción inducida por KCl 100mM (mm Hg)	Fenilefrina (μM)	Tono inducido por fenilefrina (mm Hg)
Ratas control	66,4 ± 2,3 (53)	8,1 ± 0,3 (53)	193 ± 4 (52)	1,2 ± 0,14 (24)	41,1 ± 1,7 (24)
Ratas diabéticas	49,0 ± 2,5 ^c (40)	6,2 ± 0,3 ^c (40)	217 ± 3 ^c (40)	1,1 ± 0,10 (23)	42,3 ± 1,2 (23)

Los resultados se presentan como la media ± sem, para el número de animales indicado entre paréntesis.

Se comparan por un test *t* de Student. ^c P < 0,001.

Tabla 28: Concentración eficaz 50 (CE₅₀) y efecto máximo (E_{max}) obtenidos para las respuestas vasoconstrictoras inducidas sobre el riñón aislado perfundido de ratas control y diabéticas.

	CE ₅₀ (μM)	E _{max} (mm Hg)	n	CE ₅₀ (μM)	E _{max} (mm Hg)	n
	<i>Ratas control</i>			<i>Ratas diabéticas</i>		
5-HT	0,34 ± 0,04	193 ± 10	8	0,13 ± 0,03**	136 ± 8**	7
α-metil-5-HT	0,49 ± 0,06 ^a	156 ± 7	5	0,24 ± 0,03**	141 ± 8	6
DOI	0,014 ± 0,002 ^c	67 ± 6 ^c	10	0,013 ± 0,003	110 ± 9**	5
BW723C86	0,43 ± 0,06	10 ± 2 ^c	4	/	/	/
<i>m</i> -CPP	1,16 ± 0,37	35 ± 9 ^c	5	0,43 ± 0,12	26 ± 2	3
5-HT + L-NNA	0,12 ± 0,02 ^c	174 ± 11	9	0,04 ± 0,01*	120 ± 14*	5
Fenilefrina	0,86 ± 0,20 ^a	161 ± 14	5	1,05 ± 0,32	134 ± 11	7
Ang II	0,003 ± 0,001 ^c	93 ± 11 ^c	3	/	/	/

Los resultados se expresan como media ± sem, para el número de animales indicados (n). Se comparan por un test ANOVA seguido de un análisis de las diferencias con respecto a 5-HT por un test de Tukey. ^a $P < 0,05$, ^b $P < 0,01$ y ^c $P < 0,001$. Diferencias entre ratas control y diabéticas: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$. /: no calculada.

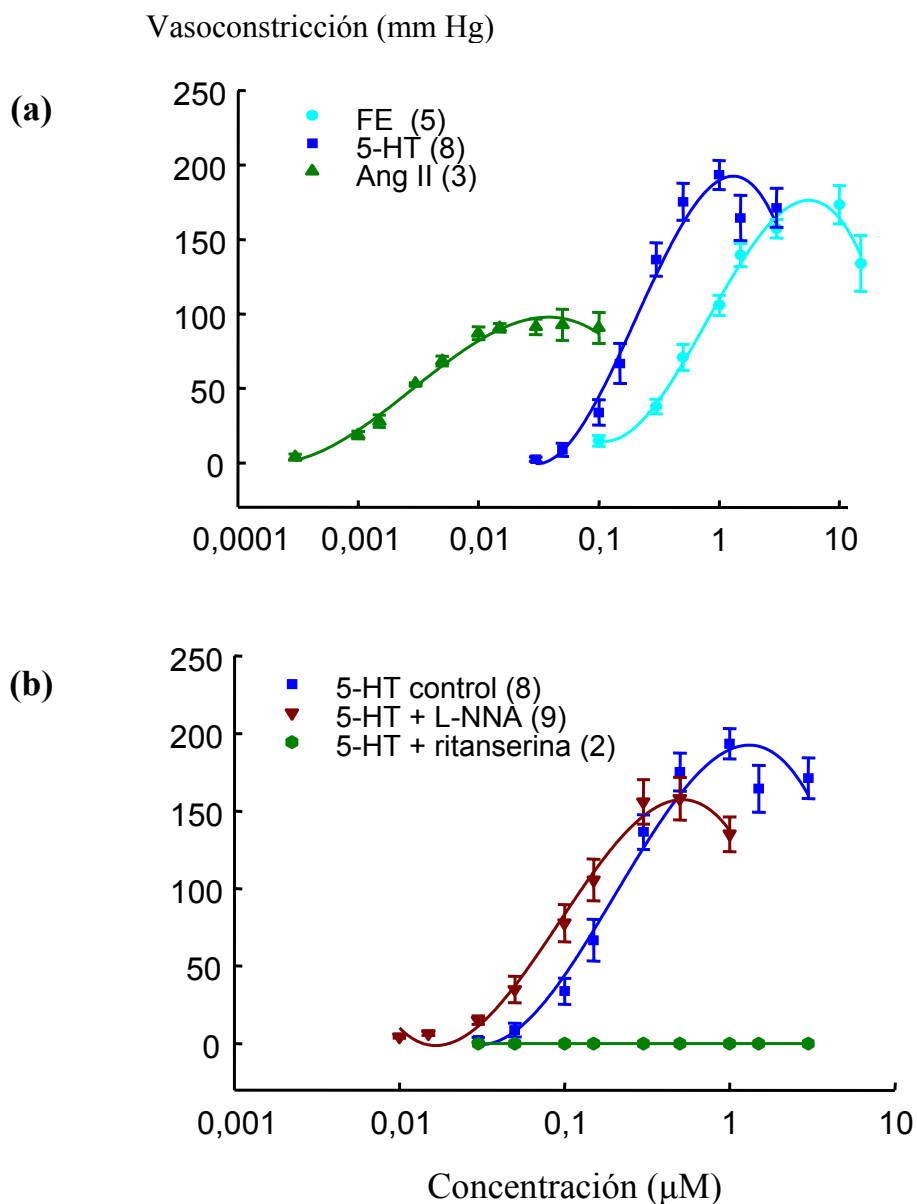


Figura 58: Respuestas vasoconstrictoras inducidas por 5-HT en riñón aislado perfundido de rata normoglucémica **(a)** Comparación con las respuestas inducidas por fenilefrina (FE) o angiotensina II (Ang II). **(b)** Modulación de su acción por un inhibidor de la NO sintasa (L-NNA, 100 μM) e inhibición por la ritanserina (10 nM). Los resultados se expresan como la media \pm sem, para el número de experimentos indicado entre paréntesis.

Vasoconstricción (mm Hg)

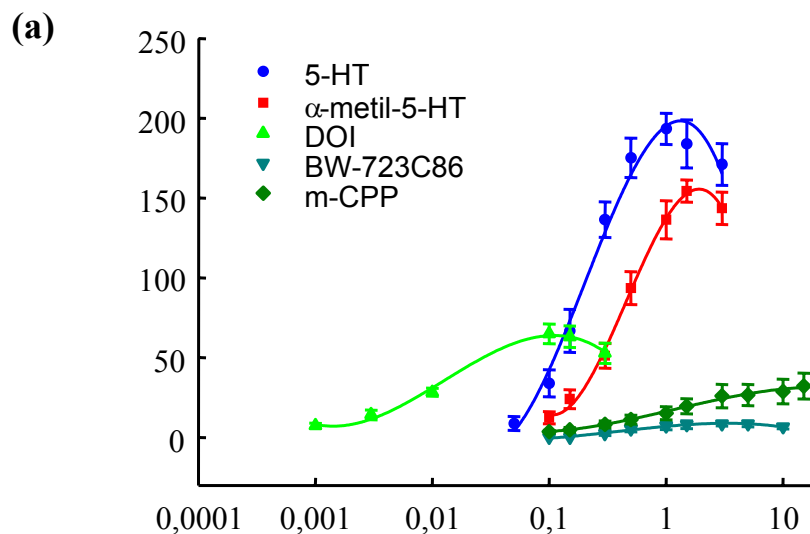
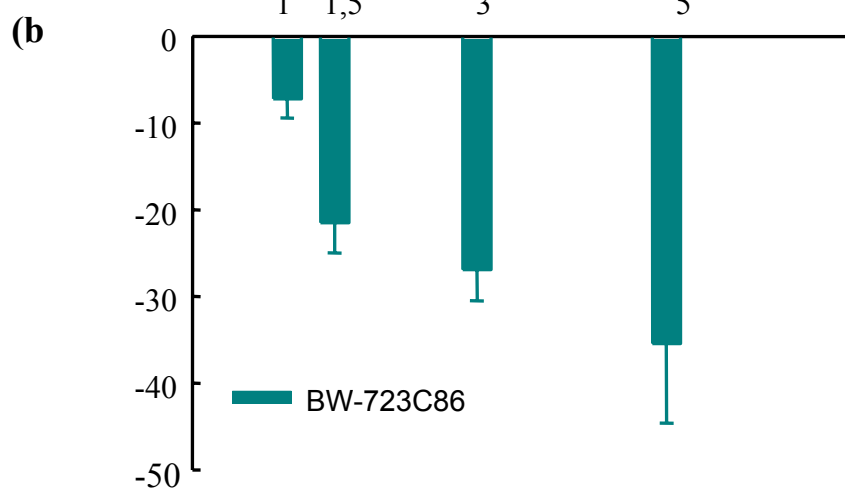
Vasodilatación (%) Concentración (μM)

Figura 59: (a) Respuestas vasoconstrictoras inducidas por diversos agonistas 5-HT_2 en riñón aislado perfundido de rata normoglucémica. (b) Respuestas vasodilatadoras inducidas por BW-723C86 después de la restauración de un tono vascular renal por Ang II. Los resultados se expresan por su media \pm sem, para el número de experimentos indicado entre paréntesis.

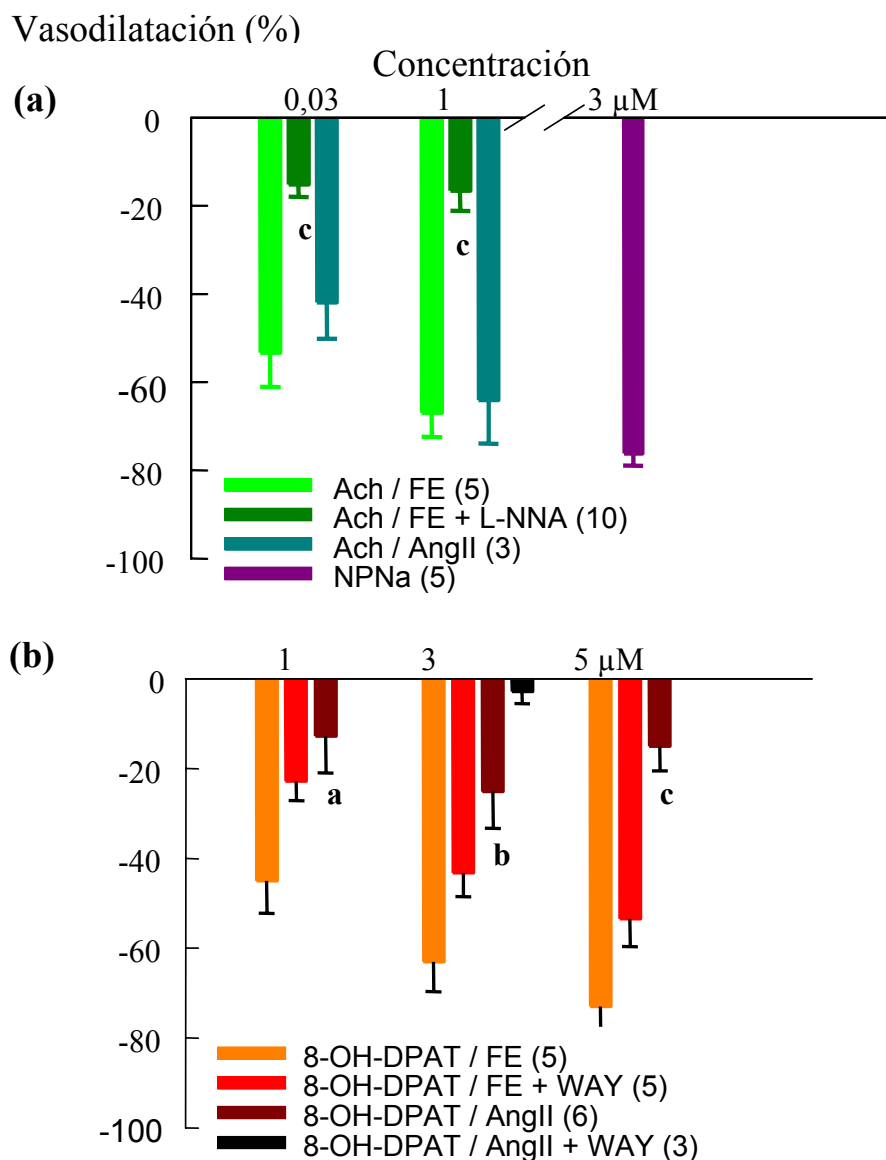


Figura 60: (a) Respuestas vasodilatadoras de referencia inducidas por Ach y nitroprusiato sódico en riñón aislado de rata normoglucémica. (b) Respuestas inducidas por 8-OH-DPAT, en ausencia o en presencia de WAY-100,635 (0,1 μ M). Los resultados se expresan como media \pm sem, para un número de experimentos indicado entre paréntesis. a) $P < 0,05$; b) $P < 0,01$ y c) $P < 0,001$ respecto a FE.

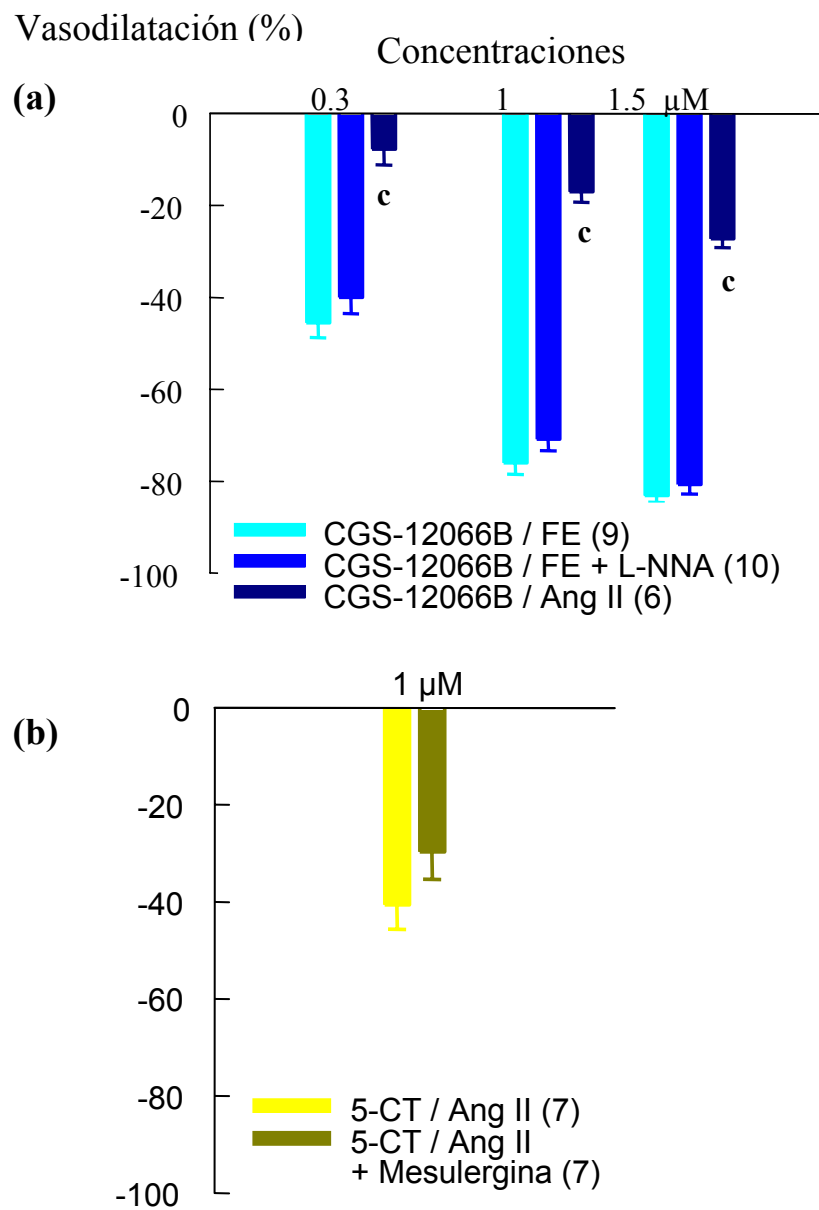


Figura 61: (a) Respuestas vasodilatadoras de referencia inducidas por CGS-12066B, y (b) por 5-CT en ausencia o en presencia de mesulergina (3 μM). Los resultados se expresan como media ± sem, para un número de experimentos indicado entre paréntesis. a) $P < 0,05$; b) $P < 0,01$ y c) $P < 0,001$ con respecto a la respuesta de FE.

Vasoconstricción (mm Hg)

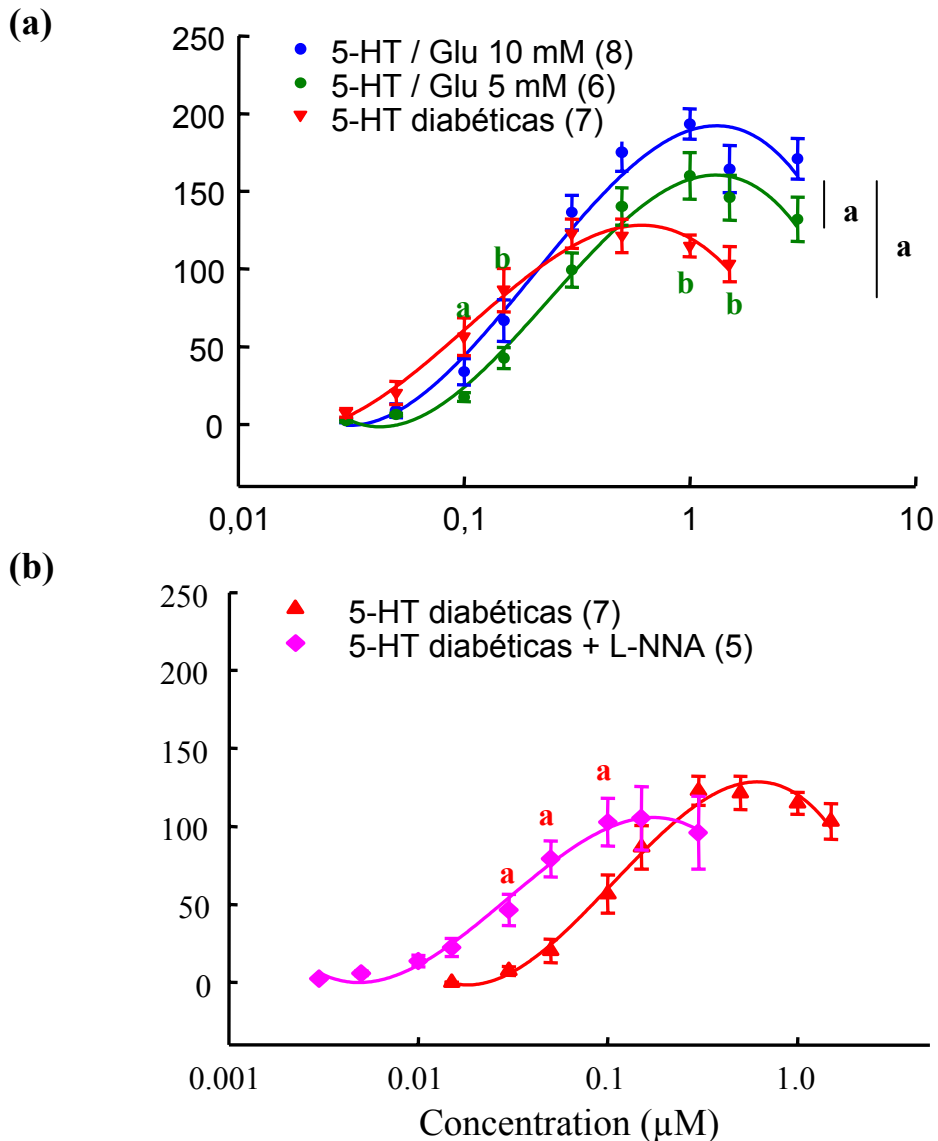


Figura 62: (a) Influencia de la diabetes en las respuestas vasoconstrictoras renales producidas por 5-HT y efectos de la exposición aguda o prolongada (4 semanas) a una solución 10 mM de glucosa. (b) Modulación por el NO (administración de L-NNA) de la respuesta producida por 5-HT en riñones diabéticos. Los resultados se expresan como la media \pm sem, para el número de experimentos indicados entre paréntesis. a) $P < 0,05$; b) $P < 0,01$ y c) $P < 0,001$.

Vasoconstricción (mm Hg)

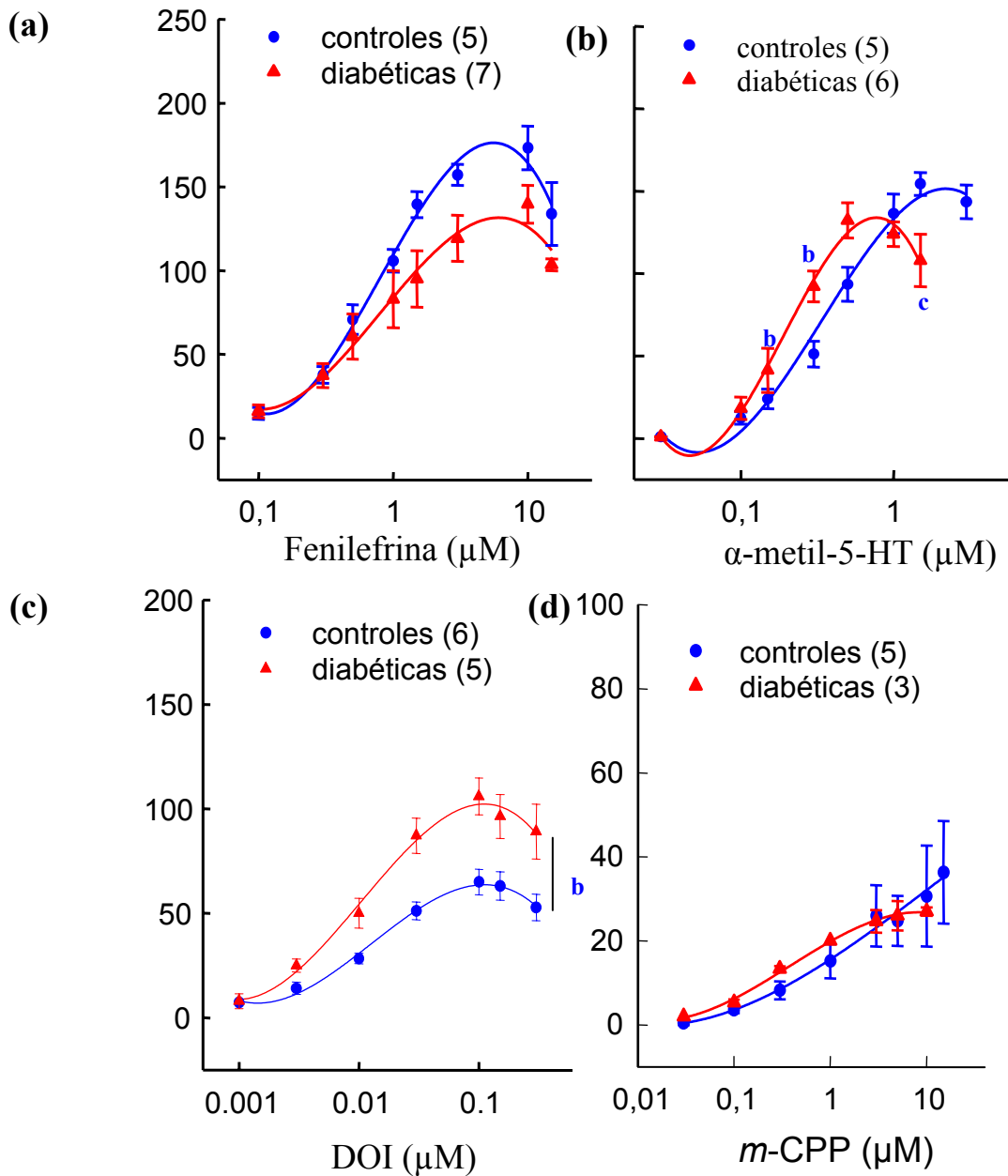


Figura 63: Influencia de la diabetes en las respuestas vasoconstrictoras renales de agonistas 5-HT₂, **(b)** α -metil-5-HT, **(c)** DOI y **(d)** *m*-CPP, y comparación con la respuesta producida por **(a)** fenilefrina. Los resultados se expresan por su media \pm sem, para el número de experimentos indicados entre paréntesis. a) $P < 0,05$; b) $P < 0,01$ y c) $P < 0,001$ respecto al grupo control.

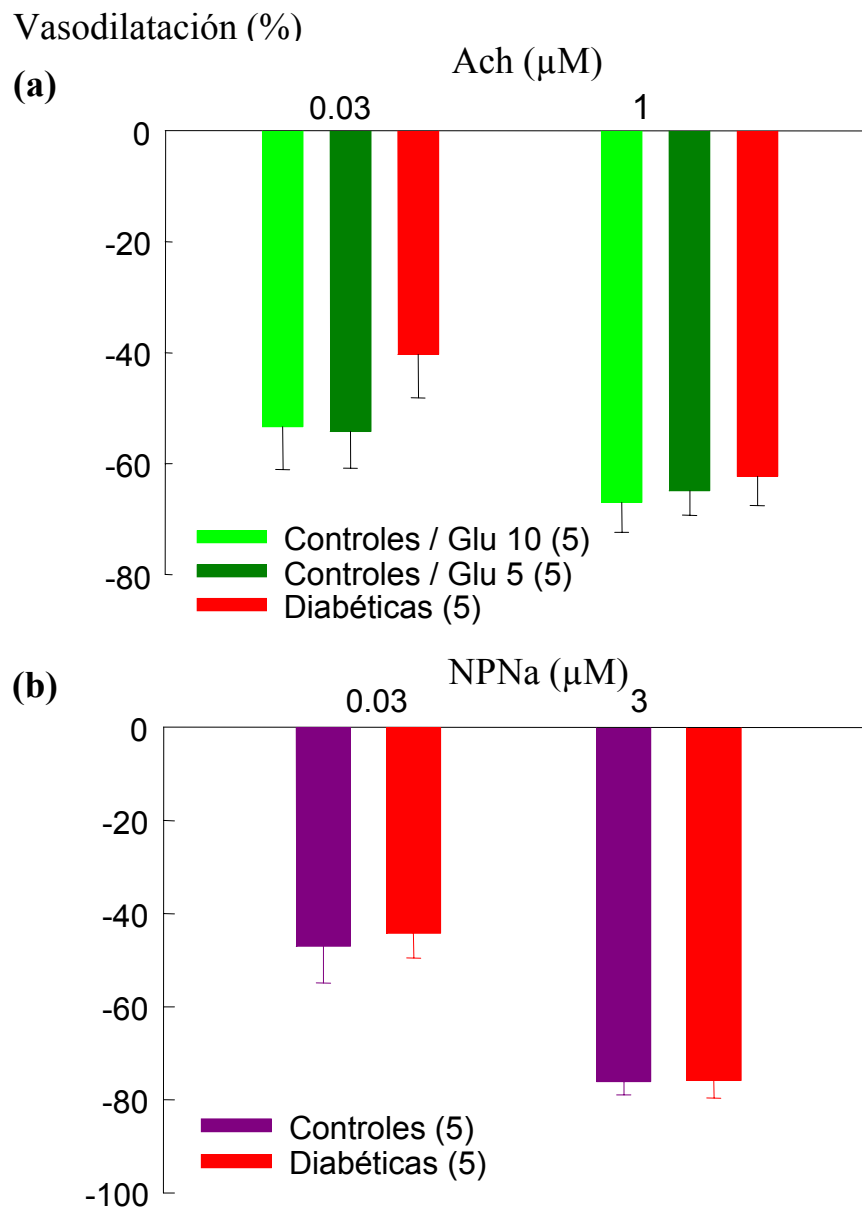


Figura 64: Influencia de la diabetes en las respuestas vasodilatadoras renales inducidas por (a) Ach y (b) nitroprusiato de sodio y (a) efecto de la exposición aguda a 10 mM de glucosa en la respuesta a la Ach. Los resultados se expresan por su media \pm sem, para el número de experimentos indicados entre paréntesis. No existen diferencias significativas.

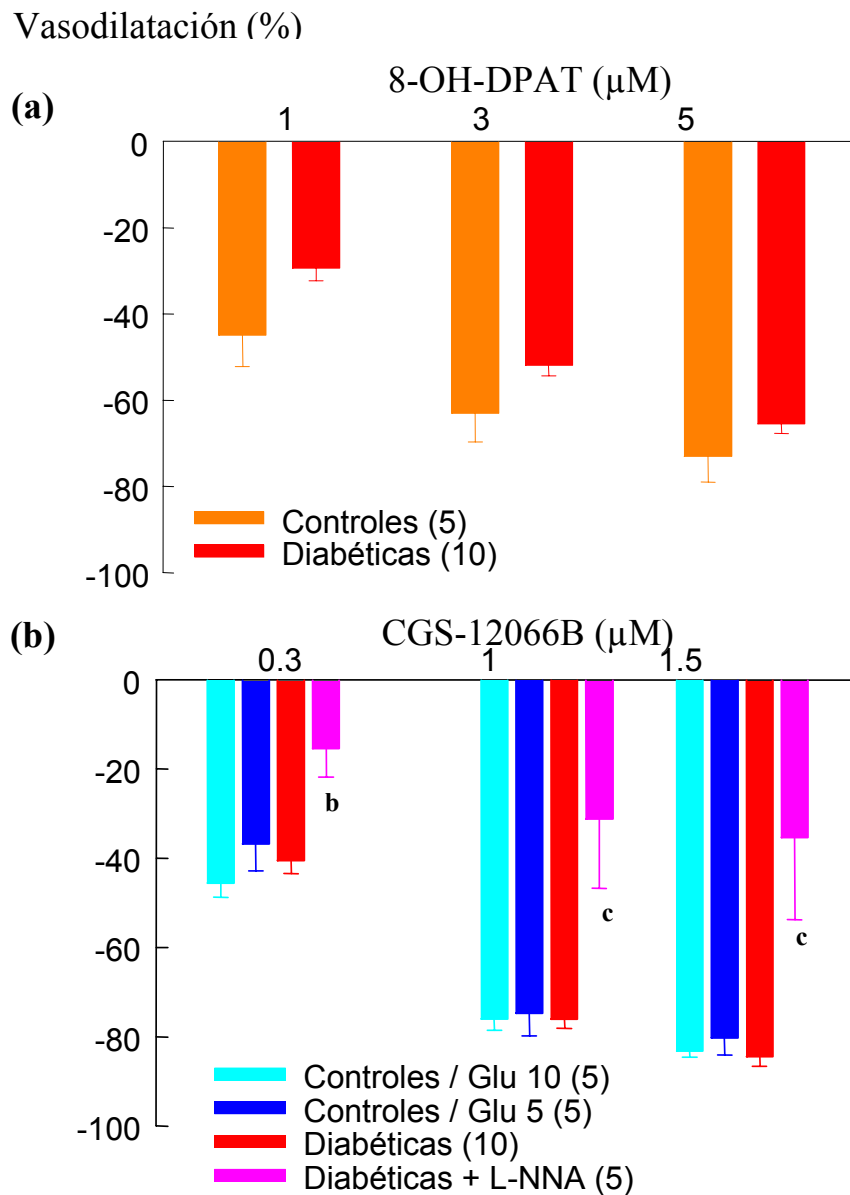


Figura 65: Influencia de la diabetes en las respuestas vasodilatadoras renales inducidas por (a) 8-OH-DPAT y (b) CGS-12066B, en presencia y ausencia de L-NNA (100 mM). Los resultados se expresan por su media \pm sem, para el número de experimentos indicados entre paréntesis. b) $P < 0,01$ y c) $P < 0,001$ con respecto al grupo de animales diabéticos.

V.- EXPRESIÓN VASCULAR RENAL DE RECEPTORES SEROTONÉRGICOS (RT-PCR CUANTITATIVA)

Los resultados normalizados de la Figura 66 muestran los niveles relativos de expresión de ARNm de los diferentes receptores de serotonina, tanto a nivel de las arteriolas intrarrenales (Figura 66b) como a nivel de la aorta torácica de ratas normoglucémicas (Figura 66c), que fue incluida como vaso de comparación. Se ha encontrado ARNm de cinco receptores, 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{2A} et 5-HT_{2B}. Los productos de amplificación generados por PCR cuantitativa en tiempo real corresponden a los fragmentos esperados, en función de los cebadores sentido y antisentido que se han utilizado, como se muestra en un gel de agarosa (Figura 66a): 5-HT_{1A} (195 bp), 5-HT_{1B} (228 bp), 5-HT_{1D} (227 bp), 5-HT_{2A} (265 bp) y 5-HT_{2B} (155 bp). Su abundancia relativa varía según el tipo de vaso utilizado; en particular, el receptor 5-HT_{1D} tiende a una menor expresión a nivel renal y a una sobreexpresión a nivel aórtico, mientras que con el receptor 5-HT_{1A} ocurre exactamente lo contrario. Los receptores 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT_{1B} tienen una expresión similar en los dos tipos de vasos estudiados.

En los vasos tomados de ratas diabéticas por estreptozotocina durante 28 días, los niveles de expresión de ARNm de los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{2A} y 5-HT_{2B} son similares a los de los animales controles de la misma edad, tanto para el caso de arteriolas renales (Figura 67a) como para aorta (Figura 67b).

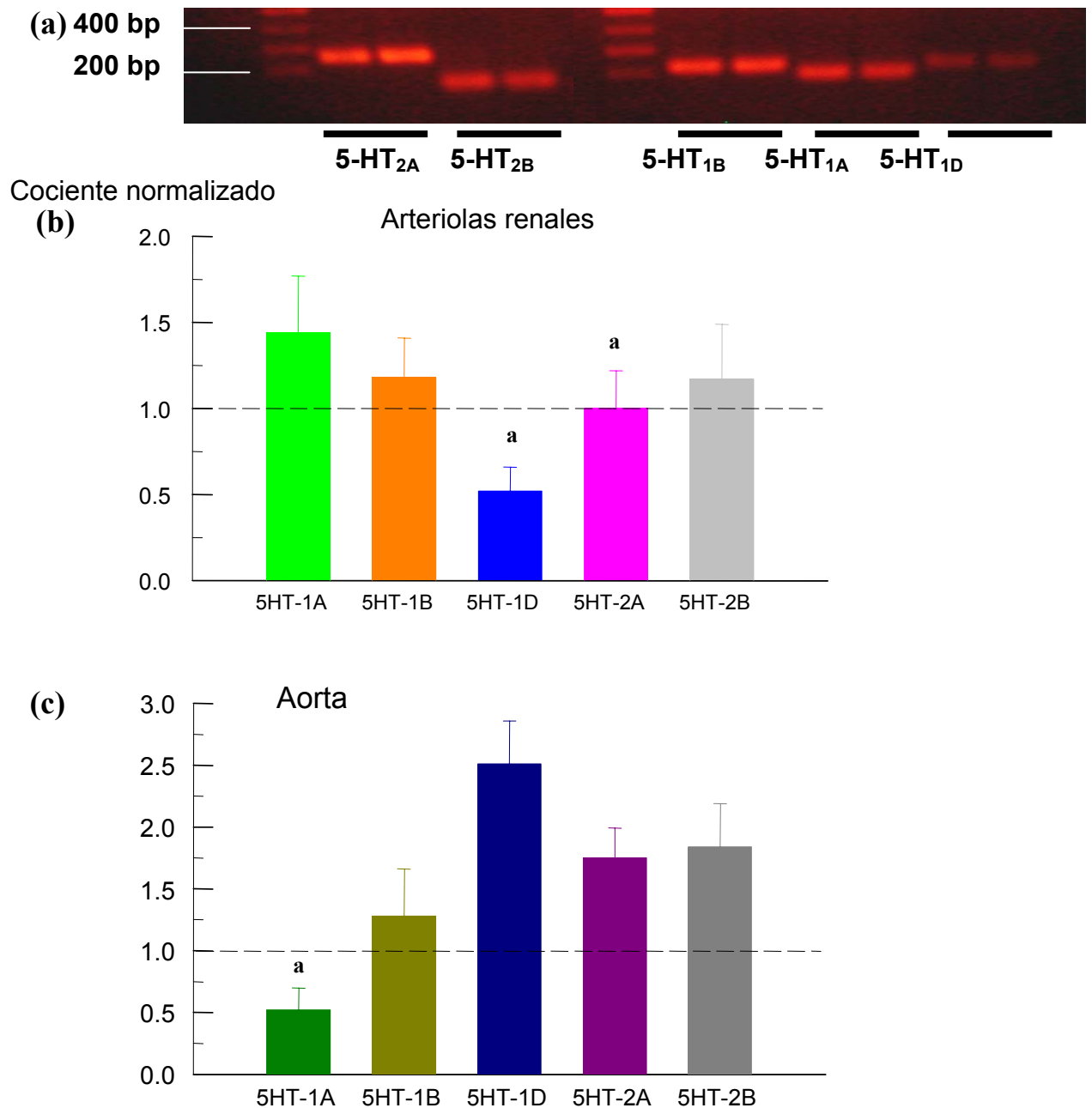


Figura 66: Expresión de ARNm de los diferentes receptores de serotonina en (b) arteriolas intrarrenales y (c) en aorta torácica (RT-PCR cuantitativa) de ratas normoglucémicas. (a) Verificación del tamaño de los fragmentos amplificados por la PCR, en función de los cebadores elegidos, mediante un gel de agarosa de arteriolas renales. Los resultados se expresan por su media \pm sem, para $n = 3 - 6$. a) $P < 0,05$ vs 5-HT_{1D} aórtica (expresión más alta).

Cociente normalizado

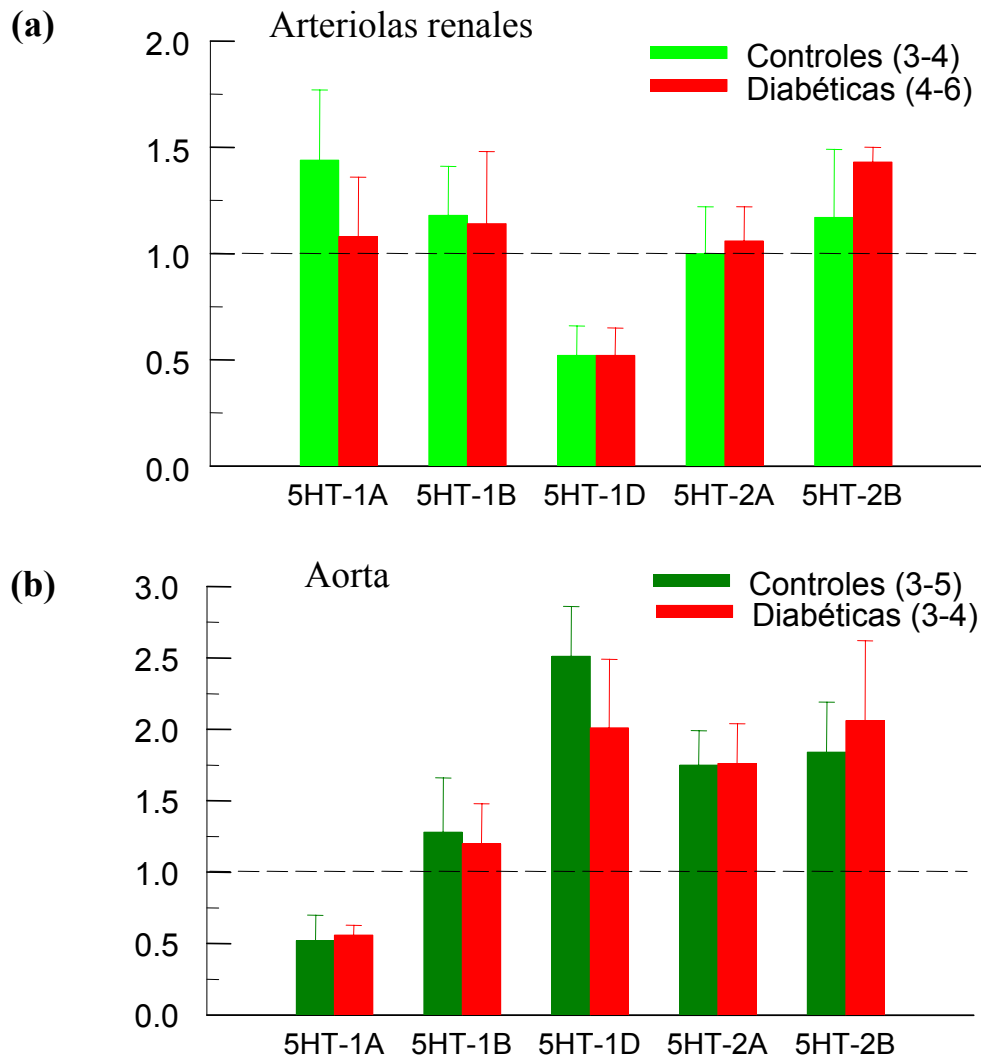


Figura 67: Influencia de la diabetes en la expresión de ARNm de diferentes receptores de 5-HT en (a) arteriolas intrarrenales y (b) aorta torácica. Los resultados se expresan por su media \pm sem, para $n = 3-6$. No existen diferencias significativas entre ratas diabéticas y controles.

----- *Discusión* -----

DIABETES POR ALOXANO O ESTREPTOZOTOCINA

Los dos agentes diabetógenos utilizados en nuestros experimentos, son empleados habitualmente y, están validados, como modelo experimental de diabetes (Öztürk *et al.*, 1996; Miranda *et al.*, 2000; Keynan *et al.*, 2000). Se caracterizan ambos agentes químicos porque destruyen las células β de los islotes de Langerhans del páncreas con la consiguiente ausencia de insulina (Szkudelski, 2001), originando la aparición, en los animales, de una hiperglucemia semejante a la que aparece en la diabetes mellitus tipo 1, caracterizada además de por el aumento de los niveles de glucosa, por hipercolesterolemia, glucosuria, y niveles aumentados de hemoglobina glucosilada en eritrocitos (Agrawal *et al.*, 1987).

Tanto con la administración intravenosa de 60 mg/kg de estreptozotocina, agente diabetógeno utilizado para los estudios realizados *in vitro* en riñón aislado perfundido, como con la utilización de aloxano (150 mg/kg, vía subcutánea), hemos buscado una diabetes elevada y desequilibrada, con una hiperglucemia superior a 400 mg/dl (> 22 mM), con el fin de conseguir alteraciones vasculares tras las 4 semanas durante las cuales los animales estaban expuestos a la hiperglucemia.

Estudios anteriores realizados en animales diabéticos avalan la situación de que la diabetes experimental desarrollada con ambos agentes, es de características similares a la diabetes mellitus espontánea que aparece en humanos. En nuestros experimentos, con respecto al grupo control de animales no hiperglucémicos, se obtiene una diferencia, significativa, en la evolución del peso de los animales, tal como ha sido propuesto por otros autores que utilizan estos agentes como inductores de diabetes (Öztürk *et al.*, 1996; Keynan *et al.*, 2000; De Vriese *et al.*, 2001; Miranda *et al.*, 2000).

5-HT Y TRANSMISIÓN SIMPÁTICA VASCULAR

En general, está admitido y bien documentado que las diferencias de actividad que 5-HT y diferentes agonistas serotoninérgicos inducen tras interactuar con el sistema cardiovascular se deben a factores tales como la especie animal, el tono simpático del mismo, el lecho vascular al que nos referimos, las condiciones experimentales, la dosis del agonista seleccionado, la posibilidad de que aparezcan acciones reflejas o directas, etc. (Saxena *et al.*, 1987; Vanhoutte, 1987b; Bagdy *et al.*, 1989; Villalon *et al.*, 1993; Miranda *et al.*, 2000).

La complejidad de acciones de 5-HT y otros agonistas serotoninérgicos se comprende en parte por la diversidad de receptores serotoninérgicos que en la actualidad se conocen (Hoyer *et al.*, 1994). La disponibilidad, cada vez mayor de agonistas y antagonistas selectivos de los diferentes tipos, e incluso subtipos, de tales receptores, es un factor importante a la hora de poder justificar, con mayor rigor y exactitud, las diferencias de actividad encontradas.

La existencia de una interacción entre mecanismos adrenérgicos y serotoninérgicos ha sido ampliamente estudiada desde el descubrimiento de la 5-hidroxitriptamina. Hoy se sabe que la distribución de neuronas serotoninérgicas a nivel del SNC es muy similar a la de las neuronas noradrenérgicas, estando regulada la actividad de estas últimas por serotonina, existiendo diversos tipos de receptores serotoninérgicos en terminaciones nerviosas adrenérgicas periféricas de distintos tejidos y especies. En este sentido, a nivel periférico, numerosos autores han dirigido sus esfuerzos al estudio de las implicaciones que a nivel cardiovascular tiene esta amina biógena.

Desde que en 1977 McGrath demostró que con dosis pequeñas de 5-HT, se inhibía la liberación de noradrenalina tritizada inducida por estimulación eléctrica en la vena safena de perro, en numerosos estudios se ha establecido la existencia de interacción entre ambos sistemas a nivel del SNC (Pedigo *et al.*, 1981; Allgaier *et al.*,

1995), donde la presencia de receptores serotoninérgicos media la liberación de neurotransmisores en terminales adrenérgicos (Humphrey *et al.*, 1983). Pero también a nivel periférico la interacción sistema adrenérgico-serotoninérgico ha sido muy debatida (Vanhoutte, 1983; Saxena y Villalón, 1991; Morán *et al.*, 1994a,b; Jones *et al.*, 1995; Morán *et al.*, 1998).

Los estudios realizados en nuestro laboratorio demuestran la existencia de diferentes mecanismos serotoninérgicos que modifican los valores de presión arterial y de frecuencia cardiaca en ratas conscientes, donde están implicados receptores 5-HT₁ y 5-HT₂ e igualmente a nivel periférico vascular, en ratas desmeduladas y descerebradas, se han puesto de manifiesto acciones serotoninérgicas inhibitoras y potenciadoras. Las inhibitoras transcurren con disminución de la liberación de NA endógena por activación de receptores preferentemente 5-HT_{1D}, aunque sin descartar en dicha inhibición la implicación de los receptores 5-HT_{1A} (Morán *et al.*, 1994b; Morán *et al.*, 1998) de localización, en todo caso, presináptica y, las acciones potenciadoras, que implican un aumento de los niveles de NA, se deben a la activación de receptores 5-HT₃.

Como continuación en esta línea de investigación, y en lo que respecta a esta memoria de Tesis Doctoral nos propusimos, considerando los posibles cambios en la actividad serotoninérgica según la especie, patología, territorio vascular, etc., realizar un estudio de los receptores implicados en la actividad serotoninérgica sobre la estimulación simpática total, en animales con hiperglucemia inducida, por la importancia de la diabetes mellitus y la frecuencia con que aparece asociada a otras patologías tales como la hipertensión (Kam *et al.*, 1996).

Las complicaciones vasculares que ocurren en la diabetes mellitus generan alteraciones sensoriales, motoras, del sistema nervioso autónomo y de las células endoteliales (Ralevic *et al.*, 1995), así como alteraciones en los niveles de endotelina-1, tromboxano A₂ y de 5-hidroxitriptamina, tanto a nivel clínico como experimental (Takeda *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 1992; Hodgson *et al.*, 1992; James y Hodgson, 1995; De Vriese *et al.*, 2000a). Todas estas complicaciones están bien caracterizadas. Sin

embargo se dispone de poca información sobre la relativa susceptibilidad de los nervios periféricos y de los neurotransmisores, a nivel del endotelio y de músculo liso vascular dañados, como consecuencia de la existencia de esta enfermedad.

El primer objetivo de nuestro estudio, en continuación con nuestra línea de trabajo consistía en caracterizar los receptores serotoninérgicos que median respuestas vasculares obtenidas por estimulación nerviosa total, del sistema simpático y por administración exógena de NA en ratas hiperglucémicas pithed, comparando los resultados con los obtenidos previamente en nuestro grupo de trabajo, en ratas normoglucémicas.

Los resultados obtenidos en ratas hiperglucémicas por administración de aloxano y posteriormente desmeduladas, en experimentos de estimulación simpática, coinciden en parte con los mostrados en ratas normoglucémicas (Morán *et al.*, 1994; Villalón *et al.*, 1995a,b) y demuestran que también en ratas hiperglucémicas, son los receptores serotoninérgicos 5-HT₁ los que principalmente median la inhibición de respuestas presoras obtenidas por estimulación eléctrica. No obstante, hemos encontrado determinadas diferencias que probablemente tienen que ver con las alteraciones en la reactividad vascular presentes en un estado de diabetes, así como con la susceptibilidad de los nervios periféricos y la hipotetizada disfunción endotelial que ocurre en la misma (Ralevick *et al.*, 1995; Miranda *et al.*, 2000; de Vriese *et al.*, 2000a).

Estos resultados ponen de manifiesto una acción inhibitoria de la respuesta presora por parte de 5-hidroxitriptamina, que en ratas hiperglucémicas resulta significativa a la dosis de 10 µg/kg/min. A diferencia de las ratas normoglucémicas las acciones inhibitorias se observan desde 1 µg/kg/min, aunque en este caso solamente es significativa para la frecuencia de estimulación más baja (0,1 Hz). El resto de las dosis ensayadas indujeron una inhibición significativa a todas las frecuencias de estimulación.

Analizando nuestros resultados observamos que tal como ocurre en ratas normoglucémicas, la inhibición es mayor a frecuencias de estimulación bajas que llega a ser superior al 80% de reducción. Esta mayor inhibición a frecuencias de estimulación

bajas, tal como proponen determinados autores (Docherty, 1988; Morán *et al.*, 1994), nos induce a pensar en una localización más bien presináptica de dicha inhibición, y por tanto nos permite plantear que la existencia de una patología diabética no modifica en principio la naturaleza mayoritariamente presináptica de la inhibición serotoninérgica en la neurotransmisión simpática.

Los resultados obtenidos con 5-CT, un potente agonista de receptores 5-HT₁ y 5-HT₇ (Hoyer *et al.*, 1994), ponen de manifiesto un efecto inhibitor superior al ejercido por 5-HT. La dosis de 5 µg/kg/min de 5-CT supera la inhibición desarrollada por 10 µg/kg/min de 5-HT. Esta mayor inhibición obtenida con 5-CT, junto con la ausencia de actividad del agonista selectivo 5-HT₂, α -metil5-HT (Baxter *et al.*, 1995), así como la de 1-fenilbiguanida (Ireland y Tyres, 1987; Chen *et al.*, 1991), agonista de receptores 5-HT₃, nos confirma, que al igual que en ratas normoglucémicas, el efecto inhibitor mediado por 5-hidroxitriptamina en ratas hiperglucémicas puede deberse a la activación de receptores 5-HT₁, coincidiendo estos resultados con los obtenidos por nuestro grupo y también por otros autores en ratas normoglucémicas, quienes proponen igualmente que el mecanismo por el cual 5-HT ejerce su acción inhibitora es la activación de receptores 5-HT₁ (Morán *et al.*, 1994; Villalón *et al.*, 1995a,b; Morán *et al.*, 1998; Villalón *et al.*, 1998; Fernández, 1999).

Cabe destacar igualmente, que a diferencia de lo que ocurre en ratas normoglucémicas donde nuestro grupo demostró acciones inhibitoras y potenciadoras de neurotransmisión simpática (Morán *et al.*, 1994), no hemos encontrado en animales diabéticos un efecto potenciador inducido por 5-HT y mediado por activación de receptores 5-HT₃, lo que nos permite establecer una diferencia significativa en la diabetes, situación en la cual 5-HT ejerce exclusivamente acciones inhibitoras de neurotransmisión simpática.

Para poder confirmar la participación de los receptores 5-HT₁ en la inhibición serotoninérgica y excluir a los receptores 5-HT₂ y 5-HT₃, se diseñaron los experimentos correspondientes con los antagonistas metiotepina, ritanserina y MDL-72222.

El pretratamiento con metiotepina, un antagonista no específico 5-HT_{1,2,5,6,7} (Hoyer *et al.*, 1994), genera por sí sola una elevada inhibición de las respuestas presoras inducidas por estimulación simpática que supera incluso a la de la propia serotonina. Aunque al asociar metiotepina a 5-HT la inhibición es ligeramente inferior a la que se consigue con metiotepina sola, no podemos concluir si se revierten o no las acciones inhibidoras de 5-hidroxitriptamina. La marcada inhibición observada con metiotepina, a diferencia de lo que ocurre con este antagonista en ratas normoglucémicas, se justifican por las acciones antagonistas α -adrenérgicas descritas para este compuesto (Leysen *et al.*, 1985) y comprobadas por nuestro grupo en trabajos anteriores (Fernández *et al.*, 2000a). La aparente potenciación de este bloqueo alfa, podría estar igualmente justificada por la disfunción autonómica que aparece en la diabetes y por el hecho comprobado en nuestros experimentos, de que las respuestas presoras inducidas por estimulación eléctrica sean superiores en ratas hiperglucémicas, tal como ha sido descrito por otros autores, en diferentes tipos de experimentos de estimulación simpática (Abebe & McLeod, 1990; Taylor *et al.*, 1994; Tesfamariam y Cohen, 1995).

Por su parte, tal como se ha comentado con anterioridad, el pretratamiento con un antagonista selectivo de receptores 5-HT₂, ritanserina (Awouters *et al.*, 1988), así como con MDL-72222 (Fozard, 1984), antagonista de los receptores 5-HT₃ no modifican la acción inhibidora inducida por 5-HT. Estos resultados permiten excluir la participación de los receptores 5-HT₂ y 5-HT₃ al igual que ocurre en animales normoglucémicos, y permiten sospechar que la inhibición simpática inducida por 5-hidroxitriptamina, en hiperglucemia, se debe preferentemente a la participación de receptores 5-HT₁.

Dado que 5-CT es un potente agonista 5-HT₇ y que se ha descrito que la activación de tales receptores induce acciones hipotensoras (Hoyer *et al.*, 1994), quisimos determinar la posible implicación de estos receptores en las acciones inhibidoras de serotonina sobre las respuestas presoras obtenidas por estimulación simpática. Para ello se administró mesulergina, antagonista con cierta selectividad hacia receptores 5-HT₇ (Villalón *et al.*, 1998; Centurión *et al.*, 2000). Este antagonista, tal como hace metiotepina, inhibe por sí mismo las acciones presoras obtenidas por

estimulación, y aunque los datos no son demasiado concluyentes no parece revertir la inhibición generada por 5-HT, por tanto podríamos excluir que la hipotensión propia derivada de la posible activación 5-HT₇ contribuya a la inhibición simpática. Esto estaría de acuerdo con los resultados previos obtenidos por nuestro grupo y por otros autores, en ratas normoglucémicas, donde se excluye que en la acción inhibitoria de 5-HT sobre la transmisión simpática, participe la activación 5-HT₇.

Para confirmar la inhibición 5-HT₁ y establecer el o los subtipos de receptores 5-HT₁ implicados en esta acción se realizaron los correspondientes experimentos utilizando diferentes agonistas y antagonistas selectivos 5-HT₁. Los trabajos previamente realizados por nuestro grupo en ratas normoglucémicas establecen que la inhibición es mayoritariamente debida a la activación 5-HT_{1D}.

Según nuestros resultados en ratas hiperglucémicas, a diferencia de los obtenidos previamente en ratas normoglucémicas, el efecto inhibitorio de 5-HT es reproducido exclusivamente por el agonista selectivo 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT (Middlemis y Fozard, 1983; Hoyer *et al.*, 1994). Ni la perfusión intravenosa de un agonista selectivo 5-HT_{1B}, CGS-12066B (Neale *et al.*, 1987) ni la del agonista selectivo de receptores 5-HT_{1D}, L-694,247 (Beer *et al.*, 1993; Hoyer *et al.*, 1994) modificaron los incrementos de presión obtenidos por estimulación eléctrica a ninguna de las dosis ensayadas.

El hecho de que la acción inhibitoria sea reproducida por 8-OH-DPAT, un agonista selectivo de receptores 5-HT_{1A} con similar afinidad que 5-CT sobre este subtipo de receptores (pEC₅₀=8.2 y 8.6 respectivamente; Hoyer *et al.*, 1994), hace pensar que también en ratas hiperglucémicas, los receptores mayoritariamente implicados en la inhibición son del tipo 5-HT₁.

Castillo *et al.*, en 1994 describen una posible acción simpaticolítica para 8-OH-DPAT, que podría contribuir a la inhibición que ejerce sobre los efectos presores obtenidos por estimulación eléctrica. Pero en nuestros experimentos, el efecto inhibitorio de este agonista se revierte totalmente cuando los animales son pretratados con un antagonista selectivo de receptores 5-HT_{1A}, WAY-100,635 (Fletcher *et al.*, 1994), el

cual tienen cierta afinidad α -adrenérgica pero que a la dosis utilizada por nosotros no modifica por sí mismo las respuestas presoras y en definitiva, parece no interferir sobre los receptores α -adrenérgicos. Esto, junto con el hecho del bloqueo total que dicho antagonista ejerce sobre la propia acción inhibitoria de 5-HT, confirmaría la participación de receptores 5-HT_{1A} en el efecto inhibitorio.

La ausencia de actividad observada con los agonistas selectivos de receptores 5-HT_{1B}, CGS-12066B, y 5-HT_{1D}, L-694,247, (Neale *et al.*, 1987; Beer *et al.*, 1993), junto con los resultados antes explicados sugieren que dichos receptores no participan en la respuesta inhibitoria de la activación simpática desarrollada por 5-HT en ratas hiperglucémicas.

Estos resultados, que contrastan en parte con los propuestos por otros autores como Villalón *et al.*, 1998 quienes demuestran que en la respuesta inhibitoria desarrollada por 5-HT participan además de los receptores 5-HT_{1A}, los receptores 5-HT_{1B}, y también con los obtenidos por nuestro grupo de trabajo en ratas normoglucémicas donde están implicados mayoritariamente receptores 5-HT_{1D} y en menor medida 5-HT_{1A}, (Morán *et al.*, 1994b; Morán *et al.*, 1998), parecen indicar que la diabetes induce un cambio importante en cuanto a los receptores implicados en la modulación serotoninérgica de la transmisión simpática, bien en el número de receptores o en la sensibilización de las vías de señalización de los distintos subtipos.

La propuesta de un posible cambio de receptores concuerda con las desarrolladas por algunos autores que a nivel molecular ya han demostrado alteraciones en la población de receptores serotoninérgicos en ratas hiperglucémicas, sobretudo de los pertenecientes al subtipo 5-HT_{1A}, (Sandrini *et al.*, 1997), así como en el hombre (Price *et al.*, 2002) quienes proponen un aumento de tales receptores. Este aumento de la población de receptores 5-HT_{1A} permitiría justificar nuestros resultados y nos llevaría a proponer que la inhibición simpática de respuestas presoras obtenidas por estimulación simpática en ratas hiperglucémicas desmeduladas está principalmente mediada por receptores 5-HT_{1A}, y que estos son de localización presináptica, ya que ninguno de los

agonistas utilizados modificaron las respuestas presoras obtenidas por la administración de NA exógena.

No obstante, como comentaremos más tarde al discutir los resultados obtenidos en riñón aislado, los estudios de PCR realizados en aorta, no permiten concluir que a las cuatro semanas de hiperglucemia (por más que tales estudios se hayan hecho en ratas diabéticas con estreptozotocina y no con aloxano), se modifique la expresión de ninguno de los subtipos de receptores analizados, entre ellos los 5-HT_{1A}. Por tanto, como parece que no podemos hablar de una hipersensibilidad por aumento del número de receptores 5-HT_{1A}, cabe pensar por los resultados obtenidos en el estudio de los mecanismos endoteliales implicados en las respuestas serotoninérgicas, los cuales serán comentados y discutidos con posterioridad, que la diferencia de sensibilidad ocurre a nivel de procesos bioquímicos o vías de señalización celular activadas por los receptores 5-HT₁ serotoninérgicos.

En todo caso, es importante destacar que, tanto el uso de 5-HT como de los agonistas selectivos de receptores serotoninérgicos, en los animales diabéticos, se hace a dosis inferiores que en los animales normoglucémicos. Esto podría deberse a que la reactividad vascular es mayor en diabetes, lo que justificaría que se obtengan respuestas similares con dosis más pequeñas. Este aumento de la reactividad vascular en diabetes para serotonina y otros agentes vasoactivos como noradrenalina o fenilefrina, ya ha sido descrita anteriormente por otros autores (Abebe *et al.*, 1990; White y Carrier, 1990; Miranda *et al.*, 2000).

Una vez confirmados estos hechos, y dado que la diabetes induce alteraciones de muy diversa índole, tanto a nivel celular como a nivel de regulación de la capacidad de resistencia y conductancia de los vasos sanguíneos, nos propusimos analizar, tanto en animales normoglucémicos como en hiperglucémicos, si la respuesta inhibitoria mediada por activación de receptores 5-HT₁, es decir, 5-HT_{1D} y 5-HT_{1A} para animales normoglucémicos (Morán *et al.*, 1994b, 1998), y exclusivamente receptores 5-HT_{1A} para ratas hiperglucémicas, se debe a una acción directa o está mediada indirectamente por otros mecanismos.

En este sentido, se estudió la posible participación del factor relajante endotelial (NO) en la inhibición serotoninérgica producida en ratas normoglucémicas. El NO es sintetizado a través del aminoácido L-arginina por la enzima dependiente de calcio óxido nítrico sintasa (NOS). El tratamiento con un inhibidor de la NOS, L-NAME, provoca un incremento de la presión arterial (Rees *et al.*, 1990) como consecuencia de la inhibición de la liberación de NO.

En nuestros experimentos en ratas normoglucémicas, la administración de L-NAME produce un incremento de la presión arterial media de los animales hasta niveles de $68,2 \pm 3,4$ mm Hg, y hace que los incrementos de presión arterial obtenidos por estimulación eléctrica también estén aumentados, lo cual se justifica por la inhibición de la liberación basal de NO que hace que los incrementos de presión sean mayores.

En ratas normoglucémicas, no encontramos diferencias en la inhibición de las respuestas presoras inducidas por estimulación simpática, producida por el agonista selectivo de receptores 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT (Middlemis y Fozard, 1983; Hoyer *et al.*, 1994), o con el agonista selectivo de receptores 5-HT_{1D}, L-694,247 (Beer *et al.*, 1993; Hoyer *et al.*, 1994), cuando previamente se administra a los animales L-NAME, lo que pone de manifiesto, que, determinados factores vasodilatadores derivados de endotelio no modifican la acción inhibitoria que serotonina es capaz de ejercer sobre los incrementos de presión arterial inducidos por estimulación simpática total.

Sin embargo, diversos trabajos han sugerido un posible papel de 5-HT en la fisiopatología de las complicaciones hiperglucémicas, describiéndose cambios en mecanismos endoteliales inducidos por la diabetes en respuesta a 5-HT (Sandrini *et al.*, 1997; Miranda *et al.*, 2000, 2002), así como evidencias sobre la participación del factor relajante endotelial en determinadas respuestas vasculares serotoninérgicas (Molderings *et al.*, 1987; Schoeffer y Hoyer, 1990; Ralevic *et al.*, 1995; Miranda *et al.*, 2000).

Estos supuestos están de acuerdo con estudios reanalizados en ratas hiperglucémicas en las cuales la disfunción endotelial resulta en parte de un incremento en la producción de NO durante la enfermedad (Pieper *et al.*, 1998; Fitzgerald y Brands,

2000; Komers y Anderson, 2003). Incluso se ha sugerido que una excesiva producción de NO contribuye a la hiperfiltración e hiperperfusión renal que caracteriza a la nefropatía diabética (Sugimoto *et al.*, 1998), y que por técnicas de Western Blot realizadas por Choi *et al.*, (1997) se ha demostrado que, las tres isoformas de la enzima implicada en la síntesis de NO (eNOS, iNOS y nNOS) están aumentadas una semana después de inducir la diabetes.

La contribución del endotelio a la regulación de la reactividad vascular viene dada por la liberación de sustancias vasoconstrictoras (angiotensina II, endotelina-1, tromboxano A₂, prostaglandina, etc.) o vasodilatadoras (NO, prostaciclina, factor hiperpolarizante derivado de endotelio), siendo el equilibrio entre ambos tipos de factores el que regula el tono muscular (Furchgott y Vanhoutte, 1989; Moncada *et al.*, 1991).

Por ello y siguiendo el mismo protocolo de animales normoglucémicos, se estudió la posible participación del factor relajante endotelial en la inhibición serotoninérgica producida en ratas hiperglucémicas.

En nuestros experimentos, la administración en ratas hiperglucémicas de L-NAME induce un incremento de la presión arterial media que alcanza valores de $57,9 \pm 3,8$ mm Hg. En estas condiciones experimentales los incrementos de presión obtenidos por estimulación resultan algo mayores a los conseguidos sin el pretratamiento con L-NAME. Estos resultados son congruentes con la literatura encontrada al respecto con L-NAME, ya que la inhibición de la liberación basal de NO inducida por L-NAME determina que al estimular eléctricamente, los incrementos de presión sean mayores.

Los estudios realizados en presencia de L-NAME con 5-HT y con 8-OH-DPAT ponen de manifiesto una relación entre el NO y la 5-hidroxitriptamina, ya que en estas condiciones experimentales, se revierte el efecto inhibitorio de 5-HT y del agonista selectivo de receptores 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT. Es decir, la inhibición presináptica serotoninérgica de la transmisión simpática en ratas hiperglucémicas, depende al menos en parte, de la formación de NO.

Por otro lado, cuando los animales tratados con L-NAME se tratan con L-arginina, sustrato de la NO sintasa (Palmer *et al.*, 1988a,b; Schmidt *et al.*, 1992; Tousoulis *et al.*, 1999), por un lado el incremento de presión arterial inducido por L-NAME desciende hasta valores normales y al perfundir tanto 5-HT como 8-OH-DPAT se manifiesta de nuevo el efecto inhibitor de estos dos agonistas sobre los incrementos de presión obtenidos por estimulación simpática. Sin embargo, no se consiguen similares resultados cuando se utiliza D-arginina, lo que demuestra que la dependencia de NO es específica.

Estos hechos ponen de manifiesto, tal como han sugerido otros autores en diferentes condiciones experimentales a las nuestras (Sugimoto *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 1999; Schoeffer y Hoyer, 1990; Ralevic *et al.*, 1995; Miranda *et al.*, 2000) que existe relación de 5-HT con la diabetes, y nos permite evidenciar la participación del factor relajante endotelial en las respuestas vasculares serotoninérgicas de ratas hiperglucémicas.

La implicación del NO en las acciones inhibitoras serotoninérgicas sobre los incrementos de presión inducidos por estimulación simpática total, se confirma aún más, con los experimentos llevados a cabo en presencia de ODQ, un inhibidor de la guanilato ciclasa (Lovren y Trigel, 2000; Sand *et al.*, 2002; Bryan-Lluka *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005). La activación de la guanilato ciclasa modula los niveles de GMPc y su activación viene dada por la presencia del NO (Florez *et al.*, 2003). En nuestros experimentos, en los animales hiperglucémicos tratados con ODQ, se revierte la acción inhibitora producida por 8-OH-DPAT, lo que demuestra la implicación del óxido nítrico y la vía de la guanilato ciclasa, en la inhibición inducida por este agonista serotoninérgico sobre las respuestas presoras inducidas por estimulación eléctrica del flujo simpático.

Otra de las posibles vías implicadas en la acción serotoninérgica inhibitora de las respuestas presoras inducidas por estimulación simpática, es la vía de las ciclooxigenasas (COX), ya que hay estudios que demuestran una interacción entre el sistema serotoninérgico y la COX. De acuerdo con resultados anteriores de nuestro laboratorio (Calama *et al.*, 2003), la inhibición de la síntesis de prostaglandinas

mediante la administración de indometacina, a una dosis habitualmente utilizada por otros autores para inhibir el sistema de las ciclooxigenasas y la consiguiente producción de prostaglandinas (Roman y Kauker, 1978; Blackshear *et al.*, 1986; Ding *et al.*, 1989a) no modifica la respuesta vasodilatadora de 5-HT en el tren posterior de la rata anestesiada. Sin embargo para otros autores, la liberación de prostaglandinas es uno de los procesos que justifican determinadas acciones vasodilatadores serotoninérgicas en otros territorios vasculares, como el renal en perro (Blackshear *et al.*, 1986; 1991) o en rata (Tuncer y Vanhoutte, 1991; Ding *et al.*, 1989b).

En animales en los que se ha inducido una diabetes por estreptozotocina, se ha demostrado, por técnicas de Western Blot, la existencia de un aumento de la expresión de dos isoformas de la COX en médula renal (Nasrallah *et al.*, 2003). Sin embargo, en aorta de rata se ha demostrado que la diabetes no modifica la respuesta contráctil máxima a fenilefrina en presencia de indometacina (Xavier *et al.*, 2003). Otros autores han mostrado que la relajación endotelio-dependiente, en diabetes, está disminuida debido a un aumento de la liberación de factores vasoconstrictores derivados del ácido araquidónico (TXA₂ o PGH₂) (Teshamariam, 1994).

En nuestro trabajo, la administración de indometacina a una dosis de 2 mg/kg, en ratas normoglucémicas, revierte completamente el efecto inhibitor producido por el agonista selectivo de receptores 5-HT_{1D}, L-694,247 sobre las respuestas presoras inducidas por estimulación simpática, a todas las frecuencias de estimulación; mientras que la inhibición producida por el agonista selectivo de receptores 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT, es únicamente revertida a las frecuencias más elevadas de estimulación. Sin embargo, en ratas hiperglucémicas, el efecto inhibitor producido por 8-OH-DPAT no se ve afectado cuando se bloquea la actividad de las ciclooxigenasas con indometacina, lo que confirma que en animales hiperglucémicos hay una modificación de los mecanismos reguladores serotoninérgicos a nivel vascular, con respecto a lo que ocurre en situación de normoglucemia.

Estas respuestas modificadas pueden estar relacionadas con una disminución de la capacidad reguladora de la vía de las ciclooxigenasas, que media sobre todo la

inhibición a través de los receptores 5-HT_{1D} en ratas normoglucémicas, y la aparición de una mayor relevancia de los receptores 5-HT_{1A} aumentados en hiperglucemia (Sandrini *et al.*, 1997; Miranda *et al.*, 2000, 2002), así como con el aumento de la capacidad reguladora del NO, ya demostrada en animales diabéticos por el aumento de la liberación de NO (Pieper *et al.*, 1998; Fitzgerald y Brands, 2000).

Otro de los mecanismos que puede estar implicado en la inhibición ejercida por serotonina, son los canales de K⁺-ATP dependientes, y para conocer su posible implicación, se administró a los animales glibenclamida, un inhibidor de estos canales (Kwan *et al.*, 2003; Ning *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos muestran que ni en ratas normoglucémicas, ni en animales hiperglucémicos la administración de glibenclamida originó una reversión de los mecanismos inhibidores serotoninérgicos de la transmisión simpática vascular, y por tanto quedan excluidos de toda participación a este nivel.

De acuerdo con nuestros resultados, confirmaríamos que la diabetes induce cambios en las vías de señalización intracelular activadas por los receptores 5-HT_{1A} o 5-HT_{1D}, principales responsables de la inhibición que serotonina ejerce en la transmisión simpática en situación de normoglucemia (Morán *et al.*, 1994b; 1998). Probablemente la mayor producción de NO descrita en la diabetes (Pieper *et al.*, 1998; Fitzgerald y Brands, 2000; Komers y Anderson, 2003) justifique el hecho de que sólo la activación del subtipo 5-HT_{1A}, directamente relacionado según nuestros resultados con esta vía, sea la responsable de la inhibición simpática en hiperglucemia, a diferencia de lo que ya conocemos, ocurre en ratas normoglucémicas.

5-HT Y TRANSMISIÓN COLINÉRGICA CARDIACA EN HIPERGLUCEMIA

A diferencia de lo que ocurre con la gran diversidad y amplitud de estudios realizados para analizar la posible interferencia entre el sistema serotoninérgico y la transmisión simpática, la gran mayoría de resultados obtenidos en relación con la posible implicación serotoninérgica sobre efectos parasimpáticos cardiovasculares, se refieren al control serotoninérgico central de la activación refleja vagal y sugieren que determinadas neuronas serotoninérgicas centrales controlarían el tono vagal del corazón (Ramage y Fozard, 1987; Sporton *et al.*, 1991, Ramage y Mifflin, 1998; Jordan, 2004).

Los resultados en cualquier caso, son controvertidos y muy variables proponiéndose acciones despolarizantes con un aumento de la actividad vagal mediada a través de la activación de receptores 5-HT₃ y 5-HT₂ (Kirby y McQueen, 1984; Yoshioka *et al.*, 1992; Ramage y Mifflin, 1998), 5-HT₄ (Tonini *et al.*, 1991) e incluso 5-HT_{1A} (Ramage *et al.*, 1988; Sporton *et al.*, 1991; Skinner *et al.*, 2002); pero también se sugieren acciones inhibitoras de la liberación de acetilcolina, preferentemente mediadas por activación de receptores 5-HT₁ (Galligan *et al.*, 1988; Tonini *et al.*, 1992) e incluso 5-HT₂ (Morán *et al.*, 1994a).

El mejor conocimiento que desde hace unos años tenemos de los diferentes tipos y subtipos de receptores serotoninérgicos permite no obstante, poder confirmar en la actualidad, el importante papel que 5-HT, al menos a nivel central, juega en el control del flujo vagal (Jordan, 2004) donde además de los ya mencionados receptores 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, y 5-HT₄, se ha podido comprobar recientemente, la participación incluso de los receptores 5-HT₇ (Kellet *et al.*, 2004).

Ya ha sido comentado que la diabetes es una patología que entraña importantes modificaciones cardiovasculares y que altera la respuesta de diferentes lechos vasculares a diversos agentes contracturantes o relajantes (Miranda *et al.*, 2000). El riesgo de accidentes cardiovasculares en pacientes diabéticos es mayor entre otros

factores, por la existencia de disfunción autonómica (Ewing *et al.*, 1980; Makimattila *et al.*, 1997). La hiper-reactividad simpática y la mayor liberación de noradrenalina cardiaca, juegan un papel fundamental en el pronóstico de algunas complicaciones cardiovasculares siendo, sin embargo, menos conocido el papel que ejerce el sistema nervioso colinérgico (Oberhauser *et al.*, 2001).

Diversos estudios proponen modificaciones miocárdicas a respuestas colinérgicas muscarínicas durante el síndrome diabético, relacionadas tanto con hiper como con hiposensibilización incluyendo o no cambios en la expresión de receptores (Vadlamudi y McNeil, 1983; Li *et al.*, 1989; Carrier *et al.*, 1984; Wong, 1994).

A pesar de lo controvertido de estas conclusiones, tal vez debido a los diferentes modelos experimentales utilizados en los estudios y/o al diferente estadio diabético inducido en los animales en cada caso (Wald *et al.*, 1998), en general se admite que en situación de diabetes existe un incremento en la población de receptores neuronales muscarínicos M₂ (inhibidores de la liberación de acetilcolina), que sería el responsable de la disminución de respuestas muscarínicas postsinápticas generadas por estimulación eléctrica en ileon y tráquea de ratas diabéticas (Coulson *et al.*, 2002), en pulmón de rata (Belmonte *et al.*, 1997), en vejiga urinaria (Tong *et al.*, 1999, Tong *et al.*, 2002) e incluso en miocardio humano (Oberhauser *et al.*, 2001).

En un estudio realizado hace algún tiempo en nuestro laboratorio en ratas normoglucémicas, se mostraron acciones inhibitoras de la transmisión parasimpática mediadas por activación de receptores 5-HT₂ y, acciones potenciadoras, debidas a la activación 5-HT₃ (Morán *et al.*, 1994a). En el trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral, queríamos comprobar si tales modificaciones se reproducen o no en situación de diabetes experimental y si además, las modificaciones observadas se justifican por la activación de similares receptores serotoninérgicos.

En nuestras condiciones experimentales se consiguen reducciones de frecuencia cardiaca inducidas por la liberación de acetilcolina al estimular neuronas cardiacas

vagales, preferentemente preganglionares (Roquebert *et al.*, 1991). La acetilcolina liberada activa receptores muscarínicos postsinápticos y genera bradicardia.

Si comparamos los descensos de la frecuencia cardiaca inducidos en ratas hiperglucémicas por aloxano (-28,2, -53,4 y -87,1 ppm a las frecuencias de estimulación 3, 6 y 9 Hz respectivamente), con los obtenidos en animales normoglucémicos (-39,5, -70 y -94,4 ppm a las mismas frecuencias de estimulación), observamos una disminución significativa (en situación de hiperglucemia) a todas las frecuencias de estimulación utilizadas. Sin embargo, en lo que respecta a la bradicardia conseguida por administración exógena de acetilcolina, aunque sólo podemos comparar la producida por una dosis de 10 µg/kg, se aprecia una mayor respuesta bradicardizante en situación de hiperglucemia (-110,8 ppm frente a -47 ppm obtenidos en ratas normoglucémicas).

Estos resultados parecen estar de acuerdo con la hipo e hipersensibilización muscarínica que se ha demostrado en otros territorios y para otros tipos de respuestas muscarínicas, como por ejemplo en vejiga de conejos hiperglucémicos por aloxano (Ichiyangi *et al.*, 2002) o en ileon y tráquea de ratas diabéticas por estreptozotocina (Coulson *et al.*, 2002). Ya hemos comentado que estos autores proponen una hipersensibilización de receptores inhibidores M₂ presinápticos que en definitiva inducen una menor liberación de acetilcolina y por tanto, menores respuestas muscarínicas postsinápticas.

En nuestro modelo experimental podría ocurrir hipersensibilización M₂, tal como ocurre a nivel de miocardio en la diabetes humana (Oberhauser *et al.*, 2001), que sería responsable de la menor respuesta obtenida por estimulación eléctrica (habría una menor liberación de acetilcolina) y justificaría sin embargo la mayor bradicardia obtenida por acetilcolina exógena.

Pero también en nuestros resultados encontramos diferencias en las acciones que 5-HT y determinados agonistas serotoninérgicos inducen sobre la bradicardia obtenida por estimulación vagal. A igualdad de dosis, en situación de hiperglucemia, 5-HT a ninguna de las dosis ensayadas, genera acciones inhibitoras siendo únicamente

significativa la potenciación de la bradicardia. Recordemos que en animales normoglucémicos los resultados previamente obtenidos por nuestro grupo, en similares condiciones experimentales (Morán *et al.*, 1994a), se obtuvieron acciones inhibitoras mediadas por activación 5-HT₂ y potenciadas, debidas a una activación 5-HT₃.

Y también a diferencia de lo que ocurre en normoglucemia, tanto la inhibición como la potenciación está mediada por activación de receptores 5-HT₁, ya que ambas acciones se reproducen con 5-CT, un potente agonista de receptores 5-HT₁ y 5-HT₇ (Hoyer *et al.*, 1994) y además, la potenciación se reproduce con los agonistas selectivos de receptores 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT (Middlemis y Fozard, 1983; Hoyer *et al.*, 1994) y 5-HT_{1B}, CGS-12066B (Neale *et al.*, 1987), mientras que la inhibición, es reproducida por L-694,247 (Beer *et al.*, 1993; Hoyer *et al.*, 1994), agonista selectivo de receptores 5-HT_{1D}.

La potenciación generada por 5-CT se revierte parcialmente con mesulergina, un antagonista que por su afinidad hacia receptores 5-HT₁ y 5-HT₇, es utilizado como antagonista 5-HT₇ (Villalón *et al.*, 1998; Centurión *et al.*, 2000), por tanto podría estar indicándonos que al menos en parte, la acción directa de este agonista sobre estos receptores serotoninérgicos hipotensores y bradicardizantes, puede contribuir a una potenciación de la bradicardia inducida en ratas diabéticas con estimulación vagal. Pero el hecho de que los agonistas selectivos 5-HT_{1A} y 5-HT_{1B} también sean potenciadores y que además metiotepina, un antagonista no específico 5-HT_{1,2,5,6,7} (Hoyer *et al.*, 1994) anule la acción inhibitora de 5-CT y que el antagonista WAY-100,635 anule la acción de 8-OH-DPAT, permite sugerir que además de la conocida regulación 5-HT_{1A} central (Ramage *et al.*, 1988; Sporton *et al.*, 1991; Skinner *et al.*, 2002), la activación periférica de estos receptores serotoninérgicos también contribuye a modular la transmisión colinérgica.

Existe otro aspecto importante a destacar de los resultados obtenidos en nuestros experimentos con respecto a animales normoglucémicos, donde los agonistas serotoninérgicos sólo modifican las respuestas muscarínicas derivadas de la estimulación vagal pero no la bradicardia inducida por administración exógena de acetilcolina. En

hiperglucemia sin embargo, al menos las respuestas de potenciación existen igualmente frente a la acetilcolina exógena. Tales resultados indican que las acciones serotoninérgicas, en situación de diabetes experimental, se manifiestan tanto a nivel pre como postsináptico.

Las acciones en todo caso son menos significativas que las encontradas en ratas no hiperglucémica, lo que permite sugerir que las respuestas serotoninérgicas a nivel parasimpático cardíaco se encuentran ligeramente atenuadas en situación de diabetes experimental, siendo los receptores 5-HT₁ los mayoritariamente implicados tanto en la inhibición como en la potenciación colinérgica muscarínica cardíaca.

En resumen, en relación con la actividad y los mecanismos serotoninérgicos implicados en la inhibición y/o potenciación de la neurotransmisión parasimpática cardíaca, podemos concluir que la diabetes experimental induce cambios en la localización y en el tipo de receptores serotoninérgicos implicados, siendo en este caso de naturaleza 5-HT₁ y de localización tanto pre como postsináptica.

RESPUESTAS VASCULARES RENALES MEDIADAS POR RECEPTORES SEROTONÉRGICOS

En esta parte del trabajo hemos intentado caracterizar las respuestas vasculares renales inducidas por 5-HT, y particularmente los receptores implicados en dichas respuestas, así como, estudiar las posibles modificaciones que se producen en la diabetes. El riñón ha llamado nuestra atención para realizar este estudio vascular, en el contexto del estudio de las modificaciones en la diabetes, porque este órgano, y más concretamente, el lecho vascular renal es uno de los órganos “diana” principales durante el desarrollo de la diabetes, preferentemente en lo que a vasos de resistencia se refiere. Las consecuencias de la diabetes a nivel renal, son muy graves, ya que las complicaciones llevan a nefropatía diabética e insuficiencia renal.

Para conseguir estos fines hemos utilizado la técnica de riñón aislado perfundido de rata para analizar *in vitro*, evitando así regulaciones neurohormonales, las respuestas vasculares debidas a la activación de diferentes receptores de 5-HT. En este modelo experimental, contrariamente a los estudios realizados en arterias renales aisladas (Watts y Thompson, 2004; Miranda *et al.*, 2002) hemos trabajado íntegramente con todo el lecho vascular renal, del que ya anteriormente Endlich *et al.* (1993) han descrito la heterogeneidad de respuesta a la serotonina. En este estudio, la administración local de 5-HT en riñón hidronefrótico de rata permitió ver una constricción, esencialmente de los grandes vasos (arterias arciformes), mientras que las arteriolas intralobulares y aferentes se dilataban. Esto podría indicar una repartición específica de los subtipos de receptores serotoninérgicos en el árbol vascular intrarrenal.

El riñón aislado perfundido conserva el endotelio intacto, y por tanto funcional, como atestiguan las respuestas vasodilatadoras inducidas por acetilcolina y bradicinina tanto en este estudio y/o en otros anteriores del grupo de investigación francés (Stephan *et al.*, 1995; Bagate *et al.*, 2001; Loichot *et al.*, 2002).

La preservación del endotelio funcional es importante puesto que cabe esperar obtener respuestas vasodilatadoras endotelio dependientes debido a que en estudios llevados a cabo en células endoteliales en cultivo se han encontrado los ARNm de numerosos receptores serotoninérgicos (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{2B} y 5-HT₄) (Ullmer *et al.*, 1995, 1996). Sin embargo, únicamente los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT₇ se encontraron en los cultivos de células musculares lisas vasculares (Ullmer *et al.*, 1995). También es de esperar la existencia de modificaciones ligadas al NO durante el desarrollo de la diabetes (Pieper *et al.*, 1998; Fitzgerald y Brands, 2000; Komers y Anderson, 2003).

Los resultados obtenidos confirman que 5-hidroxitriptamina, ligando endógeno del conjunto de receptores serotoninérgicos, induce una respuesta, a nivel renal, esencialmente vasoconstrictora. Dicha respuesta está completamente inhibida en presencia de la ritanserina (10 nM), lo que demuestra, por tanto, la implicación en dicha acción vasoconstrictora de los receptores 5-HT₂. La CE₅₀ de serotonina (CE₅₀ = 0,34

μM) es del mismo orden que la CE_{50} determinada anteriormente en arteria renal de rata o de conejo (Watts y Thompson, 2004; Miranda *et al.*, 2002). El efecto máximo es, por el contrario, diferente y equivalente al de fenilefrina en riñón aislado perfundido o en arterias renales (Watts y Thompson, 2004), pero corresponden solamente al 20% de la respuesta obtenida con KCl en arterias renales de conejo (Miranda *et al.*, 2002).

Según los valores de CE_{50} podemos establecer un perfil relativo de potencia para los diferentes agonistas utilizados: $\text{DOI} > 5\text{-HT} > \alpha\text{-methyl-5-HT} > m\text{-CPP}$. Este perfil es similar al ya obtenido anteriormente en arteria renal de rata (Watts y Thompson, 2004), o en aorta de ratón (McKune y Watts, 2001); aunque también existen diferencias que creemos importante destacar:

- En primer lugar, BW723C86 (Banes *et al.*, 2004; Centurión *et al.*, 2004; Knight *et al.*, 2004) no produce ningún tipo de vasoconstricción en riñón aislado, pero, por el contrario, es capaz de inducir una vasorelajación. De este modo podemos excluir *a priori*, a los receptores $5\text{-HT}_{2\text{B}}$ de acciones vasoconstrictoras, del mismo modo a como ocurre en el tren posterior autoperfundido (Calama *et al.*, 2002).
- En segundo lugar, DOI aparece como agonista parcial, como ya ha sido demostrado *in vivo* en ratas desmeduladas (Chaouche-Teyara *et al.*, 1993) o en aorta de ratón (McKune y Watts, 2001). Con el *m*-CPP ocurre lo mismo, es decir, la respuesta es particularmente débil en riñón aislado. Estas acciones agonistas parciales parecen estar ligadas a una regulación por la vía del NO, a través de la activación de receptores $5\text{-HT}_{2\text{B}}$ endoteliales. Los dos agentes se han descrito también como agonistas del receptor $5\text{-HT}_{2\text{B}}$ (Knight *et al.*, 2004), del que vemos en nuestra preparación renal que induce una vasodilatación. De hecho, ha sido demostrado por otros autores (Ishida *et al.*, 1998) que la activación de receptores $5\text{-HT}_{2\text{B}}$ produce una liberación de NO en cultivo de células endoteliales de arterias coronarias humanas.

- En tercer lugar, 5-CT, agonista de receptores 5-HT_{1/7}, 8-OH-DPAT, agonista selectivo de receptores 5-HT_{1A}, CGS-12066B (agonista selectivo de receptores 5-HT_{1B}) y L-694,247 (agonista selectivo de receptores 5-HT_{1D}), de la misma forma que el agonista selectivo de receptores 5-HT₃, 1-fenilbiguanida, quedan excluidos de la acción vasodilatadora renal.

Nuestros resultados muestran una vasoconstricción renal esencialmente ligada a la activación de receptores 5-HT_{2A}, como ya ha sido sugerido previamente por otros autores en aorta renal de rata y ratón (Watts y Thompson, 2004; McKune y Watts, 2001), y sin embargo no parece implicar a los receptores 5-HT_{2B}, principal subtipo responsable de la vasoconstricción serotoninérgica inducida en mesenterio autoperfundido *in situ* de rata (Fernández *et al.*, 2000b).

Es importante destacar que el bloqueo de los receptores 5-HT₂ no permite visualizar una vasodilatación producida por serotonina, como se ve *in vivo*, en el tren posterior autoperfundido de rata anestesiada (Calama *et al.*, 2002). Este hecho lo podemos explicar porque la vasodilatación, en riñón aislado perfundido, no se ve a no ser que se haya restaurado previamente el tono vascular renal.

Después de la restauración de este tono vascular, hemos visto una acción vasodilatadora, a nivel renal, concentración-dependiente con 5-CT (agonista de receptores 5-HT_{1/7}), 8-OH-DPAT (agonista de receptores 5-HT_{1A}), CGS-12066B (agonista de receptores 5-HT_{1B}) y BW723C86 (agonista de receptores 5-HT_{2B}). Globalmente, estas respuestas demuestran una contribución de receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2B} y puede ser que también la activación de los receptores 5-HT₇, contribuya a esta respuesta vasodilatadora. Estos resultados nos llevan a comentar los siguientes aspectos:

- En lo que respecta a los receptores 5-HT_{1A}, los resultados conseguidos con 8-OH-DPAT confirman los obtenidos previamente por Verbeuren *et al.* (1991) en riñón aislado de rata. La naturaleza endotelial de esta

vasodilatación con posterior liberación de NO está ampliamente documentada (Verbeuren *et al.*, 1988, 1991). Estos resultados, sin embargo, también han sido puestos en duda debido a la importante actividad antagonista α_{1A} -adrenérgica que algunos autores (Eltze *et al.*, 1991) han descrito para algunos de los agonistas de receptores 5-HT_{1A}, así como a la ausencia de una vasodilatación renal cuando el tono vascular estaba restaurado por prostaglandina F_{2 α} (Stephan *et al.*, 1990). En nuestros resultados, una parte importante de la vasodilatación producida por 8-OH-DPAT (80% de relajación) en el tono restaurado por fenilefrina revela también un posible efecto α -adrenolítico. De todos modos, existe una parte de la vasodilatación por activación de receptores 5-HT_{1A} que se mantiene cuando el tono vascular renal se ha restaurado con Ang II, y que, a su vez, es inhibida por WAY-100,635, antagonista específico de este tipo de receptores.

- Del mismo modo, nuestro trabajo demuestra la implicación de otros receptores serotoninérgicos en la respuesta vasodilatadora renal. Los receptores 5-HT_{2B} presentes tanto en células endoteliales como en células de músculo liso vascular, han sido ya descritos como responsables tanto de vasodilatación endotelio-dependiente como de vasoconstricción (Ullmer *et al.*, 1995; Hoyer *et al.*, 1994). También para los receptores 5-HT_{1B}, localizados tanto a nivel de células endoteliales como de células de músculo liso vascular, se han descrito tanto acciones vasoconstrictoras como vasodilatadoras (Jähnichen *et al.*, 2004; Nilsson *et al.*, 1999; Elhusseiny *et al.*, 2001). En lo referente a los receptores 5-HT₇, de los que no existen agonistas o antagonistas muy específicos salvo SB269970 (Lovell *et al.*, 2000), nosotros hemos utilizado 5-CT (agonista 5-HT_{1/7}) en presencia del antagonista de receptores 5-HT₇, mesulergina (Hoyer *et al.*, 2002) y los resultados obtenidos nos hacen pensar que una parte de la vasodilatación obtenida es debida a la activación de receptores 5-HT₇.

Por estudios de RT-PCR cuantitativa en tiempo real, hemos podido confirmar la presencia de ARNm de receptores 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{1A} y 5-HT_{1B}, tanto en arteriolas renales como en aorta torácica. Estos resultados han sido verificados por inmunohistoquímica con un anticuerpo dirigido al factor VIII, con el que se ha visto que, tanto la muestra procedente de arteriolas intrarrenales como la procedente de aorta, preservaban las células endoteliales (Resultados preliminares comunicados directamente por la investigadora Véronique Lindner).

El receptor 5-HT_{1D} está presente, pero poco expresado a nivel renovascular (ARNm), y no parece estar ligado a ningún fenotipo vascular en nuestra preparación renal *in vitro*. Sin embargo, es importante destacar que, en arterias renales de conejo parcialmente despolarizadas y en presencia de ketanserina para inhibir la posible acción ligada a receptores 5-HT₂, sí que se ha descrito una actividad vasoconstrictora ligada a la activación de receptores 5-HT_{1D} (Choppin y O'Connor, 1994).

Ya se ha comentado que para estudiar las modificaciones de las respuestas serotoninérgicas durante la diabetes, buscábamos una diabetes elevada y desequilibrada, con una hiperglucemia superior a 400 mg/dl (> 22 mM), con el fin de aumentar las alteraciones vasculares después de las 4 semanas en las que los animales estaban expuestos a la hiperglucemia. El resultado más interesante obtenido en las ratas diabéticas, con respecto a normoglucémicas, es que la vasoconstricción renal producida por serotonina está potenciada a las concentraciones bajas y, disminuida a las concentraciones más elevadas. Teniendo en cuenta que las concentraciones de 5-HT circulante son del orden de 100 nM como mucho, es evidente que la disminución del umbral de sensibilidad y la potenciación de respuestas a las bajas concentraciones de 5-HT son elementos importantes en favor de un papel fisiopatológico de 5-HT en las lesiones vasculares durante el desarrollo de la diabetes.

En nuestro estudio la potenciación de las respuestas es particularmente importante en presencia de DOI, pero no en presencia de *m*-CPP, lo que favorece, aún más, la hipótesis de que la acción vasoconstrictora renal está ligada a los receptores 5-HT_{2A}. La potenciación de las respuestas vasoconstrictoras de 5-HT ha sido también

descrita en arterias renales de conejo diabético (Miranda *et al.*, 2002), en arterias pulmonares o carótidas procedentes de conejo o de cerdo diabético (Miranda *et al.*, 2000; El-Kashef, 1996; Bagwell *et al.*, 2000), pero también se han encontrado resultados variables en aortas de ratas diabéticas (Sikorski *et al.*, 1993; James *et al.*, 1994; Orié *et al.*, 1993; Hattori *et al.*, 1995).

Nuestros resultados muestran que esta potenciación se produce tanto con una exposición aguda a una concentración elevada de glucosa como por los efectos crónicos de la diabetes. Sin embargo no hemos encontrado argumento alguno a favor de una implicación por un déficit de NO en esta modulación. La vasoconstricción renal producida por 5-HT está potenciada después de la inhibición de la NO sintasa (se ve una disminución de la CE_{50}), pero esta potenciación es similar en el lecho vascular de los riñones procedentes tanto de animales normoglucémicos como diabéticos. Por otro lado, las vasodilataciones renales que implican un componente endotelio-dependiente ligado al NO, como son las vasodilataciones inducidas por Ach, o las producidas por 8-OH-DPAT o CGS-12066B no se ven modificadas en el desarrollo de la diabetes.

Nuestros resultados parecen contradictorios con otros indicios que están en favor de una implicación mucho más importante del NO vascular en rata diabética. En efecto, i) la resistencia vascular renal está particularmente disminuida en los riñones procedentes de los animales diabéticos, situación en la que L-NNA ejerce una vasoconstricción aumentada; ii) las ratas diabéticas se encuentran en el desarrollo de la fase precoz de la nefropatía diabética caracterizada por una hiperfiltración glomerular, debida, al menos en parte, a un aumento en la producción de NO renal (Komers y Anderson, 2003; iii) la inhibición de la NO sintasa disminuye la respuesta vasodilatadora renal de CGS-12066B en la rata diabética, situación que no ocurre en los riñones de ratas normoglucémicas, probablemente porque las prostaciclina o el factor endotelial de hiperpolarización contribuyen mayoritariamente a la relajación del NO. Todos estos hechos sugieren que el componente no dependiente de NO de la vasodilatación endotelio-dependiente está alterado en diabetes, pero que, a su vez, éste se encuentra compensado por una potenciación del componente NO.

En este contexto, es interesante anotar que la vasodilatación endotelio-dependiente en riñón aislado y, en los vasos de resistencia en general (Bagaté *et al.*, 2001; Garland *et al.*, 1995; De Vriese *et al.*, 2000b), está unida, principalmente, a la liberación de factores de hiperpolarización endotelial (EDHF). Este componente está alterado en las arterias interlobulares y aferentes glomerulares durante la diabetes, (De Vriese *et al.*, 2000b), pero no es capaz de modificar, al menos en la fase precoz de la diabetes, la respuesta global del riñón a la acetilcolina. Estos hechos concuerdan con nuestros resultados.

El análisis de la expresión de ARNm de los receptores de 5-HT por RT-PCR muestra que la potenciación de la vasoconstricción no está ligada a un aumento en la expresión vascular de receptores 5-HT_{2A}. El papel de los receptores 5-HT_{2C}, que aparece como menos importante en la vasoconstricción, no ha sido por el momento verificado. Aunque el nivel de expresión de ARNm no muestra obligatoriamente el nivel de expresión de proteínas, podemos observar que otros autores han mostrado que la densidad de los receptores 5-HT₂ (Bmax) no está modificada en aorta de ratas diabéticas (James *et al.*, 1994).

Por tanto, parece probable que la potenciación de la vasoconstricción de 5-HT en la diabetes esté ligada a modificaciones en las vías de señalización intracelular o/y a un aumento de la maquinaria contráctil del calcio. Esta potenciación, que en riñón no modifica la respuesta a fenilefrina, ha sido también encontrada para la respuesta a la endotelina-1 o a noradrenalina (Hodgson *et al.*, 1990; Orié *et al.*, 1993). El mecanismo exacto por el que se produce este aumento de la respuesta en diabetes no ha sido todavía elucidado pero hay estudios que apuntan hacia una contribución aumentada del tromboxano A₂ (Hodgson *et al.*, 1990), anomalías en la vía de la PKC (Hattori *et al.*, 1995) o de la cascada de la COX (James *et al.*, 1995a).

Serotonina ejerce también importantes efectos a nivel de células mesangiales, un factor importante en la evolución de la nefropatía diabética. 5-HT es capaz de aumentar la proliferación de dichas células, la síntesis de TGFβ1 y la secreción de la matriz extracelular (Eto *et al.*, 1997; Grewall *et al.*, 1999; Kasho *et al.*, 1998). Todas estas

propiedades han llevado a Takahashi *et al.*, (2002) a estudiar los efectos de un antagonista de receptores 5-HT_{2A}, sarpogrelato, en esta patología. Los resultados indican un efecto beneficioso de este compuesto, ya que la albuminuria de un grupo no muy elevado de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 ha disminuido en el tercer mes de tratamiento. Estos datos muestran que las tasas elevadas de 5-HT en la diabetes, participan probablemente en la nefropatía diabética, a través de una acción sobre los receptores 5-HT_{2A}. Es posible que parte de los efectos beneficiosos que se ven en diabetes para este compuesto, sean debidos a la inhibición de las respuestas hemodinámicas vasoconstrictoras producidas por 5-HT. En nuestro trabajo, hemos podido comprobar que 5-hidroxitriptamina induce acciones vasoconstrictoras renales, y que tales acciones vasoconstrictoras están potenciadas durante el desarrollo de esta enfermedad.

----- *Conclusiones* -----

1. Existen mecanismos serotoninérgicos inhibidores de la transmisión simpática en ratas normoglucémicas, relacionados con receptores de naturaleza 5-HT_{1D} y en menor medida, 5-HT_{1A}, de localización preferentemente presináptica, cuya activación implica, al menos parcialmente, la activación de las ciclooxigenasas.
2. En hiperglucemia inducida por administración de aloxano, se reproduce la respuesta inhibitoria que sobre la neurotransmisión simpática ejerce 5-HT y otros agonistas serotoninérgicos de receptores 5-HT₁, a la vez que disminuyen las respuestas potenciadoras, que en ausencia de hiperglucemia, están mediadas por la activación de receptores 5-HT₃.
3. Además de predominar la respuesta inhibitoria, en hiperglucemia inducida por aloxano, cambia el subtipo de receptores implicados, siendo mayoritariamente la activación de receptores presinápticos 5-HT_{1A} los responsables de la inhibición simpática en ratas diabéticas.
4. La diabetes experimental además, induce cambios en las vías de señalización implicadas en la respuesta serotoninérgica inhibitoria de transmisión simpática, siendo en este caso la formación de NO y la consiguiente activación de la guanilato ciclasa, los procesos implicados tras la activación 5-HT_{1A}.
5. La hiperglucemia induce una menor implicación de 5-HT o mecanismos serotoninérgicos en los efectos derivados de la estimulación cardíaca vagal, y aunque se observan efectos tanto potenciadores como inhibidores de bradicardia, son menos significativos que los obtenidos en ratas normoglucémicas.
6. No obstante, a pesar de la menor implicación serotoninérgica, se aprecian cambios en la naturaleza de los receptores implicados e incluso en la localización. En situación de hiperglucemia, los receptores serotoninérgicos inhibidores y potenciadores de transmisión colinérgica son de naturaleza 5-HT₁ y de

localización tanto pre como postsináptica. La inhibición es preferentemente 5-HT_{1A/1B} y la potenciación 5-HT_{1D}.

7. En riñón aislado perfundido, 5-hidroxitriptamina induce respuestas tanto vasodilatadoras como vasoconstrictoras. Las acciones vasoconstrictoras están mediadas principalmente por activación de receptores 5-HT_{2A}, aunque no podemos descartar una posible acción de los receptores 5-HT_{2C}, mientras que las acciones vasodilatadoras se producen a través de la activación de receptores 5-HT_{1A/1B} y 5-HT_{2B}.
8. La inducción de diabetes experimental por estreptozotocina, provoca una potenciación de la vasoconstricción renal, a bajas concentraciones de 5-HT y, una atenuación de dicha respuesta a las concentraciones más elevadas.
9. Las acciones vasodilatadoras sin embargo, no se ven modificadas con el desarrollo de esta enfermedad, aunque mejora la contribución del NO a la regulación hemodinámica renal, aumentándose la vasodilatación endotelio-
10. Los ARNm de los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{2A} y 5-HT_{2B} están presentes en arteriolas intra-renales y en aorta de ratas normoglucémicas. Su expresión no se ve modificada cuatro semanas después de inducir la diabetes.

Este trabajo aporta nuevos conocimientos en cuanto a la participación de diversos receptores serotoninérgicos en la regulación de algunas funciones cardiovasculares y renales. La diabetes experimental implica cambios en los mecanismos serotoninérgicos cardiovasculares y renales, en concreto en lo que respecta a la participación del NO y de metabolitos de la vía de las ciclooxigenasas.

----- *Bibliografia* -----

- ABEBE, W., McLEOD, K.M. (1990). Protein kinase C-mediated contractile responses of arteries from diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.*, **101**, 465-71.
- 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_{1D α} , 5-HT_{1D β} , 5-HT_{1E} and 5-HT_{1F} receptors of α -adrenergic antagonists. *Neuropharmacology*, **33**, 387-91.
- AGRAWAL, D.K., McNEIL, J.H. (1987). Vascular responses to agonists in rat mesenteric artery from diabetic rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **65**, 1484-90.
- 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**, 1769-74.
- ALTAN, M.V., YILDIZOGLU, N., OZTURK, Y. (1987). Decreased gastro-intestinal responses to certain agonists in streptozotocin- and alloxan-diabetic rats in vitro. *Pharmacology*, **34**, 143-48.
- ALTURA, B.M. (1981). Pharmacology of venules: some current concepts and clinical potential. *J. Cardiovas. Pharmacol.*, **3**, 1413-28.
- ANGULO, J., RODRIGUEZ-MAÑAS, L., PEIRÓ, C., NEIRA, M., MARIN, J., SANCHEZ-FERRER, C.F. (1998). Impairment of nitric oxide-mediated relaxations in anaesthetized autoperfused streptozotocin-induced diabetic rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **358**, 529-37.
- 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 S₂ antagonist. *Drug Dev. Res.*, **1**, 67-73.
- BADGY, G., CALOGERO, A.E., MURPHY, D.L., SZEMEREDI, K. (1989). Serotonin agonists cause parallel activation of the sympathoadrenal medullary system and the Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Axis in conscious rats. *Endocrinology*, **125**, 2664-69.

- BAGATE, K., GRIMA, M., IMBS, J.L., DE JONG, W., HELWIG, J.J., BARTHELMEBS, M. (2001): Signal transduction pathways involved in kinin B2 receptor-mediated vasodilation in the rat isolated perfused kidney. *Br. J. Pharmacol.*, **132**, 1735-42.
- BAGWELL, C.A., BROPHY, C. (2000). Enhanced arterial contractile responses in diabetic hypercholesterolemic pig carotid arteries. *Int J Surg Investig.*, **1**, 477-81.
- BANES, A.K., SHAW, S.M., TAWFIK, A., PATEL, B.P., OGBI, S., FULTON, D., MARRERO, M.B. (2004). Activation of the JAK/STAT pathway in vascular smooth muscle by serotonin. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, in press.
- BANK, N., AYNEDJIAN, H.S. (1993). Role of the EDRF (nitric oxide) in diabetic renal hyperfiltration. *Kidney Int.*, **43**(6), 1306-12.
- BANTING, F.G., BEST, C.H. (1990). Pancreatic extracts. 1922. *J. Lab. Clin. Med.*, **115**(2): 254-72.
- 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.
- BARTHELMEBS, M., KRIEGER, J.P., GRIMA, M., NISATO, D., IMBS, J.L. (1996). Vascular effects of [Arg⁸]vasopressin in the isolated perfused rat kidney. *Eur. J. Pharmacol.*, **314**, 325-32.
- BASSENGE, E. (1992). Clinical relevance of endothelium derived relaxing factor (EDRF). *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **34**, 37S-42S.
- BAXTER, G., KENNETT, G., BLANEY, F., BLACKBURN, T. (1995). 5-HT₂ receptor subtypes: a family reunited?. *Trends Pharmacol. Sci.*, **16**, 105-10.
- 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):1125-30.

- BEER, M.S., STANTON, J.A., BEVAN, Y., HEALD, A., REEVE, A.J., STREET, L.J., MATASSA, V.G., HARGREAVES, R.J., MIDDLEMIS, M.D. (1993). L-694.247: a potent 5-HT_{1D} receptor agonist. *Br. J. Pharmacol.*, **110**, 1196-200.
- 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**, 973-81.
- BELMONTE, K.E., JACOBY, D.B., FRYER, A.D. (1997). Increased function of inhibitory neuronal M₂ muscarinic receptors in diabetic rat lungs. *Br. J. Pharmacol.*, **121**, 1287-94.
- BIANCHI, C., SINISCALCHI, A., BEANI, L. (1990). 5-HT_{1A} agonists increase and 5-HT₃ agonists decrease acetylcholine efflux from the cerebral cortex of freely-moving guinea-pigs. *Br. J. Pharmacol.*, **101**, 448-52.
- BIRNBAUMER, L., ABRAMOWITZ, J., BROWN, A.M. (1990). Receptor-effector coupling by G proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1031**, 163-224.
- BLACKSHEAR, J.L., ORLANDI, C., HOLLENBERG, N.K. (1986). Serotonin and renal blood supply: Role of prostaglandins and the 5-HT₂ receptor. *Kidney Intern.*, **30**, 304-10.
- BLACKSHEAR, J.L., ORLANDI, C., HOLLENBERG, N.K. (1991). Constrictive effect of serotonin on visible renal arteries: a pharmacoangiographic study in anesthetized dogs. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **17** (1), 68-73.
- BLESSING, W.W., SEAMAN, B. (2003). 5-Hydroxytryptamine_{2A} receptors regulate sympathetic nerves constricting the cutaneous vascular bed in rabbits and rats. *Neuroscience*, **117**, 939-48.

- BORKOWSKI, K.R., QUINN, P. (1984). Facilitation by α -adrenoceptors of stimulation-induced vasoconstriction in pithed spontaneously hypertensive rats. *J. Auton. Pharmacol.*, **4**, 127-31.
- BOSTON, P.C., HODGSON, W.C. (1997). Changes in reactivity towards 5-hydroxytryptamine in the renal vasculature of diabetic spontaneously hypertensive rat. *J. Hypertension*, **15**, 769-74.
- 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**, 563-76.
- BRODIE, T. (1900). The immediate action of an intravenous injection of blood serum. *J. Physiol. (London)*, **26**, 48-71.
- BROWN, G.L., LINNOILA, M.I. (1990). CSF serotonin metabolite (5-HIAA) studies in depression, impulsivity, and violence. *J. Clin. Psychiatry*, **51**, 31-41.
- BRUNNER, H.C., NELEN, M., BREAKFIELD, X.O., ROPERS, H.H., VAN OOST, B.A. (1993). Abnormal behaviour associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A. *Science*, **262**, 578-80.
- BRYAN-LLUKA, L.J., PAPACOSTAS, M.H., PACZKOWSKI, F.A., WANSTALL, J.C. (2004). Nitric oxide donors inhibit 5-HT uptake in the human 5-HT transporter (SERT). *Br. J. Pharmacol.*, **143**(1): 63-70.
- CALAMA, E., FERNANDEZ, M.M., MORAN, A., MARTIN, M.L., SAN ROMAN, L. (2002). Vasodilator and vasoconstrictor responses induced by 5-hydroxytryptamine in the in situ blood autoperfused hindquarters of the anaesthetized rat. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, **366**(2), 110-16.
- CALAMA, E., GARCIA, M., JARQUE, M.J., MORAN, A., MARTIN, M.L., SAN ROMAN, L. (2003). 5-Hydroxytryptamine-induced vasodilator responses in the hindquarters of the anaesthetized rat, involve beta-2-adrenoceptors. *J. Pharm. Pharmacol.*, **55**(10), 1371-78.

- CALAMA, E., MORÁN, A., ORTIZ DE URBINA, A.V., MARTIN, M.L., SAN ROMAN, L. (2004). Vasoconstrictor responses to 5-hydroxytryptamine in the autoperfused hindquarters of spontaneously hypertensive rats. *Pharmacology*, **71**(2), 66-72.
- CARRIER, G.O., EDWARDS, A.D., ARONSTAM, R.S. (1984). Cholinergic supersensitivity and decreased number of muscarinic receptors in atria from short-term diabetic rats. *J. Moll. Cell Cardiol.*, **16**, 963-5.
- CASES, O., SEIF, I., GRIMSBY, J., GASPAR, P., CHEN, K., POURNIN, S., MULLER, U., AGUET, M., BABINET, C., SHIH, J.C. *et al.* (1995). Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. *Science*, **268**, 1763-66.
- CASTILLO, C., IBARRA, M., TERRON, J.A., VILLALON, C.M. (1994). Direct effects of indorenate and 8-OH-DPAT on the blood pressure of pithed rats. *Drug Develop. Res.*, **33**, 20-25.
- CAZZOLA, M., MATERA, M.G. (2000). 5-HT modifiers as a potential treatment of asthma. *TIPs*, **21**, 13-15.
- CAZZOLA, M., MATERA, M.G., D'AMATO, G., ROSSI, F. (1995). Effects of serotonin on airways: recent developments. *Allergy*, **50**(1), 1-10.
- CENTURION, D., GLUSA, E., SANCHEZ-LOPEZ, A., VALDIVIA, L.F., SAXENA, P.R., VILLALON, C.M. (2004). 5-HT₇, but not 5-HT_{2B}, receptors mediate hypotension in vagosympathectomized rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **502**(3), 239-42.
- CENTURIÓN, D., SÁNCHEZ-LÓPEZ, A., ORTIZ, M.I., SAXENA, P.R., VILLALÓN, C.M. (2000). Mediation of 5-HT-induced internal carotid vasodilatation in GR127935- and ritanserin-pretreated dogs by 5-HT₇ receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **362**(2), 169-176.
- CHAOUCHE-TEYARA, K., FOURNIER, B., SAFAR, M., DABIRE, H. (1993). Vascular and cardiac effects of alpha-methyl-5-HT and DOI are mediated by different 5-HT receptors in the pithed rat. *Eur J Pharmacol.*, **250**, 67-75.

- CHEN, J., VAN PRAAG, H.M., GARDNER, E.L. (1991). Activation of 5-HT₃ receptor by 1-phenylbiguanide increases dopamine release in the rat nucleus accumbens. *Brain Res.*, **543**, 354-357.
- CHEN, S.J., CHEN, K.H., WU, C.C. (2005). Nitric oxide-cyclic GMP contributes to abnormal activation of Na⁺-K⁺-ATPase in the aorta from rats with endotoxic shock". *Shock*, **23**(2), 179-85.
- 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**, 793-99.
- CHOPPIN, A., O'CONNOR, S.E. (1994). 5-Hydroxytryptamine_{1D}-like receptors mediate contraction of partially depolarized rabbit renal arteries. *J Pharmacol Exp Ther.*, **270**, 650-5.
- 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**, 655-62.
- 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.
- COULSON, F.R., JACOBY, D.B., FRYER, A.D. (2002). Increased function of inhibitory neuronal M₂ muscarinic receptors in trachea and ileum of diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.*, **135**, 1355-62.
- 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 VRIESE, A.S., VAN DE VOORDE, J., BLOM, H.J., VANHOUTTE, P.M., VERBEKE, M., LAMEIRE, N.H. (2000b) The impaired renal vasodilator response attributed to endothelium-derived hyperpolarizing factor in streptozotocin—induced diabetic rats is restored by 5-methyltetrahydrofolate. *Diabetologia*, **43**, 1116-25.

- DE VRIESE, A.S., STOENOIU, M.S., ELGER, M., DEVUYST, O., VANHOLDER, R., KRIZ, W., LAMEIRE, N.H., (2001). Diabetes-induced microvascular dysfunction in the hydropnrotic kidney: Role of nitric oxide. *Kideny Int.*, **60**, 202-10.
- DE VRIESE, A.S., VERBEUREN, T.J., VAN DE VOORDE, J., LAMEIRE, N.H., VANHOUTTE, P.M. (2000a). Review: Endothelial dysfunction in diabetes. *Br. J. Pharmacol.*, **130**, 963-974.
- DILSAVER, S. (1986). Cholinergic mechanisms in depression. *Brain Res. Rev.* **11**, 285-16.
- DING, X.R., STIER, C.J.R., HAROLD, I. (1989a). Hemodynamic effect of norepinephrine and serotonin with and without indomethacin. *Chin. Medical J.*, **102** (6), 461-63.
- DING, X.R., STIER, C.J.R., ITSKOVITZ, H.D. (1989b). Serotonin and 5-hydroxytryptophan on blood pressure and renal blood flow in anaesthetized rats. *Am. J. Med. Sci.*, **297**, 290-93.
- DOCHERTY, J.R. (1988). Investigation of cardiovascular 5-HT receptors subtypes in the rat. *Naunyn Schmiederberg's Arch. Pharmacol.*, **337**, 1-8.
- ELHUSSEINY, A., HAMEL, E. (2001). Sumatriptan elicits both constriction and dilation in human and bovine brain intracortical arterioles. *Br. J. Pharmacol.*, **132**, 55-62.
- EL-KASHEF, H. (1996). Hyperglycemia increased the responsiveness of isolated rabbit's pulmonary arterial rings to serotonin. *Pharmacology.*, **53**, 151-9.
- ELTZE, M., BOER, R., SANDERS, K.H., KOLASSA, N. (1991). Vasodilatation elicited by 5-HT_{1A} receptor agonists in constant-pressure-perfused rat kidney is mediated by blockade of alpha 1A-adrenoceptors. *Eur. J. Pharmacol.*, **202**, 33-44.
- ENDLICH, K., ENDLICH, N., FIASCHI-TAESCH, N., HELWIG, J.J. (2000). Culture of vascular smooth muscle cells from small arteries of the rat kidneys. *Kidney Int.*, **57**, 2468-75.
- ENDLICH, K., KUHN, R., STEINHAUSEN, M. (1993). Visualization of serotonin effects on renal vessels of rats. *Kidney Int.*, **43**, 314-23.

- ERSPARMER, V. (1954). Pharmacology of indolealkylamines. *Pharmacol. Rev.*, **6**, 435-87.
- ERSPARMER, V., ASERO, B. (1952). Identification of enteramine, the specific hormone of enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature*, **169**, 800-01.
- 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**, 193-9.
- EVANS, R.G., KAPOOR, V., LUDROOK, J. (1992). A CNS serotonergic mechanism in acute central hypovolemia in conscious rabbits?. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **19**, 1009-17.
- EWING, D.J., CAMPBELL, I.W., CLARKE, B.F., (1980). Assessment of cardiovascular effects in diabetic autonomic neuropathy and prognostic implications. *Ann. Intern. Med.*, **92**, 308-11.
- FELETOU, M., MOREAU, N., DUHAULT, J. (1994). Vascular responsiveness in young, diabetic, and aging hyperinsulinemic rats. *Life Sci.*, **54**(23), 1801-13.
- 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-HT₁ receptor antagonists. *J. Auton. Pharmacol.*, **20**(5-6), 313-23.
- 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_{2B} and/or 5-HT_{2C} receptor activation. *Eur. J. Pharmacol.*, **401**(2), 221-27.

- FITZGERALD, S.M., BRANDS, M.W. (2000). Nitric oxide may be required to prevent hypertension at the onset of diabetes. *Am. J. Physiol.*, **279**, E762-E768.
- FLETCHER, A., BILL, D.J., CLIFFE, I.A., FOR-STER, E.A., JONES, D., REILLY, Y. (1994). A pharmacological profile of WAY-100,635, a potent and selective 5-HT_{1A} receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol*, **112**, 91P.
- FLOREZ, J., ARMIJO, J.A., MEDIAVILLA, A. (2003). *Farmacología humana*. Ed. Masson, Madrid.
- FOZARD, J.R., KALKMAN, H.O. (1994). 5-Hydroxytryptamine and the initiation of migraine: new perspectives. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **350**, 225-29.
- 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., KUMAR, A., SHAREEF, B. (1995). Serotonin and serotonin antagonism in cardiovascular and non-cardiovascular tissue. *J. Clin. Pharmacol.*, **35**, 541-72.
- FURCHGOTT, R.F., VANHOUTTE, P.M. (1989). Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.*, **3**, 2007-18.
- GADDUM, J.H., PICARELLI, Z.P. (1957). Two kinds of tryptamine receptors. *Br. J. Pharmacol.*, **12**, 323-28.
- GALLIGAN, J.J., SURPRENANT, A., TONINI, M., NORTH, R.A. (1988). Differential localization of 5-HT₁ receptors in myenteric and submucosal neurons. *Am. J. Physiol.*, **255**, 603-11.
- GARCÍA, M.A. (1998). Mecanismos serotoninérgicos inhibidores de neurotransmisión simpática vascular, en ratas genéticamente hipertensas. Memoria de Grado de Salamanca. Universidad de Salamanca.
- GARLAND, C., PLANE, F., KEMP, B.K., COCKS, T.M. (1995). Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone. *Trends Pharmacol Sci.*, **16**, 23-30.

- GILLESPIE, J.S., MADAREU, A., POLLOCK, D. (1970). A method of stimulating different segments of the autonomic outflow from spinal column to various organs in the pithed cat and rat. *Br. J. Pharmacol.*, **40**, 257-67.
- GILLESPIE, J.S., MUIR, J.C. (1967). A method of stimulating complete sympathetic outflow from spinal cord to blood vessels in the pithed rats. *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, **30**, 78-87.
- GILLET, G., AMMOR, S., FILLON, G. (1985) Serotonin inhibits acetylcholine release from rat striatum slices: evidence for a presynaptic receptor-mediated effect. *J. Neurochem.*, **45**, 1687-91.
- GLUSA, E., PERTZ, H.H. (2000). Further evidence that 5-HT-induced relaxation of pig pulmonary artery is mediated by endothelial 5-HT_{2B} receptors. *Br. J. Pharmacol.*, **130**, 692-98.
- GOEDEL, 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**, 106-10.
- 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), 364-69.
- GRANSTAM, E., GRANSTAM, S.O. (2003). Involvement of nitric oxide in the regulation of regional hemodynamics in streptozotocin-diabetic rats. *Physiol. Res.*, **52**, 159-69.
- 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_{2A} receptors stimulate mitogen-activated protein kinase via H₂O₂ generation in rat renal mesangial cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **278**(4), F650-8.
- GREWAL, J.S., MUKHIN, Y.V., GARNOVSKAYA, M.N., RAYMOND, J.R., GREENE, E.L. (1999) Serotonin 5-HT_{2A} receptor induces TGF- β 1 expression in mesangial cells via ERK: proliferative and fibrotic signals. *Am J Physiol.*, **276**, F922-30.
- HAMLIN, K.E., FISCHER, F.E. (1951). The synthesis of 5-hydroxytryptamine. *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 5007-8.

- HANNON, J., HOYER, D. (2002). Serotonin receptors and systems: endless diversity? *Acta Biologica Szegediensis*, **46**(1-2), 1-12.
- 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), 319-23.
- HATTORI, Y., KAWASAKI, H., KANNO, M., FUKAO, M. (1995). Enhanced 5-HT₂ receptor mediated contractions in diabetic rat aorta: participation of Ca²⁺ channels associated with protein kinase C activity. *J Vasc Res.*, **32**(4), 220-29
- 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**, 275-86.
- HILLS, J.M., JESSEN, R.K. (1995). Transmisión: $\bar{\alpha}$ aminobutiric acid(GABA), 5-hydroxytryptamine (5-HT) and dopamine. En: *Autonomic neuroeffector mechanisms*. Eds: Burnstock, G., Holey, C.H, V. Harwood Academic Publisher GmbH., pag., 465.
- HINTON, J.M., HILL, P., JEREMY, J., GARLAND, C. (2000) Signalling pathways activated by 5-HT(1B)/5-HT(1D) receptors in native smooth muscle and primary cultures of rabbit renal artery smooth muscle cells. *J. Vasc. Res.*, **37**(6), 457-68.
- HODGSON, W.C., KING, R.G., BOURA, A.L. (1990). Augmented potentiation of renal vasoconstrictor responses by TXA₂ receptor stimulation in the alloxan diabetic rats. *J. Pharm. Pharmacol.*, **42**, 423-27.
- HODGSON, W.C., SIKORSKI, 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.
- HOYER, D., CLARKE, D.E., ROZARD, J.R., HARTIG, P.R., MARTIN, G.R., MYLECHARANE, E.J., SAXENA, P.R., HUMPHREY, P.P.A. (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), 533-54.
- 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**, 218-22.
- ICHIYANAGI, N., TSUJII, T., MASUDA, H., KIHARA, K., GOTO, M., AZUMA, H. (2002). Changed responsiveness of the detrusor in rabbits with alloxan induced hyperglycemia: possible role of 5-hydroxytryptamine on diabetic bladder dysfunction. *J. Urol.*, **168**(1), 303-7.
- IISMAA, T.P., BIDEN, T.J., SHINE, J. (1995). G-protein-coupled receptors. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag.
- IRELAND, S.J., TYRES, M.B. (1987). Pharmacological characterization of 5-hydroxytryptamine induced depolarization of the rat isolated vagus nerve. *Br. J. Pharmacol.*, **90**, 229-238.
- ISHIDA, T., KAWASHIMA, S., HIRATA, K., YOKOYAMA, M. (1998). Nitric oxide is produced via 5-HT_{1B} and 5-HT_{2B} receptor activation in human coronary artery endothelial cells. *Kobe. J. Med. Sci.*, **44**(2), 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_{1A} receptor enhances acetylcholine release in conscious rats. *J. Neurochem.*, **62**, 1804-08.
- JAHNICHEN, S., RADTKE, O.A., PERTZ, H.H. (2004). Involvement of 5-HT_{1B} receptors in triptan-induced contractile responses in guinea-pig isolated iliac artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, **370**, 54-63.
- JAMES, G.M., HODGSON, W.C. (1995a). Attenuated 5-HT₂ receptor-mediated responses in hindquarters of diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **294**, 109-15.
- 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 A₂. *Br. J. Pharmacol.*, **114**, 1236-40.

- 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), 370-76.
- JAMNICKY, B., MÜCK-SELER, D., SLIJEPCEVIC, M. (1993). Favourable effect of tryptophan/insulin treatment on serotonergic imbalance in alloxan diabetic rats. *Comp. Biochem. Physiol.*, **105A**, 267-73.
- 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), 2510-16.
- JONES, J.F.X., MARTIN, G.R., RAMAGE, A.G. (1995). Evidence that 5-HT_{1D} receptors mediate inhibition of sympathetic ganglionic transmission in anaesthetized cats. *Br. J. Pharmacol.*, **116**, 1715-17.
- JORDAN, D. (2004). Vagal Control of the Heart: Central serotonergic (5-HT) mechanisms. *Exp. Physiol.*, versión online 200402905.
- KAKOKI, M., HIRATA, Y., HAYAKAWA, H., NISHIMATSU, H., SUZUKI, Y., NAGATA, D., SUZUKI, E., KIKUCHI, K., NAGANO, T., OMATA, M. (1999). Effects of vasodilatory beta-adrenoceptor antagonists on endothelium-derived nitric oxide release in rat kidney. *Hypertension*, **33**, 467-71.
- KAM, K.L., HENDRIKS, M.G.C., PIJL, A.J., VAN MARLE, J., VAN VEEN, H.A., PFAFFENDORF, M., VAN ZWIETEN, P.A. (1996). Contractile responses to various stimuli in isolated resistance vessels from simultaneously hypertensive and streptozotocin-diabetic rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **27**, 167-75.
- KAPPELLE, A.C., BIESSELS, G., BRANVENBOER, B., VAN BUREN, T., TRABER, J., DE WILDT, D.J., GISPEN, W.H. (1994). Beneficial effect of the Ca²⁺ antagonist, nimodipine, on existing diabetic neuropathy in the BB/Wor rat. *Br. J. Pharmacol.*, **111**, 887.
- 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.

- 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**, 1083-92.
- KAUMANN, A.J., FRENKEN, M., POSIVAL, H., BROWN, A.M. (1994). Variable participation of 5-HT_{1-like} receptors and 5-HT_{2A} receptors in serotonin-induced contraction of human isolated coronary arteries. 5-HT_{1-like} receptors resemble cloned 5-HT_{1Dβ} receptors. *Circulation.*, **90**, 1141-53.
- KELLET, D.O., RAMAGE, A.D., JORDAN, D. (2004). Central 5-HT₇ receptors are critical for reflex activation of cardiac vagal drive in anaesthetised rats. *J. Physiol.*, versión online 2004.076521.
- KEREZOUDIS, N.P., NOMIKOS, G.G., OLGART., L.M., SVENSSON, T.H. (1994). Serotonin in rat oral tissues: role of 5-HT₁ receptors in sympathetic vascular control. *Eur. J. Pharmacol.*, **275**, 191-98.
- KEYNAN, S., HIRSHBERG, B., LEVIN-IAINA, N., WEXLER, I.D., DAHAN, R., REINHARTZ, E., OVADIA, H., WOLLMAN, Y., CHERNIHOVSKEY, T., IAINA, A., RAZ, I. (2000). Renal nitric oxide production during early phase of experimental diabetes mellitus. *Kidney international*, **58**, 740-47.
- KIRBY, G.C., McQUEEN, D.S. (1984). Effects of the antagonists MDL72222 and ketanserin on responses of cat carotid body chemoreceptors to 5-hydroxytryptamine. *Br. J. Pharmacol.*, **83**, 259-69.
- KNIGHT, A.R., MISRA, A., QUIRK, K., BENWELL, K., REVELL, D., KENNETT, G., BICKERDICKE, M. (2004). Pharmacological characterisation of the agonist radioligand binding site of 5-HT(2A), 5-HT(2B), and 5-HT(2C) receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **370**(2), 114-23.
- KOLTA, M.G., SOLIMAN, K.F.A., WILLIAMS, B.B. (1986). Role of 5-hydroxytryptamine in the regulation of brain neuropeptides in normal and diabetic rats. *Hormone Res.*, **23**, 112-21.
- KOMERS, R., ANDERSON, S. (2003). Paradoxes of nitric oxide in the diabetic kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.*, **284**, F1121-37.

- KWAN, C.Y., ZHANG, W.B., KWAN, T.K., SAKAI, Y. (2003). In vitro relaxation of vascular smooth muscle by atropine: involvement of K⁺ channels and endothelium. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **368**(1), 1-9.
- LAKOVIC, Z., SALKOVIC, M., KUCI, Z., RELJA, M. (1990). Effect of long-lasting diabetes mellitus on rat and human brain monoamines. *J. Neurochem.*, **54**, 143-47.
- LASSEGUE, B., CLEMPUS, R.E. (2003). Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, **285**(2), R277-97. Review.
- LEHMANN, R., SCHLEICHER, E.D. (2000). Molecular mechanism of diabetic nephropathy. *Clin. Chim. Ac.*, **297**(1-2), 135-44. Review.
- LEVY, F.O., GUDERMANN, T., PEREZ-REYES, E., BIRNBAUMER, M., KAUMANN, A.J., BIRMAUMER, L. (1992). Molecular cloning of a human serotonin receptor (S12) with a pharmacological profile resembling that of the 5-HT_{1D} subtype. *J. Biol. Chem.*, **267**, 7553-62.
- LI, X.S., TANZ, R.D., CHANG, K.S.K. (1989). Effect of age and methacholine on the rate and coronary flow of isolated hearts of diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.*, **97**, 1209-17.
- LOICHOT, C., ANJUERE, J., NISATO, D., DE JONG, W., IMBS, J.L., BARTHELMEBS, M. (2001). Renal vascular reactivity to vasopressin in rats with diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol.*, **431**, 321-9.
- LOICHOT, C., KRIEGER, J.P., DE JONG, W., HELWIG, J.J., NISATO, D., IMBS, J.L., BARTHELMEBS, M. (2002). Shear stress modulates vasopressin-induced renal vasoconstriction in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **366**, 555-561.
- LOVELL, P.J., BROMIDGE, S.M., DABBS, S., DUCKWORTH, D.M., FORBES, I.T., JENNINGS, A.J., KING, F.D., MIDDLEMISS, D.N., RAHMAN, S.K., SAUNDERS, D.V., COLLIN, L.L., HAGAN, J.J., RILEY, G.J., THOMAS, D.R. (2000). A novel, potent, and selective 5-HT(7) antagonist: (R)-3-(2-(2-(4-methylpiperidin-1-yl)ethyl)pyrrolidine-1-sulfonyl) phenol (SB-269970). *J. Med. Chem.*, **43**, 342-5.

- LOVREN, F., TRIGGLE, C. (2000). Nitric oxide and sodium nitroprusside induced relaxation of the human umbilical artery. *Br. J. Pharmacol.*, **131**(3), 521-29.
- MAKIMATTILA, S., MANTYSAARI, M., GROOP, P.H., SUMMANEN, P., VIRKAMAKI, A., SCHLENZKA, A., FAGERUDD, J., YKI-JARVINEN, H. (1997). Hyperreactivity to nitrovasodilators in forearm vasculature is related to autonomic dysfunction in insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation.*, **95**, 618-625.
- MALYSZKO, 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.
- MALYSZKO, J., MALYSZKO, J.S., BORAWSKI, J., RYDZEWSKI, A., KALINOWSKI, M., AZZADIN, A., MYSLIWIEC, M., BUCZKO, W. (1995). A study of platelet functions, some hemostatic and fibrinolytic parameters in relation to serotonin in hemodialyzed patients under erythropoietin therapy. *Thromb Res.*, **77**(2), 133-43.
- MARRE, M., BERRUT, G., BOUHANICK, B. (1993). Hypertension and diabetes mellitus. *Biomed. Pharmacother.*, **47**, 61-66.
- MARTIN, F.J., MIGUEZ, J.M., ALDEGUNDE, M., ATIENZA, G., (1995). Platelet serotonin transport is altered in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci.*, **56**(21), 1807-15.
- MARTIN, G.R., EGLIN, R.M. (1998). 5-Hydroxytryptamine receptors. En: Receptor and ion channel nomenclature supplement. *Trends Pharmacol. Sci.*
- MASSFELDER, T., TAESCH, N., ENDLICH, N., EICHINGER, A., ESCANDE, B., ENDLICH, K., BARTHELMEBS, M., HELWIG, J.J. (2001). Paradoxical actions of exogenous and endogenous parathyroid hormone-related protein on renal vascular smooth muscle cells proliferation: reversion in the SHR model of genetic hypertension. *FASEB J.*, **15**(3), 707-18
- MASSFELDER, T., TAESCH, N., FRITSCH, S., EICHINGER, A., BARTHELMEBS, M., STEWART, A.F. (2002). Type1 parathyroid hormone receptor expression level modulates renal tone and plasma rennin activity in spontaneously hypertensive rat. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **13**(3), 639-48.

- MAURA, G., FEDELE, E., RAITERI, M. (1989). Acetylcholine release from rat hippocampus slices is modulated by 5-hydroxytryptamine. *Eur. J. Pharmacol.*, **165**, 173-79.
- 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.
- Mc CANCE, D.R., HANSON, R.L., PETTITT, D.J., BENETT, P.H., HADDEN, D.R., KNOWLER, W.C. (1997). Diagnosing diabetes mellitus: do we need new criteria?. *Diabetologia.*, **40**, 247-55.
- 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**(4), 386-90.
- McGRATH, M.A. (1977). 5-HT and neurotransmitter release in canine blood vessels. *Cir. Res.*, **41**, 428-35.
- McKUNE, C.M., WATTS, S.W. (2001). Characterization of the serotonin receptor mediating contraction in the mouse thoracic aorta and signal pathway coupling. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **297**, 88-95.
- MIDDLEMISS, D.N., FOZARD, J.R. (1983). 8-hidroxy-2-(di-n-propyl-amino) tetralin discriminates between subtypes of the 5-HT₁ recognition site. *Eur. J. Pharmacol.*, **90**, 151-153.
- MILLER, K.J., KING, A., DEMCHYSHYNL, L., NIZNIK, H., TEITLER, M. (1992). Agonist activity of sumatriptan and metergolie at the human 5-HT_{1D} receptor: futher evidence for a role of 5-HT_{1D} receptor in teh action of sumantriptan. *Eur. J. Pharmacol.*, **227**, 99-102.
- MILSTIEN, S., KATUSIC, Z. (1999). Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **263**(3), 681-84.
- MINSON, J., CHALMERS, J., DROLET, G., KAPOOR, V., LLEWELLYN-SMITH, I., MILL, E., MORRIS, M., PILOWSKY, P. (1990). Central serotonergic mechanism in the cardiovascular regulation. *Cardiovasc. Drugs Ther.*, **4**, 27-32.

- 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**(1-3), 121-27.
- 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.
- MOLDERINGS, G.J., FINK, K., SCH.LICKER, E., GOTHER, M. (1987). Inhibition of noradrenaline release via presynaptic 5-HT_{1B} receptors of the rat vena cava. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **336**, 245-250.
- MONCADA, S., PALMER, R.M.J, HIGGS, E.A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, **43**, 109-142.
- MOORHOUSE, J.A., CARTER, S.A., DOUPE, J. (1966). Vascular responses in diabetic peripheral neuropathy. *Br. Med. J.*, **1**, 883-88.
- MORÁN, A., FERNANDEZ, M.M., VELASCO, C., MARTIN, M.L., SAN ROMAN, L. (1998). Characterization of prejunctional 5-HT₁ receptors that mediate the inhibition of pressor effects elicited by sympathetic stimulation in the pithed rats. *Br. J. Pharmacol.*, **123**, 1205-13.
- MORÁN, A., VELASCO, C., MARTIN, M.L., SAN ROMAN, L. (1994a). Pharmacological characterization of 5-HT receptors in parasympathetic innervation of rat heart. *Eur. J. Pharmacol.*, **252**, 161-66.
- MORÁN, A., VELASCO, C., MARTÍN, M.L., SAN ROMAN, L. (1997). Renal vasoconstrictor response to 5-hydroxytryptamine in the in situ autoperfused rat kidney: involvement of angiotensin II and the 5-HT₂ receptor activation. *Eur. J. Pharmacol.*, **330**, 205-11.
- MORÁN, A., VELASCO, C., SALVADOR, T., MARTIN, M.L., SAN ROMAN, 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.*, **252**, 161-66.

- MURRAY, J., KANEKO, J.J., RUCKER, R.B. (1983). Experimental diabetes and platelet aggregation in the rat. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **41**, 283-91.
- MUSSO, M.J., BARTHELMEBS, M., IMBS, J.L., PLANTE, M., BOLLACK, C., HELWIG, J.J. (1989). The vasodilator action of parathyroid hormone fragments on isolated perfused rat kidney. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, **340**(2), 246-51.
- NASRALLAH, R., LANDRY, A., SINGH, S., SKLEPOWICZ, M., HÉBERT, R.L. (2003). Increased expression of cyclooxygenase-1 and -2 in the diabetic rat renal medulla. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **285**, F1068-F1077.
- NEALE, R.F., FALLON, S.L., BOYAR, W.C., WASLEY, J.W.F., MARTIN, L.L., STONE, G.A., GLAESER, B.S., SINTON, C.M., WILLIAMS, M. (1987). Biochemical and pharmacological characterization of CGS-12066B, a selective serotonin-1B agonist. *Eur. J. Pharmacol.*, **136**, 1-9.
- NEBIGIL, C.G., GARNOVSKAYA, M.N., SPURNEY, R.F., RAYMOND, JR. (1995). Identification of a rat glomerular mesangial cell mitogenic 5-HT_{2A} receptor. *Am. J. Physiol.*, **268**, F122-27.
- NILSSON, T., LONGMORE, J., SHAW, D., OLESEN, I.J., EDVINSSON, L. (1999). Contractile 5-HT_{1B} receptors in human cerebral arteries: pharmacological characterization and localization with immunocytochemistry. *Br. J. Pharmacol.*, **128**, 1133-40.
- NILSSON, T., LONGMORE, J., SHAW, D., PANTEV, E., BARD, J.A., BRANCHEK, T., EDVINSSON, L. (1999b). Characterisation of 5-HT receptors in human coronary arteries by molecular and pharmacological techniques. *Eur. J. Pharmacol.*, **372**, 49-56.
- NING, Y., ZHU, J.X., CHAN, H.C. (2004). Regulation of ion transport by 5-hydroxytryptamine in rat colon. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **31**(7), 424-28.
- NITSCHKE, R., HENGER, A., RICKEN, S., GLOY, J., MULLER, V., GREGER, R., PAVENSTADT, H. (2000). Angiotensin II increases the intracellular calcium activity in podocytes of the intact glomerulus. *Kidney Int.*, **57**(1), 41-49.

- OBERHAUSER, V., SCHWERTFEGER, E., RUTZ, T., BEYERSDORF, F., RUMP, L.C. (2001). Acetylcholine release in human heart atrium. Influence of muscarinic autoreceptors, diabetes, and age. *Circulation*, **103**, 1638-43.
- 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., MARSTERS, S.A., O'DOWD, B.F., JIN, H., HAVLIK, S., PEROUTKA, S.J., ASHKENAZI, A. (1992). A single amino-acid difference confers major pharmacological variation between human and rodent 5-HT_{1B} receptors. *Nature*, **360**, 161-63.
- ORIE, N.N, ALOAMAKA, C.P. (1993). Duration-dependent variability in the responses of diabetic rat aorta to noradrenaline and 5-hydroxytryptamine. *Gen. Pharmacol.*, **24**(1), 243-46.
- 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.
- ÖZTÜRK, Y., ALTAN, V.M., YILDIZOUGLU-ARI, N. (1996). Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions. *Pharmacol. Rev.*, **48**, 69-110.
- PALMER, R.M., ASHTON, D.S., MONCADA, S. (1988a). Vascular endothelial cells synthesize NO from L-arginine. *Nature*, **333**, 664-666.
- PALMER, R.M., ASHTON, D.S., 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.
- PARKS, C.L., ROBINSON, P.S., SIBILLE, E., SHENK, T., TOTH, M. (1998). Increased anxiety of mice lacking the serotonin 1A receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 10734-39.
- PEDIGO, N.W., YAMAMURA, H.I., NELSON, D.L. (1981). Discrimination of multiple (³H)-5-hydroxytryptamine-binding sites by the neuroleptics spiperones in rat brain. *J. Neurochem.*, **36**, 220-26.

- 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), 687-99.
- PIEPER, G.M., ADAMS, M.B., ROZA, A.M. (1998). Pancreatic transplantation reverses endothelial dysfunction in experimental diabetes. *Surgery*, **123**, 89-95.
- 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. *Diabetología*, **40**, 910-15.
- PRICE JC, KELLEY DE, RYAN CM, MELTZER CC, DREVETS WC, MATHIS CA, MAZUMDAR S, REYNOLDS CF 3RD (2002) Evidence of increased serotonin-1A 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**, 193-99.
- RAMAGE, A.G., FOZARD, J.R. (1987). Evidence that the putative 5-HT_{1A} receptor agonists, 8-OH-DPAT and ipsapirone, have a central hypotensive action that differs from that clonidine in anaesthetized cats. *Eur. J. Pharmacol.*, **138**, 179-191.
- RAMAGE, A.G., MIFFLIN, S.W. (1998). Vagal-evoked excitation of a sub-population of neurones in the nucleus of the solitary tract (NTS) involves 5-HT₃ receptors in the anaesthetized rat. *J. Physiol.*, **509**, 129.
- RAMAGE, A.G., WOUTERS, W., BEVAN, P. (1988). Evidence that the novel antihypertensive agent, flesinoxan, causes differential sympathoinhibition and also increases vagal tone by a central action. *Eur. J. Pharmacol.*, **151**(3), 373-79.
- RAMBOZ, S., OOSTING, R., AMARA, D.A., KUNG, H.F., BLIER, P., MENDESJOHN, M., MANN, J.J., BRUNNER, D., HEN, R. (1998). Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 14476-81.

- RAPPORT, M.M., GREEN, A.A., PAGE, I.H. (1948). Partial purification of the vasoconstrictor in beef serum. *J. Biol. Chem.*, **174**, 735-41.
- RAPTIS, A.E., VIBERTI, G., (2001). Pathogenesis of diabetic nephropathy. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.*, **109**(2), S424-37. Review.
- REES, D.D., PALMER, R.M., SCHULZ, R., HODSON, H.F., MONCADA, S. (1990). Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br. J. Pharmacol.*, **101**(3):746-52.
- ROMAN, R.J., KAUKER, M.L., (1978). Renal effect of prostaglandin synthetase inhibition in rats: Micropuncture studies. *Am. J. Physiol.*, **235**, F111-F118.
- ROQUEBERT, J., MORAN, A., DEMICHEL, P., SAUVAGE, M.F. (1991). Pharmacological characterization of dopamine receptors in parasympathetic innervation of rat heart. *Eur. J. Pharmacol.*, **200**, 59-63.
- SÁNCHEZ-LÓPEZ, 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-HT₁ and putative 5-HT_{5A/5B} receptors. *B. J. Pharmacol.*, **140**, 725-35.
- SAND, A.E., ANDERSSON, E., FRIED, G. (2002). Effects of nitric oxide donors and inhibitors of nitric oxide signalling on endothelin- and serotonin-induced contractions in human placental arteries. *Acta Physiol. Scand.*, **174**(3): 217-23.
- SANDRINI, M., VITALE, G., VERGONI, A.V., OTTANI, A., BERTOLINI, A. (1997). Streptozotocin-induced diabetes provokes changes in serotonin concentration and on 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors in the rat brain. *Life Sci.*, **60**, 1393-97.
- 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), 267-68.

- 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., VILLALON, C.M. (1991). 5-hydroxytryptamine, a chameleon in the heart. *Trends Pharmacol. Sci.*, **12**, 223-27.
- SCHMIDT, H.H., WARNER, T.D., ISHII, K., SHENG, H., MURAD, F. (1992). Insulin secretion from pancreatic β cells caused by L-arginine-derived nitrogen oxides. *Science*, **255**, 721-723.
- SCHMIDT-BARTHELMEBS, M., IMBS, J.L. (1981). Rein de rat isolé et perfusé. Fiche technique. *J. Pharmacol., (Paris)*, **12**, 103-09.
- SCHMUCK, K., ULLMER, C., KALKMAN, H.O., PROBST, A., LÜBBERT H. (1996). Activation of meningeal 5-HT_{2B} receptors: an early step in the generation of migraine headache? *Eur. J. Neurosci.*, **8**, 959-67.
- SCHOEFFTER, P., HOYER, D. (1990). 5-hydroxytryptamine (5-HT) induced endothelium dependent relaxation of pig coronary arteries is mediated by 5-HT receptors similar to the 5-HT_{1D} receptor subtype. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **252**, 387-395.
- SCHOEFFTER, P., PFEILSCHIFTER, J., BOBIRNAC, I. (1995). 5-Hydroxytryptamine 5-HT_{1B} 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-HT₇ receptors in human vascular smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.*, **117**, 993-4.
- SHAW, A.M., BROWN, J.I., BUNTON, D.C., MACDONALD, A. (2000). Role of the 5-HT_{2A} receptor and α_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**, 277-85.
- SHIMIZU, K., MURAMATSU, M., KAKEGAWA, Y., ASANO, H., TOKI, Y., MIYAZAKY, Y., OKUMURA, K., HASHIMOTO, H., ITO, T. (1993). Role of prostaglandin H₂ as an endothelial-derived contracting factor in diabetic state. *Diabetes*, **42**, 1246-52.

- 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**, 237-44.
- SIKORSKI, B.W., HODGSON, W.C., KING, R.G. (1993). Effect of haemoglobin and N-nitro-L-arginine on constrictor and dilator response of aortic rings from streptozotocin diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **242**, 275-82.
- SKINNER, M.R., RAMAGE, A.G., JORDAN, D. (2002). Modulation of reflexly evoked vagal bradycardias by central-5-HT_{1A} receptors in anaesthetized rabbits. *Br. J. Pharmacol.*, **137**(6), 861-73.
- SOBREVIA, L., MANN, G.E. (1997). Dysfunction of the endothelial nitric oxide signalling pathway in diabetes and hyperglycaemia. *Exp. Physiol.*, **82**, 423-52.
- SPORTON, S.C.E., SHEPHEARD, S.L., JORDAN, J., RAMAGE, A.G. (1991). Microinjections of 5-HT_{1A} agonist into the dorsal motor vagal nucleus produce bradycardia in the atenolol-pretreated anaesthetized rat. *Br. J. Pharmacol.*, **104**(2), 466-470.
- STEPHAN, D., BARTHELMEBS, M., KRIEGER, J.P., DECKER, N., ROCHAT, C., IMBS, J.L. (1990). Effect of tertatolol and of its metabolites and structural analogues in isolated perfused rat kidney vasculature. *J Cardiovasc Pharmacol.*, **16**, 338-46.
- STEPHAN, D., BILLING, A., KRIEGER, J.P., GRIMA, M., FABRE, M., HOFNER, M., IMBS, J.L., BARTHELMEBS, M. (1995). Endothelium-dependent relaxation in the isolated rat kidney : impairment by cyclosporine A. *J Cardiovasc. Pharmacol.*, **26**, 859-68.
- SUGIMOTO, H., SHIKATA, K., MATSUDA, M., KUSHIRO, M., HAYASHI, Y., HIRAGUSHI, K., WADA, J., MAKINO, H. (1998). Increased expresión of endotelial cell nitric oxide synthase (ec NOS), in afferent and glomerular endothelial cells is involved in glomerular hyperfiltration of idabetic nephropathy. *Diabetologia*, **41**, 1426-34.
- SUMIYOSHI, T., ICHIKAWA, J., MELTZER, H.Y. (1997). The effect of streptozotocin-induced diabetes on dopamine₂, serotonin_{1A} and serotonin_{2A} receptors in the rat brain. *Neuropsychopharmacology*, **16**(3), 183-90.

- SZKUDELSKI, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res.*, **50**, 537-46.
- TAKAHASHI, T., HISA, H., SATOH, S. (1992). Serotonin induced vasoconstriction in dog kidney. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **20**(5), 779-84.p
- TAKAHASHI, T., YANO, M., MINAMI, J., HARAGUCHI, T., KOGA, N., HIGASHI, K., KOBORI, S. (2002). Sarpogrelate hydrochloride, a serotonin_{2A} receptor antagonist, reduces albuminuria in diabetic patients with early-stage diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract.*, **58**, 123-9.
- TAKEDA, Y., MIYAMORI, Y., YONEDA, TAKEDA, R. (1991). Production of endothelin-1 from the mesenteric arteries of streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci.*, **48**, 2553-56.
- TAKIGUCHI, Y., SATOH, H., HASHIMOTO, NAKASHIMA, M. (1998). Changes in vascular reactivity in experimental diabetic rats: comparison with hypothyroid rats. *Blood vessels*, **25**, 250-60.
- TAMMESILD, P.J., HODGSON, W.C, KING, R.G. (1992). Increased sensitivity to endothelin-1 in isolated Krebs'-perfused kidneys of streptozotocin-diabetic rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **19**(4), 261-5.
- TERRON, J.A., FALCON-NERI, A. (1999). Pharmacological evidence for the 5-HT₇ receptor mediating smooth muscle relaxation in canine cerebral arteries. *Br J Pharmacol.*, **127**, 609-16.
- TESFAMARIAM, B. (1994). Free radical in diabetic endothelial cell dysfunction. *Free Radic. Biol. Med.*, **16**(3), 383-391.
- TESFAMARIAM, B., JAKUBOWSKI, J.A., COHEN, R.A. (1989). Contraction of diabetic rabbit aorta caused by endothelium-derived PGH₂-TXA₂. *Am. J. Physiol.*, **257**, H1327-H1333.
- 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.
- TOLINS, J.P., SHULTZ, P.J., RAIJ, L., BROWN, D.M., MAUER, S.M. (1993). Abnormal renal haemodynamic response to reduced renal perfusion pressure in diabetic rats: role of the NO. *Am. J. Physiol.*, **265**, F886-95.
- TONG, Y.C, CHENG, J.T., WAN, W.C. (2002). Effects of Ba-Wei-Die-Huang-Wang on the cholinergic function and protein expression of M₂ muscarinic receptor of the urinary bladder in diabetic rats. *Neuroscience Letters*, **330**, 21-4.
- TONG, Y.C, CHIN, W.T., CHENG, J.T. (1999). Alterations in urinary bladder M₂-muscarinic receptor protein and mRNA in 2-week streptozotocin-induced diabetic rats. *Neuroscience Letters*, **277**, 173-6.
- 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. Pharmacol.*, **107**(1), 5-7.
- TONINI, M., RIZZI, C.A., MANZO, L., ONORI, L. (1991). Novel enteric 5-HT₄ receptors and gastrointestinal prokinetic action. *Pharmacol. Res.*, **24**, 5-14.
- TOUSOULIS, D., TENTOLOURIS, C., CRAKE, T., KATSIMAGLIS, G., STEFANADIS, C., TOUTOUZAS, P., DAVIES, G.J. (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.
- 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.
- 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), 157-61.

- ULLMER, C., BODDEKE, H.G., SCHMUCK, K., LUBBERT, H. (1996). 5-HT_{2B} receptor-mediated calcium release from ryanodine-sensitive intracellular stores in human pulmonary artery endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.*, **117**, 1081-8.
- ULLMER, C., SCHMUCK, K., KALKMAN, H.O., LUBBERT, H. (1995). Expression of serotonin receptor mRNAs in blood vessels. *FEBS Lett.*, **370**, 215-21.
- VADLAMUDI, R.V.S.V., McNEILL, J.H. (1983). Effect of alloxan- and streptozotol-induced diabetes on isolated rat heart responsiveness to carbachol. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **225**, 410-5.
- VAN BUREN, T., KASBERGEN, C.M., GISPEN, W.H., DE WILDT, D.J. (1996). Presynaptic deficit of sympathetic nerves: a cause for disturbed sciatic nerve blood flow responsiveness in diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **296**, 277-83.
- 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), 1004-10.
- VAN NUETEN, J.M., JANSENS, 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.M., JANSENS, W.J., VANHOUTTE, P.M. (1985b). Serotonin and vascular reactivity. *Pharmacol. Res. Commun.*, **17**, 585-608.
- VANHOUTTE, P.M. (1983). 5-Hydroxytryptamine and vascular disease. *Federation Proc.*, **42**, 233-37.
- VANHOUTTE, P.M. (1985). Can peripheral serotonergic blockade explain the hypotensive effect of ketanserin? *J. Cardiovas. Pharmacol.*, **7** (7), S105-S109.
- VANHOUTTE, P.M. (1987a). Endothelium dependent contractions in arteries and veins. *Blood Vessels*, **24**, 141-44.
- 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**(1-3), 271-77.
- VANHOUTTE, P.M., VERBEREUN, T.J., WEBB, R.C. (1981). Local modulation of the adrenergic neuroeffector interaction in the blood vessel wall. *Physiol. Rev.*, **61**, 151-247.
- VEELKEN, R., HILGERS, K.F., HARTNER, A., HAAS, A., BOHMER, KP., STERZEL, R.B. (2000). Nitric oxide synthase isoforms and glomerular hyperfiltration in early diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **11**(1), 71-79.
- VERBEUREN, T.J., ZONNEKEYN, L.L., PROST, J.F., ROCHAT, C., THOMAS, J.R., HERMAN, A.G. (1988). The beta adrenoceptor blocker tertatolol causes vasodilatation in the isolated perfused vasoconstricted rat kidney. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **246**, 628-34.
- VERBEUREN, T.J. (1993). Vasodilator effect of tertatolol in isolated perfused rat kidney: involvement of endothelial 5-HT_{1A} receptors. *Cardiology*, **83**(1), 5-9.
- VERBEUREN, T.J., MENNECIER, P., LAUBIE, M. (1991). 5-Hydroxytryptamine-induced vasodilatation in the isolated perfused rat kidney : are endothelial 5-HT_{1A} receptors involved ?. *Eur. J. Pharmacol.*, **201**, 17-27.
- VERHEGGEN, R., HUNDESHAGEN, A.G., BROWIN, A.M., SCHINDLER, M., KAUMANN, A.J. (1998). 5-HT_{1B} receptor-mediated contractions in human temporal artery: evidence from selective antagonists and 5-HT receptor mRNA expression. *Br. J. Pharmacol.*, **117**, 283-89.
- 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., FERNÁNDEZ, M.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), 1839-48.
- VILLALÓN, C.M., CENTURIÓN, D., RABELO, G., DE VRIES, P., SAXENA, P.R., SÁNCHEZ-LÓPEZ, A. (1998). The 5-HT_{1like} receptors mediating inhibition of sympathetic vasopressor

- outflow in the pithed rat: operational correlation with the 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} subtypes. *Br. J. Pharmacol.*, **124** (5), 1001-1011.
- VILLALON, C.M., CONTRERAS, J., RAMIREZ-SANZ JUAN, E., CASTILLO, C., PERUSQUIE, M., LOPEZ-MUÑOZ, F.J., TERRON, J.A. (1995a). 5-hydroxytryptamine inhibits pressor responses to preganglionic sympathetic nerve stimulation in pithed rats. *Life Sci.*, **57**, 803-12.
- VILLALON, C.M., TERRON, 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**, 441-47.
- WALD, M.R., BORDA, E.S., STERIN-BORDA, L. (1998). Participation of nitric oxide and cyclic GMP in the supersensitivity of acute diabetic rat myocardium by cholinergic stimuli. *Biochem. Pharmacol.*, **55**, 1991-9.
- WATANABE, S., YASHIRO, Y., MIZUNO, R., OHHASHI, T. (2005). Involvement of the NO and EDHF in flor-induced vasodilatation in isolated hamster cremasteric arteriales. *J. Vasc. Res.*, **42**(2), 137-47.
- 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**, 165-72.
- 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_{1D α} and 5-HT_{1D β} . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 3630-34.
- WHITE, R.E., CARRIER, G.O., (1990). Vascular contraction induced by activation of membrane calcium ion channels is enhanced in streptozotocin diabetes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **253**, 1057-1062.
- WILKINSON, L.O., MIDDLEMISS, D.N., HUTSON, P.H.P. (1994). 5-HT_{1A} receptor activation increases hippocampal acetylcholine efflux and motor activity in the guinea pig: agonist efficacy influences functional activity in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **270**, 656-64.

- WINTERSTEINER, O., VIGNEAUD, V. DU AND JENSEN, H. (1928). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **32**, 397-411.
- WONG, K.K. (1994). Cardiac response to autonomic drugs in atria of diabetic mouse. *J. Pharm. Pharmacol.*, **46**, 513-4.
- WURCH, T., COLPAERT, F.C., PAUWELS, P.J. (1998). Chimeric receptor analysis of the ketanserin binding site in the human 5-Hydroxytryptamine_{1D} receptor: importance of the second extracellular loop and fifth transmembrane domain in antagonist binding. *Mol. Pharmacol.*, **54**, 1088-96
- XAVIER, F.E., DAVEL, A.P.C., ROSSONI, L.V., VASSALLO, D.V. (2003). Time-dependent hyperreactivity to fenilefrine in aorta from untreated diabetic rats: role of prostanoids and calcium mobilization. *Vasc. Pharmacol.*, **40**, 67-76.
- YOSHIOKA, M., IKEDA, T., ABE, M., TOGASHI, H., MINAMI, M., SAITO, H. (1992). Pharmacological characterization of 5-hydroxytryptamine-induced excitation of afferent cervical vagus nerve in anaesthetized rats. *Br. J. Pharmacol.*, **106**, 544-9.
- ZUKOWSKA-GROJEC, Z., BAYORH, M.A., KOPIŃI. (1983). Effect of desipramine on the effects of α -adrenoceptors inhibitors on pressor responses and release of norepinephrine into plasma of pithed rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **5**, 297-301.

UNIVERSITE LOUIS PASTEUR, Strasbourg, France
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA, España

Laboratoire de Physiologie et Pharmacologie Rénovasculaires (EMI, INSERM 0015)
Laboratorio de Farmacognosia y Farmacología ; Dpto. Fisiología y Farmacología

THESE EN COTUTELLE

présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR DE STRASBOURG ET DOCTOR EN FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Discipline: **Sciences du Vivant**
Domaine: **Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie**

Par

Mónica GARCIA DOMINGO
(DEA par l'Université de Salamanca)

INFLUENCE DU DIABETE SUCRE EXPERIMENTAL SUR LA REPONSE CARDIOVASCULAIRE ET RENALE A LA SEROTONINE

SOUTENUE LE 18 MARS 2005 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN :

Pour l'Université Louis Pasteur

V. SCHINI-KERTH	Rapporteur interne
J.M. LOPEZ-NOVOA	Rapporteur externe
J.P. DE LA CRUZ CORTES	Rapporteur externe
M. BARTHELMEBS	Directeur de thèse
L. SAN ROMÁN	Directeur de thèse

Pour l'Universidad de Salamanca

J.M. LOPEZ-NOVOA	Presidente
J.P. DE LA CRUZ CORTES	1 ^{er} Vocal
V. SCHINI-KERTH	2 ^{er} Vocal
C. VELASCO	3 ^{er} Vocal
M.A. SEVILLA	Secretario

DIRECTEURS DE THESE:

M. BARTHELMEBS, A. MORAN, M.L. MARTIN, L. SAN ROMAN

----- *Table de Matières* -----

INTRODUCTION	3
I.- 5-Hydroxytryptamine	3
1.- Son histoire	3
1.- Localisation, synthèse et dégradation	4
3.- Récepteurs sérotonergiques et mécanismes d'action	5
4.- Actions pharmacologiques associées aux récepteurs 5-HT	7
5.- Interaction système sérotonergique-adrénergique-cholinergique	9
6.- Récepteurs sérotonergiques-cardiovasculaire	11
II.- Le Diabète	14
1.- Pancréas et insuline	16
2.- Complications du diabète sucré	17
III.- Serotonine, diabète et système cardiovasculaire	21
OBJECTIFS	27
MATERIEL ET MÉTHODES	35
I.- Induction du diabète sucré expérimental	35
II.- Rat déméduillé	35
1.- Stimulation sympathique	35
2.- Stimulation cholinergique	36
III.- Rein isolé perfusé de rat	36
IV.- Expressions des mRNA des récepteurs sérotoninergiques	37
V.- Fonctions rénales	40
RÉSULTATS	43
I.- Induction du diabète sucré	43
II.-Sérotonine et stimulation sympathique chez le rat	
hyperglycémique et normoglycémique	43

1.- Récepteurs impliqués	43
2.- Modulation de ces réponses par des médiateurs cellulaires	44
III.- Sérotonine et stimulation parasympathique chez le rat	
hyperglycémique	45
1.- Récepteurs impliqués	45
IV.- Récepteurs 5-HT et reactivité vasculaire chez le rat	
normal et diabétique	46
V.- Expression vasculaire des récepteurs 5-HT dans la diabète sucré	49
DISCUSSION	53
CONCLUSION	79

----- *Introduction* -----

I.- 5-HYDROXYTRYPTAMINE (5-HT)

1.- La 5-hydroxytryptamine et son histoire

La 5-hydroxytryptamine (Figure 1) est un neurotransmetteur et une hormone présente dans beaucoup d'espèces, y compris chez l'homme. Elle joue un rôle important dans une grande variété de fonctions physiologiques comme la douleur, l'appétit, l'émotion, le sexe, le sommeil, la mémoire et tous les processus pathologiques associés.

Ce fut au début du siècle passé que Brodie (1900) a décrit comment l'injection de sérum sanguin induisait une vasoconstriction et un réflexe vagal (bradycardie et hypotension) réversibles ainsi qu'un arrêt de la respiration qui ne se reproduisaient pas si on injectait du plasma. La 5-HT n'a cependant pas été isolée du sang et caractérisée avant 1948 par Rapport *et al.* Le nom qui lui fut donné alors rappelait son action vasculaire originale (séro = sérum et tonin = vasoconstriction).

La sérotonine a été synthétisée par Hamlin et Fischer en 1951, puis a été reconnue comme un neurotransmetteur actif au niveau du système nerveux central (SNC) (Twarog *et al.*, 1953). Bien que moins de 5% de la quantité totale de sérotonine soit localisée dans le SNC, c'est un facteur très important pour le bon fonctionnement du cerveau. L'observation presque simultanée que la drogue psychédélique diéthylamide de l'acide lysergique (LSD) antagonise une réponse produite par la 5-HT, même si la réponse était une contraction du muscle lisse gastro-intestinal, a confirmé l'idée que la 5-HT était un produit de notre cerveau et qu'elle exerce d'importants effets comportementaux.

De la même manière, une autre substance endogène a été isolée des cellules entéro-chromaffines de la muqueuse intestinale, et nommée entéramine (Erspamer et Asero, 1952). L'entéramine induisait essentiellement une contraction du muscle lisse. Rapidement, il s'avéra que l'entéramine et la sérotonine étaient chimiquement et pharmacologiquement similaires (Erspamer, 1954).

2.- Localisation, synthèse et dégradation de 5-HT

Elle est largement distribuée dans le règne animal et végétal. Chez les mammifères, elle se trouve notamment dans les cellules entérochromaffines du tractus gastro-intestinal, dans les plaquettes, la paroi des vaisseaux sanguins, le poumon, le cœur et dans le SNC.

Sa synthèse est réalisée à 95% au niveau périphérique, au niveau intestinal, où la 5-HT est produite à partir du L-tryptophane (Figure 2); celui-ci est apporté par l'alimentation, stocké dans les cellules entérochromaffines et y subit une hydroxylation par la tryptophane-hydroxylase. La synthèse de 5-HT dépend donc directement de la quantité de tryptophane disponible et de différents facteurs contrôlant l'activité de l'hydroxylase (Hills et Jessen, 1995). La combinaison du groupe OH en position 5 du noyau indole et d'une amine primaire font de la 5-HT un accepteur de proton à pH physiologique. Le caractère hydrophile de la 5-HT ne lui permet pas de passer la barrière hémato-encéphalique, de sorte que la 5-HT active au niveau central dépend d'une synthèse locale, favorisée par le transport facilité du L-tryptophane du sang vers le cerveau. La 5-HT est localisée principalement dans le SNC au niveau des noyaux du raphé, de l'épiphyse et d'autres neurones.

La 5-HT peut être libérée dans la lumière intestinale par des stimuli nerveux ou alimentaires et interagir avec des récepteurs localisés dans le muscle lisse intestinal. Elle peut aussi se déverser dans la circulation porte. Enfin, elle a été localisée dans des neurones entériques. Dans le sang, la plupart de la 5-HT n'est pas circulante mais stockée dans les plaquettes par un mécanisme de transport actif, puisque celles-ci ne sont pas capables de la synthétiser. Pendant l'agrégation plaquettaire, la 5-HT est libérée en grandes quantités et agit, localement, dans les cellules endothéliales et les cellules du muscle lisse vasculaire. Nous pouvons aussi la trouver dans les mastocytes. Dans le système nerveux, tant central que périphérique, elle agit comme un neurotransmetteur et interagit avec une grande variété de récepteurs pré- ou post-synaptiques. Dans l'épiphyse, elle est le principal précurseur de la synthèse de mélatonine. Sa dégradation se produit principalement par les mono-amine-oxydases (MAO).

3.- Récepteurs sérotonergiques et mécanismes d'action

La classification et la nomenclature des récepteurs sérotonergiques a beaucoup évolué au cours des dernières années, en réponse à une meilleure connaissance sur leur structure et leur fonction au niveau moléculaire.

Dès la fin des années 50, Gaddum et Picarelli ont proposé l'existence de plusieurs types de récepteurs pour la 5-HT. Les récepteurs impliqués dans les effets de la 5-HT sur le muscle lisse de l'iléon de cobaye, ont été nommés **5-HT-D** (musculotropes), et ceux localisés dans les ganglions parasympathiques et contrôlant la libération d'acétylcholine dans des terminaisons nerveuses post-synaptiques **5-HT-M** (neurotropes).

L'introduction en 1979 par Peroutka et Snyder des techniques de liaison spécifique avec des radioligands a permis la discrimination nette entre deux types de récepteurs (**5-HT₁** et **5-HT₂**) dans un homogénat de cerveau, selon la liaison préférentielle de [³H]-5-HT ou de [³H]-spipéronne respectivement. En 1986, Bradley *et al.*, ont proposé une classification en trois différents sous-types de récepteurs pour la 5-HT: **5-HT_{1-like}**, avec une grande affinité par la 5-carboxamidotryptamine (5-CT) et fixant la [³H]-5-HT; **5-HT₂**, identique au 5-HT-D précédent et avec une grande affinité pour la kétansérine; **5-HT₃**, identique au 5-HT-M précédent et associé à un canal ionique.

Toutefois, les outils de la biologie moléculaire combinés aux techniques biochimiques et fonctionnelles de la dernière décennie ont conduit à proposer une classification des récepteurs basée sur leur composition en amino-acides, les seconds messagers mis en jeu, ainsi que leurs caractéristiques fonctionnelles. De nouveaux récepteurs ont été identifiés et parfois nommés de manière différente selon les laboratoires, comme pour le récepteur 5-HT_{1B} (aussi connu comme 5-HT_{1Dβ} ou S12) (Levy *et al.*, 1992; Weinshank *et al.*, 1992).

Afin d'éviter toute ambiguïté, le Comité de Nomenclature pour le récepteur 5-HT de l'Union Internationale de Pharmacologie (NC-IUPHAR) a proposé une classification des récepteurs 5-HT (Hoyer *et al.*, 1994) basée sur des critères structurels (structure moléculaire), opérationnels (agonistes) et transductionnelles (mécanisme de

transduction intracellulaire). Cette classification comporte sept classes de récepteurs de la sérotonine: 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃ (bien caractérisés), 5-HT₄ (non clonés), 5-ht₅, 5-ht₆ et 5-HT₇ (clonés, mais dont les caractéristiques opérationnelles et transductionnelles ne sont pas connues). Cette classification (Hoyer *et al.*, 1994) fait toujours autorité et intègre les nouveaux venus: un récepteur sera nommé avec des lettres majuscules quand ses caractéristiques structurales et opérationnelles sont bien définies et qu'il est reconnu comme récepteur endogène; les récepteurs ne remplissant pas ces critères seront nommés avec des lettres minuscules.

Tous les récepteurs 5-HT, à l'exception des récepteurs 5-HT₃ (liés à des canaux ioniques) sont des membres de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs), des protéines membranaires qui interagissent avec une grande variété d'hormones et de neuro-transmetteur (Iismaa *et al.*, 1995). Tous ces GPCRs possèdent sept domaines transmembranaires, une extrémité N-terminale extracellulaire et une extrémité C-terminale intracellulaire qui comporte des sites de phosphorylation. Les sites de reconnaissance des agonistes et antagonistes sont situés généralement dans les régions transmembranaires de la protéine, comme le montrent les études de mutagenèse et les récepteurs chimériques (Adham *et al.*, 1994; Oksenberg *et al.*, 1992; Wurch *et al.*, 1998). Les GPCRs jouent un rôle fondamental dans la régulation des réponses physiologiques et dans les effets de près de 80% de tous les neurotransmetteurs et hormones (Birnbaumer *et al.*, 1990).

La Figure 4 présente une représentation schématique de la classification actuelle des récepteurs 5-HT. Les récepteurs représentés en minuscule n'ont pas une fonction physiologique déterminée (Hanon et Hoyer, 2002). Les récepteurs 5-HT activent l'adénylate cyclase (formation d'adénosine monophosphate cyclique ou AMPc), la phospholipase C (production inositol triphosphate (IP₃) et augmentation du calcium intracellulaire), ou un canal ionique (comme par exemple le canal potassique). Tous ces systèmes effecteurs sont présents dans toutes les cellules. Un récepteur 5-HT couplé à l'adénylate cyclase est représenté schématiquement sur les Figures 5 et 6. Un récepteur canal ionique est représenté sur la Figure 7. Les classifications des différents récepteurs 5-HT en sous-types au sein des diverses familles de récepteurs sont précisées dans le tableau 1 (récepteurs 5-HT₁), tableau 2 (récepteurs 5-HT₂), tableau 3 (récepteurs 5-HT₃

et 5-HT₄) et tableau 4 (récepteurs 5-HT₅, 5-HT₆ et 5-HT₇). Y sont également résumées leurs principales localisations dans le SNC ou en périphérie et leurs fonctions, ainsi que les outils pharmacologiques (agonistes et antagonistes) spécifiques, les voies de transduction et la localisation chromosomique de leur gène.

4.- Actions pharmacologiques associées aux récepteurs 5-HT

Suite à sa vaste distribution dans tout l'organisme, la 5-HT est impliquée dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques. Ainsi, la 5-HT remplit une fonction de premier ordre dans la régulation de la motilité gastro-intestinale, dans les processus d'agrégation plaquettaire parce qu'elle est stockée et sécrétée par les plaquettes, et dans le SNC où, en tant que neurotransmetteur, elle influence de manière directe ou indirecte presque la totalité des fonctions cérébrales. A ces effets s'ajoutent une régulation des fonctions endocriniennes (contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire), du sommeil (la 5-HT est principalement impliquée dans les phases III et IV), de l'appétit, du comportement sexuel, de la température corporelle, de l'anxiété, ainsi que des processus maniaco-dépressifs:

- Le cycle sommeil-vigilance: le contrôle de ce cycle est une des premières actions qui ait été identifiée pour la 5-HT. On sait que ce rythme dépend de la balance adrénergique/sérotonergique et que, par exemple, l'administration de ritansérine (antagoniste 5-HT₂) augmente les phases de sommeil à ondes lentes.
- Agressivité et impulsivité: chez l'homme, il existe une corrélation entre les taux de 5-HIAA (métabolite de la dégradation de 5-HT) dans le liquide céphalorachidien et les comportements impulsifs ou agressifs (Brown et Linnoila, 1990). Les souris délétées («knockout» ou KO) en récepteur 5-HT_{1B} développent une agressivité extrême. Une mutation sur le gène codant pour la MAO-A est associée chez l'homme à un retard mental et une agressivité (Brunner *et al.*, 1993), un profil confirmé ultérieurement chez le rongeur (Maries *et al.*, 1995). Ces données démontrent que des

anomalies du système sérotonergique sont associés à des comportements agressifs.

- Anxiété et dépression: les médicaments efficaces contre la dépression sont pour la plupart des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la 5-HT (SRII). Une action directe de la 5-HT sur les récepteurs 5-HT_{1A} semble également impliquée, comme le démontrent les souris KO pour ce récepteur (Parks *et al.*, 1998; Ramboz *et al.*, 1998).
- Appétit: la 5-HT est le principal médiateur inhibiteur du noyau hypothalamique ventro-latéral qui régule la faim et la satiété. Une hyperactivité sérotonergique conduit à l'anorexie et inversement, une hypoactivité mène au surpoids.
- Température, fonctions endocrines (sécrétion ACTH, hormones gonadotropes, hormone de croissance, prolactine; 5-HT₁, 5-HT₂), douleur (5-HT₁), réflexe postural (5-HT₁, 5-HT₂), contrôle central du vomissement (5-HT₃), etc.

Au niveau périphérique, la 5-HT est impliquée dans l'activité de divers organes et systèmes, comme l'appareil respiratoire (bronchoconstriction), le système gastro-intestinal (tant dans la paroi de l'estomac que de l'intestin, contraction et relaxation), l'agrégation plaquettaire et hémostasie (l'agrégabilité des plaquettes est majorée dans le diabète), la libération de neurotransmetteurs et la stimulation des terminaisons nerveuses sensibles:

- Dans des cellules entérochromaffines: la 5-HT est libérée par l'étirement mécanique causé par les aliments ou par la stimulation vagale efférente. Dans la paroi gastro-intestinale, elle produit une relaxation comme une contraction, par la stimulation directe des récepteurs 5-HT₂, et l'activation de récepteurs sur les terminaisons nerveuses du muscle lisse intestinal et oesophagien (5-HT₄) ou ganglionnaires (5-HT₃). Dans le carcinome à cellules entérochromaffines, la libération de grandes quantités de 5-HT est

responsable des problèmes cardiovasculaires (spasme coronaire, fibrose cardiaque, hypotension) associés à cette maladie.

- Agrégation plaquettaire: comme il a déjà été mentionné précédemment, la 5-HT n'est pas synthétisée dans les plaquettes, mais est recueillie par celles-ci et est stocké dans des granules. Sa fonction dans l'agrégation plaquettaire est résumée dans la Figure 8.

5.- Interaction du système sérotonergique avec le système adrénérgique et cholinérgique

L'interaction de la sérotonine avec d'autres neurotransmetteurs (acétylcholine, adrénaline, noradrénaline, dopamine), tant au niveau central que périphérique, a été très étudiée au cours des dernières années. Il ressort que la distribution des neurones sérotonérgiques dans le SNC est très similaire à celle des neurones noradrénérgiques dont la 5-HT régule souvent l'activité. Plusieurs types de récepteurs 5-HT sont présents sur les terminaisons nerveuses adrénérgiques périphériques dans différents tissus et diverses espèces. La présence de ces récepteurs peut avoir un effet facilitateur ou inhibiteur sur l'activité neuronale (Humphrey *et al.*, 1983).

Une interaction au niveau neuronal entre le système cholinérgique et sérotonérgique a été impliquée dans des désordres affectifs (Dilsaver, 1986). La 5-HT est liée à la libération d'acétylcholine en différents endroits du cerveau: le striatum (Gillet *et al.*, 1985), le cortex (Bianchi *et al.*, 1990), l'hippocampus (Maura *et al.*, 1989) où les études de microdialyse *in vivo* démontrent que la libération d'acétylcholine est contrôlée en partie *via* les récepteurs 5-HT_{1A} (Izumi *et al.*, 1994; Wilkinson *et al.*, 1994).

Au niveau cardiaque, l'activation des récepteurs 5-HT₃ stimule le nerf vague et provoque une hypotension et une bradycardie (réflexe de Bezold-Jarish). Chez le rat déméduillé, l'analyse des mécanismes sérotonérgiques modulant la neurotransmission cholinérgique cardiaque montrent une potentialisation et une inhibition, respectivement par les récepteur 5-HT₃ et 5-HT₂ (Morán *et al.*, 1993).

Dans le poumon, la 5-HT induit autant une constriction qu'une relaxation des voies aériennes du porc, principalement en facilitant la neurotransmission cholinergique (action présynaptique), mais aussi en agissant directement sur le muscle lisse (Cazzola *et al.*, 1995). Les différents récepteurs 5-HT impliqués dans ces effets sont détaillés sur la Figure 9 (Cazzola et Matera, 2000)

En 1977, Mc Grath a montré que de petites doses de 5-HT inhibent la libération de [³H]-noradrénaline induite par la stimulation électrique de la veine saphène du chien. Depuis, de nombreuses études ont établi l'existence d'une interaction entre le système adrénergique et sérotonergique au niveau central (Pedigo *et al.*, 1981; Allgaier *et al.*, 1995) et périphérique (Saxena et Villalon, 1991; Morán *et al.*, 1994 et 1998; Jones *et al.*, 1995; Fernández *et al.*, 2000). Au niveau pulmonaire, les récepteurs α 1-adrénergiques participent à la contraction induite par la 5-HT (Ogawa *et al.*, 1995) et, au niveau gingival, la sérotonine modifie les niveaux de vasoconstriction produits par le système adrénergique (Kerezoudis *et al.*, 1994). Le système sérotonergique joue d'ailleurs un rôle fondamental dans l'inhibition du tonus sympathique après un choc hémorragique, et le methysergide (antagoniste 5-HT₁/5-HT₂) bloque cette phase de la réponse au choc (Evans *et al.*, 1992).

Au niveau du coeur, la sérotonine favorise la libération de NA par la stimulation de récepteurs 5-HT_{1A}, et par conséquent exerce des effets inotropes et chronotropes positifs. Elle peut en outre produire une bradycardie accompagnée d'une hypotension par réponse réflexe vagale. Chez les rats déméduillés, la sérotonine induit une inhibition présynaptique de la transmission sympathique (Demeurent *et al.*, 1994; Villalón *et al.*, 1995), notamment *via* les récepteurs 5-HT₁, en particulier les 5-HT_{1D} (Demeurent *et al.*, 1998), ou les récepteurs 5-HT₁ et 5-HT_{5A/5B} (Sanchez-López *et al.*, 2003). D'autres récepteurs clairement ne sont pas impliqués dans cette inhibition sympathique sérotonergique cardiaque (5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₆, 5-HT₇). Le récepteur 5-HT₃ semble même au contraire être impliqué dans une augmentation de la libération d'adrénaline (Demeurent *et al.*, 1994).

6.- Récepteurs sérotonergiques et actions cardiovasculaires

La 5-HT exerce des changements complexes au niveau cardiovasculaire, qui incluent bradycardie ou tachycardie, hypotension ou hypertension, vasodilatation ou vasoconstriction. Ces réponses dépendent de nombreux facteurs comme par exemple l'espèce animale, le tonus vasculaire basal, le lit vasculaire étudié, la dose d'agoniste testée, les conditions expérimentales, mais ils varient surtout en fonction du récepteur présent et de la possibilité d'une action directe ou indirecte (Saxena *et al.*, 1987; Bagdy *et al.*, 1989; Villalón *et al.*, 1993; Mirador *et al.*, 2000). La localisation des récepteurs 5-HT dans les structures spécifiques des vaisseaux (Figure 10) est aussi déterminante. Ainsi, dans le muscle lisse de la plupart des vaisseaux, les récepteurs 5-HT₂ sont à l'origine d'une vasoconstriction (Gradin *et al.*, 1986) (Figure 11), alors que les récepteurs situés au niveau endothélial sont impliqués dans une vasodilatation (Figure 12) par la libération de facteurs de relaxation endothéliaux (Vanhoutte, 1987, 2000).

Un certain rôle est reconnu à la sérotonine dans la régulation et le contrôle de la pression artérielle, du moins au niveau central (Minson *et al.*, 1990) où l'activation des récepteurs 5-HT_{1A} induit une hypotension. Libérée massivement lors de l'agrégation plaquettaire en réponse à différents processus (inflammation, infections), elle contribue par ses effets vasoactifs à la physiopathologie de diverses maladies vasculaires (Vanhoutte, 1983), telles que l'hypertension artérielle systémique, l'hypertension pulmonaire et la maladie périphérique vasculaire (Frishman et Grewall, 2000).

Lorsqu'elle est étudiée *in vitro*, la sérotonine est capable de provoquer une contraction de la plupart des vaisseaux de conductance, mais avec des différences de sensibilité, les artères cérébrales et coronaires étant les plus réactives. Par contre, dans la microcirculation, l'effet vasoconstricteur direct de la sérotonine apparaît surtout au niveau des veinules (Altura, 1981).

Les effets vasoconstricteurs de la 5-HT ont été expliqués par l'activation de récepteurs 5-HT₁ ou 5-HT₂ directement au niveau du muscle lisse vasculaire (Vont Nueten *et al.*, 1985; Feniuk et Humphrey, 1989), par l'activation de récepteurs adrénergiques (Vanhoutte *et al.*, 1981), ou la mise en jeu d'autres agents vasoconstricteurs comme l'histamine, l'angiotensine II ou la prostaglandine F_{2α} (Vont Nueten *et al.*, 1985b; Frishman *et al.*, 1995). Des études récentes montrent que, dans les

artères coronaires humaines, les récepteurs 5-HT₂ et 5-HT_{1B} s'expriment intensément, les récepteurs 5-HT_{1F} et 5-HT_{1A} modérément, et peu les récepteurs 5-HT_{1D} (Nilsson *et al.*, 1999); dans les artères cérébrales (artères temporales et occipitales), l'ensemble des récepteurs 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT₄ et 5-HT₇ est exprimé. Dans les deux cas, les études pharmacologiques ont montré que les réponses vasoconstrictrices sont dues par moitié à l'activation des récepteurs 5-HT_{1B} et 5-HT_{2A} (Kaumann *et al.*, 1994; Verheggen *et al.*, 1998; Verheggen *et al.*, 2004). Dans la veine porte de rongeur, la 5-HT exerce un effet vasoconstricteur indépendant de l'endothélium, *via* les récepteurs 5-HT_{1D/1B} et 5-HT_{2A}, mais non par une libération de NA (Datté et Offoumou, 2004).

En ce qui concerne les actions vasodilatatrices de la sérotonine, celle-ci sont particulièrement marquée quand le tonus sympathique est élevé, bien qu'on ait aussi montré la présence de récepteurs 5-HT au niveau des cellules endothéliales (Verbeuren *et al.*, 1991) et la libération de NO après activation des récepteurs 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} et 5-HT_{2B} (Fozard et Kalman, 1994; Schmuck *et al.*, 1996; Glusa et Pertz, 2000, Kakoki *et al.*, 1999). Cette production de NO *via* l'activation des récepteurs 5-HT_{1B} et 5-HT_{2B} a d'ailleurs été retrouvée sur des cellules endothéliales en culture provenant de coronaires humaines (Ishida *et al.*, 1998). Les actions vasodilatatrices de la 5-HT au niveau des artères cérébrales ont été impliquées dans la migraine. Enfin, le récepteur 5-HT₇ est exprimé dans le muscle lisse vasculaire (Ullmer *et al.*, 1995, Verheggen *et al.*, 2004) où il est impliqué dans une réponse vasodilatatrice *via* l'augmentation des taux d'AMPC (Schoeffter *et al.*, 1996, Terron *et al.*, 1999, Centurion *et al.*, 2004).

Dans d'autres lits vasculaires, la 5-HT induit des réponses soit vasodilatatrices, soit vasoconstrictrices, du fait de l'implication de différents types de récepteurs et/ou de l'activation de divers messagers secondaires comme par exemple par la voie de la COX. Dans le lit mésentérique autoperfusé *in situ* du rat, la vasoconstriction induite par la 5-HT ou l' α -méthyl-5-HT est médiée par les récepteurs 5-HT_{2B} et/ou 5-HT_{2C} (Fernandez *et al.*, 2000). Sur le lit vasculaire autoperfusé *in situ* du train postérieur du rat, cette vasoconstriction est liée à l'activation de récepteurs 5-HT_{2A} chez le rat normotendu (Calama *et al.*, 2002), mais aussi de récepteurs 5-HT_{2C} chez le rat spontanément hypertendu (Calama *et al.*, 2004). Les réponses vasodilatatrices à ce niveau sont dues à l'activation des récepteurs 5-HT_{1B/1D} (Calama *et al.*, 2002). Elles impliquent une

libération d'adrénaline par les surrénales suivie d'une vasodilatation par activation des récepteurs β_2 -adrénergiques (Calama *et al.*, 2003).

Au niveau rénal là encore, les réponses vasoconstrictrices et vasodilatatrices coexistent. Cet effet double a été observé après perfusion de 5-HT dans l'artère rénale du chien (Takahashi *et al.*, 1992) ou application locale de 5-HT sur le rein hydronéphrotique du rein (Endlich *et al.*, 1993). Dans ce dernier travail, la vasoconstriction semble toucher essentiellement les gros vaisseaux (artérioles arquées) alors que les artérioles plus fines (interlobulaires et afférentes) se dilatent. Ceci pourrait témoigner d'une répartition spécifique des sous-types de récepteurs 5-HT le long de l'arbre vasculaire intra-rénal. Verbeuren suggérait dès 1991 que des récepteurs 5-HT_{1A} endothéliaux étaient impliqués dans la vasodilatation induite par la 8-OH-DPAT et aussi de certains antagonistes β -adrénergiques (Verbeuren *et al.*, 1991 et 1993). Une étude réalisée dans notre laboratoire sur le rein autoperfusé *in situ* démontre le rôle des récepteurs 5-HT₂ dans la constriction induite par la sérotonine, mais aussi de l'angiotensine II (Morán *et al.*, 1997). Plus récemment, avec le développement de molécules agonistes et antagonistes plus sélectives, l'implication de divers sous-types de récepteurs a été rapportée: 5-HT_{2A} et 5-HT_{2B} sur les artères rénales isolées de rat (Watts et Thompson, 2004), mais aussi 5-HT_{1B} et 5-HT_{1D} sur des anneaux provenant d'artères rénales de lapin (Hinton *et al.*, 2000). La sérotonine exerce aussi des effets sur les cellules mésangiales. Les récepteurs 5-HT_{1B} et 5-HT_{2A} ont été décrits sur ces cellules, associés tous les deux à une inhibition de l'adénylate cyclase (Schoeffter *et al.*, 1995; Nebigil *et al.*, 1995). La sérotonine stimule la production de TGF- β 1 et la synthèse de collagène (Masaya *et al.*, 1998). Elle est aussi un facteur de croissance de ces cellules, par un mécanisme mettant en jeu la PKC et ERK (« extra-cellular regulated kinase »), mais aussi la production d'espèces réactives de l'oxygène (Grewal *et al.*, 1999; Greene *et al.*, 2000). La sérotonine, par contre ne semble pas exercer d'effet sur les podocytes (Nitschke *et al.*, 2000).

II.- LE DIABÈTE

Le Diabète sucré (Diabetes Mellitus, DM) est un groupe de maladies métaboliques caractérisées par une hyperglycémie qui apparaît suite à des défauts dans la sécrétion ou l'action de l'insuline. L'hyperglycémie chronique est associée à long terme à des dommages au niveau de plusieurs organes, spécialement dans les yeux, le rein, les nerfs, le coeur et les vaisseaux sanguins. Ceci est la définition donnée par le Comité des Experts dans le Diagnostic et la Classification du DM, comité qui a été créé en mai 1995 et qui travaille avec le parrainage de l'Association Américaine de Diabète (ADA).

Cette dénomination inclut un ensemble hétérogène de pathologies dont la classification a été proposée par le même Comité d'Experts (McCance et al., 1997; Reports of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1997 et 2000) en cinq groupes:

- 1) Diabète sucré (DM) de type 1
- 2) Diabète sucré (DM) de type 2
- 3) Autres types spécifiques de diabètes
- 4) Diabète gestationnel
- 5) Modification du métabolisme du glucose ou altération de l'homéostasie du glucose.

Les caractéristiques de chaque groupe sont résumées sur les tableaux 5 et 6.

- DM de type 1: Caractérisé par la destruction des cellules β , associé à un déficit absolu en insuline. Il existe sous deux formes: i) DM par destruction des cellules β par des processus auto-immuns; ii) DM idiopathique d'étiologie inconnue.
- DM de type 2: Caractérisé par une résistance à l'insuline, habituellement accompagné d'un déficit relatif en insuline.

- Altération de l'homéostasie du glucose: C'est un état métabolique intermédiaire entre la normalité et le diabète, peut-être facteur de risque cardiovasculaire. i) Glycémie basale au-dessus des valeurs normales mais inférieure à la valeur diagnostique du diabète; ii) Tolérance altérée au glucose lors d'un test après surcharge de 75 grammes de glucose.
- Diabète gestationnel, apparaissant au cours de la grossesse
- Diabète causé par d'autres étiologies identifiables: défauts génétiques dans la fonction de la cellule β , défauts génétiques dans l'action de l'insuline, maladies de l'excrétion pancréatique, endocrinopathies, pathologies iatrogènes, infections, formes rares de diabète par processus auto-immuns, autres syndromes génétiques

Les diabètes sucrés les plus communs sont le DM de type 1 et de type 2. Le DM de type 1 apparaît généralement à un âge précoce; les patients sont minces, avec une acétonémie, et nécessitent un traitement par l'insuline pour leur survie. Le DM de type 2 apparaît plus tardivement (après 40 ans) chez des patients obèses, avec des antécédents familiaux de diabète (Tableaux 5 et 6).

Dans le monde occidental, la prévalence du diabète sucré oscille entre 2 et 6% de la population. Cette prévalence varie en fonction du type de diabète: dans le DM de type 1, la prévalence est de 0,2%, tandis que dans le DM de type 2, elle est de 6% et augmente avec l'âge. L'incidence de cette maladie varie aussi en fonction du type de diabète: DM de type 1 = 10-12 cas/100 000 habitants/année; DM de type 2 = 60-150 cas/100 000 habitants/année.

La morbidité des patients diabétiques est beaucoup plus grande que pour des sujets normoglycémiques, du fait de pathologies rénales, oculaires, cardiovasculaires et neurologiques. Le diabète de type 2, le plus fréquent, touche 135 millions de sujets dans le monde. Il est en progression constante pour diverses raisons (habitudes alimentaires, sédentarité, surpoids, vieillissement de la population...), au point d'être considéré par l'OMS comme une "pandémie" moderne. Il devient une des premières causes de décès. En Espagne, il représente la 3^{ème} cause de mortalité pour les femmes et la 7^{ème} pour les

hommes. Dans la plupart des cas, le diabète n'est pas directement responsable du décès, mais les complications qu'il engendre. Ainsi, pour les patients souffrant d'un DM de type 2, la 1^{ère} cause de décès est l'infarctus de myocarde (50-60% des décès), alors que pour des patients souffrant d'un DM de type 1, c'est la néphropathie diabétique conduisant à l'insuffisance rénale.

1.- Pancréas et insuline

L'organe responsable du diabète sucré est le pancréas (Thomas Cawly, 1778), et plus précisément les îlots de Langerhans décrits en 1869 par Langerhans. Mais la relation directe entre diabète sucré et altération des îlots de Langerhans n'a été établie jusqu'à 1901 par Opie. Histologiquement, le pancréas comprend i) des acini (fonction exocrine, sécrétion d'enzymes digestifs) et ii) les îlots de Langerhans (pancréas endocrine). Le pancréas de l'homme compte 2 à 3 millions d'îlots, organisés autour de capillaires vers lesquels ils sécrètent diverses hormones (Figure 13), selon le type de cellule: cellules β (60%; insuline et peptide C); cellules α (25%; glucagon); cellules δ (10%; somatostatine); cellules PP (polypeptide pancréatique).

En 1921, Banting (Prix Nobel, 1923) et Best isolent l'insuline d'un pancréas de singe. L'efficacité de son activité antidiabétique chez le chien conduit à son utilisation chez l'homme dès 1922. La structure protéique de l'insuline est décrite en 1927 (Wintersteiner) mais sa structure primaire ne sera connue qu'en 1955 (Sanger, 1988 et 2001), autre prix Nobel. Ce sera la première protéine dont on a déterminé la séquence en aminoacides. Elle est formée de deux chaînes (A et B) de 21 et 30 résidus d'aminoacides, unies par deux ponts disulfure (Figure 14).

Elle est synthétisée comme précurseur, la prépro-insuline (poids moléculaire: 11500), dans le réticulum endoplasmique rugueux. Ce précurseur est transporté dans l'appareil de Golgi où il subit des protéolyses post-traductionnelles libérant la pro-insuline (poids moléculaire: 9000), puis l'insuline (poids moléculaire: 5080) et le peptide C. Ceux-ci sont stockés dans des granules dans les cellules β et sont libérés par

exocytose en quantités équimolaires, de manière régulée (facteurs hormonaux et chimiques).

L'insuline utilisée initialement en thérapeutique chez l'homme était isolée à partir de bovins puis de porcs. Depuis 1979, elle est produite par génie génétique. La découverte de l'insuline a radicalement changé le pronostic vital des patients diabétiques, puisque ceux-ci survivaient dès lors. Cependant, l'insuline apparaît maintenant comme un substitut qui évite le décès, mais pas nécessairement les effets secondaires à long terme de cette maladie.

2.- Complications du diabète sucré

Le principal problème que pose le diabète n'est pas l'administration d'insuline ou des antidiabétiques oraux, mais ses complications à long terme. Ces complications affectent différents organes, le métabolisme des glucides, lipides et protides, ainsi que divers systèmes de neurotransmission ce qui explique l'importance du tableau clinique de cette pathologie.

La complication la plus fréquente dans le diabète est au niveau du système nerveux, en estimant qu'environ 40% des diabétiques présentent une neuropathie au moment du diagnostic, touchant les nerfs sensoriels comme les nerfs moteurs ou autonomes. Sa prévalence augmente avec le temps d'évolution de la maladie et avec l'âge du patient. Cette affectation porte à une altération du tissu nerveux (étant donné le fonctionnement erroné du système enzymatique de l'aldose réductase), qui à long terme provoque des défauts dans la transmission de l'influx nerveux. Dans beaucoup de cas, il y a aussi une démyélinisation des fibres nerveuses, cause principale des névralgies dont souffre le patient diabétique. La neuropathie diabétique est à l'origine d'une majoration de la réponse vasculaire à la NA (Moorhouse *et al.*, 1966) et, dans la majorité des cas, d'une diminution du débit sanguin dans les vaisseaux associés aux nerfs. D'autres auteurs pensent au contraire que ce sont les modifications vasculaires liées au diabète qui sont la cause du développement de la neuropathie diabétique.

Les études effectuées dans des rats diabétiques au niveau du SNC ont conclu à d'importantes modifications du système sérotonergique (Jamnicky *et al.*, 1993). Ainsi, Lackovic *et al.* (1990) rapportent que la quantité de 5-HT synthétisée dans le cerveau est majorée chez le rat diabétique non traité par l'insuline, mais un résultat inverse a aussi été décrit chez des rats avec une hyperglycémie chronique (Bellush et Reid, 1994). Des changements hormonaux, comme l'élévation de corticostérone, complètent le tableau (Bellush *et al.*, 1991).

Les modifications hématologiques et cardiovasculaires sont la principale cause de morbidité et mortalité dans les personnes diabétiques. Les modifications hématologiques affectent presque toutes les cellules sanguines. Au niveau leucocytaire, il y a une plus faible activité mitogénique et phagocytaire, et un accroissement de l'hémolyse (destruction des globules rouges). Les protéines plasmatiques sont glycosylées, majorant la viscosité du sang, avec un plus grand risque de thrombus. Au niveau des plaquettes, existe une hyperagrégabilité, augmentant par conséquent la libération de facteurs intraplaquettaires comme le thromboxane A₂ et la 5-HT.

Les modifications cardiovasculaires peuvent se produire au niveau des vaisseaux de gros calibre (macroangiopathies) ou de petit calibre (microangiopathies). Des études effectuées récemment montrent l'existence de modifications au niveau du métabolisme de l'acide arachidonique, de la perméabilité vasculaires et de la vasomotricité (Hodgson *et al.*, 1990). Ainsi, une diminution des réponses contractiles à la stimulation électrique ou à l'administration d'agents vasoconstricteurs exogènes a été décrite (Ralevic *et al.*, 1995; Takiguchi *et al.*, 1998; Loichot *et al.*, 2001), mais d'autres auteurs rapportent des résultats exactement inverses, une augmentation de la réponse vasoconstrictrice à des agents exogènes (Agrawal et McNeil., 1987; Abebe et McLeod., 1990; Tammesild *et al.*, 1992).

Parmi les microangiopathies, la plus fréquente est celle qui touche le rein, la néphropathie diabétique caractérisée par une glomérulosclérose qui évolue vers l'insuffisance rénale. Le diabète est ainsi responsable de 30% des insuffisances rénales graves nécessitant une dialyse et de 16% des interventions de greffe de rein. L'évolution du rein vers la néphropathie diabétique débute cliniquement par la microalbuminurie, suivie d'une protéinurie et d'une urémie qui culminent dans l'insuffisance rénale

terminale. L'apparition de la protéinurie est précédée de diverses modifications fonctionnelles comme l'hyperfiltration glomérulaire, la vasodilatation rénale et l'augmentation de la perméabilité capillaire aux macromolécules. Elles s'accompagnent de changements ultrastructuraux incluant un épaissement de la membrane basale, une hypertrophie glomérulaire et une expansion mésangiale qui conduisent à la glomérulosclérose et à la fibrose interstitielle. Des facteurs métaboliques (hyperglycémie, glycation des protéines, voie des polyols) mais aussi hormonaux (angiotensine II, endothéline, prostaglandines, glucagon, facteur natriurétique atrial) ont été impliqués dans l'altération des fonctions rénales dans le diabète. Les modifications de l'hémodynamique intrarénale combinées à l'altération des voies métaboliques conduisent à l'expansion du mésangium glomérulaire et à la glomérulosclérose par des mécanismes qui ne sont actuellement pas complètement élucidés (Lehmann et Schleicher, 2000; Raptis et Viberti, 2001). Ainsi, dans l'évolution de la néphropathie diabétique, le rein passe par différents stades: le stade précoce est caractérisé par une hyperfiltration glomérulaire produite par une réduction de la résistance vasculaire intrarénal et une hypertension dans les capillaires glomérulaires; le stade intermédiaire voit une normalisation hémodynamique alors qu'apparaît la microalbuminurie; plus tardivement, l'insuffisance rénale s'installe avec la glomérulosclérose et la protéinurie, et conduit à terme à la dialyse et/ou à la transplantation rénale. L'évolution de la néphropathie diabétique est accélérée en cas d'association à l'hypertension artérielle, aussi bien chez le rat qu'en clinique (Cooper *et al.*, 1986; Marre *et al.*, 1993).

Les modifications oculaires affectent les nerfs oculomoteurs et optiques, bien que la structure majoritairement touchée soit la rétine (la rétinopathie diabétique est la cause de cécité la plus fréquente dans les pays industrialisés).

Les macroangiopathies les plus fréquentes sont l'hypertension artérielle, l'hyperlipidémie, l'hypercholestérolémie, l'hypertriglycémie et l'artériosclérose.

L'un des facteurs critiques, souvent responsable du début du développement des maladies vasculaires dans le diabétique, est l'endothélium, plus concrètement la perte de sa capacité régulatrice dans les vaisseaux. Dans le diabète, la vasodilatation endothélium-dépendante est altérée. Ceci est particulièrement vrai dans la phase tardive du diabète, aussi bien chez le rat diabétique (Feletou *et al.*, 1994; Oyama *et al.*, 1986)

que chez l'homme (Johnstone *et al.*, 1993; Van Etten *et al.*, 2002). La quantité de NO disponible est abaissée dans le diabète, un facteur de risque commun avec l'hypertension artérielle et les dyslipidémies. Dans le diabète, l'hyperglycémie elle-même, ou la glycation des protéines et la surexpression de la NAD(P)H oxydase dans les cellules musculaires lisses ou endothéliales, majorent le stress oxydatif dans les vaisseaux qui conduit à la dégradation de NO (Lassègue et Clempus, 2003). Par ailleurs, la NO synthase endothéliale se «découple» en conditions hyperglycémiques, c'est-à-dire qu'elle produit l'anion superoxyde plutôt que le NO (Cosentino *et al.*, 1997). L'oxydation du cofacteur de la NO synthase, la tétrahydrobioptérine, est probablement la cause de ce découplage (Milstien et Katusic, 1999). Dans la phase précoce du diabète par contre, le NO semble bien présent et largement impliqué par exemple dans l'hyperfiltration glomérulaire. En effet, l'excrétion urinaire des nitrites/nitrates est alors augmentée (Bank et Aynedjan, 1993), l'hyperfiltration glomérulaire est abolie par un inhibiteur de la NOS (Bank et Aynedjan, 1993; Tolins *et al.*, 1993) et l'expression des NO synthases est majorée dans le glomérule du rat diabétique (Choi *et al.*, 1997; Veelken *et al.*, 2000). Ces résultats suggèrent que le NO, quelque soit son origine, puisse jouer un rôle majeur dans l'hyperfiltration glomérulaire au cours de la phase précoce du diabète. D'autres études montrent une augmentation des facteurs vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium (EDCF), comme les prostanoïdes, dans diverses artères du rat diabétique (Mayhan *et al.*, 1991; Tesfamariam *et al.*, 1989; Shimizu *et al.*, 1993). Récemment, Cosentino *et al.* (2003) ont montré que l'hyperglycémie et le stress oxydatif majorent l'expression de la COX-2 (inductible) sur les cellules endothéliales en culture et augmentent ainsi la libération de thromboxane A₂.

III.- SEROTONINE, DIABÈTE et SYSTÈME CARDIOVASCULAIRE

Le diabète est une maladie qui, comme nous l'avons déjà mentionné, est à long terme à l'origine d'importantes complications cardiovasculaires, parmi lesquelles l'hypertension artérielle, qui a une incidence et une prévalence beaucoup plus grande chez les patients diabétiques. De nombreux travaux se sont intéressés au rôle possible de la sérotonine dans la pathophysiologie des complications du diabète sucré. Le diabète sucré est en effet associé à des modifications i) dans les concentrations de 5-HT et de l'agrégation des plaquettes, ii) dans la population de récepteurs sérotonergiques, iii) dans les réponses vasculaires induites par la sérotonine sur divers vaisseaux et leur régulation par l'endothélium.

Dans le diabète sucré, les taux plasmatiques de 5-HT sont majorés (Barradas *et al.*, 1988; Malyszko *et al.*, 1995; Martín *et al.*, 1995) du fait d'une hyperagrégabilité des plaquettes, principale source de 5-HT en périphérie (Murray *et al.*, 1983; Malyszko *et al.*, 1995; Hasegawa *et al.*, 2002). Les plaquettes libérant massivement la 5-HT finissent alors par être déplétées en amine. L'activation sérotonergique chez les patients diabétiques est confirmée par le doublement de leur excrétion urinaire en 5-HIAA, principal métabolite de la 5-HT.

Les modifications dans l'expression des récepteurs 5-HT ont surtout été étudiées dans le SNC, où une majoration des récepteurs 5-HT_{1A} (cortex, tronc cérébral) et 5-HT₂ (cortex frontal) a été rapportée chez les rats après induction d'un diabète par la streptozotocine (Sandrini *et al.*, 1997; Sumiyoshi *et al.*, 1997). Elle apparaît comme un phénomène de compensation face à une concentration locale en 5-HT abaissée (Sandrini *et al.*, 1997). Cette surexpression de récepteur 5-HT dans le SNC a été confirmée récemment chez des patients diabétiques (5-HT_{1C}, DM de type 2) par des mesures en tomographie par émission d'électrons (Price *et al.*, 2002). En périphérie, la densité en sites de liaison de la [³H]-kétansérine n'est par contre pas modifiée dans l'aorte de rats diabétiques, dans une situation où la réactivité à la sérotonine est altérée (James *et al.*, 1994).

Compte tenu des puissants effets vasoconstricteurs de la sérotonine sur l'ensemble des vaisseaux, de nombreux travaux se sont attachés à évaluer les modifications de ces réponses sur diverses préparations artérielles, au cours des premières semaines d'évolution d'un diabète expérimental. Les résultats obtenus montrent soit une inhibition, soit une potentialisation de la vasoconstriction induite par la 5-HT, et ceci de manière très variable selon les lits vasculaires considérés et l'espèce animale. Sur les aortes de rats diabétiques, une inhibition ou une potentialisation sont décrits à part égale dans la littérature (Sikorski *et al.*, 1993; James *et al.*, 1994; Orié *et al.*, 1993; Hattori *et al.*, 1995). Sur d'autres vaisseaux, les réponses sont plus homogènes. Ainsi, sur la patte autoperfusée *in situ* du rat, une inhibition de la réponse est la règle quelque soit l'agent diabétogène (streptozotocine ou alloxane) utilisé (Sikorski *et al.*, 1991; James *et al.*, 1995). Sur les artères pulmonaires ou carotides prélevées chez le lapin ou le cochon diabétique, la réponse vasoconstrictrice à la 5-HT est par contre toujours majorée (Miranda *et al.*, 2000; El-Kashef, 1996; Bagwell *et al.*, 2000). Peu d'études se sont intéressées aux modifications de la réactivité à la sérotonine sur le rein au cours du diabète. Cependant, si une nette potentialisation de la réponse à la 5-HT a été décrite sur les artères rénales de lapin, (Miranda *et al.*, 2002), la réponse est plus complexe sur le rein isolé de rat, où apparaît une potentialisation pour les faibles doses de 5-HT et une inhibition pour les doses plus élevées (Hodgson *et al.*, 1990), ou encore une réponse à la sérotonine non modifiée (Beenen *et al.*, 1996; Boston *et al.*, 1997). Divers mécanismes ont été évoqués pour rendre compte de ces différences de réactivité à la 5-HT dans le diabète, notamment la modulation des réponses *via* le NO, les prostaglandines et l'endothélium (Miranda *et al.*, 2000 et 2002), la potentialisation par le thromboxane A₂ (Hodgson *et al.*, 1990), une anomalies dans le voie de la PKC (Hattori *et al.*, 1995) ou dans la cascade des COX (James *et al.*, 1995). Les études ont généralement été réalisées dans les premières semaines (2 à 8 semaines) après l'induction du diabète, ce qui peut être considéré comme la phase précoce. Les vasoconstrictions à la 5-HT sur l'aorte étant reproduites par l' α -méthyl-5-HT et inhibées par la kétansérine, elles sont considérées comme étant liées à l'activation des récepteurs 5-HT₂ (James *et al.*, 1994). La densité de ces récepteurs ne semble pas modifiée dans l'aorte de rats diabétiques. La complexité des réponses vasculaires de la 5-HT, mettant aussi en jeu des récepteurs « vasodilatateurs », endothéliaux ou non, n'a pas été considérée dans ces travaux qui

pour la plupart ont précédé l'apparition de molécules suffisamment spécifiques des différents récepteurs.

Les propriétés de la sérotonine sur la cellule mésangiale, acteur important dans l'évolution vers la néphropathie diabétique, ont conduit Takahashi *et al.*, (2002) à évaluer les effets d'un antagoniste des récepteurs 5-HT_{2A} dans cette pathologie. Les résultats sont en faveur d'un effet bénéfique du sarpogrelate puisque l'albuminurie d'un petit groupe de patients (DM de type 2) a été abaissée dès le 3^{ème} mois de traitement. Ces données démontrent que les taux de 5-HT élevés dans le diabète sucré participent probablement à la néphropathie diabétique via les récepteurs 5-HT_{2A}. Il est possible qu'une part des effets bénéfiques de ce traitement relève de l'inhibition des réponses hémodynamiques liées à la 5-HT.

----- *Objectifs* -----

Comme nous l'avons rappelé dans l'introduction de ce mémoire, la 5-hydroxytryptamine (5-HT, sérotonine) prend part à un nombre important de réponses physiologiques et pathologiques et joue un rôle complexe au niveau cardiovasculaire, qui dépend de facteurs comme l'espèce animale, les doses utilisées, le tonus sympathique et le vaisseau considéré (Villalón *et al.*, 1993).

La vasoconstriction et la libération d'autres agents vasoconstricteurs, la vasodilatation et les effets inotropes et chronotropes positifs, sont quelques unes des actions décrites pour la 5-HT (Saxena et Villalón, 1991 ; Vanhoutte *et al.*, 1985, 1987a, b). Certains de ces effets relèvent d'une interaction entre les voies sérotonergiques et adrénergiques.

Les multiples études réalisées au cours des dernières années montrent la complexité du système sérotonergique. Toutefois, les connaissances actuelles sur les types et les sous-types de récepteurs sérotonergiques, ainsi que la plus grande disponibilité d'agonistes et d'antagonistes sélectifs, fournissent les outils nécessaires à l'étude fonctionnelle des divers récepteurs impliqués dans le système sérotonergique. Ils devraient permettre à terme une meilleure connaissance du rôle et des mécanismes d'action de la sérotonine.

Pour sa part, le diabète constitue un important problème de santé publique. Ses effets délétères sont particulièrement importants au niveau cardiovasculaire, où le diabète est considéré de longue date comme un facteur de risque aggravant le pronostic de morbidité et de mortalité des patients. Dans le diabète, une modification de la réponse des lits vasculaires à divers agents vasoconstricteurs ou vasorelaxants a été décrite. Ces modifications ont été rapportées en particulier pour la 5-HT (hyporéactivité ou hyperréactivité), dont on sait par ailleurs que les taux circulants sont majorés au cours du diabète.

Notre groupe de recherche développe une ligne de travail consacrée à l'étude des actions cardiovasculaires de la 5-HT dans le rat, visant en particulier à établir, en périphérie, la participation de cette amine et des mécanismes sérotonergiques dans la régulation des fonctions cardiovasculaires. Dans ces travaux, nous avons préférentiellement utilisé des techniques fonctionnelles *in vivo* chez des rats normoglycémiques, normotendus ou hypertendus. Nos résultats ont dès à présent permis de mettre en évidence les points suivants :

1.- Existence d'une interaction entre la 5-HT et les mécanismes cholinergiques et adrénergiques, chez le rat démédullé:

- La 5-HT module la neurotransmission cholinergique cardiaque chez le rat démédullé en inhibant ou facilitant la libération d'acétylcholine. Les mécanismes inhibiteurs impliquent l'activation de récepteurs 5-HT₂, alors que la potentialisation met en jeu les récepteurs 5-HT₃ (Morán *et al.*, 1994a).
- Dans la neurotransmission sympathique vasculaire des rats normotendus et hypertendus, il existe des mécanismes présynaptiques sérotonergiques qui inhibent ou facilitent la libération de noradrénaline des terminaisons nerveuses sympathiques. Les mécanismes inhibiteurs passent par l'activation des récepteurs 5-HT₁, préférentiellement les récepteurs 5-HT_{1D} et dans une moindre mesure 5-HT_{1A} chez les rats normotendus (Morán *et al.*, 1998), mais les récepteurs 5-HT_{1B} chez les rats hypertendus. Les mécanismes potentialisateurs, qui n'existent que chez les rats normotendus, passent par l'activation des récepteurs 5-HT₃ (Morán *et al.*, 1994b).
- Certains antagonistes des récepteurs 5-HT₁/5-HT₂ exercent des effets inhibiteurs de la transmission sympathique vasculaire des rats, par des mécanismes non directement en rapport avec l'antagonisme des récepteurs sérotonergiques (Fernández *et al.*, 2000a).
- Nous avons aussi démontré un effet inhibiteur de la 5-HT sur la neurotransmission sympathique cardiaque chez les rats démédullés

normotendus. Des récepteurs 5-HT_{1B} présynaptiques étaient impliqués dans cette action (Villalón *et al.*, 1999).

2.- Actions vasculaires sérotonergiques et mécanismes impliqués dans des territoires vasculaires autoperfusés chez le rat *in vivo* :

- Au niveau rénal, dans le rein autoperfusé du rat *in situ*, la 5-HT exerce des effets vasoconstricteurs par l'activation de récepteurs 5-HT₂, principalement les sous-types 5-HT_{2B/2C} (Morán *et al.*, 1997). Ces réponses impliquent le système rénine-Ang II puisque la vasoconstriction induite par la 5-HT était inhibée par un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'Ang I (énalapril), et un antagoniste des récepteurs AT₁, le losartan (Morán *et al.*, 1997).
- Dans le lit mésentérique autoperfusé *in situ* du rat anesthésié, l'administration locale de 5-HT induit de même des réponses vasoconstrictrices impliquant l'activation de récepteurs 5-HT₂, probablement principalement les récepteurs 5-HT_{2B/2C} (Fernández *et al.*, 2000b).
- Dans le lit vasculaire du train postérieur autoperfusé *in situ* de rats normotendus, la vasoconstriction est liée à l'activation de récepteurs 5-HT_{2A} (Calama *et al.*, 2002), alors que chez les rats spontanément hypertendus, les récepteurs 5-HT_{2C} y participent également (Calama *et al.*, 2004).
- Dans le train postérieur autoperfusé *in situ* du rat anesthésié, la 5-HT induit aussi une réponse vasodilatatrice (faibles doses) qui met en jeu l'activation de récepteurs 5-HT_{1B/1D} (Calama *et al.*, 2002). Cette réponse paraît complexe puisqu'elle est inhibée par un antagoniste des récepteurs β₂-adrénergiques et nécessite une innervation sympathique intacte du lit vasculaire considéré. Nous avons suggéré qu'une libération d'adrénaline au niveau des surrénales, suivie d'une vasodilatation par activation des récepteurs β₂-adrénergiques, contribue à cette réponse (Calama *et al.*, 2003).

En accord et en continuation avec les résultats antérieurs obtenus dans notre laboratoire, nous nous demandons maintenant si ces régulations sérotonergiques sont altérées dans des pathologies comme l'hypertension artérielle ou le diabète sucré, que ce soit au niveau des actions vasculaires directes et/ou indirectes de la 5-HT, ou dans la modulation de la neurotransmission autonome. Dans ce travail de Thèse Doctorale, je me suis plus particulièrement intéressée aux modifications qui surviennent au cours du diabète sucré, que nous avons reproduit expérimentalement chez le rat.

L'OBJECTIF GÉNÉRAL de mon travail a ainsi été de déterminer le degré de participation des différents types et sous-types de récepteurs sérotonergiques, ainsi que de quelques médiateurs endothéliaux, dans des réponses cardiovasculaires sérotonergiques qui modulent la neurotransmission sympathique et parasympathique, ainsi que le tonus vasculaire rénal, dans une situation de hyperglycémie expérimentale. Concrètement, cette problématique a été analysée avec les objectifs spécifiques suivants :

- 1.- Déterminer, chez les rats hyperglycémiques désmédullés, l'influence de la 5-HT et d'autres agonistes sérotonergiques sur les réponses vasculaires obtenues par la stimulation sympathique totale ou par l'administration de noradrénaline exogène ; établir la nature ces actions en analysant le type et/ou le sous-type de récepteur sérotonergique impliqué et, comparer les résultats à ceux obtenus précédemment chez des rats normoglycémiques.
- 2.- Etablir, tant chez les animaux normoglycémiques que hyperglycémiques, la possibilité d'une participation de médiateurs endothéliaux ou de mécanismes indirects, dans les effets de la 5-HT et des agonistes sérotonergiques sur les réponses pressives induites par la stimulation sympathique totale.
- 3.- Etudier, chez les rats hyperglycémiques démédullés, l'influence de la 5-HT et d'autres agonistes sérotonergiques sur les réponses cholinergiques cardiaques obtenues par la stimulation électrique vagale, ou par l'administration

d'acétylcholine exogène. Les résultats seront comparés à ceux obtenus précédemment au laboratoire chez des rats normoglycémiques.

- 4.- Analyser fonctionnellement les récepteurs sérotonergiques impliqués dans les réponses vasoconstrictrices et/ou vasodilatatrices rénales produites par la 5-HT et d'autres agonistes sélectifs des divers récepteurs. Cette analyse sera faite *in vitro*, sur le rein isolé perfusé, en comparant les réponses de reins provenant de rats normoglycémiques à celles de reins d'animaux diabétiques.
- 5.- Finalement, évaluer l'expression des récepteurs sérotonergiques dans le lit vasculaire rénal et dans l'aorte, en terme d'ARNm, par RT-PCR quantitative. Les différences entre rats normoglycémiques et diabétiques seront recherchées.

----- *Matériel et Méthodes* -----

I.- INDUCTION DU DIABÈTE SUCRÉ EXPÉRIMENTAL

Les rats (Wistar mâles, 250-350 g) ont été rendus diabétiques par une injection unique d'alloxan (150 mg/kg s.c.) ou de streptozotocine (60 mg/kg i.v., tampon citrate à pH 4). La destruction des cellules β des îlots de Langerhans induit alors un diabète sucré par défaut d'insuline. Les animaux reçoivent des injections d'insuline ultratard NPH 100 UI (Novo Nordisk) afin de les maintenir en vie avec un diabète très déséquilibré (glycémie 400-500 mg/dl, soit 22-28 mM). Ce diabète expérimental reproduit les caractéristiques du diabète de type 1 humain. Les animaux sont étudiés 1 mois après l'induction de leur diabète.

II.- RAT DÉMÉDULLÉ

Après la préparation des animaux (anesthésie, trachéotomie, voies artérielle et veineuse), la démyélinisation est réalisée par l'insertion d'une tige métallique dans le canal spinal, via l'orbite droite (Gillespie et Muir, 1967). Les rats sont alors immédiatement ventilés avec l'air ambiant, placés sur une table thermostatée et prétraités avec la d-tubocurarine et l'atropine ou l'aténolol (respectivement pour les stimulations sympathiques et parasympathiques). Leur pression artérielle est enregistrée en continu pendant toute la durée de l'expérimentation.

1.- Stimulation sympathique

L'ensemble du système sympathique périphérique est stimulé en appliquant l'électrode de stimulation directement sur la tige métallique (15 V, 0.1 ms, 5 Hz pendant 25 sec, toutes les 10 min). L'augmentation de pression artérielle induite par ces stimulations est analysée avant puis pendant la perfusion des divers agonistes et/ou

antagonistes, chez le rat normoglycémique (tableaux 8 à 11), ainsi que chez le rat hyperglycémique (tableaux 12 à 20).

2.- Stimulation cholinergique (nerf vague)

Les deux nerfs vagues sont isolés au niveau cervical, liés et coupés afin de prévenir les réflexes vagues afférents et efférents. Une électrode de platine est placée sur la partie distale du nerf vague cervical droit qui sera stimulé électriquement (intensité supramaximale, 10 V, 1 ms, 3 à 9 Hz pendant 15 sec, toutes les 15 min). La fréquence cardiaque est calculée à partir de l'enregistrement de la pression artérielle (Tableaux 21 à 23).

III.- REIN ISOLÉ PERFUSÉ DE RAT

Ce modèle permet une évaluation de la réactivité vasculaire rénale, tant pour des substances vasodilatatrices que vasoconstrictrices, à l'abri des régulations hormonales ou nerveuses systémiques. Le rat est anesthésié au pentobarbital, puis, après laparotomie, le rein droit est disséqué, placé sur une coupelle thermostatée et mis sous perfusion (solution de Tyrode) sans période d'ischémie via l'artère mésentérique supérieure, selon une technique utilisée de longue date dans notre laboratoire strasbourgeois (Schmidt-Barthelmebs et Imbs, 1981, Musso *et al.*, 1989, Barthelmebs *et al.*, 1996, Bagaté *et al.*, 2001, Loichot *et al.* 2001). Le rein est perfusé en circuit ouvert, à un débit constant de 8 ml/min. La pression de perfusion rénale est enregistrée en continu (Figures 16 et 17). Après une période de stabilisation de 30 minutes, le rein est perfusé pendant 10 minutes avec une solution dépolarisante (KCl 100 mM) afin de stabiliser les réponses vasculaires rénales ultérieures. Le perfusat de base contient du glucose à une concentration de 10 mM pour une meilleure survie de l'organe *in vitro*. Dans certains cas, les expériences ont aussi été réalisées en présence d'une concentration de glucose de 5 mM (concentration physiologique).

1.- Etude d'une vasoconstriction

Les effets de concentrations croissantes d'un vasoconstricteur sont analysés sur l'augmentation de la pression de perfusion rénale, après administration du constricteur dans le perfusat à proximité du rein. Les réponses sont exprimées en variation de la pression de perfusion. Les réponses induites par la 5-HT et les agonistes sélectifs des différents récepteurs à la 5-HT (tableau 24) sont comparées à la réponse induite par la phényléphrine ou l'Ang II. La contribution du NO comme facteur modulateur des constriction est analysée en présence d'un inhibiteur de la NO synthase (L-NNA 100 μ M).

2.- Etude d'une vasodilatation

Le rein isolé et perfusé *in vitro* est dans un état de relaxation quasi maximale. L'étude d'une réponse vasodilatatrice nécessite alors le rétablissement préalable d'un tonus vasomoteur. Ceci est réalisé par des perfusions répétées de phényléphrine ou d'Ang II (15 sec, toutes les 2,5 min) de sorte à induire des majorations répétées de la pression de perfusion de l'ordre de 40 mm Hg. Les effets de concentrations croissantes d'un vasodilatateur, administré dans le perfusat à proximité du rein, sont analysés par la réversion de ce tonus induit. Les réponses des vasodilatateurs sont comparées à celles de l'acétylcholine et du nitroprussiate de sodium, outils de référence pour juger d'une vasodilatation endothélium-dépendante et endothélium-indépendante. Les relaxations sont exprimées en pourcentage de réversion du tonus vasculaire induit.

IV.- EXPRESSION DES ARNm DES RÉCEPTEURS SÉROTONINERGIQUES

L'expression des différents récepteurs de la 5-HT a été évaluée par une technique de RT-PCR quantitative en temps réel (LightCycler, Roche Diagnostics) en utilisant des amorces sens et anti-sens décrites précédemment pour le rat (Ullmer *et al.*, 1995), ou déterminées par le logiciel BLASTN à partir de bases de données connues sur

le génome. Ces expressions sont normalisées par rapport à l'expression de la GAPDH prise comme gène domestique. Cette démarche a été appliquée à des arbres vasculaires intra-rénaux préparés selon une technique mise au point au laboratoire (Endlich *et al.*, 2000) et, à titre de comparaison, à des aortes prélevées chez les mêmes animaux normoglycémiques ou rendus diabétiques par la streptozotocine depuis 1 mois.

1.- Extraction de l'ARN

L'ARN total est extrait par la méthode au TRIzol selon le protocole du fournisseur (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) (Massfelder *et al.*, 2001 y 2002). Le TRIzol est une solution mono-phasique de phénol et d'isothiocyanate de guanidine qui maintient l'intégrité de l'ARN tout en détruisant les cellules et en dissolvant les autres composés cellulaires. Les échantillons tissulaires (artérioles intra-rénales, aorte, 50 à 100 mg chacun) sont placés immédiatement lors du prélèvement dans 1 ml de TRIzol, à température ambiante, puis broyés mécaniquement (broyeur de Kontes, Sigma) dans les 20 minutes sous une hotte aspirante. Afin d'assurer une dissociation des complexes nucléoprotéiques, les échantillons sont ensuite laissés à reposer pendant 5 minutes à température ambiante. L'adjonction de chloroforme (0,2 ml par échantillon) est suivie d'une agitation vigoureuse pendant 15 secondes puis d'un contact prolongé à température ambiante (2 à 15 minutes). Les échantillons sont centrifugés à 12000 g pendant 15 minutes à 4°C ce qui sépare le contenu des tubes en trois phases distinctes : une phase inférieure organique contenant les protéines, une interphase renfermant l'ADN et une phase supérieure aqueuse transparente contenant exclusivement l'ARN.

L'ARN est précipité dans la phase aqueuse supérieure par addition de 0,5 ml d'isopropanol par ml de TRIzol. Les tubes sont ensuite agités, laissés à température ambiante pendant dix minutes puis centrifugés à 12000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot d'ARN est lavé par une solution d'éthanol à 75 % et centrifugé pendant 5 minutes à 7500 g à 4°C. Le culot est récupéré et séché à l'air puis remis en suspension dans un volume d'eau additionnée de 0,1% de diéthyl-pyrocabonate, un inhibiteur de nucléase. La pureté des échantillons d'ARN est calculée par le rapport des densités optiques à 260 et 280 nm. Un rapport égal ou supérieur à 1,7 indique l'absence de contamination de la préparation d'ARN par l'ADN.

2.- Synthèse de l'ADN_c par transcription réverse (RT)

La transcription réverse (RT) est réalisée dans un volume de 40 µl à 37° C pendant une heure en présence d'ARN (3 µg pour les aortes, 3 µg pour les arbres artériels intrarénaux), 400 U de transcriptase réverse (transcriptase réverse du virus de la leucémie de rat, Invitrogen), 10 U d'inhibiteur de la ribonucléase (RNaseOUT™, Invitrogen), 1 mM de désoxynucléotides triphosphates et 1 µM d'amorces p(dT)₁₅ (amorces spécifiques des séquences polyA des ARN messagers). La transcription réverse est stoppée en chauffant les échantillons à 99°C pendant 5 minutes.

3.- Amplification de l'ADN_c par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) quantitative en temps réel

L'ADN_c a été amplifiée par le LightCycler® (Roche Diagnostic, Meylan, France), en utilisant le kit LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostic). La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est réalisée dans un volume de 20 µl en présence de 0.5 µM de « primers » spécifiques "sens" et "antisens" pour les différents récepteurs de 5-HT, 1 µg BSA, 10 µl LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I et 2 µl d'ADN_c (50 ng). Les primers utilisés sont résumés sur le tableau 25. Après une première dénaturation à 95°C, la PCR est réalisée en 45 cycles de dénaturation (10 s à 95°C), d'amorçage (5 s à 55°C) et de polymérisation (12 s à 72°C). Chaque échantillon est analysé en double et quantifié selon le protocole du fournisseur (Roche Diagnostics).

L'expression relative des différents gènes a été calculée en rapportant les taux d'ARNm à ceux de la GAPDH considérée comme gène domestique. Les produits de la PCR ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 2% contenant 0.5 µg/ml de bromure d'éthidium afin de vérifier la taille attendue des divers fragments amplifiés par PCR (tableau 25).

V. FONCTIONS RÉNALES

Les fonctions rénales des rats diabétiques et normoglycémiques ont été évaluées en plaçant les animaux en cage à diurèse pour un recueil d'urine de 24 heures (après 24 heures d'habituation). Un prélèvement de sang a été réalisé en fin de recueil à la queue du rat. Les prises de boisson et de nourriture, les excrétions urinaires de sodium et de glucose, ainsi que la clairance de la créatinine et la réabsorption fractionnelle de sodium ont ainsi pu être calculés.

----- *Résultats* -----

I.- INDUCTION DU DIABÈTE SUCRÉ

La diabète sucré se développe rapidement après l'injection d'alloxane ou de streptozotocine, puisque la glycémie augmente dès le second jour. Les animaux sont traités à l'insuline mais à une dose maintenant un diabète très déséquilibré. La glycémie reste alors constamment élevée (> 22 mM). Ce diabète très déséquilibré explique que ces animaux ne prennent plus de poids ou même en perdent par rapport aux rats contrôles de même âge. (*Figures 18 et 19*)

Quatre vingt % des animaux survivent au terme des 4 semaines d'évolution de leur pathologie. Les fonctions rénales de ces animaux, mesurées en cage à diurèse, montrent qu'ils se trouvent alors dans une phase précoce de l'évolution de leur pathologie, caractérisée par une hyperfiltration glomérulaire, premier signe de la néphropathie diabétique débutante. Ils sont par ailleurs polyuriques, polydyspniques et hyperphagiques. (*Tableau 26*)

II.- SÉROTONINE ET TRANSMISSION SYMPATHIQUE AU NIVEAU VASCULAIRE CHEZ LE RAT HYPERGLYCÉMIQUE ET NORMOGLYCÉMIQUE

1.- Récepteurs impliqués

L'augmentation de pression artérielle induite par la stimulation électrique du système sympathique périphérique chez le rat démyélinisé (*Figure 20*) est réduite de manière dose- et fréquence-dépendante pendant la perfusion de 5-HT (1-80 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) chez le rat diabétique. (*Figures 23 à 24*).

Cette inhibition est reproduite par un agoniste sélectif du récepteur 5-HT₁ (5-CT), et, plus précisément, du récepteur 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT). Les récepteurs 5-HT₂ (α -

méthyl-5-HT), 5-HT₃ (1-phénylbiguanide), ainsi que les récepteurs 5-HT_{1B} (CGS-12066B) et 5-HT_{1D} (L-694,247) ne sont par contre pas impliqués. (*Figures 25 à 28*).

La modulation *via* le récepteur 5-HT_{1A} a été confirmée par l'utilisation d'antagonistes \pm sélectifs: seuls le WAY-100,635 (antagoniste 5-HT_{1A}) et la méthiothepine (antagoniste 5-HT) bloquent les effets inhibiteurs de la 5-HT et de la 8-OH-DPAT, alors que des antagonistes des récepteurs 5-HT₂ (ritansérine), 5-HT₇ (mésulergine) et 5-HT₃ (MDL-72222) sont inactifs. (*Figures 29 à 32*).

La spécificité présynaptique des effets de la 5-HT a été établie en vérifiant l'inefficacité de la 5-HT sur des augmentations de pression artérielle induites par l'administration de noradrénaline exogène. (*Figures 33 à 34*).

2.- Modulation de ces réponses par des médiateurs cellulaires

La question se posait de savoir si des médiateurs spécifiques étaient impliqués dans cet effet inhibiteur de la 5-HT. Nous avons évalué la contribution du monoxyde d'azote (NO), d'un facteur d'hyperpolarisation activant les canaux K⁺ ATP-dépendants ou de produits de la cyclo-oxygénase (COX) en utilisant des inhibiteurs spécifiques de ces différentes voies (L-NAME et ODQ, glibenclamide, indométacine).

Chez le rat normoglycémique, où des travaux antérieurs de notre laboratoire avaient montré que l'inhibition présynaptique de la neurotransmission sympathique par la 5-HT mettait essentiellement en jeu le récepteur 5-HT_{1D} (Morán *et al.*, 1994a; 1998; Fernández *et al.*, 2000), les réponses inhibitrices n'étaient pas liées à l'activation de canaux K⁺ ATP-dépendants ou du système du NO, mais semblaient impliquer la voie de la COX puisque l'indométacine était capable de bloquer l'action inhibitrice du L-694,247 (agoniste sélectif 5-HT_{1D}). (*Figures 21 à 22 et 35 à 42*).

Chez le rat diabétique par contre, l'inhibition de la neurotransmission sympathique par la 5-HT et la 8-OH-DPAT *via* le récepteur 5-HT_{1A} était modulée par le NO, mais non par la voie de la COX ou les canaux K⁺ ATP-dépendants. (*Figures 43 à 50*).

L'ensemble de ces résultats met en évidence une contribution majeure du récepteur 5-HT_{1A} *via* le NO dans l'inhibition présynaptique de la neurotransmission sympathique chez le rat diabétique, alors que cette inhibition était préférentiellement liée au récepteur 5-HT_{1D} et impliquait les produits générés par la COX chez le rat normoglycémique.

III.- SÉROTONINE ET TRANSMISSION PARASYMPATIQUE AU NIVEAU CARDIAQUE CHEZ LE RAT HYPERGLYCÉMIQUE

1.- Récepteurs impliqués

La stimulation électrique du nerf vague chez le rat démyélinisé induit une bradycardie fréquence-dépendante, non modifiée par de faibles doses de 5-HT (10 à 50 µg/kg), mais potentialisée par de plus fortes doses (100 et 200 µg/kg). (*Figure 51*).

L'administration d' α -méthyl-5-HT (agoniste sélectif 5-HT₂) ou de 1-phénylbiguanide (agoniste sélectif 5-HT₃) ne modifient pas la bradycardie induite par la stimulation électrique ; par contre, l'administration de 5-CT (agoniste des récepteurs 5-HT₁ et 5-HT₇) à faible dose majore la bradycardie (à basses fréquences de stimulation) puis l'inhibe à forte dose. (*Figure 52*).

Des agonistes sélectifs des récepteurs 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT) et 5-HT_{1B} (CGS-12066B) reproduisent la potentialisation de la 5-CT à doses faibles. Le L-694,247 (agoniste sélectif 5-HT_{1D}) reproduit l'action inhibitrice de la 5-CT à doses élevées. La contribution respective des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1D} a été confirmée par l'étude des antagonistes, méthiothepine (antagoniste 5-HT₁), WAY-100,635 (antagoniste 5-HT_{1A}) et BRL-15572 (antagoniste 5-HT_{1D}). (*Figures 53 à 56*).

La spécificité présynaptique des effets de la 5-HT et des autres agonistes a été établie en vérifiant l'inefficacité de ces traitements sur la bradycardie induite par l'administration exogène d'acétylcholine. (*Figure 57*).

Là encore, l'ensemble des résultats met en évidence une contribution majeure des récepteurs 5-HT₁ dans la modulation présynaptique de la neurotransmission parasympathique chez le rat diabétique, les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} étant responsables d'une potentialisation alors que le récepteur 5-HT_{1D} est impliqué dans une inhibition.

IV.- RÉCEPTEURS 5-HT ET REACTIVITÉ VASCULAIRE CHEZ LE RAT NORMAL ET DIABÉTIQUE

Les réponses vasculaires post-synaptiques liées à l'activation des différents récepteurs 5-HT ont été évaluées *in vitro*, sur le rein isolé de rat perfusé à débit constant. Une vasoconstriction est évaluée par l'augmentation de la pression de perfusion du rein, alors qu'une vasodilatation est évaluée par la réversion d'un tonus vasculaire préalablement induit par un constricteur (phényléphrine ou Ang II).

1.- Caractéristiques des reins isolés perfusés de rat

Le *tableau 27* résume les caractéristiques des reins isolés préparés à partir de rats normoglycémiques ou rendus diabétiques depuis un mois par la streptozotocine. Perfusés à un débit fixe de 8 ml/min, la pression de perfusion rénale était plus basse dans les reins provenant des rats diabétiques, témoignant d'une résistance vasculaire rénale abaissée. Ces reins étaient plus réactifs à la solution dépolarisante de KCl (100 mM). Pour l'étude des réponses vasodilatatrices, un tonus vasculaire d'environ 40 mm Hg a pu être rétabli avec des concentrations de phényléphrine semblables sur les reins contrôles et les reins diabétiques.

2.- Réponses vasoconstrictrices rénales

La 5-HT induit une vasoconstriction concentration-dépendante sur le lit vasculaire du rein isolé. La réponse maximale, obtenue pour une concentration de 1 μM , équivaut environ à celle induite par l'activation des récepteurs α -adrénergiques par la phényléphrine, mais est double de celle de celle induite par l'Ang II. La vasoconstriction à la 5-HT est abolie en présence de ritansérine, un antagoniste des récepteurs 5-HT₂, sans que n'apparaisse de relaxation sur ces reins dont le tonus vasculaire basal est très bas. En présence d'un inhibiteur de la synthèse de NO (L-NNA, 100 μM), la pression de perfusion basale est majorée de 30% ($88,4 \pm 4,6$ vs $67,8 \pm 4,11$ mm Hg, $n=9$, $P > 0,001$). Les réponses vasoconstrictrices de la 5-HT sont potentialisées, avec un déplacement vers la gauche de la courbe concentration-réponse d'un facteur 3, comme le montrent les valeurs des EC₅₀, sans modification toutefois des réponses maximales. (*Figure 58, tableau 28*).

Un agoniste sélectif des récepteurs 5-HT₂, l' α -méthyl-5-HT, reproduit la vasoconstriction rénale induite par la 5-HT. De même, le DOI, un agoniste des récepteurs 5-HT_{2A/2C}, et le m-CPP, un agoniste spécifique des récepteurs 5-HT_{2C}, induisent des vasoconstrictions rénales, mais avec des réponses maximales très abaissées, atteignant à peine 1/3 et 1/5 des réponses à la 5-HT. (*Figure 59, tableau 28*).

Le BW-723C86 par contre, un agoniste sélectif des récepteurs 5-HT_{2B}, n'a produit qu'une vasoconstriction insignifiante sur le lit vasculaire du rein isolé. Après restauration d'un tonus vasculaire par l'Ang II (41 ± 3 mm Hg, pour une concentration de $9,6 \pm 3,1$ nM, $n=4$), le BW-723C86 a induit une relaxation concentration-dépendante atteignant $35,4 \pm 9,2$ % pour la concentration de 5 μM . (*Figure 59*).

3.- Réponses vasodilatatrices rénales

Pour l'évaluation des réponses vasodilatatrices rénales, un tonus vasculaire a été restauré au préalable par des embols de phényléphrine ou d'Ang II toutes les minutes. Les pics de constriction étaient en moyenne de $41,1 \pm 1,7$ et de $42,1 \pm 1,4$ mm Hg

respectivement, pour des concentrations de phényléphrine de $1,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ($n = 24$), et d'Ang II de $7,9 \pm 1,2 \text{ nM}$ ($n = 15$). Il n'y avait pas de différence dans ce tonus induit entre les groupes expérimentaux.

Comme attendu, l'ACH induit une relaxation concentration-dépendante, inhibée à 75% en présence de $100 \mu\text{M}$ de L-NNA, témoignant d'un endothélium fonctionnel. Cette vasodilatation est indépendante du vasoconstricteur utilisé pour restaurer le tonus rénal (phényléphrine ou Ang II). Le nitroprussiate de sodium ($3 \mu\text{M}$), activant directement la voie de la guanylate cyclase dans le muscle lisse, produit une relaxation de près de 80% conforme aux résultats antérieurs de notre laboratoire. (*Figure 60*).

Dans le lit vasculaire rénal, un effet vasodilatateur a été observé après activation de divers types de récepteurs, 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} (agonistes sélectifs 8-OH-DPAT et CGS-12066B, respectivement) mais aussi 5-HT_{2B} (BW723C86) et 5-HT₇ (part de la vasodilatation induite par la 5-CT inhibée en présence de mésulergine). La 5-CT est en effet un agoniste des récepteurs 5-HT₁ et 5-HT₇, et la mésulergine un antagoniste des récepteurs 5-HT₂ et 5-HT₇. Le L-694,247 (agoniste 5-HT_{1D}) et la 1-phenylbiguanide (agoniste 5-HT₃) étaient par contre inactifs. Aucune de ces molécules n'a induit de réponse vasoconstrictrice sur le rein isolé perfusé. (*Figures 60 et 61*).

Il faut remarquer que les vasorelaxations rénales induites par la 8-OH-DPAT et le CGS-12066B étaient 2 à 3 fois plus importantes lorsque le tonus vasculaire était restauré par la phényléphrine que sur un tonus restauré par l'Ang II. La réponse vasodilatatrice à la 8-OH-DPAT étaient alors inhibée par le WAY-100,635, confirmant l'implication des récepteurs 5-HT_{1A}. Ce résultat suggère qu'une part importante de la réponse vasodilatatrice rénale induite par la 8-OH-DPAT était probablement liée à une interaction directe avec les récepteurs α -adrénergiques et non à l'activation des 5-HT_{1A}.

4.- Diabète sucré et modification des réponses vasculaires rénales

Sur les reins isolés à partir des animaux diabétiques, les vasoconstrictions rénales induites par les faibles concentrations de 5-HT sont majorées et celles induites aux fortes concentrations sont minorées. L'effet potentialisation aux faibles

concentrations est même plus marqué quand les reins contrôles sont perfusés avec un milieu comportant une concentration de glucose physiologique (5mM). La potentialisation est retrouvée pour l' α -méthyl-5-HT et le DOI (agonistes 5-HT₂). Elle n'est pas liée à un défaut en NO puisque la L-NNA (inhibiteur de la NO synthase) déplace la courbe dose-réponse de la 5-HT vers la gauche de manière similaire chez le rat normoglycémique ou diabétique. (*Figures 62 et 63*).

Les réponses vasodilatatrices induites par la 8-OH-DPAT ou le CGS-12066B sur des reins de rats diabétiques ne sont pas modifiées, tout comme d'ailleurs les relaxations induites par l'acétylcholine ou le nitroprussiate de sodium. Cependant, la participation du NO dans la relaxation induite par le CGS-12066B est majorée chez le rat diabétique. (*Figures 64 à 65*).

L'ensemble de ces résultats démontre que la réponse vasculaire rénale prépondérante de la 5-HT est une vasoconstriction *via* l'activation des récepteurs 5-HT₂, probablement majoritairement les récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2C}, et ceci bien que d'autres récepteurs soient présents et susceptibles d'induire une relaxation du lit vasculaire rénal. Dans le diabète sucré, cette vasoconstriction rénale est potentialisée pour les faibles doses de 5-HT ayant une pertinence physiopathologique, sans que nous ne puissions lier cet effet à un défaut en NO. Nous avons donc naturellement cherché à voir si l'expression vasculaire des récepteurs 5-HT était modifiée dans le diabète sucré.

V.- EXPRESSION VASCULAIRE DES RÉCEPTEURS 5-HT DANS LA DIABÈTE SUCRÉ

Les ARNm des récepteurs 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{2A} et 5-HT_{2B} sont présents. Les produits d'amplification générés par la PCR quantitative en temps réel correspondent aux fragments attendus, en fonction des primers sens et antisens choisis, comme le montre le gel d'agarose : 5-HT_{1A} (195 bp), 5-HT_{1B} (228 bp), 5-HT_{1D} (227 bp), 5-HT_{2A} (265 bp) et 5-HT_{2B} (155 bp). (*Figures 66*).

L'expression relative des récepteurs varie selon le type/sous-type de récepteur, mais aussi selon le vaisseau considéré. En particulier, sur les artérioles rénales, l'expression des récepteurs 5-HT_{2A/2B} et 5-HT_{1D} tend à être diminuée, alors que celle du récepteur 5-HT_{1A} est majorée. Dans tous les cas, nous n'avons trouvé aucune différence significative dans l'expression de ces récepteurs entre les rats diabétiques et les rats normoglycémiques. (*Figures 66 et 67*).

----- *Discussion* -----

DIABÈTE SUCRÉ INDUIT PAR L'ALLOXANE OU LA STREPTOZOTOCINE

Le diabète sucré a été induit par une injection d'alloxane ou de streptozotocine. Ces deux agents ont été largement utilisés et validés comme induisant un diabète sucré expérimental chez le rat (Öztürk *et al.*, 1996; Miranda *et al.*, 2000; Keynan *et al.*, 2000). Tous deux induisent un diabète sucré par la destruction des cellules β des îlots de Langerhans conduisant à un défaut en insuline (Szkudelski, 2001). Ils reproduisent ainsi un diabète comparable au diabète humain de type 1, insulino-dépendant, caractérisé par une hyperglycémie, une hypercholestérolémie et une augmentation de hémoglobine glycosylée (Agrawal *et al.*, 1987). Ce diabète est associé dans sa phase précoce, au niveau rénal, à une hyperfiltration glomérulaire que nous avons retrouvée dans notre étude. Elle est le premier signe de la néphropathie diabétique débutante.

Des études réalisées précédemment ont montré que le diabète sucré expérimental induit chimiquement par l'alloxane ou la streptozotocine est semblable dans ses conséquences au diabète sucré spontané, avec notamment une polyurie et une polyphagie. Dans nos expériences, les rats diabétiques n'ont plus pris de poids ou en ont même perdu par rapport à un groupe contrôle de même âge, une observation en accord avec celle d'autres auteurs (Öztürk *et al.*, 1996; Keynan *et al.*, 2000; De Vriese *et al.*, 2001; Miranda *et al.*, 2000).

Dans nos études, nous avons choisi d'étudier les animaux après une exposition à une hyperglycémie importante (> 400 mg/dl, soit 22 mM) pendant une période de 4 semaines. Pour ce faire, les rats diabétiques ont reçu de l'insuline à une dose leur assurant une survie adéquate, tout en maintenant une glycémie très déséquilibrée. Cette situation peut être considérée comme extrême puisqu'en clinique le diabète des patients est généralement mieux équilibré. Cette situation expérimentale devait nous permettre de mieux saisir les éventuelles altérations vasculaires dues à une exposition prolongée à une hyperglycémie.

5-HT ET TRANSMISSION SYMPATHIQUE VASCULAIRE

Les effets de la 5-HT et des divers agonistes des différents récepteurs 5-HT sont relativement bien connus dans le système cardiovasculaire. Ainsi, la 5-HT exerce des effets cardiovasculaires complexes (bradycardie ou tachycardie, hypotension ou hypertension, vasodilatation ou vasoconstriction) qui dépendent de nombreux facteurs (espèce animal, tonus vasculaire basal, le lit vasculaire étudié), dont le plus important reste le type de récepteur impliqué et sa localisation (Saxena *et al.*, 1987; Vanhoutte, 1987; Bagdy *et al.*, 1989; Villalon *et al.*, 1993; Miranda *et al.*, 2000). Cette diversité d'action est due au grand nombre de récepteurs qui sont actuellement clonés (5-HT₁ à 5-HT₇), six récepteurs couplés aux protéines G et un seul récepteur (5-HT₃) couplé à un canal ionique (Hoyer *et al.*, 1994; Hoyer *et al.*, 2002).

L'existence d'une interaction entre le système sérotonergique et adrénergique a souvent été recherchée depuis la découverte de la 5-HT. Au niveau central, la distribution des neurones adrénergiques et sérotonergiques est similaire, l'activité des neurones adrénergiques est régulée par la 5-HT, et des récepteurs sérotonergiques modulent la libération des neurotransmetteurs dans les terminaisons adrénergiques (Humphrey *et al.*, 1983). Des études réalisées dans diverses conditions expérimentales ont montré l'existence de récepteurs 5-HT localisés au niveau des terminaisons nerveuses pré- et post-ganglionnaires sympathiques, tant *in vivo* que *in vitro* (Molderings *et al.*, 1987; Villalón *et al.*, 1995).

Notre laboratoire a montré précédemment *in vivo*, l'existence de mécanismes sérotonergiques qui modulent la neurotransmission sympathique en périphérie, avec une implication en particulier des récepteurs 5-HT₁ (Morán *et al.*, 1994b, 1998). Ainsi, chez le rat déméduillé, la neurotransmission sympathique était modulée par des récepteurs sérotonergiques présynaptiques, la 5-HT exerçant une inhibition liée principalement au récepteur 5-HT_{1D} (sans que l'on puisse formellement exclure l'implication du récepteur 5-HT_{1A}), et une potentialisation liée à l'activation de récepteurs 5-HT₃.

En continuité avec cette ligne de recherche, et en ce qui concerne plus précisément ce mémoire de Thèse Doctorale, nous nous sommes proposés d'analyser les récepteurs impliqués dans la modulation sérotonergique de l'activité sympathique périphérique, chez des animaux diabétiques. Le diabète sucré est en effet une pathologie associée à une majoration des taux circulants de 5-HT (Martín *et al.*, 1995) et une modification de l'expression des récepteurs 5-HT dans le système nerveux central (Sandrini *et al.*, 1997). Il est aussi fréquemment associé à d'autres pathologies comme l'hypertension artérielle (Kam *et al.*, 1996).

Les complications vasculaires qui apparaissent dans le diabète sucré produisent des modifications des nerfs sensitifs, des nerfs moteurs, du système nerveux autonome et des altérations de la vasodilatation endothélium-dépendante (Ralevic *et al.*, 1995), ainsi que les alterations au niveau de l'endothéline-1, du thromboxane A₂ et de la 5-HT. Ces complications ont été bien caractérisées, tant chez des patients diabétiques que chez des animaux avec un diabète expérimental (Takeda *et al.*, 1991; Hodgson *et al.*, 1990; De Vriese *et al.*, 2000a). Mais, on ne dispose que de peu d'informations, pendant le développement du diabète, sur les modifications de réponse de l'endothélium et du muscle lisse vasculaire en réponse aux altérations de la neurotransmission au niveau des nerfs périphériques.

Le premier objectif de notre étude consistait à caractériser les récepteurs sérotonergiques qui modulent les réponses cardiovasculaires chez des rats hyperglycémiques. Les réponses cardiovasculaires ont été obtenues par la stimulation nerveuse totale du système nerveux sympathique chez le rat démyélinisé ou par l'administration exogène de NA. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus précédemment dans notre groupe chez des rats normoglycémiques.

Nos résultats chez les rats rendus diabétiques par l'alloxane, coïncident en partie avec ceux décrits chez des rats normoglycémiques (Morán *et al.*, 1994; Villalón *et al.*, 1995 a,b). En effet, les récepteurs 5-HT₁ sont là encore les récepteurs sérotonergiques principaux impliqués dans l'inhibition des réponses pressives obtenues par stimulation électrique. Par ailleurs, nous trouvons cependant aussi des différences entre les rats hyperglycémiques et les rats normoglycémiques, probablement liées aux modifications de la réactivité vasculaire, de la conductivité des nerfs périphériques et du

fonctionnement de l'endothélium au cours du diabète (Ralevick *et al.*, 1995; Miranda *et al.*, 2000; de Vriese *et al.*, 2000a).

Nos résultats montrent que les rats diabétiques sont moins sensibles à l'action inhibitrice de la réponse pressive par 5-HT. La 5-HT n'exerce en effet une action significative qu'à la dose de 10 µg/kg/min, alors qu'elle était déjà active, chez les rats normoglycémiques, à la dose de 1 µg/kg/min, aux fréquences de stimulation la plus faible (0,1 Hz).

L'inhibition sérotonergique est par ailleurs généralement plus importante pour les faibles fréquences de stimulation (> 80%). Cette caractéristique, commune avec les rats normoglycémiques (Docherty, 1988; Morán *et al.*, 1994), nous conduit à penser à une localisation plutôt présynaptique des récepteurs 5-HT impliqués, une donnée confirmée par l'absence d'effet de la 5-HT sur la réponse à la NA exogène. Ce résultat indique que l'existence d'une pathologie sous-jacente comme le diabète sucré ne modifie pas la nature majoritairement présynaptique de l'inhibition sérotonergique dans la neurotransmission sympathique.

Les résultats obtenus avec le 5-CT, un puissant agoniste des récepteurs 5-HT₁ et 5-HT₇ (Hoyer *et al.*, 1994), mettent en évidence un effet inhibiteur supérieur à celui exercé par la 5-HT elle-même, pour une dose plus faible (respectivement 5 et 10 µg/kg/min). Cette inhibition importante obtenue avec le 5-CT, alors que l' α -methyl-5-HT, un agoniste sélectif des récepteurs 5-HT₂ (Baxter *et al.*, 1995), ou la 1-fenylbiguanide, un agoniste des récepteurs 5-HT₃ (Ireland et Tyres, 1987 ; Chen *et al.*, 1991) étaient inactifs, confirme que l'effet inhibiteur présynaptique de la 5-HT est lié chez les rats diabétiques à l'activation de récepteurs 5-HT₁. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus précédemment par notre groupe et par d'autres chez les rats normoglycémiques, qui tous proposent que la 5-HT exerce son action inhibitrice présynaptique *via* l'activation de récepteurs 5-HT₁ (Morán *et al.*, 1994b; Villalón *et al.*, 1995a,b; Morán *et al.*, 1998; Villalón *et al.*, 1998; Fernández *et al.*, 2000a).

Il convient de souligner que, contrairement à ce qui se produit chez les rats normoglycémiques où notre groupe a montré que la 5-HT exerce également une action potentialisatrice de la neurotransmission sympathique *via* les récepteurs 5-HT₃ (Morán

et al., 1994b), nous n'avons pas retrouvé cet effet potentialisateur chez les animaux diabétiques. Ceci établit ainsi clairement une différence de réponse dans le diabète sucré, une situation où la 5-HT exerce exclusivement une action inhibitrice sur la neurotransmission sympathique.

Afin de confirmer la participation des récepteurs 5-HT₁ dans l'inhibition sérotonergique de la neurotransmission sympathique et d'exclure les récepteurs 5-HT₂ et 5-HT₃, nous avons réalisé des expériences en présence de divers antagonistes (méthiotépine, ritansérine et MDL-72222). Le prétraitement par la méthiotépine, un antagoniste non sélectif des récepteurs 5-HT_{1,2,5,6,7} (Hoyer *et al.*, 1994), inhibe par elle-même en partie l'action pressive induite par la stimulation sympathique (Fernández *et al.*, 2000a). L'association de méthiotépine à la 5-HT produit une inhibition légèrement supérieure à celle que nous trouvons avec la méthiotépine seule, mais on ne peut pas conclure que l'action inhibitrice de la 5-HT soit bloquée. Cette action inhibitrice mise en évidence avec la méthiotépine s'explique par l'activité antagoniste α -adrénergique décrite pour ce produit (Leysen *et al.*, 1985) et confirmé par notre groupe de travail (Fernández, 1999). Cet effet antagoniste α -adrénergique est d'autant plus intéressant qu'un dysfonctionnement du système nerveux autonome est décrit dans le diabète (Abebe & McLeod, 1990; Taylor *et al.*, 1994; Tesfamariam and Cohen, 1995) et confirmé dans notre étude, où nous observons une potentialisation des réponses pressives induites par la stimulation électrique chez les rats diabétiques.

Le prétraitement par un antagoniste sélectif des récepteurs 5-HT₂, la ritansérine (Awouters *et al.*, 1988), ou par le MDL-72222 (Fozard, 1984), un antagoniste des récepteurs 5-HT₃, ne modifie pas l'action inhibitrice induite par la 5-HT. Ces résultats permettent d'exclure la participation des récepteurs 5-HT₂ et 5-HT₃, et semblent confirmer que, tout comme chez les animaux normoglycémiques, l'inhibition sympathique induite par la 5-HT est préférentiellement due à la participation de récepteurs 5-HT₁. Cependant, puisque i) le 5-CT est aussi un agoniste puissant des récepteurs 5-HT₇, ii) la méthiotépine se comporte comme un antagoniste de ces récepteurs et iii) il a été récemment décrit que l'activation des récepteurs 5-HT₇ induit une hypotension (Hoyer *et al.*, 1994), nous avons testé la mésulergine, un antagoniste avec une certaine sélectivité par des récepteurs 5-HT₇ (Villalón *et al.*, 1998; Centurión

et al., 2000). Cet antagoniste, là encore, inhibe lui-même partiellement les réponses pressives induites par la stimulation électrique, mais ne bloque pas les effets de la 5-HT. Ceci nous permet d'exclure la participation des récepteurs 5-HT₇ dans les effets de la 5-HT.

Pour définir quel sous-type de récepteurs 5-HT₁ est impliqué dans l'effet de la 5-HT, nous avons poursuivi notre démarche expérimentale en testant divers agonistes et/ou antagonistes sélectifs des divers sous-types de récepteurs 5-HT₁. Rappelons que les travaux antérieurs de notre groupe chez des rats normoglycémiques avaient établi que l'inhibition était majoritairement liée à l'activation des récepteurs 5-HT_{1D} (Móran *et al.*, 1994b).

Chez les rats diabétiques, l'effet inhibiteur de la 5-HT est exclusivement reproduit par un agoniste sélectif des récepteurs 5-HT_{1A}, la 8-OH-DPAT (Middlemis et Fozard, 1983; Hoyer *et al.*, 1994). Ni la perfusion intraveineuse d'un agoniste sélectif des récepteurs 5-HT_{1B}, le CGS-12066B (Neale *et al.*, 1987), ni celle d'un agoniste sélectif des récepteurs 5-HT_{1D}, le L-694.247 (Beer *et al.*, 1993; Hoyer *et al.*, 1994) n'ont modifié les pics de pression obtenus par la stimulation électrique.

Le fait que l'action inhibitrice se reproduise pour des doses comparables de 8-OH-DPAT et de 5-CT, nous conduit à penser que les récepteurs majoritairement impliqués dans l'inhibition de la neurotransmission sympathique chez le rat diabétique sont de type 5-HT_{1A} pour lesquels ces deux agonistes ont une affinité semblable (pCE₅₀ = 8.2 et 8.6, respectivement; Hoyer *et al.*, 1994), et non les récepteurs 5-HT₇ (pCE₅₀ = 7.4 et 9.5, respectivement).

Castillo *et al.*, (1994) décrivent une possible activation de récepteurs α 2-adrénergiques présynaptiques par la 8-OH-DPAT. Mais, dans nos expériences, l'effet inhibiteur de cet agoniste était totalement aboli par un antagoniste sélectif des récepteurs 5-HT_{1A}, le WAY-100,635 (Fletcher *et al.*, 1994). L'abolition complète par cet antagoniste de l'action inhibitrice de la 5-HT elle-même, confirme la participation exclusive des récepteurs 5-HT_{1A} dans l'effet inhibiteur de la 5-HT.

En accord avec ce dernier point, un agoniste sélectif des récepteurs 5-HT_{1B}, le CGS-12066B, ou des récepteurs 5-HT_{1D}, le L-694.247 était incapable de reproduire la réponse inhibitrice de la 5-HT sur l'activation sympathique chez le rat diabétique.

Ces résultats sont différents de ceux obtenus précédemment chez des rats normoglycémiques. Ainsi, Villalón *et al.*, (1998) rapportent que les récepteurs 5-HT_{1A}, mais aussi 5-HT_{1B} et 5-HT_{1D}, sont impliqués dans la réponse inhibitrice développée par la 5-HT. Par ailleurs, notre groupe a montré que les récepteurs 5-HT_{1D}, et dans une moindre mesure 5-HT_{1A}, sont impliqués (Morán *et al.*, 1994; Morán *et al.*, 1998). Nos résultats indiquent ainsi que le diabète sucré est associé à d'importants changements dans la population de récepteurs impliqués dans la modulation sérotonergique de la transmission sympathique.

La possibilité d'un changement dans la population des récepteurs 5-HT_{1A} dans le diabète sucré a déjà été évoquée et documentée au niveau du système nerveux central chez le rat (Sandrini *et al.*, 1997) et chez l'homme (Price *et al.*, 2002). Une augmentation de la population des récepteurs 5-HT_{1A} permettrait de mieux comprendre nos propres résultats chez les rats hyperglycémiques. Ces récepteurs ont une localisation présynaptique, puisqu'aucun des agonistes utilisés n'a modifié les réponses pressives induites par l'administration exogène de NA.

Il faut souligner cependant que nous n'avons pas trouvé de surexpression du récepteur 5-HT_{1A} dans l'aorte thoracique (par RT-PCR), chez des rats rendus diabétiques par la streptozotocine, comme nous le détaillerons ultérieurement dans ce mémoire. Ainsi, nos résultats ne s'expliquent probablement pas par une augmentation du nombre de récepteurs 5-HT_{1A}, mais plutôt par une modulation des réponses par des facteurs endothéliaux (discutés ci-après), et/ou des modifications au niveau des voies de signalisation intracellulaires activées par les récepteurs 5-HT₁ sérotonergiques.

Le diabète est connu pour induire des modifications vasculaires diverses notamment en ce qui concerne le NO (De Vriese *et al.*, 2000a). Nous nous sommes donc proposés, dans un second temps, d'analyser si la réponse inhibitrice de la 5-HT *via* l'activation des récepteurs 5-HT₁ était modulée différemment ou mettait en jeu des voies de signalisation différentes chez les rats normoglycémiques et les rats

hyperglycémiques. Cette démarche était d'autant plus pertinente que les récepteurs 5-HT_{1D} (et 5-HT_{1A}) étaient impliqués dans réponse inhibitrice de la 5-HT chez les rats normoglycémiques (Morán *et al.*, 1994b, 1998), alors que les récepteurs 5-HT_{1A} étaient exclusivement responsables de cet effet chez les rats diabétiques.

Nous avons ainsi recherché si le monoxyde d'azote (NO), facteur de relaxation endothélial, participait à l'inhibition sérotonergique chez les rats normoglycémiques. Le NO est synthétisé à partir de la L-arginine par la NO synthase (NOS), un enzyme dépendant du calcium. C'est un facteur essentiel dans l'homéostasie vasculaire. Ainsi, le traitement des rats par un inhibiteur de la NOS, le L-NAME, réduit la libération basale de NO, majore la résistance vasculaire et induit une hypertension artérielle (Rees *et al.*, 1990).

Dans nos expériences chez les rats normoglycémiques, l'administration de L-NAME majore la pression artérielle moyenne des animaux d'environ 68.2 ± 3.4 mm Hg, et majore aussi les pics de pression artérielle obtenus par les stimulations électriques. Ceci confirme le rôle modulateur du NO, tant dans la régulation basale de la pression artérielle que dans la réponse aux constricteurs.

Chez les rats normoglycémiques, nous n'avons pas trouvé de différence, en présence de L-NAME, dans l'inhibition des réponses pressives induites par la stimulation sympathique, que cette inhibition ait été produite par l'agoniste sélectif des récepteurs 5-HT_{1A}, la 8-OH-DPAT, ou par l'agoniste sélectif des récepteurs 5-HT_{1D}, le L-694,247. Ces résultats montrent que le NO n'est pas impliqué dans l'action inhibitrice présynaptique de la 5-HT dans la neurotransmission sympathique.

Toutefois, divers travaux ont montré que le NO participe ou module certaines réponses vasculaires sérotonergiques (Moldering *et al.*, 1987; Schoeffter et Hoyer, 1990; Ralevic *et al.*, 1995; Miranda *et al.*, 2000), et que cette modulation par le NO pouvait être majorée dans le diabète (Miranda *et al.*, 2000). En accord avec ces résultats, il faut souligner qu'un dysfonctionnement endothélial, avec un accroissement de la production de NO, a été largement décrit dans le diabète (Pieper *et al.*, 1998; Fitzgerald et Brands, 2000; Komers et Anderson, 2003). La production excessive de NO semble d'ailleurs contribuer à l'hyperfiltration glomérulaire et à la vasodilatation rénale

caractéristiques de la phase précoce du diabète sucré (Sugimoto *et al.*, 1998). Une surexpression des trois isoformes de la NOS (eNOS, iNOS et nNOS) a d'ailleurs été rapportée en Western Blot une semaine après l'induction du diabète (Choi *et al.*, 1997). Cette activation excessive de la voie du NO dans le diabète est en apparence contradiction avec l'altération généralement décrite de cette voie dans cette pathologie, avec une perte de la vasodilatation endothélium-dépendante (De Vriese *et al.*, 2000a). Nous y reviendrons dans la discussion de nos résultats sur le rein isolé.

La contribution de l'endothélium dans la régulation de la réactivité vasculaire est complexe, et met en jeu à la fois des substances vasoconstrictrices (Ang II, endothéline-1, thromboxane A₂ et prostaglandines) ou vasodilatatrices (NO, prostacycline, facteur d'hyperpolarisation dérivé de l'endothélium ou EDHF). Le tonus vasculaire résulte alors de l'équilibre entre ces divers facteurs (Furchgott et Vanhoutte, 1989; Moncada *et al.*, 1991).

C'est pourquoi, en suivant un protocole identique à celui utilisé chez les rats normoglycémiques, nous avons cherché à évaluer la participation du NO dans l'inhibition sérotonergique de la neurotransmission sympathique chez les rats hyperglycémiques.

Dans nos expériences, l'administration de L-NAME chez les rats diabétiques majore la pression artérielle moyenne d'environ 57.9 ± 3.8 mm Hg. Elle potentialise aussi les pics de pression artérielle induits par la stimulation électrique. Ces observations sont similaires à celles que nous avons faites chez les rats normoglycémiques et conformément aux effets attendus d'une inhibition de la NOS par le L-NAME.

Les études réalisées en présence de L-NAME, montrent que l'inhibition présynaptique sérotonergique de la transmission dépend au moins en partie du NO chez les rats diabétiques. En effet, les effets inhibiteurs de la 5-HT ou de la 8-OH-DPAT sur les pics de pression après stimulation électrique sont amoindris après inhibition de la NOS par le L-NAME. Les effets du L-NAME sont réversés par l'administration de L-arginine, qui restaure la synthèse de NO (Palmer *et al.*, 1988a,b; Schmidt *et al.*, 1992; Tousoulis *et al.*, 1999), mais non par la D-arginine qui n'est pas un substrat de la NOS.

Ces résultats mettent en évidence, comme cela a été suggéré par d'autres auteurs dans des conditions expérimentales différentes des nôtres (Sugimoto *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 1999; Schoeffter et Hoyer, 1990; Ralevic *et al.*, 1995; Miranda *et al.*, 2000) qu'il existe une anomalie de la voie du NO dans le diabète. Pour notre part, nous démontrons que le NO participe dans la modulation présynaptique des réponses sympathiques chez les rats diabétiques mais non chez les rats normoglycémiques.

L'implication du NO dans les actions inhibitrices sérotonergiques sur les réponses pressives induites par la stimulation sympathique totale, est confirmée par les expériences menées en présence d'ODQ, un inhibiteur de la guanylyl-cyclase (Lovren et Trigel, 2000; Sand *et al.*, 2002; Bryan-Lluka *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005). La guanylyl-cyclase est en effet la cible privilégiée du NO (Florez *et al.*, 2003) et son activation induit une relaxation *via* la majoration du GMPc. Dans nos expériences, l'ODQ abolit l'action inhibitrice de la 8-OH-DPAT. Ceci démontre que le NO, *via* l'activation de la guanylyl-cyclase, est impliqué dans l'inhibition présynaptique de la neurotransmission sympathique chez le rat diabétique qui met exclusivement en jeu les récepteurs 5-HT_{1A}.

Nous avons aussi envisagé une modulation de l'action sérotonergique présynaptique dans la neurotransmission sympathique par la voie des cyclooxygénases (COX), puisqu'une interaction entre le système sérotonergique et la COX a été décrite (Blackshear *et al.*, 1986; 1991; Tuncer y Vanhoutte, 1991; Ding *et al.*, 1989b).

Des résultats antérieurs de notre laboratoire (Calama *et al.*, 2003) ont montré que l'inhibition de la synthèse des prostaglandines par l'indométhacine, à une dose habituellement utilisée pour inhiber la COX et la production de prostaglandines (Roman et Kauker, 1978; Blackshear *et al.*, 1986; Ding *et al.*, 1989a) ne modifie pas la réponse vasodilatatrice induite par la 5-HT dans le train postérieur du rat anesthésié. Toutefois pour d'autres auteurs, la libération de prostaglandines participe aux réponses vasodilatatrices serotonérgiques ou module les réponses vasoconstrictrices sur d'autres territoires vasculaires, notamment sur le lit vasculaire rénal du chien (Blackshear *et al.*, 1986; 1991) ou du rat (Tuncer y Vanhoutte, 1991; Ding *et al.*, 1989b).

Par ailleurs, diverses perturbations de la voie des prostaglandines ont été décrites dans le diabète sucré. Ainsi, une augmentation de l'expression des deux isoformes de la COX a été rapportée par Western blot dans la médulla rénale du rat diabétique (Nasrallah *et al.*, 2003). Par ailleurs, la majoration de la réponse contractile à la phényléphrine sur des aortes de rat diabétiques implique le thromboxane A₂ (Xavier *et al.*, 2003). D'autres auteurs ont montré que la relaxation endothélium-dépendante était altérée dans le diabète du fait d'une majoration de prostaglandines vasoconstrictrices dérivées de l'acide arachidonique, thromboxane A₂ et prostaglandine H₂ (Teschfamiar, 1994).

Dans notre travail, l'administration d'indométhacine à une dose de 2 mg/kg chez les rats normoglycémiques abolit complètement l'effet inhibiteur produit par le L-694,247 (agoniste sélectif des récepteurs 5-HT_{1D}) sur les réponses pressives induites par la stimulation sympathique (à toutes les fréquences de stimulation). Il en est de même sur l'effet inhibiteur produit par la 8-OH-DPAT (agoniste sélectif des récepteurs 5-HT_{1A}), mais uniquement pour les fréquences de stimulation les plus élevées. Toutefois, chez les rats diabétiques, l'effet inhibiteur produit par la 8-OH-DPAT n'est plus modifié par l'indométhacine. Ce résultat montre là encore que les mécanismes régulateurs impliqués dans les réponses sérotoninergiques diffèrent entre les rats diabétiques et les rats normoglycémiques. Il témoigne aussi du fait que la voie de la COX contribue à la régulation des réponses chez les rats normoglycémiques alors que la voie du NO/GMPc contribue à la régulation des réponses chez le rat diabétique.

Que ces différences soient liées à des différences d'activité ou d'expression des COX dans le diabète, ou à la nature des récepteurs 5-HT impliqués n'est actuellement pas établi. On peut cependant remarquer que l'implication majeure des récepteurs 5-HT_{1A} dans les régulations sérotoninergiques présynaptiques chez les animaux diabétiques pourrait expliquer la contribution majeure du NO dans cette situation. Celle-ci pourrait être majeure chez les animaux diabétiques comme nous l'avons déjà évoqué précédemment (Pieper *et al.*, 1998 ; Fitzgerald et Brands, 2000). Finalement, un autre mécanisme régulateur a été envisagé, *via* l'activation des canaux potassiques ATP-dépendants (K_{ATP}) par un facteur d'hyperpolarisation. Pour évaluer son implication,

nous avons administré aux animaux du glibenclamide, un inhibiteur sélectif de ces canaux (Kwan *et al.*, 2003 ; Ning *et al.*, 2004 ; Watanabe *et al.*, 2005).

L'administration de glibenclamide n'a pas modifié les effets inhibiteurs de la 8-OH-DPAT chez les rats hyperglycémiques ou normoglycémique, suggérant que ces canaux ne soient pas impliqués dans l'inhibition sérotonergique des réponses pressives induites par la stimulation sympathique totale.

D'accord avec nos résultats, on peut confirmer que la diabète induit des changements dans les voies de signalisation intracellulaire activées par les récepteurs 5-HT_{1A} ou 5-HT_{1D}, principaux récepteurs responsables de l'action inhibitrice que 5-HT exerce en la transmission sympathetic en normoglycémie (Morán *et al.*, 1994b ; 1998). Il est probable que la plus grand production de NO chez le rat diabétique (Pieper *et al.*, 1998; Fitzgerald y Brands, 2000; Komers y Anderson, 2003) justifié le fait que suelement l'activation de subtype 5-HT_{1A}, directement relationé avec nos résultats dans cette voie, est le responsable de l'inhibition simpatique en hyperglycemie, a difference de ce que l'on déjà connait chez le rat normoglycemique.

5-HT ET TRANSMISSION CHOLINERGIQUE CARDIAQUE

Contrairement à la diversité et au grand nombre d'études s'intéressant aux effets possibles du système sérotonergique dans la modulation de la transmission sympathique, la grande majorité des études analysant la possibilité d'une implication sérotonergique dans les effets parasympathiques cardiovasculaires se sont intéressés au contrôle sérotonergique central de l'activation réflexe vagale. Les résultats suggèrent que des voies sérotonergiques centrales puissent contrôler le tonus vagal du coeur (Ramage et Fozard, 1987; Sporton *et al.*, 1991, Ramage et Mifflin, 1998; Jordan, 2004).

Les résultats sont très variables quant à l'effet de la 5-HT et quant aux récepteurs impliqués. En effet, une action dépolarisante avec une augmentation de l'activité du vague a été rapportée après l'activation des récepteurs 5-HT₃ et 5-HT₂ (Kirby et McQueen, 1984; Yoshioka *et al.*, 1992), 5-HT₄ (Tonini *et al.*, 1991), et même 5-HT_{1A} (Ramage *et al.*, 1988; Sporton *et al.*, 1991; Skinner *et al.*, 2002). Une action inhibitrice sur la libération d'acétylcholine a cependant aussi été décrite, préférentiellement suite à l'activation des récepteurs 5-HT₁ (Galligan *et al.*, 1988 ; Tonini *et al.*, 1992), mais aussi après l'activation des récepteurs 5-HT₂ (Morán *et al.*, 1994a).

La connaissance des différents types et sous-types de récepteurs sérotonergiques s'est considérablement améliorée ces dernières années, grâce surtout à l'apparition d'outils spécifiques, agonistes ou antagonistes, des divers récepteurs. Elle a permis de confirmer le rôle important que joue la 5-HT, du moins au niveau central, dans le contrôle du tonus vagal (Jordan, 2004) où, outre les récepteurs 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, et 5-HT₄ déjà mentionnés ci-dessus, la participation des récepteurs 5-HT₇ est maintenant aussi établie (Kellet *et al.*, 2004).

Nous avons déjà mentionné que le diabète sucré est une pathologie qui entraîne d'importantes modifications cardiovasculaires. Le risque d'accidents cardiovasculaires est majoré chez les patients diabétiques du fait, notamment, d'un dysfonctionnement du système nerveux autonome (Ewing *et al.*, 1980; Makimattila *et al.*, 1997).

L'hyperactivité sympathique et la plus grande libération de noradrénaline cardiaque, jouent un rôle fondamental dans la prévision des complications cardiovasculaires. Les études sont plus rares qui rapportent une anomalie du contrôle cholinergique des fonctions cardiaques chez le patient diabétique (Oberhauser *et al.*, 2001). Les modifications cardiaques qui ont été décrites dans les réponses cholinergiques muscariniques au cours du diabète ont été très diverses, puisque une hypersensibilisation mais aussi une hyposensibilisation ont été rapportées, incluant ou non des changements dans l'expression des récepteurs (Vadlamudi et McNeil, 1983; Li *et al.*, 1989; Carrier *et al.*, 1984; Wong, 1994).

La variabilité de ces réponses peut être due aux différents modèles expérimentaux utilisés dans les études et/ou au stade différent dans l'évolution du diabète où les animaux ont été utilisés (Wald *et al.*, 1998). En général, on admet qu'il existe un accroissement de la population des récepteurs neuronaux muscariniques M_2 (inhibiteurs de la libération d'acétylcholine) qui seraient responsables de la diminution des réponses muscariniques *postsynaptiques* (M_3) produites par la stimulation électrique, comme cela a été montré sur l'iléon et la trachée de rats diabétiques (Coulson *et al.*, 2002), sur le poumon du rat (Belmonte *et al.*, 1997), la vessie du rat (Tong *et al.*, 1999, Tong *et al.*, 2002) et même sur des oreillettes d'origine humaine (Oberhauser *et al.*, 2001).

Dans une étude antérieure réalisée dans notre laboratoire sur des rats normoglycémiques, une action inhibitrice de la transmission parasymphatique a été mise en évidence *via* l'activation des récepteurs 5-HT₂, ainsi qu'une action potentialisatrice *via* l'activation des récepteurs 5-HT₃ (Morán *et al.*, 1994a). Dans le travail développé dans cette Thèse Doctorale, nous souhaitons vérifier i) si ces modulations de la transmission parasymphatique par la 5-HT persistent au cours du diabète sucré, ii) si elles mettaient en jeu l'activation des mêmes récepteurs sérotonergiques.

Dans les conditions expérimentales que nous avons utilisées, nous observons une réduction de la fréquence cardiaque induite par la libération d'acétylcholine en stimulant les neurones cardiaques vagues, préférentiellement préganglionnaires (Roquebert *et al.*,

1991). L'acétylcholine libérée active les récepteurs muscariniques *postsynaptiques* et produit une bradycardie.

Si nous comparons les diminutions de la fréquence cardiaque induites par les stimulations électriques chez les rats rendus diabétiques par l'alloxane (-28.2, -53.4 et -87.1 battements/min aux fréquences de stimulation 3, 6 et 9 Hz respectivement), avec les diminutions obtenues précédemment dans notre laboratoire chez des animaux normoglycémiques (-39.5, -70 et -94.4 battements/min aux mêmes fréquences de stimulation), nous observons une diminution significative des réponses à toutes les fréquences de stimulation utilisées chez les animaux diabétiques. Toutefois, en ce qui concerne la bradycardie obtenue par l'administration exogène d'acétylcholine (que nous pouvons comparer à la dose unique de 10 µg/kg), la bradycardie est considérablement majorée chez les rats diabétiques (-110.8 *versus* -47 battements/min, respectivement chez les rats hyper- et normoglycémiques).

Ces résultats paraissent en accord avec l'hypo- ou l'hypersensibilisation muscarinique décrite sur d'autres territoires et pour d'autres types de réponses muscariniques, comme par exemple sur la vessie du lapin rendu diabétique par l'alloxane (Ichiyangi *et al.*, 2002), ou sur l'iléon et la trachée de rats rendus diabétiques par la streptozotocine (Coulson *et al.*, 2002). Nous avons déjà mentionné que ces auteurs proposent une hypersensibilisation des récepteurs inhibiteurs M₂ présynaptiques qui conduisent à une moindre libération d'acétylcholine, et par conséquent, à une moindre réponse muscarinique postsynaptique.

Dans notre modèle expérimental, une hypersensibilisation des récepteurs M₂ peut rendre compte de nos observations, comme cela a aussi été décrit sur des oreillettes provenant de cœur de patients diabétiques (Oberhauser *et al.*, 2001). Ceci permettrait d'expliquer la plus petite réponse obtenue par stimulation électrique, liée à une libération amoindrie d'acétylcholine, tout en dissociant celle-ci de la réponse à l'administration d'acétylcholine exogène (qui est majorée).

Dans notre étude, nous trouvons par ailleurs des différences dans les effets de la 5-HT et de divers agonistes sérotonergiques sur la bradycardie obtenue par la stimulation du nerf vague. Ainsi, la 5-HT, quelque soit la dose testée (10 à 200 µg/kg),

ne produit jamais d'inhibition de la réponse à la stimulation vagale chez le rat diabétique, et produit ponctuellement une potentialisation de la bradycardie. Rappelons que, dans des animaux normoglycémiques, les résultats préalablement obtenus par notre groupe dans des conditions expérimentales tout à fait semblables (Morán *et al.*, 1994a) montraient une inhibition *via* l'activation des récepteurs 5-HT₂ et une potentialisation *via* l'activation des récepteurs 5-HT₃.

Chez les animaux diabétiques, une potentialisation (à faible dose) et une inhibition (à forte dose) de la réponse à la stimulation du nerf vague peuvent cependant être observée avec le 5-CT, un agoniste des récepteurs 5-HT₁ et 5-HT₇. Les deux types de réponses mettent en jeu des sous-types de récepteurs spécifiques. Ainsi, la potentialisation peut être reproduite avec des agonistes sélectifs des récepteurs 5-HT_{1A}, la 8-OH-DPAT, et 5-HT_{1B}, le CGS-12066B, alors que l'inhibition est reproduite par le L-694.247, un agoniste sélectif des récepteurs 5-HT_{1D}.

La potentialisation produite par le 5-CT est antagonisée partiellement par la mésulergine, un antagoniste des récepteurs 5-HT₁ et 5-HT₇, souvent utilisé comme antagoniste 5-HT₇ (Villalón *et al.*, 1998 ; Centurion *et al.*, 2000). Ces résultats pourraient indiquer qu'au moins en partie, l'action directe que cet agoniste exerce sur ces récepteurs sérotonergiques hypotenseurs et bradycardisants, peut contribuer à une augmentation de la bradycardie induite dans des rats diabétiques avec stimulation vagale. Mais comme i) les agonistes sélectifs des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} sont aussi potentialisateurs, ii) que la méthiotépine, un antagoniste non spécifique 5-HT_{1,2,5,6,7} annule l'action du 5-CT, et iii) que l'antagoniste WAY-100,635 annule l'action de 8-OH-DPAT, nous pouvons suggérer que, en plus de l'action régulatrice centrale connue des récepteurs 5-HT_{1A} (Ramage *et al.*, 1988 ; Sporton *et al.*, 1991; Skinner *et al.*, 2002), l'activation périphérique de ces récepteurs sérotonergiques contribue aussi à moduler la transmission cholinergique.

Un autre aspect important de notre travail mérite d'être souligné. En effet, chez les animaux normoglycémiques, les agonistes sérotonergiques modifient seulement les réponses muscariniques dérivées de la stimulation vagale, mais non la bradycardie induite par l'administration exogène d'acétylcholine. Chez les rats diabétiques au contraire, nous notons aussi une potentialisation des réponses induites par

l'administration exogène d'acétylcholine. Ces résultats indiquent que les modulations sérotonergiques sont présentes dans le diabète sucré expérimental, à la fois au niveau pré- et postsynaptique.

Les actions de la 5-HT et des divers agonistes sont cependant moins marquées chez les animaux diabétiques par rapport aux rats normoglycémiques. Ceci nous permet de suggérer que les réponses sérotonergiques au niveau parasympathique cardiaque sont globalement atténuées en situation de diabète expérimental, avec une implication majeure des récepteurs 5-HT₁ tant dans l'inhibition que dans la potentialisation cholinergique muscarinique cardiaque.

En résumé, par rapport à l'activité et aux mécanismes sérotonergiques impliqués dans l'inhibition et/ou la promotion de la neurotransmission parasympathique cardiaque, nous pouvons conclure que le diabète expérimental induit des changements dans la localisation et dans le type des récepteurs sérotonergiques impliqués, avec une implication de récepteurs 5-HT₁ à la fois pré- et postsynaptiques.

RÉPONSES VASCULAIRES RÉNALES LIÉES AUX RÉCEPTEURS SEROTONERGIQUES

Dans cette partie de mon travail de Thèse Doctorale, nous avons cherché à caractériser les réponses vasculaires rénales induites par la 5-HT, et plus particulièrement les récepteurs impliqués, avant de rechercher d'éventuelles modifications au cours du diabète sucré. Le rein a tout particulièrement retenu notre attention pour cette étude vasculaire, dans le contexte du diabète, puisque le lit vasculaire rénal est une cible privilégiée des altérations vasculaires qui surviennent au cours du diabète, de préférence sur les vaisseaux de résistance. Au niveau rénal, les conséquences sont graves pour le patient qui évolue vers la néphropathie diabétique et l'insuffisance rénale.

Nous avons mis à profit la préparation du rein isolé perfusé du rat pour analyser *in vitro*, à l'abri des régulations neurohumorales, les réponses vasculaires liées à l'activation des différents récepteurs 5-HT. Dans ce modèle expérimental, contrairement aux études réalisées sur les seules artères rénales (Watts and Thompson, 2004; Miranda *et al.*, 2002), nous avons accès à l'intégralité du lit vasculaire rénal dont l'hétérogénéité en terme de réponse à la 5-HT a été décrite par Endlich *et al.* (1992). Dans cette étude, l'administration locale de 5-HT sur le rein hydronéphrotique du rat a permis de visualiser une constriction essentiellement des gros vaisseaux (artéioles arquées) alors que les artéioles interlobulaires et afférentes se dilataient. Ceci pourrait témoigner d'une répartition spécifique des sous-types de récepteurs 5-HT le long de l'arbre vasculaire intra-rénal. Le rein isolé perfusé conserve aussi un endothélium intacte et fonctionnel, comme en témoignent les réponses vasodilatatrices induites par l'Ach, la bradykinine et les forces de cisaillement dans cette étude et/ou dans nos travaux antérieurs (Stephan *et al.*, 1995 ; Bagate *et al.*, 2001 ; Loichot *et al.*, 2002). La préservation d'un endothélium fonctionnel était importante puisque nous pouvions suspecter des réponses vasodilatatrices endothélium-dépendantes pour de nombreux récepteurs 5-HT (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{2B} et 5-HT₄) dont les ARNm ont été détectés dans les cellules endothéliales en culture (Ullmer *et al.*, 1995, 1996). Les

récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT₇ étaient par contre exclusivement présents dans les vaisseaux, sur les cellules musculaires lisses (Ullmer et al., 1995). Nous suspicions par ailleurs des modifications au cours du diabète sucré liées au NO.

Nos résultats confirment que la 5-HT, le ligand endogène de l'ensemble des récepteurs 5-HT, induit essentiellement une réponse vasoconstrictrice rénale. Elle est complètement inhibée en présence de ritansérine (10 nM), démontrant par là l'implication essentielle des récepteurs 5-HT₂. La concentration efficace 50 de la 5-HT (CE₅₀: 0,34 µM) est du même ordre que les CE₅₀ déterminées sur l'artère rénale de rat ou de lapin (Watts et Thompson, 2004; Miranda et al., 2002). Les réponses maximales sont par contre très différentes, équivalentes à celles de la phényléphrine sur le rein isolé ou les artères rénales (Watts et Thompson, 2004), mais correspondant à seulement à 20% de la réponse du KCl sur les artères rénales du lapin (Miranda et al., 2002).

En fonction des valeurs des CE₅₀, nous pouvons établir un profil de puissances relatives : DOI > 5-HT > α-methyl-5-HT > m-CPP. Ce profil ressemble à celui décrit sur l'artère rénale du rat (Watts et Thompson, 2004) ou l'aorte de souris (McKune et Watts, 2001), bien que des différences importantes sont à souligner.

- En premier lieu, le BW723C86 n'induit pas de constriction sur le rein isolé, mais une relaxation, excluant ainsi le récepteur 5-HT_{2B} des mécanismes vasoconstricteurs, comme c'est d'ailleurs aussi le cas sur le lit vasculaire de la patte arrière (Calama *et al.*, 2002).
- En second lieu, le DOI apparaît comme un agoniste partiel, comme d'ailleurs aussi *in vivo* chez le rat déméduillé (Chaouche-Teyara *et al.*, 1993) ou sur l'aorte de souris (McKune et Watts, 2001). Il en est de même du mCPP, agoniste plein sur l'aorte de souris mais dont la réponse est particulièrement faible sur le rein isolé. Ces activités agonistes partielles apparentes du DOI et du mCPP pourraient être dues sur le rein isolé à une pondération par le NO *via* l'activation concomitante de récepteurs 5-HT endothéliaux. Tous deux sont d'ailleurs des agonistes du récepteur 5-HT_{2B} (Knight et al., 2004), dont nous verrons ci-après qu'il induit une vasodilatation sur notre préparation rénale. L'activation des

récepteurs 5-HT_{2B} sur des cellules endothéliales d'artères coronaires humaines en culture provoque d'ailleurs une libération de NO (Ishida *et al.*, 1998).

- En troisième lieu, l'ensemble des agonistes des récepteurs 5-HT₁ et 5-HT₇, la 5-CT (agoniste 5-HT₁ et 5-HT₇), la 8-OH-DPAT (agoniste 5-HT_{1A}), le CGS-12066B (agoniste 5-HT_{1B}), le L-694,247 (agoniste 5-HT_{1D}), ainsi que l'agoniste du récepteur 5-HT₃, la 1-phénylbiguanide, étaient dépourvus de tout effet vasoconstricteur rénal.

L'ensemble de ces résultats est en faveur d'une vasoconstriction rénale essentiellement liée à l'activation des récepteurs 5-HT_{2A}, comme cela a aussi été suggéré sur l'artère rénale du rat et l'aorte de souris (Watts et Thompson, 2004 ; McKune et Watts, 2001). Une conclusion définitive quant à la participation des récepteurs 5-HT_{2C} pourra être obtenue en testant un antagoniste sélectif de ce récepteur, le RS 102221 (Knight *et al.*, 2004), sur la réponse induite par la 5-HT. Le récepteur 5-HT_{2C} semblait impliqué dans la vasoconstriction sérotonergique induite sur le lit mésentérique autoperfusé *in situ* du rat (Fernandez *et al.*, 2000b).

On peut remarquer que le blocage des récepteurs 5-HT₂ ne permet pas de révéler une vasodilatation induite par la 5-HT comme c'est le cas *in vivo*, sur la patte arrière autoperfusée du rat anesthésié (Calama *et al.*, 2002). Ceci s'explique du fait qu'une vasodilatation ne peut être visualisée sur le rein isolé perfusé qu'après restauration préalable d'un tonus vasculaire. Après restauration de ce tonus, nous avons observé une vasodilatation rénale concentration-dépendante avec la 5-CT (agoniste 5-HT₁ et 5-HT₇), la 8-OH-DPAT (agoniste 5-HT_{1A}), le CGS-12066B (agoniste 5-HT_{1B}) et le BW723C86 (agoniste 5-HT_{2B}). Globalement ces réponses démontrent la contribution des récepteurs 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2B} et peut-être aussi du récepteur 5-HT₇. Ces résultats appellent quelques commentaires :

- En ce qui concerne le récepteur 5-HT_{1A}, notre résultat avec la 8-OH-DPAT confirme l'observation rapportée précédemment par Verbeuren *et al.*, (1991) sur le rein isolé de rat. La nature endothéliale de la vasodilatation, *via* une libération de NO, avait alors été largement documentée (Verbeuren *et al.*, 1988 et 1991). Ce résultat avait cependant été mis en doute du fait de l'importante activité

antagoniste, de plusieurs agonistes 5-HT_{1A}, sur les récepteurs adrénergiques α_{1A} (Eltze et al., 1991), et de l'absence de relaxation rénale induite lorsque le tonus était restauré par la prostaglandine F_{2 α} (Stephan et al., 1990). Entre nos mains, une part de l'importante vasodilatation (80% de relaxation) induite par la 8-OH-DPAT sur le tonus restauré par la phényléphrine relevait probablement du même effet α -adrénergique. Néanmoins, une vasorelaxation persistait après restauration du tonus rénal par l'Ang II, liée à l'activation des récepteurs 5-HT_{1A} et inhibée par le WAY-100,635, un antagoniste spécifique.

- Notre travail est le premier qui démontre l'implication d'autres récepteurs sérotonergiques dans une réponse vasodilatatrice rénale. Le récepteur 5-HT_{2B}, présent sur les cellules endothéliales et musculaires lisses, a été impliqué dans des vasodilatations endothélium-dépendantes ou des contractions (Ullmer et al., 1995 ; Hoyer et al., 1994). Il en est de même du récepteur 5-HT_{1B}, également présent sur les cellules endothéliales et musculaires lisses, et responsable de réponses vasoconstrictrices ou dilatatrices (Jähnichen et al., 2004 ; Nilsson et al., 1999 ; Elhusseiny *et al.*, 2001). Quant au récepteur 5-HT₇ qui ne dispose ni d'agoniste, ni d'antagoniste spécifique, sauf peut-être le SB 269970 (Lovell et al., 2000), nous avons mis à profit sa haute affinité pour la 5-CT (agoniste 5-HT₁ et 5-HT₇) pour en définir la part de vasodilatation relevant du 5-HT₇ par son antagonisme par la mesulergine (antagoniste 5-HT₂ et 5-HT₇) (Hoyer et al., 2002). Il semble qu'il y ait une part de vasodilatation 5-HT₇ mais ces résultats sont trop préliminaires pour tirer une conclusion.

Par RT-PCR quantitative en temps réel, nous avons pu confirmer la présence des ARNm des récepteurs 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} tant sur les artérioles intrarénales que sur l'aorte. Nous avons vérifié par immunohistochimie et marquage avec un anticorps dirigé contre le facteur VIII que la préparation des artérioles intrarénales et le prélèvement de l'aorte préservait les cellules endothéliales (Véronique Lindner, résultats personnels).

Le récepteur 5-HT_{1D} est présent mais peu exprimé au niveau rénovasculaire (ARNm) et ne semble pas lié à un phénotype vasculaire sur notre préparation rénale *in*

in vitro. Il est intéressant de mentionner que, chez le lapin où les réponses rénales sont très faibles, une vasoconstriction liée à l'activation des récepteurs 5-HT_{1D} a été décrite sur des artères rénales partiellement dépolarisées et en présence de kétansérine pour inhiber les réponses 5-HT₂ (Choppin et O'Connor, 1994). Nous n'avons pas vérifié si la même réponse existait chez le rat.

Pour évaluer les modifications dans les réponses sérotonergiques au cours du diabète, nous avons choisi d'induire un diabète sucré par la streptozotocine, et de maintenir ce diabète très déséquilibré (glycémie > 400 mg/dl, soit 22 mM) afin de majorer les répercussions vasculaires au cours des 4 semaines d'exposition des vaisseaux. Notre observation la plus intéressante sur les reins provenant des rats diabétiques est que la vasoconstriction rénale à la 5-HT est potentialisée pour les plus faibles concentrations, et diminuée pour les concentrations les plus fortes. Compte tenu des concentrations circulantes de 5-HT (au plus de l'ordre de 100 nM), il est évident que la diminution du seuil de sensibilité et la potentialisation des réponses aux faibles concentrations de 5-HT sont des éléments importants en faveur d'un rôle pathophysiologique de la 5-HT dans les atteintes vasculaires au cours du diabète sucré. Dans notre étude, la potentialisation est particulièrement nette pour le DOI, mais non pour le mCPP, suggérant là encore une contribution privilégiée des récepteurs 5-HT_{2A}. Une potentialisation de la vasoconstriction induite par la 5-HT a aussi été décrite sur des artères rénales du lapin diabétique (Miranda *et al.*, 2002), sur les artères pulmonaires ou carotides prélevées chez le lapin ou le cochon diabétique (Miranda *et al.*, 2000; El-Kashef, 1996; Bagwell *et al.*, 2000), mais a été trouvée de manière inconstante sur les aortes de rats diabétiques (Sikorski *et al.*, 1993; James *et al.*, 1994; Orié *et al.*, 1993; Hattori *et al.*, 1995).

Nos résultats montrent que cette potentialisation relève à la fois de l'exposition aiguë à une forte concentration de glucose et des effets chroniques du diabète. Nous n'avons par contre pas trouvé d'arguments en faveur d'une implication d'un déficit en NO dans cette modulation. La vasoconstriction rénale induite par la 5-HT est en effet potentialisée après inhibition de la NO synthase (baisse de CE₅₀), et cette potentialisation n'est pas significativement différente entre les reins provenant de rats normoglycémiques ou diabétiques. Par ailleurs, des vasodilatations rénales impliquant

une composante endothélium-dépendante liée au NO, comme celles induites par l'Ach, la 8-OH-DPAT ou le CGS-12066B, ne sont pas altérées au cours du diabète.

Au contraire, plusieurs indices seraient plutôt en faveur d'une implication plus importante du NO vasculaire chez le rat diabétique. Ainsi, i) la résistance vasculaire rénale est particulièrement basse sur les reins isolés provenant de rats diabétiques, une situation où la L-NNA exerce une vasoconstriction majeure; ii) les rats diabétiques se trouvent dans la phase précoce de la néphropathie diabétique caractérisée par une hyperfiltration glomérulaire, liée du moins en partie à une majoration de la production rénale de NO (Komers and Anderson, 2003, revue); iii) l'inhibition de la NO synthase diminue la réponse vasodilatatrice rénale du CGS-12066B chez le rat diabétique, alors qu'il n'en était pas ainsi sur des reins de rats normoglycémiques. Ces résultats suggèrent que la composante non-NO de la vasodilatation endothélium-dépendante est altérée dans le diabète, mais est compensée par une majoration de la composante NO. Dans ce contexte, il est intéressant de noter que la vasodilatation endothélium-dépendante est principalement liée, sur le rein isolé et les vaisseaux de résistance en général (Bagaté *et al.*, 2001; Garland *et al.*, 1995; De Vriese *et al.*, 2000b), à la libération de facteurs endothéliaux d'hyperpolarisation (EDHF). Cette composante est altérée par le diabète dans les artères interlobulaires et les artérioles afférentes du glomérule (De Vriese *et al.*, 2000b), sans modification sensible de la réponse globale du rein à l'Ach, du moins dans la phase précoce du diabète. Nos résultats sont en accord avec ces données.

L'analyse de l'expression des ARNm des récepteurs 5-HT par RT-PCR montre par ailleurs que la potentialisation de la vasoconstriction n'est pas liée à une surexpression vasculaire des récepteurs 5-HT_{2A}; celle des récepteurs 5-HT_{2C} n'ayant pour l'instant pas pu être vérifiée. Bien que le niveau d'expression des ARNm ne préjuge pas obligatoirement du niveau d'expression des protéines réceptrices, nos résultats sont cohérents avec l'absence de modification de la densité en récepteurs 5-HT₂ (Bmax) décrite dans l'aorte de rats diabétiques (James *et al.*, 1994).

Il semble donc que la potentialisation de la vasoconstriction à la 5-HT dans le diabète sucré soit liée à des modifications des voies de signalisations intracellulaires et/ou à une sensibilité majorée de la machinerie contractile au calcium. Cette potentialisation, qui sur le rein ne touche pas la réponse à la phényléphrine, a cependant

également été retrouvée, selon les études, avec l'endothéline 1 ou la noradrénaline (Hodgson et al., 1990 ; Orié et al., 1993). Son mécanisme n'est pas élucidé mais des pistes intéressantes ont été suggérées, comme une contribution majeure du thromboxane A₂ (Hodgson *et al.*, 1990), une anomalies dans le voie de la PKC (Hattori *et al.*, 1995) ou dans la cascade des COX (James et al., 1995).

La 5-HT exerce aussi des effets particuliers sur les cellules mésangiales, un acteur important dans l'évolution vers la néphropathie diabétique. Elle majore la prolifération de ces cellules, la synthèse de TGFβ1 et la sécrétion de matrice extracellulaire (Eto *et al.*, 1997; Grewal et al., 1999; Kasho et al., 1998). Ces, propriétés ont conduit Takahashi *et al.*, (2002) a évaluer les effets d'un antagoniste des récepteurs 5-HT_{2A} dans cette pathologie. Les résultats sont en faveur d'un effet bénéfique du sarpogrelate puisque l'albuminurie d'un petit groupe de patients (DM de type 2) a été abaissée dès le 3^{ème} mois de traitement. Ces données démontrent que les taux de 5-HT élevés dans le diabète sucré participent probablement à la néphropathie diabétique *via* les récepteurs 5-HT_{2A}. Il est possible qu'une part des effets bénéfiques de ce traitement dans le diabète ait été obtenu par l'inhibition des réponses hémodynamiques vasoconstrictrices dont nous venons de décrire la potentialisation dans cette étude.

----- *Conclusions* -----

Au terme de ce mémoire de Thèse de Doctorat, notre travail de recherche nous permet de tirer les conclusions suivantes:

1. Il existe des mécanismes sérotonergiques inhibiteurs de la neurotransmission sympathique périphérique dans les rats normoglycémiques ; ils mettent en jeu des récepteurs 5-HT_{1D} et dans une moindre mesure, 5-HT_{1A}, localisés préférentiellement au niveau présynaptique ; leur activation implique, au moins partiellement, l'activation des cyclooxygénases.
2. L'hyperglycémie induite par l'injection d'alloxane reproduit la neurotransmission sympathique aux effets inhibiteurs de la 5-HT et d'autres agonistes sérotonergiques des récepteurs 5-HT₁; elle atténue aussi la potentialisation que la 5-HT exerce normalement chez le rat normoglycémique en activant les récepteurs 5-HT₃.
3. L'hyperglycémie modifie aussi le sous-type de récepteurs impliqués, puisque l'activation des récepteurs présynaptiques 5-HT_{1A} est maintenant majoritairement responsable de l'inhibition sympathique sérotonergique chez les rats diabétiques.
4. Le diabète expérimental induit en outre des changements dans les médiateurs impliqués dans la réponse sérotonergique inhibitrice de la neurotransmission sympathique, le NO et l'activation de la guanylate cyclase participant maintenant à cette réponse.
5. L'hyperglycémie réduit par contre le contrôle sérotonergique de la neurotransmission cholinergique cardiaque, tant dans ses effets de potentialisation que d'inhibition de la bradycardie.
6. La nature et la localisation des récepteurs impliqués est aussi modifiée ; dans le diabète, la potentialisation de la neurotransmission cholinergique cardiaque implique des récepteurs 5-HT_{1D} pré- et postsynaptiques, son inhibition se fait préférentiellement par des récepteurs 5-HT_{1A/1B}
7. Sur le rein isolé perfusé du rein, la 5-HT et/ou des agonistes des divers récepteurs sérotonergiques induisent à la fois des réponses vasoconstrictrices et vasodilatatrices ; les vasoconstrictions impliquent principalement l'activation des récepteurs 5-HT_{2A}, et, à

un moindre degré, les récepteurs 5-HT_{2C}; l'activation des récepteurs 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} et 5-HT_{2B} induit par contre des réponses vasodilatatrices.

8. L'induction d'un diabète sucré expérimental par la streptozotocine majore la vasoconstriction rénale induite par les faibles concentrations de 5-HT et atténue les réponses vasoconstrictrices aux concentrations les plus importantes.

9. Les réponses vasodilatatrices par contre ne sont pas modifiées dans le diabète, mais la part relative du NO dans la régulation de l'hémodynamique rénale et dans la vasodilatation endothélium-dépendante est majorée.

10. Les ARNm des récepteurs 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{2A} et 5-HT_{2B} sont présents dans les artérioles intra-rénales et l'aorte des rats normoglycémiques; leur expression n'est pas modifiée par le diabète.

L'ensemble de ce travail apporte ainsi des connaissances nouvelles quant à la participation des divers récepteurs de la 5-HT dans la régulation des fonctions cardiovasculaires et rénales. Le diabète sucré expérimental s'accompagne de modifications dans ces mécanismes sérotonergiques cardiovasculaires et rénaux, en particulier en ce qui concerne les types de récepteurs impliqués et la participation du monoxyde d'azote et des dérivés de la cyclooxygénase.

**UNIVERSITÉ LOUIS PASTEUR
FACULTÉ DE MÉDECINE
LAB. PHARMACOLOGIE ET PHYSIOLOGIE
RÉNOVASCULAIRES**

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y
FARMACOLOGÍA**



**INFLUENCE DU DIABÈTE SUCRÉ EXPÉRIMENTAL
SUR LA RÉPONSE CARDIOVASCULAIRE ET
RÉNALE À LA SÉROTONINE**