



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**SEDE SUR**

**DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA**

Título de la tesis:

**EFFECTO DEL INDORRENATO EN LA RESISTENCIA A LA INSULINA  
Y EL ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN-CONTRACCIÓN CARDIACO  
EN RATAS CON SÍNDROME METABÓLICO.**

Tesis que presenta:

**IBQ. Mariana Jacobo Antonio.**

Para obtener el grado de

**Maestra en ciencias en Neurofarmacología y Terapéutica Experimental**

**Directores de tesis:**

Dra. Norma Leticia Gómez Víquez.

Dr. Enrique Hong Chong

Ciudad de México.

Noviembre 2018

**Este trabajo se realizó gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), a través de la beca de Maestría número 589924 y al apoyo parcial como auxiliar de investigación de SNI-III o emérito con expediente 15337.**

## AGRADECIMIENTOS

A CINVESTAV por permitirme ser parte de tan honorable institución y por contribuir con mi formación profesional y personal.

A la Dra. Norma Leticia Gómez Víquez por darme la oportunidad de aprender de ella y de formar parte de su equipo de trabajo; por su infinita paciencia durante mi formación y por su apoyo tanto profesional como personal.

Al Dr. Enrique Hong por permitirme trabajar en su laboratorio y brindarme una visión diferente del proyecto. Así también agradezco su apoyo académico y personal que me ayudaron a concluir este proyecto.

A mis sinodales los doctores Karla Carvajal y David Centurión por contribuir con su perspectiva y conocimientos a este proyecto, pero principalmente por comprender mi desarrollo académico. Muchas gracias en verdad.

A la Bióloga Maritza Mayorga, al Maestro Miguel Ángel Rosas y a la Maestra Miriam Torres por sus consejos experimentales y apoyo técnico.

A mis compañeros de los laboratorios 1 y 2, Jaime, Ricardo, Aby, David, Ariana e Itzel, por contribuir con su experiencia y recomendaciones para el desarrollo de mi proyecto e incluso permitirme contribuir modestamente en algunos de sus proyectos.

## DEDICATORIA

A mis padres Francisca y Simón porque sin ustedes no me sería posible tener lo poco o mucho que ahora tengo; por confiar en mí y apoyarme para iniciar este proyecto. Los amo.

A mi esposo Ángel por creer en mí, por apoyarme en todas las maneras que te ha sido posible, por amarme y brindarme la fortaleza que necesitaba para continuar con este proyecto y la vida misma.

A mi hermana Alma por aguantar mi mal humor cuando las cosas no salían bien y aun así darme palabras de aliento. Me habría gustado ser una mejor hermana para ti en el tiempo que estuvimos juntas, tanto como tú lo has sido para mí.

A mis hermanos Bere, Mela y Miguel que me permitieron crecer y desarrollarme en un ambiente emocional e intelectualmente bueno.

A mis amigos Isabel, Aby, Yarim, Pablo, Abraham y Fany por sus sugerencias y apoyo técnico, pero principalmente por ser mis amigos. Su amistad es invaluable para mí.

A Toby, Snoopy y Yesi porque nunca voy a poder compensar todo el tiempo que pase lejos de ustedes y el descuido que al irme de casa recayó sobre ustedes lamentablemente. A Jake por darme consuelo, alegría y amor.

A mi bebé Abril, que me ha dado la energía suficiente para terminar este proyecto. Eres mejor que la fluoxetina definitivamente y te amo.

## ÍNDICE

<b>Abreviaturas.....</b>	<b>VII</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>X</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. Generalidades de la anatomía del corazón.....	1
1.2. AEC cardiaco.....	2
1.3. Regulación del metabolismo cardiaco.....	3
1.4. Insulina.....	5
1.4.1. Síntesis y secreción.....	5
1.4.2. Translocación de GLUT4 por insulina.....	7
1.4.3. Regulación del metabolismo cardiaco por insulina.....	8
1.5. Resistencia a la insulina en el síndrome metabólico.....	9
1.6. Alteraciones del funcionamiento cardiaco en la resistencia a la insulina.....	10
1.7. Efectos de la serotonina sobre la secreción de insulina, el transporte de glucosa y la función cardiaca.....	12
1.7.1. Serotonina.....	12
1.7.2. Regulación del metabolismo de glucosa por serotonina.....	15
1.7.3. Regulación de la liberación de insulina por serotonina.....	16
1.7.4. Relación entre la serotonina y la resistencia a la insulina.....	18
1.7.5. Efectos de la serotonina en el corazón.....	19
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>22</b>
<b>3. HIPOTESIS.....</b>	<b>24</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
4.1. Objetivo general.....	24
4.2. Objetivos particulares.....	24
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
5.1. Modelo experimental de síndrome metabólico.....	25
5.1.1. Animales.....	25
5.1.2. Desarrollo del síndrome metabólico y tratamientos farmacológicos...	25

5.1.3. Evaluación del desarrollo del síndrome metabólico.....	27
5.1.3.1. Determinación de la presión arterial.....	27
5.1.3.2. Determinación de glucosa y triglicéridos en sangre.....	27
5.1.3.3 Determinación de insulina y obtención del índice de HOMA.....	28
5.1.3.4. Medición del peso corporal y la cantidad de grasa abdominal.....	29
5.2. Evaluación de la expresión de GLUT4.....	30
5.3. Registro de los cambios transitorios de la $[Ca^{2+}]_i$ .....	31
5.5. Análisis estadístico.....	32
<b>6. Resultados</b> .....	<b>33</b>
6.1. Efectos del Indorrenato y la Metformina en el peso corporal y el porcentaje de grasa visceral de los animales tratados con fructuosa.....	33
6.2. Efectos del indorrenato y la metformina sobre el incremento de la presión arterial inducido por la fructuosa.....	35
6.3. Efectos del indorrenato y la metformina sobre las concentraciones de glucosa e insulina y en el índice HOMA. ....	37
6.4. Efectos del indorrenato y la metformina sobre las concentraciones de triglicéridos.....	39
6.5. Efectos del indorrenato y la metformina sobre la expresión de GLUT4.....	41
6.6. Efectos del indorrenato y la metformina sobre la homeostasis de $Ca^{2+}$ ...	42
<b>7. Discusión</b> .....	<b>45</b>
7.1. Efectos de la fructosa en el desarrollo de síndrome metabólico y cardiopatía.....	45
7.2. Efectos del indorrenato sobre las alteraciones metabólicas y hemodinámicas y en la disfunción diastólica en el síndrome metabólico.....	50
7.3. Efectos de la metformina sobre las alteraciones metabólicas y hemodinámicas y en la disfunción diastólica en el síndrome metabólico.....	55
<b>8. Conclusiones y perspectivas</b> .....	<b>59</b>
8.1. Conclusiones.....	59
8.2. Perspectivas.....	60
<b>9. Bibliografía</b> .....	<b>61</b>

## ABREVIATURAS

11 $\beta$ -HSD1	11 $\beta$ - hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1
5-HIAA	Ácido 5-hidroxindolacético
5HT	Serotonina
5HT <sub>1-7</sub>	Receptores de Serotonina de la familia 1 a la 7
8-OH-DPAT	8-Hidroxi-n,n-dipropilaminotetralina
AADC	L-aminoácido descarboxilasa aromática
AANAT	Arilalquilamina N-acetiltransferasa
ACC	Acetil CoA carboxilasa
AEC	Acoplamiento excitación-contracción
AGEs	Productos de glicación avanzada
AGL	Ácidos grasos libres
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
ANOVA	Análisis de varianza
AS160	Substrato de Akt de 160 kDa
ASMT	Acetilserotonina O-metiltransferasa
ATP	Adenosin trifosfato
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Concentración intracelular de calcio
cAMP	Adenosina Monofosfato Cíclico
CD36	Clúster de diferenciación 36
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
EEM	Error estándar de la media
ET-1	Endotelina 1
FABPc	Proteína de unión a ácidos grasos
FABPpm	Proteína de unión a ácidos grasos asociada a la membrana
FATP	Proteína transportadora de ácidos grasos
FCF21	Factor de crecimiento de fibroblástico 21
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GLUT1-5	Transportadores de glucosa de tipo 1 al 5
HCN	Canales de cationes sensibles a nucleótidos cíclicos
HOMA-IR	Índice Homeostático para la Determinación de Resistencia a la Insulina
IDO	Indolamina 2,3 dioxigenasa
IL-1,6	Interleucina 1 y 6
IP3	Inositol Trifosfato
IRS	Sustrato del Receptor de Insulina
LCC	Canales de Ca <sup>2+</sup> tipo L

LDCV	Vesículas del núcleo denso y grande
MAO	Monoamino oxidasa
MAPK	Cinasa Activada por Mitógeno
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensajero
NHE3	intercambiador de Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> tipo 3
NOS	Sintasa de Óxido Nítrico
NXC	Intercambiador Na <sup>+</sup> -Ca <sup>2+</sup>
OCT1-3	Transportadores de cationes orgánicos
PAT1	Transportador de aniones putativo tipo 1
PFK	Fosfofructo cinasa
PKA/ AKT	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PLB	Fosfolamban
PLC	Fosfolipasa C
PMAT	Transportador de monoaminas de la membrana plasmática
PPAR-α	Receptor α Activado por Proliferadores de Peroxisomas
RhoK	Proteína cinasa asociada a Rho
RI	Resistencia a la Insulina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RyR	Canales liberadores de Ca <sup>2+</sup> /receptores de rianodina
S6K	Proteína ribosomal S6
SERCA	ATPasa de Ca <sup>2+</sup> del retículo sarcoplásmico
SERT	Transportador de serotonina
SNA	Sistema nervioso autónomo
SNC	Sistema nervioso central
SNS	Sistema nervioso simpático
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
TCa	Concentración transitoria de Ca <sup>2+</sup>
TD <sub>50</sub>	Tiempo en el que se alcanza el 50% de la amplitud máxima
TD <sub>90</sub>	Tiempo en el que se alcanza el 90% de la amplitud máxima
TGasa	Transglutaminasa
TNFα	Factor de Necrosis Tumoral α
TPH	Triptófano hidroxilasa
VEGF	Factor de crecimiento endotelial
VMAT	Transportador vesicular de monoaminas
WHO	Organización Mundial de la Salud



## RESUMEN

En la resistencia a la insulina, el corazón pierde la flexibilidad metabólica que le permite adaptarse a la demanda energética, dando lugar a una cardiomiopatía que se manifiesta de forma temprana como una disfunción diastólica (Vasanji y cols., 2006). Estudios en modelos animales de resistencia a la insulina inducidos por dietas altas en carbohidratos y grasas, indican que la disfunción diastólica se asocia con una disminución en la expresión del transportador de glucosa GLUT4 y en la velocidad de la remoción intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  durante el acoplamiento excitación-contracción. Considerando esta relación, en el presente estudio evaluamos el efecto benéfico que podría tener la administración profiláctica y terapéutica del indorrenato sobre la función cardíaca en ratas con resistencia a la insulina; este fármaco es un agonista serotoninérgico con acción antihipertensiva, que ha mostrado incrementar la sensibilidad a la insulina en ratas. Para fines comparativos, empleamos a la metformina, un fármaco utilizado en la clínica que reduce la resistencia a la insulina y tiene efectos cardioprotectores. El modelo de resistencia a la insulina utilizado en este trabajo fue el de ratas tratadas con fructosa 20% en el agua de beber, las cuales desarrollaron, además de la resistencia a la insulina, hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia, un aumento en la presión arterial, y un aumento en la acumulación del tejido adiposo visceral. Asimismo, los animales desarrollaron alteraciones cardíacas relacionadas con una disminución en la expresión de GLUT4 y una reducción en la velocidad de remoción de  $\text{Ca}^{2+}$  durante los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  evocados por estimulación eléctrica. El tratamiento con indorrenato generó mejores resultados en su esquema de administración terapéutica, pues redujo la hiperinsulinemia y la resistencia a la insulina, y mejoró la función diastólica sin influir sobre la expresión de GLUT4. Por otra parte la administración profiláctica de metformina mostró mejores resultados pues redujo la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia e incrementó la expresión de GLUT4 en el corazón. No obstante, no fue posible observar su efecto cardioprotector. Estos resultados sugieren que el indorrenato, administrado de forma terapéutica puede reducir la resistencia a la insulina y la disfunción diastólica, generadas por la fructosa, sin necesariamente incrementar la expresión de GLUT4 en el corazón.

## ABSTRACT

In insulin resistance, the heart loses the metabolic flexibility that allows it to adapt to the energy demand, giving rise to a cardiomyopathy that manifests itself early as a diastolic dysfunction (Vasanji et al., 2006). Studies in animal models of insulin resistance induced by diets high in carbohydrates and fats, indicate that diastolic dysfunction is associated with a decrease in GLUT4 glucose transporter expression and in the rate of intracellular removal of  $Ca^{2+}$  during excitation coupling -contraction. Considering this relationship, in the present study we evaluated the beneficial effect that prophylactic and therapeutic administration of indorrenate could have on cardiac function in rats with insulin resistance. This drug is a serotonergic agonist with antihypertensive action, which has been shown to increase insulin sensitivity in rats. For comparative purposes, we use metformin, a drug used in the clinic that reduces insulin resistance and has cardioprotective effects. The model of insulin resistance used in this work was that of rats treated with 20% fructose in drinking water, which developed, in addition to insulin resistance, hypertriglyceridemia, hyperinsulinemia, an increase in blood pressure, and an increase in the accumulation of visceral adipose tissue. Likewise, the animals developed cardiac alterations related to a decrease in the expression of GLUT4 and a reduction in the rate of removal of  $Ca^{2+}$  during transient  $Ca^{2+}$  evoked by electrical stimulation. Treatment with indorrenate generated better results in its therapeutic administration scheme, since it reduced hyperinsulinemia and insulin resistance, and improved diastolic function without influencing the expression of GLUT4. On the other hand, the prophylactic administration of metformin showed better results as it reduced insulin resistance and hyperinsulinemia and increased the expression of GLUT4 in the heart. However, it was not possible to observe its cardioprotective effect. These results suggest that indorrenate, administered in a therapeutic manner, can reduce insulin resistance and diastolic dysfunction, generated by fructose, without necessarily increasing the expression of GLUT4 in the heart.

# 1. INTRODUCCIÓN.

## 1.1. Generalidades de la anatomía del corazón.

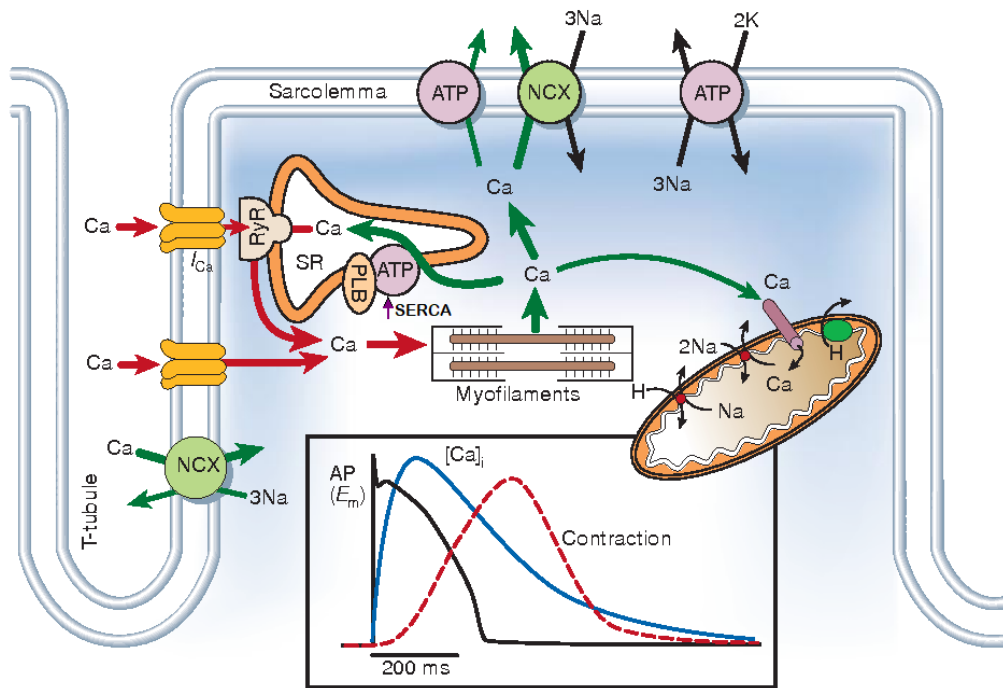
El corazón forma parte del sistema circulatorio. En mamíferos está compuesto por cuatro cavidades: dos aurículas y dos ventrículos. Las aurículas reciben la sangre que proviene de los vasos sanguíneos venosos, la cual es transferida a los ventrículos desde donde es expulsada hacia los vasos sanguíneos arteriales. El flujo sanguíneo en el corazón es unidireccional, gracias a un sistema de válvulas presentes entre aurículas, ventrículos y vasos sanguíneos mayores, que impiden el flujo retrogrado. A través de su contracción rítmica y repetida, el corazón distribuye la sangre en dos circuitos: pulmonar y sistémico.

A nivel celular, el corazón está conformado principalmente por cardiomiocitos y fibroblastos, aunque también por células endoteliales y vasculares. Los cardiomiocitos constituyen alrededor del 30% de las células del corazón adulto en mamíferos, y su organización y especialización confieren la funcionalidad del corazón. Los cardiomiocitos se encuentran unidos entre sí a través de los discos intercalares, que facilitan el acoplamiento mecánico, químico y eléctrico entre las células, permitiendo que éstas actúen como un sincitio funcional.

Los cardiomiocitos presentan diferencias anatómicas y funcionales que les permiten realizar diferentes funciones como son la generación y conducción de los potenciales de acción, y la contracción y relajación auricular y ventricular. De esta manera según su especialización, los cardiomiocitos se distinguen en células marcapasos, caracterizadas por la generación del potencial de acción; células de conducción encargadas de la propagación del potencial de acción y células de trabajo que llevan a cabo la contracción y relajación de las cavidades cardiacas. Las actividades eléctrica y contráctil del corazón se encuentran ligadas a través del proceso conocido como acoplamiento excitación-contracción (AEC).

## 1.2. AEC cardiaco.

El AEC inicia con el arribo del potencial de acción al miocardio ventricular, y su propagación en los cardiomiocitos a través del sarcolema y de las invaginaciones del sarcolema conocidas como túbulos T (Balderas 2011; Bello 2015). El potencial de acción abre a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L (LCC, por sus siglas en inglés) localizados en el sarcolema y en los túbulos T, permitiendo el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula. El influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  activa a los canales liberadores de  $\text{Ca}^{2+}$ /receptores de rianodina (RyR) albergados en la membrana del retículo sarcoplásmico, lo que favorece la salida del  $\text{Ca}^{2+}$  desde este almacén intracelular, y por lo tanto el aumento en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) (Rueda y cols., 2014). El aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  es lo que activa la contracción ventricular. La relajación ventricular inicia con el retorno de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  hacia sus niveles basales. Esto ocurre a través de varios mecanismos, siendo los más importantes la recaptura de  $\text{Ca}^{2+}$  en el retículo sarcoplásmico mediada por la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  presente en este organelo (SERCA), y la remoción de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por el intercambiador  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  (NXC) presente en el sarcolema (Fig. 1). Aunque de manera indirecta, la proteína fosfolamban (PLB) interviene también en la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el retículo sarcoplásmico, ya que se encarga de regular la actividad de SERCA. En condiciones basales, PLB se une a SERCA reduciendo su actividad. Sin embargo, durante la estimulación  $\beta$ -adrenérgica, PLB es fosforilado, favoreciendo su separación de SERCA, y eliminando por lo tanto su efecto inhibitorio, lo que produce un incremento en la actividad de SERCA.



**Figura 1.** Regulación de la  $[Ca^{2+}]_i$  durante el AEC en cardiomiocitos ventriculares. La ilustración muestra la relación temporal entre el potencial de acción, la  $[Ca^{2+}]_i$  y la contracción muscular. También se indican con flechas rojas, los procesos que contribuyen al incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  y en flechas verdes, aquellos que intervienen en la recaptura y extrusión de  $Ca^{2+}$  (Bers, 2002).

### 1.3. Regulación del metabolismo cardíaco.

El corazón mantiene un ritmo de trabajo constante que exige una estrecha coordinación entre el incremento en la carga de trabajo y el suministro energético. Se estima que el corazón humano es capaz de producir y consumir alrededor de 3.5 a 5 kg de ATP por día, además de que puede incrementar su carga de trabajo hasta 10 veces y mantenerla así durante un tiempo considerable (Iliadis y cols., 2011; Balaban 2012). Las reservas de ATP cardíaco duran aproximadamente 10 segundos, por lo que el abastecimiento energético es de suma importancia para mantener el ciclo de contracción-relajación (Iliadis y cols., 2011).

Como parte de la capacidad adaptativa a su alta demanda energética, el corazón puede emplear más de un sustrato o combinaciones de ellos. Esta propiedad puede

ser entendida como un “switch metabólico” o flexibilidad metabólica (Iliadis y cols., 2011; Schwarzer, Doenst, 2016). Los factores determinantes de la flexibilidad metabólica son la disponibilidad de sustrato y de oxígeno, ya que éste último es empleado hasta en más del 90% para la producción de ATP (Frederik, 2007; Iliadis y cols., 2011; Schwarzer, Doenst, 2016). La flexibilidad metabólica es de suma importancia cuando la demanda de oxígeno en el corazón es insuficiente como ocurre durante el ejercicio y algunas patologías.

El sustrato principal del corazón son los ácidos grasos libres (AGL) y en menor medida la glucosa, aunque el lactato, los cuerpos cetónicos, los aminoácidos y el acetato también pueden ser sustratos bajo ciertas circunstancias. Los AGL aportan del 60 al 90 % de la producción total de ATP a través de la  $\beta$ -oxidación, mientras que la glucosa contribuye del 10 al 40% de ATP a través de la glucólisis (Frederik y cols., 2007; Iliadis y cols., 2011). Dado que el corazón posee una capacidad reducida en la síntesis de novo de AGL, las principales fuentes de éstos son los AGL transportados por la albumina y los triglicéridos de las lipoproteínas presentes en el torrente sanguíneo (Frederik y cols., 2007). El transporte de los AGL al interior de los cardiomiocitos ocurre a través de tres mecanismos: difusión pasiva, difusión mediada por el receptor de albumina y el transporte mediado por el sistema de captura de AGL (Musters y cols., 2006; Frederik y cols., 2007). Este último, incluye la interacción de proteínas como la translocasa CD36, las proteínas de unión a ácidos grasos FABPpm y FABPc, así como la proteína transportadora de ácidos grasos FATP (Koonen y cols., 2005; Frederik y cols., 2007). Por su parte, la glucosa es incorporada a los cardiomiocitos a través de los transportadores GLUT1 y GLUT4. GLUT1 es la isoforma que predomina en etapas prenatales, mientras que GLUT4 predomina en el corazón adulto, manteniendo una relación de 3:1 respecto a GLUT1 (Santalucia y cols., 1999; Frederik y cols., 2007). El transporte basal de glucosa se encuentra mediado por GLUT1 cuya función es independiente de insulina. A diferencia de esto, GLUT4 responde a cambios en la demanda energética dado que su funcionamiento y translocación son dependientes de insulina.

El metabolismo energético del corazón es modulado por diferentes mecanismos que ejercen sus efectos a corto y largo plazo. Entre los mecanismos de corto plazo se encuentran aquellos que afectan la cinética de las enzimas que regulan el metabolismo, tales como la proteína cinasa A (PKA), la proteína ribosomal S6 (S6K) y la proteína cinasa activada por AMP (AMPK), por mencionar algunas (Frederik y cols., 2007; Hue y cols., 2016). En la mayoría de los casos se trata de enzimas alostéricas cuya inhibición se da en función de la concentración de sustratos, así como por modificaciones postraduccionales como la fosforilación (Frederik y cols., 2007; Hue y cols., 2016). Por otra parte, los mecanismos cuyos efectos son a largo plazo incluyen las vías de señalización desencadenadas por un estímulo hormonal, que concluye en la modificación de la expresión de proteínas trascendentales del metabolismo energético. La regulación con efectos a largo plazo se presenta justo después del nacimiento en respuesta a la adaptación a un nuevo ambiente, pero también se presenta en condiciones patológicas como la hipertensión, diabetes o isquemia, bajo las cuales el corazón pierde su flexibilidad metabólica (Frederik y cols., 2007). Entre las hormonas que regulan el metabolismo energético cardiaco se encuentran la insulina (Hue y cols., 2016), cuyas propiedades y acciones se describen con detalle en la siguiente sección.

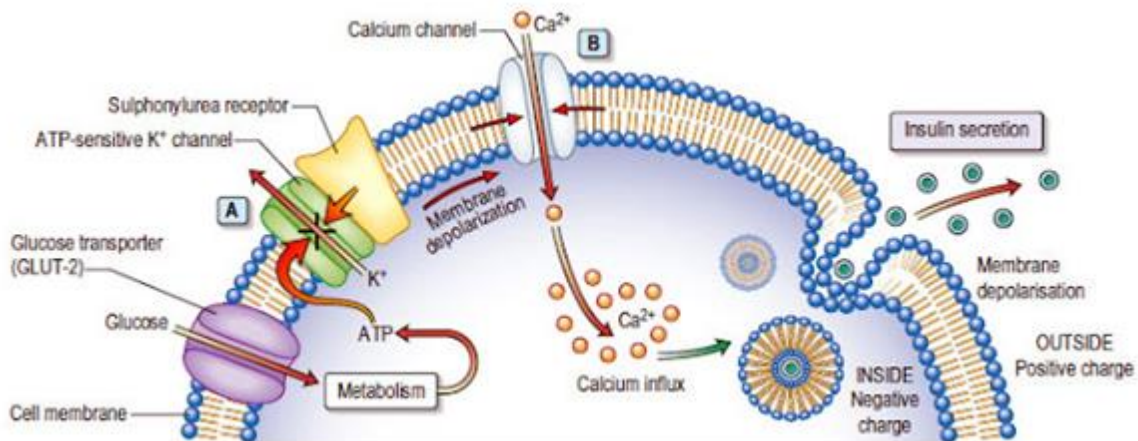
## **1.4. Insulina.**

### **1.4.1. Síntesis y secreción.**

La insulina es una hormona polipéptica de 51 aminoácidos que se sintetiza en las células  $\beta$ -pancreáticas de los islotes de Langerhans. La síntesis de la insulina comienza en el retículo endoplasmático rugoso con la formación de un polipéptido de 75 aminoácidos denominado preproinsulina. Posteriormente, la preproinsulina se pliega formando dos puentes disulfuro y pierde su señal peptídica. Al péptido resultante se le denomina proinsulina. La conversión de proinsulina a insulina,

implica la pérdida de un fragmento conocido como péptido C e inicia en la cara trans del aparato de Golgi, culminando en las vesículas de transporte. La insulina es almacenada en las vesículas del núcleo denso y grande (LDCV por sus siglas en inglés), y es liberada al medio extracelular por exocitosis.

La secreción de insulina es un proceso regulado por glucosa. El proceso comienza cuando la concentración de glucosa en el torrente sanguíneo incrementa y este azúcar ingresa en las células  $\beta$ -pancreáticas a través del transportador GLUT2. La oxidación de la glucosa produce ATP, lo que resulta en el cierre de los canales de  $K^+$  dependientes de ATP, la despolarización de la membrana y la apertura de los canales de  $Ca^{2+}$  sensibles a voltaje (Braun y cols., 2012). El aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  facilita el transporte vesicular y por lo tanto la exocitosis de la insulina (Fig. 2). Aunque este mecanismo de liberación de la insulina es el más conocido, se sabe que existen otras vías, entre ellas la relacionada con la estimulación de receptores acoplados a proteínas Gq (Weiss y cols., 2014).

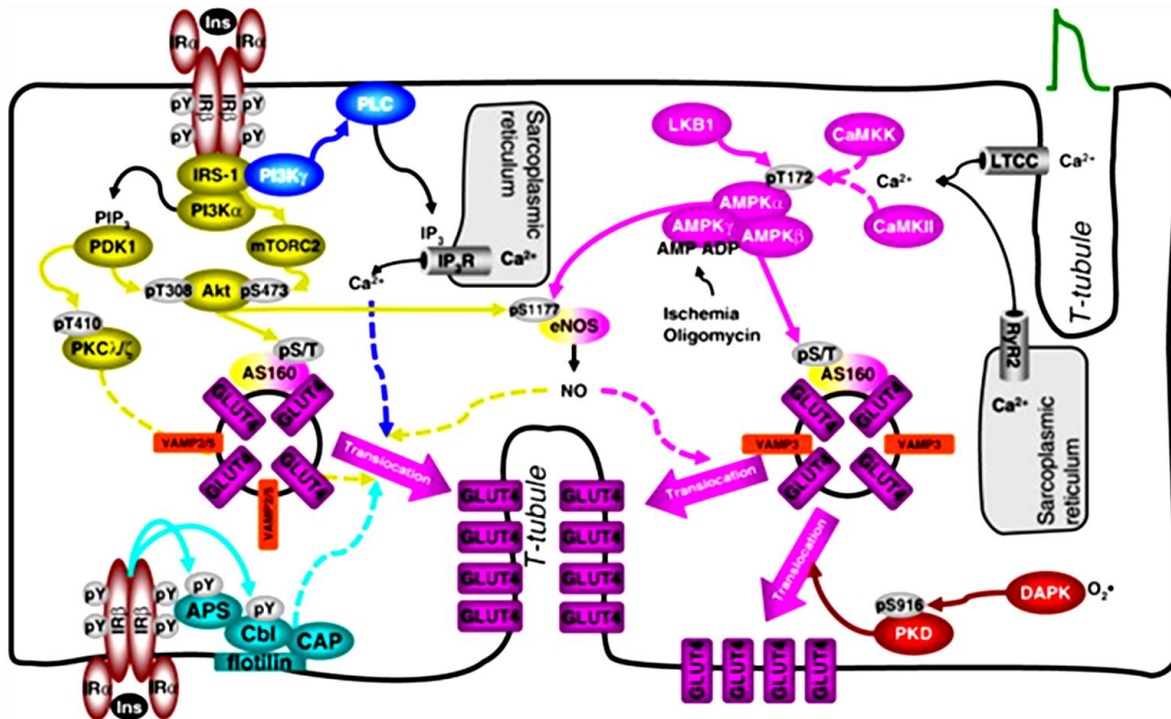


**Figura 2.** Mecanismo desencadenado por la glucosa para inducir la exocitosis de insulina en las células  $\beta$  pancreáticas. (Tomado de: <http://www.medicinehack.com/2011/08/insulin-secretion-local-regulation.html>)



#### 1.4.2. Translocación de GLUT4 por insulina.

Una vez liberada al torrente sanguíneo, la insulina ejerce sus efectos a través de la unión con su receptor localizado en la membrana celular. El receptor a insulina cuenta con dos subunidades, denominadas  $\alpha$  y  $\beta$ , que se distinguen entre sí tanto por su ubicación en la membrana, como por su función (Riehle y cols., 2016). Además, este receptor tiene actividad intrínseca de tirosina cinasa. Al unirse la insulina, la subunidad  $\beta$  sufre un cambio conformacional que favorece la autofosforilación del receptor en residuos de tirosina y la consiguiente fosforilación del sustrato del receptor de insulina (IRS, por sus siglas en inglés). Los IRS son proteínas adaptadoras que marcan el inicio de una amplia ruta de señalización que incluye a la PI3K, la AKT y la vía de las MAP cinasas (Luiken y cols., 2015; Riehle y cols., 2016). La vía de la PI3-K y la AKT se encuentra estrechamente relacionada con la translocación del GLUT4 a la membrana celular. Para que las vesículas que contienen a los GLUT4 sean translocadas, es necesario que la PI3K fosforile a AKT, y ésta a su vez, fosforile a AS160 (Riehle y cols., 2016). La AS160 es una pequeña GTPasa que se inactiva al ser fosforilada, favoreciendo la activación de las GTPasas de la familia Rab, las cuales son esenciales para la traslocación de GLUT4 en adipocitos, cardiomiocitos y células del músculo esquelético (Montessuit y cols., 2013; Contreras y cols., 2014). Esta es la vía clásica para la translocación de GLUT4 inducida por insulina. Sin embargo, se sabe que otros estímulos pueden promover la translocación de este transportador, a través de mecanismos que implican un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ , así como la activación de la cinasa AMPK y la fosfolipasa C (PLC) (Fig. 3.)



**Figura 3.** Esquema de las rutas de señalización que participan en la traslocación de GLUT4 en los cardiomiocitos. (Montessuit y cols., 2012)

### 1.4.3. Regulación del metabolismo cardíaco por Insulina.

Aunque el mecanismo de acción de la insulina sobre el corazón no se conoce por completo, se tiene claro que la insulina es parte fundamental de su funcionamiento. De hecho, se sabe que en el sarcolema de los cardiomiocitos existen entre 10,000 y 100,000 receptores para insulina (Iliadis y cols., 2011). Si bien, los AGL son la fuente de energía predilecta en el corazón, la acción de la insulina sobre sus receptores influye en el metabolismo energético haciendo de la glucosa el principal sustrato para la producción de ATP. Esto es de vital importancia para incrementar la eficiencia cardíaca en condiciones de un bajo suministro de oxígeno.

Las acciones de la insulina no se limitan únicamente a la regulación del metabolismo energético del corazón, sino que también influyen en su crecimiento, sus movimientos de relajación y contracción, así como en su perfusión sanguínea. Estos

efectos tienen lugar gracias a que la insulina incrementa los niveles del mRNA de RyR y SERCA (Teshima y cols., 2000). Dado que también es un factor de crecimiento, la insulina promueve la hipertrofia de los cardiomiocitos por medio de la vía de señalización PI3K-Akt (Walsh 2006). Al mismo tiempo, incrementa la angiogénesis con la estimulación del factor de crecimiento endotelial (VEGF) (O'Neill y Abel 2005). Además, contribuye a la homeostasis del corazón a nivel periférico debido a la vasodilatación que produce a través de un mecanismo dependiente del endotelio (Sundell y Knuuti 2003).

Situaciones bajo las cuales la insulina no puede ejercer su efecto en el corazón, como es el caso de la resistencia a la insulina, conllevan a la interrupción de la flexibilidad metabólica. Por lo tanto, en estas condiciones se favorece la oxidación de los AGL a expensas de un mayor consumo de oxígeno, mientras que disminuye el metabolismo de la glucosa. Como se abordará con más detalle en las siguientes secciones, esta alteración en los sustratos energéticos produce un aumento en el estrés oxidativo y en los productos de peroxidación lipídica, reduciendo en paralelo la generación de ATP y por lo tanto la eficiencia cardíaca. Además, se ven afectadas también la estructura y funcionalidad de las proteínas que participan en la contracción y relajación del músculo cardíaco, lo que da inicio a una disfunción cardíaca (Gilca y cols., 2017).

### **1.5. Resistencia a la insulina en el síndrome metabólico.**

La resistencia a la insulina es un componente del síndrome metabólico. Este síndrome comprende además a otros factores de riesgo cardiovascular, como son la hipertensión, dislipidemia, alteraciones en la homeostasis de la glucosa y obesidad central (Wassink y cols., 2007). En 1998, la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) estableció la definición de “síndrome metabólico”, que por ese entonces recibía otros nombres, como el de síndrome X. En ese mismo año, la WHO estableció los parámetros para el diagnóstico de este síndrome, que incluía la hipertensión arterial (>140/90 mmHg), la dislipidemia

(TG>150 mg/dL; HDL <35 mg/dL), la obesidad central (IMC>30), el cociente de cintura-cadera (>0.9 en hombres y >0.85 en mujeres) y la microalbuminuria (Laclaustra y cols., 2005). Sin embargo, para el diagnóstico del síndrome metabólico no se incluyó a la resistencia a la insulina, a pesar de que Reaven en 1988, la señaló como la principal causa que subyace al síndrome (Reaven, 1988). De hecho, aunque en la actualidad no existe un criterio unificado sobre los componentes del síndrome metabólico, se acepta que sus ejes fisiopatológicos son la resistencia a la insulina y la obesidad central (Wassink y cols., 2007).

La resistencia a la insulina puede ser definida como una respuesta insuficiente de las células de los órganos blancos a los niveles fisiológicos de insulina. En compensación, las células  $\beta$ -pancreáticas aumentan la liberación de insulina, proinsulina y amilina, que en sinergia e individualmente activan de manera local al sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (Ooterlinck y cols., 2014). Se considera que la resistencia a la insulina surge como consecuencia de un daño en su vía de señalización, lo que conlleva a una disminución en la captación celular de glucosa (Wassink y cols., 2007). En estados de obesidad, se han identificado a los AGL y al factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) como elementos que promueven la inhibición de la vía de señalización de la insulina. Estudios *in vitro* en adipocitos y células del músculo esquelético, han demostrado que el TNF $\alpha$  induce la fosforilación de un residuo de serina, mientras que los metabolitos de los AGL lo hacen en residuos serina/treonina de las IRS, provocando de esta manera que la proteína deje de ser sustrato y se convierta en inhibidor de la vía de señalización de la insulina (Wassink y cols., 2007).

#### **1.6. Alteraciones del funcionamiento cardiaco en la resistencia a la insulina.**

Aunque se tiene un menor conocimiento de los mecanismos que inducen el desarrollo de la resistencia a la insulina en el músculo cardiaco, hay evidencia de

que este estado se asocia con una reducción en la expresión de GLUT4 y en la fosforilación de AKT (Carvajal y cols., 2014). Además, como se mencionó anteriormente, la resistencia a la insulina causa la pérdida de la flexibilidad metabólica, favoreciendo la acumulación intracelular de AGL y sus metabolitos derivados (Ooterlinck y cols., 2014; Carvajal y cols., 2014; Riehle y cols., 2016). Esto propicia un estado de lipotoxicidad que induce disfunción mitocondrial y la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS), así como apoptosis y estrés del retículo endoplásmico (Abel y cols., 2012; Carvajal y cols., 2014). Como consecuencia, la producción de ATP decrece y afecta la unión entre la miosina y actina, que es fundamental para la contractibilidad del músculo cardíaco. Además, los AGL, citocinas y el aumento de ROS contribuyen a generar y perpetuar la resistencia a la insulina. En el caso específico de los AGL, se ha sugerido que contribuyen al desarrollo de la resistencia a la insulina a través del diacilglicerol (uno de sus metabolitos), ya que incrementa la actividad de la proteína cinasa C (PKC), la cual puede inhibir la señalización de la insulina al aumentar la fosforilación de los residuos serina de las IRS (Abel y cols., 2012)

Por otra parte, en diversos modelos de síndrome metabólico se han identificado cambios relacionados con el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  durante el AEC, desde etapas tempranas de la resistencia a la insulina. Como parte de estos cambios se encuentran la reducción en la función del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , SERCA y RyR (Wassink y cols., 2007). Además, en algunos modelos se ha encontrado que la expresión de SERCA está reducida mientras que hay un aumento en la expresión y una reducción en la fosforilación de PLB (Van den Bergh y cols., 2008; Wassink y cols., 2007; Hayden y cols., 2003), condiciones que favorecen la inhibición de SERCA. Se tiene también evidencia de que las alteraciones en la función de SERCA y de los RyRs se asocian con cambios en su estado de oxidación, relacionados con modificaciones postraduccionales oxidativas inducidas por la sobreproducción de ROS (Carvajal y cols., 2014). Todos estos cambios contribuyen a que las fases de ascenso y descenso de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  sean más lentas (Carvajal y cols., 2014), lo que conlleva a un enlentecimiento de la contracción y a una prolongación de la

relajación. Dichas alteraciones son características de la denominada cardiomiopatía diabética, las cuales dan inicio al desarrollo de una disfunción ventricular izquierda, siendo la disfunción diastólica la que se presenta con mayor frecuencia y mucho antes de que se presenten las anomalías sistólicas. Los mecanismos que subyacen a la disfunción diastólica involucran la perturbación del funcionamiento de SERCA y probablemente, también de sus procesos reguladores (es decir, decremento en la actividad de PKA y actividades elevadas de PKC) (Wold y cols., 2005).

Es importante mencionar que la disfunción ventricular que se presenta en la resistencia a la insulina puede ser prevenida a través del ejercicio y el uso de fármacos como los fibratos, que pueden mejorar el funcionamiento cardíaco a través de mecanismos que implican la reducción de los niveles plasmáticos de triglicéridos, así como el aumento en la oxidación de glucosa y en la sensibilidad a la insulina en el corazón (Mehta y Reilly, 2004). No obstante es importante evaluar nuevas estrategias terapéuticas que permitan conocer no solo los factores que podrían participar en el desarrollo de la disfunción cardíaca en la resistencia a insulina, sino también aquellos que puedan prevenirla y revertirla.

## **1.7. Efectos de la serotonina sobre la secreción de insulina, el transporte de glucosa y la función cardíaca.**

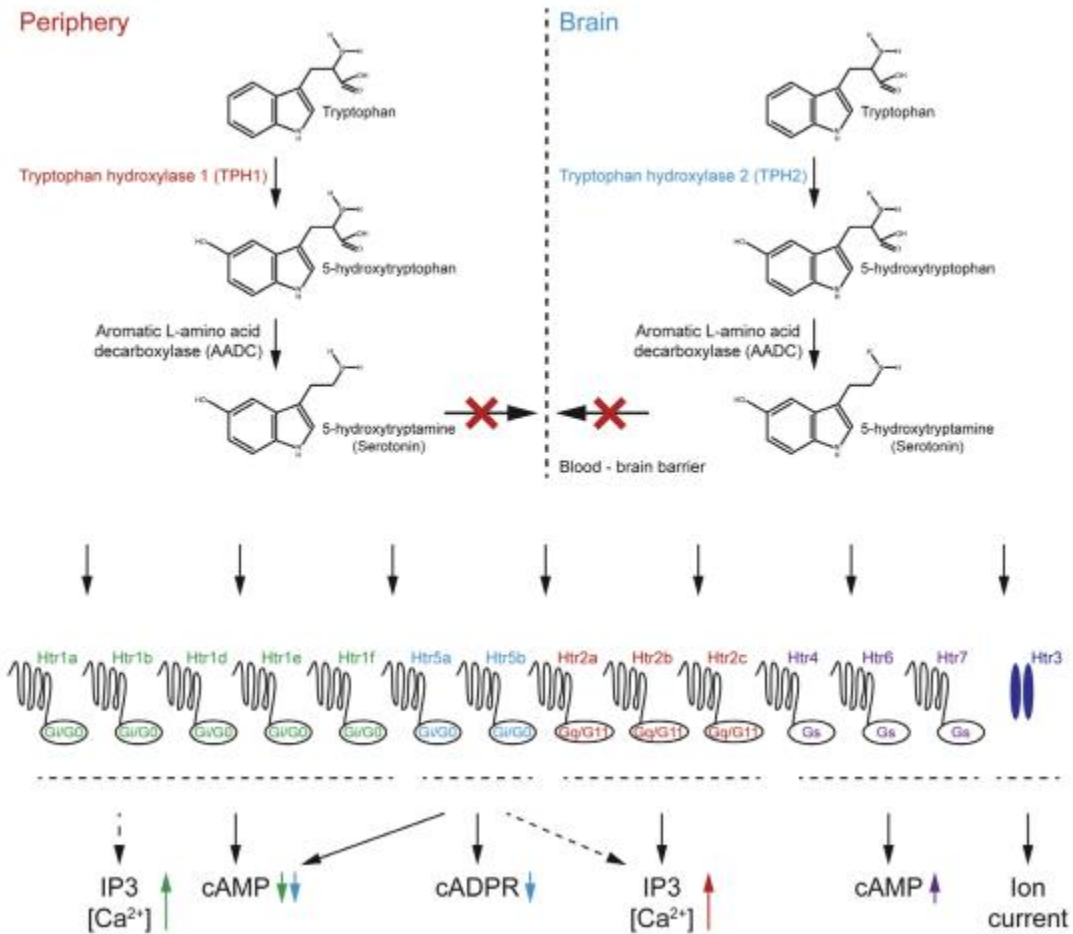
### **1.7.1. Serotonina.**

La serotonina (5-hidroxytriptamina) es una monoamina versátil que ejerce sus efectos a nivel central y periférico, de tal forma que puede actuar como hormona, mitógeno o neurotransmisor. Es sintetizada a partir del triptófano por las enzimas triptófano hidroxilasa (TPH) y L-aminoácido descarboxilasa aromática (AADC, por sus siglas en inglés) (Fig. 4). La velocidad de síntesis de la serotonina se encuentra limitada por la TPH, de la cual hay dos isoformas: TPH1, que predomina en tejidos

periféricos, y la TPH2, que se expresa en el sistema nervioso central (SNC) y en el sistema nervioso entérico (Li y cols., 2011; Chang y cols., 2016). En el SNC, la serotonina se sintetiza principalmente en las neuronas serotoninérgicas del núcleo de rafe, mientras que en los tejidos periféricos se sintetiza en las células enterocromáfines del tracto gastrointestinal y es almacenada en las plaquetas (Donovan y Tecott, 2013; Martin y cols. 2017). Como la serotonina no puede cruzar la barrera hematoencefálica, su función en cada uno de estos sistemas es independiente.

Una vez que ha sido sintetizada, la serotonina es almacenada en vesículas intracelulares por medio del transportador vesicular de monoaminas (VMAT), para su posterior liberación al espacio extracelular (Brunton y cols., 2011). Sin embargo, la serotonina reingresa a las células a través del transporte tipo 1 (dependiente de energía ya que va contra gradiente) y del transporte tipo 2 (independiente de energía al ir a favor del gradiente) (Neumann y cols., 2017). El transporte tipo 1 requiere de la expresión y funcionalidad del transportador de serotonina (SERT), mientras que el transporte tipo 2 depende de la expresión y funcionamiento del transportador de monoaminas de la membrana plasmática (PMAT, por sus siglas en inglés) y de los transportadores de cationes orgánicos OCT1, OCT2 y OCT3.

Por otra parte la degradación de serotonina ocurre principalmente por la actividad de la enzima monoamino oxidasa (MAO), y en menor medida, por las enzimas arilalquilamina N-acetiltransferasa (AANAT), la indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO) y la acetilserotonina O-metiltransferasa (ASMT) (Brunton y cols., 2011; Neumann y cols., 2017). El metabolito más estable de la serotonina es el ácido 5-hidroxiindol acético (5-HIAA), que se produce por acción de la MAO y una aldehído deshidrogenasa (Brunton y cols., 2011). Otro destino metabólico para la serotonina es la formación de la melatonina por medio de la IDO.



**Figura 4.** Síntesis de la serotonina y sus tipos de receptores. Los receptores de la serotonina se pueden identificar con base en la nomenclatura de los genes que los codifican, tal como se muestra en la imagen. (El-Merahbi y cols., 2015).

Los efectos de la serotonina se encuentran mediados por la estimulación de sus receptores. Existen al menos 14 isoformas de receptores de serotonina, que se agrupan en 7 tipos: 5HT<sub>1</sub>, 5HT<sub>2</sub>, 5HT<sub>3</sub>, 5HT<sub>4</sub>, 5HT<sub>5</sub>, 5HT<sub>6</sub> y 5HT<sub>7</sub> (El-Merahbi y cols., 2015). Los receptores de serotonina se encuentran acoplados a proteínas G, con excepción del receptor 5HT<sub>3</sub>, que es un canal iónico controlado por ligando (Fig. 4). La distribución de los receptores de serotonina sobre tejidos y órganos es extensa, por lo que ejerce una amplia gama de efectos. A continuación se revisaran aquellos relacionados con la liberación de insulina, el metabolismo de carbohidratos y el funcionamiento cardíaco.



### **1.7.2. Regulación del metabolismo de glucosa por serotonina.**

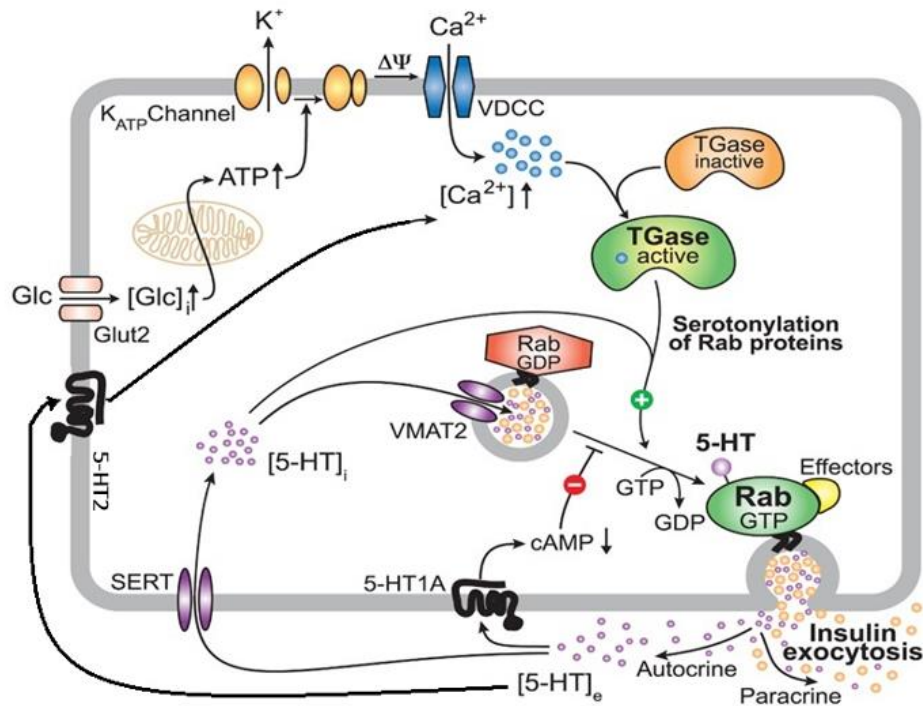
Aunque la insulina es el principal regulador del metabolismo de la glucosa, evidencias recientes indican que la serotonina puede contribuir también a este fin, a través de diferentes mecanismos. Los efectos de la serotonina que han sido implicados en el metabolismo energético se encuentran mediados principalmente por los receptores 5HT<sub>2</sub>, 5HT<sub>1B</sub> y 5HT<sub>6</sub>, y de éstos, los 5HT<sub>2</sub> se han relacionado con el desarrollo de obesidad tardía y resistencia a la insulina (Tecott, 2007; Silva 2015).

A nivel central el efecto global predominante de la serotonina sobre la alimentación, es la supresión de la ingesta de alimentos. La pérdida en la homeostasis de serotonina a este nivel puede producir hipofagia e hiperfagia (Donovan y Tecott, 2013), interviniendo de esta manera en la cantidad de nutrientes disponibles. Por otra parte, a nivel periférico la serotonina participa en varios procesos que regulan el metabolismo de la glucosa. Por ejemplo, se ha observado que en los hepatocitos promueve la gluconeogénesis y suprime la captación de glucosa hepática, aunque podría ejercer diferentes efectos que varían de acuerdo a la especie, así como al contexto hormonal y fisiológico (El-Merahbi y cols., 2015). También se tiene evidencia de que la serotonina aumenta el transporte de glucosa en músculo esquelético de ratas y humanos a través de la estimulación de los receptores 5HT<sub>2A</sub>, que promueven la translocación de GLUT1 y GLUT4 a través de un mecanismo diferente al de la insulina (Hajduch y cols., 1999; Al-Zoairy y cols., 2017). Incluso, se sabe que la serotonina influye sobre la liberación de insulina de las células  $\beta$  pancreáticas por medio de diferentes mecanismos que se abordaran con mayor detalle en la siguiente sección.

### 1.7.3. Regulación de la liberación de insulina por serotonina.

Aunque desde hace más de 30 años se sabe que la serotonina influye en la liberación de insulina, el mecanismo a través del cual logra este efecto aún se desconoce. Se ha reportado que la estimulación de los receptores 5HT<sub>1</sub> y 5HT<sub>2</sub> en las células β pancreáticas de mamíferos tiene efectos opuestos en la secreción de insulina, lo que hace difícil el establecimiento del papel que tiene la serotonina en la liberación de esta hormona (Almaça y cols., 2016). En este sentido, se ha observado que en humanos y roedores, la serotonina inhibe la liberación de insulina a través de la estimulación de los receptores 5HT<sub>1</sub> (Bennet y cols., 2015, Almaça y cols., 2016; Bennet y cols., 2016), mientras que incrementa la liberación de insulina inducida por glucosa a través de la estimulación de los receptores 5HT<sub>2</sub> (Bennet y cols., 2016). Cabe resaltar que los experimentos de estas investigaciones fueron hechos *in vitro* y bajo la exposición aguda de agonistas selectivos. De acuerdo con estos estudios, es probable que los efectos de la serotonina sobre las células β dependan del tipo de receptores que se expresen, así como de su densidad relativa, lo cual podría estar estrechamente relacionado con cambios metabólicos del organismo y con diferencias relacionadas a la especie.

Por otra parte, se ha reportado que la serotonina puede incrementar la liberación de insulina a través de un mecanismo directo que involucra su unión covalente con proteínas que participan en el tráfico de las vesículas que contienen a la insulina. A esta modificación postraduccional se le denomina serotonilación y ocurre en respuesta al incremento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> inducido por glucosa. El aumento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> activa a la enzima TGasa que se encarga de serotonilar a las pequeñas GTPasas Rab3a y Rab27a (Paulman y cols., 2009). Además, dado que las vesículas de transporte en las células β expresan al transportador vesicular de monoaminas, la serotonina se colibera con insulina, tal como se muestra en la Figura 5.



**Figura 5.** Modelo propuesto para explicar el mecanismo mediante el cual la 5-HT favorece la exocitosis de insulina tras la exposición de las células  $\beta$  con glucosa. (Modificado de Paullman y cols., 2009).

En este punto, es necesario considerar que las células  $\beta$  interactúan con las células  $\alpha$ ,  $\delta$  y PP dentro de los islotes pancreáticos, lo cual complica el panorama de los efectos de la serotonina ya que se sabe que tanto las células  $\alpha$  como las  $\delta$ , expresan receptores 5HT<sub>1</sub>. De esta manera, la liberación de serotonina desde las células  $\beta$ , podría actuar no sólo de manera autócrina sino también de manera parácrina, inhibiendo la liberación de glucagón de las células  $\alpha$ , que a su vez influye en la liberación de insulina (Almaça y cols., 2016).

#### **1.7.4. Relación entre la serotonina y la resistencia a la insulina.**

Diferentes estudios sugieren una asociación entre la serotonina y la resistencia a la insulina (Goyal y Vaidya 2009; Deuschle, 2013). Por ejemplo, se ha reportado que la administración de antidepresivos se asocia con el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), y de hecho se ha sugerido que puede existir una asociación bidireccional entre la DMT2 y la depresión, en la que la pérdida en la homeóstasis de serotonina es el punto de convergencia (Knol y cols., 2006; Deuschle, 2013). En este tenor, se ha observado que la respuesta serotoninérgica a nivel central se encuentra atenuada en individuos con síndrome metabólico y resistencia a la insulina (Muldoon y cols., 2006). Asimismo, estudios en pacientes depresivos que no padecen DMT2, muestran que, de manera general, el tratamiento con antidepresivos a corto plazo mejora la sensibilidad a la insulina. Sin embargo, cuando el tratamiento se administra a largo plazo, incrementan las posibilidades de que se desarrolle la DMT2, independientemente del tipo de antidepresivo que se administre (Deuschle, 2013).

Otras investigaciones han centrado su atención en el estudio de los receptores involucrados en la regulación del metabolismo, como son los 5HT<sub>2</sub> y 5HT<sub>3</sub>. Debido al papel que tienen los receptores 5HT<sub>3</sub> en la proliferación de las células  $\beta$  pancreáticas durante el embarazo, se propuso que éstos podrían tener un papel relevante durante algunos cambios metabólicos. Para confirmar esta noción, Kim (2015) evaluó los efectos de una dieta hipercalórica en ratones knockout de los receptores 5HT<sub>3</sub>, y observó que éstos desarrollan resistencia a la insulina con mayor facilidad que los ratones control. Asimismo, se ha descrito un aumento en la expresión de los receptores 5HT<sub>2</sub> en las células  $\beta$  de los ratones resistentes a la insulina db/db (Zhang y cols., 2013). Debido a que la estimulación de los receptores 5HT<sub>2</sub> promueve la liberación de insulina, se ha propuesto que el aumento en su expresión forme parte de un mecanismo para compensar el incremento de glucosa que sucede en la resistencia a la insulina, participando así en la hiperinsulinemia.

Si bien estos estudios apoyan la idea de una relación entre la serotonina y la resistencia a la insulina, es evidente que aún faltan más investigaciones para establecer de forma clara cuál es el papel de la serotonina, ya que es probable que sus efectos cambien en función del curso temporal del desarrollo de la resistencia a la insulina y el ambiente hormonal que esto involucra, así como del estilo de vida de los pacientes debido a que éste se encuentra estrechamente ligado a su estado anímico.

#### **1.7.5. Efectos de la serotonina en el corazón.**

Se ha descrito la presencia de las enzimas necesarias para la síntesis (TPH1 y AADC) y degradación (MAO, AANAT, IDO y ASMT) de serotonina en cardiomiocitos de roedores. Asimismo, se ha observado que el corazón de humanos y roedores contiene serotonina, la cual proviene principalmente de las plaquetas y puede ingresar a los cardiomiocitos a través de los transportes tipo 1 y tipo 2 (siendo ambos fisiológicamente relevantes), debido a la expresión de SERT, OCT2, OCT3 y PMAT (Neumann y cols., 2017).

Los efectos de la serotonina en el corazón son diversos y dependen del tipo de receptores que son estimulados, los cuales se encuentran tanto en las terminales nerviosas que inervan al corazón, como en el mismo miocardio. De esta forma se ha propuesto que la serotonina desempeña un papel importante en el funcionamiento del corazón, participando en procesos que van desde el desarrollo embrionario, la prevención de arritmias, la regulación del tono vascular y la fuerza de contracción. Asimismo, se ha observado que la pérdida de la homeostasis de la serotonina repercute en el mantenimiento de la  $[Ca^{2+}]$ ; y favorece el desarrollo de arritmias, hipertrofia cardíaca, disfunción valvular e insuficiencia cardíaca (Neumann y cols., 2017).

En animales anestesiados se ha observado que la administración de serotonina produce bradicardia en respuesta a la estimulación de los receptores 5HT<sub>3</sub> presentes en los nervios sensoriales vagales cardiacos. Además, la estimulación de los receptores presinápticos 5HT<sub>1B/1D</sub> contribuye a la bradicardia a través de la inhibición de las fibras simpáticas cardiacas. Sin embargo, la serotonina también ejerce de manera directa sus efectos en el corazón, ya que produce taquicardia a través de diferentes mecanismos, que incluyen principalmente la estimulación de los receptores 5HT<sub>2A</sub> (en rata) y 5HT<sub>4</sub> (en cerdo y humano) localizados en el miocardio, y que se hace evidente al eliminar la influencia del sistema nervioso autónomo (SNA) (Sánchez y cols., 2008). Es importante mencionar que el tipo de receptores de serotonina que se expresan en el corazón varía entre las especies. Por ejemplo, el corazón de ratón expresa los receptores 5HT<sub>1A</sub>, 5HT<sub>1B</sub>, 5HT<sub>1D</sub>, 5HT<sub>2A</sub>, 5HT<sub>2B</sub>, 5HT<sub>2C</sub>, 5HT<sub>3</sub> y 5HT<sub>4</sub> (Mekontso-Dessap y cols., 2006), mientras que en las aurículas de las ratas se ha observado la expresión de los receptores 5HT<sub>2A</sub> (Läer y cols., 1998). En humanos se expresan los receptores 5HT<sub>4a</sub> y 5HT<sub>4b</sub>, pero su densidad es mayor en las aurículas respecto a los ventrículos (Brattelid y cols., 2004). Además, en humanos se ha reportado que los receptores 5HT<sub>2A</sub> y 5HT<sub>4</sub> se expresan en los ventrículos en condiciones patológicas (Brattelid y cols., 2004; Levy y cols., 2008).

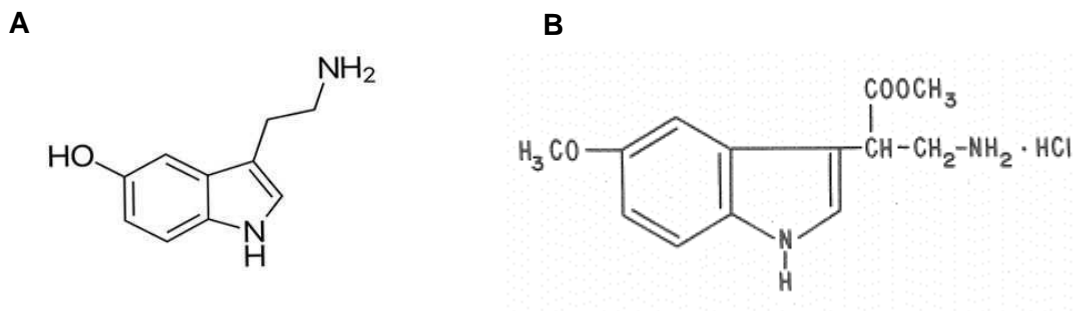
Al igual que sucede con los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, la estimulación de los receptores 5HT<sub>4</sub> incrementa la concentración intracelular de cAMP y por consiguiente aumenta la actividad de la PKA. La PKA se encarga de fosforilar proteínas clave del AEC, tales como los LCC, la subunidad inhibidora de la troponina I y PLB (Gergs y cols., 2009; Meschin y cols., 2015). De esta manera incrementa la contracción del corazón al aumentar la  $[Ca^{2+}]_i$ . La estimulación de los receptores 5HT<sub>4</sub> también propicia la despolarización de la membrana a través de la apertura de los canales de cationes sensibles a nucleótidos cíclicos (HCN), lo que aumenta la corriente marcapasos del nodo sinusal (Pino y cols., 1998). Por otra parte, la

estimulación de los receptores 5HT<sub>2A</sub> ejerce también un efecto inotrópico positivo al incrementar la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> a través de un aumento en la síntesis del inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y la estimulación de los receptores para IP<sub>3</sub> localizados en el retículo sarcoplásmico (Contreras y cols., 2010; Marín, 2011). De manera adicional, la estimulación de los receptores 5HT<sub>2A</sub> aumenta la fosforilación de la cadena ligera de la miosina a través de la cinasa de la cadena ligera de miosina y probablemente también a través de la cinasa Rho (RhoK) (Levy y cols., 2008). Estos mecanismos en conjunto, subyacen al efecto inotrópico positivo que la serotonina ejerce sobre los corazones de humanos y roedores.

La serotonina ejerce también efectos adversos sobre el corazón los cuales están relacionados con la estimulación de los receptores 5HT<sub>2</sub> presentes en los fibroblastos (Jafré y cols., 2009; Yabanoglu y cols., 2009). Sin embargo, estos efectos parecen presentarse cuando se pierde la homeostasis de serotonina y se generan cambios importantes en la expresión de sus receptores en el corazón. Por otro lado, aunque no se ha establecido con claridad si las alteraciones en la homeostasis de la serotonina contribuyen a la disfunción cardíaca en estados de resistencia a la insulina, se ha reportado que los receptores 5HT<sub>2A</sub> se encuentran regulados a la baja en ratas diabéticas, y que el efecto inotrópico positivo mediado por éstos, decrece significativamente (Goyal y Vaidya 2009). Considerando lo anterior, surge la pregunta de si un agonista de los receptores 5HT<sub>2A</sub> podría mejorar la contractilidad del corazón en estados de resistencia a la insulina.

## 2. ANTECEDENTES

Los efectos que tiene la serotonina sobre la captura de glucosa y la secreción de insulina han despertado el interés para el desarrollo de fármacos análogos que puedan ser usados para este fin. El indorrenato es un derivado de la serotonina que presenta un grupo metoxi en la posición 5 y tiene una sustitución en el carbón  $\beta$  correspondiente a un metil-carboxilato (Fig. 6) (Hong, 1981; Safdy y cols., 1982). Aunque en un inicio, se propuso al indorrenato como un agonista de los receptores  $5HT_{1A}$ , actualmente se sabe que también es agonista de los receptores  $5-HT_2$  y de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos (Hong, 1981; Miranda y cols., 2004). Se ha demostrado que el indorrenato tiene un efecto antihipertensivo mediado por su interacción con los receptores  $5HT_{1A}$  en el SNC (Hong y cols., 1981; Villafaña y cols., 2004). Este efecto se alcanza aproximadamente una hora después de administrar el indorrenato por vía oral, a una dosis de 10 mg/kg en ratas (Antonaccio y Kerwin, 1981). También se ha evaluado su efecto como ansiolítico y antidepresivo (Fernández y cols., 1990; Martínez y cols., 2002), e incluso se ha observado que posee un modesto efecto anorexigénico (Velázquez y cols., 1995).



**Figura 6.** Estructura de la serotonina (5-hidroxitriptamina) (A). Estructura del indorrenato (5-metoxitriptamina,  $\beta$ -metilcarboxilato) (B) (Hong, 1981).



En el 2004, Villafaña y colaboradores reportaron por primera vez que el indorrenato tiene un efecto hipoglucémico en ratas anestesiadas. Años más tarde, Medina (2012) mostró por medio de pruebas de tolerancia a la glucosa oral, que el indorrenato tiene un efecto antihiper glucemiante en ratas Wistar sanas. Continuando con esta línea de investigación, en el 2015, Silva reportó que la administración aguda del indorrenato (5mg/kg) es capaz de incrementar la secreción de insulina y mejorar la sensibilidad a la insulina, a través de un mecanismo que involucra a los receptores 5HT<sub>2</sub>, en ratas Wistar Kyoto que presentan síndrome metabólico en respuesta a una dieta alta en fructuosa. Estos datos indican que el indorrenato, además de actuar como un antihipertensivo, tiene efectos sobre el metabolismo de la glucosa, posiblemente relacionados con su capacidad de favorecer la secreción de insulina. Asimismo, los datos sugieren que el indorrenato podría tener un efecto benéfico en el síndrome metabólico al incrementar la sensibilidad a la insulina.

La resistencia a la insulina se asocia con una reducción en la expresión de GLUT4 en el corazón y contribuye a las alteraciones en la homeostasis de Ca<sup>2+</sup> asociadas con la disfunción cardiaca en el síndrome metabólico. Por lo anterior es factible proponer que el indorrenato, al reducir la resistencia a la insulina, podría también disminuir dichas alteraciones en el corazón. Cabe mencionar que debido a la evidencia que se tiene, en relación al efecto inotrópico positivo mediado por los receptores 5HT<sub>2A</sub> en los corazones de roedores (Levy y cols., 2008), la reducción en la expresión de estos receptores está asociada con una disminución de sus efectos inotrópicos positivos en ratas diabéticas (Goyal y Vaidya 2009). Ciertamente el indorrenato es un agonista 5HT<sub>2</sub> (Hong, 1981; Miranda y cols., 2004), por lo tanto no se puede descartar que ejerza también un efecto directo en el corazón, que contribuya a reducir la disfunción cardiaca en el síndrome metabólico.

### **3. HIPÓTESIS**

El indorrenato al prevenir o reducir el desarrollo de la resistencia a la insulina, incrementará la expresión de GLUT4 y contribuirá a la recuperación de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  durante el AEC en los corazones de ratas adultas con síndrome metabólico.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 General.**

Estudiar el efecto de la administración profiláctica y terapéutica del indorrenato en la resistencia a la insulina en un modelo de síndrome metabólico inducido por la ingesta de fructuosa, y evaluar su relación con la expresión de GLUT4 y la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  cardíaca.

#### **4.2. Particulares.**

1. Establecer el modelo de síndrome de metabólico en ratas tratadas con fructuosa en el agua de bebida (20%), y evaluar el efecto del indorrenato, tanto en su administración profiláctica como terapéutica sobre la resistencia a la insulina.
2. Estudiar el efecto del indorrenato, tanto en su administración profiláctica como terapéutica, sobre la expresión de GLUT4 en el miocardio ventricular de ratas tratadas con fructuosa.

3. Estudiar el efecto del indorrenato, tanto en su administración profiláctica como terapéutica, sobre el transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por estimulación eléctrica en los miocitos ventriculares de ratas tratadas con fructuosa.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **5.1. Modelo experimental de síndrome metabólico.**

#### **5.1.1. Animales.**

Se utilizaron ratas Wistar macho adultas, que al inicio de los tratamientos tenían 8 semanas de edad y un peso entre 250-300 g. Los animales se mantuvieron en un ambiente controlado de temperatura 23-25°C y humedad 45-55%, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 x 12 h. El manejo de los animales se realizó de acuerdo a lo descrito en la NOM-062-ZOO-1999. Todos los animales fueron alimentados con alimento estándar Lab diet 5008 de purina.

#### **5.1.2. Desarrollo del síndrome metabólico y tratamientos farmacológicos.**

Los animales se dividieron de manera aleatoria en 6 grupos (cada grupo con 6 animales): a) Grupo control, con ratas que recibieron agua potable, b) Grupo con fructosa, con animales que recibieron fructuosa en el agua de bebida (20%) por 3 meses, c) Grupo con fructosa + tratamiento terapéutico de indorrenato (10mg/kg), con animales que recibieron el tratamiento de fructuosa, y tres semanas antes de los 3 meses se inició también la administración de indorrenato (10mg/kg) en el agua de bebida, d) Grupo con fructosa + tratamiento profiláctico de indorrenato, con

animales que iniciaron de manera simultánea el tratamiento de fructuosa e indorrenato.

Dado que en la terapéutica de los padecimientos relacionados con la resistencia a la insulina, no se tiene algún fármaco análogo a la 5-HT, para fines de este trabajo se empleó a la metformina como fármaco de comparación, puesto que es el fármaco de primera elección para el tratamiento de pre-diabetes y diabetes. Si bien no se espera que actúe bajo el mismo mecanismo molecular que el indorrenato, hay evidencia suficiente de que reduce la resistencia a la insulina y tiene un efecto cardioprotector. Por consiguiente, se formaron 2 grupos adicionales: e) Grupo con fructosa + tratamiento terapéutico de metformina (300mg/kg), con animales que recibieron el tratamiento de fructuosa, y tres semanas antes de cumplir los 3 meses de tratamiento iniciaron también el tratamiento de metformina en el agua de bebida, f) Grupo con fructosa + tratamiento profiláctico de metformina (300mg/kg), con animales que iniciaron al mismo tiempo el tratamiento de fructuosa y metformina.

La solución de fructosa al 20% que se suministró a los animales como agua de bebida, fue remplazada todos los días para evitar cualquier contaminación bacteriana. Para los grupos con tratamiento farmacológico, los compuestos se adicionaron a la solución de fructosa al 20% debido a que la vida media del indorrenato es corta y administrarlo a través de una cánula en los animales durante 3 meses podría dañarlos. Los animales fueron pesados y su consumo promedio de agua fue monitoreado antes de comenzar el tratamiento, de manera que la dosis se ajustó a ambas variables. De esta manera en promedio, los grupos de ratas formadas por 3 individuos comenzaron por beber 130 mL de fructosa al 20% adicionada con 9 mg de indorrenato, acercándose de esta manera a la dosis deseada (10mg/kg). Tanto el consumo de agua como el peso de los animales se mantuvo en constante monitoreo con la finalidad de evitar variaciones en la dosis. Estas consideraciones también se tomaron en la administración de metformina.

### **5.1.3. Evaluación del desarrollo del síndrome metabólico**

#### **5.1.3.1. Determinación de la presión arterial.**

La presión arterial sistólica se monitoreó a través del método esfigmomanométrico clásico, utilizando un medidor de presión LE 5002 Letica. Éste método sigue el principio de los sonidos de Korotkoff que son producidos por la arteria de interés ocluida por un manómetro y su posterior descompresión. El manómetro ejerce presión en la cola de las ratas hasta suspender el sonido del latido en la arteria caudal, siendo el primer latido que se percibe al liberar la presión gradualmente el que determina la presión arterial sistólica. El último latido antes de restablecerse la circulación normal en la arteria corresponde a la medida de la presión arterial diastólica. El procedimiento requiere que la arteria caudal de los animales esté dilatada, por lo tanto las ratas fueron inmovilizadas parcialmente en cepos de acrílico para calentar sus colas con una lámpara durante al menos 12 minutos. Para evitar la influencia del estrés que se produce en las ratas al ser manipuladas, se les expuso a las condiciones en que la presión sería tomada durante 3 días, antes del registro. La presión arterial en los animales se registró antes de cada tratamiento y cada mes después del inicio de estos, cuidando que las condiciones experimentales no los estresaran.

#### **5.1.3.2. Determinación de glucosa y triglicéridos en sangre.**

Antes de iniciar los tratamientos, se midieron los valores basales de las concentraciones de triglicéridos y glucosa en la sangre de los animales. Estas medidas se realizaron cada mes por medio de tiras reactivas y los equipos Accu-Chek® Active para glucosa y Accutrend Plus System de Roche para triglicéridos.

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción de la punta de la cola de las ratas, tras 8 horas de ayuno.

### **5.1.3.3. Determinación de insulina y obtención del índice HOMA.**

La determinación de insulina en sangre se realizó utilizando un kit comercial de ALPCO (Ultrasensitive Rat Insulin ELISA), siguiendo las especificaciones del fabricante. Todas las muestras fueron adquiridas al momento del sacrificio de cada animal, tomando la sangre acumulada en la cavidad torácica al extraer el corazón. La sangre se dispuso en tubos para microcentrífuga de 1.5 mL previamente heparinizados y se centrifugó a 13500 rpm a 4°C durante 10 minutos. El suero obtenido se alicuotó y conservó a -70°C en un ultracongelador hasta el momento de su uso.

Para el procesamiento de las muestras, se preparó por duplicado la curva de calibración con las concentraciones de insulina estándares de 0, 0.15, 0.40, 1.0, 3.0 y 5.5 µg/mL. Se empleó una placa de 96 pozos donde cada muestra se evaluó por duplicado, añadiendo 10 µL de muestra más 75 µL de una dilución de anticuerpo monoclonal anti-insulina. La placa fue incubada durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación constante y al término de ese tiempo se lavó 6 veces con solución amortiguadora. Posteriormente, se incubó la placa durante 15 minutos a temperatura ambiente con 200 µL de sustrato de peroxidasa (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina). Para detener la reacción se añadió H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 M. Finalmente la lectura se realizó a 450 nm en el equipo BIO-RAD iMark Microplate Reader a los tiempos 0, 15 y 30 minutos.

Las absorbancias obtenidas correspondientes a la curva patrón fueron ajustadas con regresión no lineal usando el programa GraphPad Prism 6.01. La concentración de insulina en las muestras se expresa como ng/mL.

Para obtener el índice de HOMA, las concentraciones de insulina se convirtieron a  $\mu\text{U/mL}$ , mientras que la glucosa plasmática se consideró en  $\text{mmol/L}$ , tal como lo requiere la fórmula para su cálculo:

$$HOMA\ IR = \frac{\text{Insulina plasmática en ayunas } (\mu\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}) \times \text{glucosa plasmática en ayunas } (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})}{22.5}$$

#### **5.1.3.4. Medición del peso corporal y de la grasa abdominal.**

El peso de las ratas se registró cada mes, mientras que la grasa correspondiente a los cojinetes retroperitoneales se disecó y pesó hasta el momento del sacrificio del animal. Se calculó el porcentaje de grasa visceral, a través de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ grasa visceral} = \frac{\text{Peso de los cojinetes disectados}}{\text{Peso total del roedor}} \times 100$$

## 5.2. Evaluación de la expresión de GLUT4.

La expresión de GLUT4 se evaluó mediante Western blot. Para esto, se extrajo el corazón de la cavidad torácica y se perfundió con solución Tyrode (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, HEPES 10mM, glucosa 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM y CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM, pH 7.4) suplementada con heparina (0.12 mg/mL), hasta expulsar la sangre de las arterias coronarias. Después, los ventrículos fueron macerados en nitrógeno y almacenados en alícuotas a -70°C hasta su uso. La homogenización de los ventrículos se realizó utilizando un mortero con pistilo esmerilado, con buffer de lisis (NaCl 150 mM, Triz base 50 mM, EDTA 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, DTT 1mM, pH 7.8), adicionado con inhibidores de proteasas (benzamidina 1 mM, pepstatina A 2 µg/mL, aprotinina 2 µg/mL, PMSF 1 mM, NEM 1mM), inhibidores de fosfatasas (NaF 5 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 5 mM) y tritón X-100 1%. Las muestras se centrifugaron a 13,500 rpm a 4°C por 20 minutos. El sobrenadante se almacenó en alícuotas a -70°C y la concentración total de proteínas fue determinada por el método de Bradford.

Se tomaron 50 µg de proteína y la muestra se separó mediante electroforesis en geles SDS-PAGE al 12%, que se corrieron a 120 V por 2 horas. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF a 70 V durante 1.5 horas. Después de la transferencia, se bloqueó la membrana en una solución de PBS-Tween 0.05% suplementada con leche al 5%, durante al menos dos horas. Posteriormente, se incubó a las membranas con el anticuerpo policlonal anti-GLUT4 a una dilución de 1:2000. Como anticuerpo secundario se empleó anti-rabbit IgG a una dilución de 1:5000. Como control de carga se utilizó la señal producida por el anticuerpo anti-GAPDH (1:5000), y en este caso se utilizó el anticuerpo secundario anti-mouse IgG (1:8000). Todos los anticuerpos fueron diluidos en PBS-Tween 0.05% con leche al 5%. Finalmente, los blots fueron revelados por quimioluminiscencia (Immobilon, Millipore) y la detección de la señal emitida fue adquirida con el equipo ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad). Las imágenes de los blots se analizaron con el programa Image Lab 6.0.



### 5.3. Registro de los cambios transitorios de la $[Ca^{2+}]_i$ .

Las señales de  $Ca^{2+}$  se registraron en miocitos ventriculares que fueron aislados de manera enzimática utilizando la técnica descrita por Balderas-Villalobos (2011). Brevemente, se anestesió a los animales con pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p), se extrajo el corazón y se recibió en una solución de Krebs modificada (NaCl 130 mM, ácido láctico 1 mM, KCl 5.4 mM, ácido pirúvico 3 mM, HEPES 25 mM,  $MgCl_2$  1 mM,  $NaH_2PO_4$  0.33 mM, dextrosa 22 mM, pH 7.6, 4°C) adicionada con EGTA (0.2 mM). El corazón se colocó en un sistema de Langendorff para perfundirlo a través de la aorta con la solución de Krebs suplementada con colagenasa tipo II (2mg/ml, Worthintong) y  $CaCl_2$  (50  $\mu$ M) a 37 °C por 10 minutos. La digestión se detuvo al cortar los ventrículos y depositarlos en una solución de Krebs suplementada solo con  $CaCl_2$  (50  $\mu$ M). La trituración del tejido se continuó en esta solución de manera mecánica hasta obtener una suspensión de células. Tras filtrar la suspensión, se obtuvieron cardiomiocitos que fueron acondicionados para sobrevivir en concentraciones altas de  $Ca^{2+}$ . Para ello, los cardiomiocitos fueron expuestos de manera secuencial a una serie de alícuotas de solución de Krebs adicionada con albúmina y concentraciones crecientes de  $CaCl_2$  (250  $\mu$ M, 500  $\mu$ M y 1 mM).

Las alteraciones en la homeostasis de  $Ca^{2+}$  que se presentan en el síndrome metabólico, se determinaron al registrar los incrementos transitorios de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducidos por estimulación eléctrica (transitorios de  $Ca^{2+}$ ). Para ello, los miocitos fueron incubados con el indicador fluorescente de  $Ca^{2+}$ , el Fluo-4 (1  $\mu$ M), a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 30 minutos. Posteriormente, el exceso de Fluo-4 fue retirado y se agregó una alícuota de las células en una cámara de registro colocada en la platina de un microscopio confocal (Zeiss LSM 800 con Airyscan y Olympus, Fluoview FV1000). La luz de excitación se seleccionó a 488 nm y la de emisión se adquirió a 505 nm. Los registros de fluorescencia se

adquirieron haciendo un barrido en línea a lo largo del eje longitudinal de la célula fuera del área nuclear. De ésta manera se obtuvieron imágenes bidimensionales (X-Y) en función de la distancia y el tiempo, con una frecuencia de adquisición de 20  $\mu$ s por pixel. Durante los registros, los miocitos se perfundieron con una solución de Tyrode normal (en solución Tyrode (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, HEPES 10mM, glucosa 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM, pH 7.4) a temperatura ambiente. Para evocar los transitorios de Ca<sup>2+</sup>, las células se estimularon eléctricamente con pulsos de 20 V, de 10 ms de duración y a una frecuencia de 1 Hz. Al termino de los registros, se evaluó el contenido de Ca<sup>2+</sup> en el retículo sarcoplásmico perfundiendo a las células con solución de Tyrode suplementada con cafeína (10 mM), un agonista de los RyR.

Para evaluar los efectos de los diferentes tratamientos, se obtuvieron los registros de los transitorios de Ca<sup>2+</sup> inducidos por estimulación eléctrica y cafeína en los miocitos de las ratas de cada uno de los grupos experimentales. Los transitorios de Ca<sup>2+</sup> se analizaron con el programa ImageJ para obtener su amplitud y los tiempos para alcanzar el 50 y 90% de reducción de la amplitud máxima durante la fase de descenso (TD<sub>50</sub> y TD<sub>90</sub>, respectivamente). Los valores de TD<sub>50</sub> y TD<sub>90</sub> reflejan el funcionamiento de SERCA y NCX, respectivamente (Fearnley y cols., 2011). La [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> se reporta como la fluorescencia (F) normalizada con respecto a la fluorescencia basal (F<sub>0</sub>) (F/F<sub>0</sub>).

## **5.5. Análisis estadístico.**

Los resultados se presentan como la media  $\pm$  el error estándar. Para analizar las diferencias estadísticas entre los grupos se realizó el Análisis de Varianza (ANOVA) de una o dos vías, seguido de una prueba Student-Newman-Keuls. En todos los casos se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando el valor de  $p < 0.05$ . Se usó el programa Sigma Plot 12.0 para la elaboración de los análisis y las gráficas.

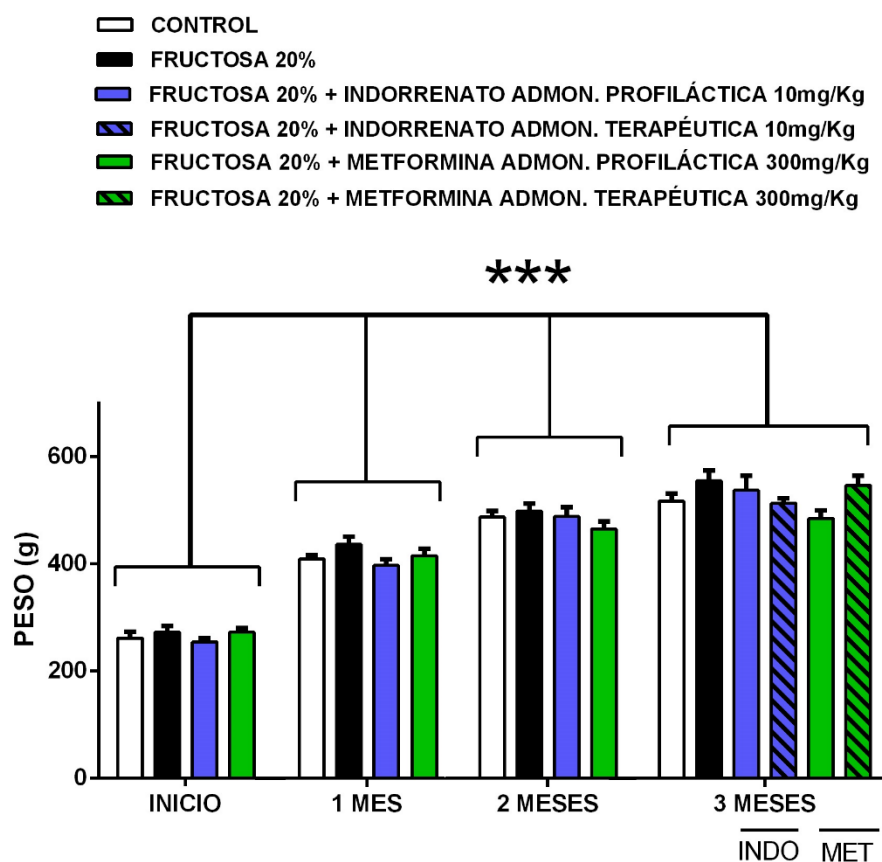
## **6. RESULTADOS.**

### **6.1. Efectos del indorrenato y la metformina sobre la obesidad central generada por la fructuosa.**

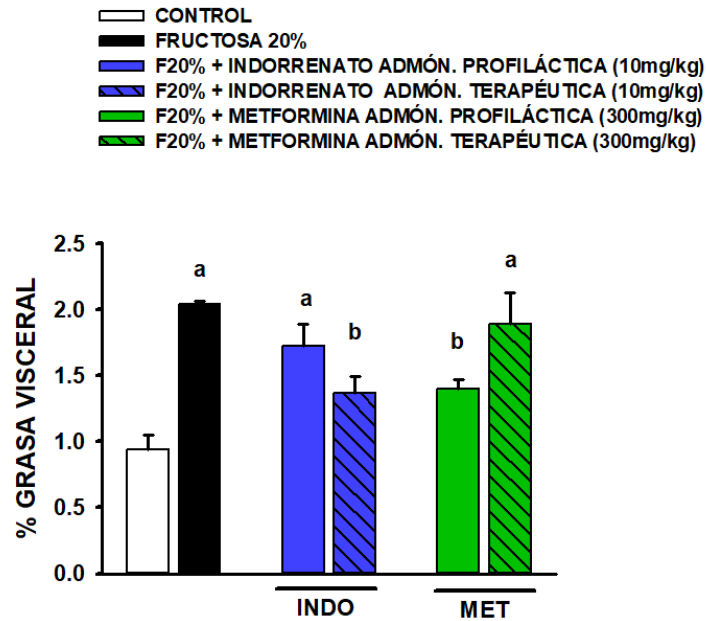
Para corroborar el desarrollo de obesidad se evaluaron los efectos de la ingesta de fructuosa sobre el peso corporal y el porcentaje de grasa visceral. En la Figura 7 se muestran los valores del peso corporal obtenidos cada mes durante los 3 meses de tratamiento con la fructuosa. Se puede apreciar que el peso de los animales que recibieron solo agua para beber (control), incrementó de manera gradual y significativa durante los 3 meses del protocolo experimental, lo que muestra el curso temporal de la ganancia de peso que resulta del crecimiento natural de los animales. En la misma Figura se puede observar, que los animales tratados con fructuosa presentan también un incremento significativo y gradual en su peso corporal. Sin embargo, este incremento no fue diferente del que se registró en el grupo control, lo que sugiere que la ingesta de fructuosa no modificó la ganancia de peso generada por el crecimiento de los animales. Por el contrario, como se muestra en la Figura 8, al comparar los valores del porcentaje de grasa retroperitoneal, obtenidos después de los 3 meses del protocolo experimental, en el grupo control y en el grupo tratado con fructuosa, se observa que este porcentaje fue significativamente mayor en los animales tratados con fructuosa. Datos que corroboran el desarrollo de obesidad visceral promovido por la fructuosa, a pesar de que ésta no se manifiesta con una ganancia de peso.

Como se ilustra en la Figura 7, los tratamientos con indorrenato o metformina, ya sea en su administración profiláctica o terapéutica, no modificaron de forma significativa el curso temporal de la ganancia de peso generada por el crecimiento natural de los animales, ya que el incremento de peso que ocurrió en estos animales durante los 3 meses del protocolo experimental fue similar al que se observó en el

grupo control y en el grupo que solo recibió fructuosa. Sin embargo, al analizar los efectos de estos compuestos sobre el porcentaje de grasa retroperitoneal se observó que el indorrenato solo causó un decremento significativo en la acumulación de grasa visceral promovido por la fructuosa en su administración terapéutica, mientras que la metformina sólo previno el incremento en el porcentaje de grasa retroperitoneal en su administración profiláctica (Figura 8).



**Figura 7. Peso corporal.** Los valores se presentan como la media  $\pm$  EEM, N=6 para cada grupo. En todos los casos se consideró como diferencia significativa valores de  $P < 0.01$  (\*\*\*) ANOVA de dos vías, Student-Newman-Keuls.

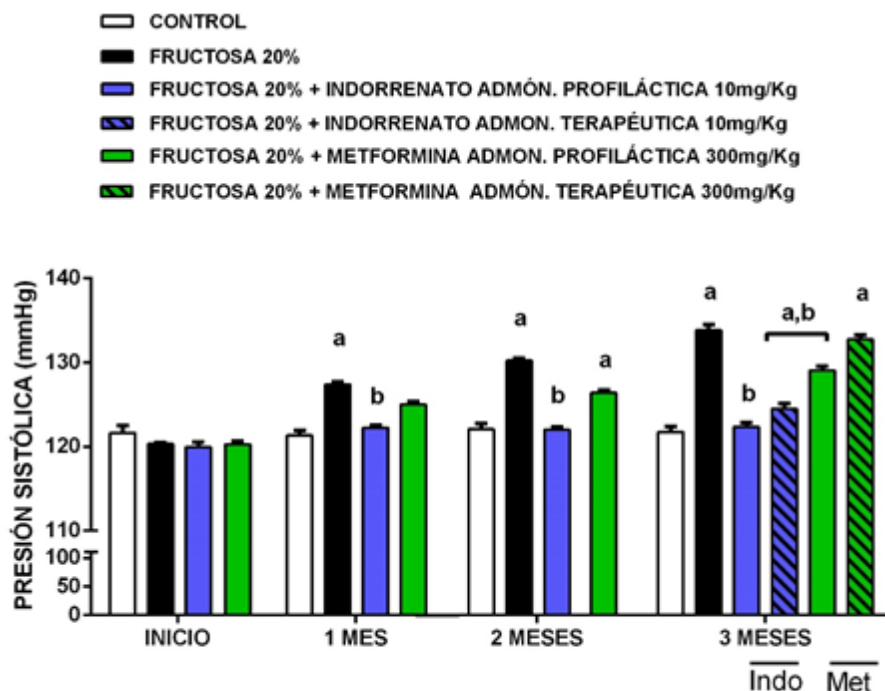


**Figura 8. Porcentaje de grasa visceral.** Los valores presentan como la media  $\pm$  EEM, N=4 para cada grupo. En todos los casos se consideró como diferencia significativa valores de  $P < 0.05$ . a: vs control; b: vs fructosa. ANOVA de una vía, Student-Newman-Keuls.

## 6.2. Efectos del indorrenato y la metformina sobre el incremento de la presión arterial inducido por la fructuosa.

Se ha descrito que en el modelo de síndrome metabólico inducido por fructosa se puede presentar un incremento en la presión arterial sistólica (Die y McNeill, 1995; Dupas 2017). Para evaluar si esto ocurre bajo nuestras condiciones experimentales, se monitoreó la presión arterial de los animales cada mes durante los 3 meses de tratamiento con fructuosa. En la Figura 9 se muestran los resultados obtenidos. Se puede apreciar que antes de iniciar el tratamiento con fructuosa, los animales de todos los grupos experimentales presentaron una presión arterial sistólica promedio de alrededor de 120 mmHg. Posteriormente, en el grupo control los valores de la presión arterial sistólica se mantuvieron estables durante los 3 meses del estudio, mientras que en el grupo tratado con fructuosa se presentó un incremento significativo en la presión arterial, respecto al grupo control, a partir del primer mes

de tratamiento, y este aumento se mantuvo durante los siguientes dos meses de tratamiento.



**Figura 9. Presión sistólica.** Los valores se presentan como la media  $\pm$  EEM, N=6 para cada grupo. En todos los casos se consideró como diferencia significativa valores de  $P < 0.05$ . a: vs control; b: vs fructosa. ANOVA de dos vías, Student-Newman-Keuls.

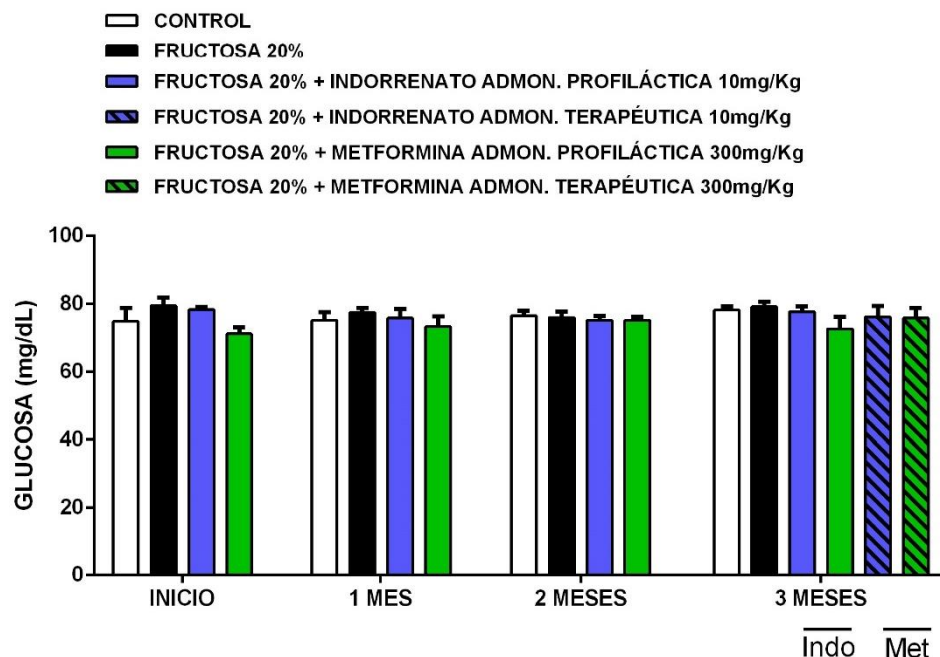
Por otro lado, la administración profiláctica con indorrenalolol previno desde el primer mes, el incremento en la presión arterial generado por la fructuosa, como lo indica el hecho de que la presión arterial sistólica se mantuviera en valores similares al grupo control, a pesar del tratamiento con fructuosa. Este efecto antihipertensivo del indorrenalolol también se observó con su administración terapéutica, ya que su administración, 3 semanas antes de finalizar los 3 meses de tratamiento con fructuosa, redujo de manera significativa el aumento en la presión arterial producido por este azúcar. En el caso de la metformina, se puede observar en la gráfica que su administración profiláctica no previno de forma significativa el aumento en la presión generado por la fructuosa durante los primeros 2 meses del tratamiento. Sin embargo, a los 3 meses de tratamiento, la metformina si disminuyó de forma

significativa el efecto hipertensivo de la fructuosa. Por el contrario, la administración terapéutica de la metformina no modificó el incremento en la presión sistólica generado después de los 3 meses de tratamiento con fructuosa. Estos datos indican que a diferencia del indorrenato, la metformina solo previno parcialmente el incremento en la presión sistólica provocado por la fructuosa, pero no fue capaz de revertirlo.

### **6.3. Efectos del indorrenato y la metformina sobre las concentraciones de glucosa e insulina y en el índice HOMA.**

En la Figura 10 se muestran los datos de las mediciones de glucosa obtenidos de la sangre de los animales de los diferentes grupos experimentales, durante los 3 meses de tratamiento. En el grupo control se observó que la concentración de glucosa en sangre se mantuvo sin cambios significativos durante todo el estudio. Asimismo, como se aprecia en la gráfica, la concentración de glucosa no se modifica ni por el tratamiento de fructuosa, ni por la administración terapéutica o profiláctica del indorrenato o de la metformina, durante los 3 meses de tratamiento.

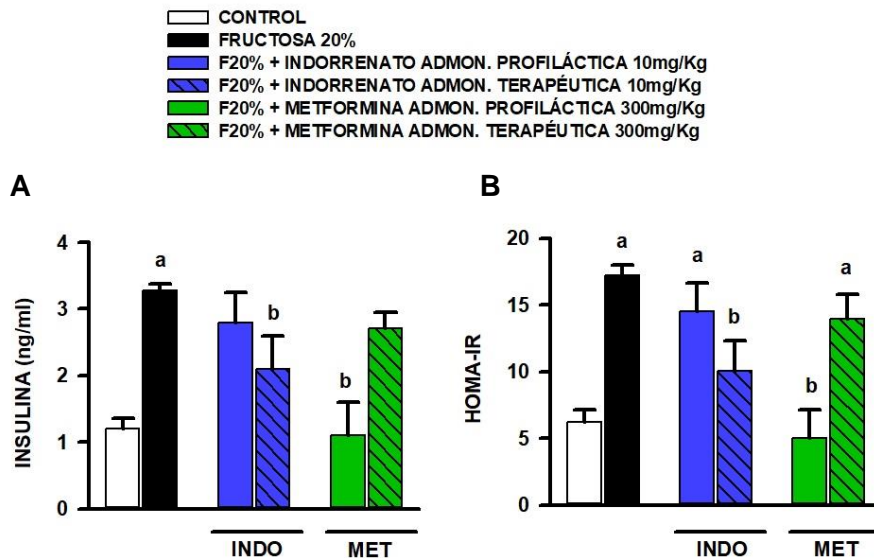
Dentro de los principales componentes del síndrome metabólico se encuentran la hiperinsulinemia y la resistencia a la insulina, las cuales se encuentran relacionadas entre sí. Para evaluar el desarrollo de éstas, se determinaron la concentración de insulina en suero y el índice HOMA, al finalizar los tres meses de tratamiento. En la Figura 11 se resumen los datos obtenidos. El tratamiento con fructuosa incrementó de manera significativa la concentración de insulina en suero (Figura 11A), lo que se relacionó con un incremento también en el valor del índice HOMA (Figura 11B). Estos datos muestran el desarrollo de hiperinsulinemia y resistencia a la insulina en el modelo experimental utilizado.



**Figura 10. Concentración de glucosa en sangre.** Los valores se presentan como la media  $\pm$  EEM, N=6 para cada grupo. En todos los casos se consideró como diferencia significativa valores de  $P < 0.05$ . ANOVA de dos vías, Student-Newman-Keuls.

Por otro lado, el tratamiento profiláctico con indorrenato no previno los incrementos en los niveles de insulina (Figura 11A), ni en el índice HOMA (Figura 11B) generados por la fructosa. Sin embargo, la administración terapéutica del indorrenato redujo de manera significativa los efectos de la fructuosa en la concentración de insulina y en el índice HOMA, sin alcanzar a restablecer sus valores a los obtenidos en el grupo control. Por el contrario, el tratamiento profiláctico con metformina evitó por completo los incrementos en la concentración de insulina (Figura 11A) y en el índice HOMA (Figura 11B) causados por la fructuosa, de tal forma que estos valores se mantuvieron similares a los del grupo control. Mientras que el tratamiento terapéutico de la metformina no previno los aumentos en la concentración de insulina y en el índice HOMA generados por la fructuosa. De esta forma, los datos muestran que el indorrenato solo es capaz de reducir la hiperinsulinemia y la resistencia a la insulina cuando es administrado en forma terapéutica, mientras que la metformina solo puede prevenirlas cuando es administrada de forma profiláctica.

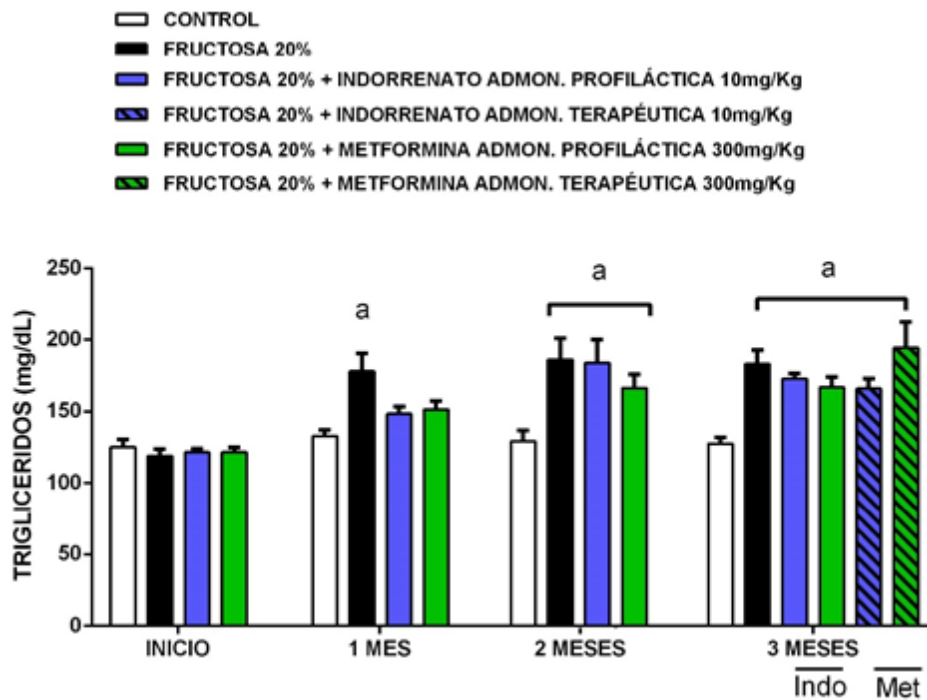




**Figura. 11. Concentración de insulina (A) e índice de HOMA (B).** Los valores se presentan como la media  $\pm$  EEM, N=4 para cada grupo. En todos los casos se consideró como diferencia significativa valores de  $P < 0.05$ . a: vs control; b: vs fructosa. ANOVA de una vía, Student-Newman-Keuls.

#### 6.4. Efectos del indorrenato y la metformina sobre las concentraciones de triglicéridos

Otro de los componentes del síndrome metabólico es la hiperlipidemia, caracterizada por el aumento de triglicéridos y AGL. Para evaluar su desarrollo en nuestro modelo de síndrome metabólico, se determinaron los efectos de la fructuosa en la concentración de triglicéridos. Los triglicéridos en sangre se midieron antes del inicio del tratamiento y una vez al mes durante los 3 meses de tratamiento con fructosa. Como se puede ver en la Figura 12, en el grupo control los niveles de triglicéridos se mantuvieron sin cambios significativos durante los 3 meses del protocolo experimental. Por el contrario, en el grupo con fructosa se observó un incremento significativo en la concentración de los triglicéridos a partir del primer mes de tratamiento, y se mantuvo elevado en los dos meses siguientes, lo que demuestra el desarrollo de hipertrigliceridemia.

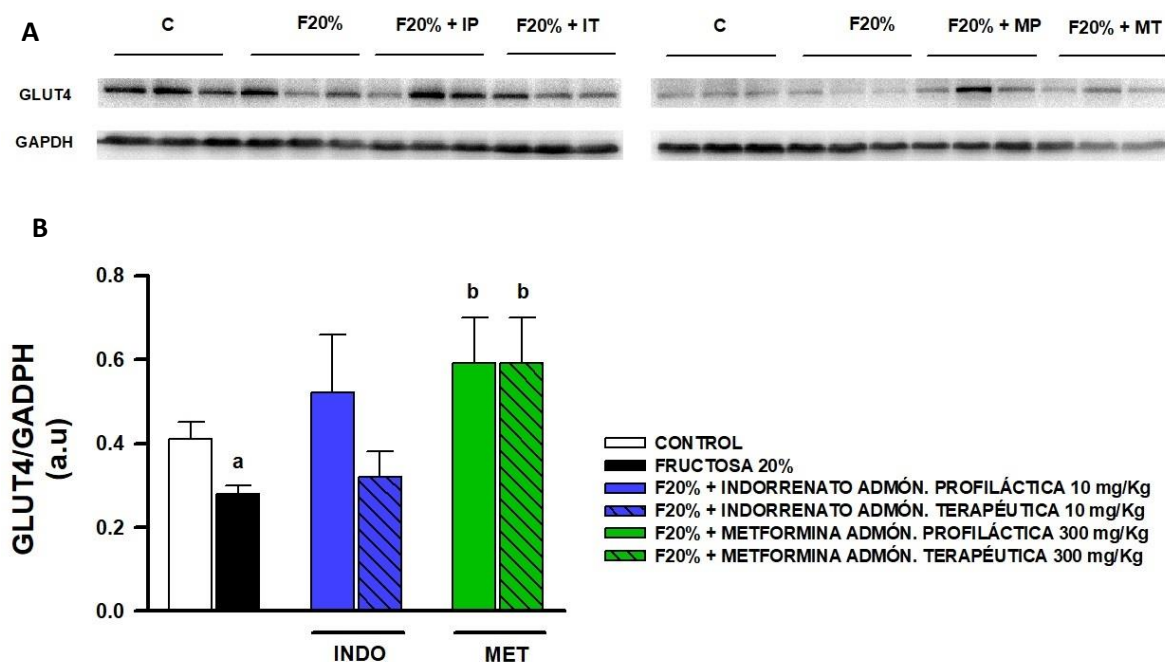


**Figura 12. Concentración de triglicéridos en sangre.** Los valores se presentan como la media  $\pm$  EEM, N=6 para cada grupo. En todos los casos se consideró como diferencia significativa valores de  $P < 0.05$ . a: vs control; b: vs fructosa. ANOVA de dos vías, Student-Newman-Keuls.

Al evaluar los efectos de los tratamientos con indorrenato se observó que la administración profiláctica de este compuesto no previno el incremento en los triglicéridos producido por la fructuosa. Sin embargo, a diferencia del grupo tratado solo con fructuosa, este aumento solo fue significativo respecto al grupo control a partir del segundo mes, lo que sugiere que el indoretrato en su administración profiláctica produce un retardo en el desarrollo de la hipertrigliceridemia. Por otro lado, el tratamiento terapéutico con indorrenato no redujo de manera significativa el incremento en la concentración de los triglicéridos causado por la fructuosa. De manera similar, la metformina administrada de forma profiláctica no evitó el aumento en los triglicéridos producido por la fructuosa, pero sí parece retardarlo porque el aumento solo fue significativamente mayor al grupo control a partir de los dos meses de tratamiento. Finalmente, la metformina administrada de forma terapéutica no revirtió la hipertrigliceridemia causada por la fructuosa.

## **6.5. Efectos del indorrenato y la metformina sobre la expresión de GLUT4.**

Se ha reportado que en la resistencia a la insulina ocurre un decremento en el contenido de GLUT4 en el tejido adiposo, músculo esquelético y músculo cardíaco (Leguisamo y cols., 2012; Baena y cols., 2015). Sin embargo, en el modelo de síndrome metabólico inducido por fructosa no se ha establecido claramente si ocurren alteraciones en la expresión de GLUT4 (Morel y cols., 2005; Leguisamo y cols., 2012). Por lo tanto, en el presente trabajo se evaluó la expresión de GLUT4 en el miocardio ventricular de los diferentes grupos experimentales. En el panel A de la Figura 13 se muestra una imagen representativa de los inmunoblots obtenidos para GLUT4 y GAPDH, y en el panel B se muestran los promedios de los valores normalizados de la señal de GLUT4 respecto a la señal de GAPDH para cada grupo. Se puede observar que el contenido de GLUT4 fue significativamente menor en el grupo tratado con fructuosa comparado con el grupo control, lo que sugiere que la expresión de este transportador se encuentra reducida en este modelo de síndrome metabólico. Por otro lado, la administración profiláctica del indorrenato previno la reducción en la expresión de GLUT4 producida por la fructuosa. Mientras que su administración terapéutica revirtió parcialmente la reducción en la expresión de GLUT4 inducida por fructosa. En cuanto a la metformina, se puede apreciar que su administración profiláctica previno y su administración terapéutica revirtió la reducción en la expresión de GLUT4 producida por la fructuosa. Cabe señalar, que tanto en su administración profiláctica como terapéutica, la metformina no solo previno o revirtió la disminución en la expresión de GLUT4, sino que incluso la aumentó.

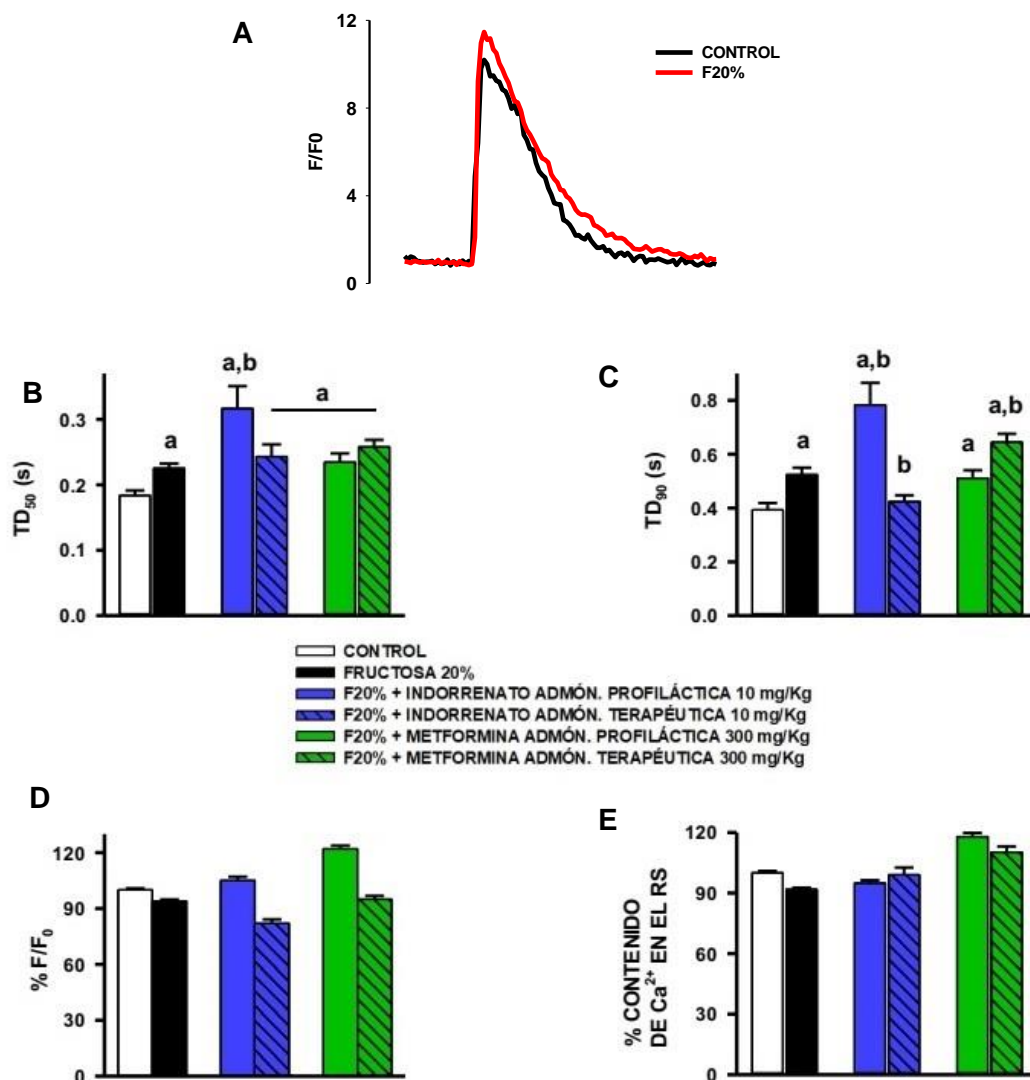


**Figura 13. Evaluación en la expresión de GLUT4 en miocitos ventriculares.** Expresión de GLUT4 en homogenados de ventrículos (A). Datos normalizados (B). Los valores se presentan como la media  $\pm$  EEM, N=3 para cada grupo. En todos los casos se consideró como diferencia significativa valores de  $P < 0.05$ . a: vs control; b: vs fructosa. ANOVA de una vía, Student-Newman-Keuls.

## 6.6. Efectos del indorrenato y la metformina sobre la homeostasis de $Ca^{2+}$ .

Como se mencionó antes, una de las manifestaciones tempranas del síndrome metabólico es la disfunción diastólica del corazón, que se caracteriza por un enlentecimiento en la fase de decaimiento del transitorio de  $Ca^{2+}$  durante el acoplamiento excitación-contracción. Para evaluar el desarrollo de la disfunción diastólica se registraron los transitorios de  $Ca^{2+}$  inducidos por estimulación eléctrica y se determinaron los valores de  $TD_{50}$  y  $TD_{90}$  en los diferentes grupos experimentales. En el panel A de la Figura 14 se muestran los perfiles de fluorescencia representativos del grupo control y del grupo tratado con fructuosa, mientras que en el panel B y C se muestran los datos promedios para el  $TD_{50}$  y  $TD_{90}$ , respectivamente. Como se puede apreciar, el tratamiento con fructuosa causó

un enlentecimiento de la fase de descenso del transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 14A) lo que se refleja en un incremento significativo tanto del  $\text{TD}_{50}$  (Figura 14B) como del  $\text{TD}_{90}$  (Figura 14C). Estos datos confirman el desarrollo de disfunción diastólica en el modelo de síndrome metabólico inducido por la fructuosa.



**Figura 14. Evaluación de parámetros de los TCa en miocitos ventriculares.** Perfiles de fluorescencia representativos de transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  obtenidos a partir de miocitos de control (línea negra) y miocitos de ratas alimentadas con fructosa (línea roja) (A). Para cada uno de los tratamientos se presentan: Tiempo al 50% de la amplitud (B); Tiempo al 90% de la amplitud máxima (C); %Amplitud del TCa (D) y contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RS (E). Los valores se presentan como la media  $\pm$  EEM, N=9 para cada grupo. En todos los casos se consideró como diferencia significativa valores de  $P < 0.05$ . a: vs control; b: vs fructosa. ANOVA de una vía, Student-Newman-Keuls.  $\text{F}/\text{F}_0$ : Fluorescencia normalizada; RS: Retículo sarcoplásmico;  $\text{TD}_{50}$ : tiempo en el cual se alcanza el 50% de la amplitud máxima;  $\text{TD}_{90}$ : tiempo en el cual se alcanza el 90% de la amplitud máxima.

Al evaluar el efecto del tratamiento farmacológico con indorrenato, se observó que su administración profiláctica causó un incremento aún mayor tanto del TD<sub>50</sub> como del TD<sub>90</sub>, comparado con los generados por la fructuosa sola. Estos datos sugieren que la administración profiláctica del indorrenato no solo no previene el desarrollo de disfunción diastólica, sino que la agrava. Por otra parte, la administración terapéutica del indorrenato no corrigió el efecto de la fructuosa sobre la TD<sub>50</sub>, pero si lo hizo para la TD<sub>90</sub>, ya que en este caso si re-estableció los valores de este parámetro a niveles control, sugiriendo que el tratamiento terapéutico del indorrenato tiene un efecto benéfico en el corazón. En cuanto a la administración de metformina, se puede observar que sin importar el esquema de administración (profiláctica y terapéutica), este compuesto no previno ni corrigió el incremento en el TD<sub>50</sub> y TD<sub>90</sub> ocasionados por la fructuosa. De hecho, en su administración terapéutica, la metformina exacerbó el incremento en el TD<sub>90</sub>, ya que este valor fue significativamente mayor al aumento generado por la fructuosa sola.

Aunque la disfunción diastólica es la alteración que se manifiesta en el corazón de forma temprana en las personas que padecen obesidad y resistencia a la insulina, se ha descrito también el desarrollo de una disfunción sistólica que se presenta de forma más tardía. Para evaluar el posible desarrollo de las alteraciones sistólicas del corazón, se determinó la amplitud de los transitorios de Ca<sup>2+</sup> inducidos por estimulación eléctrica (Figura 14D). Asimismo, se evaluó el contenido de Ca<sup>2+</sup> en el retículo sarcoplásmico, midiendo la amplitud de la señal de Ca<sup>2+</sup> generada por la cafeína (Figura 14E). Sin embargo, como se observa en la Figura 14, no se encontraron diferencias significativas en la amplitud del transitorio de Ca<sup>2+</sup>, ni en el contenido de Ca<sup>2+</sup> en el retículo sarcoplásmico, entre el grupo control y el de fructuosa, lo que sugiere la ausencia de alteraciones en la homeostasis de Ca<sup>2+</sup> relacionadas con una disfunción sistólica. De manera similar, los tratamientos profilácticos o terapéuticos del indorrenato o de la metformina no generaron cambios significativos en estos parámetros.

## **7. DISCUSIÓN.**

### **7.1 Efectos de la fructosa en el desarrollo de síndrome metabólico y cardiopatía.**

La fructosa es un monosacárido que se encuentra presente de manera natural en algunas frutas y verduras. El consumo de fructosa incrementó desde la edad media debido a la introducción de la sacarosa como edulcorante, e incrementó de forma más drástica desde 1960, cuando los avances tecnológicos permitieron el desarrollo de jarabes con alto contenido de fructosa derivados de maíz. Actualmente, el jarabe de maíz de alta fructosa es el principal edulcorante en bebidas industrializadas de todo tipo. Entre otros factores, el sedentarismo y el incremento en el consumo de fructosa se encuentran estrechamente relacionados con el aumento en la incidencia de enfermedades metabólicas como la obesidad, el síndrome metabólico y la DMT2.

En el presente trabajo, se generó el modelo de síndrome metabólico en ratas Wistar alimentadas con fructosa al 20% en el agua de beber durante 3 meses. Al cabo de este tiempo, se pudieron identificar al menos 5 componentes del síndrome metabólico: obesidad visceral, hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina y un incremento moderado en la presión arterial. Estos resultados concuerdan con lo reportado en estudios previos en los que se ha utilizado este mismo modelo experimental (Die y McNeill, 1995; Dupas 2017).

El desarrollo de obesidad en el modelo de fructuosa se manifestó por un incremento en el porcentaje de grasa visceral y no como una ganancia en el peso corporal. Esta característica se presenta de manera frecuente en este modelo experimental y se ha sugerido que es así porque el consumo de fructosa en el agua de beber reduce el consumo de alimentos sólidos, lo que produce un desbalance en la aportación de

nutrientes; mientras que el pellet supone una dieta balanceada para los animales respecto a los macronutrientes (carbohidratos, proteínas y grasas), la fructosa únicamente aporta carbohidratos, que favorecen la lipogénesis (Bantle, 2009). Este desbalance, sobretodo en el aporte de proteína, puede contribuir a la pérdida de la masa muscular explicando la falta de ganancia en el peso corporal. En comparación con la glucosa, la fructosa produce un incremento mayor en los niveles postprandiales de triglicéridos, y se ha reportado que el aumento de lípidos en la circulación sanguínea promueve la acumulación del tejido adiposo (Kithan y Kim 2013). De esta manera, es posible que el incremento en la grasa visceral ocasionado por la fructosa se deba al aumento en los triglicéridos observado en los animales tratados con este azúcar.

Por otro lado, hay evidencia de que la acumulación excesiva de tejido adiposo contribuye al desarrollo de resistencia a la insulina. En concordancia, nosotros observamos que el modelo de síndrome metabólico utilizado en este estudio se asocia con un incremento en la acumulación de grasa visceral y con el desarrollo de resistencia a la insulina; esto último se corroboró con la presencia de hiperinsulinemia y el aumento en el índice HOMA. Se han descrito diferentes mecanismos por los cuales el tejido adiposo lleva al desarrollo de resistencia a la insulina. Los adipocitos presentes en el tejido adiposo almacenan el exceso de lípidos hasta incrementar en tamaño (hipertrofia) y posteriormente en número (hiperplasia). La fructosa acelera el proceso de hiperplasia ya que algunos de sus metabolitos, como el ácido úrico, propician la diferenciación de las células madre mesenquimales (o preadipocitos) a adipocitos (Kithan y Kim 2013). Además se ha observado que la fructosa, a diferencia de la glucosa, activa a la enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (11 $\beta$ -HSD1), cuya función es catalizar la síntesis de glucocorticoides, los cuales han sido relacionados con la diferenciación de preadipocitos (Legeza y cols., 2017). Aunado a esto se sabe que el tejido adiposo visceral es el depósito de grasa con mayor susceptibilidad de crecimiento ante la sobre-ingesta calórica, bajo influencia de los niveles de insulina (Levine y Levine, 2013). Cuando el tejido adiposo visceral alcanza su masa crítica puede sufrir hipoxia, la cual desencadena respuestas celulares que alteran la flexibilidad



metabólica entre la glucólisis y el metabolismo oxidativo, e incrementan la liberación de mediadores inflamatorios que contribuirán al establecimiento de la resistencia a la insulina. El consumo crónico de fructosa puede propiciar también un desbalance hormonal, en el cual se encuentran afectadas las funciones de la insulina, leptina y adiponectina. La adiponectina se sintetiza principalmente en el tejido adiposo y sus receptores se encuentran en los órganos sensibles a insulina, tales como músculo esquelético, hígado y tejido adiposo. La adiponectina mejora la sensibilidad a insulina ya que la estimulación de sus receptores incrementa la actividad de la AMPK y del receptor alfa activado por proliferación de peroxisomas (PPAR- $\alpha$ ), de tal modo que incrementa el transporte de glucosa y la oxidación de AGL (Levine y Levine, 2013; Kithan y Kim 2013). Se ha observado que en padecimientos como la obesidad y DMT2, así como en el modelo de síndrome metabólico inducido por fructosa, los niveles séricos de adiponectina se encuentran disminuidos. Esto podría explicar parcialmente porque la fructosa produce resistencia a la insulina; sin embargo, el tejido adiposo visceral desempeña un papel importante a través de la liberación de AGL y de citosinas proinflamatorias como la IL-1, IL-6 y el TNF- $\alpha$ . Estos mediadores inflamatorios compiten por la fosforilación de proteínas que participan en la señalización de la insulina y que son claves para el funcionamiento de ésta.

Otro efecto que pudimos observar en la presente investigación, fue el incremento moderado en la presión arterial sistólica en los animales que consumieron fructosa. Estos resultados coinciden con investigaciones previas en las que se ha planteado que el incremento en la presión arterial causado por la fructosa es sustancial pero no suficiente para considerarse hipertensión. Sin embargo, depende del lapso de tiempo y de la concentración de fructosa administrada (Die y McNeill, 1995; Diez y cols, 2013; Dupas 2017). Las causas por las que la fructosa incrementa la presión arterial no se conocen por completo, pero se han propuesto 3 mecanismos principales: la sobre estimulación del sistema nervioso simpático (SNS), la absorción de sales y la disfunción endotelial. El papel de la sobre-estimulación del

SNS se ha inferido de experimentos que muestran el bloqueo del incremento en la presión arterial así como de la hiperinsulinemia en animales simpatectomizados (Tran y cols., 2009). Como parte de la sobre estimulación del SNS ocurre un incremento en la actividad del sistema renina-angiotensina-aldosterona, que, al igual que la hiperinsulinemia, contribuye al aumento en la liberación de endotelina 1 (ET-1) hacia las células del músculo liso vascular. La ET-1 es un potente vasoconstrictor *per se*, sin embargo también influye en la liberación de otros agentes vasoconstrictores como la angiotensina II y los tromboxanos A<sub>2</sub> y B<sub>2</sub> (Levine y Levine, 2013; Tran y cols., 2009). Por otra parte, la fructosa también incrementa la presión arterial sistólica mediante la absorción de sales en el intestino delgado y el tubo proximal renal a través de acciones que implican el incremento en la actividad y expresión del transportador GLUT5, el intercambiador de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> tipo 3 (NHE3) y el transportador de aniones putativo tipo 1 (PAT1). Finalmente, la fructosa parece también incrementar la presión arterial a través de un mecanismo que se relaciona con la disfunción endotelial, en el que participa el incremento en los niveles de insulina en sangre y la continua exposición a vasoconstrictores que propician el estrés oxidativo que culmina en la disminución de la disponibilidad y síntesis de óxido nítrico (Klein y Kiat, 2015).

Aunque se desconoce si la exposición a la fructosa posee efectos deletereos más allá de aquellos atribuibles a la sobreingesta calórica, los cardiomiocitos obtenidos de animales alimentados con este azúcar exhiben defectos en la homeostasis de Ca<sup>2+</sup>, relacionados con un incremento en el tiempo de relajación (Xing y cols., 2010; Mostarda y cols., 2012). Tras el establecimiento de los principales componentes del síndrome metabólico nos fue posible estudiar las alteraciones que el corazón presenta durante este y otros estados de resistencia a la insulina. La alteración cardiaca que se desarrolla bajo estas condiciones se conoce como miocardiopatía diabética y se caracteriza por una disfunción diastólica temprana (Vasanji y cols., 2006). Entre las causas que subyacen a esta disfunción se encuentran la resistencia a la insulina, disfunción mitocondrial, estrés del retículo endoplásmico, alteraciones

de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ , microcirculación coronaria anormal, activación de los SNS y renina-angiotensina-aldosterona, y respuestas inmunes desadaptativas (Jia y cols., 2016).

La resistencia a la insulina se sugiere como uno de los factores clave para el desarrollo de la cardiomiopatía diabética debido a que propicia la pérdida de la flexibilidad metabólica cardíaca, lo cual incrementa la oxidación de los AG. Sin embargo, los AG pueden saturar la  $\beta$ -oxidación y acumularse en el citosol, generando metabolitos lipotóxicos como ceramidas, diacilglicerol y ROS (Almorós y cols., 2017). Por otra parte, la hiperglucemia también contribuye a formación de ROS y de productos de glicosilación avanzada (AGEs) que conducen a la glucotoxicidad cardíaca. Este desequilibrio entre las principales fuentes energéticas del corazón conduce a la disfunción mitocondrial, al estrés del retículo endoplásmico e incrementa la apoptosis, desencadenando fibrosis, la pérdida en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  y disfunción. Además, como parte del defecto en la señalización de insulina, se ha observado que la fructosa produce alteraciones en la expresión, translocación y funcionamiento de los transportadores de glucosa (GLUT1 y GLUT4) (Qin y cols., 2010; Zakula y cols., 2010). En concordancia, nuestros resultados muestran una reducción en la expresión de GLUT4 en el corazón de las ratas tratadas con fructosa (Fig.13), lo que sugiere el desarrollo local de resistencia a la insulina en este órgano. Asociado con esto, al evaluar la cinética de la fase de decaimiento de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  evocados por estimulación eléctrica, observamos un aumento significativo en el  $\text{TD}_{90}$  de los miocitos cardíacos de las ratas tratadas con fructosa (Fig. 14), lo que coincide con estudios previos (Mostarda y cols., 2012; Xing y cols., 2010) y confirma el desarrollo de disfunción diastólica.

El  $\text{TD}_{90}$  corresponde a la última porción de la fase de decaimiento del transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$ , y se ha sugerido que esta parte del transitorio depende principalmente de la función del NCX (Dong y cols., 2006). Por lo tanto, es probable que el aumento en el  $\text{TD}_{90}$  observado en nuestro estudio sea resultado de una reducción en el proceso

de remoción de  $\text{Ca}^{2+}$  mediado por este transportador. En estudios previos, usando ratas con resistencia a la insulina inducida por sacarosa, se han reportado alteraciones en la función del NCX, aunque en otro estudio no se encontró alteración en este transportador (Vasanji y cols., 2006; Wold y cols., 2005). Nuestros resultados con fructosa sugieren que en este modelo se presentan alteraciones en la función del NCX que podrían estar relacionadas con alteraciones en su estructura o en su nivel de expresión, tal como se ha observado en modelos animales de diabetes en donde se ha reportado un decremento progresivo en la expresión del NCX (Zhao y cols., 2014).

Entre los avances terapéuticos que existen para las alteraciones producidas en la cardiomiopatía diabética, se encuentran aquellos en los cuales se ha observado que a través de la mejora en la sensibilidad a insulina se pueden revertir o disminuir dichas alteraciones. Para este fin se ha empleado el uso de fármacos como la metformina y cambios en el estilo de vida, condiciones bajo las cuales se ha demostrado que se aminoran o revierten las alteraciones producidas en el corazón (Dutta y cols., 2001; Mostarda y cols., 2012). La presente investigación parte precisamente de la hipótesis de que la mejora a la sensibilidad a insulina a través de la administración del indorrenato, podría relacionarse con efecto benéfico en la homeóstasis de  $\text{Ca}^{2+}$ .

## **7.2. Efectos del indorrenato sobre las alteraciones metabólicas y hemodinámicas y en la disfunción diastólica en el síndrome metabólico.**

El indorrenato ejerce un efecto antihipertensivo al actuar como un agonista de los receptores  $5\text{HT}_{1A}$  localizados en el SNC (Hong y cols, 1981; Villalón y cols, 1998). Su administración en ratas y gatos no produce alteraciones gastrointestinales o conductuales (Hong y cols, 1981). Además, no ejerce efectos significativos en las respuestas vasopresoras de ratas decerebradas y desmeduladas, por lo que su

acción antihpertensiva es meramente central (González y cols., 2011). Nuestros resultados muestran que la administración profiláctica del indorrenato previene el incremento de la presión arterial sistólica evocado por el consumo de fructosa. Por otra parte la administración terapéutica de indorrenato reestableció la presión sistólica que había incrementado tras el consumo crónico de fructosa. De esta manera podemos establecer que el indorrenato conserva su propiedad antihpertensiva independientemente del establecimiento de la resistencia a la insulina.

En un estudio previo realizado por nuestro grupo de trabajo, se demostró que la administración aguda del indorrenato puede incrementar la secreción de insulina y mejorar la sensibilidad a esta hormona a través de la estimulación de los receptores 5HT<sub>2</sub> en ratas Wistar Kyoto que muestran resistencia a la insulina (Silva, 2015). Por lo tanto, en el presente trabajo evaluamos si la administración de este compuesto puede mejorar también la sensibilidad a la insulina en ratas tratadas con fructosa que presentan resistencia sistémica a las acciones de esta hormona, y si este efecto se acompaña del restablecimiento de la expresión de GLUT4 y la velocidad de remoción de Ca<sup>2+</sup> en el corazón. Además, se evaluó la eficacia que tiene el esquema de administración, ya sea terapéutico o profiláctico, en las acciones de este compuesto.

Evidencia reciente indica que la serotonina y sustancias análogas influyen en la homeostasis de la glucosa, aunque sus efectos varían de acuerdo a la especie evaluada. La administración de buspirona y 8-OH-DPAT, agonistas de los receptores 5HT<sub>1A</sub>, produce hiperglicemia e hiperglucagonemia en ratas a través de un mecanismo dependiente de la liberación de adrenalina (Chaouloff y cols., 1990; Sugimoto y cols., 1992). En el caso del indorrenato se ha observado, mediante pruebas de tolerancia oral a la glucosa en ratas Wistar, que posee un efecto hipoglucemiante que se asocia con la capacidad de este fármaco de producir un aumento en los niveles de insulina (Medina, 2010). En este sentido, aunque el

indorrenato tiene afinidad sobre los receptores 5HT<sub>1</sub> y 5HT<sub>2</sub>, se ha demostrado que su efecto hipoglucemiante involucra a los receptores 5HT<sub>2</sub> (Medina, 2010; Silva 2015). Debido a que las células β pancreáticas tienen tanto receptores 5HT<sub>1</sub> como 5HT<sub>2</sub>, los cuales inhiben y promueven la liberación de insulina, respectivamente, se ha propuesto que el efecto hipoglucemiante del indorrenato podría involucrar la activación de los receptores 5HT<sub>2</sub> en estas células, lo que favorecería el aumento en la secreción de esta hormona y por la tanto explicaría el aumento en sus niveles.

Sin embargo, en el modelo de resistencia a la insulina inducido por la fructosa, observamos que el indorrenato, en su esquema de administración terapéutica, disminuyó de forma significativa el incremento en los niveles de insulina promovidos por este azúcar. Estos resultados podrían indicar que en el síndrome metabólico en este modelo ocurren cambios en la expresión de los receptores serotoninérgicos en las células β. En principio es probable que ocurra un aumento en la expresión de los receptores 5HT<sub>1</sub>, lo que explicaría la reducción en los niveles de insulina promovidos por el indorrenato. Esto es posible ya que se ha demostrado que la densidad de los receptores de serotonina en las células β pancreáticas cambia en función del estado metabólico del organismo (Bennet y cols., 2015, Almaça y cols., 2016). Es probable que se presente una remodelación en la densidad de receptores a serotonina de acuerdo al progreso y establecimiento de la RI y que debido a esto, los efectos en los esquemas de administración de indorrenato tengan efectos diferenciales sobre la liberación de insulina. Por otra parte, mediante la realización de un clamp euglucémico se observó que la administración aguda de indorrenato incrementó la sensibilidad a insulina en ratas Wistar sanas (Medina, 2010), al igual que en ratas wistar kyoto con resistencia a la insulina (Silva 2015). Aún, cuando se desconocen los mecanismos que median este efecto, es probable que se deba a la estimulación de los receptores 5HT<sub>2A</sub> en el músculo esquelético. Se sabe que los receptores 5HT<sub>2A</sub> promueven la translocación de los transportadores GLUT1 y GLUT4 a través de una ruta diferente a la de la insulina (Hajdich y cols., 1999; Al-Zoairy y cols., 2017). De esta manera, el indorrenato podría promover un incremento

en la sensibilidad a insulina y favorecer el decremento en la hiperinsulinemia en nuestro modelo experimental de fructosa al interactuar con los receptores serotoninérgicos 5HT<sub>2A</sub> en las células musculares, y 5HT<sub>1</sub> en las células β pancreáticas.

Además de reducir la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia, la administración terapéutica del indorrenato disminuyó también la acumulación de grasa visceral promovida por la fructosa. Hasta nuestro conocimiento no existen antecedentes de los efectos que tiene el indorrenato sobre el tejido adiposo. Sin embargo, hay evidencia de que el tejido adiposo expresa a los receptores 5HT<sub>1</sub> y 5HT<sub>2</sub>, así como a la enzima encargada de la síntesis de serotonina, la TPH1, y al transportador SERT (al menos en ratas, Stunes y cols., 2011; Hansson y cols., 2016). Asimismo, se ha reportado que la serotonina y los agonistas de los receptores 5HT<sub>1</sub> y 5HT<sub>2</sub> pueden modificar la función de este tejido. En este tenor, hay evidencia de que la serotonina puede promover la acumulación de tejido graso por promover la diferenciación de adipocitos (Stunes y cols., 2011) y la inhibición de la lipólisis mediada por la insulina, esto último a través de los receptores 5HT<sub>2</sub> (Chang-Myung y cols., 2015; Hansson y cols., 2016). Asimismo, se ha reportado que la serotonina suprime el transporte de glucosa mediado por la insulina en tejido adiposo, lo que podría contribuir al establecimiento de la resistencia a la insulina en este tejido. Estas acciones podrían explicar los efectos del uso de los inhibidores de su recaptura en personas con depresión, quienes tienden a desarrollar obesidad y resistencia a la insulina (Hansson y cols., 2016). Nuestros hallazgos con el indorrenato, sin embargo, no correlacionan con los efectos descritos para la serotonina en el tejido adiposo. Sin embargo, no hay estudios en los que se hayan evaluado los efectos de la serotonina en el contexto del síndrome metabólico, o la resistencia a la insulina. Los mecanismos asociados con los efectos del indorrenato sobre el tejido adiposo, en el contexto de esta enfermedad, requieren de una mayor investigación.

Por otro lado, el tratamiento terapéutico con indorrenato en las ratas alimentadas con fructosa, favoreció también la recuperación en los valores del  $TD_{90}$  en los transitorios de  $Ca^{2+}$ , y generó una recuperación parcial en la expresión de GLUT4 en el corazón. Por lo tanto, en conjunto nuestros resultados indican que, bajo este esquema de administración, el indorrenato contribuye a incrementar la sensibilidad a insulina en el síndrome metabólico, y este efecto se asocia con la recuperación parcial en la expresión de GLUT4 y con una mejoría de la disfunción diastólica cardiaca. Sin embargo, estos datos no nos permiten conocer los mecanismos utilizados por el indorrenato para mejorar la función cardiaca. Es decir, si estos efectos son secundarios a la disminución en la resistencia a la insulina, o a un efecto *per se* del indorrenato sobre el corazón. Al respecto, algunos estudios sugieren que al corregir la RI se mejora la función cardiaca (Dutta y cols., 2001; Mostarda y cols., 2012), aunque también se ha observado que no hay una relación directa entre estos dos (Dong y cols., 2006). Por otra parte hay evidencia de que la serotonina puede actuar directamente en el corazón a través de receptores  $5HT_2$  que se expresan en el miocardio, y ejercer a través de estos receptores un efecto inotrópico positivo (Contreras y cols., 2010; Marín, 2011). Sin embargo, en nuestro estudio nosotros no observamos este efecto.

De manera contraria a la administración terapéutica, la administración profiláctica del indorrenato no mostró tener un efecto benéfico en la resistencia a la insulina o en la remoción de  $Ca^{2+}$  en el corazón, a pesar de que este esquema de administración fue de mayor duración (3 meses) que el esquema terapéutico (3 semanas), y que bajo este esquema se observó la prevención en la reducción de GLUT4 promovido por la fructosa. De manera notable, administrado de forma profiláctica, el indorrenato causó una exacerbación de la disfunción diastólica como lo indica el hecho de que incrementó aún más los valores de los  $TD_{50}$  y  $TD_{90}$ , en comparación con la fructosa. Se ha reportado que la serotonina bajo ciertas condiciones tiene efectos nocivos en el corazón que incluyen la apoptosis y el desarrollo de hipertrofia (Nebigil y Maroteaux, 2003; Bianchi y cols., 2005), lo cual



podría estar relacionado a los efectos deletéreos de la administración profiláctica del indorrenato. Además, hay evidencia de que el indorrenato puede reducir el tono simpático, lo que podría incidir en una reducción de la función de proteínas que regulan el proceso de remoción de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células cardiacas, como es el caso de SERCA.

### **7.3. Efectos de la metformina sobre las alteraciones metabólicas y hemodinámicas y en la disfunción diastólica en el síndrome metabólico.**

Para fines comparativos, se evaluaron también los efectos de la metformina, una biguanida que se ha usado por más de 50 años como primera opción en el tratamiento de la DM2, y que si bien no comparte el mecanismo de acción del indorrenato, tiene un uso amplio en la clínica por su capacidad para reducir la resistencia a la insulina y tener un efecto cardioprotector (Dutta y col., 2001; Apaijai y cols., 2012). De manera general, la metformina contribuye a mejorar la homeóstasis de la glucosa, efecto que se asocia con su capacidad para reducir la producción de glucosa hepática, bloquear la absorción intestinal de la glucosa e incrementar la sensibilidad periférica a la insulina (Malin y Kashyap, 2014; Nesti y Natali, 2017). La metformina inhibe los procesos metabólicos que incrementan los niveles de glucosa en la sangre (gluconeogénesis y glucogenólisis) y promueve su oxidación a través de la glucólisis. Los mecanismos a través de los cuales logra sus efectos hipoglucémicos dependen del tejido sobre el que actúa, sin embargo la vía de señalización converge en la fosforilación de la AMPK. La activación de la AMPK es importante en el transporte de glucosa, pues entre sus sustratos se encuentra la AS160 que activa el transporte y translocación de GLUT4 a la membrana. AMPK fosforila a la fosfofructosa cinasa (PFK) y a la glucógeno sintasa, incrementando la glucólisis y favoreciendo la síntesis de glucógeno (Kewalramani y Rodrigues, 2017). De esta manera permite que bajen los niveles de glucosa y que la insulina secretada por el páncreas se reduzca (Nesti y Natali, 2017; Kewalramani y Rodrigues, 2017). La metformina detiene la gluconeogénesis a través de la interrupción de la

respiración celular, ya que inhibe el funcionamiento del complejo 1 en las mitocondrias (Giannarelli y cols., 2003; Nesti y Natali, 2017). En el hígado, la metformina reduce la gluconeogénesis aumentando la supresión mediada por la insulina e incrementa la translocación de GLUT1 a través de la activación del receptor de insulina (Gunton y cols., 2003). En el músculo esquelético, la metformina promueve la translocación de GLUT4 a través de la fosforilación del receptor de insulina y por lo tanto incrementa la captación de glucosa y la síntesis de glucógeno. En el tejido adiposo, la metformina favorece la reesterificación de AGL e inhibe la lipólisis (Giannarelli y cols., 2003). Por consiguiente se puede sugerir que la metformina mejora la sensibilidad a insulina a través de un conjunto de mecanismos coordinados que disminuyen la gluco-lipotoxicidad. Este efecto ha sido comprobado *in vivo*, tanto en humanos como en varios modelos en ratas con resistencia a la insulina (Giannarelli y cols., 2003; Gunton y cols., 2003; Felice y cols., 2017; Meng y cols., 2017). En nuestros resultados también observamos que la metformina mejora la sensibilidad a insulina aunque esta mejora parece depender de la duración en la administración del fármaco, ya que fue en la administración profiláctica donde se observó un efecto significativo.

Por otra parte, aunque no es la principal opción en el tratamiento para la pérdida progresiva de peso, varios estudios señalan que la metformina permite una modesta pero significativa pérdida de peso. Se ha sugerido que la metformina logra este efecto ya que tiene acciones anorexigénicas directas al actuar directamente sobre el hipotálamo donde disminuye los péptidos orexigenicos y acciones anorexigénicas indirectas a través del incremento en la sensibilidad de la leptina (Kim y cols., 2006; Seifarth y cols., 2012; Malin y Kashyap, 2014). En relación a la pérdida de peso, se ha sugerido que la metformina también influye sobre el desarrollo del tejido adiposo visceral. Se ha observado en diferentes modelos de obesidad en roedores, que la administración de metformina reduce la grasa visceral, a través del incremento de los niveles de leptina y del factor de crecimiento de fibroblástico 21 (FCF21) (Kim y cols., 2006; Kim y cols., 2016). El FCF21 es una hormona hepática que mejora la

sensibilidad a insulina y a la leptina, así como el transporte de glucosa y la lipólisis en el tejido adiposo blanco (Coskun y cols., 2008). Además, la metformina también produce cambios en la expresión genética que favorecen la diferenciación de los adipocitos en adipocitos marrón y no en adipocitos blancos (Kim y cols., 2016). Por otra parte, la metformina también interfiere en el metabolismo de los triglicéridos ya que incrementa la oxidación de ácidos grasos por medio de un mecanismo que implica la actividad de la AMPK. Ésta cinasa fosforila e inhibe a la acetil CoA carboxilasa (ACC 1/2), provocando una disminución en la síntesis de la malonil-CoA y un incremento en el transporte de ácidos grasos a la mitocondria para su oxidación (Kewalramani y Rodrigues, 2017). Además, se ha observado en roedores que la metformina incrementa el número de mitocondrias en el tejido adiposo marrón (Geerling y cols., 2014). A pesar de lo anterior, en los resultados que obtuvimos no encontramos efectos benéficos sobre el peso corporal de las ratas tratadas con metformina independientemente del esquema de administración (Fig.7), ni tampoco sobre el nivel de los triglicéridos, aunque se observó una reducción sobre la acumulación de grasa visceral ocasionado por la fructosa (Fig.8). Cabe mencionar que éste efecto solo fue observado cuando la metformina fue administrada como profiláctico. Al igual que con la mejora en la sensibilidad de la insulina, los efectos de la metformina sobre la grasa visceral y otras variables parecen depender del tiempo de administración. Es probable que en el esquema terapéutico la dosis administrada de metformina (300mg/ kg/d) no funcionó porque los animales no tomaron agua el tiempo suficiente, a diferencia del esquema profiláctico que fue de mayor duración.

La metformina es una biguanida con múltiples efectos en diferentes órganos y sistemas. En el sistema cardiovascular es capaz de reducir la presión arterial a través de mecanismos directos e indirectos. En primera instancia, promueve el incremento de la fosforilación de la NOS en el endotelio a través de un mecanismo dependiente de AMPK. De esta manera no solo mejora la vasodilatación sino que contribuye a disminuir la producción de ROS generada por fructosa (Davis y cols.,

2006; Nesti y Natali, 2017). Además, se ha observado que favorece la diferenciación de los macrófagos hacia un fenotipo funcionalmente anti-inflamatorio, lo cual contribuye a la disminución de proteínas de adhesión celular relacionadas con la disfunción endotelial (Nesti y Natali, 2017). La metformina también bloquea las respuestas vasopresoras inducidas por estimulación simpática y por agonistas  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  (De la Cruz y cols., 2018). Aunque los efectos de la metformina sobre la presión arterial difieren entre humanos y roedores (Snorgaard y cols., 1997), se ha observado que en modelos animales de hipertensión y diabetes, la metformina reduce la presión arterial cuando es administrada terapéuticamente por lo menos durante 4 semanas (Majithiya y Balaraman, 2006; Shishavan y cols., 2017). Los efectos antihipertensivos de la metformina que han sido reportados en éstas y otras investigaciones, concuerdan con nuestros resultados. Sin embargo, nuevamente observamos en nuestros resultados que la metformina contribuye benéficamente al reducir la presión arterial únicamente en los animales que la consumieron de manera profiláctica, fortaleciendo la hipótesis de que el fármaco en cuestión requiere de un mayor tiempo de administración para ejercer sus efectos positivos. Es probable que la acción antihipertensiva de la metformina se encuentre en función del establecimiento de la hipertensión, ya que se ha observado que la expresión de la NOS en el endotelio se reduce significativamente en la hipertensión (Gómez y cols., 2004). De esta manera, se sugiere que la metformina necesita más tiempo de administración para poder influir significativamente sobre la homeóstasis de las ROS en el endotelio y contribuir con la vasorelajación.

Las acciones de la metformina sobre la función cardíaca se encuentran relacionadas al efecto benéfico sobre la mejora en la sensibilidad a la insulina y la disminución de los niveles de TG. Dutta y colaboradores (2001) demostraron en ratas con síndrome metabólico que exhibían disfunción sistólica y diastólica, que la administración de metformina mejoraba el tiempo de contracción y relajación cardíaca. Nuestros resultados no concuerdan con lo reportado por Dutta probablemente por el esquema de administración y la dosis empleada (500mg/kg/día de metformina disuelta en una

solución de sucrosa administrada a ratas hospedadas de manera individual). Felice y colaboradores (2017) reportaron en base a sus resultados que la administración de metformina en el agua de beber podría tener efectos heterogéneos e incluso ningún efecto sobre algunas variables. Por otra parte, aunque la metformina puede mejorar el metabolismo lipídico en el corazón también puede contribuir al desarrollo de la fibrosis al incrementar la expresión del receptor 1 de adiponectina (AdipoR1) (Forcheron y cols., 2009). También es posible que la administración terapéutica de metformina y la dosis no haya generado efectos significativos bajo nuestro esquema porque el tiempo de administración no fuera suficiente.

## **8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

### **8.1. CONCLUSIONES**

La administración de fructosa al 20% durante 3 meses generó varios componentes del síndrome metabólico como hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia obesidad visceral e hipertensión arterial sistémica.

Durante los 3 meses de administración, la fructosa solo generó una disfunción diastólica modesta.

El tratamiento con indorrenato en su forma terapéutica tuvo una mejor respuesta que cuando se administró profilácticamente, ya que en los animales tratados con fructuosa redujo la resistencia insulina, previno parcialmente la reducción en la expresión de GLUT4 en corazón, y revirtió el enlentecimiento de la fase de descenso de los transitorios de  $Ca^{2+}$ .

La metformina parece tener un mejor efecto en su administración terapéutica que en su administración profiláctica, ya que previno el desarrollo de varios componentes del síndrome metabólico, incluida la resistencia a insulina.

## 8.2. PERSPECTIVAS

Con base en los resultados de la presente investigación se propone:

- Estudiar la estabilidad del indorrenato y de la metformina en una solución de fructosa.
- Evaluar otras dosis, esquemas y vías de administración para indorrenato y metformina.
- Investigar el mecanismo de acción del indorrenato sobre la sensibilidad a insulina y la secreción de esta hormona en estados de resistencia a la insulina.
- Corroborar los efectos del indorrenato sobre la función cardíaca y su posible mecanismo de acción.
- Establecer si los efectos del indorrenato sobre el corazón dependen del tiempo de administración o del establecimiento de la resistencia a insulina.
- Investigar si el indorrenato ejerce efectos sobre el metabolismo energético del corazón.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Abel, E. D., O'Shea, K. M., & Ramasamy, R. (2012). Insulin resistance: Metabolic mechanisms and consequences in the heart. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(9), 2068–2076. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.241984>
2. Almaça, J., Molina, J., Menegaz, D., Pronin, A. N., Tamayo, A., Slepak, V., Caicedo, A. (2016). Human Beta Cells Produce and Release Serotonin to Inhibit Glucagon Secretion from Alpha Cells. *Cell Reports*, 17(12), 3281–3291. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.11.072>
3. Almorós L, A., Tuñón, J., Orejas, M., Cortés, M., Egado, J., & Lorenzo. (2017). Diagnostic approaches for diabetic cardiomyopathy. *Cardiovascular Diabetology*, 16(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12933-017-0506-x>
4. Antonaccio, M.J., Kerwin, L., 1981. On the effects and mechanism of action of the antihypertensive agent TR 3369 (5-methoxytryptamine b-methylcarboxilate) in spontaneously hypertensive rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 3, 1306e1311
5. Apaijai, N., Pintana, H., Chattipakorn, S. C., & Chattipakorn, N. (2012). Cardioprotective effects of metformin and vildagliptin in adult rats with insulin resistance induced by a high-fat diet. *Endocrinology*, 153(8), 3878–3885. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1262>
6. Balaban, R. S. (2012). Metabolic homeostasis of the heart. *The Journal of General Physiology*, 139(6), 407–414. <https://doi.org/10.1085/jgp.201210783>
7. Balderas Villalobos Jaime. (2011). “Cambios en el estado de oxidación de SERCA y posible relación con la disminución de la función cardiaca en el síndrome metabólico”. Trabajo de tesis de maestría.
8. Bantle, J. P. (2009). Dietary fructose and metabolic syndrome. *The Journal of Nutrition*, 139(6), 1263S–1268S. <https://doi.org/10.3945/jn.108.098020.used>

9. Bennet, H., Balhuizen, A., Medina, A., Dekker Nitert, M., Ottosson Laakso, E., Essén, S., Fex, M. (2015). Altered serotonin (5-HT) 1D and 2A receptor expression may contribute to defective insulin and glucagon secretion in human type 2 diabetes. *Peptides*, 71, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.07.008>
10. Bennet, H., Mollet, I. G., Balhuizen, A., Medina, A., Nagorny, C., Bagge, A., Fex, M. (2016). Serotonin (5-HT) receptor 2b activation augments glucose-stimulated insulin secretion in human and mouse islets of Langerhans. *Diabetologia*, 59(4), 744–754. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3847-6>
11. Bianchi, P., Kunduzova, O., Masini, E., Cambon, C., Bani, D., Raimondi, L., Parini, A. (2005). Oxidative stress by monoamine oxidase mediates receptor-independent cardiomyocyte apoptosis by serotonin and postischemic myocardial injury. *Circulation*, 112(21), 3297–3305.
12. Brattelid, T., Qvigstad, E., Lynham, J.A., Molenaar, P., Aass, H., Geiran, O., Skomedal, T., Osnes, J.-B., Levy, F.O., Kaumann, A.J., (2004). Functional serotonin 5-HT<sub>4</sub> receptors in porcine and human ventricular myocardium with increased 5-HT<sub>4</sub> mRNA in heart failure. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 370, 157–166.
13. Braun, M., Ramracheya, R., & Rorsman, P. (2012). Autocrine regulation of insulin secretion. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 14 Suppl 3(OCTOBER), 143–151. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2012.01642.x>
14. Brunton L, Parker K, Blumenthal, Buxton, Goodman & Guilman. (2006). *Manual de Farmacología y Terapéutica*, Ed. McGraw Hill, 11va edición, 2006.
15. Carvajal, K., Balderas-Villalobos, J., Bello-Sanchez, M. D., Phillips-Farfán, B., Molina-Muñoz, T., Aldana-Quintero, H., & Gómez-Viquez, N. L. (2014). Ca<sup>2+</sup> mishandling and cardiac dysfunction in obesity and insulin resistance: Role of oxidative stress. *Cell Calcium*, 56(5), 408–415.
16. Chaouloff, F., Baudrie, V. and Laude, D. (1990) Evidences that the 5-HT 1A receptor agonist buspirone and iprapirone activates adrenaline release in the conscious rat. *Eur. J. Pharmacol.* 177, 107-110



17. Contreras-Ferrat, A. E., Toro, B., Bravo, R., Parra, V., Vásquez, C., Ibarra, C., Lavandero, S. (2010). An inositol 1,4,5-triphosphate (IP3)-IP3 receptor pathway is required for insulin-stimulated glucose transporter 4 translocation and glucose uptake in cardiomyocytes. *Endocrinology*, 151(10), 4665–4677. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0116>
18. Coskun, T., Bina, H. A., Schneider, M. A., Dunbar, J. D., Hu, C. C., Chen, Y., Kharitonov, A. (2008). Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology*, 149(12), 6018–6027. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0816>
19. Dai, S., & McNeill, J. H. (1995). Fructose-induced hypertension in rats is concentration-and duration-dependent. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 33(94), 101–107.
20. Davis, B. J., Xie, Z., Viollet, B., & Zou, M. (2006). Drug Metformin Stimulates Nitric Oxide Synthesis In Vivo and Endothelial Nitric Oxide Synthase, 55(February).
21. De la Cruz SH, Medina-Terol GJ, Beltrán-Ornelas JH, Gomez CB, Morato-Valderrama Y, Sánchez-López A, Centurión D. (2018). "Pharmacological evidence that metformin blocks the vasopressor responses mediated by stimulation of  $\alpha$ 1- and  $\alpha$ 2-adrenoceptors in pithed rats". *Eur J Pharmacol.*;820:130-137
22. Deuschle, M. (2013). Effects of antidepressants on glucose metabolism and diabetes mellitus type 2 in adults. *Current Opinion in Psychiatry*, 26(1), 60–65. <https://doi.org/10.1097/YCO.0b013e32835a4206>
23. Diez E, Renna N, Prado N, Lembo C, Ponce A, Vázquez-Prieto M, Miatello M, (2013). Melatonin, given at the time of reperfusion, prevent ventricular arrhythmias in isolated hearts from fructose-fed rats and spontaneously hypertensive rats, *J. Pineal Res*, 2013; (55):166-173
24. Donovan, M. H., & Tecott, L. H. (2013). Serotonin and the regulation of mammalian energy balance. *Frontiers in Neuroscience*, 7(March), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00036>

25. Dupas, J., Feray, A., Goanvec, C., Guernec, A., Samson, N., Bougaran, P., Mansourati, J. (2017). Metabolic Syndrome and Hypertension Resulting from Fructose Enriched Diet in Wistar Rats. *BioMed Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/2494067>
26. Dutta, K., Podolin, D. A., Davidson, M. B., & Davidoff, A. J. (2001). Cardiomyocyte dysfunction in sucrose-fed rats is associated with insulin resistance. *Diabetes*, 50(5), 1186–1192. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.5.1186>
27. El-Merahbi, R., Löffler, M., Mayer, A., & Sumara, G. (2015). The roles of peripheral serotonin in metabolic homeostasis. *FEBS Letters*, 589(15), 1728–1734. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.05.054>
28. Fearnley, C. J., Llewelyn Roderick, H., & Bootman, M. D. (2011). Calcium signaling in cardiac myocytes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(11), 1–20. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004242>
29. Felice, J. I., Schurman, L., McCarthy, A. D., Sedlinsky, C., Aguirre, J. I., & Cortizo, A. M. (2017). Effects of fructose-induced metabolic syndrome on rat skeletal cells and tissue, and their responses to metformin treatment. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 126, 202–213. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2017.02.011>
30. Fernández-Guasti, A., Escalante, A., Hong, E., & Agmo, A. (1990). Behavioural actions of the serotonergic anxiolytic indorenate. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 37(1), 83–88. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(90\)90045-J](https://doi.org/10.1016/0091-3057(90)90045-J)
31. Forcheron, F., Basset, A., Abdallah, P., Del Carmine, P., Gadot, N., & Beylot, M. (2009). Diabetic cardiomyopathy: Effects of fenofibrate and metformin in an experimental model - The Zucker diabetic rat. *Cardiovascular Diabetology*, 8, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-8-16>
32. Geerling, J. J., Boon, M. R., Van Der Zon, G. C., Van Den Berg, S. A. A., Van Den Hoek, A. M., Lombès, M., Guigas, B. (2014). Metformin lowers plasma triglycerides by promoting vldl-triglyceride clearance by brown adipose tissue in mice. *Diabetes*, 63(3), 880–891. <https://doi.org/10.2337/db13-0194>

33. Gergs U, Neumann J, Simm A, Silber RE, Remmers FO, Laer S. (2009). Phosphorylation of phospholamban and troponin I through 5-HT (4) receptors in the isolated human atrium. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2009; 379: 349-359.
34. Giannarelli, R., Aragona, M., Coppelli, A., & Del Prato, S. (2003). Reducing insulin resistance with metformin: the evidence today. *Diabetes & Metabolism*, 29(4), 6S28-6S35. [https://doi.org/10.1016/S1262-3636\(03\)72785-2](https://doi.org/10.1016/S1262-3636(03)72785-2)
35. Gilca, G.-E., Stefanescu, G., Badulescu, O., Tanase, D.-M., Bararu, I., & Ciocoiu, M. (2017). Diabetic Cardiomyopathy: Current Approach and Potential Diagnostic and Therapeutic Targets. *Journal of Diabetes Research*, 2017, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2017/1310265>
36. Gómez-Fernández, P., Sánchez-Margalet, V., Ruiz, A., García-Molina, F., Medina, J., & Almaraz, M. (2004). Expresión vascular de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) en la hipertensión arterial esencial. *Nefrología*, 24(5), 486–488.
37. González-Hernández, A., Manrique-Maldonado, G., Lozano-Cuenca, J., Muñoz-Islas, E., Centurión, D., Maassen VanDenBrink, A., & Villalón, C. M. (2011). The 5-HT<sub>1</sub> receptors inhibiting the rat vasodepressor sensory CGRPergic outflow: Further involvement of 5-HT<sub>1F</sub>, but not 5-HT<sub>1A</sub> or 5-HT<sub>1D</sub>, subtypes. *European Journal of Pharmacology*, 659(2–3), 233–243. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.03.035>
38. Goyal, R. K., & Vaidya, H. B. (2009). Exploring role of 5-hydroxytryptamine in Diabetes mellitus and Cardiovascular Feature Exploring Role of 5-Hydroxytryptamine in Diabetes Mellitus and Cardiovascular Complications, (July 2017).
39. Gunton, J. E., Delhanty, P. J. D., Takahashi, S. I., & Baxter, R. C. (2003). Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(3), 1323–1332. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-021394>

40. Hamidi Shishavan, M., Henning, R. H., Van Buiten, A., Goris, M., Deelman, L. E., & Buikema, H. (2017). Metformin Improves Endothelial Function and Reduces Blood Pressure in Diabetic Spontaneously Hypertensive Rats Independent from Glycemia Control: Comparison to Vildagliptin. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11430-7>
41. Hansson, B., Medina, A., Fryklund, C., Fex, M., & Stenkula, K. G. (2016). Serotonin (5-HT) and 5-HT<sub>2A</sub> receptor agonists suppress lipolysis in primary rat adipose cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 474(2), 357–363. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.04.110>
42. Hong, E. (1981). A Serotonergic Antihypertensive Agent. *Molecular Basis of Drug Action*.
43. Iliadis, F., Kadoglou, N., & Didangelos, T. (2011). Insulin and the heart. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 93(SUPPL. 1), S86–S91. [https://doi.org/10.1016/S0168-8227\(11\)70019-5](https://doi.org/10.1016/S0168-8227(11)70019-5)
44. Jaffré, F., Bonnin, P., Callebert, J., Debbabi, H., Setola, V., Doly, S., Maroteaux, L. (2009). Serotonin and angiotensin receptors in cardiac fibroblasts coregulate adrenergic-dependent cardiac hypertrophy. *Circulation Research*, 104(1), 113–123. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.180976>
45. Kewalramani, G., & Rodrigues, B. (2009). AMP-activated protein kinase in the heart: role in cardiac glucose and fatty acid metabolism AMP-activated protein kinase in the heart: role in cardiac glucose and fatty acid metabolism. *Clinical Lipidology*, 4(5), 643–661.
46. Khitan, Z., & Kim, D. H. (2013). Fructose: a key factor in the development of metabolic syndrome and hypertension. *J Nutr Metab*, 2013, 682673. <https://doi.org/10.1155/2013/682673>
47. Kim, E. K., Lee, S. H., Jhun, J. Y., Byun, J. K., Jeong, J. H., Lee, S. Y., ... Cho, M. La. (2016). Metformin prevents fatty liver and improves balance of white/brown adipose in an obesity mouse model by inducing FGF21. *Mediators of Inflammation*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/5813030>

48. Kim, Y., Kim, J., Park, Y., Park, S., Won, K., Choi, K., Moon, K. (2006). Metformin Restores Leptin Sensitivity in High-Fat-Fed Obese Rats With Leptin Resistance, 55(March).
49. Klein, A. V., & Kiat, H. (2015). The mechanisms underlying fructose-induced hypertension: A review. *Journal of Hypertension*, 33(5), 912–920. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000000551>
50. Knol, M. J., Twisk, J. W. R., Beekman, A. T. F., Heine, R. J., Snoek, F. J., & Pouter, F. (2006). Depression as a risk factor for the onset of type 2 diabetes mellitus. A meta-analysis. *Diabetologia*, 49(5), 837–845. <https://doi.org/10.1007/s00125-006-0159-x>
51. Kodde, I. F., van der Stok, J., Smolenski, R. T., & de Jong, J. W. (2007). Metabolic and genetic regulation of cardiac energy substrate preference. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 146(1), 26–39. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.09.014>
52. Laclaustra G.M., Bergua M.C., Pascual C.I., Casasnovas L.J. (2005). “Síndrome metabólico. Concepto y fisiopatología”. *Rev Esp Cardiol Supl.* 2005; 5: 3D-10.
53. Læer S, Remmers F, Scholz H, Stein B, Muller FU, Neumann J. Receptor mechanisms involved in the 5-HT-induced inotropic action in the rat isolated atrium. *British Journal of Pharmacology.* 1998; 123: 1182-1188
54. Legeza, B., Marcolongo, P., Gamberucci, A., Varga, V., Bánhegyi, G., Benedetti, A., & Odermatt, A. (2017). Fructose, glucocorticoids and adipose tissue: Implications for the metabolic syndrome. *Nutrients*, 9(5), 1–19. <https://doi.org/10.3390/nu9050426>
55. Levine T. Barry, Levine Arlene B. (2012). *Metabolic Syndrome and Cardiovascular Disease.* Wiley Online Library. Segunda edición, 6 de Agosto de 2012.
56. Levy, F. O., Qvigstad, E., Krobert, K. A., Skomedal, T., & Osnes, J. B. (2008). Effects of serotonin in failing cardiac ventricle: Signalling mechanisms and potential therapeutic implications. *Neuropharmacology*, 55(6), 1066–1071. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.07.010>

57. Li, Z., Chalazonitis, A., Huang, Y. -y., Mann, J. J., Margolis, K. G., Yang, Q. M., Gershon, M. D. (2011). Essential Roles of Enteric Neuronal Serotonin in Gastrointestinal Motility and the Development/Survival of Enteric Dopaminergic Neurons. *Journal of Neuroscience*, 31(24), 8998–9009. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6684-10.2011>
58. Luiken, J. J. F. P., Glatz, J. F. C., & Neumann, D. (2015). Cardiac contraction-induced GLUT4 translocation requires dual signaling input. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 26(8), 404–410. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.06.002>
59. Majithiya, J. B., & Balaraman, R. (2006). Metformin reduces blood pressure and restores endothelial function in aorta of streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sciences*, 78(22), 2615–2624. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.10.020>
60. Malin, S. K., & Kashyap, S. R. (2014). Effects of metformin on weight loss: potential mechanisms. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity*, 21(5), 323–329. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000095>
61. Martin, A. M., Young, R. L., Leong, L., Rogers, G. B., Spencer, N. J., Jessup, C. F., & Keating, D. J. (2017). The diverse metabolic roles of peripheral serotonin. *Endocrinology*, 158(5), 1049–1063. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1839>
62. Martínez-Mota, L., Estrada-Camarena, E., & López-Rubalcava, C. (2002). Indorenate produces antidepressant-like actions in the rat forced swimming test via 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Psychopharmacology*, 165(1), 60–66. <https://doi.org/10.1007/s00213-002-1222-z>
63. Medina Contreras, Juana María de Lourdes. (2012). “Participación de los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2</sub> en la sensibilidad a insulina”. Trabajo de tesis de maestría
64. Mehta, N. N., & Reilly, M. P. (2004). Mechanisms of the metabolic syndrome. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 1(2), 187–194. <https://doi.org/10.1016/j.ddmec.2004.09.010>

65. Mekontso-Dessap A, Brouri F, Pascal O, Lechat P, Hanoun N, Lanfumey L, Seif I, Benhaiem-Sigaux N, Kirsch M, Hamon M, Adnot S, Eddahibi S (2006). Deficiency of the 5-hydroxytryptamine transporter gene leads to cardiac fibrosis and valvulopathy in mice. *Circulation*. 2006; 113:81-89
66. Meng, X., Ma, X., Tian, Y., Jiang, Q., Wang, L., & Shi, R. (2017). Metformin improves the glucose and lipid metabolism via influencing the level of serum total bile acids in rats with streptozotocin-induced type 2 diabetes mellitus. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2232–2237.
67. Meschin, P., Demion, M., Cazorla, O., Finan, A., Thireau, J., Richard, S., & Lacampagne, A. (2015). P11 modulates calcium handling through 5-HT<sub>4</sub>R pathway in rat ventricular cardiomyocytes. *Cell Calcium*, 58(6), 549–557. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2015.08.005>
68. Miranda, F., Hong, E., Sanchez, H., & Velazquez-Martinez, D. N. (2003). Further evidence that the discriminative stimulus properties of indorenate are mediated by 5-HT 1A/1B/2C receptors. *Pharmacol Biochem Behav*, 74(2), 371–380.
69. Montessuit, C., & Lerch, R. (2013). Regulation and dysregulation of glucose transport in cardiomyocytes. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833(4), 848–856. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.08.009>
70. Muldoon, M. F., Mackey, R. H., Korytkowski, M. T., Flory, J. D., Pollock, B. G., & Manuck, S. B. (2006). The metabolic syndrome is associated with reduced central serotonergic responsivity in healthy community volunteers. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(2), 718–721. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-1654>
71. Mostarda, C., Moraes-Silva, I., Salemi, V., Machi, J., Rodrigues, B., De Angelis, K., Irigoyen, M. (2012). Exercise training prevents diastolic dysfunction induced by metabolic syndrome in rats. *Clinics*, 67(7), 815–820. [https://doi.org/10.6061/clinics/2012\(07\)18](https://doi.org/10.6061/clinics/2012(07)18)
72. Musters, M.W., Bassingthwaite, J.B., van Riel, N.A., van der Vusse, G.J., (2006). Computational evidence for protein-mediated fatty acid transport across the sarcolemma. *Biochem. J.* 393, 669–678.

73. Nebigil, C. G. (2003). Functional Consequence of Serotonin/5-HT<sub>2B</sub> Receptor Signaling in Heart: Role of Mitochondria in Transition Between Hypertrophy and Heart Failure? *Circulation*, 108(7), 902–908. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000081520.25714.D9>
74. Nesti, L., & Natali, A. (2017). Metformin effects on the heart and the cardiovascular system: A review of experimental and clinical data. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 27(8), 657–669. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2017.04.009>
75. Neumann J, Hofmann B, Gergs U (2017). Production and function of serotonin in cardiac cells. Serotonin—a chemical messenger between all types of living cells, Chapter 13; 271–305 ISBN 978-953-51-3361-2 Kaneez Fatima Shad (ed).
76. Oh, C. M., Namkung, J., Go, Y., Shong, K. E., Kim, K., Kim, H., Kim, H. (2015). Regulation of systemic energy homeostasis by serotonin in adipose tissues. *Nature Communications*, 6, 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms7794>
77. Oh, C.-M., Park, S., & Kim, H. (2016). Serotonin as a New Therapeutic Target for Diabetes Mellitus and Obesity. *Diabetes Metab J*, 40, 89–98. <https://doi.org/10.4093/dmj.2016.40.2.89>
78. Oosterlinck W., Herijgers P. (2014). “Cardiomyocyte changes in the metabolic syndrome and implications for endogeneous protective strategies”. *Expert Reviews Cardiovascular Therapy*. Vol. 12(3), Pags 331-343
79. Paulmann, N., Grohmann, M., Voigt, J. P., Bert, B., Vowinckel, J., Bader, M. Walther, D. J. (2009). Intracellular serotonin modulates insulin secretion from pancreatic  $\beta$ -cells by protein serotonylation. *PLoS Biology*, 7(10), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000229>
80. Pino R, Cerbai E, Calamai G, Alajmo F, Borgioli A, Braconi L, Cassai M, Montesi GF, Mugelli A. (1998). Effect of 5-HT<sub>4</sub> receptor stimulation on the pacemaker current I(f) in human isolated atrial myocytes. *Cardiovascular Research*. 1998;40: 516-522
81. Qin, B., Polansky, M. M., Harry, D., & Anderson, R. A. (2010). Green tea polyphenols improve cardiac muscle mrna and protein levels of signal



- pathways related to insulin and lipid metabolism and inflammation in insulin-resistant rats. *Molecular Nutrition and Food Research*, 54(SUPPL. 1), 14–23. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900306>
82. Reaven GM, Pathophysiology of insulin resistance in human disease, *Physiol Rev.* 1995 Jul; 75(3):473-86
83. Riehle C., Abel E.D. (2016). “Insulin Signaling and Heart Failure”. *Circulation Research*. Vol. 118, Pags 1151-1169.
84. Rueda, A., de Alba-Aguayo, D. R., & Valdivia, H. H. (2014). Receptor de rianodina, fuga de calcio y arritmias. *Archivos de Cardiología de México*, 84(3), 191–201. <https://doi.org/10.1016/j.acmx.2013.12.008>
85. Safdy ME, Kurchakova E, Schut RN, Vidrio H, Hong E (1982) Tryptophan analogues. 1. Synthesis and anti-hypertensive activity of positional isomers. *J Med Chem* 25:723–730
86. Sánchez-López, A., Centurión, D., Lozano-Cuenca, J., Muñoz-Islas, E., Cobos-Puc, L. E., & Villalón Herrera, C. M. (2009). Receptores de la serotonina que inhiben el tono simpático vasopresor en la rata descerebrada y desmedulada. *Archivos de Cardiología de México*, 79(SUPPL. 2), 83–94.
87. Santalucia, T., Boheler, K.R., Brand, N.J., Sahye, U., Fandos, C., Vinals, F., Ferre, J., Testar, X., Palacin, M., Zorzano, A., 1999. Factors involved in GLUT-1 glucose transporter gene transcription in cardiac muscle. *J. Biol. Chem.* 274, 17626–17634.
88. Schwarzer, M., & Doenst, T. (2016). Metabolism. The Scientist’s Guide to Cardiac Metabolism. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802394-5/00001-7>
89. Seifarth, C., Schehler, B., & Schneider, H. J. (2013). Effectiveness of metformin on weight loss in non-diabetic individuals with obesity. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, 121(1), 27–31. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1327734>
90. Silva Arzave Abigail. (2015). “Efecto antihiperglucemiante e hipoglucemiante de un análogo de la serotonina en ratas Wistar Kyoto alimentadas con fructosa”. Tesis de maestría.

91. Snorgaard, O., Køber, L., & Carlsen, J. (1997). The effect of metformin on blood pressure and metabolism in nondiabetic hypertensive patients. *Journal of Internal Medicine*, 242(5), 407–412. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.1997.00236.x>
92. Stunes A. K, Reseland J. E., Hauso Ø., Kidd M., Tømmeras K., Waldum H. L. Syversen U., Gustafsson B. I. (2011). Adipocytes express a functional system for serotonin synthesis, reuptake and receptor activation. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 13: 551–558, 2011.
93. Sugimoto, Y., Yamada, J., Kimura, I., Watanabe, Y., & Horisaka, K. (1992). The effects of the serotonin<sub>1A</sub> receptor agonist buspirone on the blood glucose and pancreatic hormones in rats. *Japanese Journal of Pharmacology*, 60(2), 145–148. <https://doi.org/10.1254/jjp.60.145>
94. Sundell, J., & Knuuti, J. (2003). Insulin and myocardial blood flow. *Cardiovascular Research* 57 (2003) 312–319
95. Tecott, L. H. (2007). Serotonin and the Orchestration of Energy Balance. *Cell Metabolism*, 6(5), 352–361. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.09.012>
96. Teshima Y<sup>1</sup>, Takahashi N, Saikawa T, Hara M, Yasunaga S, Hidaka S, Sakata T. (2000). Diminished expression of sarcoplasmic reticulum Ca (2+)-ATPase and ryanodine sensitive Ca (2+) Channel mRNA in streptozotocin-induced diabetic rat heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2000 Apr; 32(4):655-64.
97. Tran, L. T., Yuen, V. G., & McNeill, J. H. (2009). The fructose-fed rat: A review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 332(1–2), 145–159. <https://doi.org/10.1007/s11010-009-0184-4>
98. Vasanji, Z., Cantor, E. J. F., Juric, D., Moyen, M., Vasanji, Z., Cantor, E. J. F., Netticadan, T. (2006). Alterations in cardiac contractile performance and sarcoplasmic reticulum function in sucrose-fed rats is associated with insulin resistance. *Am J Physiol Cell Physiol* 291: C772–C780,

99. Velázquez Martínez, D. N., Valencia Flores, M., López Cabrera, M., & Villarreal, J. E. (1995). Effects of indorenate on food intake: a comparison with fenfluramine and amphetamine. *Psychopharmacology*, 117(1), 91–101. <https://doi.org/10.1007/BF02245103>
100. Villafaña, S., Huang, F., & Hong, E. (2004). Role of the sympathetic and renin angiotensin systems in the glucose-induced increase of blood pressure in rats. *European Journal of Pharmacology*, 506(2), 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.10.055>
101. Villalón, C. M., Centurión, D., Rabelo, G., De Vries, P., Saxena, P. R., & Sánchez-López, A. (1998). The 5-HT<sub>1</sub>-like receptors mediating inhibition of sympathetic vasopressor outflow in the pithed rat: Operational correlation with the 5-HT (1A), 5-HT(1B) and 5-HT(1D) subtypes. *British Journal of Pharmacology*, 124(5), 1001–1011. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701907>
102. Wassink A. M. J., Olijhoek J. K. y Visseren F. L. J. (2007). The metabolic syndrome: metabolic changes with vascular consequences. *European Journal of Clinical Investigation* (2007) 37, 8–17.
103. Wold, L. E., Dutta, K., Mason, M. M., Ren, J., Cala, S. E., Schwanke, M. L., & Davidoff, A. J. (2005). Impaired SERCA function contributes to cardiomyocyte dysfunction in insulin resistant rats. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 39(2), 297–307. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2005.03.014>
104. Xing, S.S., Bi X.P., Tan H.W, Zhang Y., Xing Q.C. and Zhang W. (2010). Overexpression of Interleukin-18 Aggravates Cardiac Fibrosis and Diastolic Dysfunction in Fructose-Fed Rats. *Molecular Medicine*, 16(11–12), 1. <https://doi.org/10.2119/molmed.2010.00028>
105. Yabanoglu, S., Akkiki, M., Seguelas, M. H., Mialet-Perez, J., Parini, A., & Pizzinat, N. (2009). Platelet derived serotonin drives the activation of rat cardiac fibroblasts by 5-HT<sub>2A</sub> receptors. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 46(4), 518–525. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.12.019>

106. Zakula, Z., Koricanac, G., Tepavcevic, S., Stojiljkovic, M., Milosavljevic, T., & Isenovic, E. R. (2011). Impairment of cardiac insulin signaling in fructose-fed ovariectomized female Wistar rats. *European Journal of Nutrition*, 50(7), 543–551. <https://doi.org/10.1007/s00394-010-0161-4>
107. Zhang, Q., Zhu, Y., Zhou, W., Gao, L., Yuan, L., & Han, X. (2013). Serotonin Receptor 2C and Insulin Secretion. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054250>
108. Zhao, S.-M., Wang, Y.-L., Guo, C.-Y., Chen, J.-L., & Wu, Y.-Q. (2014). Progressive decay of Ca<sup>2+</sup> homeostasis in the development of diabetic cardiomyopathy. *Cardiovascular Diabetology*, 13(1), 75. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-13-75>