



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

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

**“Análisis farmacológico del papel diferencial de los  
subtipos de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ , dopaminérgicos  
D<sub>2</sub>-like y de los receptores histaminérgicos H<sub>3</sub>/H<sub>4</sub> que  
inhiben el tono simpático cardioacelerador en ratas  
Wistar macho normoglicémicas y diabéticas”**

Tesis que presenta:

**M. en C. Eduardo Rivera Mancilla**

Para obtener el Grado de:

**Doctor en Ciencias en  
Neurofarmacología y Terapéutica Experimental**

Director de Tesis:

**Dr. Carlos Miguel Villalón Herrera**

El presente trabajo de tesis fue desarrollado bajo la dirección del **Dr. Carlos Miguel Villalón Herrera**, en el Laboratorio No. 5 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Unidad Coapa).

Ciudad de México, México

Por otro lado, algunos protocolos experimentales adicionales al presente trabajo de tesis se desarrollaron en el Laboratorio No. 1 del Departamento de Farmacobiología a cargo del Dr. Enrique Hong Chong y en el Laboratorio de Investigación Integral Cardiometabólica (Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional) a cargo del Dr. Guillermo Ceballos Reyes.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la Beca de Doctorado Núm. 394395 y del Proyecto de Continuación CONACyT No. 219707.

*“El investigador sufre las decepciones, los largos meses pasados en una dirección equivocada, los fracasos. Pero los fracasos son también útiles, porque, bien analizados, pueden conducir al éxito. Y para el investigador no existe alegría comparable a la de un descubrimiento, por pequeño que sea. . .”*

*(Alexander Fleming)*

*A mi gran ejemplo a seguir y mi razón de ser:*

*Mi madre, María Concepción Mancilla Castro*

*Gracias por tanto amor...*

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a mi tutor y asesor de tesis; el **Dr. Carlos Miguel Villalón Herrera** por su inestimable ayuda, tiempo y paciencia desde mis primeros pasos por el laboratorio. Por permitirme ser parte de su grupo de trabajo y brindarme su confianza. Sin duda alguna usted ha sido una parte muy importante en mi desarrollo personal y profesional. Mis respetos y admiración hacia usted por su gran calidad humana, profesionalismo y su indudable capacidad y calidad científica.

Agradezco también a la **Dra. Luisa Lila Rocha Arrieta** por brindarme la oportunidad de trabajar dentro de su laboratorio y con su grupo de trabajo, y de esta manera poder ampliar y enriquecer esta investigación. Valoro todas las atenciones, su tiempo y disposición, pero sobre todo, sus enseñanzas y su paciencia.

Asimismo, agradezco infinitamente a la **Dra. Norma Leticia Gómez Víquez**, al **Dr. José Antonio Arias Montaña** y al **Dr. Guillermo Manuel Ceballos Reyes**. Gracias por su paciencia, su valioso tiempo y dedicación, sus sabios consejos y atinadas aportaciones para corregir y enriquecer este trabajo de tesis, lo que hoy me ha permitido culminar con este proyecto.

También quisiera hacer extensos mis agradecimientos al **Laboratorio de Investigación Integral Cardiometabólica** a cargo del **Dr. Guillermo Manuel Ceballos Reyes** por permitirme realizar algunos protocolos experimentales que complementaron esta investigación, en especial a sus alumnos; la **Med. Cir. Vannia Solis** y el **Med. Cir. Levy Munguía** por sus enseñanzas y paciencia para desarrollar los experimentos planeados.

Un agradecimiento especial al **Dr. Enrique Hong Chong** por facilitarme el uso del equipo para realizar las mediciones de pletismografía, así como al **M. en C. Miguel Ángel Rosas Lezama** por su asistencia técnica para la realización de estos experimentos.

A la auxiliar del laboratorio No. 8 **Q.F.I. Francia Carmona Cruz**, por su ayuda y colaboración en la realización de algunos experimentos adicionales, así como por su amistad.

A la auxiliar del laboratorio No. 5 **Q.F.B. Belinda Villanueva Castillo**, por su invaluable ayuda durante mi estancia en el laboratorio y su gran colaboración para la realización de este trabajo de tesis, así como por su paciencia y su valiosa amistad. Muchas Gracias Beli.

Al técnico especializado **Sr. Mauricio Villasana**, muchas gracias por la gran ayuda durante la parte experimental de este trabajo y por la amistad que me ha brindado.

A la **Dra. Guadalupe Manrique** y el **Dr. Alain H. Altamirano**, por sus acertados consejos y su gran apoyo, por compartir de su valioso tiempo y sus conocimientos, y por su gran disposición para ayudar en la planeación, desarrollo y revisión de esta investigación. Agradezco también su valiosa amistad y de aquellos gratos momentos que compartimos fuera del laboratorio.

A todos los **Profesores del Departamento de Farmacobiología** y a aquellos que han contribuido en mi formación académica y profesional. Gracias por todas sus enseñanzas.

Al personal del **Bioterio del Cinvestav-IPN Sede Sur**, por su gran apoyo y disposición para facilitarme la entrega de los animales utilizados en esta investigación.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**, por el financiamiento económico otorgado, el cual permitió que realizara mis estudios de posgrado y la realización de este proyecto.

Existen personas que han dejado huella en mi vida y que han estado conmigo en las buenas y en las malas. A todas ellas, muchas gracias por su paciencia, comprensión, amor y por los gratos momentos que compartieron conmigo. En ocasiones, la vida nos pone en situaciones difíciles, las cosas cambian, y el tiempo transcurre. Sin embargo, los recuerdos quedarán grabados en mi corazón, y serán gratos por siempre. Gracias por hacer de mi estancia en el Cinvestav y en la Cd. de México una de las más grandes experiencias que he tenido en la vida, los quiero.

A mi padre **Eduardo Rivera Agüero**, muchas gracias por el apoyo que me has brindado.

A mi amiga de toda la vida **Citlali Bernabé Díaz**, muchas gracias por permitirme compartir contigo tantos momentos, por tus palabras de aliento, y sobre todo, por haberme levantado cuando sentía que todo estaba perdido. Te quiero mucho Taly.

Por último, agradezco a mi familia por todo su apoyo y por compartir conmigo este sueño, en especial a **Francisco de los Santos**, quien se ha convertido en una persona muy importante en mi vida y en la de mi familia, gracias por todo el gran apoyo que nos has brindado; y a mis tíos **Alejandra Mancilla**, **Gerardo Barragán** y **Raúl Mancilla** por las muestras de cariño que me han brindado desde pequeño, los quiero mucho.

*Eduardo*

## DEDICATORIAS

A mi madre: **María Concepción Mancilla Castro**

Este es un éxito más, del cual eres parte y te dedico con todo mi amor. Gracias por el apoyo incondicional que siempre me has dado, por tener siempre la fortaleza de salir adelante sin importar los obstáculos, por haberme formado como un hombre de bien, por ser la mujer que me dio la vida y por enseñarme a vivirla. Te admiro por tu valentía y capacidad de luchar siempre para conseguir lo que te propones, eres mi gran ejemplo a seguir y me siento tan afortunado y orgulloso por tenerte como mi madre. Gracias señora hermosa por acompañarme en cada uno de mis éxitos y ayudarme a levantarme de mis fracasos, por enseñarme a ser cada vez más fuerte y continuar en esto a lo que hemos llamado vida: **TE AMO MADRE.**

A mis hermanos: **Carlos Miguel y Rosario**

Sin duda alguna ustedes también forman parte de este logro y con todo orgullo comparto con ustedes. Muchas gracias por todos los momentos que hemos compartido, buenos o malos pero nos han dejado grandes lecciones. Está de más decirles que siempre estaré con y para ustedes, a pesar de las distancias y de las circunstancias de la vida. Son una de mis razones de ser y de existir, gracias por compartir este sueño conmigo: **LOS AMO.**

A mi tía: **Antonia Mancilla Castro**

Gracias por estar a mi lado y apoyarme incondicionalmente, por sus sabias palabras y consejos, y sobre todo muchas gracias por ser como una madre para mí. La quiero y la admiro mucho.

*Eduardo*





# ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>V</b>
<b>Índice de tablas</b>	<b>VII</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>VIII</b>
<b>Resumen</b>	<b>IX</b>
<b>Abstract</b>	<b>X</b>
<b>CAPÍTULO 1. REGULACIÓN AUTONÓMICA CARDIACA</b>	
1.1 Generalidades	1
1.2 Sistema nervioso autónomo (SNA)	2
1.2.1 Sistema nervioso simpático	4
1.2.2 Sistema nervioso parasimpático	4
1.3 Regulación autonómica de la función cardiovascular	5
1.3.1 Control simpático	7
1.3.2 Control parasimpático	7
<b>CAPÍTULO 2. SIMPATO-INHIBICIÓN CARDIACA</b>	
2.1 Generalidades	9
2.2 Criterios para la clasificación de receptores	10
2.2.1 Criterio operacional	10
2.2.2 Criterio transduccional	10
2.2.3 Criterio estructural	11
2.3 Receptores adrenérgicos $\alpha_2$	11
2.3.1 Receptor adrenérgico $\alpha_{2A}$	12
2.3.2 Receptor adrenérgico $\alpha_{2B}$	13
2.3.3 Receptor adrenérgico $\alpha_{2C}$	13
2.4 Receptores dopaminérgicos D <sub>2</sub> -like	13
2.4.1 Receptor dopaminérgico D <sub>2</sub>	14



2.4.2	Receptor dopaminérgico D <sub>3</sub>	15
2.4.3	Receptor dopaminérgico D <sub>4</sub>	15
2.5	Receptores histaminérgicos H <sub>3</sub> y H <sub>4</sub>	16
2.5.1	Receptor histaminérgico H <sub>3</sub>	16
2.5.2	Receptor histaminérgico H <sub>4</sub>	17
2.6	Sistema transduccional de receptores acoplados a proteínas G <sub>i/o</sub>	18
<b>CAPÍTULO 3. DIABETES</b>		
3.1	Generalidades	20
3.2	Clasificación	20
3.3	DM tipo I	20
3.3.1	Complicaciones	21
3.3.2	Neuropatía autonómica cardiovascular	21
3.4	Modelos experimentales de DM tipo I	23
3.4.1	Mecanismo de acción del aloxan	24
3.4.2	Mecanismo de acción de la estreptozotocina	24
3.5	Alteraciones centrales y periféricas en la DM tipo I	25
<b>CAPÍTULO 4. UBICACIÓN DEL PROYECTO</b>		
4.1	Justificación	27
4.2	Hipótesis	27
<b>CAPÍTULO 5. OBJETIVOS</b>		
5.1	Objetivo general	28
5.2	Objetivos particulares	28
<b>CAPÍTULO 6. DISEÑO EXPERIMENTAL</b>		
6.1	Animales	29
6.2	Procedimiento general	29
6.3	Protocolos experimentales	31
6.4	Compuestos utilizados	34
6.5	Análisis estadístico	35



## CAPÍTULO 7. RESULTADOS

7.1	Efecto de la estreptozotocina o vehículo	36
7.2	Variables hemodinámicas sistémicas	37
7.3	Efecto de salina o B-HT 933 sobre las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica simpática o por bolos i.v. de noradrenalina en ratas normoglicémicas y diabéticas	37
7.4	Efecto <i>per se</i> de los vehículos o antagonistas de los subtipos de receptores adrenérgicos $\alpha_{2A}$ , $\alpha_{2B}$ o $\alpha_{2C}$ sobre las respuestas taquicárdicas producidas por estimulación eléctrica simpática en ratas diabéticas	40
7.5	Efecto de los vehículos o antagonistas de los subtipos de receptores adrenérgicos $\alpha_2$ sobre la simpato-inhibición cardiaca producida por el B-HT 933 en ratas diabéticas	41
7.6	Efecto de salina o quinpirol sobre las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica simpática o por bolos i.v. de noradrenalina en ratas normoglicémicas y diabéticas	42
7.7	Efecto <i>per se</i> de los vehículos o antagonistas de los subtipos de receptores dopaminérgicos $D_2$ , $D_3$ o $D_4$ sobre las respuestas taquicárdicas producidas por estimulación eléctrica simpática en ratas diabéticas	44
7.8	Efecto de los vehículos o antagonistas de los subtipos de receptores dopaminérgicos $D_2$ , $D_3$ o $D_4$ sobre la simpato-inhibición cardiaca producida por quinpirol en ratas diabéticas	45
7.9	Efecto de salina o immpip sobre las respuestas taquicárdicas producidas por estimulación eléctrica simpática en ratas normoglicémicas y diabéticas	46



<b>CAPÍTULO 8. DISCUSIÓN</b>	
8.1 General	48
8.2 Efecto de la administración de estreptozotocina: correlación con un modelo experimental de diabetes tipo I	49
8.3 Variables hemodinámicas sistémicas	49
8.4 Simpato-inhibición diferencial producida por B-HT 933, quinpirol e immepip en ratas diabéticas descerebradas y desmeduladas: comparación farmacológica con ratas normoglicémicas	51
8.5 Análisis del efecto <i>per se</i> de los antagonistas utilizados sobre el tono simpático cardioacelerador en ratas diabéticas	53
8.6 Participación de los subtipos de receptores adrenérgicos $\alpha_2$ en la simpato-inhibición cardíaca producida por el B-HT 933 en ratas diabéticas: comparación farmacológica con ratas normoglicémicas	54
8.7 Participación de los subtipos de receptores dopaminérgicos D <sub>2</sub> -like en la simpato-inhibición cardíaca producida por el quinpirol en ratas diabéticas: comparación farmacológica con ratas normoglicémicas	55
8.8 Posibles implicaciones clínicas	57
<b>CAPÍTULO 9. CONCLUSIÓN</b>	58
<b>CAPÍTULO 10. PERSPECTIVAS</b>	59
<b>REFERENCIAS</b>	60
<b>APÉNDICES</b>	85
<b>ANEXOS</b>	90

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Representación esquemática del sistema nervioso autónomo de los mamíferos	3
<b>Figura 2.</b>	Control autonómico de la función cardiovascular	6
<b>Figura 3.</b>	Control autonómico de la función cardíaca	8
<b>Figura 4.</b>	Mecanismos de señalización de receptores metabotrópicos inhibitorios	19
<b>Figura 5.</b>	Inervación autonómica del corazón y los efectos de la diabetes	22
<b>Figura 6.</b>	Efecto de la estreptozotocina o vehículo	36
<b>Figura 7.</b>	Efecto del B-HT 933 o vehículo sobre las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica simpática o por bolos i.v. de noradrenalina	39
<b>Figura 8.</b>	Efecto <i>per se</i> de los vehículos o antagonistas adrenérgicos $\alpha_2$ sobre las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica simpática	40
<b>Figura 9.</b>	Papel de los subtipos de receptores adrenérgicos $\alpha_2$ sobre la simpato-inhibición producida por 100 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ de B-HT 933 en ratas diabéticas	41



<b>Figura 10.</b> Efecto del quinpirol o vehículo sobre las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica simpática o por bolos i.v. de noradrenalina	43
<b>Figura 11.</b> Efecto <i>per se</i> de los vehículos o antagonistas dopaminérgicos D <sub>2</sub> -like sobre las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica simpática	45
<b>Figura 12.</b> Papel de los subtipos de receptores dopaminérgicos D <sub>2</sub> -like sobre la simpato-inhibición producida por 10 µg/kg.min de quinpirol en ratas diabéticas	46
<b>Figura 13.</b> Efecto del immepip o vehículo sobre las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica simpática	47
<b>Figura 14.</b> Cambios en la presión arterial diastólica (A) y en la frecuencia cardíaca (B) en ratas despiertas con cuatro semanas de evolución de DM tipo I	86
<b>Figura 15.</b> Cuantificación de grupos carbonilos en sueros de ratas normoglicémicas y ratas diabéticas	88
<b>Figura 16.</b> Concentración de metabolitos bioquímicos: (A) glucosa, (B) colesterol total, (C) triglicéridos; determinados en suero de ratas normoglicémicas y diabéticas	89



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Simpato-inhibición cardiaca producida por B-HT 933 en ratas normoglicémicas y diabéticas	38
<b>Tabla 2.</b>	Simpato-inhibición cardiaca producida por quinpirol en ratas normoglicémicas y diabéticas	44



## ABREVIATURAS

AC	Adenilato ciclasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
DM	Diabetes mellitus
DMSO	Dimetilsulfóxido
D-R	Dosis-respuesta
E-R	Estímulo-respuesta
HDL	Lipoproteína de alta densidad
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
LDL	Lipoproteína de baja densidad
NAC	Neuropatía autonómica cardiaca
SNA	Sistema nervioso autónomo
STZ	Estreptozotocina





## RESUMEN

Se ha reportado que el perfil farmacológico de los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  que inhiben el tono simpático vasopresor se encuentra alterado en la *diabetes mellitus*. Además, en ratas descerebradas y desmeduladas normoglicémicas, el tono simpático cardioacelerador es inhibido por: (i) el B-HT 933 (agonista adrenérgico  $\alpha_2$ ) vía la activación de los subtipos  $\alpha_{2A}$ - y  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos; (ii) el quinpirol (agonista dopaminérgico  $D_2$ -like) vía la activación del subtipo  $D_2$ , y (iii) el immepip (agonista histaminérgico  $H_3/H_4$ ) vía la activación de los receptores  $H_3$ . Por lo tanto, el presente proyecto fue diseñado para investigar posibles alteraciones en el perfil farmacológico de estos receptores en ratas descerebradas y desmeduladas pretratadas con estreptozotocina (modelo experimental de diabetes). Para este propósito, se utilizaron ratas pretratadas con estreptozotocina (50 mg/kg, i.p.; n=155) o vehículo (1 ml/kg solución amortiguadora con citratos, i.p.; n=50) las cuales se mantuvieron durante 4 semanas. Después de la anestesia, las ratas fueron descerebradas y desmeduladas, ventiladas artificialmente, y preparadas para la estimulación espinal selectiva ( $C_7$ - $T_1$ ) del tono simpático cardioacelerador o la administración de bolos i.v. de noradrenalina. Tanto en ratas diabéticas como en normoglicémicas, los agonistas B-HT 933 (30 y 100  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ ) y quinpirol (3 y 10  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ ) inhibieron las respuestas taquicárdicas producidas por estimulación eléctrica simpática, pero no las producidas por bolos i.v. de noradrenalina. Adicionalmente, la simpato-inhibición cardíaca en ratas diabéticas producida por: (i) 100  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$  B-HT933 fue abolida por bolos i.v. de los antagonistas BRL44408 ( $\alpha_{2A}$ ; 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), imiloxan ( $\alpha_{2B}$ ; 10,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) o JP-1302 ( $\alpha_{2C}$ ; 1,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ); y (ii) 10  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$  quinpirol fue abolida por bolos i.v. de los antagonistas L-741,626 ( $D_2$ ; 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), SB-277011-A ( $D_3$ ; 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) o L-745,870 ( $D_4$ ; 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). En marcado contraste, las infusiones continuas de immepip (3 y 10  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ ) produjeron simpato-inhibición cardíaca en las ratas normoglicémicas, pero no en las diabéticas (hasta 100  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ ). Nuestros resultados sugieren que: (i) a diferencia de lo que ocurre en las ratas normoglicémicas, en las ratas diabéticas la inhibición del tono simpático cardioacelerador producida por: (a) el B-HT933 involucra los subtipos  $\alpha_{2A}$ -,  $\alpha_{2B}$ - y  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos; y (b) el quinpirol involucra los subtipos  $D_2$ ,  $D_3$  y  $D_4$ ; (ii) los receptores histaminérgicos  $H_3/H_4$  no desempeñan un papel simpato-inhibitorio en ratas diabéticas, y (iii) existe una participación diferencial de los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  y  $D_2$ -like, los cuales podrían representar un blanco terapéutico para el tratamiento de algunas complicaciones diabéticas, como la neuropatía autonómica cardiovascular.



## ABSTRACT

It has been reported that the pharmacological profile of the  $\alpha_2$ -adrenoceptors inhibiting the vasopressor sympathetic outflow is altered in *diabetes mellitus*. Moreover, in normoglycemic pithed rats, the cardioaccelerator sympathetic outflow is inhibited by: (i) B-HT 933 ( $\alpha_2$ -adrenoceptor agonist) via the activation of the  $\alpha_{2A}$ - y  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptor subtypes; (ii) quinpirole (dopamine  $D_2$ -like receptor agonist) via the activation of the  $D_2$  subtype; and (iii) immepip (histamine  $H_3/H_4$  receptor agonist) via the activation of  $H_3$  receptors. Hence, the present project was designed to investigate possible alterations in the pharmacological profile of the above receptors in pithed rats pretreated with streptozotocin (experimental model of diabetes). For this purpose, rats were pretreated with streptozotocin (50 mg/kg, i.p.; n=155) or vehicle (1 ml/kg citrate buffer, i.p.; n=50) and were kept for four weeks. After anaesthesia, the rats were pithed, artificially ventilated, and prepared for selective spinal stimulation ( $C_7$ - $T_1$ ) of the cardioaccelerator sympathetic outflow; or i.v. bolus injections of noradrenaline. Both in diabetic as normoglycemic pithed rats, the agonists B-HT 933 (30 and 100  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ ) and quinpirole (3 and 10  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ ) produced inhibition of the tachycardic responses produced by sympathetic electrical stimulation, but not of those produced by i.v. bolus injections of noradrenaline. Additionally, in diabetic pithed rats, the cardiac sympatho-inhibition produced by: (i) 100  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$  B-HT933 was abolished by i.v bolus of the antagonists BRL44408 ( $\alpha_{2A}$ ; 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), imiloxan ( $\alpha_{2B}$ ; 10,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) or JP-1302 ( $\alpha_{2C}$ ; 1,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ); and (ii) 10  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$  quinpirole was abolished by i.v bolus of the antagonists L-741,626 ( $D_2$ ; 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), SB-277011-A ( $D_3$ ; 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) or L-745,870 ( $D_4$ ; 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). In marked contrast, continuous infusions of immepip (3 and 10  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ ) produced cardiac sympatho-inhibition in normoglycemic rats, but not in diabetic rats (up to 100  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ ). Our results suggest that: (i) unlike in normoglycemic pithed rats, in diabetic pithed rats the inhibition of the cardioaccelerator sympathetic outflow produced by: (a) B-HT 933 involves the role of the  $\alpha_{2A}$ -,  $\alpha_{2B}$ - y  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptor subtypes, and (b) quinpirole involves the role of the  $D_2$ ,  $D_3$  and  $D_4$  subtypes; (ii) the histamine  $H_3/H_4$  receptors do not seem to play a sympatho-inhibitory role; and (iii) there is a differential participation of  $\alpha_2$ -adrenergic and dopamine  $D_2$ -like receptors, which may certainly represent therapeutic targets for the treatment of some diabetic complications, such as cardiovascular autonomic neuropathy.



# CAPÍTULO 1

## REGULACIÓN AUTÓNOMICA CARDIACA

### 1.1 Generalidades

El sistema cardiovascular es responsable de la circulación de la sangre, oxígeno y de nutrientes desde y hacia las células y tejidos, manteniendo la homeostasis en el organismo (Farley et al., 2012; Madany y Golts, 2014). Es un sistema complejo formado por: (i) varios tipos de vasos sanguíneos con una amplia gama de diámetros; (ii) el corazón (con 4 cámaras, 2 ventrículos y 2 aurículas) que bombea la sangre y funciona como iniciador del flujo sanguíneo; (iii) el sistema linfático el cual no se encarga del transporte de la sangre, pero participa en el intercambio de sustancias en conjunto con los vasos sanguíneos; y (iv) el sistema de control, que consiste en un sistema nervioso y hormonal, el cual proporciona la autorregulación (Klabunde, 2011; Farley et al., 2012).

El corazón es el principal órgano del sistema cardiovascular. Funciona como una bomba que se encarga de impulsar la sangre a través de los vasos sanguíneos (Guyton y Hall, 2011; Gordan et al., 2015). Está dividido en cuatro cámaras las cuales reciben la sangre: aurículas derecha e izquierda y ventrículos derecho e izquierdo. La aurícula derecha recibe la sangre pobre en oxígeno de las venas sistémicas, la cual circula a través de la válvula tricúspide hacia el ventrículo derecho. Desde el ventrículo derecho, la sangre desoxigenada es bombeada pasando las válvulas semilunares a través de las arterias pulmonares hacia los pulmones. En los pulmones, la sangre se oxigena y regresa a la aurícula izquierda vía las venas pulmonares. Esta sangre oxigenada circula a través de la válvula mitral hacia el ventrículo izquierdo, y se bombea a través de las válvulas semilunares hacia las arterias sistémicas y el cuerpo (Tortora y Derrickson, 2007; Gordan et al., 2015).



Para responder rápidamente a las necesidades cambiantes de los tejidos del cuerpo, las funciones del corazón (*i.e.* la frecuencia cardíaca y la contractilidad) están reguladas principalmente por el sistema nervioso autónomo (SNA), las hormonas (*e.g.* adrenalina y noradrenalina) y algunos otros factores (Westfall y Westfall, 2006; Gordan et al., 2015).

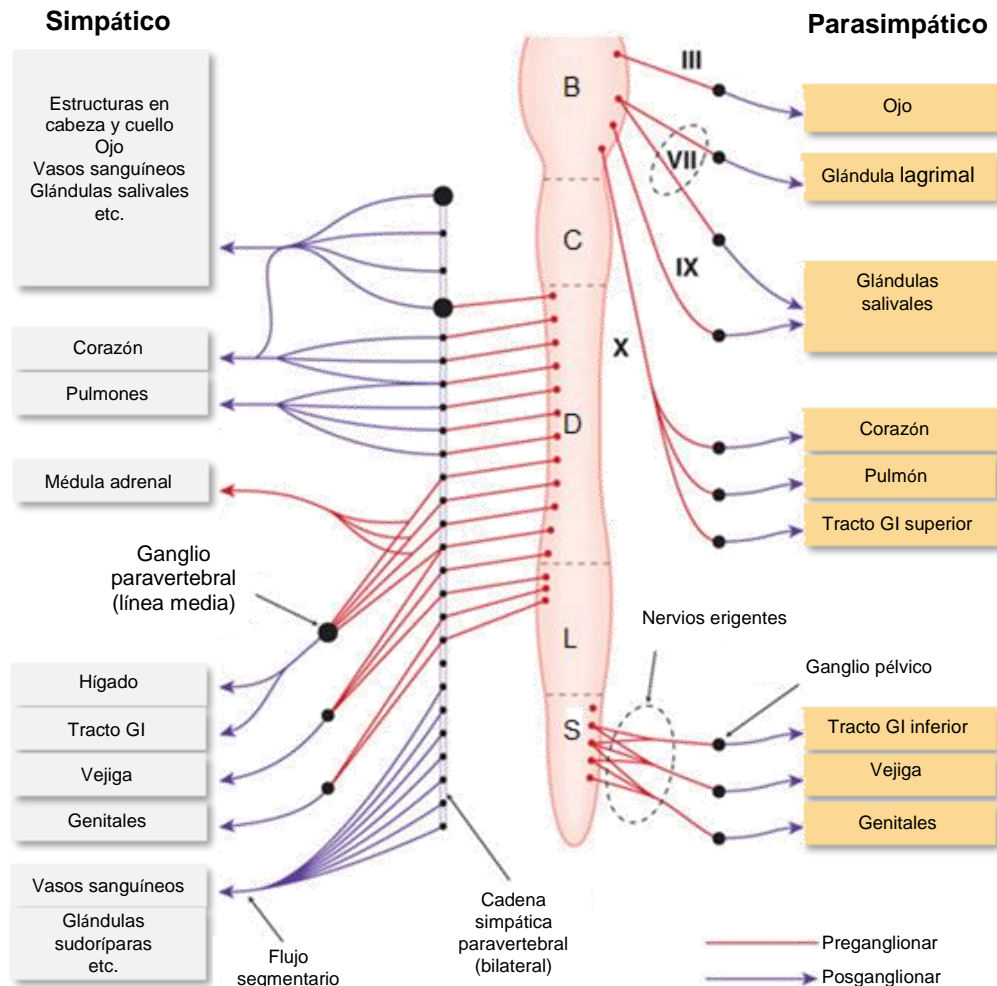
En este sentido, el corazón está sujeto a una regulación precisa mediante mecanismos reflejos, de modo que se pueda proporcionar un suministro apropiado de sangre a los diferentes tejidos del organismo. El monitoreo sensorial para este proceso homeostático implica principalmente información mecánica (barosensorial) sobre la presión en el sistema arterial, e información química (quimiosensorial) sobre el oxígeno y dióxido de carbono en la sangre. De esta manera, la actividad autónoma (simpática y parasimpática) relevante para el control cardiovascular, está determinada por la información mecánica y química (Purves et al., 2012).

## 1.2 Sistema Nervioso Autónomo (SNA)

El SNA es el componente del sistema nervioso periférico que transmite todas las señales que salen del sistema nervioso central al resto del cuerpo, con la excepción de la inervación motora del músculo esquelético (Robertson, 2004). Se encarga de controlar la contracción del músculo cardíaco, la actividad visceral y las funciones glandulares del cuerpo. Específicamente, el SNA puede regular la frecuencia cardíaca, la presión sanguínea, la frecuencia de respiración, la temperatura corporal, la sudoración, la motilidad gastrointestinal y la secreción hormonal, así como otras actividades viscerales que mantienen la homeostasis en el organismo (Gwathmey et al., 1994; Rhoadsand y Bell, 2009; Boron y Boulpaep, 2011; Mann et al., 2014).

El SNA consta de tres divisiones autonómicas fundamentales: (i) el sistema nervioso simpático; (ii) el sistema nervioso parasimpático; y (iii) el sistema nervioso entérico. Los sistemas nerviosos simpático y parasimpático (Figura 1) se encargan de crear un vínculo entre el sistema nervioso central y

los órganos periféricos, mientras que el sistema nervioso entérico está formado por los plexos nerviosos intrínsecos del tubo digestivo, que están interconectados con los sistemas nerviosos simpático y parasimpático (Rang et al., 2012).



**Figura 1. Representación esquemática del sistema nervioso autónomo de los mamíferos.** Los nervios simpáticos emergen de los segmentos dorsales (D) y lumbares (L) de la columna vertebral, mientras que los nervios parasimpáticos emergen de la región bulbar (B) y sacral (S) de la médula espinal. Ambos sistemas inervan numerosos órganos, actuando de manera antagónica, es decir, mientras uno estimula una función, el otro la inhibe. B, bulbar; C, cervical; D, dorsal; L, lumbar; S, sacro; GI, gastrointestinal. Modificado de Rang et al., 2012.



### 1.2.1 Sistema nervioso simpático

Las neuronas preganglionares del sistema simpático surgen de las regiones torácica y lumbar de la médula espinal (segmentos T<sub>1</sub>-L<sub>2</sub>) (Crosby et al., 1962; McCorry, 2007). La mayoría de los axones de las neuronas preganglionares son cortos y establecen sinapsis con neuronas posganglionares dentro de los ganglios que se encuentran en las cadenas ganglionares simpáticas. De hecho, una sola neurona preganglionar puede hacer sinapsis con varias neuronas posganglionares en diferentes ganglios (McCorry, 2007; Westfall y Westfall, 2006). Esto permite la distribución de las fibras nerviosas simpáticas hacia los efectores (Figura 1) incluyendo vasos sanguíneos, glándulas sudoríparas, estructuras de la cabeza (ojo, glándulas salivales, membranas de la mucosa de la cavidad nasal), vísceras torácicas (corazón, pulmones), y vísceras de las cavidades abdominales (estómago, intestinos, páncreas, médula suprarrenal, vejiga urinaria) (McCorry, 2007).

En cuanto a los neuromoduladores liberados por las neuronas posganglionares simpáticas, se ha descrito que éstos dependen del órgano efector que inervan. Por ejemplo, pueden liberar dopamina (en la arteria renal), acetilcolina (en las glándulas exocrinas y en los vasos sanguíneos que inervan al músculo esquelético) o noradrenalina (en el corazón y vasos sanguíneos de resistencia) (Hoffman y Taylor, 2001; McCorry, 2007).

### 1.2.2 Sistema nervioso parasimpático

Las neuronas preganglionares del sistema parasimpático surgen de los núcleos del tronco encefálico y en la región sacral de la médula espinal (segmentos S<sub>2</sub>-S<sub>4</sub>) (Crosby et al., 1962; McCorry, 2007). Los axones de estas neuronas emergen del sistema nervioso central a través de regiones que están constituidas por determinados pares craneales (Figura 1). El nervio oculomotor (III) inerva los ojos; el nervio facial (VII) inerva la glándula lagrimal, las glándulas salivales y las membranas mucosas de la cavidad nasal; el nervio glossofaríngeo (IX) inerva la glándula parótida (salival); y el nervio vago (X)



inerva las vísceras del tórax y abdomen (e.g. corazón, pulmones, estómago, páncreas, etc) (McCorry, 2007; Rang et al., 2012).

Por otro lado, los axones de las neuronas preganglionares que surgen de la región sacral de la médula espinal emergen del sistema nervioso central y se unen para formar los nervios pélvicos. Estos nervios inervan las vísceras de la cavidad pélvica (e.g. la mitad inferior del intestino grueso y los órganos de los sistemas renal y reproductivo, Figura 1) (McCorry, 2007; Rang et al., 2012).

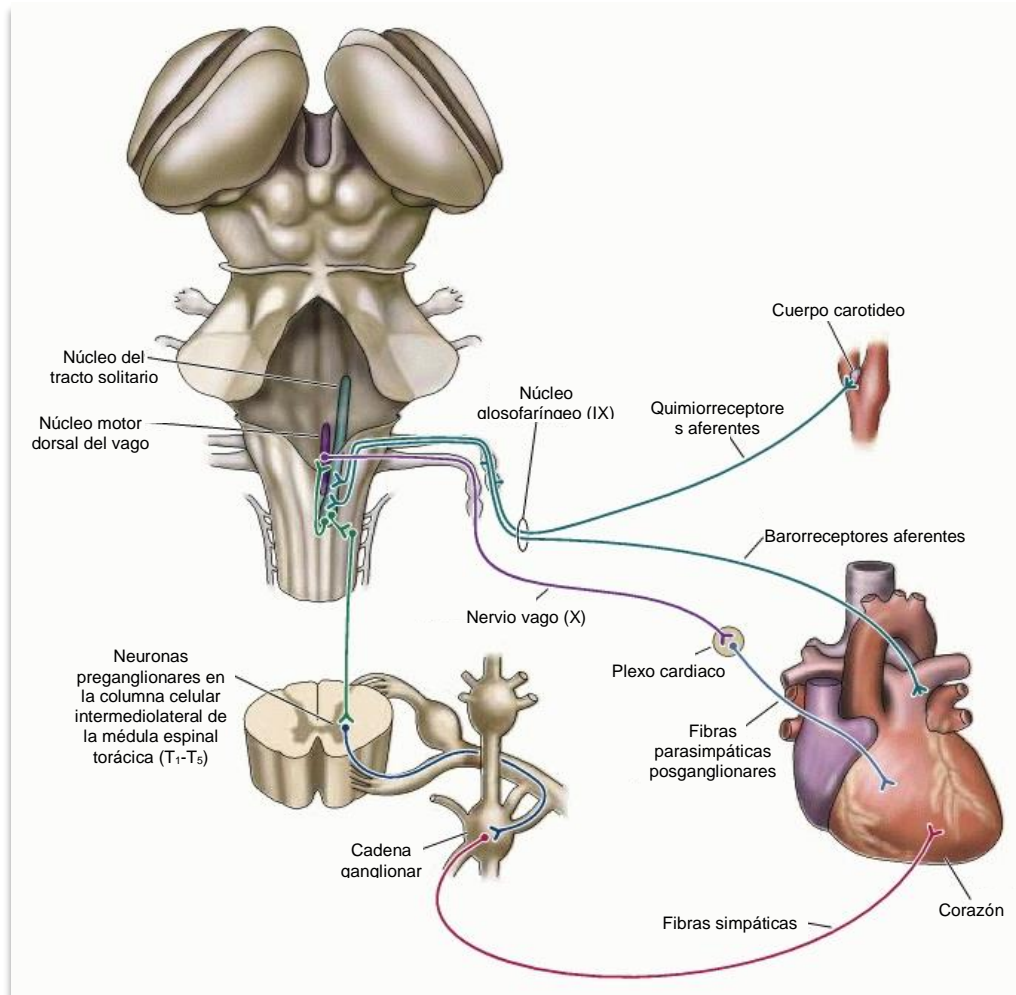
### **1.3 Regulación autonómica de la función cardíaca**

Como se mencionó anteriormente, la actividad parasimpática y simpática relevante para el control cardiovascular, está determinada por la información mecánica (vía la participación de barosensores) y química (vía la participación de quimiosensores) (Purves et al., 2012).

Los mecanorreceptores (barorreceptores), se localizan en el corazón y vasos sanguíneos, mientras que los quimiorreceptores están principalmente en los cuerpos carotídeos. Las terminales nerviosas de los barorreceptores se activan por deformación a medida que los elementos elásticos de los vasos sanguíneos se expanden y se contraen. Los quimiorreceptores en los cuerpos carotídeos y la aorta responden directamente a la presión parcial de oxígeno y dióxido de carbono en la sangre. Ambos sistemas aferentes transmiten sus señales al núcleo del tracto solitario, el cual transmite esa información al hipotálamo y a los centros autonómicos relevantes en la formación reticular (Figura 2) (Purves et al., 2012).

Cuando cambia el equilibrio de la actividad simpática y parasimpática, los efectos noradrenérgicos de la inervación simpática en el marcapasos y la musculatura cardíaca se reducen debido a la disminución en la liberación de catecolaminas de la médula suprarrenal y a la disminución de la vasoconstricción periférica. Al mismo tiempo, la inervación parasimpática colinérgica del corazón disminuye la frecuencia de descarga del marcapasos cardíaco en el nodo sinoauricular y ralentiza el sistema de conducción

ventricular. Estas influencias parasimpáticas están mediadas por ganglios parasimpáticos localizados en el corazón, los cuales liberan acetilcolina en las células del marcapasos y en las fibras del músculo cardiaco. Como resultado de los efectos simpáticos y parasimpáticos, la frecuencia cardiaca y la efectividad de la contracción miocárdica auricular y ventricular se reducen y las arteriolas periféricas se dilatan, produciendo disminución de la presión arterial (Purves et al., 2012; Gordan et al., 2015).



**Figura 2. Control autónomo de la función cardiovascular.** Las señales sensoriales relacionadas con la presión arterial y la oxigenación de la sangre se transmiten al núcleo del tracto solitario, organizando el flujo de salida autónomo vía interneuronas en la formación reticular medular. Este circuito proporciona una retroalimentación negativa a las motoneuronas viscerales que se encargan de la función cardiovascular. Modificado de Purves et al., 2012.





### 1.3.1 Control simpático

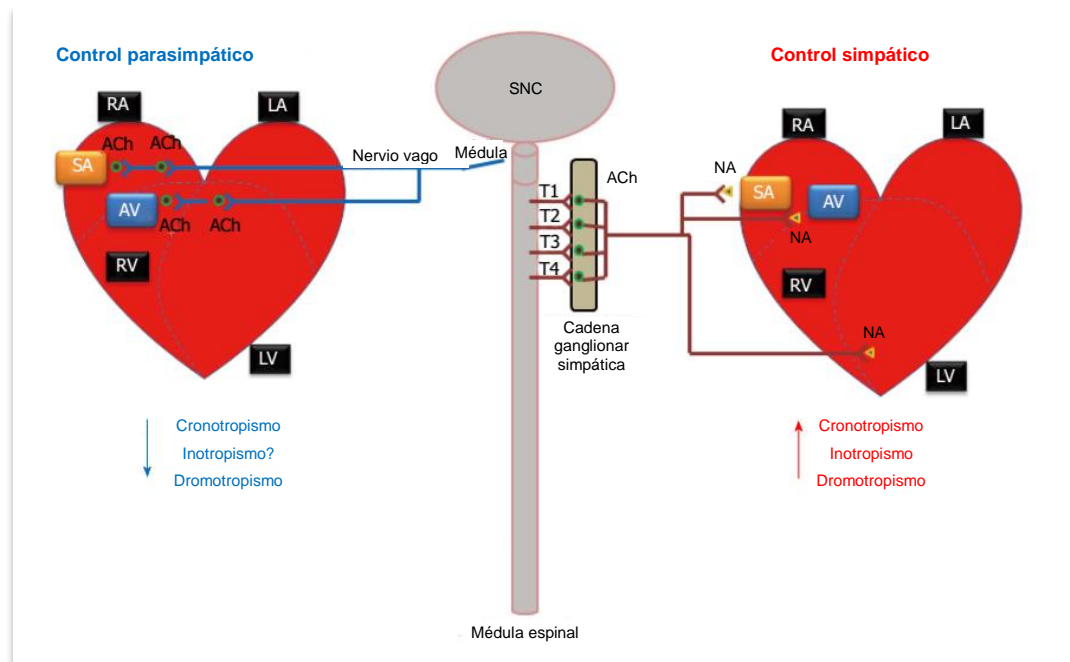
La innervación simpática del corazón surge de las neuronas preganglionares localizadas en la columna intermediolateral de la médula espinal, extendiéndose desde el primer hasta el quinto segmento torácico. En este sentido, se ha reportado que la estimulación de los nervios simpáticos resulta en (Figura 3): (i) efecto cronotrópico positivo (incremento en la frecuencia cardíaca); (ii) efecto inotrópico positivo (incremento de la contractilidad del corazón); y (iii) efecto dromotrópico positivo (potenciación de la velocidad de conducción) (Purves et al., 2012; Gordan et al., 2015).

El nodo sinoauricular es el marcapasos predominante del corazón. Está localizado dentro de la parte posterior superior de la pared de la aurícula, y es el responsable de mantener el ritmo sinusal. La estimulación de los nervios del sistema simpático resulta en incrementos de la frecuencia cardíaca (cronotropismo positivo), como lo que ocurre en la respuesta de “lucha o huida”. Por otro lado, la contractilidad del miocardio representa la capacidad del corazón para producir fuerza durante la contracción. Este fenómeno está determinado por el incremento de los enlaces entre los filamentos de miosina y actina, que a su vez depende de la concentración de calcio en el citosol del cardiomiocito. La estimulación de las fibras nerviosas simpáticas causa incrementos en la concentración de calcio intracelular y por lo tanto, aumento en la contracción de las aurículas y los ventrículos (inotropismo positivo). Finalmente, la estimulación del sistema nervioso simpático también potencia la conductividad de la señal eléctrica del corazón, es decir, incrementa la velocidad de conducción auriculo-ventricular (Gordan et al., 2015).

### 1.3.2 Control parasimpático

La actividad parasimpática produce efectos opuestos a los producidos por la activación simpática. Sin embargo, el sistema nervioso parasimpático tiene poco efecto sobre la contractilidad del miocardio (Figura 3) (Gordan et al., 2015).

El nervio vago inerva directamente el nodo sinoauricular, y cuando es activado, produce una disminución de la frecuencia cardíaca (efecto cronotrópico negativo). En cuanto a la disminución de la contractilidad miocárdica (efecto inotrópico negativo), se sabe que el nervio vago no inerva directamente cardiomiocitos distintos de los nodos sinoauricular y auriculoventricular. Sin embargo, estudios *in vivo* han sugerido lo contrario, al menos en la aurícula. Por último, la estimulación del sistema nervioso parasimpático, también puede producir inhibición de la velocidad de conducción en el nodo auriculoventricular (efecto dromotrópico negativo) (Gordan et al., 2015).



**Figura 3. Control autónomo de la función cardíaca.** Los nervios simpáticos y parasimpáticos ejercen efectos antagónicos en el corazón. La estimulación del sistema nervioso autónomo afecta la frecuencia, la fuerza de contracción y la velocidad de conducción del corazón vía la liberación de noradrenalina (simpático) y acetilcolina (parasimpático). SNC, sistema nervioso central; RA, aurícula derecha; LA, aurícula izquierda; RV, ventrículo derecho; LV, ventrículo izquierdo; SA, nodo sinoauricular; AV, nodo auriculoventricular; NA, noradrenalina; ACh, acetilcolina. Modificado de Gordan et al., 2015.

## CAPÍTULO 2

### SIMPATO-INHIBICIÓN CARDIACA

#### 2.1 Generalidades

Dado que el corazón está innervado por el SNA, se ha reportado que al estimular selectivamente los segmentos vertebrales que comprenden la región C<sub>7</sub>-T<sub>1</sub> (es decir, estimulación preganglionar selectiva de los nervios simpáticos que innervan al corazón) en el modelo de la rata descerebrada y desmedulada (preparación experimental que permite la estimulación selectiva del tono simpático y el estudio de los efectos de diversos fármacos sobre dicho tono) se producen incrementos en la frecuencia cardíaca dependientes de las frecuencias de estimulación (Gillispie y Miur, 1967).

En este sentido, se ha demostrado que las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica simpática son inhibidas por las infusiones continuas B-HT 933 (agonista de los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ ) (Cobos-Puc et al., 2007); quinpirol (agonista de los receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>-like) (Altamirano-Espinoza et al., 2013); o immepip (agonista histaminérgico H<sub>3</sub>/H<sub>4</sub>) (Pinacho-García et al., 2016).

Además, la simpato-inhibición cardíaca producida por estos agonistas es bloqueada selectivamente por la administración de, respectivamente: (i) BRL44408 (antagonista adrenérgico  $\alpha_{2A}$ ) y MK912 (antagonista adrenérgico  $\alpha_{2C}$ ) (Cobos-Puc et al., 2007); (ii) L-741,626 (antagonista del subtipo dopaminérgico D<sub>2</sub>) (Altamirano-Espinoza et al., 2013); y (iii) tioperamida (antagonista histaminérgico H<sub>3</sub>) (Pinacho-García et al., 2016). Estos (sub)tipos de receptores están acoplados a proteínas Gi/o heterotriméricas (Boehm y Kubista, 2002) y han sido asociadas con la modulación preunional de la liberación de noradrenalina y otros neuromoduladores en modelos *in vivo* e *in vitro* (Boehm y Kubista, 2002; De Jong y Verhage, 2009).



Además de la modulación preunional de la liberación de neuromoduladores, la noradrenalina, la dopamina y la histamina ejercen múltiples funciones vía la interacción con sus respectivos (sub)tipos de receptores, los cuales han sido clasificados de acuerdo a la conjunción de los criterios operacionales, transduccionales y estructurales (Hoyer et al., 1994).

## 2.2 Criterios para la clasificación de receptores

De acuerdo con la IUPHAR (*International Union of Pharmacology*), la clasificación de los receptores está basada en la conjunción de tres criterios esenciales, a saber: operacionales (o farmacológicos), transduccionales y estructurales. Estos criterios involucran, respectivamente, el uso de agonistas y antagonistas selectivos para un receptor en particular, técnicas bioquímicas y técnicas de biología molecular. Con base en lo anterior, se ha establecido que los receptores deben ser clasificados de acuerdo a sus características operacionales, transduccionales y estructurales (Hoyer et al., 1994).

### 2.2.1 Criterio operacional

El criterio operacional o farmacológico involucra: (i) el uso de agonistas con afinidad única o alta selectividad por el receptor de estudio; (ii) el orden de potencia de los agonistas para el receptor en cuestión; (iii) el uso de antagonistas selectivos para cada uno de los (sub)tipos de receptores en referencia al receptor en cuestión o por otros receptores; y (iv) las constantes de disociación de estos ligandos obtenido por estudios de unión o estudios funcionales (Hoyer et al., 1994).

### 2.2.2 Criterio transduccional

Este criterio se basa en el conocimiento e identificación de los sistemas transduccionales a los cuales se encuentra asociado el receptor. Es decir, ayuda a definir: (i) la identidad de la superfamilia de receptores a la que pertenece (*i.e.* la familia de receptores acoplados a proteínas G, o canal iónico



operado por un ligando); y (ii) la naturaleza de la proteína G a la que se encuentra acoplado (*i.e.* G<sub>i</sub>, G<sub>o</sub>, G<sub>s</sub>, G<sub>q</sub>) (Hoyer et al., 1994).

### 2.2.3 Criterio estructural

El criterio estructural contempla la identificación de la secuencia de aminoácidos que componen al receptor y su grado de homología. Este criterio es válido para la identificación y clasificación del receptor en cuestión, sin embargo, aunque el receptor cumpla con diferencias estructurales, pero no con diferencias operacionales o transduccionales, los datos obtenidos por este criterio son de valor limitado (Hoyer et al., 1994).

## 2.3 Receptores adrenérgicos $\alpha_2$

Los receptores adrenérgicos han sido la familia de receptores más estudiada debido al papel importante que desempeñan en el control de la presión arterial y el flujo sanguíneo, en la modulación neuronal, la digestión, reproducción, y en procesos metabólicos, endocrinos y conductuales, entre otros (Docherty, 1998). Estos receptores pueden ser definidos como receptores de membrana de siete dominios transmembranales, pertenecientes a la familia de receptores acoplados a proteínas G, los cuales responden a los agonistas fisiológicos noradrenalina y adrenalina produciendo una respuesta en la célula (Docherty, 1998; Ruffolo et al., 1991).

Se define como receptor adrenérgico  $\alpha_2$  a aquel receptor que se activa por B-HT 933, UK14304 o NHT920 y se antagoniza por concentraciones bajas de yohimbina, rauwolscina o idazoxan (Ruffolo et al., 1991; Hieble et al., 1995; Hieble y Ruffolo, 1996). Esta familia de receptores ha sido clasificada con base en estudios de unión y moleculares en tres subtipos: receptores adrenérgicos  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  y  $\alpha_{2C}$  (Lorenz et al., 1990; Bylund, 1994), los cuales están ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central (pre- y postsinápticamente) y a nivel periférico se localizan en el músculo liso vascular (Bylund et al., 1994; Piascik et al., 1997; Docherty, 1998).



A nivel cardiovascular, los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  producen constricción de los vasos sanguíneos de resistencia (Chotani et al., 2004), de las venas (Pang, 2001) y de las arterias coronarias que irrigan sangre al corazón (Woodman y Vatner, 1987). Por otro lado, a nivel presináptico los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  se localizan en el corazón de diversas especies de mamíferos, incluyendo la rata, el conejo, el cerdo, el perro, el mono y humanos (Likungu et al., 1996). Adicionalmente, se ha reportado que los subtipos de receptores adrenérgicos  $\alpha_{2A}$  y  $\alpha_{2C}$  participan en la simpato-inhibición cardiaca en la rata descerebrada y desmedulada (Cobos-Puc et al., 2007).

### 2.3.1 Receptor adrenérgico $\alpha_{2A}$

El subtipo de receptor adrenérgico  $\alpha_{2A}$  se descubrió inicialmente en plaquetas humanas y en células de adenocarcinoma de colon (células HT29) (Bylund et al., 1998). Adicionalmente, se ha reportado que el ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de este subtipo de receptor se encuentra pre- y postsinápticamente en el sistema nervioso central, lo cual ha sugerido que tiene influencia sobre la liberación de neuromediadores y la excitabilidad neuronal, así como una influencia directa sobre la regulación del tono simpático (Guyenet et al., 1994; Talley et al., 1996).

A nivel presináptico, se ha descrito que tienen un papel predominante en la inhibición de la liberación del neuromodulador (Altman et al., 1999; Hein et al., 1999; Trendelenburg et al., 2003). Además, este subtipo de receptor está involucrado en la antinocicepción (Hunter et al., 1997; Lakhani et al., 1997), en efectos anti- y pro-convulsivantes (Szot et al., 2004) y en efectos hipotérmicos (Hunter et al., 1997).

Postsinápticamente, el subtipo adrenérgico  $\alpha_{2A}$  está relacionado con incrementos del flujo sanguíneo en la corteza prefrontal y con el mejoramiento de la función de la memoria de trabajo (Avery et al., 2000). Además, puede mediar efectos benéficos en el trastorno de hiperactividad con déficit de atención (Levy, 2008; Cho et al., 2008).



### 2.3.2 Receptores adrenérgicos $\alpha_{2B}$

Este subtipo de receptor fue identificado por primera vez en pulmones de rata y en células de neuroblastoma (NG108) (Bylund et al., 1988). Adicionalmente, se ha demostrado que se localiza en el ganglio de la raíz dorsal y en los nervios craneales V y VII, en la corteza cerebral, en el núcleo olfatorio anterior, hipotálamo, tallo cerebral y en las células de Purkinje en el cerebelo (Wang et al., 2002). Tienen un papel importante en mediar respuestas vasoconstrictoras inducidas por agonistas adrenérgicos  $\alpha_2$  (Link et al., 1996), además de participar en respuestas contráctiles del útero en ratas gestantes (Gaspar et al., 2007).

### 2.3.3 Receptores adrenérgicos $\alpha_{2C}$

Es el principal subtipo de receptor que inhibe la liberación de catecolaminas desde la médula suprarrenal y modula la transmisión dopaminérgica en el encéfalo (Westfall y Westfall, 2006).

Se ha demostrado que el ARNm del subtipo  $\alpha_{2C}$  se encuentra altamente expresado en los ganglios basales, además de localizarse en el hipocampo y la corteza cerebral (MacDonald y Scheinin, 1995). Adicionalmente, se ha encontrado en otras regiones cerebrales que contienen cuerpos celulares noradrenérgicos, en el núcleo del rafé que contiene cuerpos celulares serotoninérgicos, en la sustancia negra y en el área tegmental ventral, las cuales son centros dopaminérgicos importantes (Rosin et al., 1996). Por lo tanto, se ha sugerido que los receptores adrenérgicos  $\alpha_{2C}$  pueden estar involucrados en la regulación de las vías monoaminérgicas en el cerebro (Rosin et al., 1996).

## 2.4 Receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>-like

La dopamina produce respuestas en el sistema cardiovascular por su capacidad de interactuar con receptores adrenérgicos  $\alpha$  y  $\beta$  (Goldberg, 1972; Missale et al., 1998; Beaulieu y Gainetdinov, 2011), además de modular



múltiples funciones periféricas al interactuar con sus receptores a nivel central y periférico (Willems et al., 1985; Missale et al., 1998; Jose et al., 2003).

La familia de receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>-like incluye tres subtipos: D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub>, los cuales están asociados con proteínas G<sub>i/o</sub> y la inhibición de la formación de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) (Kebabian, 1978; Spano et al., 1978). Se encuentran principalmente a nivel preunional sobre los nervios simpáticos y perivasculares mediando la simpato-inhibición (Harvey et al., 1985, 1986; Willems et al., 1985; Lokhandwala y Hegde, 1990; Missale et al., 1998). En el sistema cardiovascular, se localizan en la capa adventicia y en la capa íntima de la arteria renal, mesentérica y esplénica de la rata, participando en la regulación del flujo sanguíneo (Amenta et al., 2000) y en la inhibición de la vasoconstricción neurogénica (Cavero et al., 1982a, Cavero et al., 1982b; Lokhandwala, 1988). Adicionalmente, se localizan en el corazón de humano (Amenta et al., 1993), rata (Amenta, 1997) y cobayo (Gómez et al., 2002).

#### 2.4.1 Receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>

Este subtipo de receptor parece ser el autoreceptor más predominante que se encuentra involucrado en la regulación presináptica de la tasa de disparo, la síntesis y la liberación de dopamina. Existen dos isoformas del subtipo D<sub>2</sub>: (i) la isoforma D<sub>2S</sub>, localizada en neuronas presinápticas; y (ii) la isoforma D<sub>2L</sub>, localizada en neuronas posinápticas. Por lo tanto, las funciones del subtipo dopaminérgico D<sub>2</sub> pre- y pos-sináptico están determinadas por las diferentes contribuciones de estas isoformas (Usiello et al., 2000; De Mei et al., 2009).

Se localiza principalmente en el estriado, el tubérculo olfatorio y en el núcleo accumbens. Además, se ha reportado que el ARNm de este subtipo se encuentra en las cortezas prefrontal, cingulada, temporal y entorrinal, en la amígdala y en las células granulares de la formación hipocampal (Bouthenet et al., 1991; Jackson y Westlind-Danielson, 1994). También se ha





encontrado en el hipotálamo, la sustancia negra y en el área tegmental ventral (Meador-Woodruff et al., 1989; Bouthenet et al., 1991; Weiner et al., 1991).

#### 2.4.2 Receptores dopaminérgicos D<sub>3</sub>

Evidencias farmacológicas (Gainetdinov et al., 1996; Zapata y Shippenberg, 2002) y estudios genéticos en ratones *knock-out* del receptor dopaminérgico D<sub>3</sub> (Sibley, 1999; Joseph et al., 2002) sugieren que este subtipo de receptor funciona como un autoreceptor, el cual contribuye en la regulación presináptica de la liberación tónica de dopamina, complementado así el papel de la isoforma D<sub>2s</sub> en la regulación de la tasa de activación neuronal, así como en la síntesis y en la liberación fásica de dopamina (De Mei et al., 2009).

Además, el subtipo de receptor D<sub>3</sub> ejerce una moderada acción inhibitoria sobre la locomoción, ya sea actuando como autorreceptor o mediante la participación de receptores postsinápticos (Sibley, 1999; Joseph et al., 2002).

#### 2.4.3 Receptores dopaminérgicos D<sub>4</sub>

El subtipo de receptor dopaminérgico D<sub>4</sub> tiene un perfil farmacológico similar al subtipo D<sub>2</sub>. Está expresado en el cerebro, predominantemente en la médula, la amígdala y la corteza prefrontal, mientras que niveles bajos de este receptor se encuentran en el estriado, en el tubérculo olfatorio, hipocampo, hipotálamo y sustancia negra. Adicionalmente, el ARNm de este subtipo, ha sido localizado en tejidos periféricos, mientras que la proteína parece estar expresada preferencialmente en el sistema cardiovascular de la rata (Missale et al., 1998; Rondou et al., 2010).

Por otro lado, se ha descrito que este subtipo de receptor participa en la modulación de la secreción de ácido gástrico (Glavin y Hall, 1994), además de tener un papel muy importante en desórdenes conductuales como la esquizofrenia (Snyder et al., 1970; Roth et al., 2004).



## 2.5 Receptores histaminérgicos H<sub>3</sub> y H<sub>4</sub>

La histamina es una monoamina biogénica que modula una amplia variedad de funciones centrales y periféricas (incluyendo la modulación la transmisión simpática), además de tener un papel patofisiológico en procesos alérgicos al interactuar con los receptores histaminérgicos H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> y H<sub>4</sub> (Parsons y Ganellin, 2006; Panula et al., 2015).

A nivel cardiovascular, la activación de los receptores H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub> pueden inducir (dependiendo de las condiciones experimentales) vasodilatación, vasoconstricción y efecto cronotrópico positivo en mamíferos (Genovese y Spadaro, 1997; Kopeć et al., 2001). Por otro lado, los efectos complejos de histamina pueden ser explicados por su interacción con receptores H<sub>3</sub> (Gemkow et al., 2009) y H<sub>4</sub> (Feliszek et al., 2015), los cuales han sido localizados en neuronas centrales y periféricas, así como en tejidos periféricos (Panula et al., 2015). Considerando que los receptores histaminérgicos H<sub>3</sub> y H<sub>4</sub> están acoplados a proteínas G<sub>i/o</sub> heterotriméricas (Bongers et al., 2007; Jutel et al., 2009), en este trabajo sólo serán descritos dichos receptores.

### 2.5.1 Receptores histaminérgicos H<sub>3</sub>

El receptor histaminérgico H<sub>3</sub> actúa como un autoreceptor presináptico que inhibe la síntesis y liberación de histamina (Arrang et al., 1987; Parsons y Ganellin, 2006), serotonina (Schlicker et al., 1988, Threlfell et al., 2004), noradrenalina (Schlicker et al., 1989), acetilcolina (Clapham y Kilpatrick, 1992), y dopamina (Schlicker et al., 1992; Munari et al., 2013) de neuronas del sistema nervioso central de mamíferos.

Por otro lado, la activación de receptores H<sub>3</sub> inhibe la neurotransmisión en el sistema nervioso autónomo periférico y en el sistema sensorial. La neurotransmisión simpática es regulada por el receptor H<sub>3</sub> en la arteria mesentérica y en la aurícula de cobayo (Ishikawa y Sperelakis, 1987; Endou et al., 1994), en la vena safena y el corazón de humano (Molderings et al., 1992; Imamura et al., 1996), en la arteria de la cola de la



rata (Godlewski et al., 1997), y en el riñón de perro (Yamasaki et al., 2001). En cuanto al sistema sensorial, la liberación del péptido relacionado con el gen de la calcitonina de las fibras sensoriales C (Ichinose y Barnes, 1990; Manrique-Maldonado et al., 2015), corazón (Imamura et al., 1996), y meninges (Matsubara et al., 1992) es controlada por este tipo de receptor.

#### 2.5.2 Receptores histaminérgicos H<sub>4</sub>

El receptor H<sub>4</sub> fue descrito inicialmente por Nguyen et al. (2001) y se ha reportado que se encuentra preferencialmente expresado en diversas células del sistema inmune (*i.e.* células dendríticas, eosinófilos, monocitos, basófilos y linfocitos T), así como en las células cebadas (Coge, 2001; Jablonowski et al., 2004). Una de las principales funciones atribuidas a este receptor es la mediación de la quimiotaxis de varios tipos de células (Hofstra et al., 2003; Thurmond et al., 2004).

Dado que los receptores H<sub>4</sub> se encuentran expresados en las células cebadas (Liu et al., 2001; Zhu et al., 2001), se ha reportado que la activación de estos receptores durante la isquemia/reperfusión proporcionan efectos cardioprotectores que incluyen la disminución en la liberación de renina y noradrenalina (Aldi et al., 2014).

Adicionalmente, se ha identificado la presencia del ARNm del receptor H<sub>4</sub> en células endoteliales de cerebro de rata (Karlstedt et al., 2013), sugiriendo que la presencia de este tipo de receptor en las células endoteliales de los microvasos cerebrales podrían afectar la vascularización y la permeabilidad vascular en el cerebro (Karlstedt et al., 2013). Sin embargo, aún no se han descritos sus características funcionales exactas en estos procesos (Hattori et al., 2017).

## 2.6 El sistema transduccional de los receptores acoplados a proteínas $G_{i/o}$

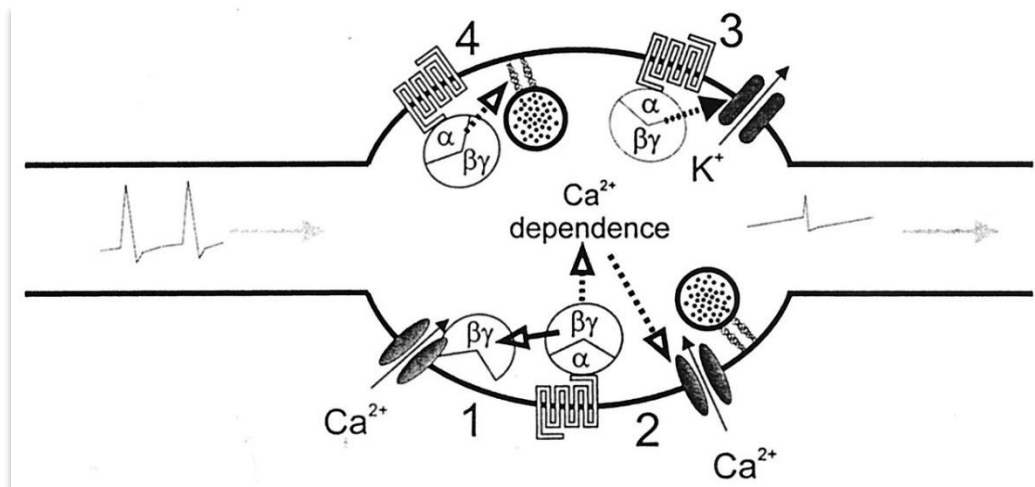
Se ha demostrado que la activación de receptores acoplados a proteínas  $G_{i/o}$  (e.g. receptores dopaminérgicos  $D_2$ -like, adrenérgicos  $\alpha_2$ , histaminérgicos  $H_3/H_4$ , entre otros); desempeñan un papel importante en el control de la transmisión sináptica, inhibiendo la liberación del neuromediador (Boehm y Kubista, 2002; Stephens y Mochida, 2005; Bongers et al., 2007; Stephens, 2009; Jutel et al., 2009). Tal regulación se atribuye a la activación de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta\gamma$  de las proteínas G heterotriméricas (Hildebrandt, 1997; Downes y Gautam, 1999;).

Por un lado, la activación de la subunidad  $G\alpha_{i/o}$  inhibe la enzima adenilato ciclasa (AC), produciendo disminución del AMPc intracelular, ocasionado inactivación de la cinasa A de proteínas e inhibición de la vía de señalización dependiente del AMPc (Sharma et al., 1975).

Por otro lado, la activación de los receptores presinápticos acoplados a proteínas  $G_{i/o}$  lleva a la disociación y activación de las subunidades  $G_{\beta\gamma}$  (Corti et al., 2002). La modulación de la transmisión sináptica por estas subunidades puede ocurrir a través de tres mecanismos principales: (i) inhibición de los canales de calcio dependientes de voltaje en las terminales nerviosas presinápticas; (ii) regulación intracelular de la entrada de calcio vía la interacción con uno o más de los componentes de la maquinaria exocitótica (Miller, 1998); y (iii) activación de los canales de potasio de rectificación interna acoplados a proteínas G, afectando el potencial de acción (Fernández-Alacid et al., 2009).

En este sentido, se ha descrito que la inhibición presináptica vía la activación de proteínas  $G_{i/o}$  puede ocurrir principalmente a dos niveles: (i) vía el acoplamiento excitación-secreción; y (ii) vía exocitosis vesicular (Bohem y Kubista, 2012) (ver figura 4). De estas dos vías, la primera está delimitada por membrana e implica la unión directa de las subunidades  $\beta\gamma$  de la proteína  $G_{i/o}$  a los canales de calcio tipo N-, P-, Q- y R-, mientras que la

segunda vía depende de un sistema de segundos mensajeros dependiente de calcio, afectando a todos los tipos de canales de calcio (Zamponi y Snutch, 1998; Shapiro et al., 1999). De estas dos vías que regulan las funciones de los canales de calcio dependientes de voltaje, sólo la primera vía (delimitada por membrana) parece estar implicada en la inhibición presináptica dependiente del receptor de la liberación del neuromediador (Koh y Hille, 1997).



**Figura 4. Mecanismos de señalización de receptores metabotrópicos inhibitorios.** La activación de las subunidades  $\beta\gamma$  de las proteínas  $G_{i/o}$  pueden ocasionar (Figura 4): (i) inhibición directa de la entrada de la entrada de calcio vía canales de calcio dependientes de voltaje (1 y 2); (ii) potenciación de la repolarización de los canales de potasio para acortar la fase despolarizante de los potenciales de acción (3); e (iii) interrupción del proceso de exocitosis (4) (Miller, 1998). Modificado de Bohem y Kubista, 2002.



## CAPÍTULO 3

### DIABETES

#### 3.1 Generalidades

La *diabetes mellitus* (DM) es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizada por hiperglucemia crónica con alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas; resultante de defectos en la secreción y/o en la acción de la insulina (*American Diabetes Association*, 2014).

Diversos procesos patogénicos están involucrados en el desarrollo de la diabetes, los cuales incluyen: (i) la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  del páncreas con la consecuente deficiencia de insulina; y (ii) anomalías en la función de la insulina que resultan en resistencia a esta hormona (Galtier, 2010; *American Diabetes Association*, 2014).

#### 3.2 Clasificación

De acuerdo con las propuestas hechas por la Asociación Americana de la Diabetes en 1997, la DM se ha clasificado en: (i) tipo I, causada por una deficiencia absoluta en la secreción de la insulina debido a la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  del páncreas; (ii) tipo II, originada por una combinación de resistencia a la insulina y una inadecuada respuesta a dicha hormona; (iii) otros tipos de diabetes, caracterizados por defectos genéticos; y (iv) gestacional, originada por hiperglucemia durante el embarazo (*American Diabetes Association*, 2014).

#### 3.3 DM tipo I

Este tipo de DM (también llamada diabetes insulino dependiente o juvenil) constituye del 5-10% de las personas diagnosticadas con esta enfermedad, lo que representa el 80-90% de niños y adolescentes de hasta 14 años de edad (Devendra et al., 2004; Daneman, 2006; Dabalea et al., 2014).



El origen de este tipo de diabetes es debido a la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  del páncreas a través de la respuesta inflamatoria mediada por células T así como de la respuesta humoral mediada por células  $\beta$  (Devendra et al., 2004). La presencia de auto-anticuerpos en el islote pancreático es el principal marcador para el desarrollo de la DM tipo I, aunque la patogénesis de esta enfermedad no es clara. Estos marcadores incluyen auto-anticuerpos presentes en las células  $\beta$  del páncreas, auto-anticuerpos para la insulina y el ácido glutámico descarboxilasa, así como auto-anticuerpos para la proteína tirosina fosfatasa 2 (IA2) y la proteína transportadora de zinc (Vermeulen et al., 2011). Estos auto-anticuerpos pancreáticos son característicos de la DM tipo I y pueden ser detectados en el plasma de estos pacientes al inicio o en etapas avanzadas de la enfermedad (Couper y Donaghue, 2009).

### 3.3.1 Complicaciones

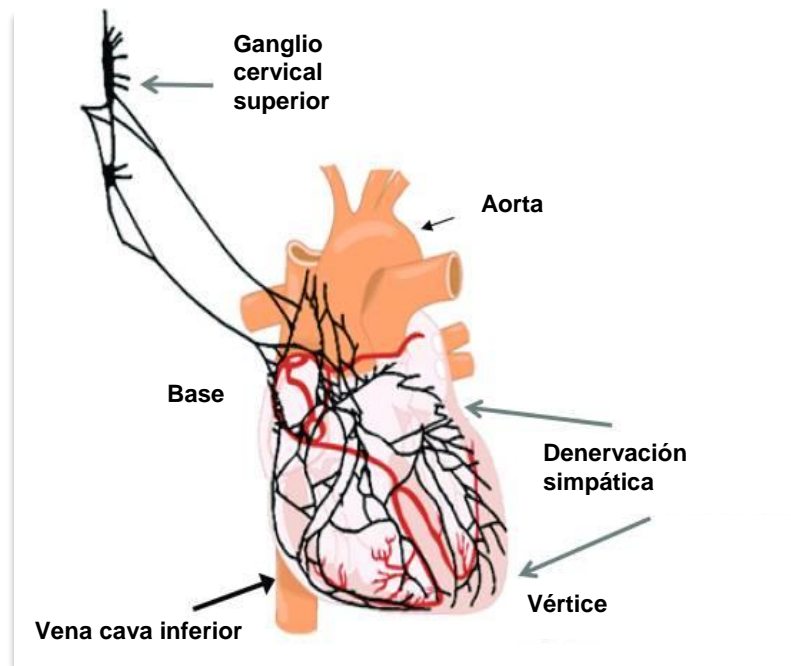
La hiperglucemia crónica de la diabetes está asociada con complicaciones a largo plazo y con disfunción y falla de varios órganos que incluyen los ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos (*American Diabetes Association*, 2014). Las complicaciones a largo plazo incluyen: (i) retinopatía, ocasionado potencial pérdida de la visión; (ii) nefropatía, lo que provoca daño renal; (iii) neuropatía periférica, con un alto riesgo de úlceras y amputaciones; y (iv) neuropatía autonómica, causando alteraciones en los sistemas gastrointestinal, genitourinario y cardiovascular, y disfunción sexual (*American Diabetes Association*, 2014).

### 3.3.2 Neuropatía autonómica cardiovascular

Las neuropatías diabéticas; incluyendo la neuropatía autonómica cardíaca (NAC), son las complicaciones crónicas más comunes en la DM tipo I y II, produciendo una alta morbilidad y mortalidad en los pacientes diabéticos (Vinik et al., 2003; Pop-Busui, 2010). La NAC engloba daño a las fibras nerviosas que inervan el corazón y vasos sanguíneos, resultando en

anormalidades en el control de la frecuencia cardiaca y las dinámicas vasculares (Schumer et al., 1998). Estas anormalidades son el resultado de interacciones complejas entre el control glicémico, la duración de la enfermedad, el desgaste neuronal relacionado con la edad y la presión sanguínea diastólica (Stella et al., 2000; Witte et al., 2005).

Adicionalmente, se ha descrito que la NAC en la diabetes se caracteriza por un aumento del tono simpático (Axelrod et al., 1987). En este sentido, se ha reportado que durante la NAC en la DM tipo I, existe un aumento compensatorio en el tono simpático cardiaco en respuesta a la denervación periférica. Dicha denervación se origina en el vértice de los ventrículos y progresa hacia la base del corazón (Figura 5) (Pop-Busui et al., 2004; Taskiran et al., 2004).



**Figura 5. Inervación autónoma del corazón y los efectos de la diabetes.**

En la diabetes, la neuropatía cardiaca se origina debido a la denervación simpática, la cual comienza en el vértice de los ventrículos y progresa hacia la base, lo que ocasiona incremento en el tono simpático cardiaco como mecanismo compensatorio. Modificado de Pop-Buusi, 2010.





Por otro lado, el aumento inicial en la actividad simpática cardíaca con el subsecuente metabolismo y señalización de noradrenalina, el incremento en el estrés oxidativo mitocondrial (Givertz et al., 2001) y la apoptosis dependiente de calcio (Iwai-Kanai et al., 1999), pueden contribuir a la lesión del miocardio (Paulson y Light, 1981; Givertz et al., 2001) y explicar el alto riesgo de eventos cardíacos y muerte súbita en los pacientes diabéticos. Además, el desequilibrio simpático asociado con la NAC puede influir de forma crítica en la utilización de glucosa o lípidos como sustratos miocárdicos (Drake-Holland et al., 2001) y contribuir en el desacoplamiento mitocondrial (Schrauwen et al., 2006), las anomalías del movimiento ventricular, los déficits funcionales y la cardiomiopatía (Pop-Busui et al., 2004).

### **3.4 Modelos experimentales de DM tipo I**

Los modelos experimentales caracterizados apropiadamente y clínicamente relevantes se consideran herramientas esenciales para probar nuevos agentes farmacológicos, entendiendo la patogénesis de la enfermedad, la base molecular y el mecanismo de acción de estos agentes terapéuticos. Por lo tanto, para controlar la DM tipo I, es de suma importancia establecer modelos animales únicos que mimeticen los cambios posteriores de la diabetes en los humanos. Estos modelos animales viables, deben abordar todos los aspectos de esta enfermedad humana, desarrollando todos los principales signos que se presentan durante el desarrollo de la DM tipo I (Suman et al., 2016).

En este sentido, la inducción de DM tipo I experimental en la rata usando sustancias químicas las cuales destruyen selectivamente las células  $\beta$  del páncreas, es muy conveniente y de fácil uso. Por tal motivo, la aloxana y la estreptozotocina (STZ) se han propuesto como agentes diabetogénicos y son usados para inducir diabetes experimental en animales (Szkudelski, 2001).



### 3.4.1 Mecanismo de acción de la aloxana

La administración de aloxana (2,4,5,6-tetraoxipirimidina; 5,6-dioxiuracilo) ha sido empleada como un modelo animal de DM tipo I (Dunn et al., 1943). Este compuesto ejerce su acción diabetogénica al producir especies reactivas de oxígeno (Heikkila et al., 1976) cuando es capturado rápidamente por las células  $\beta$  del páncreas (Weaver et al., 1978; Boquist et al., 1983). La producción de especies reactivas de oxígeno ocurre por una reducción de este compuesto en las células pancreáticas (Lenzen y Munday, 1991). Como resultado de la reducción de la aloxana, se forma el ácido dialúrico, el cual es re-oxidado para formar nuevamente la aloxana, estableciendo un ciclo óxido-reducción para la formación de radicales superóxido (Munday, 1988). Uno de los principales blancos de las especies reactivas de oxígeno es el ácido desoxirribonucleico (ADN) de las células pancreáticas, el cual resulta fragmentado después de la exposición de las células  $\beta$  a la aloxana (Takasu et al., 1991; Sakurai y Ogiso, 1995).

Además de la formación de especies reactivas de oxígeno tras la administración de aloxana, se ha descrito que existen otros procesos tóxicos que incluyen la oxidación de grupos sulfhidrilo, inhibición de la glucoronidasa y la inducción de alteraciones en las concentraciones de calcio, con lo que se produce un desbalance en la homeostasis y muerte celular (Dunn et al., 1943).

Por otro lado, se ha demostrado que el efecto de aloxana no es suficientemente selectivo, ya que produce daño hepático (Szkudelski, 2001) al ser administrado en dosis diabetogénicas (65 mg/kg, Katsumata et al., 1992), además de que existe un rango muy pequeño de seguridad en términos de toxicidad letal y el efecto diabetogénico (Lenzen et al., 1996).

### 3.4.2 Mecanismo de acción de la estreptozotocina STZ

La STZ (2-deoxi-2-(3-(metil-3-nitrosoureido)-D-glucopiranososa) es sintetizada por el hongo *Streptomyces achromogenes* y ha sido usada como agente diabetogénico (Szkudelski, 2001). El rango de dosis empleado para este



compuesto es entre 40 a 60 mg/kg vía intraperitoneal (i.p.), dosis que se utilizan de manera eficaz (Ganda et al., 1976); mientras que dosis inferiores a 40 mg/kg pueden ser poco eficaces (Katsumata et al., 1992).

Este compuesto es capturado por las células  $\beta$  pancreáticas vía el transportador de glucosa GLUT 2 (Schnedl et al., 1994; Thulesen et al., 1997), lo cual resulta en producción de especies reactivas de oxígeno que ocasionan la fragmentación del ADN y cambios deletéreos en las células (Takasu et al., 1991; Bedoya et al., 1996). El daño al ADN inducido por la STZ activa el proceso de poli-ribosilación del ADP (Sandler y Swenne, 1983). Este proceso ocasiona la depleción del dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma oxidada, además de una reducción del contenido de ATP (Heller et al., 1994) y una subsecuente inhibición en la síntesis y secreción de insulina (Nukatsuka et al., 1990).

Otro mecanismo de acción atribuido a la STZ es la participación del óxido nítrico, el cual produce destrucción de las células pancreáticas y contribuye al daño del ADN (Morgan et al., 1994; Kröncke et al., 1995). En este sentido, se ha reportado que al exponer las células  $\beta$  del páncreas a STZ se presentan cambios característicos de la acción del óxido nítrico como el incremento en la actividad de la guanilil ciclasa y una potenciación en la formación del guanosín monofosfato cíclico (Turk et al., 1993).

### **3.5 Alteraciones centrales y periféricas en la DM tipo I**

Se ha descrito un gran número de alteraciones anatómicas, funcionales y bioquímicas que afectan el cerebro, la médula espinal y nervios periféricos de animales diabéticos (Tomlinson et al., 1992; Ozturk et al., 1996). Por ejemplo, a nivel del sistema nervioso autónomo de ratas diabéticas se ha observado degeneración del tejido ganglionar, disminución del calibre axonal y desmielinización (Monckton y Pehowich, 1980; Tomlinson y Yosof, 1983; Schmidt y Pulard, 1986; Kniel et al., 1986). Por otro lado, en el sistema nervioso central, la DM tipo I provoca reducción en el peso del cerebro y en el



volumen neocortical, el cual está asociado con una reducción del número de neuronas corticales (Jakobsen et al., 1987). Todos estos cambios centrales y periféricos son consistentes con el decremento en la actividad neuronal.

En cuanto a los cambios bioquímicos, se ha reportado en estudios clínicos (Roy et al., 1989) y en modelos experimentales de DM tipo I inducidos por STZ (Hicks et al., 1998), que la DM tipo I está asociada con alteraciones en el control autonómico cardiovascular, que a su vez, está ligada con cambios en los sistemas catecolaminérgicos centrales y periféricos (Gallego et al., 2003), así como en la densidad de receptores (Lozovsky et al., 1981; Sumiyoshi et al., 1997).

En este sentido, en ratas diabéticas pretratadas con STZ: (i) el contenido de dopamina se encuentra reducido en el sistema nigroestriatal, mientras que los niveles de dopamina se encuentran disminuidos en el ganglio estelar periférico (Gallego et al., 2003); (ii) las concentraciones plasmáticas de noradrenalina, dopamina e histamina pueden estar aumentadas, sin cambios o disminuidas, respectivamente (Fushimi et al., 1984; Hollis et al., 1985; James et al., 1997; Gill et al., 1998; Gallego et al., 2003); y (iii) la densidad de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  (Padayatti y Paulose, 1999) y dopaminérgicos D<sub>2</sub>-like (Lozovsky et al., 1981; Sumiyoshi et al., 1997) a nivel central está incrementada. Sin embargo, estas alteraciones a nivel periférico o a nivel central dependen de la duración y de la severidad de esta enfermedad (Gallego et al., 2003).

Adicionalmente, nuestro grupo de investigación ha demostrado que existe una activación diferencial de los subtipos de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  que inhiben el tono simpático vasopresor al compararlo con ratas diabéticas descerebradas y desmeduladas. Es decir, en ratas diabéticas, el tono simpático vasopresor es mediado por los subtipos de receptores  $\alpha_{2A}$  y  $\alpha_{2B}$ , pero no por el subtipo  $\alpha_{2C}$  (Altamirano-Espinoza et al., 2015); mientras que en ratas normoglicémicas, esta simpato-inhibición involucra la participación de los subtipos  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  y  $\alpha_{2C}$  (Villamil-Hernández et al., 2013).



## CAPÍTULO 4

### UBICACIÓN DEL PROYECTO

#### 4.1 Justificación

Se ha reportado que en ratas normoglicémicas descerebradas y desmeduladas, la estimulación selectiva de fibras autonómicas simpáticas que inervan el corazón produce cardioaceleración, respuesta que es inhibida por la activación de receptores  $\alpha_{2A}/\alpha_{2C}$  adrenérgicos (Cobos-Puc et al., 2007), dopaminérgicos  $D_2$  (Altamirano-Espinoza et al., 2013) y receptores histaminérgicos  $H_3$  (Pinacho-García et al., 2016). Sin embargo, hasta el momento no se ha reportado en la literatura científica internacional si estos mismos receptores están involucrados en la simpato-inhibición de las respuestas cardioaceleradoras en ratas diabéticas descerebradas y desmeduladas.

Por lo tanto, consideramos de suma importancia identificar el perfil farmacológico de los subtipos de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos,  $D_2$ -like dopaminérgicos, así como de receptores histaminérgicos  $H_3$  y  $H_4$  que inhiben el tono simpático cardioacelerador en un modelo experimental de diabetes inducido por STZ en ratas descerebradas y desmeduladas. El hecho de identificar posibles alteraciones en dicho perfil farmacológico durante el desarrollo de la DM, representaría el potencial de encontrar nuevos blancos farmacológicos para el tratamiento de algunas complicaciones cardiovasculares que se desencadenan durante esta enfermedad (e.g. la neuropatía autonómica cardiovascular).

#### 4.2 Hipótesis

En ratas diabéticas versus ratas normoglicémicas, es posible que exista un cambio diferencial en la activación de los subtipos de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  y dopaminérgicos  $D_2$ -like, así como de los receptores histaminérgicos  $H_3$  y  $H_4$  que inhiben el tono simpático cardioacelerador.



## CAPÍTULO 5

### OBJETIVOS

#### 5.1 Objetivo General

Identificar farmacológicamente los subtipos de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ , dopaminérgicos D<sub>2</sub>-like y los receptores histaminérgicos H<sub>3</sub> y H<sub>4</sub> involucrados en la inhibición del tono simpático cardioacelerador en un modelo experimental de diabetes inducida por STZ.

#### 5.2 Objetivos particulares

*Investigar en ratas diabéticas descerebradas y desmeduladas el efecto de la administración de bolos i.v. de los siguientes antagonistas (o sus respectivos vehículos) sobre las respuestas cardioaceleradoras inducidas por estimulación eléctrica simpática:*

- 5.2.1 BRL44408 (adrenérgico  $\alpha_{2A}$ ), imiloxan (adrenérgico  $\alpha_{2B}$ ) o JP-1302 (adrenérgico  $\alpha_{2C}$ ) en ratas con una infusión i.v. continua de B-HT 933 o del vehículo correspondiente.
- 5.2.2 L-741,626 (dopaminérgico D<sub>2</sub>), SB-277011-A (dopaminérgico D<sub>3</sub>) o L-745,870 (dopaminérgico D<sub>4</sub>) en ratas con una infusión i.v. continua de quinpirol o del vehículo correspondiente.
- 5.2.3 Tioperamida (histaminérgico H<sub>3</sub>) o JNJ7777120 (histaminérgico H<sub>4</sub>) en ratas con una infusión i.v. continua de immepip o del vehículo correspondiente.

## CAPÍTULO 6

### DISEÑO EXPERIMENTAL

#### 6.1 Animales

Se utilizó un total de 205 ratas macho de la cepa Wistar con un peso entre 250-300 g. Los animales se mantuvieron con alimento y agua *ad libitum* en una habitación con una temperatura de  $22 \pm 2$  °C, una humedad relativa del 50% y un ciclo de luz obscuridad de 12:12 horas.

Todos los procedimientos y los protocolos experimentales de la presente investigación se realizaron de acuerdo a lo establecido por el Comité de Ética Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Cinvestav-IPN (CICUAL-Cinvestav, No. de Protocolo: 0139-15) y siguiendo lo establecido por la Norma Oficial Mexicana para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

#### 6.2 Procedimiento General

La cantidad inicial de animales se dividió en dos principales sets: (i) set 1 (n=155); y (ii) set 2 (n=50). En el set 1, los animales se indujeron a diabetes mediante una administración de STZ (50 mg/kg; i.p.) la cual se disolvió en solución amortiguadora con citratos (pH=4.5). En el set 2 (grupo control de ratas normoglicémicas), los animales se trataron con una administración del vehículo (solución amortiguadora con citratos, 1 ml/kg). Para ambos sets, se esperó un período de 4 semanas de evolución. El peso corporal así como las concentraciones de glucosa, se determinaron antes y hasta 4 semanas después de la administración de STZ o del vehículo. Para el set 1, solamente se consideraron animales diabéticos aquellos que presentaron niveles de glucosa >300 mg/dl. Para ambos sets: (i) los niveles de glucosa se determinaron mediante el uso de un glucómetro Accu-check y tiras reactivas



de la misma marca; y (ii) el peso corporal se determinó con el uso de una balanza granataria.

Después de las 4 semanas de la administración de STZ o vehículo, todos los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (60 mg/kg, i.p.). Una vez que los animales se encontraron bajo los efectos del anestésico, se realizó una traqueostomía insertando una cánula de polietileno en la tráquea del animal con la finalidad de asistir con respiración artificial a los animales a través de una bomba de respiración Ugo Basile modelo 7025 (velocidad de 56 ciclos/minuto) (Kleinman y Radford, 1964). Finalizando la operación, se realizó la descerebración y desmedulación, la cual consistió en la inserción de un estilete de acero inoxidable a través de la órbita ocular y el *foramen magnum*, hasta el foramen vertebral (Shiple y Tilden, 1947). El estilete fue reemplazado por un electrodo de estimulación, esmaltado excepto por 1 cm localizado a 7 cm de la punta, de tal manera que el segmento no esmaltado se localizara a nivel de las vértebras C<sub>7</sub>-T<sub>1</sub>, para estimular selectivamente el tono simpático cardioacelerador y no alterar de manera significativa la presión arterial sistémica (Gillespie y Miur, 1967; Villalón et al., 1999).

Posteriormente, se realizó una vagotomía bilateral a nivel cervical y se colocaron catéteres de polietileno en: (i) venas femorales izquierda y derecha para la infusión de agonistas y la administración de antagonistas, respectivamente; y (ii) arteria carótida izquierda para el registro de la presión arterial y frecuencia cardíaca mediante un transductor de presión Grass (P23XL); ambas se registraron simultáneamente mediante el uso de un tacógrafo (7P4F, Grass Instruments Co., Quincy, MA, U.S.A). La temperatura corporal de los animales se mantuvo a 37 °C mediante una lámpara de tungsteno, y se monitoreó con un termómetro rectal.

Previo a la estimulación eléctrica, los animales se pretrataron con: (i) galamina (25 mg/kg, i.v.) con la finalidad de prevenir los espasmos musculares producidos por la estimulación de las fibras motoras; y (ii) desipramina (50 µg/kg; un inhibidor de la recaptura de noradrenalina). Bajo





estas condiciones, las respuestas simpato-inhedoras producidas por un agonista dado son particularmente más pronunciadas a bajas frecuencias de estimulación (Villalón et al., 1999). La estimulación eléctrica se realizó aplicando trenes de descarga monofásicos de 10 segundos, pulsos rectangulares de 2 milisegundos a 50 V, y con frecuencias de estimulación crecientes de 0.03, 0.1, 0.3, 1 y 3 Hz.

### 6.3 Protocolos Experimentales

Para evaluar el efecto simpato-inhedorio de cada agonista, así como el papel de los (sub)tipos de receptores involucrados, ambos sets de animales se dividieron en 9 grupos con sus respectivos subgrupos (n= 5 cada uno), como se describe a continuación:

#### 6.3.1 *Efecto de una infusión i.v. continua de vehículo o B-HT 933 sobre las respuestas cardioaceleradoras inducidas por estimulación eléctrica simpática o bolos i.v. de noradrenalina.*

Grupo 1. Un total de 20 ratas (n=10 ratas diabéticas; n=10 ratas normoglicémicas) fue dividido en 2 subgrupos respectivamente (n=5) para determinar las respuestas cardioaceleradoras inducidas por estimulación eléctrica, en presencia de infusiones i.v. continuas de: (i) solución salina (0.02 ml/min); y (ii) B-HT 933 (30 y 100 µg/kg.min).

Grupo 2. Conformado por 20 ratas (n=10 ratas diabéticas; n=10 ratas normoglicémicas), se dividió en 2 subgrupos respectivamente (n=5), los cuales recibieron bolos i.v. de noradrenalina a las dosis de 0.03, 0.1, 0.3, 1 y 3 µg/kg, en presencia de una infusión i.v. continua de: (i) solución salina (0.02 ml/min); y (ii) B-HT 933 (100 µg/kg.min).



*6.3.2 Efecto per se de los vehículos o de los antagonistas BRL44408; imiloxan o JP-1302 sobre las respuestas cardioaceleradoras inducidas por estimulación eléctrica simpática en animales diabéticos*

Grupo 3. Este grupo (n=25 diabéticas) se dividió en 5 subgrupos (n=5 cada uno), a los cuales se les administró respectivamente bolos i.v. de: (i) solución salina (1ml/kg); (ii) DMSO 10% (1 ml/kg); (iii) BRL44408 ( $\alpha_{2A}$ ; 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ); (iv) imiloxan ( $\alpha_{2B}$ ; 10,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ); y (v) JP 1302 ( $\alpha_{2C}$ ; 1,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Diez minutos después de cada administración, se realizó una curva E-R, con la finalidad de analizar el efecto *per se* de cada compuesto sobre las respuestas cardioaceleradoras inducidas por estimulación eléctrica.

*6.3.3 Efecto simpato-inhibitorio producido por una infusión i.v. continua de B-HT 933 en animales diabéticos pretratados con los antagonistas BRL44408; imiloxan o JP-1302*

Grupo 4. Conformado por 25 animales, este grupo se dividió en 5 subgrupos (n=5 cada uno) para determinar las respuestas cardioaceleradoras inducidas por estimulación eléctrica durante una infusión continua de B-HT 933, en animales diabéticos pretratados con bolos i.v. de: (i) solución salina (1ml/kg); (ii) DMSO 10% (1 ml/kg); (iii) BRL44408 ( $\alpha_{2A}$ ; 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ); (iv) imiloxan ( $\alpha_{2B}$ ; 10,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ); y (v) JP-1302 ( $\alpha_{2C}$  1,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Diez minutos después de cada administración, cada subgrupo recibió una infusión i.v. continua de 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  B HT 933, y diez minutos después se realizó una curva E-R como se mencionó anteriormente.

*6.3.4 Efecto de una infusión i.v. continua de vehículo o quinpirol sobre las respuestas cardioaceleradoras inducidas por estimulación eléctrica simpática o bolos i.v. de noradrenalina.*

Grupo 5. La cantidad inicial de ratas (n=20) se dividió en dos grupos (n=10 ratas diabéticas; n=10 ratas normoglicémicas). De cada grupo se obtuvieron dos subgrupos respectivamente (n=5) y se determinaron las respuestas



cardioaceleradoras inducidas por estimulación eléctrica, en presencia de infusiones i.v. continuas de: (i) solución salina (0.02 ml/min); y (ii) quinpirol (3 y 10  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ ).

Grupo 6. Conformado por 20 ratas (n=10 ratas diabéticas; n=10 ratas normoglicémicas), se dividió en 2 subgrupos respectivamente (n=5), los cuales recibieron bolos i.v. de noradrenalina a las dosis de 0.03, 0.1, 0.3, 1 y 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , en presencia de una infusión i.v. continua de: (i) solución salina (0.02 ml/min); y (ii) quinpirol (10  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ ).

*6.3.5 Efecto per se de los vehículos o de los antagonistas L-741,626; SB-277011-A; o L-745,870 sobre las respuestas cardioaceleradoras inducidas por estimulación eléctrica simpática en animales diabéticos*

Grupo 7. Este grupo (n=25 diabéticas) se dividió en 5 subgrupos (n=5 cada uno), a los cuales se les administró respectivamente bolos i.v. de: (i) agua bidestilada (1 ml/kg); (ii) DMSO 0.5% (1 ml/kg); (iii) L-741,626 (D<sub>2</sub>; 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ); (iv) SB-277011-A (D<sub>3</sub>; 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ); y (v) L-745,870 (D<sub>4</sub>; 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Diez minutos después de cada administración, se realizó una curva E-R, con la finalidad de analizar el efecto *per se* de cada compuesto sobre las respuestas cardioaceleradoras inducidas por estimulación eléctrica.

*6.3.6 Efecto simpato-inhibitorio producido por una infusión i.v. continua de quinpirol en animales diabéticos pretratados con los antagonistas L-741,626; SB-277011-A; o L-745,870*

Grupo 8. Este grupo (n=25) se dividió en 5 subgrupos (n=5 cada uno), para determinar las respuestas cardioaceleradoras inducidas por estimulación eléctrica durante una infusión i.v. continua de quinpirol, en animales diabéticos pretratados con bolos i.v. de: (i) agua bidestilada (1 ml/kg); (ii) DMSO 0.5% (1 ml/kg); (iii) L-741,626 (D<sub>2</sub>; 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ); (iv) SB-277011-A (D<sub>3</sub>; 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ); y (v) L-745,870 (D<sub>4</sub>; 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Diez minutos después de la administración de cada antagonista, cada subgrupo recibió una infusión i.v. continua de quinpirol

(10 µg/kg.min) y, diez minutos después se realizó una curva E-R como se mencionó anteriormente.

### 6.3.7 Efecto de una infusión i.v. continua de vehículo o immepip sobre las respuestas cardioaceleradoras inducidas por estimulación eléctrica simpática

Grupo 9. La cantidad inicial de ratas (n=25) se dividió en dos grupos (n=15 ratas diabéticas; n=10 ratas normoglicémicas). En ratas diabéticas, se determinaron las respuestas cardioaceleradoras inducidas por estimulación eléctrica, en presencia de infusiones i.v. continuas de: (i) solución salina (0.02 ml/min); (ii) immepip (3 y 10 µg/kg.min); e (iii) immepip (30 y 100 µg/kg.min). En ratas normoglicémicas, se determinaron las respuestas cardioaceleradoras inducidas por estimulación eléctrica, en presencia de infusiones i.v. continuas de: (i) solución salina (0.02 ml/min); e (ii) immepip (3 y 10 µg/kg.min) (n=5 cada subgrupo).

## 6.4 Compuestos utilizados

Además del anestésico (pentobarbital sódico), los compuestos utilizados en este trabajo (obtenidos de las compañías indicadas) fueron los siguientes: estreptozotocina, ácido cítrico, citrato de sodio, triyodo de galamina, clorhidrato de desipramina, clorhidrato de (±)-noradrenalina, quinpirol (dihidrocloridrato de quinpirol), L-741,626 ((±)-3-[4-(4-clorofenil)-4-hidroxipeperidinil]metilindol), SB-277011-A (dihidroclorato de N-[trans-4-[2-(6-ciano-3,4-dihidro-2(1H)-isoquinolinilo)etil]ciclohexil]-4-quinolinacarboxamida, L-745,870 (hidroclorato de 3-[[4-(4-clorofenil)piperazin-1-il]metil]-1H-pirrol[2,3-b]piridina, BRL44408 (maleato de 2-[2H-(1-metil-1,3-dihidroisoindol)metil]-4,5-dihidroimidazol), imiloxan (hidroclorato de (2-[(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-2il)metil]-1-etil-1H-imidazol), immepip (dihidrobromuro de 4-(1H-imidazol-4-ilmetil)piperidina) (obtenidos de Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), B-HT 933 (dihidroclorato de 6-etil-5,6,7,8-tetrahidro-4H-oxazolo[4,5-d]azepin-2-amino) (obtenido de Tocris Cookson Inc., Ellisville, MO, USA) y JP-1302 (clorhidrato



de acridin-9-il-[4-(4-metilpiperazina-1-il)-fenilamina]) (cortesía de Orion Corporation ORION PHARMA, Turku, Finlandia)

Todos los compuestos fueron disueltos en solución salina, excepto: (i) estreptozotocina, la cual se disolvió en solución amortiguadora con citratos (0.1 M, pH=4.5); (ii) L-741,626 disuelto en DMSO 0.5%; (iii) SB-277011-A y L-745,870 disueltos en agua bidestilada; y (iv) BRL44408 disuelto en DMSO 0.5%.

Las dosis mencionadas en el texto se refieren a la base libre de las sustancias, excepto en el caso de galamina, desipramina, noradrenalina y B-HT 933, los cuales hacen referencia a sus respectivas sales.

## 6.5 Análisis estadístico

Todos los datos en el texto y las figuras son presentados como la media  $\pm$  el error estándar de la media. Inicialmente, la diferencia entre los valores del peso corporal y las concentraciones de glucosa antes y después del tratamiento con vehículo o STZ se evaluó utilizando la prueba U de Mann-Whitney. Se determinaron los cambios máximos de la frecuencia cardiaca producidos por estimulación eléctrica simpática o por la administración de bolos i.v. de noradrenalina después de la administración de agonistas o antagonistas. La diferencia en los valores basales de presión arterial diastólica y frecuencia cardiaca dentro de un subgrupo de animales, antes y después de las infusiones i.v. continuas de los agonistas o de los bolos i.v. de los antagonista o noradrenalina se evaluó mediante la prueba t-Student pareada.

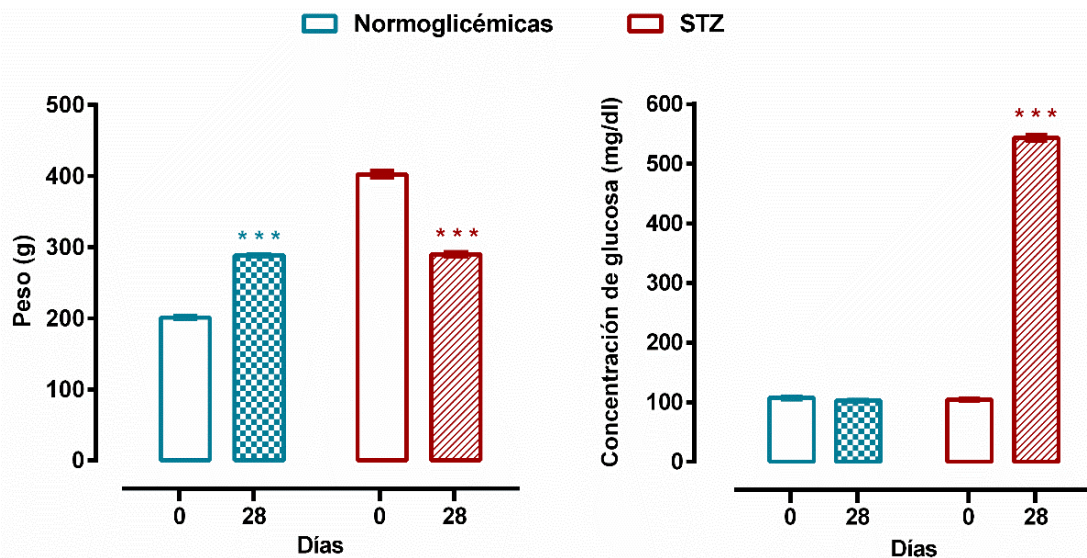
Además, las diferencias entre los cambios en la frecuencia cardiaca dentro de un subgrupo de animales se evaluaron mediante un ANOVA de dos vías de medidas repetidas seguido de la prueba post hoc Student-Newman-Keuls (Steel y Torrie, 1980). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando  $P < 0.05$ .

## CAPÍTULO 7

### RESULTADOS

#### 7.1 Efecto de la estreptozotocina o vehículo

Los valores de glucosa en sangre (mg/dl) y peso corporal (g) de los animales antes y después de las 4 semanas de la administración de STZ fueron estadísticamente significativos ( $P < 0.001$ ): (i)  $402 \pm 5$  g antes y  $290 \pm 3$  g después de la administración de STZ; y (ii)  $104 \pm 1$  mg/dl antes y  $543 \pm 5$  mg/dl después de la administración de STZ. En cuanto a los animales a los que se les administró el vehículo de la STZ (buffer citrato de sodio), se observa diferencia significativa ( $P < 0.01$ ) sólo en el peso corporal ( $200 \pm 2$  g antes y  $288 \pm 2$  g después de la administración del vehículo), pero no en las concentraciones de glucosa ( $107 \pm 3$  mg/dl antes y  $102 \pm 3$  mg/dl después de la administración del vehículo) (Figura 6).



**Figura 6. Efecto de la estreptozotocina o vehículo.** Cambios en el peso corporal y en la concentración de glucosa antes y después de la administración de solución amortiguadora con citratos (vehículo) o STZ respectivamente. \*\*\* $P < 0.001$  vs día cero.



## 7.2 Variables hemodinámicas

Los valores basales de presión arterial diastólica y frecuencia cardiaca en las ratas normoglicémicas (n=50) fueron  $48 \pm 5$  mmHg y  $257 \pm 5$  latidos/min, respectivamente; mientras que en ratas diabéticas (n=155), estos valores fueron  $52 \pm 1$  mmHg y  $227 \pm 4$  latidos/min ( $P < 0.05$ ), respectivamente. En ambos grupos, estas variables hemodinámicas no se modificaron significativamente ( $P > 0.05$ ) después de la administración de galamina o desipramina (administrados en bolos i.v.). Por otro lado, la administración de: (i) los agonistas B-HT 933 (adrenérgico  $\alpha_2$ ), quinpirol (dopaminérgico D<sub>2</sub>-like) e immapip (histaminérgico H<sub>3</sub>/H<sub>4</sub>); (ii) los vehículos solución salina, agua bidestilada, DMSO 0.5%, DMSO 10%; o (iii) los antagonistas BRL 44408 ( $\alpha_{2A}$ ) imiloxan ( $\alpha_{2B}$ ), JP-1302 ( $\alpha_{2C}$ ), L-741,626 (D<sub>2</sub>), SB-277011-A (D<sub>3</sub>) o L-745,870 (D<sub>4</sub>); no modificaron significativamente los valores basales de presión arterial diastólica y frecuencia cardiaca ( $P > 0.05$ , datos no mostrados).

## 7.3 Efecto de salina o B-HT 933 sobre las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica simpática o por bolos i.v. de noradrenalina en ratas normoglicémicas y diabéticas

La figura 7 muestra las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica o por bolos i.v. de noradrenalina antes (control) y durante infusiones i.v. continuas de: (i) solución salina (0.02 ml/min); o (ii) B-HT 933 (30 y 100  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ , para las curvas E-R, o 100  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$  para las curvas D-R); en ratas normoglicémicas (paneles superiores) y diabéticas (paneles inferiores). En ambos grupos de animales, la estimulación eléctrica preganglionar selectiva (C<sub>7</sub>-T<sub>1</sub>, Figura 7A, B, E, F) o la administración de bolos i.v. de noradrenalina (0.03-3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , Figure 7C, D, G, H) produjeron incrementos frecuencia- y dosis-dependiente en la frecuencia cardiaca. En este sentido, tanto en ratas normoglicémicas como en diabéticas, las infusiones continuas de solución salina, no produjeron cambios ( $P > 0.05$ ) en las respuestas taquicárdicas que recibieron infusión continua de solución salina, las

respuestas taquicárdicas producidas por estimulación eléctrica (Figura 7A, E) o las producidas por bolos i.v. de noradrenalina (Figura 7C, G).

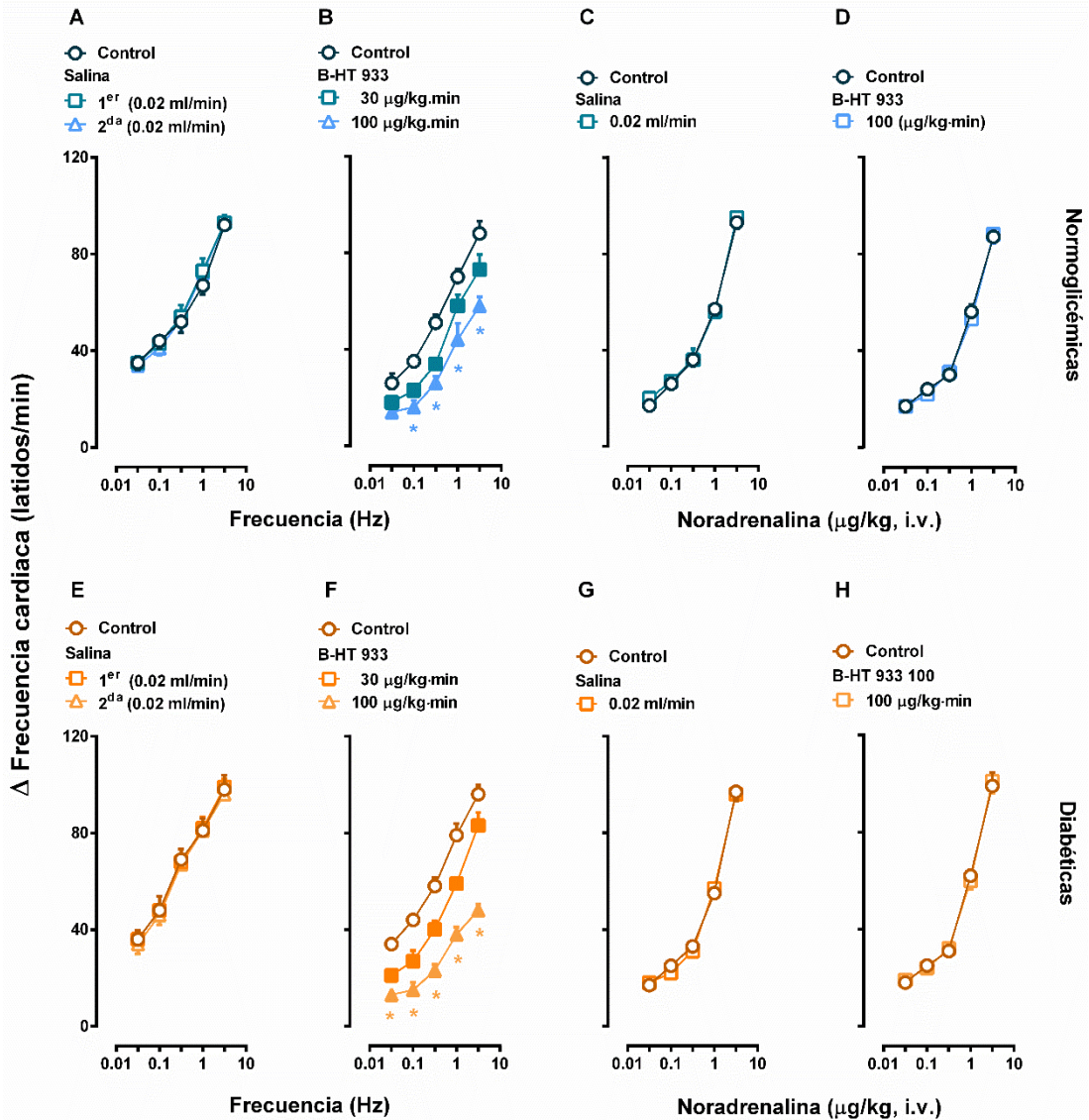
En marcado contraste, en animales normoglicémicos y diabéticos que recibieron infusiones continuas de B-HT 933, las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica simpática fueron inhibidas de manera dependientes de la frecuencia y la dosis (Figura 7B, F), siendo la dosis de 100  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$  la que produjo el mayor efecto ( $P<0.05$ ), mientras que las respuestas taquicárdicas inducidas por bolos i.v. de noradrenalina permanecieron sin cambios (Figura 7D, H). Es importante destacar que el efecto simpato-inhibitorio cardiaco producido por 100  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$  de B-HT 933 fue mayor en ratas diabéticas en comparación con ratas normoglicémicas (ver Tabla No. 1). Por otro lado, debido a que la dosis de 100  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$  de B-HT 933 produce mayor inhibición que la dosis de 30  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$  en ratas diabéticas y normoglicémicas ( $P<0.05$ ), se eligió la dosis de 100  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$  para el resto de los experimentos

**Tabla 1.** Simpato-inhibición cardiaca producida por B-HT 933 en ratas normoglicémicas y diabéticas

	Frecuencias de estimulación (Hz)				
	0.03	0.1	0.3	1	3
	Porcentaje de inhibición (%)				
Normoglicémicas	41 $\pm$ 13	53 $\pm$ 9	49 $\pm$ 5	37 $\pm$ 9	34 $\pm$ 4
Diabéticas	62 $\pm$ 5	66 $\pm$ 7	59 $\pm$ 7	52 $\pm$ 2	52 $\pm$ 2*

Porcentaje de inhibición producido por B-HT 933 (100  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ ) sobre las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica simpática a diferentes frecuencias de estimulación (0.03-3 Hz) en ratas normoglicémicas y diabéticas. \* $P<0.05$  versus ratas normoglicémicas.

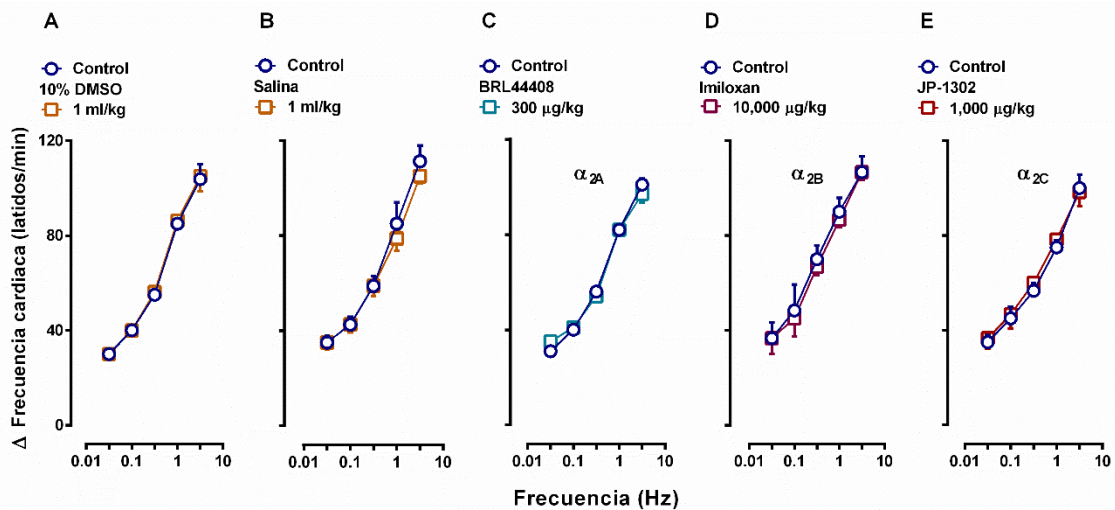




**Figura 7. Efecto del B-HT 933 o vehículo sobre las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica simpática o por bolos i.v. de noradrenalina.** Incrementos en la frecuencia cardiaca inducidos por estimulación eléctrica simpática (A, B, E, F) o por bolos i.v. de noradrenalina (C, D, G, H) en ratas normoglicémicas (panel superior) y diabéticas (panel inferior) antes (control) y durante infusiones i.v. continuas de: (A, C, E, G) solución salina; o (B, D, F, H) B-HT 933 (n=5 para cada subgrupo). Los símbolos sólidos (■,▲,■,▲) indican diferencia significativa vs control (P<0.05). \*P<0.05 vs 30 μg/kg.min de B-HT 933.

#### 7.4 Efecto *per se* de los vehículos o antagonistas de los subtipos de receptores adrenérgicos $\alpha_{2A}$ , $\alpha_{2B}$ o $\alpha_{2C}$ sobre las respuestas taquicárdicas producidas por estimulación eléctrica simpática en ratas diabéticas

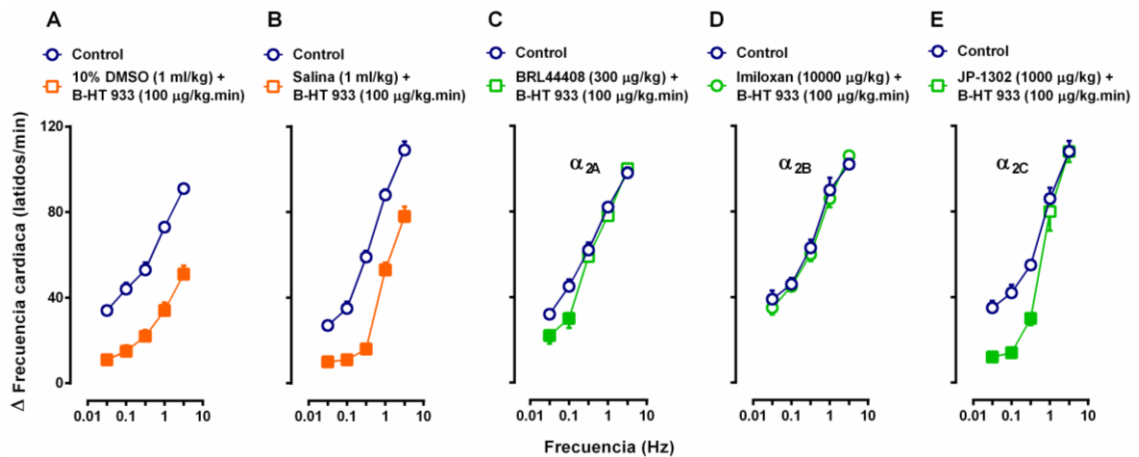
La figura 8 muestra las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica antes y después del tratamiento i.v. con DMSO 10% (1 ml/kg), solución salina (1 ml/kg), BRL44408 (300  $\mu$ g/kg), imiloxan (10,000  $\mu$ g/kg) o JP-1302 (1,000  $\mu$ g/kg). Dichas respuestas taquicárdicas permanecieron sin cambios significativos ( $P > 0.05$ ) después de la administración de DMSO 10% (Figura 8A), solución salina (Figura 8B), BRL44408 (Figura 8C), imiloxan (Figura 8D) o JP-1302 (Figura 8E).



**Figura 8. Efecto *per se* de los vehículos o antagonistas adrenérgicos  $\alpha_2$  sobre las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica simpática.** Efecto *per se* de bolos i.v. de: (A) DMSO 10% (1 ml/kg); (B) solución salina (1 ml/kg); (C) BRL44408 (300  $\mu$ g/kg); (D) imiloxan (10,000  $\mu$ g/kg); o (E) JP-1302 (1,000  $\mu$ g/kg) ( $n=5$ ) sobre los incrementos de la frecuencia cardiaca producidos por estimulación del tono simpático cardiaco en ratas diabéticas.  $P > 0.05$  en todos los casos.

## 7.5 Efecto de los vehículos o antagonistas de los subtipos de receptores adrenérgicos $\alpha_2$ sobre la simpato-inhibición cardiaca producida por B-HT 933 en ratas diabéticas

La figura 9 muestra las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica simpática antes (control) y después del tratamiento i.v. con DMSO 10% (1 ml/kg), solución salina (1 ml/kg), BRL44408 (300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ); imiloxan (10,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) o JP-1302 (1,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) seguido por una infusión continua de B-HT 933 (100  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ ). La inhibición inducida por B-HT 933: (i) permaneció sin cambios después de la administración de DMSO 10% (Figura 9A) o solución salina (Figura 9B); (ii) parcialmente bloqueada por 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de BRL44408 (Figura 9C) y 1,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de JP-1302 (Figura 9E); y (iii) abolida después de 10,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de imiloxan (Figura 9D).

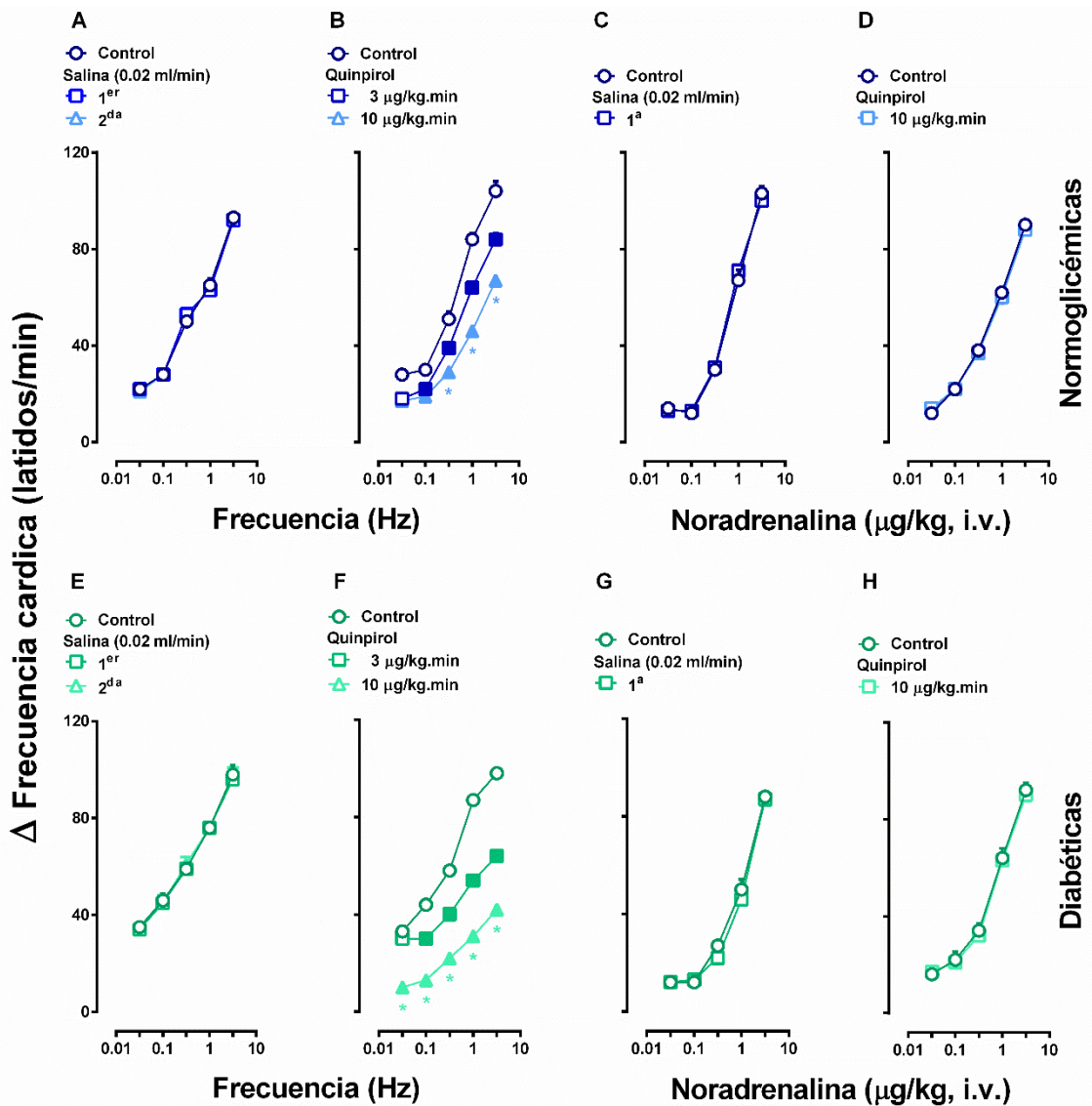


**Figura 9. Papel de los subtipos de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  sobre la simpato-inhibición producida por 100  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$  de B-HT 933 en ratas diabéticas.** Efecto del tratamiento con bolos i.v. de: (A) DMSO 10% (1 ml/kg); (B) solución salina (1 ml/kg); (C) BRL44408 (300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ); (D) imiloxan (10,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ); o (E) JP-1302 (1,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ( $n=5$  para cada subgrupo) sobre la simpato-inhibición de las respuestas taquicárdicas producidas por B-HT 933 (100  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ ) en ratas diabéticas. Los símbolos sólidos (■, ■) indican diferencia significativa vs control ( $P < 0.05$ ).

## **7.6 Efecto de salina o quinpirol sobre las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica simpática o por bolos i.v. de noradrenalina en ratas normoglicémicas y diabéticas**

La figura 10 muestra las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica (A, B, E, F) o por bolos i.v. de noradrenalina (C, D, G, H) antes (control) y durante infusiones i.v. continuas de: (i) solución salina (0.02 ml/min); o (ii) quinpirol (3 y 10  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ , para las curvas E-R, o 10  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$  para las curvas D-R); en ratas normoglicémicas (paneles superiores) y diabéticas (paneles inferiores). Tanto en ratas normoglicémicas como en diabéticas que recibieron infusión continua de solución salina, las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica (Figura 10A, E) así como las inducidas por bolos i.v. de noradrenalina (Figura 10C, G) permanecieron sin cambios ( $P>0.05$ ). Por otra parte, en animales normoglicémicos y diabéticos que recibieron infusiones i.v. continuas de quinpirol, las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica simpática fueron inhibidas de manera dependiente de la frecuencia y la dosis (Figura 10B, F), siendo la dosis de 10  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$  la que produjo el mayor efecto ( $P<0.05$ ), mientras que las respuestas taquicárdicas inducidas por bolos i.v. de noradrenalina permanecieron sin cambios (Figura 10D, H).

Es importante destacar, que el efecto simpato-inhibitorio cardíaco producido por 10  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$  de quinpirol fue mayor en ratas diabéticas en comparación con ratas normoglicémicas (ver Tabla No. 2). Además, debido a que la dosis de 10  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$  de quinpirol produjo mayor inhibición que la dosis de 3  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$  en ratas diabéticas y normoglicémicas ( $P<0.05$ ), se eligió la dosis de 10  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$  para el resto de los experimentos.



**Figura 10.** Efecto del quinpirol o vehículo sobre las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica simpática o por bolos i.v. de noradrenalina. Incrementos en la frecuencia cardíaca inducidos por estimulación eléctrica simpática (A, B, E, F) o por bolos i.v. de noradrenalina (C, D, G, H) en ratas normoglicémicas (panel superior) y diabéticas (panel inferior) antes (control) y durante infusiones i.v. continuas de: (A, C, E, G) solución salina; o (B, D, F, H) quinpirol (n=5 para cada subgrupo). Los símbolos sólidos (■, ▲, ■, ▲) indican diferencia significativa vs control (P<0.05); \*P<0.05 vs 10 μg/kg.min de quinpirol.

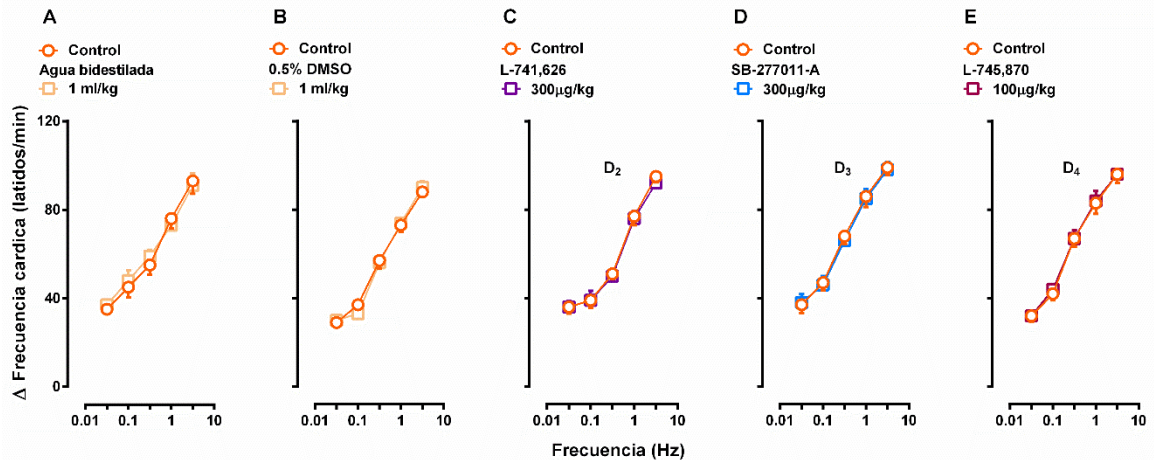
**Tabla 2.** Simpato-inhibición cardica producida por quimpirol en ratas normoglicémicas y diabéticas

	Frecuencias de estimulación (Hz)				
	0.03	0.1	0.3	1	3
	Porcentaje de inhibición (%)				
Normoglicémicas	39 ± 7	37 ± 3	43 ± 3	45 ± 4	35 ± 3
Diabéticas	70 ± 1*	70 ± 4*	62 ± 2*	64 ± 2*	57 ± 2*

Porcentaje de inhibición producido por quinpirol (10 µg/kg.min) sobre las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica simpática a diferentes frecuencias de estimulación (0.03-3 Hz) en ratas normoglicémicas y diabéticas. \*P<0.05 *versus* ratas normoglicémicas.

### 7.7 Efecto *per se* de los vehículos o antagonistas de los subtipos de receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> o D<sub>4</sub> sobre las respuestas taquicárdicas producidas por estimulación eléctrica simpática en ratas diabéticas

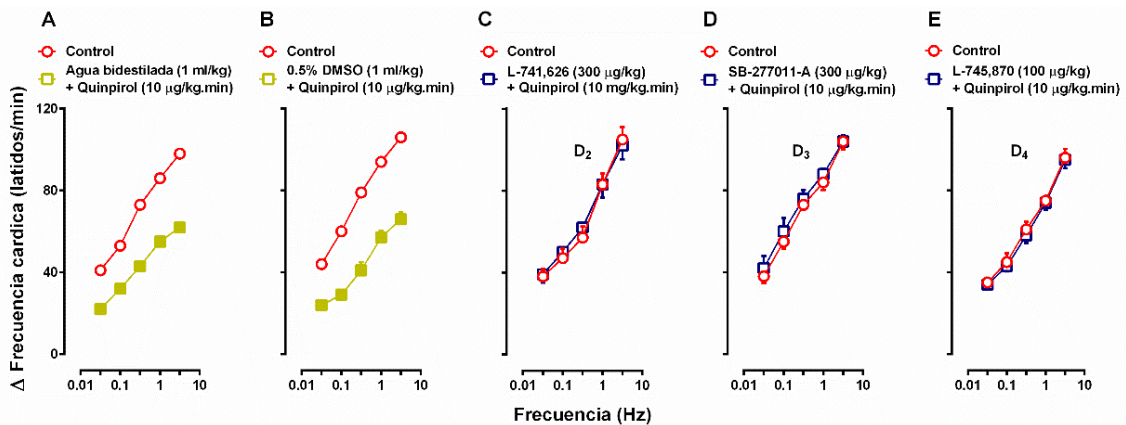
La figura 11 muestra las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica antes y después del tratamiento i.v. con agua bidestilada (1 ml/kg), DMSO 0.5% (1 ml/kg), L-741,626 (300 µg/kg), SB-277011-A (300 µg/kg) o L-745,870 (100 µg/kg). Dichas respuestas no se modificaron significativamente (P>0.05) después de la administración de agua bidestilada (Figura 11A), DMSO 0.5% (Figura 11B), L-741,626 (Figura 11C), SB-277011-A (Figura 11D) o L-745,870 (Figura 11E).



**Figura 11. Efecto *per se* de los vehículos o antagonistas dopaminérgicos D<sub>2</sub>-like sobre las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica simpática.** Efecto *per se* de bolos i.v. de: (A) agua bidestilada (1 ml/kg); (B) DMSO 0.5% (1 ml/kg); (C) L-741,626 (300 μg/kg); (D) SB-277011-A (300 μg/kg); o (E) L-745,870 (100 μg/kg) (n=5) sobre los incrementos de la frecuencia cardíaca producidos por estimulación del tono simpático cardíaco en ratas diabéticas. P>0.05 en todos los casos.

### 7.8 Efecto de los vehículos o antagonistas de los subtipos de receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> o D<sub>4</sub> sobre la simpato-inhibición cardíaca producida por quinpirol en ratas diabéticas

La figura 12 muestra las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica simpática antes (control) y después del tratamiento i.v. con agua bidestilada (1 ml/kg), DMSO 0.5% (1 ml/kg), L-741,626 (300 μg/kg); SB-277011-A (300 μg/kg) o L-745,870 (100 μg/kg) seguido por una infusión continua de quinpirol (10 μg/kg.min). La inhibición inducida por quinpirol: (i) permaneció sin cambios después de la administración de agua bidestilada (Figura 12A) o DMSO 0.5% (Figura 12B); (ii) fue abolida por 300 μg/kg del antagonista selectivo D<sub>2</sub>, L-741,626 (Figura 12C), 300 μg/kg de SB-277011-A (antagonista selectivo D<sub>3</sub>, Figura 12D) o 100 μg/kg del antagonista selectivo D<sub>4</sub>, L-741,626 (Figura 12E).



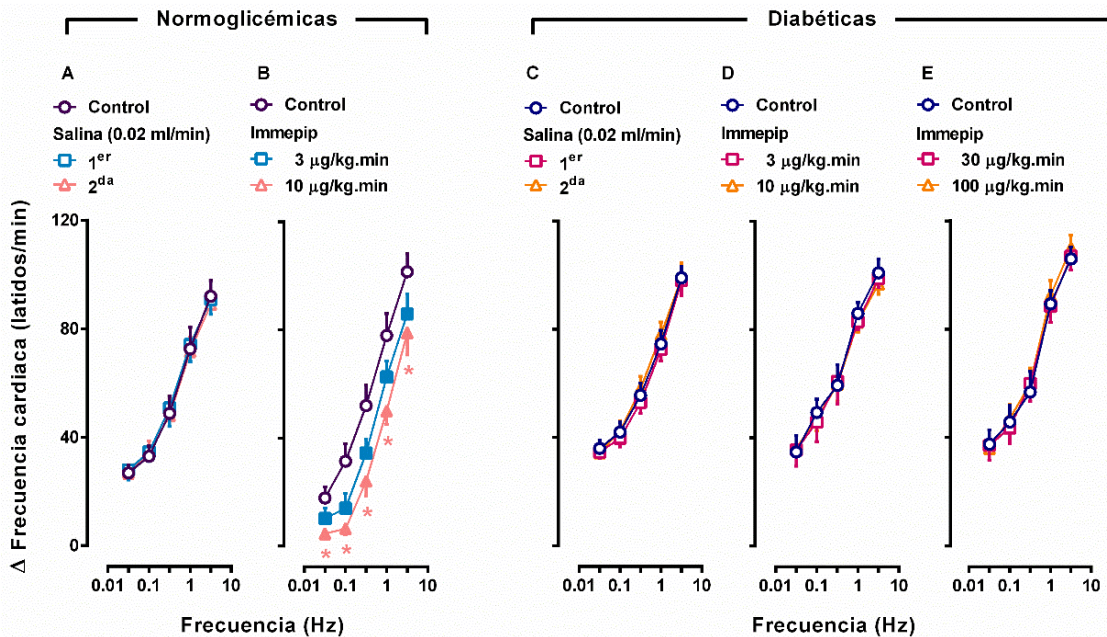
**Figura 12. Papel de los subtipos de receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>-like sobre la simpato-inhibición producida por 10 µg/kg.min de quinpirol en ratas diabéticas.** Efecto del tratamiento con bolos i.v. de: (A) Agua bidestilada (1 ml/kg); (B) DMSO 0.5% (1 ml/kg); (C) L-741,626 (300 µg/kg); (D) SB-277011-A (300 µg/kg); o (E) L-741,870 (100 µg/kg) (n= 5 para cada subgrupo) sobre la simpato-inhibición de las respuestas taquicárdicas producidas por quinpirol (10 µg/kg.min) en ratas diabéticas. Los símbolos sólidos (■) indican diferencia significativa vs control (P<0.05).

### 7.9 Efecto de salina o imnepip sobre las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica simpática en ratas normoglicémicas y diabéticas

La figura 13 muestra las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica antes (control) y durante infusiones i.v. continuas de: (i) solución salina (0.02 ml/min); (ii) imnepip (3 y 10 µg/kg.min) en ratas normoglicémicas y diabéticas; o (iii) imnepip (30 y 100 µg/kg.min) en ratas diabéticas. Tanto en ratas normoglicémicas como en diabéticas que recibieron infusión continua de solución salina, las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica (Figura 13A, C) permanecieron sin cambios (P>0.05). Por otra parte, en animales normoglicémicos que recibieron infusiones i.v. continuas de imnepip, las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica simpática fueron inhibidas de manera dependiente de la frecuencia y la dosis (Figura 13B), siendo la dosis de 10 µg/kg.min la que produjo el mayor efecto



( $P < 0.05$ ). En marcado contraste, en ratas diabéticas, dosis de hasta  $100 \mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$  de immpip no produjeron ningún cambio ( $P > 0.05$ ) en las respuestas taquicárdicas producidas por estimulación eléctrica (Figura 13D, E). En vista de los hallazgos en ratas diabéticas (Figura 13D, E) no se consideró necesario: (i) analizar el efecto de dicho agonista sobre las respuestas taquicárdicas producidas por bolos i.v. de noradrenalina; (ii) utilizar los antagonistas selectivos  $H_3$  y  $H_4$  para analizar su efecto *per se* o el papel de dichos receptores sobre la simpato-inhibición cardiaca.



**Figura 13. Efecto del immpip o vehículo sobre las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica simpática.** Incrementos en la frecuencia cardiaca inducidos por estimulación eléctrica simpática en ratas normoglicémicas (A, B) y diabéticas (C, D, E) antes (control) y durante infusiones i.v. continuas de: (A, C) solución salina; o (B, D, E) immpip ( $n=5$  para cada subgrupo). Los símbolos sólidos ( $\blacksquare, \blacktriangle$ ) indican diferencia significativa vs control ( $P < 0.05$ ). \*  $P < 0.05$  vs  $3 \mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$  de immpip.

## CAPÍTULO 8

### DISCUSIÓN

#### 8.1 General

Con base en las anormalidades autonómicas cardíacas mostradas previamente en ratas pretratadas con STZ (diabéticas) (Gallego et al., 2003; Altamirano-Espinoza et al., 2015), nuestro estudio muestra: (i) alteraciones diferenciales en la simpato-inhibición cardíaca producida por B-HT 933, quinpirol e immepip entre ratas descerebradas y desmeduladas normoglicémicas y pretratadas con STZ (diabéticas); y (ii) cambio en el perfil farmacológico de los subtipos de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  y dopaminérgicos D<sub>2</sub>-like que median la inhibición del tono simpático cardioacelerador. Es decir, en ratas diabéticas: (i) la simpato-inhibición cardíaca producida por el B-HT 933 y el quinpirol es más pronunciada que en ratas normoglicémicas (Figuras 7 y 10 así como Tablas 1 y 2); (ii) el immepip no produjo simpato-inhibición cardíaca (Figura 13D, E), en comparación con ratas normoglicémicas (Figura 13B); y (iii) la simpato-inhibición cardíaca producida por B-HT 933 y quinpirol es mediada por los subtipos de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  (*i.e.*  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  y  $\alpha_{2C}$ ; Figura 9) y dopaminérgicos D<sub>2</sub>-like (*i.e.* D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub>; Figura 12), respectivamente.

Además, las respuestas producidas por los agonistas B-HT 933 y quinpirol fueron consideradas simpato-inhedoras ya que estos compuestos inhibieron las respuestas taquicárdicas producidas por estimulación eléctrica simpática sin afectar las producidas por bolos i.v. de noradrenalina (Figuras 7 y 10), como lo reportado previamente (Cobos-Puc et al., 2007; Altamirano-Espinoza et al., 2013). Interesantemente, el immepip, el cual produce simpato-inhibición cardíaca en ratas normoglicémicas (Pinacho-García et al., 2016) (Figura 13B), no produjo simpato-inhibición en animales diabéticos (Figura 13D, E).

La interpretación de estos hallazgos sugieren que el tono simpático cardioacelerador en ratas diabéticas (comparado con normoglicémicas) involucra la activación diferencial de los subtipos de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  (*i.e.*  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  y  $\alpha_{2C}$ ) y dopaminérgicos D<sub>2</sub>-like (*i.e.* D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub>), así como de los receptores histaminérgicos H<sub>3</sub>/H<sub>4</sub>.

## **8.2 Efecto de la administración de estreptozotocina: correlación con un modelo experimental de diabetes tipo I**

La administración de una sola dosis de STZ (50 mg/kg; i.p.) en ratas, produce incrementos en las concentraciones de glucosa en sangre y pérdida de peso corporal (Hicks et al., 1998; Altamirano-Espinoza et al., 2015). Adicionalmente, en dicho modelo experimental se ha reportado que existe la aparición de algunas características típicas de la diabetes como poliuria, polidipsia y polifagia (Gallego et al., 2003).

En cuanto a los incrementos significativos en las concentraciones de glucosa sanguínea y la pérdida de peso corporal, nuestros resultados son consistentes con lo previamente observado (Figura 6) (Hicks et al., 1998; Altamirano-Espinoza et al., 2015). Por otro lado, en los animales a los que se les administró STZ, se observó un incremento en la ingesta de agua y alimento, así como en la excreción de orina. Sin embargo, en el presente estudio no se hicieron mediciones exactas que pudieran demostrar estas últimas características. A pesar de esto y bajo nuestras condiciones experimentales, podemos sugerir que se mimetizaron dos de las principales características típicas de la DM I: la hiperglucemia crónica y la pérdida de peso corporal (Hicks et al., 1998; Gallego et al., 2003; De Angelis et al., 2009; Altamirano-Espinoza et al., 2015).

## **8.3 Variables hemodinámicas sistémicas**

Debido a que en el presente estudio se utilizaron ratas descerebradas y desmeduladas: (i) la funcionalidad del sistema nervioso central



(e.g. mecanismos compensatorios del reflejo baroreceptor y efectos centrales de los compuestos) es categóricamente excluida; y (ii) los valores basales de frecuencia cardíaca y presión arterial diastólica son más bajos que los determinados en ratas anestesiadas (no descerebradas y desmeduladas), las cuales todavía tienen un tono simpático neurogénico (Centurión et al., 2004).

En este sentido, considerando solamente ratas descerebradas y desmeduladas, los valores de frecuencia cardíaca en ratas diabéticas ( $227 \pm 7$  latidos/minuto) fueron significativamente más bajos ( $P < 0.05$ ) que los obtenidos en ratas normoglicémicas ( $257 \pm 5$  latidos/minuto) (ver sección de Resultados). Estos valores son, de alguna manera, consistentes con los determinados en ratas conscientes (ver Apéndice 1.1), en donde los valores de frecuencia cardíaca al día 0, 7, 14, 21, y 28 después de la administración de STZ fueron, respectivamente,  $411 \pm 8$ ,  $401 \pm 28$ ,  $*360 \pm 8$ ,  $*371 \pm 9$  y  $*366 \pm 7$  latidos/minuto ( $*P < 0.05$ ;  $n=6$ ). Por lo tanto, estos valores indican que después de 14 días de la administración de STZ la funcionalidad cardíaca (en términos de frecuencia cardíaca) se encuentra alterada. Esta disminución en la frecuencia cardíaca, independientemente de las condiciones experimentales (ratas descerebradas y desmeduladas o ratas conscientes), puede estar relacionada con: (i) cambios en las propiedades electrofisiológicas del corazón (Hicks et al., 1998); y/o (ii) alteraciones en la expresión y/o densidad de receptores adrenérgicos  $\beta$  cardíacos durante la diabetes (Dincer et al., 2001; Sellers y Chess-Williams, 2001), considerando que la modulación de la función cardíaca es modulada por receptores adrenérgicos  $\beta$  (Hoffman, 2001).

En contraste, el tono vascular sistémico no se encuentra afectado en animales diabéticos (Hicks et al., 1998; Altamirano-Espinoza et al., 2015). Consistente con estas observaciones, los valores basales de la presión arterial diastólica no fueron significativamente diferentes ( $P > 0.05$ ): (i) en ratas descerebradas y desmeduladas diabéticas ( $52 \pm 1$  mmHg) y normoglicémicas ( $48 \pm 5$  mmHg) (ver sección de Resultados); y (ii) en ratas conscientes ( $93 \pm 8$ ,  $109 \pm 8$ ,  $97 \pm 10$ ,  $102 \pm 9$ ,  $78 \pm 7$  mmHg,  $n=6$ ; al día 0, 7, 14, 21 y 28 después de la administración de STZ; ver Apéndice 1.1). La razón por la cual los valores



basales de presión arterial diastólica, pero no los de frecuencia cardiaca, permanecieron sin cambios en animales diabéticos es desconocida, pero parece ser que los receptores adrenérgicos  $\beta$  cardiacos se encuentran afectados en animales pretratados con STZ (diabéticos) (Atkins et al., 1985).

Adicionalmente, el hecho de que los valores basales de frecuencia cardiaca y presión arterial diastólica permanecieran sin cambios durante las infusiones continuas de B-HT 933, quinpirol e imepip en ratas normoglicémicas y diabéticas implica que estos agonistas: (i) fueron usados a tasas de infusión y dosis apropiadas para investigar las respuestas simpato-inhedoras sin producir efectos cardiovasculares sistémicos; e (ii) interactúan directamente con su respectivo receptor en los nervios simpáticos cardiacos (Cobos-Puc et al., 2007; Altamirano-Espinoza et al., 2013; Pinacho-García et al., 2016). Finalmente, el hecho de que las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica simpática no fueran modificadas durante infusiones continuas del vehículo (solución salina) (Figuras 7A, E; 10A, E; y 13A, C) muestra que: (i) la simpato-inhedoración producida (por B-HT 933, quinpirol o imepip) no se debe a la taquifilaxis; y (ii) estas respuestas son altamente reproducibles bajo nuestras condiciones experimentales.

#### **8.4 Simpato-inhedoración diferencial producida por B-HT 933, quinpirol e imepip en ratas diabéticas descerebradas y desmeduladas: comparación farmacológica con ratas normoglicémicas**

El hecho de que la simpato-inhedoración cardiaca producida por 100  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$  de B-HT 933 (Figura 7F) y 10  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$  de quinpirol (Figura 10F) en ratas diabéticas fuera más pronunciada ( $P < 0.05$ ) que en ratas normoglicémicas (ver Tablas 1 y 2), sin afectar las respuestas taquicárdicas producidas por bolos i.v. de noradrenalina (Figura 7H y Figura 10H), sugiere que bajo condiciones diabéticas existe un papel más predominante de receptores simpato-inhedoros adrenérgicos  $\alpha_2$  y dopaminérgicos  $D_2$ -like. De acuerdo con esta sugerencia, numerosos estudios en modelos experimentales de diabetes

inducida con STZ han demostrado que los sistemas catecolaminérgicos y el papel modulador de sus receptores se encuentran alterados (Figlewicz et al., 1996; Gallego et al., 2003). Por ejemplo, algunos autores han reportado un incremento en la densidad de los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  y dopaminérgicos D<sub>2</sub>-like a nivel central en ratas tratadas con STZ (Lozovsky et al., 1981; Sumiyoshi et al., 1997; Padayatti y Paulose, 1999). Ciertamente, nuestro modelo experimental de la rata descerebrada y desmedulada no proporciona evidencias directas sobre los mecanismos moleculares involucrados en el papel predominante de estos receptores en ratas diabéticas. Sin embargo, algunas posibles hipótesis pueden incluir un incremento en: (i) activación de proteínas G<sub>i/o</sub> y simpato-inhibición cardiaca funcional; (ii) factores dependientes del tejido tales como la densidad de receptores (*i.e.* adrenérgicos  $\alpha_2$  y dopaminérgicos D<sub>2</sub>-like) y la eficacia en el acoplamiento); y/o factores dependientes del fármaco tales como la afinidad de la noradrenalina y dopamina (como ligandos endógenos) y sus agonistas relacionados (*i.e.* B-HT 933 y quinpirol) para cada uno de estos receptores. Ciertamente, se requiere de experimentos adicionales para explorar estas hipótesis, los cuales están fuera del alcance del presente estudio.

Sorprendentemente, cuando exploramos la acción simpato-inhibitoria cardiaca del imepip (un agonista de los receptores histaminérgicos H<sub>3</sub>/H<sub>4</sub>) en ratas diabéticas descerebradas y desmeduladas (comparada con ratas normoglicémicas), encontramos que incluso a dosis 1 unidad logarítmica mayor (Figura 13D, E) que en ratas normoglicémicas (Figura 13B) no se produjo simpato-inhibición cardiaca. De hecho, 3 y 10  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$  de imepip son dosis suficientemente altas para interactuar con receptores H<sub>3</sub> preunionales (pero no H<sub>4</sub>) que modulan respuestas cardiovasculares en ratas normoglicémicas descerebradas y desmeduladas (Manrique-Maldonado et al., 2015; Pinacho-García et al., 2016).

Por lo tanto, nuestros hallazgos sugieren que, a diferencia de lo que ocurre en ratas normoglicémicas (Pinacho-García et al., 2016), los receptores histaminérgicos H<sub>3</sub>/H<sub>4</sub> no tienen un papel simpato-inhibitorio cardiaco en ratas

diabéticas. Sin embargo, es notable que los receptores histaminérgicos H<sub>3</sub> y H<sub>4</sub> se encuentran sobre-expresados en riñones de ratas diabéticas (Rosa et al., 2013; Pini et al., 2015) muy probablemente como un mecanismo compensatorio para la NAC producida en individuos diabéticos (Vinik et al., 2003).

### **8.5 Análisis del efecto *per se* de los antagonistas utilizados sobre el tono simpático cardioacelerador en ratas diabéticas**

Con el propósito de identificar farmacológicamente el perfil de los subtipos de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  y dopaminérgicos D<sub>2</sub>-like involucrados en la inhibición del tono simpático cardioacelerador, se utilizaron como herramientas farmacológicas los antagonistas BRL44408 ( $\alpha_{2A}$ ), imiloxan ( $\alpha_{2B}$ ), JP-1302 ( $\alpha_{2C}$ ), L-741,626 (D<sub>2</sub>); SB-277011-A (D<sub>3</sub>) o L-745,870 (D<sub>4</sub>). Debido a que el B-HT 933 (agonista adrenérgico  $\alpha_2$ ) y el quinpirol (agonista dopaminérgico D<sub>2</sub>-like) fueron elegidos para producir simpato-inhibición cardiaca bajo nuestras condiciones experimentales, el bloqueo de dicho efecto por alguno de los antagonistas antes mencionados puede involucrar el bloqueo del subtipo de receptor correspondiente. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de un efecto *per se* sobre las respuestas taquicárdicas producidas por estimulación eléctrica simpática debido a interacciones postunionales.

Por lo tanto, consideramos una condición *sine qua non* investigar el efecto *per se* de la administración i.v. de los antagonistas antes mencionados (así como de los vehículos correspondientes) sobre las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica simpática en ratas diabéticas.

En este sentido, la administración i.v de los antagonistas BRL44408 ( $\alpha_{2A}$ , Figura 8C); imiloxan ( $\alpha_{2B}$ , Figura 8D); JP-1302 ( $\alpha_{2C}$ , Figura 8E); L-741,626 (D<sub>2</sub>, Figura 11C); SB-277011-A (D<sub>3</sub>, Figura 11D) o L-745,870 (D<sub>4</sub>, Figura 11E) o sus respectivos vehículos (Figura 8A, B y Figura 11A, B) no modificó ( $P>0.05$ ) las respuestas taquicárdicas producidas por estimulación eléctrica

simpática. Cabe mencionar que las dosis utilizadas de dichos antagonistas son lo suficientemente altas para bloquear a sus respectivos receptores (Cobos-Puc et al., 2007; Altamirano-Espinoza et al., 2015; Pinacho-García et al., 2016) y, de hecho, las mismas dosis fueron usadas para bloquear la simpato-inhibición producida por los agonistas B-HT 933 y quinpirol.

### **8.6 Participación de los subtipos de receptores adrenérgicos $\alpha_2$ en la simpato-inhibición cardíaca producida por el B-HT 933 en ratas diabéticas: comparación farmacológica con ratas normoglicémicas**

Para la identificación farmacológica de los subtipos de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  (*i.e.*  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  y  $\alpha_{2C}$ ), utilizamos los antagonistas selectivos BRL44408 ( $\alpha_{2A}$ ); imiloxan ( $\alpha_{2B}$ ) o JP-1302 ( $\alpha_{2C}$ ) a dosis suficientemente altas para bloquear los receptores  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  o  $\alpha_{2C}$  simpato-inhibitorios (Cobos-Puc et al., 2007; Altamirano-Espinoza et al., 2015). Desde que la simpato-inhibición cardíaca producida por 100  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$  de B-HT 933 fue: (i) parcialmente bloqueada por 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de BRL44408 (Figura 9C) y 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de JP-1302 (Figura 9E); y (ii) abolida después de 10000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de imiloxan (Figura 9D), nuestros resultados sugieren que en ratas diabéticas descerebradas y desmeduladas, dicha simpato-inhibición cardíaca es mediada principalmente por el subtipo de receptor adrenérgico  $\alpha_{2B}$ , y en menor proporción por los subtipos  $\alpha_{2A}$  y  $\alpha_{2C}$ . Estos resultados contrastan con lo previamente reportado en ratas normoglicémicas descerebradas y desmeduladas (Cobos-Puc et al., 2007), en donde la simpato-inhibición producida por el B-HT 933 es mediada por los subtipos de receptores  $\alpha_{2A}$  y  $\alpha_{2C}$ , pero no por los  $\alpha_{2B}$ .

Es cierto que nuestros hallazgos no pueden explicarse simplemente en términos de antagonismo puro de un solo subtipo de receptor en vista de que en el modelo de la rata descerebrada y desmedulada, los factores farmacocinéticos tales como el metabolismo y la excreción de los fármacos no pueden ser categóricamente excluidos. Sin embargo, el hecho de que la



simpato-inhibición producida por 100 B-HT 933  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$  haya sido parcialmente por los antagonistas BRL44408 (300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) y JP-1302 (1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ); y abolida por imiloxan (10000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) claramente apoya el papel de los tres subtipos de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ .

De acuerdo con esta sugerencia, diversos estudios han demostrado que en la DM existen alteraciones en el papel modulador de estos receptores. Por ejemplo: (i) la densidad de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  a nivel central se encuentra incrementada (Padayatti y Paulose, 1999); (ii) existe un incremento en el flujo de noradrenalina y del tono simpático (Thackeray et al., 2012), y (iii) existe un papel diferencial en la activación de dichos receptores que inhiben el tono simpático vasopresor (Altamirano-Espinoza et al., 2015). Sin embargo, bajo nuestras condiciones experimentales, y debido a que esto está fuera del objetivo de nuestro estudio, no es posible investigar las cuestiones antes mencionadas, por lo que se requiere de experimentos adicionales que ayuden a sustentar nuestra hipótesis.

### **8.7 Participación de los subtipos de receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>-like en la simpato-inhibición cardiaca producida por el quinpirol en ratas diabéticas: comparación farmacológica con ratas normoglicémicas**

En un intento por analizar el papel específico de los subtipos de receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>-like (*i.e.* D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub>) sobre la simpato-inhibición cardiaca producida por 10  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$  en ratas diabéticas, utilizamos los antagonistas selectivos L-741,626 (D<sub>2</sub>); SB-277011-A (D<sub>3</sub>) o L-745,870 (D<sub>4</sub>) a dosis suficientemente altas para bloquear por completo a sus respectivos receptores en ratas descerebradas y desmeduladas (Altamirano-Espinoza et al., 2013; Ruiz-Salinas et al., 2013).

Dado que la simpato-inhibición cardiaca producida por 10  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$  fue abolida después de la administración i.v. de 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de L-741,626 (Figura 12C); 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de SB-277011-A (Figura 12D); o 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de L-745,870 (Figura 12E), nuestros resultados sugieren que en ratas diabéticas



descerebradas y desmeduladas, dicha simpato-inhibición cardiaca es mediada por los subtipos de receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub>. Estos resultados contrastan con lo reportado previamente en ratas normoglicémicas, en donde la simpato-inhibición cardiaca producida por quinpirol es mediada por el subtipo de receptor D<sub>2</sub>, pero no por los subtipos D<sub>3</sub> o D<sub>4</sub> (Altamirano-Espinoza et al., 2013).

Diversos estudios en ratas normoglicémicas descerebradas y desmeduladas han mostrado el papel neurogénico (*i.e.* simpato-inhibitorio) de los receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>-like (Alcántara-Vázquez et al., 2013; Altamirano-Espinoza et al., 2013; Ruiz-Salinas et al., 2013). Sin embargo, nuestros hallazgos incluyen el papel de estos receptores en condiciones patológicas (*i.e.* diabetes experimental). Nosotros hipotetizamos que el hecho que los subtipos de receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub> estén involucrados en la simpato-inhibición cardiaca producida por el quinpirol (Figura 12C, D, E) puede deberse a: (i) un incremento en la densidad de receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>-like (Lozovsky et al., 1981; Sumiyoshi et al., 1997); y (ii) la interacción de los subtipos de receptores dopaminérgicos para formar heterodímeros con propiedades farmacológicas y funcionales únicas (Angers et al., 2002; Ferré et al., 2009; Milligan, 2009).

En este sentido, se ha reportado que los subtipo de receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub> pueden formar heterodímeros (Scarselli et al., 2001; Maggio et al., 2003; Novi et al., 2007), y que dicho heterodímero es el más importante debido a la estos subtipos de receptores comparten un alto grado de homología y muestran similares perfiles de unión de ligando similares y patrones de acoplamiento a las señales celulares (Neve et al., 2004). Adicionalmente, el heterodímero dopaminérgico D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> ha sido propuesto como un nuevo agente terapéutico para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, esquizofrenia y otros trastornos del sistema nervioso central (Maggio y Millan, 2010). Sin embargo, no existe evidencia alguna sobre la formación de heterodímeros en la DM.



## 8.8 Posibles implicaciones clínicas

Desde una perspectiva clínica, los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  y dopaminérgicos D<sub>2</sub>-like involucrados en la simpato-inhibición cardiaca en individuos diabéticos pueden representar blancos terapéuticos para el tratamiento de complicaciones diabéticas tales como la NAC. En este contexto, durante el desarrollo de la NAC (la principal forma de neuropatía autonómica diabética), una reducida función autonómica cardiovascular (medida por la variabilidad de la frecuencia cardiaca) parece duplicar el riesgo relativo de isquemia miocárdica silenciosa y mortalidad en los sujetos con DM tipo I (Vinik et al., 2003). Ciertamente, se requieren de estudios *in vivo* para explorar si los ligandos selectivos para los receptores antes mencionados son efectivos para el tratamiento de la NAC.



## CAPÍTULO 9

### CONCLUSIÓN

Nuestros hallazgos **en ratas diabéticas** descerebradas y desmeduladas sugieren que: (i) el efecto inhibitorio producido por quinpirol y B-HT 933 sobre las respuestas taquicárdicas producidas por estimulación eléctrica simpática es mediado por la activación de receptores simpato-inhibitorios; (ii) el B-HT 933 y el quinpirol producen un mayor efecto inhibitorio sobre las respuestas cardioaceleradoras simpáticas en comparación con las ratas normoglicémicas; (iii) la simpato-inhibición producida por 100  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$  de B-HT 933 está mediada por la activación de los subtipos de receptores  $\alpha_{2A}$ -,  $\alpha_{2B}$ -, y  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos (a diferencia de lo que ocurre en las ratas normoglicémicas, donde únicamente los receptores  $\alpha_{2A}$ -, y  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos desempeñan un papel predominante; (iv) la simpato-inhibición producida por 10  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$  de quinpirol está mediada por la activación de los subtipos de receptores dopaminérgicos  $D_2$ ,  $D_3$  y  $D_4$  (a diferencia de lo que ocurre en las ratas normoglicémicas, donde únicamente los receptores  $D_2$  desempeñan un papel predominante); y (v) el immepip (3 y 10  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ ) produce un efecto inhibitorio en ratas normoglicémicas, más no en ratas diabéticas.

Con base en estos resultados, se puede concluir que en animales diabéticos con 4 semanas de evolución existen alteraciones en el perfil farmacológico de los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ , dopaminérgicos  $D_2$ -like así como los receptores histaminérgicos  $H_3$  y  $H_4$  que inhiben el tono simpático cardioacelerador.



## CAPÍTULO 10

### PERSPECTIVAS

El presente trabajo experimental fue realizado con el propósito de aportar información de suma importancia a la ciencia básica sobre los posibles mecanismos que participan en la inhibición del tono simpático cardioacelerador en condiciones patológicas como la DM, empleando un modelo experimental de DM tipo I (inducido por STZ), a través de la activación de los subtipos de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  y dopaminérgicos D<sub>2</sub>-like. Sin embargo, nuestra propuesta no se limita a la actividad de estos receptores en las terminales simpáticas que inervan al corazón. Por tal motivo, las perspectivas futuras resultantes de este trabajo de tesis podrían ser:

- (i) Determinar si la inhibición del tono simpático involucra la participación de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  y dopaminérgicos D<sub>2</sub>-like localizados en ganglios autonómicos.
- (ii) Investigar si en otras patologías metabólicas (e.g. obesidad, síndrome metabólico) existen alteraciones en el perfil farmacológico de dichos receptores.
- (iii) Analizar la participación de otros receptores acoplados a proteínas G<sub>i/o</sub> (e.g. serotoninérgicos 5-HT<sub>1B/1D/1F</sub>) en un modelo experimental de diabetes tipo 1 inducido por STZ.
- (iv) Determinar si existen otras alteraciones periféricas, tales como cambios en las concentraciones de monoaminas en plasma sanguíneo de animales pretratados con STZ (*i.e.* noradrenalina, dopamina e histamina), así como la funcionalidad de los (sub)tipos de receptores de las monoaminas involucradas en el presente estudio.
- (v) Cuantificar la densidad y/o expresión de los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ , dopaminérgicos D<sub>2</sub>-like o histaminérgicos H<sub>3</sub> y H<sub>4</sub>.

## REFERENCIAS

- Alcántara-Vázquez O, Villamil-Hernández MT, Sánchez-López A, Centurión D (2013). Pharmacological evidence that dopamine inhibits the cardioaccelerator sympathetic outflow via D<sub>2</sub>-like receptors in pithed rats. *J Pharmacol Sci.* **123**:380-391.
- Aldi S, Takano K, Tomita K, Koda K, Chan NY, Marino A, et al. (2014). Histamine H<sub>4</sub>-receptors inhibit mast cell renin release in ischemia/reperfusion via protein kinase C $\epsilon$ -dependent aldehyde dehydrogenase type-2 activation. *J Pharmacol Exp Ther.* **349**:508–517.
- Altamirano-Espinoza AH, González-Hernández A, Manrique-Maldonado G, Marichal-Cancino BA, Ruiz-Salinas I, Villalón CM (2013). The role of dopamine D<sub>2</sub>, but not D<sub>3</sub> or D<sub>4</sub>, receptor subtypes, in quinpirole-induced inhibition of the cardioaccelerator sympathetic outflow in pithed rats. *Br J Pharmacol.* **170**:102-111.
- Altamirano-Espinoza AH, Manrique-Maldonado G, Marichal-Cancino BA, Villalón CM (2015). Specific role of  $\alpha_{2A}$ - and  $\alpha_{2B}$ -, but not  $\alpha_{2C}$ -, adrenoceptor subtypes in the inhibition of the vasopressor sympathetic out-flow in diabetic pithed rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* **117**:31-38.
- Altman JD, Trendelenburg AU, MacMillan L, Bernstein D, Limbird L, Starke K, et al. (1999). Abnormal regulation of the sympathetic nervous system in alpha<sub>2A</sub>-adrenergic receptor knockout mice. *Mol Pharmacol.* **56**:154-161.
- Amenta F (1997). Light microscope autoradiography of peripheral dopamine receptor subtypes. *Clin Exp Hypertens.* **19**:27-41.
- Amenta F, Barili P, Bronzetti E, Felici L, Mignini F, Ricci A (2000). Localization of dopamine receptor subtypes in systemic arteries. *Clin Exp Hypertens.* **22**:277-288.



- Amenta F, Gallo P, Rossodivita A, Ricci A (1993). Radioligand binding and autoradiographic analysis of dopamine receptors in the human heart. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol.* **347**:147-154.
- American Diabetes Association (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* **33**:S62–S69.
- Angers S, Salahpour A, Bouvier M (2002). Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **42**:409-435.
- Arrang JM, Garbarg M, Lancelot JC, Lecomte JM, Pollard H, Robba M, et al. (1987). Highly potent and selective ligands for histamine H<sub>3</sub>-receptors. *Nature.* **327**:117-123.
- Atkins FL, Dowell RT, Love S (1985). beta-Adrenergic receptors, adenylate cyclase activity, and cardiac dysfunction in the diabetic rat. *J Cardiovasc Pharmacol.* **7**:66-70.
- Avery RA, Franowicz JS, Studholme C, van Dyck CH, Arnsten AF (2000). The alpha-2A-adrenoceptor agonist, guanfacine, increases regional cerebral blood flow in dorsolateral prefrontal cortex of monkeys performing a spatial working memory task. *Neuropsychopharmacology.* **23**: 240-249.
- Axelrod S, Lishner M, Oz O, Bernheim J, Ravid M (1987). Spectral analysis of fluctuations in heart rate: an objective evaluation of autonomic nervous control in chronic renal failure. *Nephron.* **45**:202-206.
- Beal MF (2002). Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic Biol Med.* **32**:797-803.
- Beaulieu JM, Gainetdinov RR (2011). The physiology, signalling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev.* **63**:182-217.
- Bedoya FJ, Solano F, Lucas M (1996). N-monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin-induced double strand DNA break formation in pancreatic rat islets. *Experientia.* **52**:344-347.



- Berlett BS, Stadtman ER (2000). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem.* **272**:200313-200316.
- Boehm S, Kubista H (2002). Fine tuning of sympathetic transmitter release via ionotropic and metabotropic presynaptic receptors, *Pharmacol Rev.* **54**:43-99.
- Bongers G, Sallmenj T, Passani MB, Mariottini C, Wendelin D, Lozada A, et al. (2007). The Akt/GSK-3 beta axis as a new signalling pathway of the histamine H(3) receptor. *J Neurochem.* **103**:248-258.
- Boron W, Boulpaep E (2011). Medical physiology: a cellular and molecular approach. 2 ed. Elsevier Saunder. Philadelphia, Pennsylvania.
- Bouthenet ML, Souil E, Martres MP, Sokoloff P, Giros B, Schwartz JC (1991). Localization of dopamine D3 receptor mRNA in the rat brain using in situ hybridization histochemistry: comparison with dopamine D2 receptor mRNA. *Brain Res.* **564**:203-219.
- Boquist L, Nelson L, Lorentzon R (183). Uptake of labelled alloxan in mouse organs and mitochondria *in vivo* and *in vitro*. *Endocrinology.* **113**:943-948.
- Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, et al. (1994). International Union of Pharmacology Nomenclature of adrenoceptors. X. *Pharmacol. Rev.* **46**:121-136.
- Bylund DB, Ray-Premger C, Murphy TJ (1988). Alpha-2A and alpha-2B adrenergic receptor subtypes: antagonist binding in tissues and cell lines containing only one subtype. *J Pharmacol Exp Ther.* **245**:600-607.
- Cavero I, Massingham R, Lefevre-Borg F (1982a). Peripheral dopamine receptors, potential targets for a new class of anti-hypertensive agents. Part I: Subclassification and functional description. *Life Sci.* **31**:939-948.
- Cavero I, Massingham R, Lefevre-Borg F (1982b). Peripheral dopamine receptors, potential targets for a new class of anti-hypertensive agents. Part II: Sites and mechanisms of action of dopamine receptor agonists. *Life Sci.* **31**:1059-1069.





- Centurión D, Cobos-Puc LE, Ramírez-Rosas MB, Gómez-Díaz B, Sánchez-López A, Villalón CM (2008). Pithed rat model for searching vasoactive drugs and studying the modulation of the sympathetic and non-adrenergic non-cholinergic outflow. In: Rocha L (ed). Models of neuropharmacology. Transworld Research Network. Kerala, India.
- Centurión D, Glusa E, Sánchez-López A, Valdivia LF, Saxena PR, Villalón CM (2004). 5-HT<sub>7</sub>, but not 5-HT<sub>2B</sub>, receptors mediate hypotension in vagosympathectomized rats. *Eur J Pharmacol.* **502**:239-242.
- Chotani MA, Mitra S, Su BY, Flavahan S, Eid AH, Clark KR, et al. (2004). Regulation of alpha<sub>2</sub>-adrenoceptors in human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **286**:H59–H67.
- Chevion M, Berenshtein E, Sandtman ER (2000). Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic Res.* **33**:S99-S108.
- Cho SC, Kim JW, Kim BN, Hwang JW, Shin MS, Park M, et al. (2008). Association between the alpha<sub>2C</sub>-adrenergic receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder in a Korean sample. *Neurosci Lett.* **446**:108-111.
- Clapham J, Kilpatrick GJ (1992). Histamine H<sub>3</sub> receptors modulate the release of [3H]-acetylcholine from slices of rat entorhinal cortex: evidence for the possible existence of H<sub>3</sub> receptor subtypes. *Br J Pharmacol.* **107**:919-23.
- Cobos-Puc LE, Villalón CM, Sánchez-López A, Lozano-Cuenca J, Pertz HH, Görnemann T, et al. (2007). Pharmacological evidence that  $\alpha_{2A}$ - and  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptors mediate the inhibition of cardioaccelerator sympathetic outflow in pithed rats. *Eur J Pharmacol.* **554**:205-211.
- Coge F, Guenin SP, Rique H, Boutin JA, Galozzo JP (2001). Structure and expression of the human histamine H<sub>4</sub>-receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun.* **284**:301-309.



- Corti C, Aldegheri L, Somogyi P, Ferraguti F (2002). Distribution and synaptic localisation of the metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4) in the rodent CNS. *Neuroscience*. **110**:403-420.
- Couper J, Donaghe KC (2009). Phases of diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes*. **10**(Suppl 12):13-16.
- Crosby EC, Humphrey T, Lauer EW (1962). Correlative anatomy of the nervous system. McMillan Co: New York. 519-549.
- Dabalea D, Mayer-Davis EJ, Saydah S, Imperatore G, Linder B, Divers J, et al. (2014). Prevalence of type 1 and type 2 diabetes among children and adolescents from 2001 to 2009. *JAMA*. **311**:1778-1786.
- Daneman D (2006). Type 1 diabetes. *Lancet*. **367**:847-858.
- De Angelis K, Irigoyen MC, Morris M (2009). Diabetes and cardiovascular autonomic dysfunction: application of animal models. *Auton Neurosci*. **145**:3-10.
- De Jong AP, Verhage M (2009). Presynaptic signal transduction pathways that modulate synaptic transmission. *Curr Opin Neurobiol*. **19**:245-253.
- De Mei C, Ramos M, Iitaka C, Borrelli E (2009). Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors. *Curr Opin Pharmacol*. **9**:53-58.
- Devendra D, Liu E, Eisenbarth GS (2004). Type 1 diabetes: recent developments. *BMJ*. **328**:750-754.
- Dincer UD, Bidasee KR, Guner S, Tay A, Ozcelikay AT, Altan VM (2001). The effect of diabetes on expression of beta<sub>1</sub>-, beta<sub>2</sub>-, and beta<sub>3</sub>-adrenoreceptors in rat hearts. *Diabetes*. **50**:455-461.
- Docherty JR (1998). Subtypes of functional  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -adrenoceptors. *Eur J Pharmacol*. **361**:1-15.
- Downes GB, Gautam N (1999). The G protein subunit gene families. *Genomics*. **62**:544-552.



- Drake-Holland AJ, Van d V, Roemen TH, Hynd JW, Mansaray M, Wright ZM, et al. (2001). Chronic catecholamine depletion switches myocardium from carbohydrate to lipid utilisation. *Cardiovasc Drugs Ther.* **15**:111-117.
- Dunn JS, Sheehan HL, Mclethie NGB (1943). Necrosis of islets of Langerhans produced experimentally. *Lancet.* **1**:484-487.
- Endou M, Poli E, Levi R (1994). Histamine H<sub>3</sub>-receptor signaling in the heart: possible involvement of G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub> proteins and N-type Ca<sup>++</sup> channels. *J Pharmacol Exp Ther.* **269**:221-229.
- Farley A, McLafferty E, Hendry C (2012). The cardiovascular system. *Nurs Stand.* **27**:35-39.
- Feliszek M, Speckmann V, Schacht D, von Lehe M, Stark H, Schlicker E. (2015) A search for functional histamine H<sub>4</sub> receptors in the human, guinea pig and mouse brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **388**:11-17.
- Fernández-Alacid L, Aguado C, Ciruela F, Martin R, Colon J, Cabanero MJ, et al. (2009). Subcellular compartment specific molecular diversity of pre- and post-synaptic GABA-activated GIRK channels in Purkinje cells. *J Neurochem.* **110**:1363-1376.
- Ferré S, Baler R, Bouvier M, Caron MG, Devi LA, Durroux T et al. (2009). Building a new conceptual framework for receptor heteromers. *Nat Chem Biol.* **5**:131-134.
- Figlewicz DP, Brot MD, McCall AL, Szot P (1996). Diabetes causes differential changes in CNS noradrenergic and dopaminergic neurons in the rat: a molecular study. *Brain Res.* **736**:54-60.
- Fushimi H, Inoue T, Kishini B, Nishikawa M, Tochino Y, Funakawa S, et al. (1984). Abnormalities in plasma catecholamine response and tissue catecholamine accumulation in streptozotocin diabetic rats: a possible role for diabetic autonomic neuropathy. *Life Sci.* **35**:1077-1081.



- Gainetdinov RR, Sotnikova TD, Grekhova TV, Rayevsky KS (1996). *In vivo* evidence for preferential role of dopamine D<sub>3</sub> receptor in the presynaptic regulation of dopamine release but not synthesis. *Eur J Pharmacol.* **308**:261–269.
- Gallego M, Seitién R, Izquierdo MJ, Casis O, Casis E (2003). Diabetes-induced biochemical changes in central and peripheral catecholaminergic systems. *Physiol Rev.* **52**:735-741.
- Galtier F (2010). Definition, epidemiology, risk factor. *Diabetes Metab.* **36**:628-651.
- Ganda OP, Rossi AA, Like AA (1976). Studies on streptozotocin diabetes. *Diabetes.* **25**:595-603.
- Gaspar R, Gal A, Galik M, Ducza E, Minorics R, Kolarovszki-Sipiczki Z, et al. (2007). Different roles of alpha2-adrenoceptor subtypes in non-pregnant and late-pregnant uterine contractility in vitro in the rat. *Neurochem Int.* **51**:311-318.
- Gemkow MJ, Davenport AJ, Harich S, Ellenbroek BA, Cesura A, Hallett D. (2009) The histamine H<sub>3</sub> receptor as a therapeutic drug target for CNS disorders. *Drug Discov Today.* **14**:509-515.
- Genovese A, Spadaro G (1997). Highlights in cardiovascular effects of histamine and H<sub>1</sub>- receptor antagonists. *Allergy.* **52**:67-78.
- Gill DS, Barradas MA, Fonseca VA, Dandona P (1998). Plasma histamine concentrations are elevated in patients with diabetes mellitus and peripheral vascular disease. *Metabolism.* **38**:243-247.
- Gillespie JS, MacLaren A, Pollock D (1970). A method of stimulating different segments of the autonomic outflow from the spinal column to various organs in the pithed cat and rat. *Br J Pharmacol.* **40**:257-267.
- Gillispie JS, Miur T (1967). A method of stimulating the complete sympathetic outflow from the spinal cord to blood vessels in the pithed rat. *Br J Pharmacol Chemother.* **30**: 78-87.



- Givertz MM, Sawyer DB, Colucci WS (2001). Antioxidants and myocardial contractility: illuminating the “Dark Side” of beta-adrenergic receptor activation? *Circulation*. **103**:782-783.
- Glavin GB, Hall AM (1994). Clozapine, a dopamine DA<sub>4</sub> receptor antagonist, reduces gastric acid secretion and stress-induced gastric mucosal injury. *Life Sci*. **54**:PL261-264.
- Godlewski G, Malinowska B, Schlicker E, Bucher B (1997). Identification of histamine H<sub>3</sub> receptors in the tail artery from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. **29**:801-807.
- Goldberg LI (1972). Cardiovascular and renal actions of dopamine: potential clinical applications. *Pharmacol Rev*. **24**:1-29.
- Gómez MJ, Rousseau G, Nadeau R, Berra R, Flores G, Suárez J (2002). Functional and autoradiographic characterization of dopamine D<sub>2</sub>-like receptors in the guinea pig heart. *Can J Physiol Pharmacol*. **80**:578-587.
- Gordan R, Gwathmey JK, Xie LH (2015). Autonomic and endocrine control of cardiovascular function. *World J Cardiol*. **7**:204-214.
- Guy J, Ogden L, Wadwa RP, Hamman RF, Mayer-Davis EJ, Liese AD, et al. (2009). Lipid and lipoprotein profiles in youth with and without type 1 diabetes: the SEARCH for Diabetes in Youth case-control study. *Diabetes Care*. **32**:416-420.
- Guyenet PG, Stornetta RL, Riley T, Norton FR, Rosin DL, Lynch KR (1994). Alpha 2A-adrenergic receptors are present in lower brainstem catecholaminergic and serotonergic neurons innervating spinal cord. *Brain Res*. **638**:285-294.
- Guyton AC, Hall JE (2011). Tratado de Fisiología Médica. Cap. 9. 12 ed. Elsevier, España, SL. 101-115.
- Gwathmey JK, Briggs GM, Allen PD (1994). Heart failure: Basic science and clinical aspects. Marcel Dekker Inc. New York. 282-283.



- Halliwell B, Gutteridge J (1999). Free radicals in biology and medicine. New York: Oxford University.
- Harvey JN, Worth DP, Brown J, Lee MR (1985). The effect of oral fenoldopam (SKF 82526-J), a peripheral dopamine receptor agonist, on blood pressure and renal function in normal man. *Br J Clin Pharmacol.* **19**:21-27.
- Harvey JN, Worth DP, Brown J, Lee MR (1986). Studies with fenoldopam, a dopamine receptor DA1 agonist, in essential hypertension. *Br J Clin Pharmacol.* **21**:53–61.
- Hattori Y, Hattori K, Matsuda N (2016). Regulation of the cardiovascular system by histamine. En: Hattori Y, Seifert R (eds). Histamine and histamine receptors in health and disease. *Handb Exp Pharmacol.* **241**:239-258.
- Heikkila RE, Winston B, Cohen G, Barden H (1976). Alloxan induced diabetes, evidence for hydroxyl radicals as a cytotoxic intermediate. *Biochem Pharmacol.* **25**:1085-1092.
- Hein L, Altman JD, Kobilka BK (1999). Two functionally distinct alpha2 adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. *Nature.* **402**:181-184.
- Heller B, Burkle A, Radons J, Fengler E, Jaloway A, Muller M, et al. (1994). Analysis of oxygen radical toxicity in pancreatic islets at the single cell level. *Biol Chem Hoppe-Seyler.* **375**:597-602.
- Hicks KK, Seifen E, Stimers JR, Kennedy RH (1998). Effects of streptozotocin-induced diabetes on heart rate, blood pressure and cardiac autonomic nervous control. *J Auton Nerv Syst.* **69**:21-30.
- Hieble JP, Bylund DB, Clarke DE, Eikenburg DC, Langer SZ, Lefkowitz RJ, et al. (1995). International Union of Pharmacology: Recommendation for nomenclature of  $\alpha_1$ -adrenoceptors: consensus update. *Pharmacol Rev* **47**:267-270.



- Hieble JP, Ruffolo RR (1996). Subclassification and nomenclature of alpha 1- and alpha 2-adrenoceptors. *Prog Drug Res.* **47**:81-130.
- Hildebrandt JD (1997). Role of subunit diversity in signaling by heterotrimeric G proteins. *Biochem Pharmacol.* **54**:325-339.
- Hoffman BB (2001). Catecholamines, sympathomimetic drugs, and adrenergic receptor antagonists. In: Hardman JG, Limbird LE, Goodman Gilman A (eds). Goodman & Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11 ed. McGraw-Hill: New York, 2001.
- Hoffman BB, Taylor P (2001). Neurotransmission: The autonomic and somatic motor nervous systems. In: Hardman JG, Limbird LE, Goodman Gilman A (eds). Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 11 ed. Ed. McGraw-Hill: New York. 115-154.
- Hofstra CL, Desai PJ, Thurmond RL, Fung-Leung WP (2003). Histamine H<sub>4</sub> receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells. *J Pharmacol Exp Ther.* **305**:1212-1221.
- Hollis TM, Kern JA, Enea NA, Cosgarea AJ (1985). Changes in plasma histamine concentration in the streptozotocin-diabetic rat. *Exp Mol Pathol.* **43**:90-96.
- Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Harting PR, Martin GR, Mylecharane EJ, et al. (1994). International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev.* **46**:157-203.
- Hunter JC, Fontana DJ, Hedley LR, Jasper JR, Lewis R, Link RE, et al. (1997). Assessment of the role of alpha2-adrenoceptor subtypes in the antinociceptive, sedative and hypothermic action of dexmedetomidine in transgenic mice. *Br J Pharmacol.* **122**:1339-1344.
- Ichinose M, Barnes PJ (1990). Histamine H<sub>3</sub> receptors modulate antigen-induced bronchoconstriction in guinea pigs. *J Allergy Clin Immunol.* **86**:491-495.



- Imamura M, Smith NC, Garbarg M, Levi R (1996). Histamine H<sub>3</sub>-receptor-mediated inhibition of calcitonin gene-related peptide release from cardiac C fibers. A regulatory negative-feedback loop. *Circ Res.* **78**:863-869.
- Ishikawa S, Sperelakis N (1987). A novel class (H<sub>3</sub>) of histamine receptors on perivascular nerve terminals. *Nature.* **327**:158-60.
- Iwai-Kanai E, Hasegawa K, Araki M, Kakita T, Morimoto T, Sasayama S (1999). Alpha- and beta-adrenergic pathways differentially regulate cell type-specific apoptosis in rat cardiac myocytes. *Circulation.* **100**:305-311.
- Jablonowski JA, Carruthers NI, Thurmond RL (2004). The histamine H<sub>4</sub> receptor and potential therapeutic uses for H<sub>4</sub> ligands. *Mini Rev Med Chem.* **4**:993–1000.
- Jackson DM, Westlind-Danielsson A (1994). Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacol Ther.* **64**:291-370.
- Jakobsen J, Sidenius P, Gundersen HJG, Osterby R (1987). Quantitative changes of cerebral neocortical structure in insulin-treated long-term streptozotocin-induced diabetes in rats. *Diabetes.* **36**:597-601.
- James J, Padayatti PS, Paul T, Paulose CS (1997). Platelet monoamine changes in diabetic patients and streptozotocin-induced diabetic rats. *Current Sci.* **72**: 137-139.
- Jose PA, Eisner GM, Felder RA (2003). Regulation of blood pressure by dopamine receptors. *Nephron Physiol.* **95**:19-27.
- Joseph JD, Wang YM, Miles PR, Budygin EA, Picetti R, Gainetdinov RR, et al. (2002). Dopamine autoreceptor regulation of release and uptake in mouse brain slices in the absence of D(3) receptors. *Neuroscience.* **112**:39-49.
- Jutel M, Akdis M, Akdis CA (2009). Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. *Clin Exp Allergy.* **39**:1786-1800.





- Karlstedt K, Jin C, Panula P (2013). Expression of histamine receptor genes *Hrh3* and *Hrh4* in rat brain endothelial cells. *Br J Pharmacol.* **170**:58–66.
- Kharroubi AT, Darwish HM (2015). Diabetes mellitus: the epidemic of the century. *World J. Diabetes.* **6**:850-857.
- Katsumata K, Katsumata K Jr, Katsumata Y (1992). Protective effect of diltiazem hydrochloride on the occurrence of alloxan- or streptozotocin-induced diabetes in rats. *Horm Metab Res.* **24**:508-510.
- Kebabian JW (1978). Multiple classes of dopamine receptors in mammalian central nervous system: the involvement of dopamine-sensitive adenylyl cyclase. *Life Sci.* **23**:479–483.
- Klabunde R (2011). Vascular Functions. In: Cardiovascular physiology concepts. Cap. 5. 1 ed. Lippincott Williams & Wilkinjs: 91-115.
- Kleinman LI, Radford EP (1964). Ventilation standards for small mammals. *J Appl Physiol.* **19**:360-362.
- Kniel PV, Junker U, Perrin I, Bestetti GE, Rossi GI (1986). Varied effect of experimental diabetes on the autonomic nervous system of the rat. *Lab Invest.* **54**:523-530.
- Koh DS, Hille B (1997). Modulation by neurotransmitters of catecholamine secretion from sympathetic ganglion neurons detected by amperometry. *Proc Natl Acad Sci USA.* **94**:1506-1511.
- Kopeć P, Korczyńska I, Olakowska E (2001). Role of histamine in cardiac muscle function-an attempt at demonstrating the presence of intracellular histamine H<sub>2</sub>-type receptors. *Med Sci Monit.* **7**:357-362.
- Kröncke KD, Fehsel K, Sommer A, Rodríguez ML, Kolb-Bachofen V (1995). Nitric oxide generation during cellular metabolism of the diabetogenic N-methyl-N-nitroso-urea streptozotocin contributes to islet cell DNA damage. *Biol Chem Hoppe-Seyler.* **376**:179-185.



- Lakhlani PP, MacMillan LB, Guo TZ, McCool BA, Lovinger DM, Maze M, et al. (1997). Substitution of a mutant alpha2a-adrenergic receptor via “hit and run” gene targeting reveals the role of this subtype in sedative, analgesic, and anesthetic-sparing responses in vivo. *Proc Nat. Acad Sci USA*. **94**:9950-9955.
- Lenzen S, Munday R (1991). Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its N-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin. *Biochem Pharmacol*. **42**:1385-1391.
- Lenzen S, Tiedge M, Jorns A, Munday R (1996). Alloxan derivatives as a tool for the elucidation of the mechanism of the diabetogenic action of alloxan. In: *Lessons from Animal Diabetes*, E SHAFRIR (ed), Birkhauser, Boston. 113-122.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz A, et al. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. **186**:464-478.
- Levine RL, Williams J, Sandtman ER, Shacter E (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. **233**:346-357.
- Levy F (2008). Pharmacological and therapeutic directions in ADHD: Specificity in the PFC. *Behav Brain Funct*. **4**:12.
- Likungu J, Molderings GJ, Göthert M (1996). Presynaptic imidazoline receptors and alpha 2-adrenoceptors in the human heart: discrimination by clonidine and moxonidine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. **354**:689-692.
- Link RE, Desai K, Hein L, Stevens ME, Chruscinski A, Bernstein D, et al. (1996). Cardiovascular regulation in mice lacking alpha2-adrenergic receptor subtypes b and c. *Science*. **273**:803-805.



- Liu C, Wilson SJ, Kuei C, Lovenberg TW (2001). Comparison of human, mouse, rat, and guinea pig histamine H4 receptors reveals substantial pharmacological species variation. *J Pharmacol Exp Ther.* **299**:121–130.
- Lokhandwala MF (1988). Cardiovascular and renal effects of dopamine receptor agonists. *Sci Pharmacol.* **2**:261–266.
- Lokhandwala MF, Hegde SS (1990). Cardiovascular dopamine receptors: role of renal dopamine and dopamine receptors in sodium excretion. *Pharmacol Toxicol.* **66**:237-243.
- Lorenz W, Lomasnev JW, Collins S, Regan JW, Caron MG, Lefkowitz RJ (1990). Expression of the three alpha 2-adrenergic receptor subtypes in rat tissues: implication for alpha 2 receptor classification. *Mol Pharmacol.* **38**:559-603.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* **196**:265-275.
- Lozovsky D, Saller CF, Kopin IJ (1981). Dopamine receptor binding is increased in diabetic rats. *Science.* **214**:1031-1033.
- MacDonald E, Scheinin M (1995). Distribution and pharmacology of alpha 2-adrenoceptors in the central nervous system. *J Physiol Pharmacol.* **46**:241-258.
- Madani MM, Golts E (2014). Cardiovascular anatomy. Reference module in biomedical sciences. Elsevier.
- Maggio R, Millan MJ (2010). Dopamine D2-D3 receptor heteromers: pharmacological properties and therapeutic significance. *Curr Opin Pharmacol.* **10**:100-107
- Maggio R, Scarselli R, Novi F, Millan MJ, Corsini GU (2003). Potent activation of dopamine D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> heterodimers by the antiparkinsonian agents, S32504, pramipexole and ropinirole. *J Neurochem.* **87**:631-641.



- Mann DL, Zipes DP, Libby P, Bonow RO (2014). Braunwald's heart disease: Textbook of cardiovascular medicine. 10 ed. Elsevier-Health Sciences Division. Philadelphia, Pennsylvania.
- Manrique-Maldonado G, Altamirano-Espinoza AH, Marichal-Cancino BA, Rivera-Mancilla E, Avilés-Rosas V, Villalón CM (2015). Pharmacological evidence that histamine H<sub>3</sub> receptors inhibit the vasodepressor responses by selective stimulation of the rat perivascular sensory CGRPergic outflow. *Eur J Pharmacol.* **754**:25-31.
- Matsubara T, Moskowitz MA, Huang Z (1992). UK-14,304, R(-)-alpha-methyl-histamine and SMS 201-995 block plasma protein leakage within dura mater by prejunctional mechanisms. *Eur J Pharmacol.* **224**:145-150.
- Meador-Woodruff JH, Mansour A, Bunzow JR, Van Tol HH, Watson SJ Jr, Civelli O (1989). Distribution of D<sub>2</sub> dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* **86**:7625-7628.
- McCorry LK (2007). Physiology of the autonomic nervous system. *Am J Pharm Educ.* **71**:78.
- Miller RJ (1998). Presynaptic receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **38**:201-227.
- Milligan G (2009). G protein-coupled receptor hetero-dimerization: contribution to pharmacology and function. *Br J Pharmacol.* **158**:5-14.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.* **78**:189-225.
- Molderings GJ, Weissenborn G, Schlicker E, Likungu J, Göthert M (1992). Inhibition of noradrenaline release from the sympathetic nerves of the human saphenous vein by presynaptic histamine H<sub>3</sub> receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **346**:46-50.
- Monckton G, Pehowich E (1980). Autonomic neuropathy in the streptozotocin diabetic rat. *Can J Neuro Sci.* **7**:135-142.



- Morgan NG, Cable HC, Newcombe NR, Williams GT (1994). Treatment of cultured pancreatic B-cells with streptozotocin induces cell death by apoptosis. *Biosci Rep.* **14**:243-250.
- Munari L, Provensi G, Passani MB, Blandina P (2013). Selective brain region activation by histamine H<sub>3</sub> receptor antagonist/inverse agonist ABT-239 enhances acetylcholine and histamine release and increases c-Fos expression. *Neuropharmacology.* **70**:131-40.
- Munday R (1988). Dialuric acid autoxidation. Effects of transition metals on the reaction rate and on the generation of "active oxygen" species. *Biochem Pharmacol.* **37**:409-413.
- Nukatsuka M, Yoshimura Y, Nishida M, Kawada J (1990). Importance of the concentration of ATP in rat pancreatic beta cells in the mechanism of streptozotocin-induced cytotoxicity. *J Endocrinol.* **127**:161-165.
- Neve KA, Seamans JK, Trantham-Davidson H (2004). Dopamine receptor signalling. *J Recept Signal Transduct Res.* **24**:165-205.
- Novi F, Millan MJ, Corsini GU, Maggio R (2007). Partial agonist actions of aripiprazole and the candidate antipsychotics S33592, bifeprunox, N-desmethylclozapine and preclamol at dopamine D(2L) receptors are modified by co-transfection of D(3) receptors: potential role of heterodimer formation. *J Neurochem.* **102**:1410-1424.
- Nguyen T, Shapiro DA, George SR, Setola V, Lee DK, Cheng R, et al. (2001). Discovery of a novel member of the histamine receptor family. *Mol Pharmacol.* **59**:427-433.
- Ozturk Y, Altan VM, Ildizoglu-Ari NY (1996). Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions. *Pharmacol Rev.* **48**:69-112.
- Panula P, Chazot PL, Cowart M, Gutzmer R, Leurs R, Liu WL, et al. (2015). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCVIII. Histamine Receptors. *Pharmacol Rev.* **67**:601-655.



- Parsons ME, Ganellin CR (2006). Histamine and its receptors. *Br J Pharmacol.* **147**:S127-S135.
- Padayatti PS, Paulose CS (1999). Alpha<sub>2</sub> adrenergic and high affinity serotonergic receptor changes in the brain stem of streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci.* **65**:403-414.
- Pang CCn (2001). Autonomic control of the venous system in health and disease: effects of drugs. *Pharmacol Ther.* **90**:179–230.
- Paulson DJ, Light KE (1981). Elevation of serum and ventricular norepinephrine content in the diabetic rat. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* **33**: 559- 562.
- Piascik MT, Hrometz SL, Edelmann SE, Guarino RD, Hadley RW, Broen RD (1997). Immunocytochemical localization of the alpha-<sub>1B</sub> adrenergic receptor and the contribution of this and the other subtypes to vascular smooth muscle contraction: analysis with selective ligands and antisense oligonucleotides. *J Pharmacol Exp Ther.* **283**:854-68.
- Pinacho-García M, Marichal-Cancino BA, Villalón CM (2016). Further evidence for the role of histamine H<sub>3</sub>, but not H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> or H<sub>4</sub>, receptors in imepip-induced inhibition of the rat cardioaccelerator sympathetic outflow. *Eur J Pharmacol.* **773**:85-92.
- Pini A, Chazot PL, Veglia E, Moggio A, Rosa AC (2015). H<sub>3</sub> receptor renal expression in normal and diabetic rats. *Inflamm Res.* **64**:271-273.
- Pop-Busui R (2010). Cardiac autonomic neuropathy in diabetes. *Diabetes Care.* **33**:434-441.
- Pop-Busui R, Kirkwood I, Schmid H, Marinescu V, Schroeder J, Larkin D, et al. (2004). Sympathetic dysfunction in type 1 diabetes: association with impaired myocardial blood flow reserve and diastolic dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* **44**:2368-2374.



- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia AS, White LE (2012). Autonomic regulation of cardiovascular function. In: Neuroscience. Cap. 21. 5 ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, USA. 468-470.
- Rahangdale S, Yeh SY, Malhotra A, Veves A (2009). Therapeutic interventions and oxidative stress in diabetes. *Front Biosci.* **14**:192-209.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G (2012). Mediadores químicos y sistema nervioso autónomo. En: Rang y Dale, Farmacología. Cap. 12. Elsevier. España, SL. 139-150.
- Reznick AZ, Packer L (1994). Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* **233**:357-363.
- Rhoadesand RA, Bell DR (2009). Medical physiology: Principles for clinical medicine. 3 ed. Lippincott Williams & Wilkins, Wolters Kluwer Health. Philadelphia, Pennsylvania.
- Rondou P, Haegeman G, Van Craenenbroeck K (2010). The dopamine D4 receptor: biochemical and signalling properties. *Cell Mol Life Sci.* **67**:1971-1986.
- Rosa AC, Grange C, Pini A, Katebe MA, Benetti E, Collino M, et al. (2013). Overexpression of histamine H<sub>4</sub> receptors in the kidney of diabetic rat. *Inflamm Res.* **62**:357-365.
- Rosin DL, Talley EM, Lee A, Stornetta RL, Gaylinn BD, Guyenet PG, et al. (1996). Distribution of alpha 2C-adrenergic receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *J Comp Neurol.* **372**:135-165.
- Robertson DW (2004). Primer on the autonomic nervous system. 3 ed. Academic Press. New York.
- Roth BL, Sheffler DJ, Kroeze WK (2004). Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. *Nat Rev Drug Discov.* **3**:353-359.



- Roy TM, Peterson HR, Snide HL, Cyrus J, Broadstone VL, Fell RD, et al. (1989). Autonomic influence on cardiovascular performance in diabetic subjects. *Am J Med.* **87**:382-388.
- Ruffolo RR, Nichols AJ, Stadel JM, Hieble JP (1991). Structure and function of  $\alpha$ -adrenoceptors. *Pharmacol Rev.* **43**:475-505.
- Ruiz-Salinas I, González-Hernández A, Manrique-Maldonado G, Marichal-Cancino BA, Altamirano-Espinoza AH, Villalón CM (2013). Predominant role of the dopamine D3 receptor subtype for mediating the quinpirole-induced inhibition of the vasopressor sympathetic outflow in pithed rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **386**:393-403.
- Sakurai K, Ogiso T (1995). Effect of ferritin on  $\lambda$ DNA strand breaks in the reaction system of alloxan plus NADPH cytochrome P450 reductase: ferritin's role in diabetogenic action of alloxan. *Biol Pharm Bull.* **18**:262-266.
- Sandler S, Swenne I (1983). Streptozotocin, but not alloxan, induces DNA repair synthesis in mouse pancreatic islets in vitro. *Diabetologia.* **25**:444-447.
- Scarselli M, Novi F, Schallmach E, Lin R, Baragli A, Colzi A et al. (2001). D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> dopamine receptor heterodimers exhibit unique functional properties. *J Biol Chem.* **276**:30308-30314.
- Schaan BD, Maeda CY, Timm HB, Medeiros S, Moraes RS, Ferlin E, et al. (1997). Time course of changes in heart rate and blood pressure variability in streptozotocin-induced diabetic rats treated with insulin. *Braz J Med Biol Res.* **30**:1081-1086.
- Schlicker E, Betz R, Göthert M (1988). Histamine H<sub>3</sub> receptor-mediated inhibition of serotonin release in the rat brain cortex. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **337**:588-590.





- Schlicker E, Behling A, Lümmer G, Göthert M (1992). Histamine H<sub>3A</sub> receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the mouse brain cortex. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **345**:489-93.
- Schlicker E, Fink K, Hinterthaler M, Göthert M (1989). Inhibition of noradrenaline release in the rat brain cortex via presynaptic H<sub>3</sub> receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **340**:633-638.
- Schmidt RE, Pulard SB (1986). Ultrastructural and biochemical characterisation of autonomic neuropathy in rats with chronic streptozotocin diabetes. *J Neuropathol Exp Neurol.* **45**:525-544.
- Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB (1994). STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes.* **43**:1326-1333.
- Schrauwen P, Hoeks J, Hesselink MK (2006). Putative function and physiological relevance of the mitochondrial uncoupling protein-3: involvement in fatty acid metabolism? *Prog Lipid Res.* **45**:17- 41.
- Schumer MP, Joyner SA, Pfeifer MA (1998). Cardiovascular autonomic neuropathy testing in patients with diabetes. *Diabet Spectr.* **11**:227-231.
- Sellers DJ, Chess-Williams R (2001). The effect of streptozotocin-induced diabetes on cardiac beta-adrenoceptor subtypes in the rat. *J Auton Pharmacol.* **21**:15-21.
- Shapiro MS, Loose MD, Hamilton SE, Nathanson NM, Gomeza J, Wess J, et al. (1999). Assignment of muscarinic receptor subtypes mediating G-protein modulation of Ca<sup>2+</sup> channels by using knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* **96**:10899-10904.
- Sharma SK, Klee WA, Nirenberg M (1975). Dual regulation of adenylate cyclase accounts for narcotic dependence and tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA.* **72**:3092-3096.
- Shiple RE, Tilden JE (1947). A pithed rat preparation suitable for assaying pressor substances. *Proc Soc Exp Biol Med.* **64**:453-455.



- Sibley DR (1999). New insights into dopaminergic receptor function using antisense and genetically altered animals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **39**:313–341.
- Snyder SH, Taylor KM, Coyle JT, Meyerhoff JL (1970). The role of brain dopamine in behavioral regulation and the actions of psychotropic drugs. *Am J Psychiatry.* **127**:199–207.
- Spano PF, Govoni S, Trabucchi M (1978). Studies on the pharmacological properties of dopamine receptors in various areas of the central nervous system. *Adv Biochem Psychopharmacol.* **19**:155-165.
- Steel RGD, Torrie JH. Principles and Procedures of Statistics: A Biomedical Approach, second ed., McGraw-Hill, Kogakusha, Ltd, Tokyo, 1980.
- Stella P, Ellis D, Maser RE, Orchard Tj (2000). Cardiovascular autonomic neuropathy (expiration and inspiration ratio) in type 1 diabetes: incidence and predictors. *J Diabetes Complications.* **14**:1-6.
- Stephens GJ (2009). G-protein-coupled-receptor-mediated presynaptic inhibition in the cerebellum. *Trends Pharmacol Sci.* **30**:421-430.
- Stephens GJ, Mochida S (2005). G protein  $\beta\gamma$  subunits mediate presynaptic inhibition of transmitter release from rat superior cervical ganglion neurones in culture. *J Physiol.* **563**:765-776.
- Suman RK, Ray Mohanty I, Borde MK, Maheshwari U, Deshmukh YA (2016). Development of an experimental model of diabetes co-existing with metabolic syndrome in rats. *Adv Pharmacol Sci.* **2016**:9463476.
- Sumiyoshi T, Ichikawa J, Meltzer HY (1997). The effect of streptozotocin-induced diabetes on dopamine<sub>2</sub>, serotonin<sub>1A</sub> and serotonin<sub>2A</sub> receptors in the rat brain. *Neuropsychopharmacology.* **16**:183-190.
- Szkudelski T (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* **50**:537-546.



- Szot P, Lester M, Laughlin ML, Palmiter RD, Liles LC, Weinshenker D (2004). The anticonvulsant and proconvulsant effects of alpha2-adrenoreceptor agonists are mediated by distinct populations of alpha2A-adrenoreceptors. *Neuroscience*. **126**: 795-803.
- Takasu N, Komiya YA I, Asawa T, Nagasawa Y, Yamada T (1991). Streptozotocin- and alloxan-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation and DNA fragmentation in pancreatic islets. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as mediator for DNA fragmentation. *Diabetes*. **40**:1141-1145.
- Talley EM, Rosin DL, Lee A, Guyenet PG, Lynch KR (1996). Distribution of alpha 2A-adrenergic receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*. **372**:111–134.
- Taskiran M, Rasmussen B, Fritz-Hansen T, Larsson HB, Jensen GB, Hilsted J (2004). Left ventricular dysfunction in normotensive type 1 diabetic patients: the impact of autonomic neuropathy. *Diabet Med*. **21**:524-530.
- Telci A, Cakatay U, Salman S, Satman I, Sivas A (2000). *Diabetes Res Clin Pract*. **50**:213-223.
- Thackeray JT, Beanlands RS, Dasilva JN (2012). Altered sympathetic nervous system signalling in the diabetic heart: emerging targets for molecular imaging. *Am J Nucl Med Mol Imaging*. **3**:314-334.
- Threlfell S, Cragg SJ, Kalló I, Turi GF, Coen CW, Greenfield SA (2004). Histamine H<sub>3</sub> receptors inhibit serotonin release in substantia nigra pars reticulata. *J Neurosci*. **24**:8704-8710.
- Thulesen J, Orskov C, Holst JJ, Poulsen SS (1997). Short-term insulin treatment prevents the diabetogenic action of streptozotocin in rats. *Endocrinology*. **138**:62-68.
- Thurmond RL, Desai PJ, Dunford PJ, Fung-Leung WP, Hofstra CL, Jiang W, et al. (2004). A potent and selective histamine H<sub>4</sub> receptor antagonist with anti-inflammatory properties. *J Pharmacol Exp Ther*. **309**:404-413.



- Tomlinson KC, Gardiner SM, Hebden A, Bennett T (1992). Functional consequences of streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular reference to the cardiovascular system. *Pharmacol Rev.* **44**:103-150.
- Tomlinson DR, Yusof AP (1983). Autonomic neuropathy in the aloxan diabetic rat. *J Auton Pharmacol.* **3**:257-263.
- Tortora GJ, Derrickson B (2007). Introduction to the human body: The essentials of anatomy and physiology. 7 ed. John Wiley & Sons. Uuuuuy New York, NY.
- Trendelenburg AU, Philipp M, Meyer A, Klebroff W, Hein L, Starke K (2003). All three alpha2-adrenoceptor types serve as autoreceptors in postganglionic sympathetic neurons. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **368**: 504-512.
- Turk J, Corbett JA, Ramanadham S, Bohrer A, McDaniel ML (1993). Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun.* **197**:458-1464.
- Usiello A, Baik JH, Rouge´-Pont F, Picetti R, Dierich A, LeMeur M, et al. (2000). Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature.* **408**:199-203.
- Vanhoutte PM, Miller VM (1989). Alpha2-adrenoceptors and endothelium-derived relaxing factor. *Am J Med.* **87**:1S–5S.
- Vergès B (2009). Lipid disorders in type 1 diabetes. *Diabetes Metab.* **35**:353-360.
- Vermeulen I, Weets I, Asanghanwa M, Ruige J, Van Gaal L, Mathieu C, et al. (2011). Contribution of antibodies against IA-2 $\beta$  and zinc transporter 8 to classification of diabetes diagnosed under 40 years of age. *Diabetes care.* **34**:1760-1765.



- Villalón CM, Centurión D, del Mar Fernández M, Morán A, Sánchez-López A (1999). 5-Hydroxytryptamine inhibits the tachycardia induced by selective preganglionic sympathetic stimulation in pithed rats. *Life Sci.* **64**:1839-1847.
- Villamil-Hernández MT, Alcántara-Vázquez O, Sánchez-López S, Centurión D (2013). The  $\alpha_2$ -adrenoceptors mediating inhibition of the vasopressor sympathetic outflow in pithed rats: pharmacological correlation with  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  and  $\alpha_{2C}$  subtypes. *Eur J Pharmacol.* **718**:31-38.
- Vinik AI, Maser RE, Mitchell BD, Feerman R (2003). Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes Care.* **26**:1553-1579.
- Wang GS, Chang NC, Wu SC, Chan AC (2002). Regulated expression of alpha2B adrenoceptor during development. *Dev Dyn.* **225**:142-152.
- Weaver DC, McDaniel M, Lacy PE (1978). Alloxan uptake by isolated rat islets of Langerhans. *Endocrinology.* **102**:1847-1855.
- Weiner DM, Levey AI, Sunahara RK, Niznik HB, O'Dowd BF, Seeman P, et al. (1991). D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* **88**:1859-1863.
- Westfall TC, Westfall DP (2006). The autonomic and somatic motor neuron systems. In: Goodman LS, Gilman A, Brunton LL, Lzado JS, Parker KL. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. Cap. 5. 11 ed. Ed. McGraw-Hill: New York. 137-177.
- Willems JL, Buylaert WA, Lefebvre RA, Bogaert MG (1985). Neuronal dopamine receptors on autonomic ganglia and sympathetic nerves and dopamine receptors in the gastrointestinal system. *Pharmacol Rev.* **37**:165-216.
- Witte DR, Tesfaye S, Chaturvedi N, Eaton SE, Kempler P, Fuller JH, et al. (2005). Risk factors for cardiac autonomic neuropathy in type 1 diabetes. *Diabetologia.* **48**:167-171.



- Woodman OL, Vatner SF (1987). Coronary vasoconstriction mediated by alpha 1- and alpha 2-adrenoceptors in conscious dogs. *Am J Physiol.* **253**:H388-H393.
- Yamasaki T, Tamai I, Matsumura Y (2001). Activation of histamine H3 receptors inhibits renal noradrenergic neurotransmission in anesthetized dogs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **280**:R1450-R1456.
- Zamponi GW, Snutch TP (1998). Modulation of voltage-dependent calcium channels by G proteins. *Curr Opin Neurobiol.* **8**:351-356.
- Zapata A, Shippenberg TS (2002) D(3) receptor ligands modulate extracellular dopamine clearance in the nucleus accumbens. *J Neurochem.* **81**:1035-1042.
- Zhu Y, Michalovich D, Wu H, Tan KB, Dytko GM, Mannan IJ, et al. (2001). Cloning, expression, and pharmacological characterization of a novel human histamine receptor. *Mol Pharmacol.* **59**:434–441.

## APÉNDICES

### PROTOCOLOS EXPERIMENTALES ADICIONALES

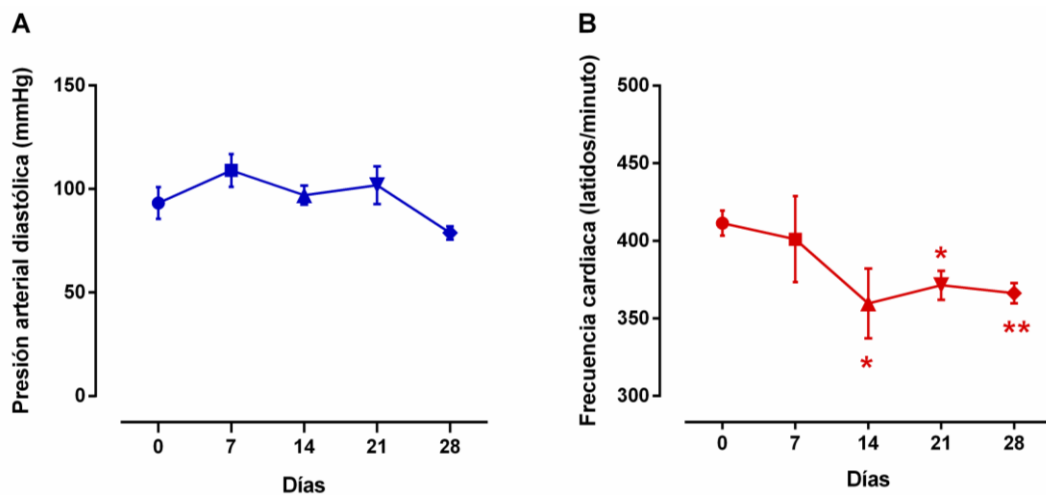
#### 1.1. Determinación de la frecuencia cardiaca y presión arterial diastólica en ratas despiertas antes y después de cuatro semanas de la administración de STZ

Se ha demostrado que en modelos experimentales de diabetes mellitus (inducidos con STZ), existen alteraciones en la frecuencia cardiaca, pero no en la presión arterial diastólica o media, durante los primeros 14 días después de la administración de STZ (Hicks et al., 1997). En este sentido, nos propusimos evaluar posibles cambios en la frecuencia cardiaca y presión arterial diastólica en nuestro modelo experimental de diabetes (STZ; 50 mg/kg, i.p) antes y hasta las 4 semanas de la administración de STZ. Para este propósito, las ratas despiertas y en libre movimiento (n=6), fueron colocadas en contenedores de plástico para restringir su movimiento. Posteriormente, se colocó manguito de presión con un sensor de pulso en la cola del animal. Se permitió que las ratas se habituaran a este procedimiento de pretismografía durante 3 días antes de realizar los experimentos. Los valores de frecuencia cardiaca y presión arterial diastólica se registraron utilizando un pretismógrafo Pressuremeter modelo LE 5001, Panlab, Barcelona, España); antes (día 0), y cada 7 días después de la administración de STZ (50 mg/kg), durante 28 días. Se obtuvieron al menos tres lecturas consecutivas para cada animal.

En la Figura 14 se muestran los valores de presión arterial diastólica y frecuencia cardiaca en ratas despiertas, monitoreada antes y hasta las 4 semanas después de la administración de STZ. En cuanto a la presión arterial diastólica (Figura 14A), los valores del día 0, 7, 14 21 y 28 fueron, respectivamente:  $93 \pm 8$ ,  $109 \pm 8$ ,  $97 \pm 10$ ,  $102 \pm 9$  y  $78 \pm 7$  mm Hg, no observándose diferencia significativa *versus* el día 0 ( $P > 0.05$ , antes de la

administración de STZ). Por otra parte, los valores de frecuencia cardiaca (Figura 14B) al día 0, 7, 14, 21 y 28 fueron, respectivamente,  $411 \pm 8$ ,  $401 \pm 28$ ,  $*360 \pm 8$ ,  $*371 \pm 9$  y  $**366 \pm 7$  latidos por minuto (\* $P < 0.05$  vs día cero; \*\* $P < 0.01$  vs día cero).

La disminución en los valores de la frecuencia cardiaca, podrían relacionarse con cambios en el control neuroendocrino o en las propiedades electrofisiológicas del corazón (Hicks et al., 1997), así como a cambios en el control autonómico asociados a los cambios metabólicos producidos por la STZ (Schaan et al., 1997).



**Figura 14. Cambios en la presión arterial diastólica (A) y en la frecuencia cardiaca (B) en ratas despiertas con cuatro semanas de evolución de DM tipo I. *t*-Student, \* $P < 0.05$  día 0 vs. día 14 o 21. \*\* $P < 0.01$  día 0 vs. día 28.**

## 1.2. Determinación de grupos carbonilos en ratas normoglicémicas y diabéticas

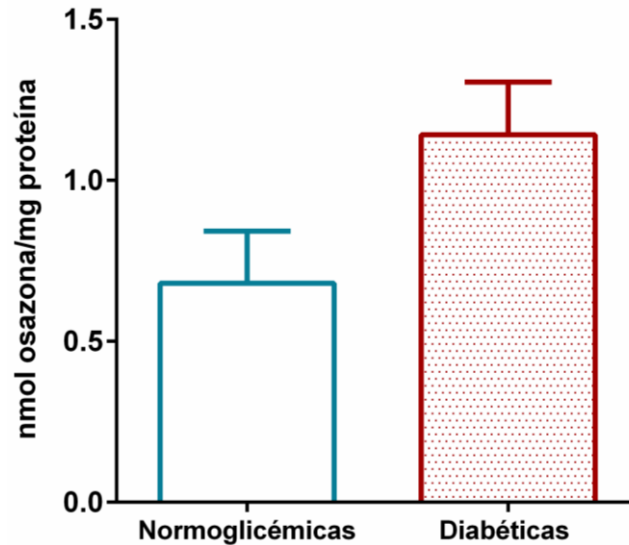
Se ha reportado que el estrés oxidativo y las especies reactivas de oxígeno tienen un papel importante en la etiología y/o progresión de algunas enfermedades en los humanos (Halliwell y Gutteridge, 1999). Los grupos carbonilos, son el principal marcador de oxidación de proteínas (Berlett y Stadtman, 1997; Chevion et al., 2000; Beal, 2002), y la acumulación





de proteínas carbonilo (carbonyl proteins) ha sido observada en la diabetes mellitus (Rahangdale et al., 2009). Uno de los métodos para la detección de grupos carbonilos en las proteínas involucra su reacción con la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), la cual conlleva a la formación de 2,4-dinitrofenilhidrazona (Levine et al., 1990; Levine et al., 1994). Para este propósito, los grupos carbonilos libres fueron medidos usando 50  $\mu$ l de suero de ratas normoglicémicas o de ratas diabéticas (después de cuatro semanas de la administración del buffer citrato de sodio o STZ, respectivamente; n=5 cada grupo) y 500  $\mu$ l de DNPH 10 mM. La absorbancia fue medida a 375 nm para detectar la formación de dinitrofenilhidrazonas (Reznick y Packer, 1994). Este producto fue corregido por la cantidad de proteína en la muestra; parámetro determinado por el método de Lowry (Lowry et al., 1951).

En la Figura 15 se muestran las concentraciones de carbonilos, expresadas en nmoles de osazonas formadas por mg de proteína contenidos en la muestra. En ratas normoglicémicas y diabéticas, la concentración de carbonilos fue de  $0.68 \pm 0.16$  y  $1.14 \pm 0.16$  nmol de osazonas por mg de proteína, respectivamente. Aunque estos valores no fueron estadísticamente significativos ( $P > 0.05$ ), se observa la tendencia de un incremento en la concentración de grupos carbonilos en ratas diabéticas en comparación con las normoglicémicas. Estos datos; (i) podrían sugerir que existe daño oxidativo en estos animales; (ii) son consistentes con estudios realizados en humanos, en donde se reporta que existe un incremento en la concentración de carbonilos durante la diabetes mellitus (Telci et al., 2000); e (iii) indican que dicho incremento en la concentración de grupos carbonilo puede ser un marcador temprano de estrés oxidativo (Reznick y Packer, 1994)



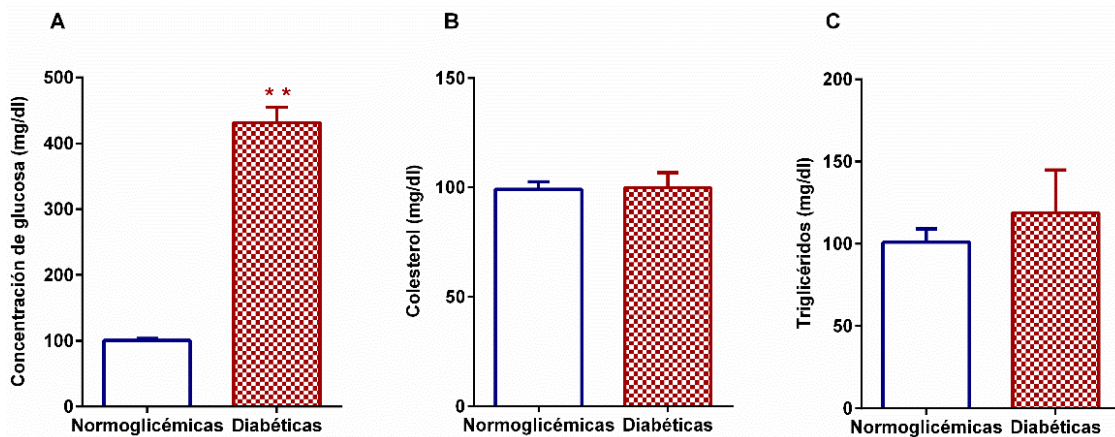
**Figura 15. Cuantificación de grupos carbonilos en sueros de ratas normoglicémicas y ratas diabéticas.** La cuantificación de grupos carbonilos se realizó después de cuatro semanas de la administración del vehículo (buffer citrato de sodio) o STZ, respectivamente. *t*-Student,  $P > 0.05$  ( $n=6$  cada grupo).

### 1.3. Determinación de metabolitos bioquímicos en ratas normoglicémicas y diabéticas

La DM I comprende un grupo de enfermedades metabólicas caracterizada por una hiperglucemia crónica (Kharroubi y Darwish, 2015), así como por alteraciones en los lípidos plasmáticos (Vergès, 2009). Se ha reportado, que en modelos animales de diabetes (inducidos con STZ), existen incrementos en las concentraciones de glucosa sanguínea (Hicks et al., 1998). Por otra parte, en pacientes con DM I, existe un decremento en las concentraciones plasmáticas de colesterol HDL (lipoproteína de alta densidad) y un incremento en colesterol LDL (lipoproteína de baja densidad); así como hipertrigliceridemia (Guy et al., 2009). Con base en estos antecedentes, se determinó por medio de ensayos colorimétricos, la concentración de glucosa, colesterol total y triglicéridos utilizando 2  $\mu$ l de suero de ratas normoglicémicas y diabéticas después de cuatro semanas de la administración del vehículo (buffer citrato de sodio) o STZ, respectivamente ( $n=6$  cada grupo), 2  $\mu$ l del

calibrador para cada metabolito, y 200  $\mu$ l de reactivo para glucosa, colesterol total y triglicéridos. El procedimiento se realizó de acuerdo a las instrucciones de cada kit, y la absorbancia fue medida a 546 nm. Estos procedimientos se realizaron con la finalidad de poder confirmar algunas características que ocurren durante la DM I y validarlas en el modelo empleado en este proyecto.

En la figura 16 se muestran las concentraciones de glucosa (A), colesterol total (B) y triglicéridos (C) en ratas normoglicémicas y diabéticas. Los valores de glucosa en sangre fueron estadísticamente significativos ( $P < 0.01$ ) en ratas diabéticas en comparación con las normoglicémicas ( $100 \pm 3$  mg/dl y  $432 \pm 23$  mg/dl, respectivamente; Figura 16A). En cuanto a las concentraciones de colesterol total, los valores en ratas normoglicémicas y diabéticas no presentaron diferencia estadísticamente significativa ( $P > 0.05$ ,  $99 \pm 4$  mg/dl y  $100 \pm 7$  mg/dl; respectivamente, Figura 16B). Por otra parte, las concentraciones de triglicéridos en ratas normoglicémicas y diabéticas fueron de  $101 \pm 8$  mg/dl y  $119 \pm 26$  mg/dl, respectivamente. Aunque estos valores no fueron diferentes estadísticamente ( $P > 0.05$ ; Figura 16C), se observa la tendencia de un incremento en la concentración de triglicéridos en ratas diabéticas en comparación con las normoglicémicas.



**Figura 16. Concentración de metabolitos bioquímicos: (A) glucosa, (B) colesterol total, (C) triglicéridos; determinados en suero de ratas normoglicémicas y diabéticas. \*\* $P < 0.01$  (n=6 cada grupo).**

## ANEXOS

### SECCIÓN I: RESÚMENES DE PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES

- 1.1 **Rivera-Mancilla E**, Altamirano-Espinoza AH, Manrique-Maldonado G, Villanueva-Castillo B & Villalón CM. Papel de los subtipos de receptores D<sub>2</sub>-like en la simpato inhibición cardiaca en ratas diabéticas. *LIX Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas*. Campeche, Campeche, México. 14-18 de agosto, 2016.
- 1.2 Villanueva-Castillo B, **Rivera-Mancilla E**, Altamirano-Espinoza AH, Manrique-Maldonado G & Villalón CM. The role of dopamine D<sub>2</sub>-like receptors in the inhibition of the cardioaccelerator sympathetic outflow in diabetic pithed rats. *46th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2016)*. San Diego, CA, USA. November 12<sup>th</sup>-16<sup>th</sup>, 2016.
- 1.3 **Rivera-Mancilla E**, Altamirano-Espinoza AH, Manrique-Maldonado G, Villanueva-Castillo B & Villalón CM. Pharmacological evidence that  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  and  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptor subtypes inhibit the cardioaccelerator sympathetic outflow in diabetic pithed rats. *Winter Meeting of the British Pharmacological Society*. London, U.K. December 13<sup>th</sup>-15<sup>th</sup>, 2016.
- 1.4 Villalón CM, **Rivera-Mancilla E**, Altamirano-Espinoza AH, Manrique-Maldonado G & Villanueva-Castillo B. The specific role of dopamine D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> and D<sub>4</sub> receptor subtypes in quinpirole-induced inhibition of the cardioaccelerator sympathetic outflow in diabetic pithed rats. *Winter Meeting of the British Pharmacological Society*. London, U.K. December 13<sup>th</sup>-15<sup>th</sup>, 2016.
- 1.5 Villalón-Herrera CM, **Rivera-Mancilla E**, Villanueva-Castillo B, Altamirano-Espinoza AH, Manrique-Maldonado G. Cambios farmacológicos en los receptores catecolaminérgicos que inhiben el tono simpático cardioacelerador en ratas diabéticas. *LX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas*. Monterrey, México. Agosto 13 - 17, 2017.



## SECCIÓN II: ARTÍCULOS ORIGINALES DE INVESTIGACIÓN

- 3.1 Rivera-Mancilla E**, Altamirano-Espinoza AH, Manrique-Maldonado G, Villanueva-Castillo B, Villalón CM (2018). Differential cardiac sympatho-inhibitory responses produced by the agonists B-HT 933, quinpirole and immpip in normoglycemic and diabetic pithed rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **45**:767-778.



Received: 20 February 2018 | Revised: 22 March 2018 | Accepted: 10 April 2018

DOI: 10.1111/1440-1681.12949

## ORIGINAL ARTICLE

WILEY CEPP Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology

## Differential cardiac sympatho-inhibitory responses produced by the agonists B-HT 933, quinpirole and immapip in normoglycaemic and diabetic pithed rats

Eduardo Rivera-Mancilla | Alain H Altamirano-Espinoza |  
Guadalupe Manrique-Maldonado | Belinda Villanueva-Castillo | Carlos M Villalón 

Department of Pharmacobiology, Cinvestav-Coapa, Mexico City, Mexico

**Correspondence**Carlos M Villalón, Department of Pharmacobiology, Cinvestav-Coapa, Mexico City, Mexico.  
Email: cvillalon@cinvestav.mx**Funding information**

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología; CONACyT, Grant/Award Number: 219707

**Summary**

This study compared the cardiac sympatho-inhibitory responses produced by agonists at  $\alpha_2$ -adrenergic (B-HT 933), dopamine  $D_2$ -like (quinpirole) and histamine  $H_3/H_4$  (immapip) receptors between normoglycaemic and streptozotocin-pretreated (diabetic) pithed rats. Intravenous (i.v.) continuous infusions of B-HT 933, quinpirole or immapip were used in normoglycaemic and diabetic pithed rats to analyse their sympatho-inhibitory effects on the electrically-stimulated cardioaccelerator sympathetic outflow. Both in normoglycaemic and diabetic animals, B-HT 933 (until 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  per minute) and quinpirole (until 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  per minute) inhibited the tachycardic responses to electrical sympathetic stimulation, but not those to i.v. bolus of exogenous noradrenaline. These sympatho-inhibitory responses were more pronounced in diabetic than in normoglycaemic animals. Accordingly, the areas under the curve for 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  per minute B-HT 933 and 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  per minute quinpirole in diabetic rats ( $1065 \pm 70$  and  $920 \pm 35$ , respectively) were significantly smaller ( $P < .05$ ) than those in normoglycaemic rats ( $1220 \pm 45$  and  $1360 \pm 42$ , respectively). In contrast, immapip infusions produced cardiac sympatho-inhibition in normoglycaemic (until 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  per minute), but not in diabetic (until 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  per minute) animals. Our results suggest that in diabetic pithed rats: (i) the more pronounced cardiac sympatho-inhibition to B-HT 933 and quinpirole may be probably due to up-regulation of  $\alpha_2$ -adrenergic and dopamine  $D_2$ -like receptors, respectively; (ii) the histamine  $H_3/H_4$  receptors do not seem to play a sympatho-inhibitory role; and (iii) there is a differential participation of  $\alpha_2$ -adrenergic and dopamine  $D_2$ -like receptors, which may certainly represent therapeutic targets for the treatment of diabetic complications such as cardiovascular autonomic neuropathy.

**KEYWORDS** $\alpha_2$ -Adrenoceptors, cardioaccelerator sympathetic outflow,  $D_2$ -like receptors, diabetes,  $G_{i/o}$ -protein coupled receptors,  $H_3/H_4$  receptors, sympatho-inhibition

## 1 | INTRODUCTION

It has previously been shown in normoglycaemic pithed rats that the sympathetic tachycardic responses produced by selective preganglionic spinal ( $C_7-T_1$ ) stimulation (but not those by exogenous noradrenaline) are inhibited during i.v. continuous infusions of: B-HT 933 ( $\alpha_2$ -adrenergic receptor agonist),<sup>1</sup> quinpirole (dopamine  $D_2$ -like receptor agonist)<sup>2</sup> or immepip (histamine  $H_3/H_4$  receptor agonist).<sup>3</sup> Moreover, the cardiac symptho-inhibition produced by these agonists is selectively blocked after i.v. administration of, respectively: (i) BRL44408 ( $\alpha_{2A}$ -adrenergic receptor antagonist) and MK912 ( $\alpha_{2C}$ -adrenergic receptor antagonist);<sup>1</sup> (ii) L-741,626 (dopamine  $D_2$  receptor subtype antagonist);<sup>2</sup> and (iii) thioperamide (histamine  $H_3$  receptor antagonist).<sup>3</sup> These receptor (sub) types are coupled to heterotrimeric  $G_{i/o}$  proteins<sup>4</sup> and have been associated with prejunctional modulation of the release of noradrenaline and other neurotransmitters in *in vitro* and *in vivo* models.<sup>4,5</sup>

On the other hand, in certain metabolic disorders such as *diabetes mellitus*, some abnormalities related with the above receptors have been demonstrated. For example, clinical studies<sup>6</sup> and experimental models of type 1 diabetes induced by streptozotocin (STZ)<sup>7</sup> are associated with alterations in the cardiovascular autonomic control which, in turn, is linked to changes in central and peripheral catecholaminergic systems,<sup>8</sup> as well as in receptor density.<sup>9,10</sup> Indeed, in STZ-pretreated (diabetic) rats: (i) the dopamine content is reduced in the nigrostriatal system, while the noradrenaline levels are decreased in the peripheral stellate ganglion;<sup>8</sup> (ii) plasma levels of noradrenaline, dopamine and histamine may be increased, unchanged or decreased, respectively,<sup>8,11-14</sup> and (iii) the central densities of  $\alpha_2$ -adrenergic receptors<sup>15</sup> and dopamine  $D_2$ -like receptors<sup>9,10</sup> are increased. However, these alterations at the peripheral or central level may change due to the duration and severity of this disease.<sup>8</sup>

Additionally, there is a differential activation of the  $\alpha_2$ -adrenergic receptor subtypes that inhibit the vasopressor sympathetic outflow when comparing diabetic and normoglycaemic pithed rats, namely: in diabetic pithed rats the vasopressor symptho-inhibition is mediated by  $\alpha_{2A}$ - and  $\alpha_{2B}$ -, but not by  $\alpha_{2C}$ -subtypes,<sup>16</sup> whereas in normoglycaemic pithed rats this symptho-inhibition involves the role of  $\alpha_{2A}$ -,  $\alpha_{2B}$ - and  $\alpha_{2C}$ - subtypes.<sup>17</sup> On this basis, the present study has compared the possible alterations in the cardiac symptho-inhibitory responses produced by agonists at  $\alpha_2$ -adrenergic (B-HT 933), dopamine  $D_2$ -like (quinpirole) and histamine  $H_3/H_4$  (immepip) receptors between normoglycaemic and STZ-pretreated (diabetic) pithed rats.

## 2 | RESULTS

### 2.1 | Effects of vehicle or streptozotocin on blood glucose, body weight and plasma pH values

As shown in Table 1, before and after 4 weeks of i.p. treatment with vehicle (citrate buffer) or STZ, the values of: (i) blood glucose (mg/dL) remained without significant changes after vehicle ( $T_{50} = 2170.5$ ;  $P = .808$ ), but markedly increased after STZ ( $T_{55} = 1540$ ;  $P < .001$ );

**TABLE 1** Blood glucose and body weight values in normoglycaemic ( $n = 56$ ) and diabetic ( $n = 61$ ) rats before and after 4 wk of the administration of vehicle or STZ. Plasma pH values were measured after the 4 wk -treatments in 6 normoglycaemic and 6 diabetic rats

	Normoglycaemic		Diabetic	
	Before	After	Before	After
Blood glucose (mg/dL)	107 ± 3	103 ± 1	104 ± 1	554 ± 7*
Body weight (g)	201 ± 2	288 ± 2*	413 ± 5	282 ± 3*
pH	7.497 ± 0.042		7.478 ± 0.032	

The  $pK_a$ 's of B-HT 933 (8.03), quinpirole (9.65) and immepip (10.62) [taken from ChEMBL data base (<https://www.ebi.ac.uk/chembl>)] suggest that these agonists may be dissociated to some extent at the above plasma pH values (implying that only the non-dissociated form of these compounds will be capable of reaching the biophase).

Note that there was no significant difference ( $P > .05$ ) between: (i) plasma pH values in normoglycaemic and diabetic animals; and (ii) body weight values after 4 wk of treatment with vehicle (normoglycaemic) and STZ (diabetic).

\* $P < .05$  vs before administration of vehicle (normoglycaemic) or STZ (diabetic), respectively.

(ii) body weight (g) increased after vehicle ( $T_{50} = 666$ ;  $P < .001$ ), but decreased after STZ ( $T_{55} = 4564$ ;  $P < .001$ ). These results are consistent with previous reports.<sup>7,16</sup>

Certainly, we used 2 different body weights for the administration of vehicle or STZ because the tachycardic responses induced by electrical stimulation are optimally obtained in animals weighing around 280 g.<sup>1-3</sup> In this respect, since the administration of STZ produced loss of body weight, as previously reported,<sup>7,16</sup> we used animals of approximately 400 g, which after 4 weeks had a body weight of approximately 280 g. Moreover, for the administration of vehicle we used animals of approximately 200 g, which increased their weight after 4 weeks to around 280 g (approximating that in diabetic rats; see Table 1).

On the other hand, as shown in Table 1, the plasma pH values in normoglycaemic and diabetic rats were not significantly different ( $t_6 = 0.344$  with 10 degrees of freedom,  $P = .738$ ), as previously reported.<sup>18</sup>

### 2.2 | Systemic haemodynamic variables

The baseline values of diastolic blood pressure and heart rate in normoglycaemic rats ( $n = 50$ ) were  $48 \pm 5$  mm Hg and  $257 \pm 5$  beats/min, respectively; while in diabetic rats ( $n = 55$ ), these values were  $51 \pm 1$  mm Hg and  $231 \pm 6^*$  beats/min ( $U = 855.5$ ;  $P < .001$ ), respectively. In both groups, these haemodynamic variables were not significantly modified after i.v. administration of gallamine ( $t_{50} = -2.750$  with 58 degrees of freedom,  $P = .180$ ;  $t_{50} = -1.238$  with 78 degrees of freedom,  $P = .269$ ;  $t_{55} = -0.687$  with 78 degrees of freedom,  $P = .786$ ;  $t_{55} = -1.382$  with 68 degrees of freedom,  $P = .108$ ) or desipramine ( $t_{50} = -1.737$  with 98 degrees of freedom,  $P = .086$ ;  $t_{50} = -1.879$  with

98 degrees of freedom,  $P = .063$ ;  $t_{55} = -1.630$  with 68 degrees of freedom,  $P = .108$ ;  $t_{55} = -0.247$  with 68 degrees of freedom,  $P = .806$  (given as i.v. bolus injection or i.v. continuous infusion). Moreover, the i.v. continuous infusions of vehicle (saline) ( $U = 312.5$ ,  $P = 1.0$ ) or the agonists B-HT 933 ( $\alpha_2$ -adrenergic) ( $U = 50$ ,  $P = 1.0$ ), quinpirole (dopamine  $D_2$ -like) ( $U = 50$ ,  $P = 1.0$ ) and immapip (histamine  $H_3/H_4$ ) ( $U = 50$ ,  $P = 1.0$ ) did not significantly modify the baseline values both diastolic blood pressure and heart rate (data not shown).

### 2.3 | Effect of i.v. continuous infusions of saline, B-HT 933 or quinpirole on the tachycardic responses produced by sympathetic stimulation or exogenous noradrenaline in normoglycaemic and diabetic rats

Figures 1 and 2 show the tachycardic responses induced by: (i) electrical sympathetic stimulation; and (ii) i.v. bolus injections of noradrenaline in normoglycaemic (upper panel) and diabetic (lower panel) rats. Both in normoglycaemic and diabetic animals infused with physiological saline, the tachycardic responses induced by electrical sympathetic stimulation (Figures 1A,E and 2A,E;  $F_{4,74} = 1.623$ ,  $P = .157$ ;  $F_{4,74} = .164$ ,  $P = .994$ ;  $F_{4,74} = .671$ ,  $P = .713$ ;  $F_{4,74} = .304$ ,  $P = .959$ ; respectively) or i.v. noradrenaline (Figures 1C,G and 2C,G;  $F_{4,49} = .541$ ,  $P = .708$ ;  $F_{4,49} = 2.567$ ,  $P = .078$ ;  $F_{4,49} = .602$ ,  $P = .667$ ;  $F_{4,49} = 1.389$ ,  $P = .282$ ; respectively) remained unchanged. In marked contrast, i.v. continuous infusions of: (i) B-HT 933 (30 and 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  per minute) produced a dose-dependent inhibition on the tachycardic responses to electrical sympathetic stimulation both in normoglycaemic ( $F_{4,74} = 4.078$ ,  $P = .002$ ; Figure 1B) as well as in diabetic ( $F_{4,74} = 9.106$ ,  $P < .001$ ; Figure 1F) animals; and (ii) quinpirole (3 and 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  per minute) produced a dose-dependent inhibition on the tachycardic responses to electrical sympathetic stimulation both in normoglycaemic ( $F_{4,74} = 21.726$ ,  $P < .001$ ; Figure 2B) as well as in diabetic ( $F_{4,74} = 46.988$ ,  $P < .001$ ; Figure 2F) animals. It is to be noted that this inhibition by B-HT 933 (Figure 1F) or quinpirole (Figure 2F) was more pronounced in diabetic (compared to normoglycaemic) animals, as shown in Tables 2 and 3. Accordingly, the areas under the curve (AUC) for 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  per minute BHT 933 and 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  per minute quinpirole in diabetic rats ( $1065 \pm 70$  and  $920 \pm 35$ , respectively) were significantly smaller ( $t_5 = .964$  with 8 degrees of freedom,  $P < .05$  and  $t_5 = 8.033$  with 8 degrees of freedom,  $P < .001$ ) than those in normoglycaemic rats ( $1220 \pm 45$  and  $1360 \pm 42$ , respectively; Tables 2 and 3). Since 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  per minute B-HT 933 or 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  per minute quinpirole produced a greater inhibition, these doses were chosen to analyse their effects on the tachycardic responses to i.v. bolus injections of exogenous noradrenaline. Unlike the inhibition observed on the sympathetic tachycardic responses, the noradrenaline-induced tachycardic responses remained unchanged in normoglycaemic ( $F_{4,49} = .841$ ,  $P = .519$  and  $F_{4,49} = .414$ ,  $P = .796$ ; Figures 1D and 2D) and diabetic ( $F_{4,49} = .684$ ,  $P = .614$  and  $F_{4,49} = 2.154$ ,  $P = .121$ ; Figures 1H and 2H) rats during these infusions of B-HT 933 and quinpirole, respectively.

### 2.4 | Effect of i.v. continuous infusions of saline or immapip on the tachycardic responses induced by electrical sympathetic stimulation in normoglycaemic and diabetic rats

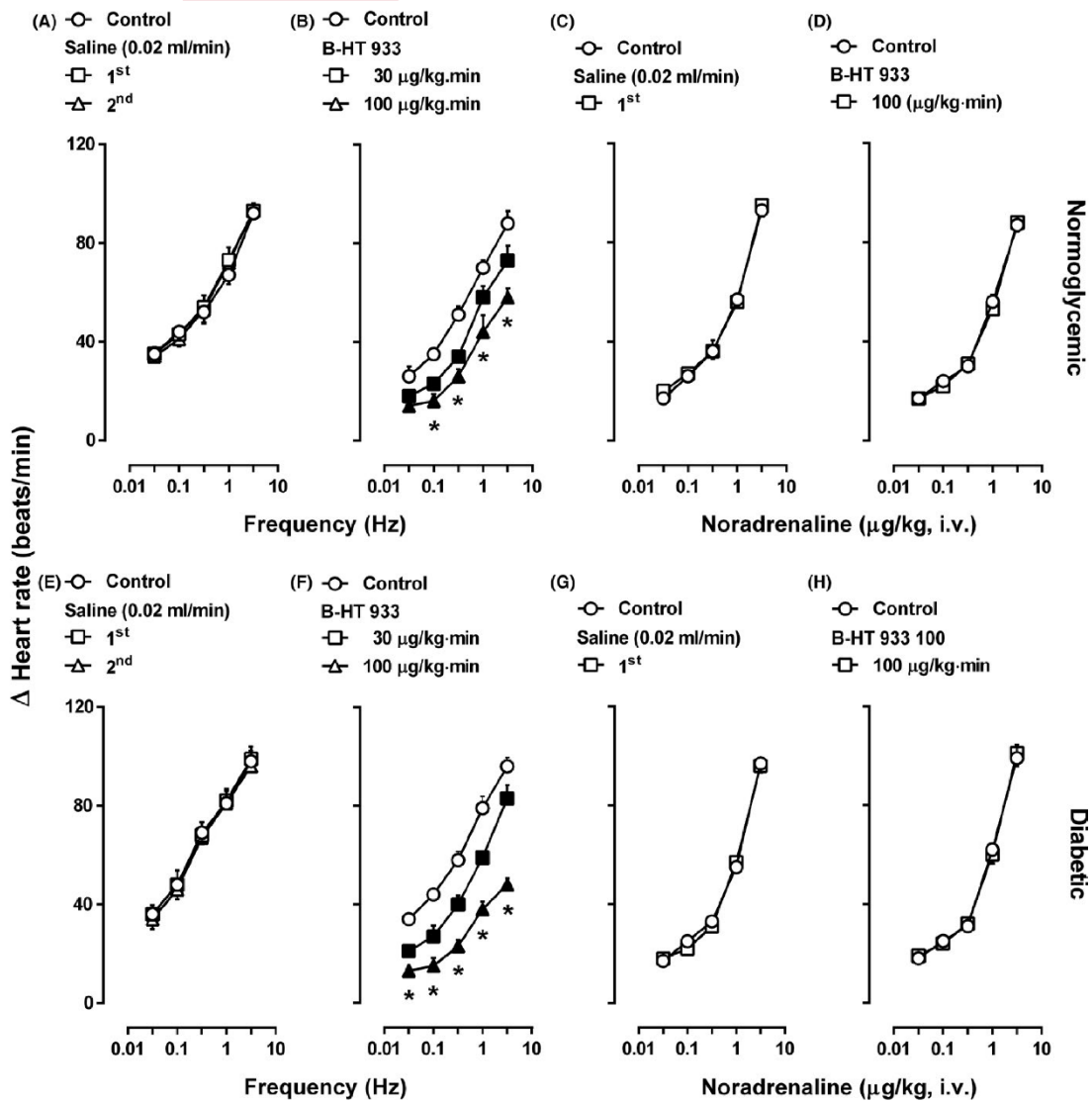
Figure 3 illustrates the tachycardic responses produced by electrical sympathetic stimulation in normoglycaemic (Figure 3A,B) and diabetic (Figure 3C-E) animals during the infusions of physiological saline or immapip. These tachycardic responses, which remained unchanged during i.v. continuous infusions of physiological saline (0.02 mL/min) in normoglycaemic (Figure 3A;  $F_{4,74} = .625$ ,  $P = .751$ ) and diabetic (Figure 3C;  $F_{4,74} = 1.147$ ,  $P = .361$ ) rats, were: (i) dose-dependently inhibited during the i.v. continuous infusions of 3 and 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  per minute immapip in normoglycaemic rats (Figures 3B and 4A;  $F_{4,74} = 4.013$ ,  $P = .002$ ), as previously reported by Pinacho-García et al.,<sup>3</sup> who also showed that these infusions of immapip did not inhibit the tachycardic responses to exogenous noradrenaline;<sup>3</sup> and (ii) resistant to inhibition during the i.v. continuous infusions of 3 and 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  per minute immapip (Figure 3D;  $F_{4,74} = .378$ ,  $P = .924$ ) and even by higher doses (30 and 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  per minute immapip; Figures 3E and 4B;  $F_{4,49} = 1.134$ ,  $P = .368$ ) in diabetic rats. In view of the latter findings (Figures 3D,E and 4B), we consider it unnecessary to analyse the effects of immapip on the noradrenaline-induced tachycardic responses in diabetic rats.

## 3 | DISCUSSION

### 3.1 | General

Based on the cardiac autonomic abnormalities previously shown in STZ-pretreated (diabetic) rats,<sup>8,16</sup> our study further shows differential alterations in the cardiac sympatho-inhibition produced by B-HT 933, quinpirole and immapip between normoglycaemic and STZ-pretreated (diabetic) pithed rats, namely, in diabetic animals: (i) the cardiac sympatho-inhibition produced by B-HT 933 and quinpirole is more pronounced than that in normoglycaemic rats (Figures 1 and 2; Tables 2 and 3); and (ii) immapip failed to produce cardiac sympatho-inhibition (Figures 3D,E and 4B), contrasting with normoglycaemic rats (Figures 3B and 4A). The simplest interpretation of these findings suggests that the cardioaccelerator sympathetic outflow in diabetic (as compared to normoglycaemic) rats involves a differential activation of  $\alpha_2$ -adrenergic, dopamine  $D_2$ -like and histamine  $H_3/H_4$  receptors. Admittedly, we did not measure directly the release of noradrenaline from sympathetic nerves, but it was determined indirectly by assessment of the evoked tachycardic responses induced by sympathetic stimulation, as previously reported.<sup>1-3,19</sup> In this respect, it is noteworthy that, unlike exogenous noradrenaline given i.v., sympathetic nerves can release, in addition to noradrenaline, several co-transmitters including neuropeptide Y, ATP, galanin, etc.;<sup>4</sup> accordingly, a postjunctional action of B-HT 933 and quinpirole (and also immapip in normoglycaemic animals) on these co-transmitters cannot be categorically excluded.



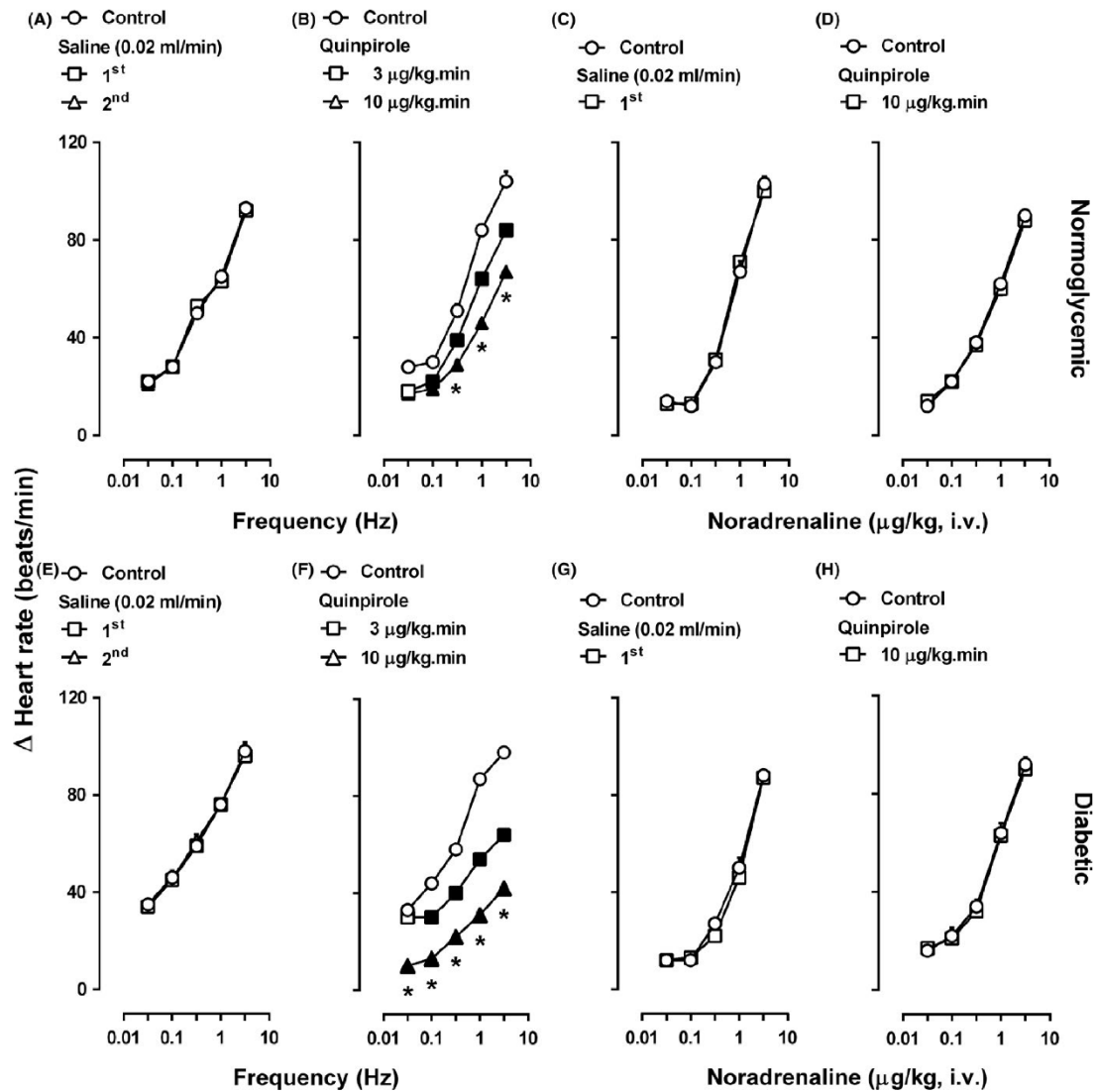


**FIGURE 1** Effect of B-HT 933 on the tachycardic responses induced by electrical sympathetic stimulation or exogenous noradrenaline in normoglycaemic and diabetic pithed rats. Tachycardic responses to electrical stimulation (A, B, E, F) or i.v. bolus injections of noradrenaline (C, D, G, H) in normoglycaemic (upper panel) and diabetic (lower panel) pithed rats, elicited during i.v. continuous infusions of saline (0.02 mL/min) or B-HT 933 (30 and 100 µg/kg per min for S-R curves and 100 µg/kg per min for D-R curves) ( $n = 5$  each subgroup). Empty symbols depict either control responses (○) or non-significant ( $P > .05$ ) responses (□, △) vs control. Solid symbols (■, ▲) represent significantly different responses ( $P < .05$ ) vs control. \* $P < .05$  vs 30 µg/kg per min B-HT 933

Accordingly, the responses to B-HT 933 and quinpirole were considered sympatho-inhibitory as these compounds inhibited the sympathetic tachycardic responses without affecting those by exogenous noradrenaline (Figures 1 and 2), as reported earlier.<sup>1,2,19</sup> Interestingly, immepip, which produces cardiac sympatho-inhibition in normoglycaemic rats<sup>3</sup> (Figures 3B and 4A), failed to do so in diabetic animals (Figures 3D,E and 4B).

### 3.2 | Systemic haemodynamic variables

Since pithed rats were used in this study: (i) the functionality of the central nervous system (e.g. baroreflex compensatory mechanisms and central effects of compounds) can be categorically excluded; and (ii) the baseline values of heart rate and diastolic blood pressure are both lower than those determined in anaesthetised (non-pithed) rats,



**FIGURE 2** Effect of quinpirole on the tachycardic responses induced by electrical sympathetic stimulation or exogenous noradrenaline in normoglycaemic and diabetic pithed rats. Tachycardic responses to electrical stimulation (A, B, E, F) or i.v. bolus of noradrenaline (C, D, G, H) in normoglycaemic (upper panel) and diabetic (lower panel) pithed rats, elicited during i.v. continuous infusions of saline (0.02 mL/min) or quinpirole (3 and 10 µg/kg per min for S-R curves and 10 µg/kg per min for D-R curves) ( $n = 5$  each subgroup). Empty symbols depict either control responses (○) or non-significant ( $P > .05$ ) responses (□, △) vs control. Solid symbols (■, ▲) represent significantly different responses ( $P < .05$ ) vs control. \* $P < .05$  vs 3 µg/kg per min quinpirole

which still have a neurogenic sympathetic tone.<sup>20</sup> Moreover, considering only pithed rats, the baseline values of heart rate in diabetic rats ( $231 \pm 6$  beats/min) were significantly lower ( $U = 855.5$ ;  $P < .001$ ) than those in normoglycaemic rats ( $257 \pm 5$  beats/min) (see Results section). These values are, somehow, consistent with those determined in conscious rats, in which the baseline values of heart rate at 0, 7, 14, 21 and 28 days after administration of STZ were, respectively:

$411 \pm 8$ ,  $401 \pm 28$ ,  $^{*}360 \pm 8$ ,  $^{*}371 \pm 9$  and  $^{*}366 \pm 7$  beats/min ( $^{*}t_8 = 3.171$  with 8 degrees of freedom,  $P = .011$ ;  $^{*}t_8 = 3.262$  with 8 degrees of freedom,  $P = .012$ ;  $^{*}t_8 = 4.374$  with 8 degrees of freedom,  $P = .002$ ;  $n = 6$ ; unpublished observations). Hence, these values indicate that after 14 days of STZ treatment the cardiac functionality (in terms of heart rate) is already altered. These significantly lower values of heart rate, irrespective of the experimental (pithed or

	Frequency (Hz)				
	0.03	0.1	0.3	1	3
	Percentage of inhibition (%)				
Normoglycaemic	41 ± 13	53 ± 9	49 ± 5	37 ± 9	34 ± 4
Diabetic	62 ± 5	66 ± 7	59 ± 7	52 ± 2	52 ± 2*

B-HT 933-induced cardiac sympatho-inhibition in normoglycaemic (AUC = 1220 ± 45; n = 5) and diabetic (AUC = 1065 ± 40\*; n = 5) pithed rats.

\*P < .05 vs normoglycaemic rats.

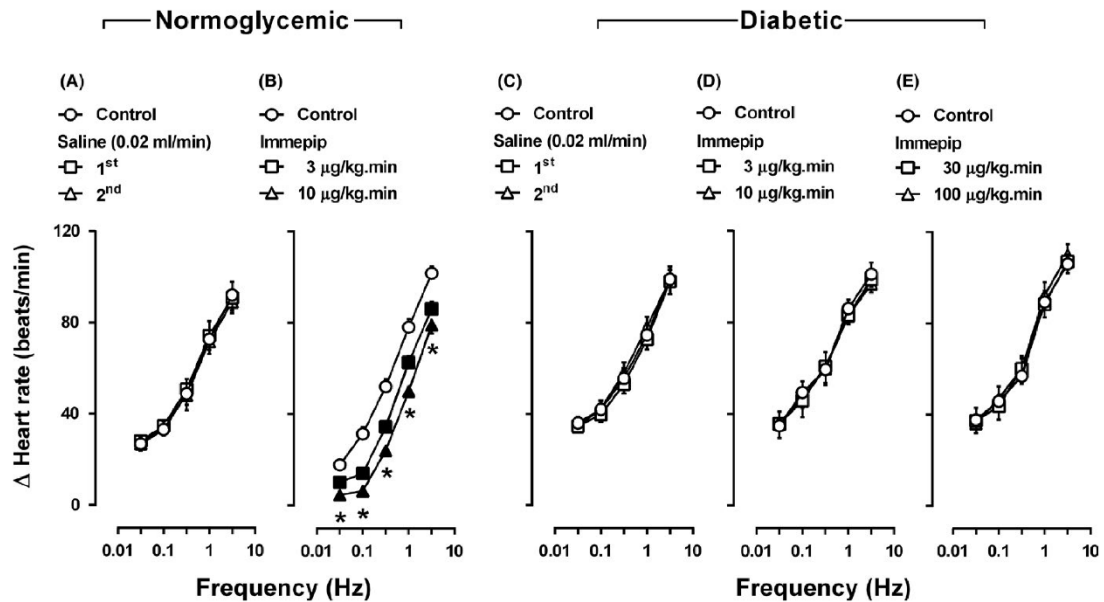
**TABLE 2** Percentage of inhibition produced by B-HT 933 (100 µg/kg per min) on sympathetically-induced tachycardic responses at different frequencies of stimulation (0.03-3 Hz) in normoglycaemic and diabetic pithed rats.

	Frequency (Hz)				
	0.03	0.1	0.3	1	3
	Percentage of inhibition (%)				
Normoglycaemic	39 ± 7	37 ± 3	43 ± 3	45 ± 4	35 ± 3
Diabetic	70 ± 1*	70 ± 4*	62 ± 2*	64 ± 2*	57 ± 2*

Quinpirole-induced cardiac sympatho-inhibition in normoglycaemic (AUC = 1360 ± 42; n = 5) and diabetic (AUC = 920 ± 35\*; n = 5) pithed rats.

\*P < .05 vs normoglycaemic rats.

**TABLE 3** Percentage of inhibition produced by quinpirole (10 µg/kg per min) on sympathetically-induced tachycardic responses at different frequencies of stimulation (0.03-3 Hz) in normoglycaemic and diabetic pithed rats.

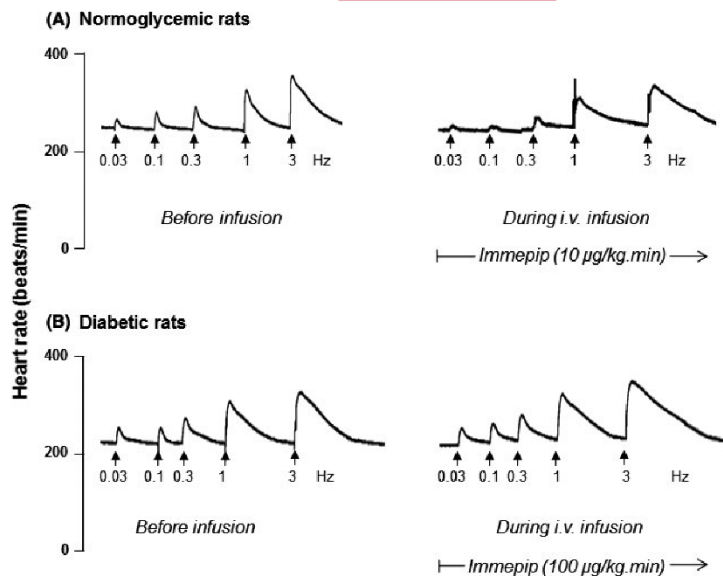


**FIGURE 3** Effect of immepip on the tachycardic responses induced by electrical sympathetic stimulation in normoglycaemic and diabetic pithed rats. Tachycardic responses to electrical sympathetic stimulation in (A, B) normoglycaemic and (C, D, E) diabetic pithed rats, elicited during i.v. continuous infusions of saline (0.02 mL/min) or immepip (3 and 10 µg/kg per min for normoglycaemic rats; and 3, 10, 30, and 100 µg/kg per min for diabetic rats) (n = 5 each subgroup). Empty symbols depict either control responses (○) or non-significant (P > .05) responses (□, △) vs control. Solid symbols (■, ▲) represent significantly different responses (P < .05) vs control. \*P < .05 vs 3 µg/kg per min immepip

conscious conditions, may be related with: (i) changes in the electrophysiological properties of the heart;<sup>7</sup> and/or (ii) alterations in the expression and/or density of cardiac β-adrenergic receptors during diabetes,<sup>21,22</sup> keeping in mind that modulation of cardiac function

is modulated by β-adrenergic receptors.<sup>23</sup> In contrast, the systemic vascular tone is not markedly affected in diabetic animals.<sup>7,16</sup> Consistent with this view, baseline values of diastolic blood pressure were not significantly different (U = 1103; P = .079): (i) in diabetic

**FIGURE 4** Differential effect of imnepip on the sympathetically-induced tachycardic responses in normoglycaemic and diabetic pithed rats. Original experimental recordings illustrating the increases in heart rate (beats/min) produced by electrical sympathetic stimulation (Hz) of the cardioaccelerator sympathetic outflow in (A) normoglycaemic and (B) diabetic pithed rats before the infusion (left panels) and during the i.v. continuous infusions of (right panel, A) imnepip 10 µg/kg per min or (right panel, B) 100 µg/kg per min. Diastolic blood pressure remained unchanged throughout the experiments (not shown). The second S-R curves (right panels) were elicited 10 min after the above infusions of imnepip had been commenced



( $51 \pm 1$  mm Hg) and normoglycaemic ( $48 \pm 5$  mm Hg) pithed rats (see Results section); and (ii) in conscious rats ( $93 \pm 8$ ,  $109 \pm 8$ ,  $97 \pm 10$ ,  $102 \pm 9$ ,  $78 \pm 7$  mm Hg,  $n = 6$ ; at 0, 7, 14, 21 and 28 days after STZ;  $t_6 = -1.434$  with 8 degrees of freedom,  $P = .189$ ;  $t_6 = -0.427$  with 8 degrees of freedom,  $P = .680$ ;  $t_6 = -.724$  with 8 degrees of freedom,  $P = .490$ ;  $t_6 = 1.746$  with 8 degrees of freedom,  $P = .119$ ; unpublished data). The reason(s) why baseline diastolic blood pressure, but not baseline heart rate, remains unaffected in diabetic animals remain(s) unknown, but it seems that cardiac  $\beta$ -adrenergic receptors are affected in STZ-pretreated (diabetic) animals.<sup>24</sup>

Furthermore, the fact that baseline values of diastolic blood pressure and heart rate remained unchanged during the infusions of B-HT 933, quinpirole and imnepip in control and diabetic animals (Results section) imply that these agonists: (i) were used at infusion rates and doses appropriate for investigating cardiac sympatho-inhibitory responses without systemic cardiovascular effects;<sup>1-3</sup> and (ii) interact directly with their corresponding receptors on sympathetic cardiac nerves.<sup>1-3</sup> Additionally, the fact that the sympathetically-induced tachycardic responses were not modified during vehicle (saline) infusions (Figures 1A,E, 2A,E and 3A,C) shows that: (i) the proposed sympatho-inhibition (by B-HT 933, quinpirole or imnepip) is not due to tachyphylaxis; and (ii) these responses are highly reproducible under our experimental conditions.

### 3.3 | Differential sympatho-inhibition produced by B-HT 933, quinpirole and imnepip in diabetic pithed rats: pharmacological comparison with normoglycaemic pithed rats

The fact that the sympatho-inhibition produced by 100 µg/kg per minute B-HT 933 (Figure 1F) and 10 µg/kg per minute quinpirole

(Figure 2F) in diabetic rats was more pronounced ( $t_5 = .964$  with 8 degrees of freedom,  $P < .05$  and  $t_5 = 8.033$  with 8 degrees of freedom,  $P < .001$ ) than that in normoglycaemic rats (see Tables 2 and 3), without affecting the tachycardic responses to exogenous noradrenaline (Figures 1H and 2H), suggests that under diabetic conditions there is a more predominant role of sympatho-inhibitory  $\alpha_2$ -adrenergic and dopamine  $D_2$ -like receptors. In close agreement with this suggestion, numerous studies in experimental models of diabetes induced by STZ have demonstrated that the catecholaminergic systems and the modulatory role of their receptors are altered.<sup>8,25</sup> For example, some authors have reported an increase in the density of central  $\alpha_2$ -adrenergic and dopamine  $D_2$ -like receptors in STZ-treated rats.<sup>9,10,15</sup> Certainly, our experimental pithed rat model cannot provide direct lines of evidence on the molecular mechanism(s) involved in the more predominant role of these receptors in STZ-pretreated animals. Nonetheless, some possible hypotheses may include (but are not limited to) an increase in: (i) activation of  $G_{i/o}$  proteins and functional cardiac sympatho-inhibition; (ii) tissue-dependent factors such as the density of receptors (i.e.  $\alpha_2$ -adrenergic and dopamine  $D_2$ -like receptors) and coupling efficiency; and/or (iii) drug-dependent factors such as the affinity of noradrenaline and dopamine (as the endogenous ligands) and related agonists (i.e. B-HT 933 and quinpirole) for each of these receptors. Clearly, the studies required for exploring these hypotheses would warrant further experiments that fall beyond the scope of the present investigation.

Surprisingly, when exploring the cardiac sympatho-inhibitory action of imnepip (a histamine  $H_3/H_4$  receptor agonist) in diabetic (compared to normoglycaemic) pithed rats, we found that even at doses 1-log unit higher (Figures 3D,E and 4B) than those in normoglycaemic rats (Figures 3B and 4A) failed to produce cardiac sympatho-inhibition. Indeed, 3 and 10 µg/kg per minute imnepip



are high enough to interact with H<sub>3</sub> (but not H<sub>4</sub>) prejunctional receptors modulating cardiovascular responses in normoglycaemic pithed rats.<sup>3,26</sup> Hence, our findings suggest that, unlike in normoglycaemic rats,<sup>3</sup> the histamine H<sub>3</sub>/H<sub>4</sub> receptors do not play a cardiac sympatho-inhibitory role in diabetic rats. In this respect, it may be argued that pharmacokinetic factors (which would be relevant had plasma pH markedly changed) could be involved in the inactivity of immpip in diabetic rats. However, the fact that plasma pH did not significantly differ from that in normoglycaemic animals excludes this possibility.

However, it is noteworthy that histamine H<sub>3</sub> and H<sub>4</sub> receptors are overexpressed in kidneys of STZ-pretreated (diabetic) rats,<sup>27,28</sup> most probably as a compensatory mechanism for the cardiovascular autonomic neuropathy produced in individuals with diabetes.<sup>29</sup>

### 3.4 | Possible molecular mechanisms involved in the cardiac sympatho-inhibition by activation of prejunctional $\alpha_2$ -adrenergic, dopamine D<sub>2</sub>-like and histamine H<sub>3</sub>/H<sub>4</sub> receptors

Admittedly, our study provides no direct evidence for the specific molecular mechanisms underlying the cardiac sympatho-inhibitory responses produced by B-HT 933, quinpirole and immpip. Notwithstanding, other studies have shown that prejunctional  $\alpha_2$ -adrenergic, dopamine D<sub>2</sub>-like and histamine H<sub>3</sub>/H<sub>4</sub> receptors' signalling is mediated by heterotrimeric G<sub>10</sub> proteins that, amongst other effects, inhibit adenylyl cyclase activity, inactivate Ca<sup>2+</sup> channels and/or activate inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels.<sup>4,5</sup> These are signal transduction systems usually associated with sympatho-inhibition.<sup>4,5</sup>

### 3.5 | Potential clinical implications

From a clinical perspective, cardiac sympatho-inhibitory  $\alpha_2$ -adrenergic and dopamine D<sub>2</sub>-like receptors in diabetic individuals may certainly represent therapeutic targets for the treatment of diabetic complications such as cardiovascular autonomic neuropathy (CAN). In this context, during the course of CAN (the most important form of diabetic autonomic neuropathy), a reduced cardiovascular autonomic function (as measured by heart rate variability) seems to double the relative risk of silent myocardial ischaemia and mortality.<sup>29</sup> Admittedly, further *in vivo* studies are required to explore if selective ligands for the above receptors are effective in CAN treatment.

In conclusion, after excluding the potential role of pharmacokinetic factors, of our results suggest a differential participation of the sympatho-inhibitory  $\alpha_2$ -adrenergic, dopamine D<sub>2</sub>-like and histamine H<sub>3</sub>/H<sub>4</sub> receptors that modulate the cardioaccelerator sympathetic outflow in diabetic (as compared to normoglycaemic) pithed rats, since: (i) B-HT 933 and quinpirole produced a more potent cardiac sympatho-inhibition; and (ii) immpip failed to produce cardiac sympatho-inhibition (unlike its effects in normoglycaemic rats).<sup>3</sup> Hence, these findings can lead to a better understanding of the cardiac sympatho-inhibitory roles, and differential contributions, of  $\alpha_2$ -adrenergic, dopamine D<sub>2</sub>-like and histamine H<sub>3</sub>/H<sub>4</sub> receptors in the early stages of diabetes. Further studies with subtype-selective

$\alpha_{2A/2B/2C}$ -adrenoceptor antagonists and subtype-selective D<sub>2/3/4</sub> receptor antagonists will shed further light on specific subtypes mediating the potentiation of their respective cardiac sympatho-inhibitory responses.

## 4 | MATERIAL AND METHODS

### 4.1 | Bioethical agreement

A total of 117 male normotensive Wistar rats (200–400 g) were used in the present study. The animals were housed in a special room at a constant temperature (22 ± 2°C) and humidity (50%), and maintained at a 12 hour/12 hour light/dark cycle (light beginning at 7.00 am), with *ad libitum* access to food and water. The experimental protocols of the present investigation were approved by our Institutional Ethics Committee on the use of animals in scientific experiments (CICUAL-Cinvestav; permission protocol number 0139-15) and followed the regulations established by the Mexican Official Norm (NOM-062-ZOO-1999), in full compliance with: (i) the guide for the Care and Use of Laboratory Animals in USA; and (ii) the ARRIVE guidelines for reporting experiments involving animals.<sup>30</sup>

### 4.2 | Compounds

Apart from the anaesthetic (sodium pentobarbital), the compounds used in the present study (all obtained from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) were the following: streptozotocin, citric acid, sodium citrate, desipramine hydrochloride, gallamine triethiodide, noradrenaline hydrochloride, 6-ethyl-5,6,7,8-tetrahydro-4H-oxazol o[4,5-d]azepin-2-amine dihydrochloride (B-HT 933 dihydrochloride), immpip dihydrobromide, (±)-quinpirole dihydrochloride. All compounds were dissolved in physiological saline, except: (i) streptozotocin, which was dissolved in citrate buffer (0.1 mol/L; pH = 4.5). These vehicles had no effect on the baseline values of diastolic blood pressure or heart rate (not shown). Fresh solutions were prepared for each experiment. The doses mentioned in this text refer to the free base of substances, except in the case of desipramine, gallamine, noradrenaline and B-HT 933, where they refer to the corresponding salts.

### 4.3 | General methods

The rats (n = 117) were initially divided into 2 main sets, namely, set 1 (diabetic rats, n = 61) and set 2 (normoglycaemic rats, n = 56). In set 1, diabetes was induced by an intraperitoneal (i.p.) injection of STZ (50 mg/kg) which was dissolved in citrate buffer (pH = 4.5); whereas set 2 received an ip injection of vehicle (citrate buffer, 1 mL/kg) as previously reported.<sup>16</sup> Both sets were kept for 4 weeks. Blood glucose levels and body weight were determined before and weekly after administration of STZ or vehicle. It is noteworthy that in set 1 all rats were considered for experimentation as they displayed elevated blood glucose levels (i.e. >16.7 mmol/L or >300 mg/dL)<sup>2</sup> at all time-points. In all animals, blood glucose levels were measured using

Accu-Chek strips and a glucometer (Accu-Chek Performa, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany); and the body weight was measured using a triple beam granatary balance (Animal scale, Ohaus, Brandford, MA, USA).

After 4 weeks of treatment with STZ or vehicle, all animals were initially anaesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg, i.p.). The adequacy of anaesthesia was judged by the absence of ocular reflexes, a negative tail flick test and corporal relaxation, amongst others. At this point, 6 normoglycaemic and 6 STZ-pretreated rats were used for measurements of blood plasma pH (see section 4.4.5. below). The rest of the rats ( $n = 105$ ) consisted of set 1 ( $n = 55$ ) and set 2 ( $n = 50$ ) that were used for pharmacological experiments in pithed animals (Figure 5). After cannulation of the trachea, the rats were pithed by inserting a stainless steel rod through the ocular orbit and *foramen magnum* into the vertebral *foramen*.<sup>16</sup> Immediately afterwards, the animals were artificially ventilated with room air using an Ugo Basile pump (56 strokes/min and a stroke volume of 20 mL/kg; Ugo Basile Srl, Comerio, VA, Italy), as described earlier by Kleinman and Radford.<sup>31</sup> After cervical bilateral vagotomy, catheters were placed in: (i) the left and right femoral veins for the continuous infusions of agonists (or vehicle) and bolus injections of gallamine/desipramine, respectively; and (ii) the left carotid artery, connected to a Grass pressure transducer (P23XL, Grass Instrument Co., Quincy, MA, USA) for the recording of blood pressure. Heart rate was measured with a tachograph (7P4F, Grass Instrument Co., Quincy, MA, USA) triggered from the blood pressure signal. Both blood pressure and heart rate were recorded simultaneously by a model 7D Grass polygraph (Grass Instrument Co., Quincy, MA, USA). Then, the responses to i.v. continuous infusions of vehicle (physiological saline) or the agonists at  $\alpha_2$ -adrenergic, dopamine  $D_2$ -like and histamine  $H_3/H_4$  receptors were investigated on the tachycardic responses

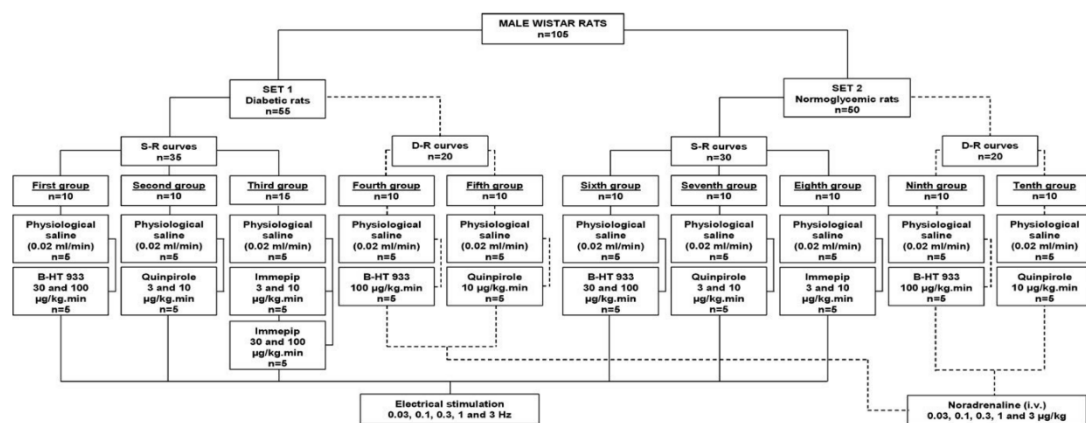
induced by: (i) selective preganglionic spinal ( $C_7-T_1$ ) electrical stimulation of the cardioaccelerator sympathetic outflow ( $n = 65$ , i.e. 35 rats from set 1 and 30 rats from set 2); or (ii) i.v. bolus injections of exogenous noradrenaline ( $n = 40$ , i.e. 20 rats from set 1 and 20 rats from set 2). The tachycardic stimulus-response (S-R) curves and the dose-response (DR) curves elicited by, respectively, preganglionic sympathetic electrical stimulation and exogenous noradrenaline were completed in about 30 minutes, with no changes in the baseline values of resting heart rate or blood pressure. The sympathetic tachycardic stimulation (0.03–3 Hz) and the i.v. dosing with exogenous noradrenaline (0.03–3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) were given using a sequential schedule in 0.5 log unit increments, at 5 minute intervals. The body temperature of each pithed rat was maintained at 37°C by a lamp and monitored with a rectal thermometer.

#### 4.4 | Experimental protocols

For the purpose of analysing the sympatho-inhibitory effects of the agonists on the tachycardic responses induced by electrical stimulation or i.v. bolus injections of exogenous noradrenaline, the 2 sets of rats were divided into different pretreatment groups and, subsequently, into the different subgroups ( $n = 5$  each, with no exception), as depicted in Figure 5.

##### 4.4.1 | Protocol I: Selective electrical stimulation of the cardioaccelerator sympathetic outflow

In 65 pithed rats (i.e. 35 from set 1 and 30 from set 2; see Figure 5), the pithing rod was replaced by an electrode enamelled except for 1 cm length 7 cm from the tip, so that the uncovered segment was situated at  $C_7-T_1$  of the spinal cord to allow selective preganglionic



**FIGURE 5** Experimental protocols. Number of animals utilized in the 2 main sets, namely: (i) set 1 (diabetic rats; divided into 5 groups); and (ii) set 2 (normoglycaemic rats; divided into 5 groups), and their subsequent subdivision into the different subgroups ( $n = 5$  each, with no exception) used in the present study. The animals in set 1 ( $n = 55$ ) received i.v. continuous infusions of physiological saline, B-HT 933, quinpirole or immeipip in the different subgroups. On the other hand, set 2 ( $n = 50$ ) received i.v. continuous infusions of physiological saline, B-HT 933, quinpirole or immeipip in the different subgroups



stimulation of the cardioaccelerator sympathetic outflow.<sup>19</sup> Before electrical stimulation, the animals were pretreated with gallamine (25 mg/kg, i.v.) to avoid electrically-induced muscular twitching. As the cardiac sympatho-inhibitory responses to several agonists in pithed rats are more pronounced at lower frequencies of stimulation, all animals were systematically pretreated with desipramine (a noradrenaline reuptake inhibitor; 50 µg/kg, i.v.) 10 minutes before each S-R curve.<sup>19</sup>

After a stable haemodynamic condition for a least 30 minutes, baseline values of diastolic blood pressure (a more accurate indicator of peripheral vascular resistance) and heart rate were determined. Then, the preganglionic cardiac sympathetic outflow was stimulated by applying trains of 10 s, consisting of monophasic rectangular pulses of 2 ms duration and 50 V, at increasing frequencies of stimulation (0.03, 0.1, 0.3, 1 and 3 Hz). When heart rate had returned to baseline levels, the next frequency was applied. Subsequently, the 65 animals were divided into 6 groups, namely: (i) first group (n = 10 diabetic); (ii) second group (n = 10 diabetic); (iii) third group (n = 15 diabetic); (iv) sixth group (n = 10 normoglycaemic); (v) seventh group (n = 10 normoglycaemic); and (vi) eighth group (n = 10 normoglycaemic) (see Figure 5 above for further details).

The first (n = 10 diabetic) and sixth (n = 10 normoglycaemic) groups were each subdivided further into 2 subgroups (n = 5 each) that received an i.v. continuous infusion of: (i) physiological saline (0.02 mL/min, given twice); and (ii) B-HT 933 (30 and 100 µg/kg per minute). After 10 min, a S-R curve was performed during the infusion of physiological saline or B-HT 933 (see Figure 5).

The second (n = 10 diabetic) and seventh (n = 10 normoglycaemic) groups were each subdivided further into 2 subgroups (n = 5 each), which received an i.v. continuous infusion of: (i) physiological saline (0.02 mL/min, given twice); and (ii) quinpirole (3 and 10 µg/kg per minute). Ten minutes after starting the infusion of each compound, an S-R curve was performed during the infusion of these compounds (Figure 5).

The third (n = 15 diabetic) and eighth (n = 10 normoglycaemic) groups were subdivided into 3 and 2 subgroups (n = 5 each), respectively. The 3 diabetic subgroups (n = 5 each) received an i.v. continuous infusion of: (i) physiological saline (0.02 mL/min, given twice); (ii) immpip (3 and 10 µg/kg per minute); or (iii) immpip (30 and 100 µg/kg per minute). On the other hand, the 2 normoglycaemic subgroups (n = 5 each) received an i.v. continuous infusion of: (i) physiological saline (0.02 mL/min, twice); or (ii) immpip (3 and 10 µg/kg per minute). Ten minutes after starting the infusion of each compound, an S-R curve was performed during the infusion of physiological saline or immpip in both groups (Figure 5).

#### 4.4.2 | Protocol II: Intravenous bolus injections of exogenous noradrenaline

The remaining 40 rats, representing the fourth, fifth, ninth and tenth groups (i.e. 20 rats from set 1 and 20 rats from set 2, see Figure 5) were prepared as described above, but the pithing rod was left and the administration of both gallamine and desipramine was omitted,

as previously described.<sup>16</sup> After a stable haemodynamic condition for 30 minutes, baseline values of diastolic blood pressure and heart rate were determined. Then, the animals received i.v. bolus injections of exogenous noradrenaline at increasing doses (0.03, 0.1, 0.3, 1 and 3 µg/kg) in order to produce dose-dependent tachycardic responses. When heart rate had returned to baseline values, the next dose was applied. This procedure was systematically performed until the D-R curve was completed. Subsequently, the fourth (diabetic) and ninth (normoglycaemic) groups were each divided further into 2 subgroups (n = 5 each) that received an i.v. continuous infusion of, respectively: (i) physiological saline (0.02 mL/min); and (ii) B-HT 933 (100 µg/kg per minute). On the other hand, the fifth (diabetic) and tenth (normoglycaemic) groups were each divided into 2 subgroups (n = 5 each) that received, an i.v. continuous infusion of, respectively: (i) physiological saline (0.02 mL/min); and (ii) quinpirole (10 µg/kg per minute). In both groups, 10 minutes later, a D-R curve to i.v. bolus injections of noradrenaline was elicited again during the infusions of the above compounds.

#### 4.4.3 | Other procedures applying to protocols I and II

The doses of B-HT 933, quinpirole, immpip and saline were infused at a rate of 0.02 mL/min using a WPI model sp100i pump (World Precision Instruments Inc., Sarasota, FL, USA). The intervals between the different stimulation frequencies or noradrenaline doses depended on the duration of the tachycardic responses (5-10 minutes), as in each case we waited until heart rate had returned to baseline values.

#### 4.4.4 | Determination of the AUC for the cardiac sympatho-inhibition produced by B-HT 933 and quinpirole in normoglycaemic and diabetic rats

The AUC for the sympatho-inhibitory responses to B-HT 933 and quinpirole in normoglycaemic and diabetic rats was calculated by the trapezoidal method using: (i) the data of the S-R curves elicited in both normoglycaemic and diabetic rats during the continuous infusions of B-HT 933 (100 µg/kg per minute) and quinpirole (10 µg/kg per minute); and (ii) Prism 6 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).<sup>32</sup>

#### 4.4.5 | Measurements of blood plasma pH in normoglycaemic and diabetic rats

Blood samples were collected from the femoral veins of 6 normoglycaemic and 6 STZ-pretreated animals, transferred to plasma separator tubes with K<sub>2</sub>EDTA (BD Microtainer, Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ, USA), and centrifuged at 1000 g during 15 minutes at 4°C. Plasmas were obtained and processed for pH measurements. The pH was measured using an glass-body combination pH electrode (HI 1131B) coupled to a pH meter HI 2210 (Hanna Instruments Inc. Highland Industrial Park, Woonsocket, RI, USA), as previously established.<sup>33</sup>



#### 4.5 | Data presentation and statistical evaluation

All data in the text and figures are presented as the mean  $\pm$  SEM. It is noteworthy that the data and statistical analysis used in the present study comply with the recommendations on experimental design and analysis in pharmacology, including that the data subjected to statistical analysis should have a minimum of  $n = 5$  independent samples/individuals per group.<sup>34</sup> Initially, the difference between the changes in blood glucose and body weight in normoglycaemic and diabetic animals was evaluated using the Mann-Whitney  $U$  test. The peak changes in heart rate produced by either electrical sympathetic stimulation or exogenous noradrenaline in the physiological saline-, B-HT 933-, quinpirole- and immpip-infused animals were determined. The difference in the baseline values of diastolic blood pressure and heart rate within 1 subgroup of animals before and during the continuous infusions of saline or agonists (at the doses mentioned above) was evaluated with paired Student's  $t$ -test.

Moreover, the difference between the changes in heart rate within 1 subgroup of animals was evaluated with the Student-Newman-Keuls' test, once a two-way repeated measures analysis of variance (randomized block design) had revealed that the samples represented different populations.<sup>35</sup> Statistical significance was accepted at  $P < .05$  (two-tailed). The  $U$ -,  $t$ - and  $F$ -values, as well as the degrees of freedom and  $P$ -values are reported for the each statistical comparison (i.e. blood glucose, corporal weight, pH values, or pharmacological treatments).

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Mr. Mauricio Villasana, M.Sc. Miguel Ángel Rosas-Lezama and Engr. José Rodolfo Fernández-Calderón for their technical assistance, and Prof. Dr. Enrique Hong for allowing us to measure diastolic blood pressure and heart rate in conscious rats in his lab. The present study was financially supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT; grant No. 219707; Mexico City).

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

#### ORCID

Carlos M Villalón  <http://orcid.org/0000-0003-4117-1343>

#### REFERENCES

- Cobos-Puc LE, Villalón CM, Sánchez-López A, Lozano-Cuenca J, Pertz HH, Görnemann T, et al. Pharmacological evidence that  $\alpha_{2A}$ - and  $\alpha_{2C}$ -adrenoceptors mediate the inhibition of cardioaccelerator sympathetic outflow in pithed rats. *Eur J Pharmacol.* 2007;554:205-211.
- Altamirano-Espinoza AH, González-Hernández A, Manrique-Maldonado G, Marichal-Cancino BA, Ruiz-Salinas I, Villalón CM. The role of dopamine  $D_2$ , but not  $D_3$  or  $D_4$ , receptor subtypes, in quinpirole-induced inhibition of the cardioaccelerator sympathetic outflow in pithed rats. *Br J Pharmacol.* 2013;170:102-111.
- Pinacho-García M, Marichal-Cancino BA, Villalón CM. Further evidence for the role of histamine  $H_3$ , but not  $H_1$ ,  $H_2$  or  $H_4$ , receptors in immpip-induced inhibition of the rat cardioaccelerator sympathetic outflow. *Eur J Pharmacol.* 2016;773:85-92.
- Boehm S, Kubista H. Fine tuning of sympathetic transmitter release via ionotropic and metabotropic presynaptic receptors. *Pharmacol Rev.* 2002;54:43-99.
- De Jong AP, Verhage M. Presynaptic signal transduction pathways that modulate synaptic transmission. *Curr Opin Neurobiol.* 2009;19:245-253.
- Roy TM, Peterson HR, Snide HL, Cyrus J, Broadstone VL, Fell RD, et al. Autonomic influence on cardiovascular performance in diabetic subjects. *Am J Med.* 1989;87:382-388.
- Hicks KK, Seifen E, Stimers JR, Kennedy RH. Effects of streptozotocin-induced diabetes on heart rate, blood pressure and cardiac autonomic nervous control. *J Auton Nerv Syst.* 1998;69:21-30.
- Gallego M, Seitién R, Izquierdo MJ, Casis O, Casis E. Diabetes-induced biochemical changes in central and peripheral catecholaminergic systems. *Physiol Rev.* 2003;52:735-741.
- Lozovsky D, Saller CF, Kopin IJ. Dopamine receptor binding is increased in diabetic rats. *Science.* 1981;214:1031-1033.
- Sumiyoshi T, Ichikawa J, Meltzer HY. The effect of streptozotocin-induced diabetes on dopamine<sub>2</sub>, serotonin<sub>1A</sub>, and serotonin<sub>2A</sub> receptors in the rat brain. *Neuropsychopharmacology.* 1997;16:183-190.
- Fushimi H, Inoue T, Kishini B, Nishikawa M, Tochino Y, Funakawa S, et al. Abnormalities in plasma catecholamine response and tissue catecholamine accumulation in streptozotocin diabetic rats: a possible role for diabetic autonomic neuropathy. *Life Sci.* 1984;35:1077-1081.
- James J, Padayatti PS, Paul T, Paulose CS. Platelet monoamine changes in diabetic patients and streptozotocin-induced diabetic rats. *Curr Sci.* 1997;72:137-139.
- Hollis TM, Kern JA, Enea NA, Cosgarea AJ. Changes in plasma histamine concentration in the streptozotocin-diabetic rat. *Exp Mol Pathol.* 1985;43:90-96.
- Gill DS, Barradas MA, Fonseca VA, Dandona P. Plasma histamine concentrations are elevated in patients with diabetes mellitus and peripheral vascular disease. *Metabolism.* 1998;38:243-247.
- Padayatti PS, Paulose CS. Alpha<sub>2</sub> adrenergic and high affinity serotonergic receptor changes in the brain stem of streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci.* 1999;65:403-414.
- Altamirano-Espinoza AH, Manrique-Maldonado G, Marichal-Cancino BA, Villalón CM. Specific role of  $\alpha_{2A}$ - and  $\alpha_{2B}$ -, but not  $\alpha_{2C}$ -, adrenoceptor subtypes in the inhibition of the vasopressor sympathetic out-flow in diabetic pithed rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2015;117:31-38.
- Villamil-Hernández MT, Alcántara-Vázquez O, Sánchez-López S, Centurión D. The  $\alpha_2$ -adrenoceptors mediating inhibition of the vasopressor sympathetic outflow in pithed rats: pharmacological correlation with  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  and  $\alpha_{2C}$  subtypes. *Eur J Pharmacol.* 2013;718:31-38.
- Okorodudu AO, Adegboyega PA, Scholz CI. Intracellular calcium and hydrogen ions in diabetes mellitus. *Ann Clin Lab Sci.* 1995;25:394-401.
- Villalón CM, Centurión D, del Mar FM, Morán A, Sánchez-López A. 5-Hydroxytryptamine inhibits the tachycardia induced by selective preganglionic sympathetic stimulation in pithed rats. *Life Sci.* 1999;64:1839-1847.
- Centurión D, Glusa E, Sánchez-López A, Valdivia LF, Saxena PR, Villalón CM. 5-HT<sub>7</sub>, but not 5-HT<sub>2B</sub>, receptors mediate hypotension in vagosympathectomized rats. *Eur J Pharmacol.* 2004;502:239-242.





21. Dincer UD, Bidasee KR, Guner S, Tay A, Ozcelikay AT, Altan VM. The effect of diabetes on expression of beta<sub>1</sub>-, beta<sub>2</sub>-, and beta<sub>3</sub>-adrenoceptors in rat hearts. *Diabetes*. 2001;50:455-461.
22. Sellers DJ, Chess-Williams R. The effect of streptozotocin-induced diabetes on cardiac beta-adrenoceptor subtypes in the rat. *J Auton Pharmacol*. 2001;21:15-21.
23. Hoffman BB. Catecholamines, sympathomimetic drugs, and adrenergic receptor antagonists. In: Hardman JG, Limbird LE, Goodman Gilman A, eds. *Goodman & Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th edn. New York, NY: McGraw-Hill; 2001.
24. Atkins FL, Dowell RT, Love S. beta-Adrenergic receptors, adenylate cyclase activity, and cardiac dysfunction in the diabetic rat. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1985;7:66-70.
25. Figlewicz DP, Brot MD, McCall AL, Szot P. Diabetes causes differential changes in CNS noradrenergic and dopaminergic neurons in the rat: a molecular study. *Brain Res*. 1996;736:54-60.
26. Manrique-Maldonado G, Altamirano-Espinoza AH, Marichal-Cancino BA, Rivera-Mancilla E, Avilés-Rosas V, Villalón CM. Pharmacological evidence that histamine H<sub>3</sub> receptors inhibit the vasodepressor responses by selective stimulation of the rat perivascular sensory CGRPergic outflow. *Eur J Pharmacol*. 2015;754:25-31.
27. Pini A, Chazot PL, Veglia E, Moggio A, Rosa AC. H<sub>3</sub> receptor renal expression in normal and diabetic rats. *Inflamm Res*. 2015;64:271-273.
28. Rosa AC, Grange C, Pini A, Katebe MA, Benetti E, Collino M, et al. Overexpression of histamine H<sub>3</sub> receptors in the kidney of diabetic rat. *Inflamm Res*. 2013;62:357-365.
29. Vinik AI, Maser RE, Mitchell BD, Feerman R. Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes Care*. 2003;26:1553-1579.
30. McGrath JC, Drummond GB, McLachlan EM, Kilkenny C, Wainwright CL. Guidelines for reporting experiments involving animals: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol*. 2010;160:1573-1576.
31. Kleinman LI, Radford EP. Ventilation standards for small mammals. *J Appl Physiol*. 1964;19:360-362.
32. Tallarida RJ, Murray RB. *Manual of Pharmacologic Calculations: With Computer Programs*, 2nd edn. New York, NY: Springer-Verlag; 1987.
33. Upton PK, Morgan DJ. The effect of sampling technique on some blood parameters in the rat. *Lab Anim*. 1975;9:85-91.
34. Curtis MJ, Bond RA, Spina D, Ahluwalia A, Alexander SP, Giembycz MA, et al. Experimental design and analysis and their reporting: new guidance for publication in BJP. *Br J Pharmacol*. 2015;172:3461-3471.
35. Steel RGD, Torrie JH. *Principles and Procedures of Statistics: A Biomedical Approach*, 2nd edn. Tokyo, Japan: McGraw-Hill, Kogakusha; 1980.

**How to cite this article:** Rivera-Mancilla E, Altamirano-Espinoza AH, Manrique-Maldonado G, Villanueva-Castillo B, Villalón CM. Differential cardiac sympatho-inhibitory responses produced by the agonists B-HT 933, quinpirole and immepip in normoglycaemic and diabetic pithed rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2018;45:767-778. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12949>

El jurado designado por el Departamento de Farmacobiología Sede Sur, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, aprueba la tesis:

**Análisis farmacológico del papel diferencial de los subtipos de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ , dopaminérgicos d<sub>2</sub>-like y de los receptores histaminérgicos h<sub>3</sub>/h<sub>4</sub> que inhiben el tono simpático cardioacelerador en ratas wistar macho normoglicémicas y diabéticas**

Que presenta el M. en C. Eduardo Rivera Mancilla para su examen final de Doctor en Ciencias en la Especialidad de Neurofarmacología y Terapéutica Experimental, el día 31 de agosto de 2018.

---

**Dr. Carlos Miguel Villalón Herrera**  
Investigador Cinvestav 3F

---

**Dra. Luisa Lilia Rocha Arrieta**  
Investigador Cinvestav 3D

---

**Dra. Norma Leticia Gómez Viquez**  
Investigador Cinvestav 3A

---

**Dr. José Antonio Arias Montaña**  
Investigador Cinvestav 3C

---

**Dr. Guillermo Manuel Ceballos Reyes**  
Profesor Titular C  
Escuela Superior de Medicina  
Instituto Politécnico Nacional



**Cinvestav**  
**Departamento de Farmacobiología**