



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

Departamento de Farmacobiología

Sede Sur

**El Indorrenato como posible tratamiento de la diabetes mellitus tipo II;
farmacopatología, actividad farmacológica y sinergismo con la metformina en un
modelo establecido en ratas macho de la cepa Wistar**

Tesis que presenta

Biol. Exp. Saúl Gaona Domínguez

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Director de la Tesis

Dr. Enrique Hong Chong

Ciudad de México

Agosto 2021

Este trabajo se realizó en el laboratorio 1 del Departamento de Farmacobiología del CINVESTAV-IPN Sede Sur, bajo la dirección de Dr. Enrique Hong Chong. Para el desarrollo de esta tesis se contó con el apoyo de CONACYT, a través de la beca de maestría otorgada.

AGRADECIMIENTOS

A Dr. Enrique Hong por todo su apoyo y confianza en mí, por permitirme contribuir, aportar datos, ideas y entusiasmarme con los hallazgos.

A mis Síodos, el Dr. Francisco J. López Muñoz, por su paciencia, por estimular siempre la búsqueda de nuevos datos y por hacerme siempre preguntas muy interesantes. A la Dra. Fengyang Huang por sus consejos y apoyo en el proyecto.

Al asistente de investigación M. en C. Miguel Ángel Rosas Lezama y a la técnica M. en C. Miriam Torres. Gracias por todo su apoyo durante la pandemia y su esfuerzo por ayudarme siempre que los necesité con dudas en mis experimentos.

A los profesores del Cinvestav Sede Sur, por todos sus conocimientos compartidos, por sus enseñanzas personales e institucionales, las cuales fueron recibidas con aprecio.

A mis amigos Martín, Itzel, Daniel, Quique, Gaby y Monse por estar siempre ahí para hablar y apoyarnos en todo. A todos mis compañeros por hacer más divertido el tiempo que pasamos en el CINVESTAV.

A mis profesores y amigos; Dr. Ignacio Camacho Arroyo, Dr. Juan Ocampo Lopez, Dr. Rayn Clarence Aarland y Dra. Maria del Rosario Tarragó Castellanos. Por su apoyo externo en la realización de este proyecto.

A mis colegas M. en C. Carmen Janin Zamora, Claudia Bello y Gabriela Piña, por compartir y apoyarme en el inicio de este protocolo, y por sus consejos y asesoría que me ayudaron mucho a lograr un buen protocolo ("Sólo faltó un poco de Serotonina").

DEDICATORIA

A la memoria de Bruno Sánchez Rodríguez y Rufino Gaona, dos personas cercanas a mi familia que padecieron diabetes mellitus por más de 30 años, quienes me mostraron el valor de seguir adelante a pesar de cualquier enfermedad.

A mis padres (Genaro Gaona de Lucio y Ma. Gloria Domínguez López) por el apoyo y los valores recibidos durante mi formación académica, por enseñarme a no rendirme.

A todos mis sobrinos, por estar siempre ahí para jugar conmigo y distraerme de las presiones diarias.

A mi amada esposa Mariana Mendoza Castillo, por ser la persona más importante en mi vida. También por apoyarme siempre en cualquier proyecto, guiarme y tener toda la paciencia del mundo.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	IX
RESUMEN	XI
ABSTRACT	XII
I. Introducción	1
1. La diabetes	1
1.1. Clasificación de la diabetes	1
1.2. Diabetes en México	2
2. Metabolismo de la glucosa.....	2
2.1. La insulina	4
2.2. Receptor de insulina	5
3. Fármacos para el tratamiento de la diabetes mellitus	6
3.1. Enfermedades cardiovasculares	6
3.1.1. Disfunción endotelial y la DM2	7
3.2. Metformina y control glucémico	9
3.3. Serotonina (5-HT).....	10
3.3.1. La serotonina y su efecto en el control de la glucosa.....	12
4. Indorrenato, análogo del receptor 5-HT ₂	15
II. Hipótesis	16
III. Objetivos	16
1. Generales	16
2. Particulares	16
IV. Material y métodos	17
1. Modelo de diabetes tipo II.....	17
2. Prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO).....	17
3. Órgano Aislado (Estudio sobre la aorta de las ratas)	18
3.1. Protocolo de las respuestas contráctiles y relajantes.....	19
4. Índice viscerosomático	19
5. Histología.....	19
6. Formación de los grupos experimentales.....	20
6.1. Estudio preliminar	20
6.2. Experimento I	20
6.3. Experimento II	21
V. Resultados	23
1. Estudio preliminar	23

1.1.	Índices viscerosomáticos.....	23
1.2.	Análisis histológico.....	26
2.	Experimento I: acción del indorrenato en la DM tipo 2.....	28
2.1.	Estudio de órgano aislado	28
2.2.	Índice Viserosomático	35
2.3.	Análisis histológico.....	39
3.	Experimento 2. Interacción metformina e indorrenato	41
VI.	<i>Discusión</i>.....	45
1.	Disfunción endotelial	45
2.	Glándula adrenal.....	46
3.	Tejidos involucrados en la homeostasis de la glucosa.....	48
4.	Interacción combinación Indorrenato y metformina	50
VII.	<i>Conclusiones</i>.....	51
VIII.	<i>Perspectivas</i>.....	53
IX.	<i>Bibliografía</i>	54
IX.	<i>Anexos</i>.....	59
1.	Anexos informáticos	59
2.	Anexos figuras.....	60

ÍNDICE DE TABLAS

*Tabla 1. Grupos celulares característicos de los islotes de Langerhans*_____3

*Tabla 2 Tabla de las dosis a administradas para realizar las curvas dosis respuesta de metformina e indorrenato.*_____22

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Fotomicrografías de tejido pancreático.....</i>	<i>3</i>
<i>Figura 2 Principales rutas del uso de la glucosa dentro de la célula.....</i>	<i>5</i>
<i>Figura 3 Esquema del TAPV</i>	<i>8</i>
<i>Figura 4 Enzimas clave que regulan el metabolismo de la serotonina</i>	<i>11</i>
<i>Figura 5. Las siete familias distintas de receptores de serotonina.....</i>	<i>12</i>
<i>Figura 6. Estructura química del Indorrenato</i>	<i>15</i>
<i>Figura 7. Distribución de los grupos para el experimento I.....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 8. Gráfico de los índices viscerosomáticos de las ratas del grupo de control en comparación con las ratas administradas con indorrenato.....</i>	<i>25</i>
<i>Figura 9. Fotomicrografía de los tejidos del grupo de control con vehículo y del grupo de control Indo</i>	<i>26</i>
<i>Figura 10. Fotomicrografía de las glándulas suprarrenales.....</i>	<i>27</i>
<i>Figura 11. Gráficas de la respuesta contráctil y relajante bajo un solo estímulo, sobre los anillos aórticos con y sin tejido adiposo perivascular de las ratas diabéticas vs ratas control.</i>	<i>30</i>
<i>Figura 12. Gráficas de la respuesta contráctil y relajante bajo un solo estímulo, sobre los anillos aórticos con tejido adiposo perivascular de las ratas diabéticas</i>	<i>33</i>
<i>Figura 13. Gráficas de la respuesta contráctil y relajante bajo un solo estímulo, sobre los anillos aórticos sin tejido adiposo perivascular de las ratas diabéticas</i>	<i>34</i>
<i>Figura 14. Gráfico de los índices viscerosomáticos de las ratas del grupo de control en comparación con las ratas diabéticas sin tratamiento.....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 15. Gráfico de los índices viscerosomáticos de las ratas del grupo de control, las ratas diabéticas</i>	<i>38</i>
<i>Figura 16 Fotomicrografías de los islotes pancreáticos.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 17. Fotomicrografía del duodeno zona proximal al estómago.....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 18. Fotomicrografía de las glándulas adrenales.</i>	<i>41</i>
<i>Figura 19. Efecto de la administración de metformina o metformina + indorrenato por 5 días sobre el Δ de glucosa.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 1 anexo. Diagrama de Venn del análisis in silico del indorrenato.....</i>	<i>60</i>
<i>Figura 2 anexo. curva dosis respuesta de contracción estimulada con NE.....</i>	<i>61</i>
<i>Figura 3 anexo. Curva dosis-respuesta de Δ PAM con la administración i. v. de indorrenato..</i>	<i>62</i>
<i>Figura 4 anexo. Curva dosis-respuesta de Δ FC con la administración i. v. de indorrenato.....</i>	<i>63</i>

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

DM	Diabetes mellitus
ADA	Asociación Americana de Diabetes
FID	Federación Internacional de Diabetes
OMS	Organización Mundial de la Salud
DM2	Diabetes mellitus tipo II
IGF I/II	Factor de crecimiento similar a insulina I o II
PI3K	Fosfoinositol 3-cinasa
MAPK	MAP cinasas
PA	presión arterial
ECV	evento cardiovascular
TAPV	tejido adiposo perivascular
ON	Óxido nítrico
NE	norepinefrina
5-HT	serotonina
5-HTR ₁₋₇	Receptores a serotonina 1-7
AngII	Angiotensina II
NOS	Óxido nítrico sintetasa
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
BH ₄	Tetrahidrobiopterina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
PMAT	Transportador de monoaminas de la membrana plasmática
OCT3	Transportador de cationes orgánicos 3
OCT1	Transportador de cationes orgánicos 1
TPH	Triptófano hidroxilasa
AADC	Descarboxilasa de aminoácidos aromáticos
SNC	Sistema Nervioso Central
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G
GLUT 2/4	Transportador de Glucosa tipo 2/4
IP3	Inositol trifosfato

DAG	Diacilglicerol
PLCβ	Fosfolipasa C beta
PKF	Fosfofructoquinasa
AMP	Adenosín monofosfato
ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
NA	Nicotinamida
STZ	Streptozotocina
PTGO	Prueba de tolerancia a la glucosa oral
ACh	Acetilcolina
KCl	Cloruro de potasio
H-E	Hematoxilina-Eosina
ABC	Área bajo la Curva
RU486	Mepifestrona

RESUMEN

La diabetes es un problema mundial, una patología causada por el mal uso de la glucosa. En la actualidad, los tratamientos para la diabetes se centran en reducir los niveles de glucosa en sangre y tratar la enfermedad desde su etiología. El medicamento más recetado para la diabetes es la metformina. Su accesibilidad y costo la han posicionado como una excelente alternativa para iniciar el tratamiento.

El desarrollo de nuevos fármacos ha impulsado la búsqueda de alternativas como las moléculas endógenas. Una de ellas es la serotonina. Desde hace más de cuatro décadas, se intenta encontrar un análogo que sea beneficioso para el control de la glucemia.

El indorrenato es un análogo de la serotonina que ha demostrado un efecto antihiper glucémico, pero aún se desconocen muchos de los mecanismos de acción y los efectos del tratamiento subcrónico y crónico.

En este estudio se encontró que el indorrenato atenúa ligeramente algunos daños producidos en diferentes tejidos por la hiperglucemia o por el síndrome metabólico que la precede. Algunos de estos órganos o tejidos son el hígado, la grasa visceral, el duodeno, la glándula suprarrenal y el tejido vascular.

El tejido vascular parece restaurar las respuestas contráctiles y relajantes de las aortas torácicas de las ratas a pesar de tener tejido adiposo visceral. En la glándula suprarrenal, que parece ser donde se produce la estimulación más extraordinaria del indorrenato, se observa una pérdida de las vesículas de almacenamiento de glucocorticoides de la glándula suprarrenal. Por otra parte, se comprobó que el aumento de la presión arterial cuando se administra indorrenato por vía intravenosa se debe a la estimulación de la glándula suprarrenal en ratas descerebradas y desmeduladas.

Todavía queda mucho por investigar sobre el indorrenato y quizás, en el futuro, proponerlo con seguridad para el tratamiento de la diabetes, ya sea solo o en combinación con la metformina.

ABSTRACT

Diabetes is a worldwide problem, a pathology caused by the misuse of glucose. Currently, treatments for diabetes are focused on reducing blood glucose levels and treating the disease from its etiology. The most prescribed drug for diabetes is metformin. Its accessibility and cost have positioned it as an excellent alternative to initiate treatment.

The development of new drugs has encouraged the search for alternatives such as endogenous molecules. One of them is serotonin. For more than four decades, we have been trying to find an analog that is beneficial for glycemic control.

Indorenate is a serotonin analog that has shown an antihyperglycemic effect, but many of the mechanisms of action and the effects of subchronic and chronic treatment are still unknown.

Indorenate seems to attenuate some damages produced in different tissues by hyperglycemia or by the metabolic syndrome that precedes it. Some of these organs or tissues are the liver, visceral fat, duodenum, adrenal gland, and vascular tissue.

The vascular tissue seems to restore the contractile and relaxant responses of the thoracic aortas of rats despite having visceral adipose tissue.

In the adrenal gland, which seems to be where we have the most extraordinary stimulation of indorenate, a loss of glucocorticoid storage vesicles of the adrenal gland is observed. On the other hand, it was proved that the increase in arterial pressure when indorenate is administered, i.v. is due to the stimulation of the adrenal gland in pithed rats.

There is still a long way to investigate indorenate and perhaps, in the future, to propose it safely for the treatment of diabetes either alone or in combination with metformin.

I. Introducción

1. La diabetes

La diabetes, o diabetes mellitus (DM), se ha definido como un grupo de trastornos metabólicos de los carbohidratos en el que la glucosa está infrautilizada, produciendo hiperglucemia. Es una de las grandes pandemias de los últimos años, ya que actúa como una enfermedad silenciosa. Además, esta patología desarrolla varias comorbilidades que degeneran las actividades rutinarias del individuo que la padece, principalmente las cardíacas (Care & Suppl, 2019).

A nivel mundial, la diabetes afecta aproximadamente a 1 de cada 11 personas (Polonsky, 2012). Por lo tanto, se trata de una enfermedad de importante impacto económico a nivel mundial que ha motivado numerosos estudios. Con los hallazgos científicos que se reportan frecuentemente, es necesario actualizar y crear diferentes clasificaciones que puedan abarcar los nuevos hallazgos.

1.1. Clasificación de la diabetes

Estas clasificaciones difieren según la organización que las dicta, por ejemplo, la Organización Americana de la Diabetes (ADA, 2019) y la Federación Internacional de la Diabetes (FID, 2019) clasifican la diabetes en cuatro tipos principales (Care & Suppl, 2019 ; IDF Atlas 9th edition 2019).

- Diabetes de tipo I, en la que hay una respuesta inmunitaria contra las células beta del páncreas, las destruye y disminuye la producción de insulina.
- La diabetes de tipo II, en la que diferentes factores (obesidad, dietas hipercalóricas y estrés) provocan un estrés oxidativo de la célula beta, lo que lleva a la senescencia o apoptosis, que provoca una disminución del número de células beta pancreáticas en la producción de insulina se agota.
- La diabetes gestacional se considera una patología temporal en la que la mujer embarazada disminuye la producción de insulina para asegurar el suministro de nutrientes y glucosa central al feto. El organismo de la madre no puede compensar

esta disminución de la insulina estimulando la proliferación de las células beta-pancreáticas.

- La diabetes tipo IV incorpora otros tipos específicos de diabetes, como la inmunomediada, la mediada por fármacos, la del páncreas exócrino, algunas infecciones víricas y algunos síndromes genéticos.

Debido a que seguimos aprendiendo sobre la enfermedad y a que está en constante cambio, las clasificaciones se están actualizando. Sin embargo, aún faltan criterios unificados, ya que cada organización internacional, como la ADA, la FID o la OMS, propone una clasificación diferente lo que puede ser muy confuso.

1.2. Diabetes en México

En México, según los informes de la FID, la prevalencia de la DM es de 1 de cada 7 adultos entre 20 y 79 años de edad. Con un gasto promedio de 26,000.00 pesos al año para su tratamiento. Las muertes relacionadas con la enfermedad superan las 8,000 al año, y se estima que el 40% de las personas permanecen sin diagnosticar (Atlas FDI 9ª edición 2019).

Del total de personas que padecen DM, el 90% pertenece al tipo II, por lo que 1 de cada 12 personas en el mundo (aproximadamente 1 de cada 8 personas en México) se verá afectada por este tipo de variante de la enfermedad. La DM tipo II (DM2) está comúnmente asociada al sobrepeso y la obesidad.

2. Metabolismo de la glucosa

La glucosa es el carbohidrato esencial en el metabolismo de los animales, incluidos los humanos. Es un monosacárido perteneciente a la familia de las hexosas, cuya función principal es ser fuente de energía. Así, los niveles de glucosa en sangre pueden verse influidos por la ingesta de carbohidratos, su utilización por los tejidos y su producción hepática.

El páncreas es el principal órgano responsable de la homeostasis de la glucosa, posee componentes exócrinos y endócrinos. La porción exócrina del páncreas se encarga del catabolismo de los nutrientes en el intestino para su mejor absorción, mientras que el componente endócrino regula estrictamente los niveles de glucosa en sangre. La porción

endócrina del páncreas se organiza en estructuras denominadas islotes de Langerhans, con un alto grado de inervación y vascularización (Figura 1). Esta organización facilita una rápida respuesta y detección de los niveles de glucosa en sangre.

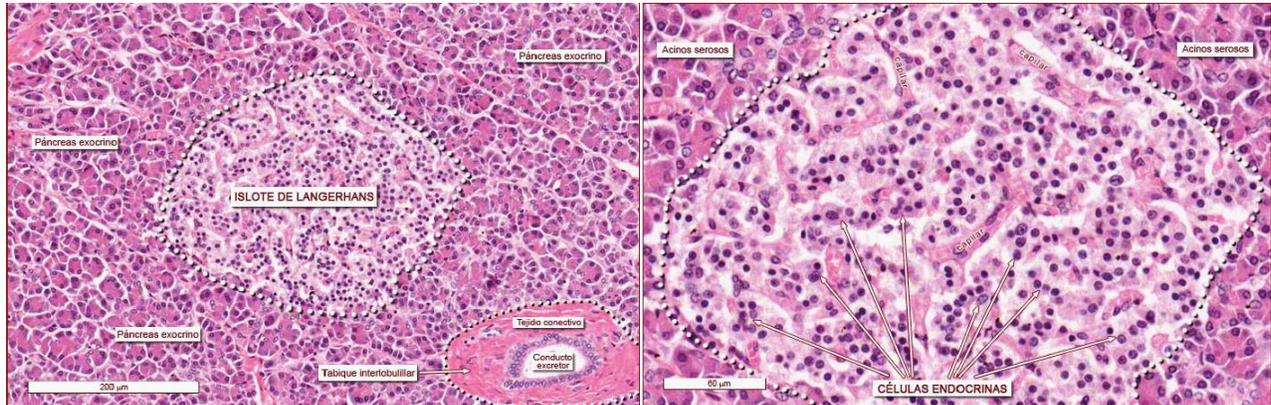


FIGURA 1. FOTOMICROGRAFÍAS DE TEJIDO PANCREÁTICO. TINCIÓN H-E. AUMENTOS 20X Y 40X. A LA IZQUIERDA SE OBSERVA LA DISTRIBUCIÓN DE LOS ISLOTES DE LANGERHANS RODEADOS POR EL PÁNCREAS EXÓCRINO. A LA DERECHA, VEMOS UNA AMPLIACIÓN SOBRE EL ISLOTE, DONDE SE APRECIA LA EXTENSA VASCULATURA (MARCADA COMO "CAPILAR") QUE RODEA A LAS CÉLULAS BETA. (MODIFICADO DE:

[HTTP://WZAR.UNIZAR.ES/ACAD/HISTOLOGIA/PAGINAS_HE/09_SISTENDO/PANCREASENDO/PANCREASENDO_04ETQ.HTM](http://wzar.unizar.es/acad/histologia/paginas_he/09_sistendo/pancreasendo/pancreasendo_04etq.htm)

El orden de perfusión sanguínea dentro de los grupos celulares de los islotes pancreáticos es β , α , δ y F, debido a los porcentajes de cada grupo celular (Tabla 1). Esta distribución en la perfusión hace que las células β sean las principales detectoras de glucosa, dando lugar a la secreción de insulina y permitiendo modificar el comportamiento de los otros grupos celulares (Jansson et al., 2016).

Grupo celular de los islotes y porcentaje de distribución	Producción y secreción de:
Alfa (α) 10-20 %	Glucagón
Beta (β) 70-80%	Insulina y polipéptido amiloide
Delta (δ) 5%	Somatostatina
F o PP	Polipéptido pancreático
Epsilon (ϵ) 1%	Secreción de grelina

Tabla 1. Grupos celulares característicos de los islotes de Langerhans, porcentajes de células que los componen y producto secretado por cada grupo celular. Modificado de: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1858§ionid=134369990>

2.1. La insulina

En 1949, Levine y colaboradores sugirieron la siguiente hipótesis sobre la insulina: *"La insulina actúa sobre la membrana celular de ciertos tejidos (músculo esquelético, etc.) de tal manera que facilita la transferencia de hexosas (y quizás de otras sustancias) desde el líquido extracelular a la célula... En el caso de la glucosa, la disimilación, el almacenamiento de glucógeno y la transformación en grasa son estimulados secundariamente por la rapidez de su entrada en la célula"*.

Actualmente se sabe que la insulina es una hormona de 5,8 kDa de origen peptídico, secretada por las células beta pancreáticas en respuesta a estímulos de niveles elevados de glucosa. Su función principal es mantener las concentraciones de glucosa en el rango de 80-100 mg/dL (Weiss et al., 2000).

Su secreción implica la participación de varios nutrientes, hormonas pancreáticas y gastrointestinales, y neurotransmisores autonómicos. Sin embargo, está mediada principalmente por la glucosa, los aminoácidos, los ácidos grasos y las cetonas.

La insulina puede estimular el transporte de glucosa hacia las células adiposas y musculares (esqueléticas y cardíacas), donde puede tener diferentes usos (figura 2). Además, el acoplamiento de la insulina a su receptor da lugar a una respuesta en el aumento de la translocación del transportador de glucosa sensible a la insulina, principalmente el transportador de tipo 4, en los tejidos insulino-dependientes (Consitt et al., 2013).

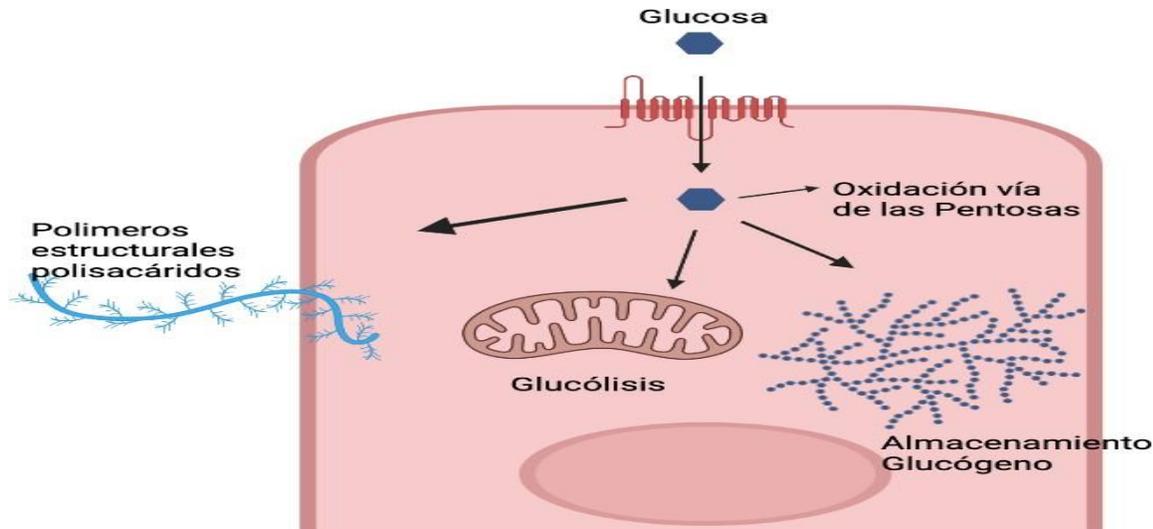


FIGURA 2 PRINCIPALES RUTAS DEL USO DE LA GLUCOSA DENTRO DE LA CÉLULA. SE MUESTRAN LAS CUATRO RUTAS PRINCIPALES DEL USO DE LA GLUCOSA, LA ACTIVACION DE ESTAS RUTAS DEPENDE DE LA CANTIDAD DE GLUCOSA QUE FLUYE EN CADA GRUPO CELULAR ESPECÍFICO. (MODIFICADO DE LEHNINGER "PRINCIPIOS DE BIOQUÍMICA" 6ª EDICIÓN, CAPÍTULO 14)

Si las células adiposas o musculares no responden correctamente a la insulina o la transducción de la señal por el receptor de la insulina es deficiente, se produce un estado que se conoce como resistencia a la insulina. La resistencia a la insulina, o el estado de deficiencia de insulina, puede clasificarse en tres categorías 1) producción anormal de insulina en el páncreas; 2) secreción de antagonistas de la insulina en el plasma sanguíneo debido a las hormonas contrarreguladoras (por ejemplo, el glucagón o el cortisol); 3) alteración de los receptores de insulina y de sus sistemas efectores, que no permite la acción de la insulina en el tejido diana (Olefsky 1981; Mizuno et al. 2007).

Durante la fase inicial de la resistencia a la insulina, se produce un estado conocido como prediabetes, en el que los individuos tienen niveles de glucosa en ayunas de 100 a 125 mg/dL. Este estado de prediabetes es un estado temporal, que bien puede progresar a diabetes mellitus.

2.2. Receptor de insulina

Los receptores de insulina están presentes en todos los grupos celulares del organismo. Los receptores de insulina regulan efectos como la diferenciación y el crecimiento celular, pero su actividad biológica más importante es el control del metabolismo (Boron, 2017).

La subfamilia de receptores de insulina, que comprende el receptor de insulina y los receptores de unión al factor de crecimiento similar a la insulina I y II (IGF-I/II), pertenece a la superfamilia de receptores tirosina cinasa.

La activación de los receptores de insulina provoca la fosforilación de residuos de tirosina específicos. Estos residuos fosforilados se convierten en sitios de unión para las proteínas de señalización asociadas, fosforiladas por la cinasa y activadas por cambios conformacionales, e inician la cascada de transducción de señales. La cascada de transducción de señales intracelulares mediada por la activación de la insulina comprende dos vías principales: la vía de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), responsable de la mayoría de los efectos metabólicos, y la vía de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), que participa en la regulación de la expresión génica, el control del crecimiento celular ("mitogénesis") y la diferenciación.

3. Fármacos para el tratamiento de la diabetes mellitus.

Los niveles elevados de glucosa en sangre y su etiología son de relevancia mundial por los perjuicios económicos que ocasionan; diferentes países y organizaciones han aunado esfuerzos para encontrar fármacos más eficaces y con menos efectos adversos.

Los fármacos actuales para la diabetes actúan produciendo un efecto antihiper glucémico, que puede evocar los siguientes mecanismos de acción; 1) aumento o sensibilización de la afluencia de glucosa, 2) disminución de la gluconeogénesis hepática, 3) aumento de la secreción de insulina de las células beta pancreáticas, y 4) otros mecanismos (Hemmingsen et al., 2013; Kovatchev, 2017; Steinberg, 2018).

3.1. Enfermedades cardiovasculares

Independientemente del tipo de DM que se trate y de su etiología clínica, los problemas cardíacos en los pacientes diabéticos se producen inevitablemente. A pesar de tener el mejor control glucémico, la DM es un importante factor de riesgo de enfermedad coronaria e insuficiencia cardíaca. Cassanova y colaboradores (2017) informan que un control glucémico razonable en las primeras fases de la DM es esencial para reducir los defectos de la microvasculatura.

Los tratamientos de las enfermedades cardiovasculares en personas con DM son otro objetivo en la búsqueda de nuevos fármacos para controlar la DM. Los pacientes con DM representan poblaciones especiales en el tratamiento de la presión arterial (PA). Los tratamientos oportunos y precisos para tratar la PA en pacientes con DM se asocian a un riesgo significativamente menor de mortalidad por cualquier causa y de eventos cardiovasculares (ECV) (Cassanova et al., 2017).

Las personas con DM sufren trastornos de hipertensión enmascarada, el número de personas que la padecen aumenta cada día. Esto se asocia a un mayor riesgo de ECV y de daños en diferentes órganos a nivel de perfusión de la micro o macrovasculatura.

Los pacientes con DM presentan una alteración de la vasodilatación dependiente del endotelio; esta alteración se debe a la frecuente asociación de la enfermedad con otros factores de riesgo cardiovascular, como la hipertensión, la obesidad y la dislipidemia. Los mecanismos que conducen al daño endotelial en la diabetes, independientemente del daño debido a otros factores de riesgo cardiovasculares, incluyen la resistencia a la insulina, la hiperglucemia y la inflamación sistémica de bajo grado (Yudkin et al., 2005; Greenstein et al., 2009).

3.1.1. Disfunción endotelial y la DM2

La disfunción endotelial parece preceder tanto al síndrome de resistencia a la insulina como al desarrollo de la aterosclerosis. Por lo tanto, según este punto de vista, se propone que la disfunción endotelial periférica producida por el tejido adiposo perivascular (TAPV) es la principal causa de la resistencia a la insulina y del síndrome de resistencia a la insulina. El TAPV participa muy activamente en la perfusión de los órganos insulino-dependientes (Turaihi et al., 2020).

La disfunción endotelial se produce debido a una reducción de la disponibilidad de vasodilatadores, en particular del óxido nítrico (ON). Sin embargo, también puede deberse a un aumento de los factores de contracción derivados del endotelio. Ambos fenómenos pueden estar presentes en la disfunción endotelial (Cyr et al., 2020). Este desequilibrio conduce a un deterioro de la vasodilatación dependiente del endotelio, que es la característica principal de la disfunción endotelial.

El TAPV modifica las respuestas fisiológicas que ejercen un efecto anticontráctil que es esencial para el mantenimiento del tono vascular de las arterias y venas (Soltis & Cassis., 1991). En el 2002, Lönh y colaboradores, corroboraron que el TAPV ejerce un efecto anticontráctil ante diversos agentes vasoconstrictores como a noradrenalina (NE), angiotensina II (AngII), Serotonina (5-HT) y fenilefrina. El TAPV puede secretar diferentes factores vasodilatadores, tales como el factor relajante derivado de adipocito (ADRF), leptina, adiponectina, angiotensina(1-7) [Ang(1-7)], peróxido de hidrogeno (H₂O₂) y ON.

El TAPV puede cambiar su composición dependiendo de la dieta y de las características nutricionales del individuo, pero se ha planteado que posee características mixtas de tejido adiposo blanco y pardo. Al tratarse de un tejido de depósito y ser capaz de modificar su composición, este tejido adiposo puede cambiar también los productos secretados y por lo tanto, modificar la respuesta anticontráctil que produce. Figura 3.

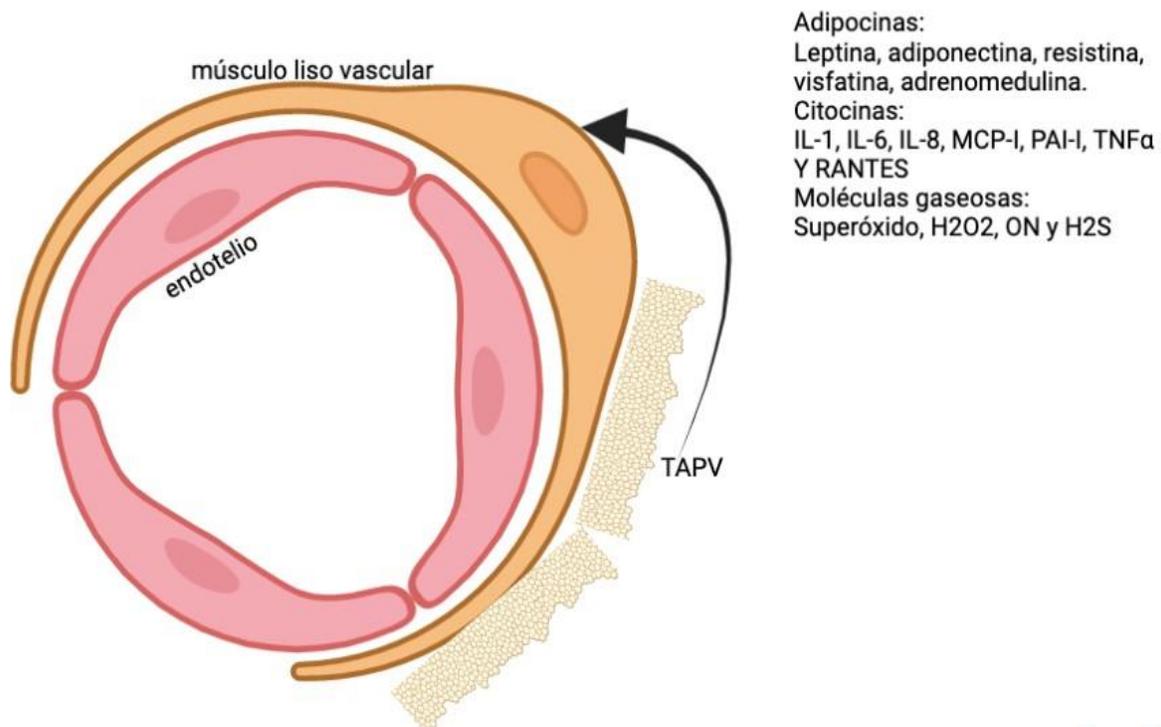


FIGURA 3 ESQUEMA DEL TAPV. LOS PRODUCTOS LIBERADOS REGULAN DE LA FUNCIÓN VASCULAR. PRINCIPALMENTE EL EFECTO ANTICONTRÁCTIL.

El ON (un gas) es crítico para la vasodilatación, se produce por la oxidación de la L-arginina a L-citrulina utilizando la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) y la tetrahidrobiopterina (BH4) como cofactor para producir ON(Farah et al., 2018).

Existen tres sintasas de ON: 1) La óxido nítrico sintasa derivada del endotelio (eNOS) producida en la mayoría de los tejidos, principalmente en el endotelio vascular. La eNOS se expresa de forma constitutiva y es dependiente del calcio. 2) La óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), que no se expresa de forma constitutiva y produce grandes cantidades de NO, y 3) la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), que se encuentra principalmente en el tejido neuronal y cardiovascular. El eNO es fundamental para la vasorrelajación dentro de las tres variantes de NOS, el aumento del flujo sanguíneo y una importante molécula de señalización que regula de forma negativa la cascada inflamatoria (Forstermann y Sessa, 2012).

3.2. Metformina y control glucémico.

La metformina es actualmente el fármaco más recetado en todo el mundo, utilizado para prevenir, tratar la diabetes y el síndrome metabólico (ADA, 2019). La metformina también se ha evaluado en el tratamiento de algunos tipos de cáncer (Heckman-Stoddard et al., 2017). Su mecanismo de acción aún no se conoce del todo, pero una vez ingerida (alcanzando el endotelio de la zona del tejido gástrico), se internaliza en los enterocitos a través del transportador plasmático de monoaminas (PMAT) y del transportador de cationes orgánicos tipo 3 (OCT3), situados en la superficie luminal del epitelio intestinal (Florez, 2017).

Además, el transportador de cationes tipo 1 (OCT1) facilita el flujo de metformina desde el enterocito hasta la superficie serosa del endotelio. Debido a su característica hidrofílica, la metformina viaja por el torrente sanguíneo hasta alcanzar los hepatocitos, los cardiomiocitos y las células musculares esqueléticas, donde los transportadores OCT1 y OCT3 ayudan a la captación de metformina. La acumulación de metformina en estos grupos celulares aumenta la afluencia de glucosa (Snell-Bergeon, 2017).

La monoterapia con metformina suele ser insuficiente para lograr el control glucémico. La dosis más comúnmente prescrita del fármaco es de 500 a 850 mg, 2 o 3

veces al día durante las comidas, con una dosis máxima de 2550 mg/día. Al ser un fármaco hidrófilo, tiene una baja absorción intestinal, cercana al 70%, y el resto pasa por el tracto gastrointestinal modificando el microbioma (Petersen, Vatner, & Shulman, 2017). Sus principales efectos adversos son la dispepsia, la diarrea y el meteorismo, generando una mala adherencia en los pacientes que inician tratamientos con metformina.

3.3. Serotonina (5-HT)

Alrededor de la década de 1980, se propuso que la serotonina podría contribuir al metabolismo de la glucosa estimulando o regulando acciones fisiológicas en diferentes órganos y tejidos, como el páncreas, el tejido adiposo (con todas sus variantes), el tejido muscular esquelético y cardíaco, el tejido gastrointestinal y el tejido óseo (Jones et al., 2020).

La 5-HT es una pequeña molécula que funciona como neurotransmisor en el sistema nervioso central, como hormona periférica y como mitógeno en diferentes órganos (Fanburg & Lee 1997). Esta molécula se sintetiza a través de varios pasos en los que el triptófano obtenido de la dieta es convertido en 5-hidroxitriptófano por una de las variantes de la enzima triptófano hidroxilasa (TPH). A continuación, el 5-hidroxitriptófano es descarboxilado para dar lugar a 5-HT por la enzima aminoácido aromático descarboxilasa (AADC) (Figura 4).

Cabe mencionar que existen dos variantes de TPH en el cuerpo humano: La TPH2, que se encuentra fuera del SNC, y la TPH1, que predomina en el cerebro. Estas enzimas determinan la tasa de síntesis de 5-HT, siendo el segundo factor limitante el aminoácido esencial triptófano.

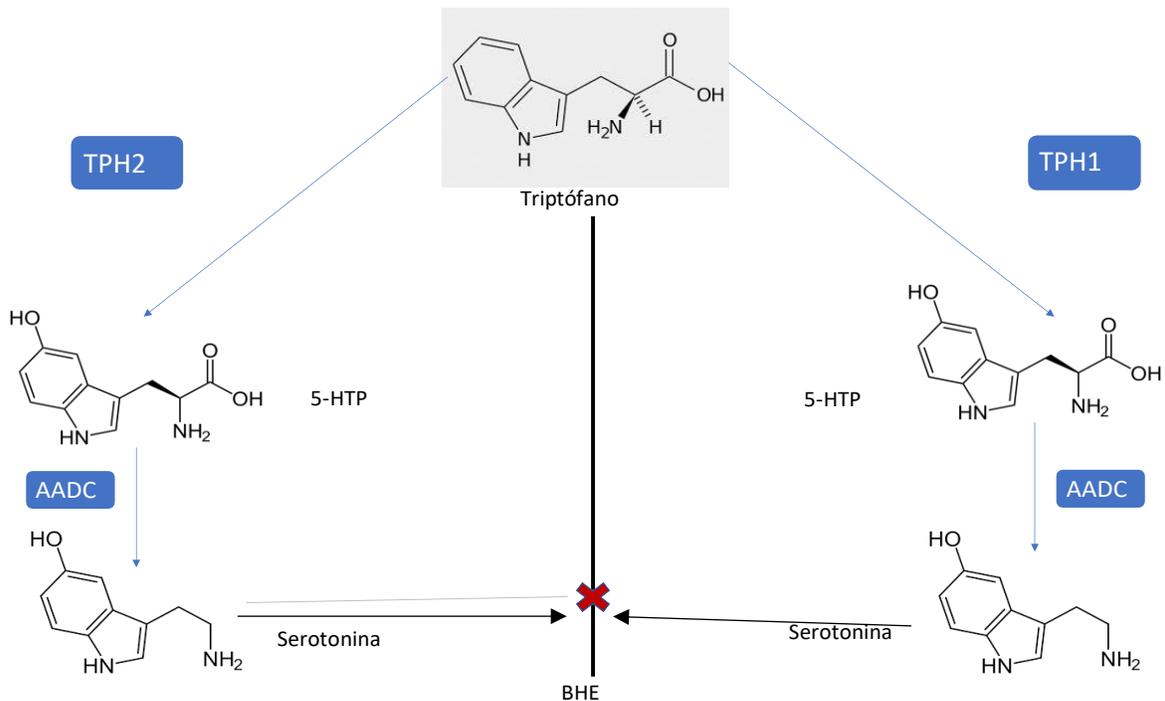


FIGURA 4 ENZIMAS CLAVE QUE REGULAN EL METABOLISMO DE LA SEROTONINA. EL TRIPTÓFANO ES METABOLIZADO POR LA Tph A 5-HTP Y POSTERIORMENTE ES METABOLIZADO A SEROTONINA POR LA AMINOÁCIDO DECARBOXILASA (AADC). LA SEROTONINA NO PUEDE CRUZAR LA BARRERA HEMTOENCEFÁLICA. (MODIFICADO DE YABUT ET AL., 2019)

Alrededor de la década de 1980, se propuso que la serotonina podría contribuir al metabolismo de la glucosa estimulando o regulando acciones fisiológicas en diferentes órganos de interés, como el tejido pancreático, el tejido adiposo (con todas sus variantes), el tejido muscular esquelético y cardíaco, el tejido gastrointestinal y el tejido óseo (Jones, Sun, Martin y Keating, 2020). Sin embargo, el principal reservorio de 5-HT fuera del SNC son las plaquetas. Además, la cantidad de 5-HT libre circulante es mínima, alrededor del 5% del total producido por las células enterocromafines (cerca de 5nM), en condiciones no patológicas. Por tanto, la interacción de esta molécula con la célula diana depende de cinco factores 1) la disponibilidad de triptófano consumido en la dieta y la cantidad de triptófano en el torrente sanguíneo, 2) la 5-HT que puede ser sintetizada por el grupo celular u órgano específico, 3) la 5-HT libre circulante, 4) la 5-HT liberada por las plaquetas y 5) los receptores que el órgano o célula esté expresando.

La 5-HT puede activar diferentes receptores. Estos receptores se clasifican en siete familias (5-HTR1-7), la mayoría de las cuales tienen subtipos (Figura 5). Casi todos los receptores son receptores acoplados a proteínas G (GPCR), aunque una familia

llamada 5-HT₃ pertenece a un receptor ionotrópico activado por un ligando (Nichols & Nichols 2008). Este receptor se encuentra principalmente en células excitables, tanto en el SNC como en la periferia (Miyake et al., 1995). Así, la serotonina puede iniciar dos mecanismos intracelulares: la despolarización de la membrana plasmática o la modificación de los niveles de mensajería intracelular mediada por proteínas G mediante la unión de la serotonina.

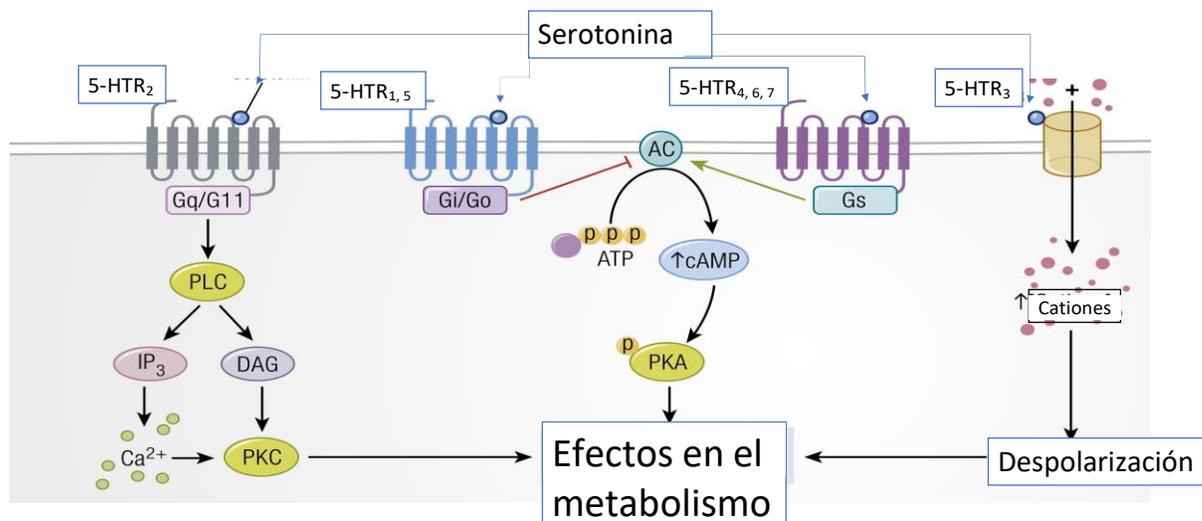


FIGURA 5. LAS SIETE FAMILIAS DISTINTAS DE RECEPTORES DE SEROTONINA. EL RECEPTOR 5-HTR₂ EMPLEA LA SUBUNIDAD DE LA PROTEÍNA G A(Gq/G11). LOS RECEPTORES 5-HTR₁/5-HTR₅ UTILIZAN LA SUBUNIDAD AI DE LA PROTEÍNA G (Gi/Go). LOS RECEPTORES 5-HTR₄/5-HTR₆/5-HTR₇ UTILIZAN LA SUBUNIDAD AS DE LA PROTEÍNA G (Gs). EL RECEPTOR 5-HTR₃ ES UN CANAL IÓNICO CERRADO POR LA SEROTONINA QUE AUMENTA LAS CONCENTRACIONES INTRACELULARES DE CATIONES, LO QUE PUEDE PROVOCAR UNA DESPOLARIZACIÓN CELULAR. (MODIFICADO DE YABUT ET AL., 2019)

3.3.1. La serotonina y su efecto en el control de la glucosa

En el tracto gastrointestinal, los cambios debidos a la diabetes provocan un aumento en el diámetro del intestino a nivel del duodeno o del yeyuno, y un aumento de la población de células enterocromafines presentes en las microvellosidades. Estas alteraciones en las células enterocromafines dan lugar a un incremento en los niveles plasmáticos de 5-HT y de glucosa en sangre.

En condiciones de dieta alta en grasas y diabetes, la inhibición de la síntesis de 5-HT derivada del intestino mejora la esteatosis hepática al reducir la estimulación de los receptores 5-HTR_{2A}. En los hepatocitos, la 5-HT a través de los receptores 5-HTR_{2A} aumenta la lipogénesis (Choi et al. 2018).

En los hepatocitos, durante el ayuno, la 5-HT aumenta la gluconeogénesis mediante el incremento de la actividad de dos enzimas, la fructosa 1,6-bisfosfatasa y la glucosa 6-fosfatasa, a través de los receptores 5-HTR_{2B}. Asimismo, el receptor 5-HTR_{2B} inhibe el transportador de glucosa (GLUT2) (da Silva, Eudy, & Deminice, 2020; Namkung et al., 2018).

Por otra parte, en el tejido pancreático, en los islotes de Langerhans (principalmente en las células β), se segrega 5-HT tras la estimulación con glucosa. Se ha determinado la localización de la 5-HT dentro de los gránulos de las células β -pancreáticas. (Zhang et al. 2017).

El acoplamiento de la 5-HT a los receptores 5-HTR_{2A} y 5-HTR_{2B}, en las células β -pancreáticas, desencadena la transducción de señales a través de una proteína G_q o G₁₁. En estas proteínas es donde se inicia la cascada, continua con la fosfolipasa C beta (PLC β)-inositol trifosfato (IP3) /diacilglicerol (DAG)-Ca² y termina en la proliferación celular. Durante estos periodos de estimulación de los receptores tipo 2 a serotonina, las células β , proliferan activamente y su masa aumenta, lo que sugiere que la 5-HT puede contribuir en la regulación fisiológica de la masa de células β (Ohta et al. 2011 y Bennet et al., 2016).

Estudios, como el de Kim y colaboradores (2015), han descubierto que el receptor tipo 3 a serotonina (5-HTR₃), un canal de cationes activado por ligando, potencia la secreción de insulina durante el embarazo y responde a la resistencia a la insulina inducida por la dieta. Se ha demostrado que la salida de Na⁺, a través de 5-HTR₃, despolariza ligeramente el potencial de la membrana, aumentando la excitabilidad de esta para producir un potencial de acción (Fex, 2018; Paulmann et al., 2009).

Por el contrario, la propia serotonina puede inhibir la secreción de insulina al acoplarse a los autorreceptores 5-HTR_{1A}, 5-HTR_{1D} y 5-HTR_{1F} en la célula β -pancreática, aunque también tiene un efecto paracrino en las células alfa, que estimulan la secreción de glucagón (Cryer, 2013; Almaca et al., 2016).

En el caso del músculo esquelético el receptor de serotonina 5-HTR_{2A} estimula la translocación de GLUT4, aumentando el transporte de glucosa que puede ser transferida al citosol, disminuyendo considerablemente el valor glucémico en sangre(Choi et al., 2020).

El receptor 5-HTR_{2A} también puede estimular la proteína cinasa dependiente de la APM (AMPK), que se ha descrito como la principal enzima informadora de energía celular y estimula la función de la fosfato cinasa (PFK). Este mecanismo es un sensor de energía que depende de la relación AMP:ATP y ADP:ATP, que provoca la activación mitocondrial para generar cantidades más significativas de energía en forma de ATP a partir de la glucosa captada. En el tejido muscular estriado, la 5-HT aumenta la captación de glucosa y da lugar a una mayor generación de energía en forma de ATP a través de la glucólisis (Choi et al., 2020; Martin et al., 2017).

La 5-HT exhibe una diversidad de efectos en el tejido adiposo; aún no está claro si los adipocitos sintetizan 5-HT de forma autónoma (Stock y Westermann, 1963). La 5-HT a través del receptor 5-HTR_{2A} aumenta la lipogénesis en el tejido adiposo, mientras que el receptor 5-HTR_{2B} la inhibe. Sin embargo, ambos receptores estimulan la lipólisis al aumentar los ácidos grasos libres y el glicerol (Mao et al., 2019).

En el tejido adiposo marrón, el receptor 5-HTR_{2A} induce el efecto de resistencia a la insulina al impedir la captación de glucosa del transportador (GLUT2). También se inhibe la termogénesis adaptativa, que se puede definir como la producción de calor en respuesta a la temperatura ambiental (Nakamura et al., 2018; Rozenblit-Susan et al., 2019).

Por otra parte, los receptores 5-HTR₂ desempeñan un papel esencial en la secreción de catecolaminas en la glándula suprarrenal, lo que conduce a un aumento de la presión arterial mediado por la adrenalina o la noradrenalina. Wetzler y colaboradores (1996) y Klaassen y colaboradores (2002), propusieron que los receptores 5-HTR_{1A} y 5-HTR_{2C} están implicados en la secreción y el aumento del nivel de glucocorticoides en sangre.

Los glucocorticoides tienen un efecto doble en los niveles de glucosa en sangre; el primero juega un papel en la secreción de glucosa a través de la gluconeogénesis hepática y en la activación del uso de la glucosa en sangre, principalmente a nivel del tejido muscular. El segundo efecto se produce con los niveles elevados y constantes de glucocorticoides, que conducen a un estado de resistencia a la insulina. Las personas con síndrome de Cushing, que aumentan los glucocorticoides a nivel plasmático, desarrollan un estado de resistencia a la insulina y una diabetes mellitus a priori muy similar a la DM2 (Yanovski & Cutler 1994).

4. Indorrenato, análogo del receptor 5-HT₂

El indorrenato se formuló como una alternativa a la quipazina (un agonista serotoninérgico)(Figura 6). Los primeros estudios con indorrenato lo clasificaron como un fármaco antihipertensivo central (Hong, 1981; Villalón et al., 1998). Estudios posteriores reportaron acciones antidepresivas (Martínez-Mota et al., 1990), anticonvulsivas (López-Meraz et al., 2005), neuroprotectoras (Rodríguez et al., 2000) y ansiolíticas (Fernández-Guasti, 1990), entre otras.

Se absorbe fácilmente a través del tracto gastrointestinal y se ha informado que tiene una mayor afinidad por los receptores 5-HTR_{1A}, pero también actúa sobre los receptores 5-HTR_{2A/C} (Villalón et al., 1998).

Estudios del laboratorio, no publicados, han planteado el efecto antihiper glucémico de algunos análogos de la serotonina, como el indorrenato (TR3369). Dichos efectos parecen estar mediados por los receptores 5-HTR₂ ya que cuando se administra pelanserina (un antagonista de estos receptores), el efecto disminuye (Silva Arzave, 2015).

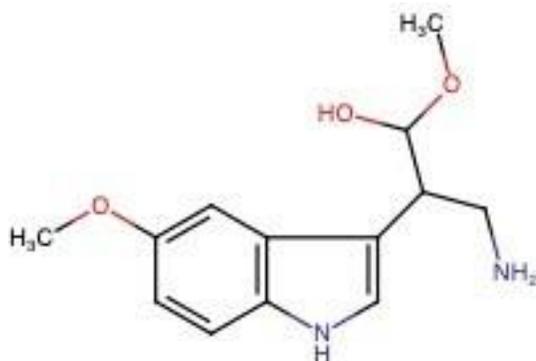


FIGURA 6. ESTRUCTURA QUIMICA DEL INDORRENATO

II. Hipótesis

El indorrenato, al ser un agonista de la serotonina, generará cambios histológicos y fisiológicos de los órganos implicados en la homeostasis de la glucosa, lo que es necesario para producir un efecto antihiper glucémico.

III. Objetivos

1. Generales

Determinar la acción del indorrenato en los tejidos que puedan estar implicados en el efecto antihiper glucémico e hipoglu cémico y compararlos con los efectos de la metformina.

2. Particulares

- Estudiar el efecto del indorrenato en la modificación macro y microscópica de los tejidos pancreático, músculo esquelético, adiposo visceral, hepático, gastrointestinal y de las glándulas adrenales en la administración intragástrica en ratas, con un modelo de diabetes de tipo II y de diabetes de tipo II tratada con metformina.
- Estudiar la interacción de la metformina y el indorrenato en la administración conjunta sobre el efecto antihiper glucémico.

IV. Material y métodos

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, que fueron cuidadas con dietas estándar (CHO-5008) y agua a demanda después del destete; se mantuvieron en un grupo de seis por jaula. Se siguieron los lineamientos establecidos por el Comité de Ética y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL-CINVESTAV) y la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999. El peso aproximado de las ratas para inducir el modelo fue de 200-250 gramos.

1. Modelo de diabetes tipo II.

Para inducir el modelo de rata diabética se utilizó el método de Nicotinamida-Estreptozotocina (NA-STZ). Este método propone que la NA actúa como antioxidante y protege los islotes pancreáticos, mientras que la toxicidad de la STZ induce la apoptosis en estas células. Antes de la administración de NA y STZ, los animales ayunaron durante un mínimo de 8 h.

Todos los animales fueron anestesiados con isoflurano con una columna de agua de 2,5 cm. y 2 L/min de O₂ a temperatura ambiente.

Para la administración de NA, se preparó una solución a una concentración de 200 mg/kg en solución salina y se administró por vía intraperitoneal 15 minutos antes de la administración de STZ. La concentración de STZ administrada fue de 65 mg/kg por vía intravenosa y se administró a través de la vena caudal del animal.

A los animales control y no diabéticos se les administró solución salina y buffer citrato de pH 6.5 0.1 M. correspondientes a los diluyentes de NA y STZ. Tras la administración, los animales se recuperaron durante 14 días con comida y agua a demanda.

2. Prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO)

Todos los animales fueron sometidos a una PTGO tras 14 días de descanso desde la administración de NA-STZ; la prueba se realizó con tiras reactivas y el equipo utilizado fue un Accu-Chek® Active para glucosa de la marca Roche.

Antes de iniciar la prueba, los animales ayunaron durante 12 horas. La sangre se extrajo por el método de punción distal de la cola. Se registró el valor basal y se

administró por vía intragástrica una solución de dextrosa a una dosis de 2 g/kg. Las mediciones de glucosa en sangre se realizaron cada 30 minutos durante un máximo de 2 horas.

Para los grupos de ratas diabéticas, sólo se utilizaron ratas con un valor de glucosa entre 180- 300 mg/dL como punto máximo dentro de la curva de tiempo de la PTGO. Para el estudio preliminar y el grupo de control, el valor máximo de los miembros del grupo es de 150 mg/dL de glucosa. Se graficaron las medias repetidas \pm error estándar para cada uno de los grupos.

3. Organo Aislado (Estudio sobre la aorta de las ratas)

Para evaluar los cambios promovidos por los tratamientos farmacológicos sobre la función cardiovascular, nos propusimos estudiar la capacidad de relajación y contracción de los anillos aórticos en condiciones de aislamiento, estudiados en fracciones aórticas con y sin tejido adiposo perivascular (TAPV).

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación y se expuso la parte interna de la cavidad torácica. A continuación se localizó y extrajo la aorta torácica. Se limpió la aorta de restos de tejido conectivo y se cortaron anillos de aproximadamente 3 mm de longitud.

Los anillos se colocaron en cámaras de órganos aislados que contenían solución de Krebs-Ringer compuesta de la siguiente manera -NaCl 119,5, Dextrosa 12, NaCO₃ 24,9, KCl 4,74, MgSO₄ 7H₂O 1,18, KH₂PO₄ 1,18, CaCl₂ 2H₂O 2,5, EDTA 0,026-(mM). Las condiciones de la solución que rodeaba el anillo en la cámara eran: temperatura 37°C, pH 7,4, con burbujeo constante de carbógeno (composición INFRA® 95% O₂ y 5% CO₂).

Dos ganchos Nikrom sujetaron cada anillo aórtico; el primer gancho se fijó al fondo de la cámara de vidrio, el otro gancho se fijó a un transductor de tensión de la marca Grass (modelo FTO3 Grass Inst, USA). El sistema recoge la información de los cambios de tensión isométrica de los anillos arteriales mediante el software de adquisición de datos BIOPAC (Biopac System, Inc. Modelo MP100) (Álvarez-Cámara et al., 2019).

3.1. Protocolo de las respuestas contractiles y relajantes

Para evaluar las respuestas de tensión de los anillos aórticos. En primer lugar, los anillos aórticos se estabilizaron a 4 g durante 30 minutos, con reajuste de la tensión a 15 minutos. A continuación, se estimularon los anillos con una solución de noradrenalina (NA) (1×10^{-7} M); una vez alcanzada la respuesta máxima y llegando a su meseta, se realizaron lavados con la solución de Krebs-Ringer sin NE, para eliminar la respuesta contráctil. Este lavado se realizó por triplicado para eliminar los restos de la solución de NA y llevar el anillo aórtico a la tensión basal. A continuación, se realizó una segunda y tercera estimulación con NE (1×10^{-7} M). La segunda estimulación se realizó de la misma manera que la primera, pero en la tercera estimulación se realizó la relajación con acetilcolina (ACh) (1×10^{-5} M).

También se evaluó la respuesta contráctil mediada por serotonina administrando una dosis de 1×10^{-5} M; no se realizó la curva ya que el compuesto administrado a las ratas (indorrenato) produce taquifilaxia, lo que puede enmascarar la respuesta máxima final al realizar una curva con dosis logarítmicas crecientes. La relajación se realizó de nuevo con ACh (1×10^{-5} M) y luego se lavó tres veces con solución de Krebs-Ringer fresca.

Para la evaluación de la actividad contráctil del músculo liso perivascular, se añadió una solución de KCl 80 mM (Figura 5).

4. Índice viscerosomático

Tras extraer la aorta de las ratas, se realizaron autopsias semicompletas en todos los animales, excluyendo el sistema nervioso central (SNC). Se anotaron las características y los rasgos diferenciales de cada órgano. Cada órgano se pesó con una balanza analítica (PRECISA modelo XB 220A, Precisa Gravimetrics GA, Suiza) y se registró para correlacionarlo con el peso corporal del animal tras la decapitación. Esta correlación se conoce como índice viscerosomático.

5. Histología

Las piezas disecadas se lavaron de restos de sangre por inmersión en solución tampón fosfato (PBS)-Citrato 0,1 M y se fijaron en formaldehído al 4%, en solución

acuosa con PBS, durante 48 horas. Posteriormente, se procesaron por el método de incrustación en parafina, se cortaron a tres μm y se tiñeron independientemente con Hematoxilina-Eosina (H-E), Tricromía de Masson. Se utilizó el manual de las fuerzas armadas de los Estados Unidos de América.

6. Formación de los grupos experimentales

Se decidió estudiar los efectos del indorrenato en los órganos de interés para el control glucémico. Además, el indorrenato se ha propuesto como antihipertensivo central; también se propuso estudiar la participación del indorrenato y la metformina en el endotelio vascular. Para ello, los estudios se dividieron en función de los objetivos que debían alcanzarse.

6.1. Estudio preliminar

Se evaluó el efecto antihiperoglucémico e hipoglucémico del indorrenato en 18 ratas de la cepa Wistar; estas ratas tenían valores normales en las curvas de tolerancia a la glucosa (150 mg/dL como pico en el PTGO). Las ratas se dividieron en tres grupos de 6. Se dividieron en: 1) el grupo de control, donde se administró el vehículo de indorrenato. 2) grupo de dosis única; se administró una dosis de 10 mg/kg de indorrenato 15 minutos antes de la prueba de tolerancia oral a la glucosa. 3) Grupo subcrónico; se administró una dosis de 10 mg/kg de indorrenato por vía intragástrica durante diez días.

Figura 6

Este enfoque se llevó a cabo para averiguar en qué órgano puede estar ejerciendo su acción el indorrenato. La dosis propuesta inicialmente fue de 10 mg/kg ya que, en estudios anteriores, se observó una elevada respuesta en el efecto antihiperoglucémico con esta dosis. En base a los datos obtenidos, se pudo ajustar la dosis a 1 mg/kg para estudios posteriores.

6.2. Experimento I

Con un total de 36 ratas, se formaron tres grupos principales: ratas control y no diabéticas (n=6 para cada grupo), ratas diabéticas (n=12) y ratas diabéticas más tratamiento con metformina (n=12), a todas las ratas se les administró el tratamiento o el

diluyente del fármaco durante quince días y se empezó la administración cuando tenían un peso aproximado de 300-400 g. (Figura 7)

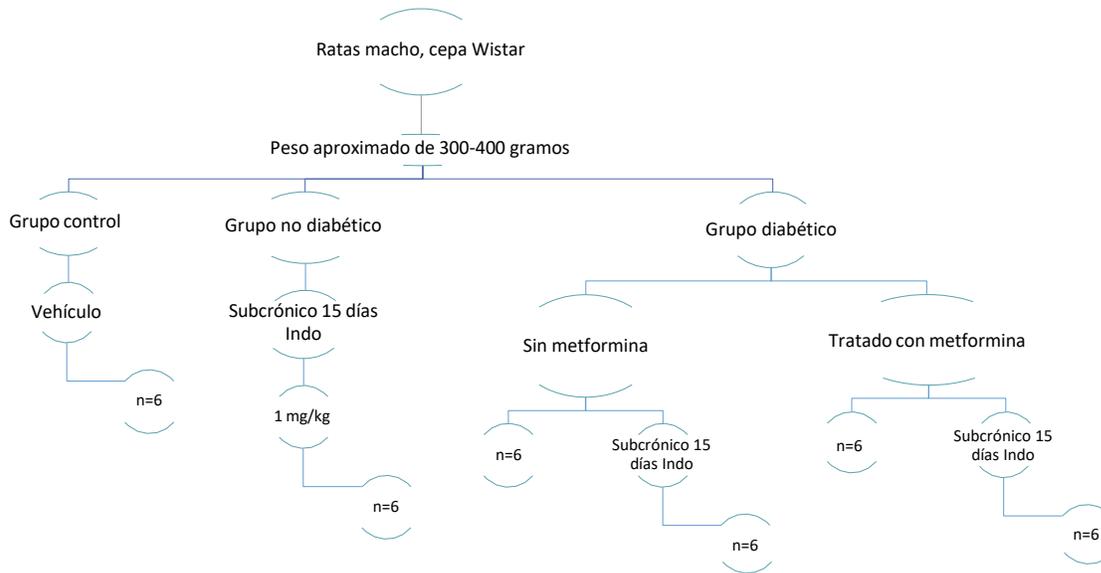


FIGURA 7. DISTRIBUCIÓN DE LOS GRUPOS PARA EL EXPERIMENTO I. TODOS LOS SUBGRUPOS TIENEN UNA N=6, Y SE REALIZARON LOS ESTUDIOS CORRESPONDIENTES A EL ESTUDIO DE ÓRGANO AISLADO, ÍNDICE VISCEROSOMÁTICO E HISTOLOGÍA.

6.3. Experimento II

En vista de la interacción de la administración conjunta de metformina e indorrenato; se propuso el siguiente esquema de administración. La metformina se administró por vía intraperitoneal; el indorrenato se administró por vía intragástrica. Además, la metformina se modificó respecto a su administración habitual, ya que se analizó que la metformina podría modificar la absorción del indorrenato debido a los cambios que ejerce en el tejido gástrico.

Las dosis utilizadas fueron en incrementos de 0.3 log, comenzando por 25 mg/kg hasta llegar a 250 mg/kg para la metformina sola. La dosis de indorrenato se propuso como una dosis única de 1 mg/kg, y esta dosis se obtuvo con el estudio preliminar en ratas no diabéticas.

Tabla de las dosis que se administró de metformina e indorrenato.			
Dosis de Indorrenato	Dosis logarítmica	Dosis de Metformina	Dosis logarítmica
		25 mg/ kg	1.4 Log
1 mg/kg	0 log de indorrenato	50 mg/kg	1.7 Log
		100 mg/kg	2.0 Log
		250 mg/kg	2.3 Log

Tabla 2 Tabla de las dosis a administradas para realizar las curvas dosis respuesta de metformina e indorrenato.

Se realizaron curvas dosis-respuesta con ratas diabéticas (n=5). Las PTGO se realizarón antes de administrar los fármacos y cinco días después del inicio de la administración.

Se consideró que después de cinco días de tratamiento con metformina, los niveles de ésta en la sangre comienzan a disminuir debido a la acumulación en las células donde se internaliza para ejercer su acción. Por lo tanto, la disminución de la glucosa será un efecto constante a partir de este día, y la disminución de la glucosa tendrá valores proporcionales a lo largo del tratamiento.

Se obtuvo el área bajo la curva a partir de estos cursos temporales y se trazó la diferencia obtenida antes del tratamiento después de cinco días.

La administración conjunta de indorrenato y de todas las dosis propuestas de metformina se realizó con la misma metodología que para la curva dosis-respuesta de metformina. Los resultados se compararon con los valores obtenidos individualmente.

V. Resultados

Para entender el presente trabajo, presentaremos nuestro grupo experimental con una dosis logarítmica menor (1 mg/kg) y el estudio preliminar; esto no demostrará los efectos del indorrenato en ratas no diabéticas.

1. Estudio preliminar

En el estudio preliminar en el que se compararon ratas control con ratas no diabéticas, administradas de forma aguda y subcrónica con indorrenato (10 mg/kg) durante diez días, encontramos que esta dosis produce alteraciones en el color y el tamaño de la glándula suprarrenal.

Por otro lado, las ratas administradas con indorrenato a una dosis de 1 mg/kg no presentaron alteraciones visibles en la glándula suprarrenal. Además, no se observaron cambios significativos con las evaluaciones de la PTGO en lugar de la dosis aguda y crónica de indorrenato (10 mg/kg).

Como dato adicional, se observó que las ratas administradas con indorrenato de forma subcrónica presentaron mayor docilidad a la manipulación. Este efecto de docilidad podría deberse al efecto ansiolítico previamente reportado.

1.1. Índices viscerosomáticos

Posteriormente, se realizó una correlación de los índices viscerosomáticos, encontrándose diferencias porcentuales significativas para los hígados del grupo control en comparación con los hígados tratados de forma subcrónica. El otro órgano en el que se encontraron diferencias fue la glándula suprarrenal. A nivel macroscópico, se observó un aumento del tamaño de la glándula, y el índice porcentual lo corroboró. En los demás tejidos, el indorrenato no produjo cambios en los valores porcentuales, como se muestra en la figura 8.

Como se puede observar en el gráfico, la administración de indorrenato 1 mg/kg no produjo un aumento en la incidencia porcentual del hígado respecto al grupo control,

por lo que la diferencia estadística en comparación con el grupo tratado con una dosis de 10 mg/kg es de $p < 0.05$.

Además, la dosis de 1 mg/kg de indorrenato no produce cambios en el índice porcentual de la glándula suprarrenal con respecto al grupo de control. Por lo tanto, la diferencia estadística de los valores porcentuales entre el grupo de animales administrados con 10 mg/kg y 1 mg/kg es de $p < 0.0001$.

Estos resultados nos llevaron a determinar que la dosis de 1 mg/kg de indorrenato podía utilizarse sin encontrar cambios morfofisiológicos que alteraran la hiperglucemia de las ratas diabéticas y pudimos tomarla como dosis segura.

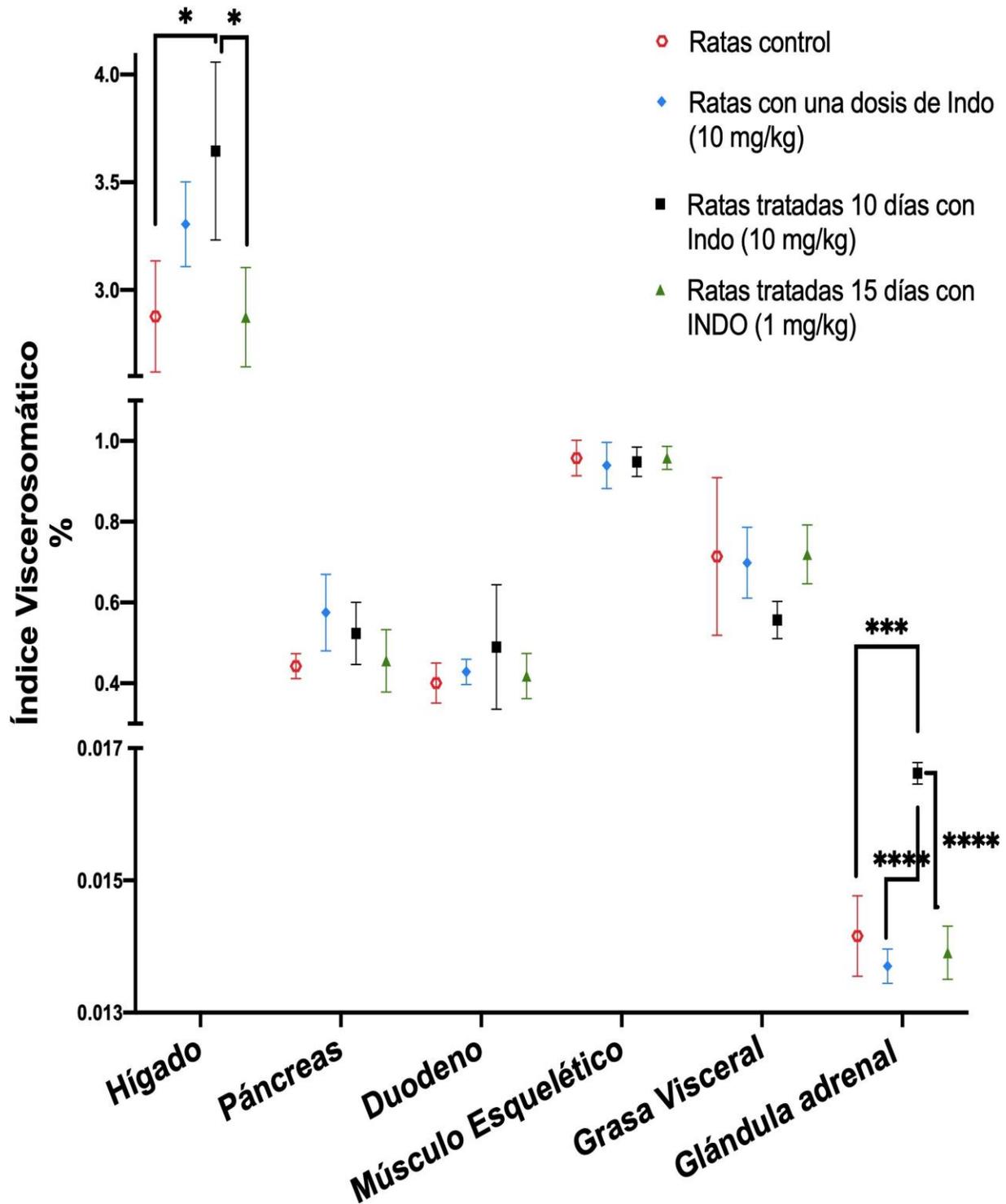


FIGURA 8. GRÁFICO DE LOS ÍNDICES VISCEROSOMÁTICOS DE LAS RATAS DEL GRUPO DE CONTROL EN COMPARACIÓN CON LAS RATAS ADMINISTRADAS CON INDORRENATO DE FORMA AGUDA Y SUBCRÓNICA POR 10 Y 15 DÍAS. EL HÍGADO Y LAS GLÁNDULAS ADRENALES PRESENTARON LAS DIFERENCIAS MÁS SIGNIFICATIVAS. PRUEBA ESTADÍSTICA ANOVA DE DOS VIAS POST HOC TUKEY. * $p < 0.05$ *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. N=6 PARA CADA TEJIDO

1.2. Análisis histológico

En el aspecto microscópico, encontramos que el músculo visceral y el tejido adiposo no mostraron cambios en ambos tratamientos subcrónicos de las ratas tratadas de forma aguda y subcrónica en comparación con el grupo control. Sin embargo, en el duodeno, encontramos una alteración de las vellosidades intestinales en la dosis subcrónica de 10 mg/kg, pero no se encontró tal alteración en la dosis aguda. Además, se observó una disminución de la profundidad de las criptas intestinales. Se observa que la zona correspondiente a la cresta de las vellosidades está desgastada (marca * en la figura 9 en la zona del duodeno).

Al comparar el hígado de los grupos control y no diabético tratados con indorrenato durante diez días (10 mg/kg), se observó un aumento del almacenamiento de lípidos; se encontró un estado de hiperemia pasiva, lo que sugiere un estado inicial de esteatosis hepática reversible, que puede confirmarse con una prueba bioquímica más específica para esta patología (Figura 9).

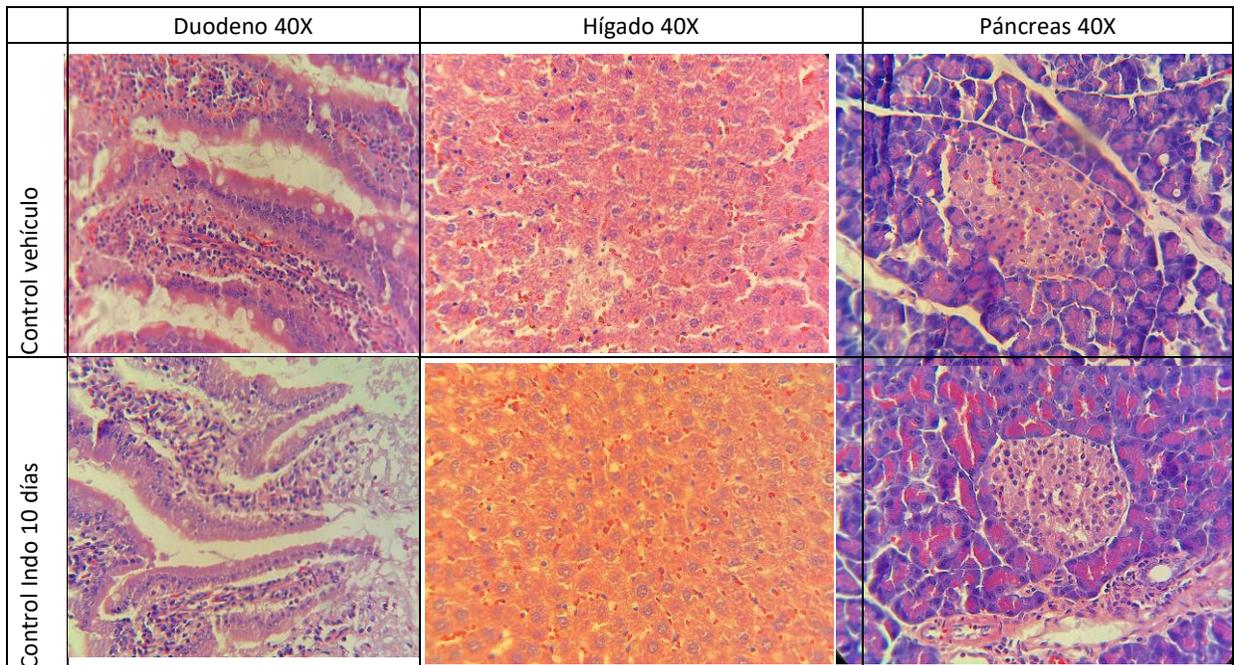


FIGURA 9. FOTOMICROGRAFÍA DE LOS TEJIDOS DEL GRUPO DE CONTROL CON VEHÍCULO Y DEL GRUPO DE CONTROL INDO. SE OBSERVAN CAMBIOS EN EL NÚMERO DE CÉLULAS QUE FORMAN LAS VELLOSIDADES INTESINALES DEL DUODENO. EN EL HÍGADO, SE OBSERVA UN AUMENTO DEL ALMACENAMIENTO DE LÍPIDOS. TINCIÓN H-E. AUMENTO DE 40X.

Microscópicamente, la glándula suprarrenal muestra una hiperplasia general de sus zonas constitutivas, conservando las estructuras y relaciones de las zonas que las subdividen.

A 10X y 40X de aumento, en la zona fascicular, se observa una disminución del número de vesículas, que almacenan la biosíntesis de glucocorticoides y hormonas sexuales producidas por las células. También se observa un estado de hiperemia activa debido a la vasorrelajación, los cambios en el tejido y el crecimiento de los vasos sanguíneos. No hay evidencia de un estado celular neoplásico ni de un estado hipertrófico. (Figura 10). La dosis de indorrenato 1 mg/kg sólo muestra una disminución de las vesículas que almacenan glucocorticoides.

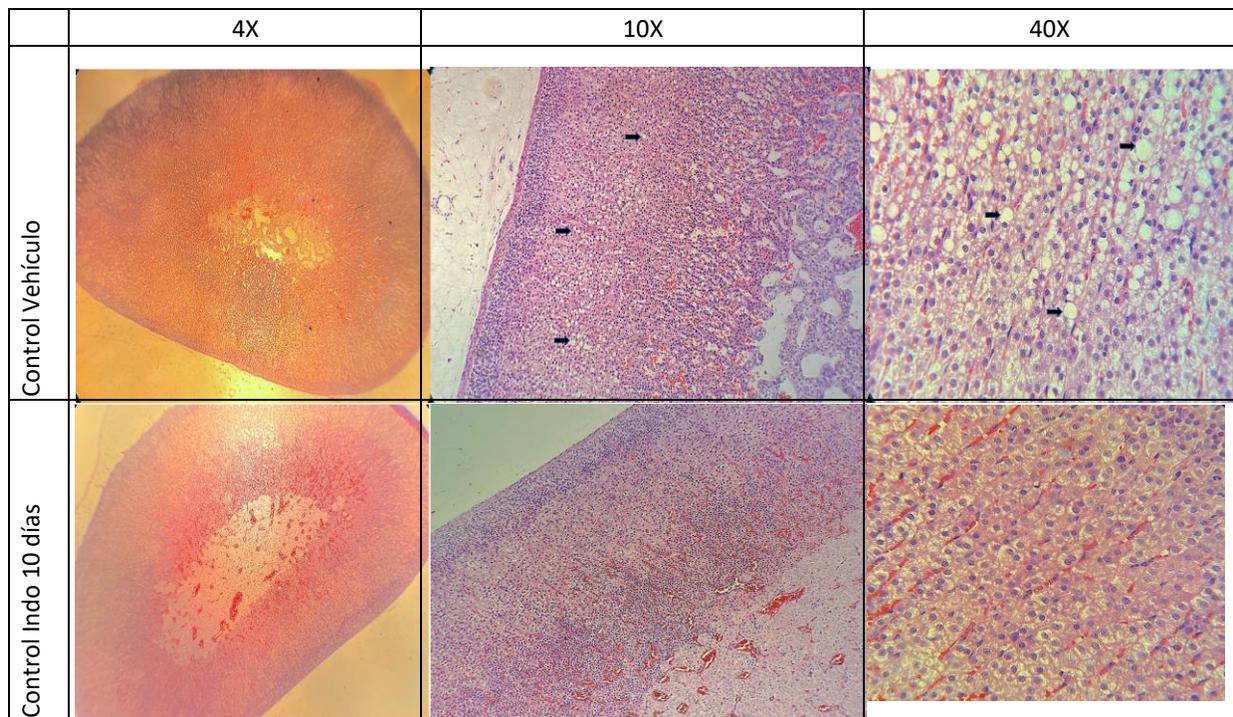


FIGURA 10. FOTOMICROGRAFÍA DE LAS GLÁNDULAS SUPRARRENALES. LAS IMÁGENES DEL PANEL SUPERIOR SON REPRESENTATIVAS DE LOS HALLAZGOS EN RATAS DE CONTROL CON LA ADMINISTRACIÓN DE INDO EN VEHÍCULO. LAS IMÁGENES DEL PANEL INFERIOR SON REPRESENTATIVAS DE LOS HALLAZGOS TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE INDO DURANTE 10 DÍAS. LAS FLECHAS SEÑALAN LAS VESÍCULAS QUE ALMACENAN GLUCOCORTICOIDES. TINCIÓN H-E. AUMENTO DE 4X, 10X Y 40X RESPECTIVAMENTE.

2. Experimento I: acción del indorrenato en la DM tipo 2

Se realizaron operaciones para ratas diabéticas con la administración de NA y STZ. En general, las ratas se recuperaron. Las curvas de glucosa nos ayudaron a identificar en cuáles de ellas funcionaba el tratamiento para generar el modelo, se categorizaron los animales diabéticos para su posterior tratamiento y estudio.

2.1. Estudio de órgano aislado

El estudio se realizó en las aortas, comparando las ratas control y diabéticas en la primera etapa. Con esta comparación, la respuesta a la relajación y la contracción cambia en las ratas diabéticas siempre responde menos a casi todos los estímulos. En la admisibilidad, se encontraron diferencias entre los anillos con TAPV y los que tenían TAPV eliminado para ambos grupos. Estos datos sugieren que la presencia de la TAPV es esencial en el estudio de los anillos aórticos y se discutirá más adelante. Por otro lado, se observó que la respuesta de contracción y relajación de la aorta con presencia de TAPV es menor respecto al grupo de aortas sin TAPV.

Con estos datos, observamos que los anillos estimulados para la contracción por la NE son significativamente menores entre el grupo control y el grupo diabético, independientemente de la presencia o ausencia de TAPV. $P < 0.0001$, como se muestra en los gráficos de la Figura 11A.

En el caso de la relajación estimulada por ACh, se observa que los anillos a los que se les retiró el TAPV se relajan más que los anillos que lo mantuvieron y que la respuesta de relajación también está disminuida en las ratas diabéticas. Los cambios a este nivel también disminuyen significativamente $p < 0.01$ entre el grupo control y el diabético que permanece con la TAPV y $p < 0.0001$ para los anillos en los que se retiró la TAPV. Figura 11B.

En la contracción máxima estimulada por KCl, se encontró que la presencia de TAPV parece estimular una mejor respuesta contráctil independientemente de si se trata de las ratas control o diabéticas; siempre, la contracción fue más significativa en los grupos con

TAPV. También se observó que el grupo diabético disminuyó la respuesta contráctil en comparación con el grupo control $p < 0.0001$, independientemente de la presencia o ausencia de TAPV. Figura 11C.

Finalmente, la contracción estimulada por 5-HT no parece diferir si la rata es diabética o no, ya que responden de forma muy similar. Sin embargo, la ausencia o presencia de TAPV sí cambia los niveles de contracción. $P < 0.0001$ para los grupos con TAPV en comparación con los grupos sin TAPV. Figura 11D.

Una vez comprobados los cambios sufridos por la enfermedad, se realizó el análisis de los grupos de diabéticos. El grupo diabético que no recibió ningún tratamiento y los que fueron administrados con indorrenato (1 mg/kg), metformina (250 mg/kg), así como la combinación de indorrenato (1 mg/kg) y metformina (100 mg/kg) su tratamiento subcrónico duró 15 días en las ratas diabéticas con estos compuestos; la comparación del estudio en las aortas de los animales mostró los siguientes resultados:

El indorrenato no produce cambios significativos en la contracción del anillo aórtico de las ratas diabéticas tratadas con este compuesto si el TAPV está presente; esto se observó bajo estimulación con NE (1×10^{-7} M). Sin embargo, el tratamiento con metformina y la combinación de indorrenato más metformina parecen aumentar significativamente la respuesta contráctil independientemente de la presencia del TAPV ($p < 0.05$ para ambos casos respecto al grupo diabético no tratado). Figura 12 A.

Sin embargo, cuando eliminamos el TAPV del anillo aórtico, la respuesta contráctil difiere cuando se estimula con NE (1×10^{-7} M). La respuesta contráctil del anillo aumenta significativamente entre el grupo tratado con indorrenato y el grupo tratado con metformina más indorrenato ($p < 0.01$ para ambos casos) respecto al grupo diabético sin tratamiento. Figura 13 A.

Contracción y relajación de anillos aórticos
Ratas control vs Ratas diabéticas

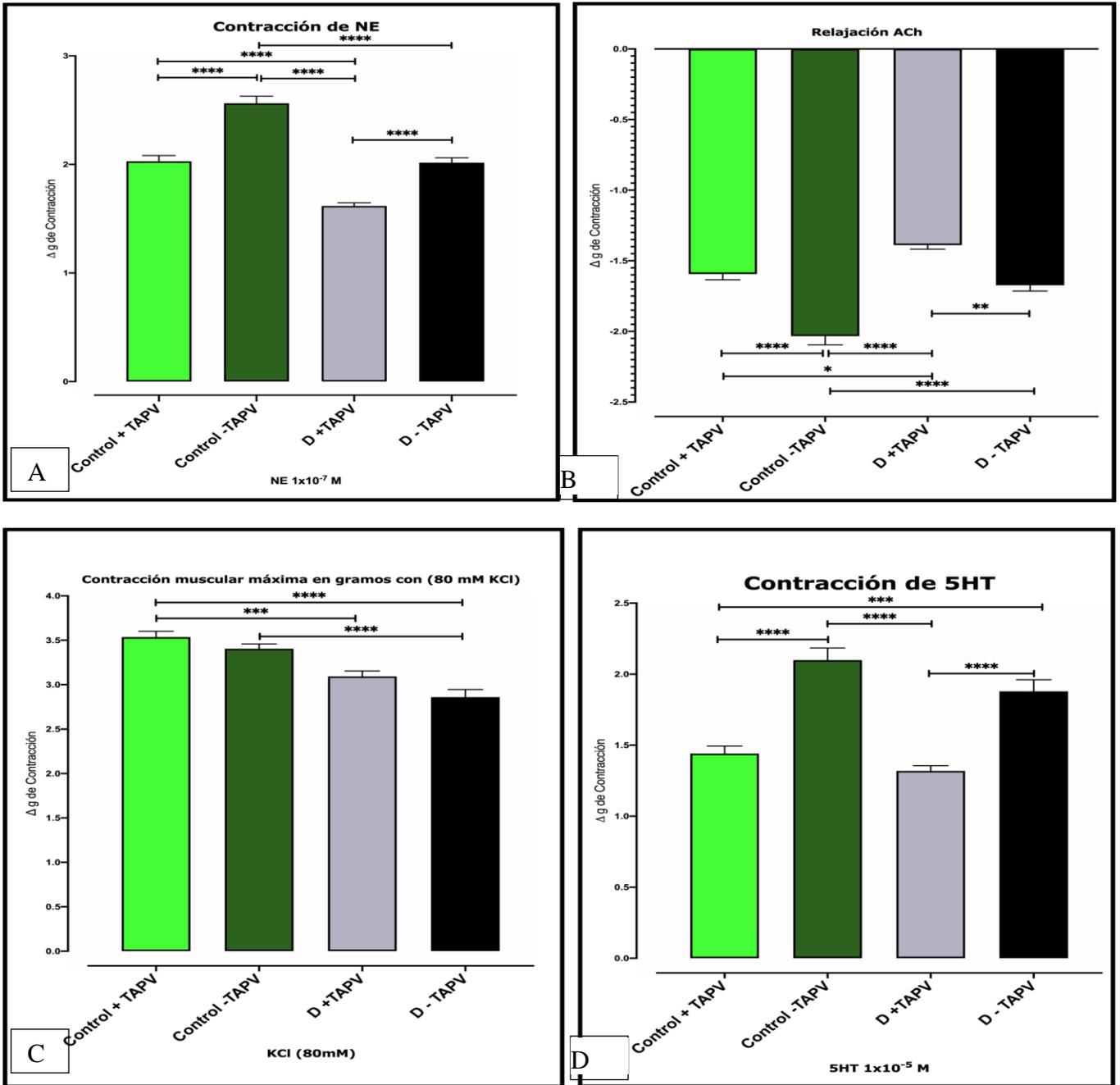


FIGURA 11. GRAFICAS DE LA RESPUESTA CONTRACTIL Y RELAJANTE BAJO UN SOLO ESTIMULO, SOBRE LOS ANILLOS AÓRTICOS CON Y SIN TEJIDO ADIPOSO PERIVASCULAR DE LAS RATAS DIABÉTICAS VS RATAS CONTROL. A) CONTRACCIÓN DEL ANILLO AÓRTICO ESTIMULADO CON NE 1×10^{-7} M, B) RELAJACIÓN DE LOS ANILLOS AÓRTICOS ESTIMULADOS CON ACh 1×10^{-5} M, C) CONTRACCIÓN DEL MUSCULO LISO VASCULAR PROMOVIDA POR KCl 80mM, D) CONTRACCIÓN DE LAS AORTAS PROMOVIDA POR 5-HT 1×10^{-5} M. N=16 PARA CADA GRUPO DE AORTAS ESTUDIADAS PROVENIENTES DE 6 ANIMALES. PRUEBA ESTADÍSTICA ANOVA DE UNA VÍA POST HOC TUKEY. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

-En el caso de la relajación del anillo aórtico, donde está presente el TAPV, estimulada por la ACh (1×10^{-5} M) se comportó de la siguiente forma. El tratamiento con indorrenato tiene un efecto reductor de la respuesta relajante ($p < 0.001$) respecto al grupo diabético no tratado. Los tratamientos con metformina y metformina más indorrenato no mostraron diferencias con el grupo diabético no tratado. Sin embargo, se encontraron diferencias entre los grupos tratados con indorrenato frente a la metformina, $p < 0.05$ para esta comparación. Por otra parte, la comparación entre el indorrenato y la combinación de indorrenato y metformina mostró una diferencia estadística $p < 0.0001$. También el grupo que recibió tratamientos de metformina y la combinación de metformina e indorrenato, presentaron una significancia de $p < 0.05$. Figura 12B

Por otra parte, si se eliminaba el TAPV del anillo aórtico, la respuesta relajante estimulada por ACh (1×10^{-5} M) se comportaba de forma diferente. El tratamiento con indorrenato combinado con metformina aumentó la respuesta relajante en comparación con el grupo diabético no tratado para el grupo tratado con indorrenato y los tratados con metformina. $P < 0,0001$ para todos los casos. Figura 13B

- En cuanto a la contracción muscular máxima promovida por la adición de 80 mM de cloruro de potasio (KCl), las respuestas también variaron con la presencia o ausencia de TAPV. En primer lugar, para el caso en el que el TAPV estaba presente, los tratamientos con metformina y metformina junto con indorrenato aumentó significativamente su respuesta ($p < 0.0001$ y $p < 0.01$, respectivamente) respecto al grupo de diabéticos no tratados. Asimismo, el grupo tratado con indorrenato presentó una diferencia con el grupo tratado con metformina. Figura 12C.

En segundo lugar, cuando se eliminó el TAPV, el grupo tratado con metformina combinada con indorrenato presentó diferencias en la contracción muscular máxima respecto al grupo diabético no tratado, al grupo tratado con indorrenato y el grupo tratado con metformina ($p < 0.0001$ para todos los casos). Figura 13C

-Otro de los aspectos analizados en el protocolo de los anillos aórticos fue la contracción estimulada por la 5-HT, ya que uno de nuestros tratamientos se basa en un análogo de la 5-HT. Como resultado, la contracción estimulada por 5-HT (1×10^{-5} M) con la presencia de TAPV presentó las siguientes diferencias. En primer lugar, el grupo

tratado con indorrenato mostró una tendencia a reducir la respuesta contráctil (no significativa). Mientras que el grupo tratado con metformina mostró una diferencia para aumentar la respuesta contráctil respecto a los grupos sin tratamiento, con indorrenato y la combinación de indorrenato mas metfomina ($p < 0.0001$ para todos los casos). Finalmente, el grupo tratado con metformina e indorrenato aumentó significativamente la respuesta contráctil en comparación con el grupo al que sólo se le administró indorrenato ($p < 0.01$). Figura 12D.

-Sumado a esto, si se elimina el TAPV de los anillos aórticos, la contracción estimulada por la serotonina muestra las siguientes comportamientos. En primer lugar, el tratamiento con indorrenato reduce la respuesta contráctil del anillo aortico ($p < 0.01$) respecto al grupo diabético sin tratamiento. En segundo lugar, el tratamiento con metformina aumenta la respuesta contráctil promovida por la 5-HT en relación con el grupo tratado con indorrenato ($p < 0.0001$) y el grupo diabético sin tratamiento ($p < 0,05$). Por otra parte, el grupo tratado con metformina más indorrenato aumenta significativamente su respuesta respecto al grupo tratado sólo con indorrenato ($p < 0.001$). Figura 13D.

Contracción y relajación de anillos aórticos con tejido adiposo perivascular
Ratas diabéticas vs Tratamientos

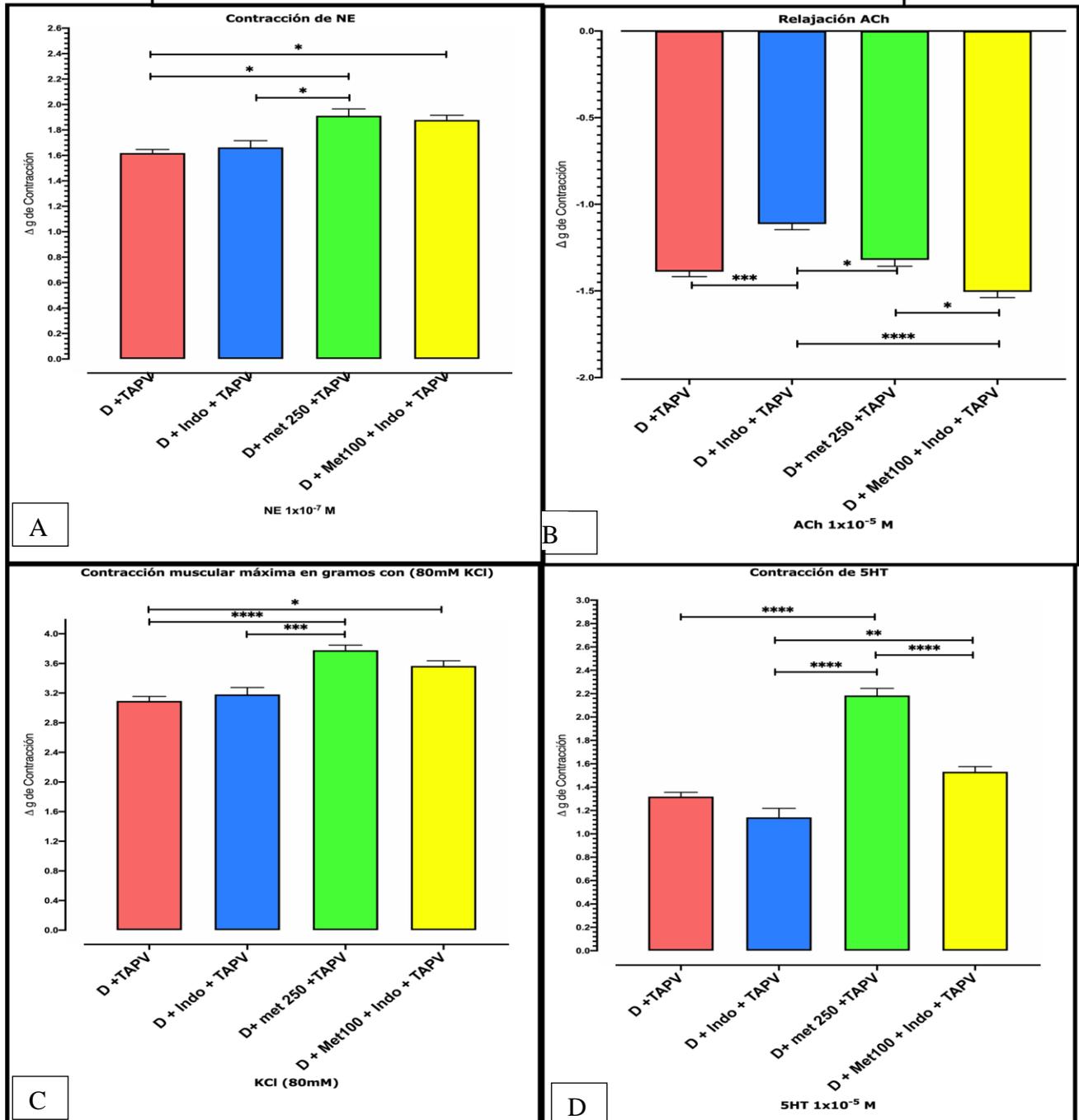


FIGURA 12. GRAFICAS DE LA RESPUESTA CONTRACTIL Y RELAJANTE BAJO UN SOLO ESTIMULO, SOBRE LOS ANILLOS AÓRTICOS CON TEJIDO ADIPOSO PERIVASCULAR DE LAS RATAS DIABÉTICAS; SIN TRATAMIENTO Y TRATADAS CON ÍNDORRENATO, METFORMINA Y LA COMBINACIÓN DE ÍNDORRENATO MAS METFORMINA. A) CONTRACCIÓN DEL ANILLO AÓRTICO ESTIMULADO CON NE 1×10^{-7} M, B) RELAJACIÓN DE LOS ANILLOS AÓRTICOS ESTIMULADOS CON ACh 1×10^{-5} M, C) CONTRACCIÓN DEL MUSCULO LISO VASCULAR PROMOVIDA POR KCl 80mM, D) CONTRACCIÓN DE LAS AORTAS PROMOVIDA POR 5-HT 1×10^{-5} M. N=16 PARA CADA GRUPO DE AORTAS ESTUDIADAS PROVINIENTES DE 6 ANIMALES. PRUEBA ESTADÍSTICA ANOVA DE UNA VÍA POST HOC TUKEY. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Contracción y relajación de anillos aórticos sin tejido adiposo perivascular
Ratas diabéticas vs Tratamientos

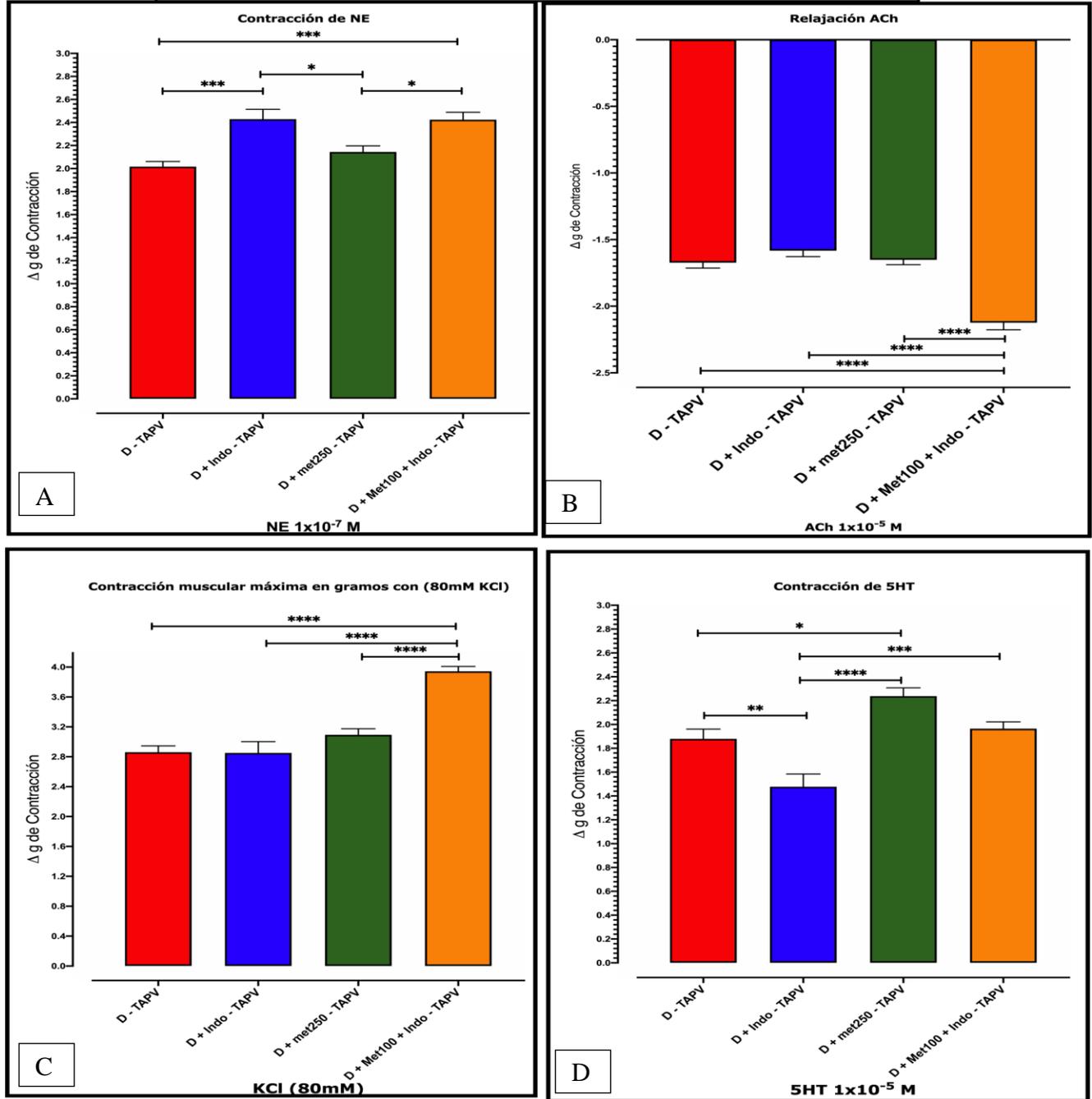


FIGURA 13. GRAFICAS DE LA RESPUESTA CONTRACTIL Y RELAJANTE BAJO UN SOLO ESTIMULO, SOBRE LOS ANILLOS AÓRTICOS SIN TEJIDO ADIPOSO PERIVASCULAR DE LAS RATAS DIABÉTICAS; SIN TRATAMIENTO Y TRATADAS CON ÍNDORRENATO, METFORMINA Y LA COMBINACIÓN DE ÍNDORRENATO MAS METFORMINA. A) CONTRACCIÓN DEL ANILLO AÓRTICO ESTIMULADO CON NE 1×10^{-7} M, B) RELAJACIÓN DE LOS ANILLOS AÓRTICOS ESTIMULADOS CON ACh 1×10^{-5} M, C) CONTRACCIÓN DEL MUSCULO LISO VASCULAR PROMOVIDA POR KCl 80mM, D) CONTRACCIÓN DE LAS AORTAS PROMOVIDA POR 5-HT 1×10^{-5} M. N=16 PARA CADA GRUPO DE AORTAS ESTUDIADAS PROVINIENTES DE 6 ANIMALES. PRUEBA ESTADÍSTICA ANOVA DE UNA VÍA POST HOC TUKEY. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

2.2. Índice Viserosomático

Tras la eutanasia, se observó que la glándula suprarrenal presentaba alteraciones en la parte visible, principalmente un aumento de tamaño; este cambio se encontró en el grupo diabético sin tratamiento.

En el grupo diabético sin tratamiento, al compararlo con las ratas control, se observaron diferencias en el índice porcentual en tres de los órganos estudiados.

El primer cambio se produjo en el hígado; el grupo diabético aumentó su índice porcentual con una significación de $p < 0.01$. A continuación, el duodeno del grupo diabético también aumentó su índice porcentual con una significación de $p < 0.01$. Por último, las glándulas suprarrenales del grupo diabético también aumentaron su índice porcentual con una significación de $p < 0.05$ con respecto a los valores porcentuales del grupo de control. Figura 14.

Después de analizar los grupos de control y los diabéticos no tratados, se realizó el análisis comparativo de los grupos tratados con indorrenato, metformina y la combinación de metformina con indorrenato. Los cambios a nivel del índice porcentual en los órganos de interés fueron:

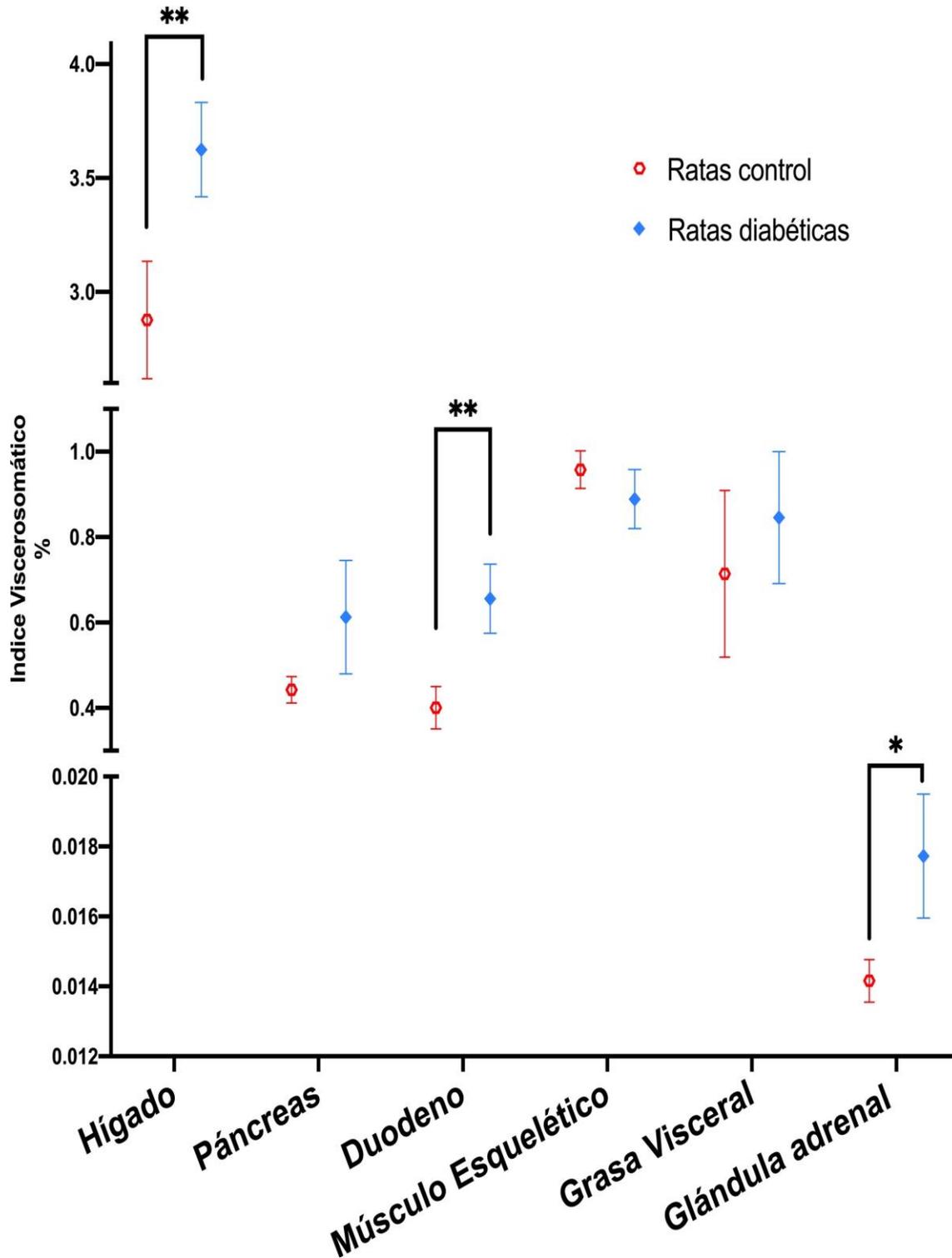


FIGURA 14. GRÁFICO DE LOS ÍNDICES VISCEROSOMÁTICOS DE LAS RATAS DEL GRUPO DE CONTROL EN COMPARACIÓN CON LAS RATAS DIABÉTICAS SIN TRATAMIENTO. EL HÍGADO, DUODENO Y LAS GLÁNDULAS ADRENALES PRESENTARON LAS DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS. PRUEBA ESTADÍSTICA ANOVA DE DOS VIAS POST HOC TUKEY. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$. $N=6$ PARA CADA TEJIDO.

- El hígado presentó un aumento en el índice porcentual del grupo diabético sin tratamiento, y del grupo tratado con metformina respecto al grupo control $p < 0.01$ y 0.05 , respectivamente. Por otro lado, los hígados pertenecientes al grupo tratado con metformina más indorrenato presentaron una disminución de los índices porcentuales respecto al grupo diabético sin tratamiento y al grupo tratado con metformina. $p < 0.01$ y 0.05 , respectivamente. Hubo una disminución también significativa entre el grupo tratado con metformina respecto al grupo tratado con metformina más indorrenato $p < 0.05$.
- El páncreas fue el único órgano que no mostró ninguna diferencia entre los grupos estudiados.
- En el duodeno, los índices porcentuales se comportaron de la siguiente manera; se observó un aumento significativo con respecto al grupo de control de los grupos de ratas diabéticas sin tratamiento ($p < 0.01$), los tratados con metformina ($p < 0.05$) y los tratados con una combinación de metformina e indorrenato ($p < 0.05$). Por otro lado, la combinación de metformina más indorrenato presentó una reducción del índice porcentual respecto al grupo diabético sin tratamiento. $P < 0.05$.
- En el músculo esquelético, el grupo tratado con metformina presentó un aumento significativo respecto al grupo diabético sin tratamiento y a los tratados con indorrenato más metformina. $P < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente.
- En la grasa visceral, el grupo tratado con indorrenato presentó una diferencia significativa con respecto al grupo de diabéticos sin tratamiento y al grupo tratado con metformina más indorrenato. $P < 0.05$ y 0.01 , respectivamente.
- Por último, en la glándula suprarrenal, los tratamientos de metformina, indorrenato y la combinación de indorrenato más metformina presentaron un aumento significativo con respecto al grupo de control ($p < 0.05$, 0.01 y 0.01 , respectivamente), al igual que el grupo de ratas diabéticas sin tratamiento ($P < 0.05$). Las ratas tratadas con indorrenato y la combinación de metformina más indorrenato presentaron una

reducción del índice porcentual respecto al grupo tratado con metformina ($p < 0.05$ y 0.01 , respectivamente). Figura 15.

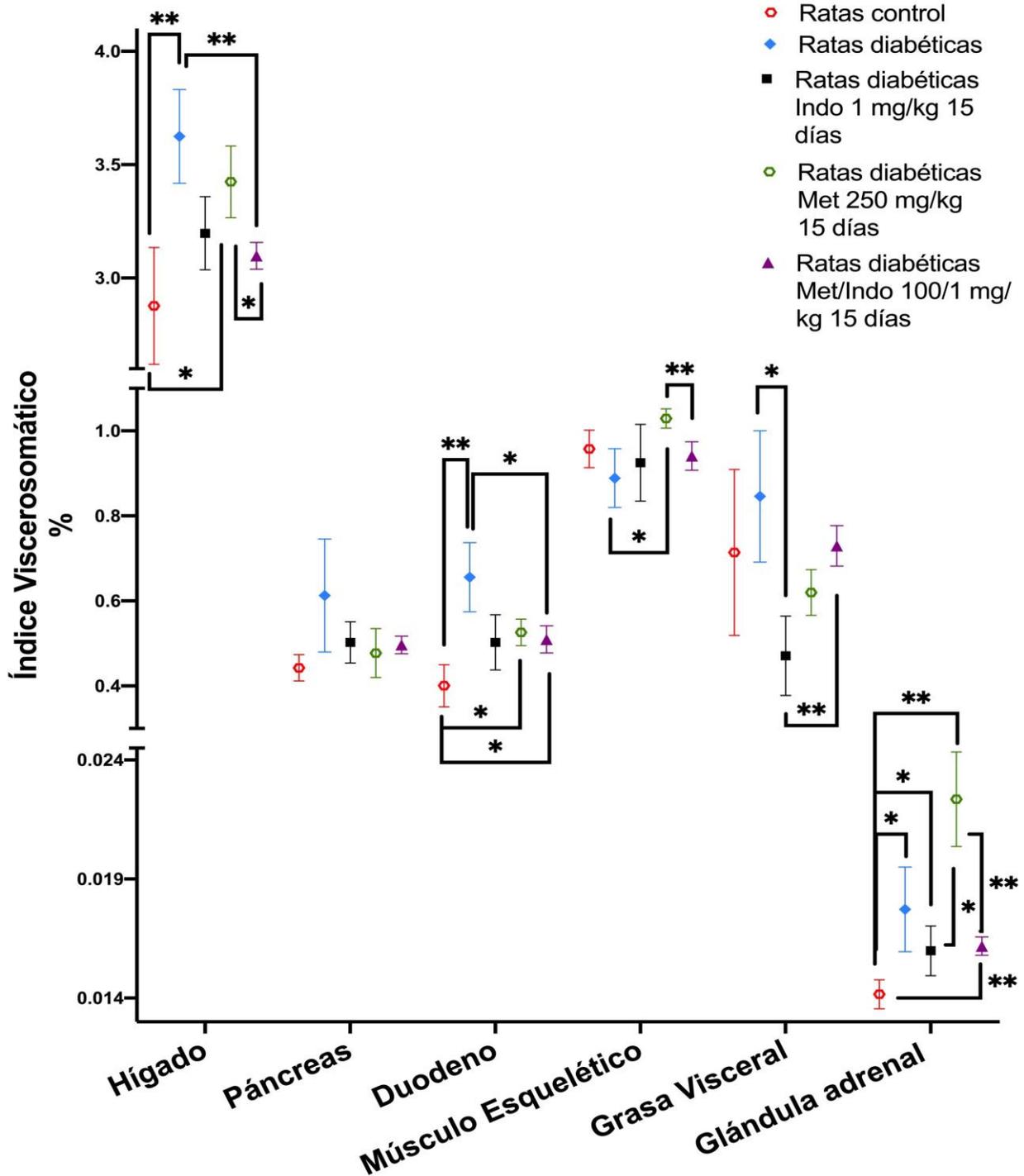


FIGURA 15. GRÁFICO DE LOS ÍNDICES VISCEROSOMÁTICOS DE LAS RATAS DEL GRUPO DE CONTROL, LAS RATAS DIABÉTICAS SIN TRATAMIENTO Y LAS RATAS TRATADAS CON INDORRENATO (COLOR NEGRO), METFORMINA (COLOR VERDE) Y LA COMBINACION DE METFORMINA CON INDORRENATO (COLOR MORADO). LAS GLÁNDULAS SUPRARRENALES PRESENTARON MAYOR CANTIDAD DE DIFERENCIAS ENTRE LOS GRUPOS. PRUEBA ESTADÍSTICA ANOVA DE DOS VIAS POST HOC TUKEY. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

2.3. Análisis histológico.

Microscópicamente, comprobamos que el hígado no presentaba cambios en las estructuras que lo componen; el único grupo que mostró diferencias fue el de la rata diabética, que mostró los inicios de la fibrosis hepática.

En el páncreas, encontramos menos islotes pancreáticos presentes en las secciones realizadas en los grupos diabéticos con y sin tratamiento. Sin embargo, los grupos tratados con indorrenato y la combinación con metformina mostraron un número más significativo de vasos sanguíneos y una presencia más abundante de eritrocitos (figura 16).

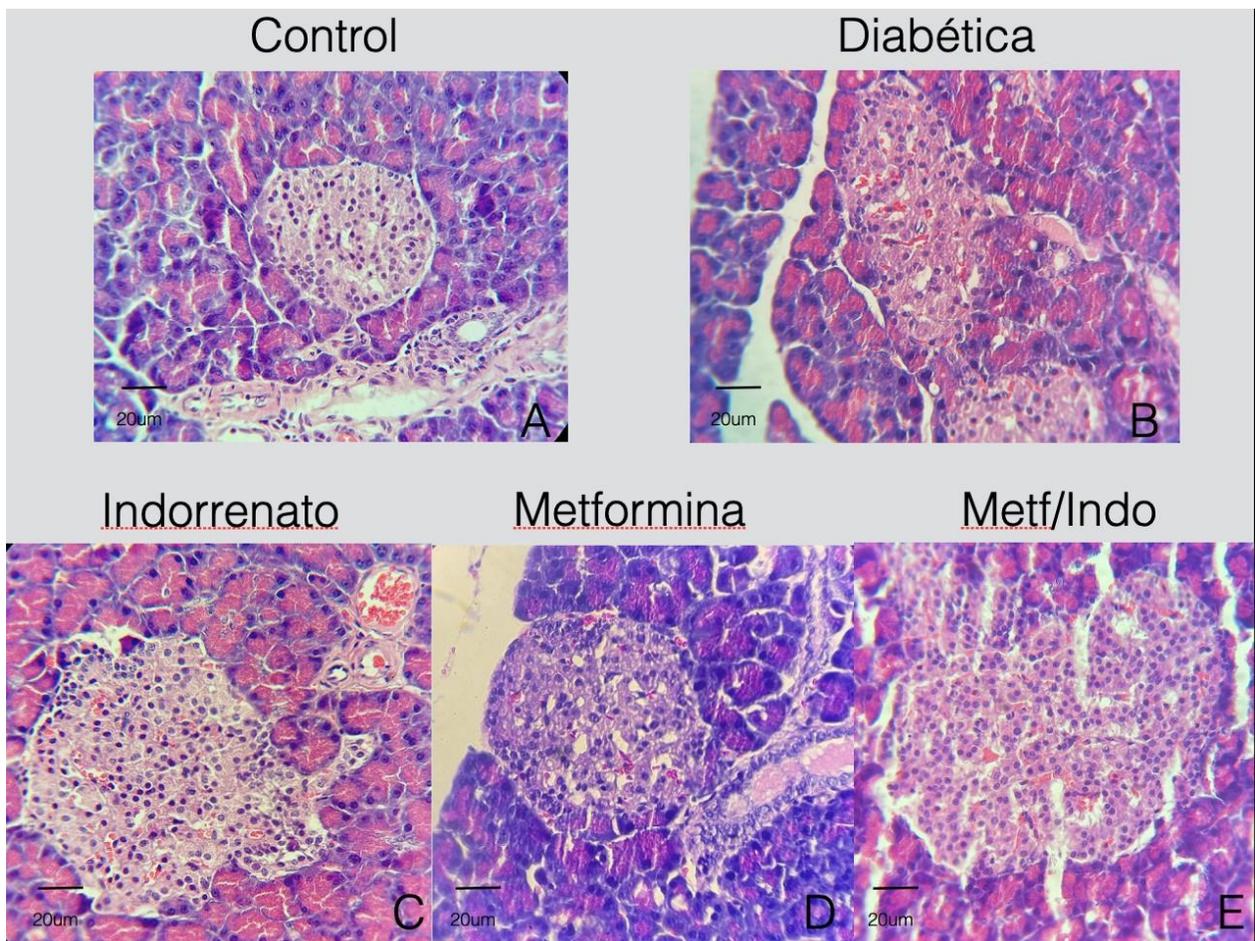


FIGURA 16 FOTOMICROGRAFÍAS DE LOS ISLOTES PANCREÁTICOS. SE OBSERVA MAYOR PRESENCIA DE ERITROCITOS EN LOS GRUPOS CONTRATAMIENTO Y CONTROL TINCIÓN H-E. AMPLIACIÓN 40X.

En el duodeno, los grupos tratados con indorrenato y la combinación de indorrenato más metformina mostraron alteraciones en las crestas de las vellosidades

intestinales, con alteraciones respecto al grupo control. También se observó un aumento de la luz intestinal (figura 17).

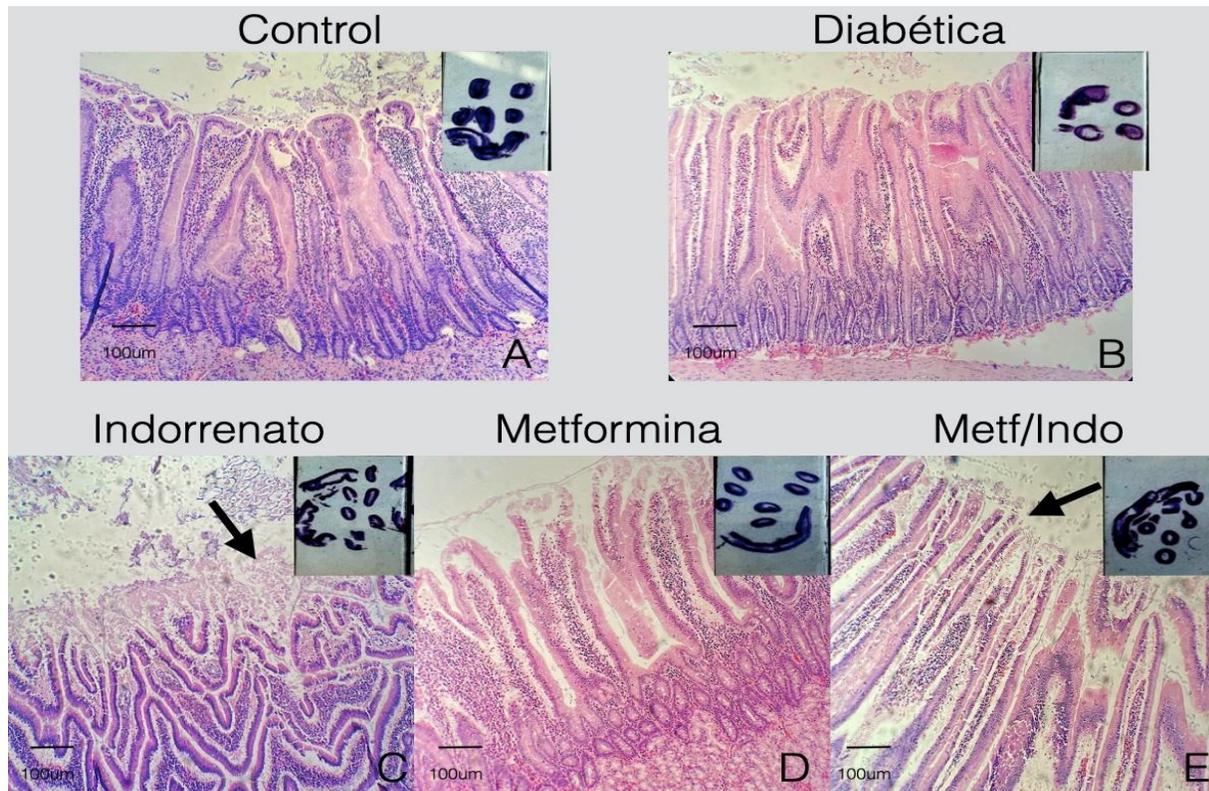


FIGURA 17. FOTOMICROGRAFÍA DEL DUODENO ZONA PROXIMAL AL ESTÓMAGO. LAS IMÁGENES SON REPRESENTATIVAS DE LOS HALLAZGOS EN RATAS CONTROL CON VEHÍCULO, EN RATAS DIABÉTICAS Y LOS TRATAMIENTOS. LAS FLECHAS (C Y D) MUESTRAN LAS CRESTAS DE LAS VELLOSIDADES QUE FUERON LASERADAS. TINCIÓN H-E. AMPLIACIÓN 40X.

En el músculo esquelético no se encontraron alteraciones en la parte microscópica.

El análisis histológico de las glándulas suprarrenales mostró un aumento del tamaño de las vesículas de almacenamiento de la biosíntesis de glucocorticoides en el grupo diabético en comparación con el grupo de control. El grupo diabético tratado con metformina modificó la proporción de la zona reticular, y los grupos tratados con indorrenato mostraron una disminución de las vesículas de la zona fascicular. También

se observó una hiperpigmentación de los núcleos en estos tres últimos grupos (Figura 18).

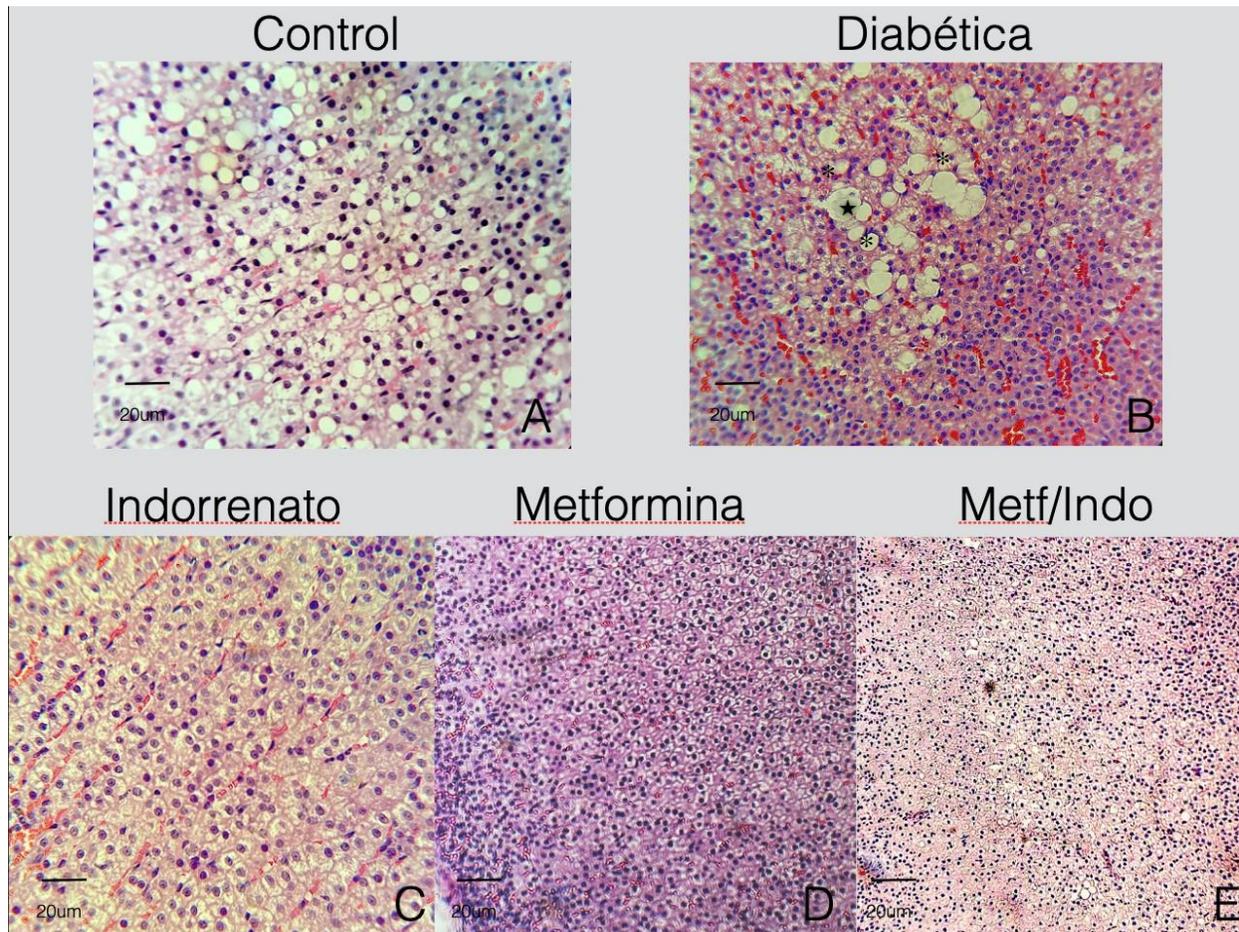


FIGURA 18. FOTOMICROGRAFÍA DE LAS GLÁNDULAS ADRENALES. LAS IMÁGENES SON REPRESENTATIVAS DE LOS HALLAZGOS EN RATAS CONTROL DIABÉTICAS CON Y SIN TRATAMIENTO DURANTE 15 DÍAS. EN EL CASO DEL TRATAMIENTO CON METFORMINA, SE OBSERVA UNA MAYOR CANTIDAD DE ERITROCITOS EN LA ZONA FASCICULAR Y RETICULAR DE LA GLÁNDULA. LOS TRATAMIENTOS CON METFORMINA Y LA COMBINACIÓN CON INDORRENATO PRESENTAN NUCLEOS HIPERPIGNOTICOS TINCIÓN H-E. AUMENTO 40X.

3. Experimento 2. Interacción metformina e indorrenato

Para el sinergismo entre el indorrenato y la metformina, se realizó el experimento de interacción. Sin embargo, primero se realizó una curva dosis-respuesta para la metformina, ya que la vía propuesta para este estudio no es la habitual de administración.

Las curvas dosis-respuesta se realizaron con metformina y se evaluaron tras cinco días de tratamiento para que se acumulara en los hepatocitos, cardiomiocitos o células musculares y ejerciera su máxima acción. Se obtuvo el área bajo la curva para cada

curso temporal con las PTGO. A partir de estos datos iniciales, se elaboraron las curvas tras cinco días de administración de metformina.

También se realizó la administración y evaluación de metformina 25, 50 y 100 mg/kg más la administración de indorrenato a una dosis única de 1 mg/kg. Se compararon las áreas bajo la curva antes del tratamiento y a los cinco días. Se representaron como el área bajo la curva (ABC) de los deltas de glucosa a los 120 min. Figura 19.

ABC Δ Glucosa con 5 días de tratamiento

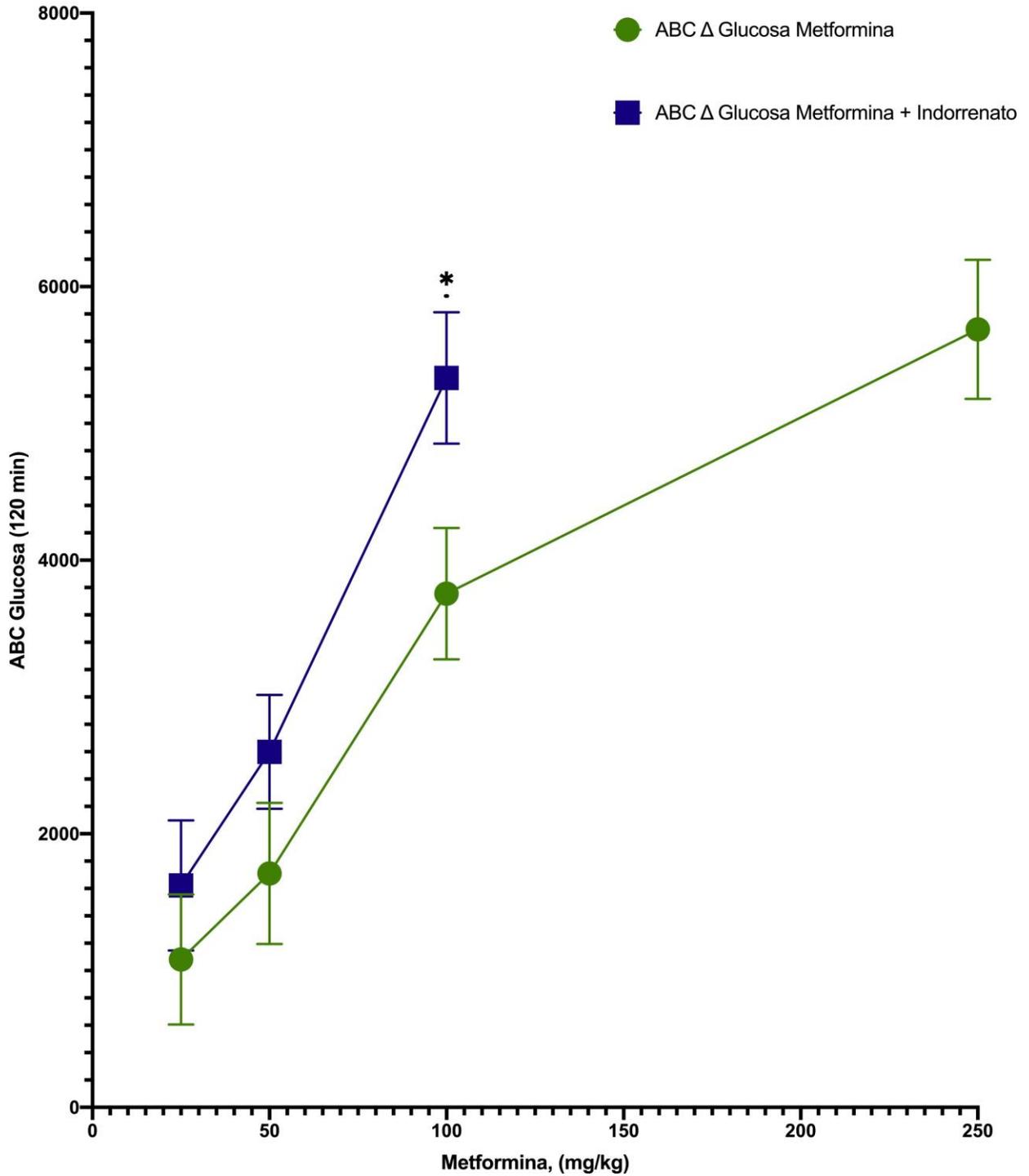


FIGURA 19. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE METFORMINA O METFORMINA + INDORRENATO POR 5 DÍAS SOBRE EL Δ DE GLUCOSA. ÁREA BAJO LA CURVA (ABC) CALCULADA A PARTIR DE LA CURVA DE PTGO. REPRESENTACIÓN DEL PROMEDIO DE 5 RATAS +/- EE.
* $p < 0.05$ VS METFORMINA POR T DE STUDENT.

Estos datos se propusieron para trabajar con el experimento 1 con la concentración de 100 mg/kg de metformina junto con el indorrenato 1 mg/kg en el experimento 1.

VI. Discusión

El indorrenato ha sido estudiado como antihipertensivo central, ansiolítico y antihiper glucémico (datos de laboratorio no publicados, Silva-Arzave 2015). Antes de este estudio, se había propuesto que la dosis más efectiva en el efecto antihiper glucémico era de 10 mg/kg. Pero nunca se había evaluado los efectos no deseados en la administración subcrónica en todos los tejidos invocados.

En los siguientes párrafos, trataremos de ver los méritos del tratamiento con indorrenato y su posible uso en la terapia de la enfermedad. Sin embargo, sin olvidar las adversidades que este compuesto aún tiene que enfrentar para proponerlo con seguridad, también buscaremos algunas posibles explicaciones de cómo algunas otras líneas de investigación apoyan nuestros hallazgos.

Diferentes informes dan cuenta de las consecuencias que la hiperglucemia tiene en el deterioro de los órganos. Algunos pacientes que sufren de DM son más susceptibles a comorbilidades específicas, apareciendo de forma más severa. Por otra parte, algunos pacientes padecen la enfermedad de forma silenciosa y no son correctamente diagnosticados.

En el presente trabajo se ha hablado muy poco de los fármacos actuales para tratar la DM. Estos fármacos parecen estar enfocados a tratar con mayor precisión la posible etiología de la enfermedad. Trataremos de ir nombrando alguno de los fármacos en el tratamiento de algunas patologías encontradas y las similitudes que encontramos con el compuesto planteado.

1. Disfunción endotelial

Como se ha mencionado anteriormente, algunos autores han propuesto que la disfunción endotelial precede a la resistencia a la insulina. Por el contrario, otros atribuyen el desarrollo de la disfunción endotelial al daño producido en el epitelio vascular por los niveles elevados de glucosa. También se ha sugerido que es en el desarrollo del síndrome metabólico cuando se producen estos cambios en la respuesta anormal del endotelio. Pero, sin duda, todos los grupos coinciden en que el tratamiento oportuno iniciado en cuanto se diagnostica al paciente es fundamental para reducir los niveles de ECV grave.

Como se observó en los gráficos de órganos aislados, la combinación de fármacos propuesta ayuda a reducir la disfunción endotelial. Además, el hecho de iniciar el tratamiento inmediatamente después de que nuestras ratas fueran categorizadas con DM ayudó en el tratamiento a observar este efecto beneficioso. Sin embargo, todavía tenemos que analizar los cambios en la presión arterial de los animales in vivo y con un modelo establecido por mas tiempo.

Se ha propuesto que el TAPV tiene actividades anticontráctiles, estimulando y secretando diferentes factores que contribuyen a una adecuada homeóstasis contráctil. Por otra parte, alguno de los otros fármacos que han reportado tener beneficio para la disfunción endotelial son los Inhibidores de la DPP-4, agonistas del receptor del GLP-1 e inhibidores del SGLT-2 y la metformina.

Aún desconocemos la función del indorrenato en el TAPV pero podemos hipotetizar que puede estar relacionada con un efecto en la disminución de triglicéridos en sangre, datos que encontramos y no han sido reportados (Figura 3 anexo).

2. Glándula adrenal

En el presente estudio se observó que una dosis de indorrenato 10 mg/kg, administrada de forma subcrónica durante 10 días en ratas macho sin enfermedades, produce alteraciones en la glándula suprarrenal. Estas alteraciones se observaron como un estado de hiperplasia en la glándula suprarrenal modificando el fenotipo de las células en la zona fascicular. Esta hiperplasia nos hizo interesarnos por la acción del indorrenato y su interacción con los receptores presentes en la zona fascicular de la glándula suprarrenal.

Los estudios que corroboran si el indorrenato altera y estimula la glándula suprarrenal fueron realizados y reportados en los anexos, en estos podemos observar que la estimulación de la gándula adrenal en un medio de cultivo y bajo un solo estímulo de indorrenato parece reducir los niveles de vesículas en la zona fascicular (Figura 5 anexo). A partir de estos datos, demostramos que el indorrenato produce aumentos de la presión en la rata descerebrada y desmedulada mediante la estimulación de la glándula suprarrenal(Figura 3 y 4 anexo). Además, el aumento de la presión no depende de la dosis cuando se administra por vía intravenosa, siempre que se eliminen las

glándulas suprarrenales. Estos datos contrastan con lo que se había informado. Se afirmaba que el aumento de la presión, estimulada por el indorrenato, se debía únicamente a la estimulación de los receptores 5-HT₂ en el endotelio vascular.

Lamentablemente, hasta donde sabemos, se han estudiado pocos fármacos en este tejido y sus posibles efectos en la DM. Uno de estos fármacos es la RU486, más conocida como Mepifestrone.

Aunque en sus inicios se propuso que el RU486 podría disminuir la resistencia a la insulina mediada por el cortisol, esto debido a su interacción con los receptores de glucocorticoides, posteriormente se observó que tiene una actividad más importante sobre los receptores de progesterona. Por esta razón es que actualmente se utiliza como abortivo, aunque se sigue utilizando en el tratamiento de los feocromocitomas. Este estudio RU486, nos anima a pensar que nuestro compuesto podría tener algún efecto beneficioso en el futuro, aunque no sea el que proponemos en este trabajo.

Por otro lado, dosis de 1 mg/kg de indorrenato no afectan negativamente a la glándula suprarrenal. Observamos la disminución de las vesículas de glucocorticoides tanto en tamaño como en número presente de éstas. Todavía desconocemos los mecanismos moleculares que pueden estar implicados. Además, desconocemos si las modificaciones se producen por la estimulación de los receptores 5-HT₂ o de algún otro receptor de serotonina presente en las células de la glándula suprarrenal.

En la glándula suprarrenal, los receptores 5-HT₂ a nivel central desempeñan un papel esencial en la secreción de catecolaminas (Wetzler et al., 1996). No obstante, autores como Sugimoto et al. (1995) y Yamada et al. (1997) informan de la presencia de receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} en la médula suprarrenal, que también inducen la liberación de adrenalina.

Además, Contesse et al. (2000) informan de que el aumento de la secreción de glucocorticoides, hormonas sexuales y aldosterona parece estar regulado por la estimulación de los receptores 5-HT₄ y 5-HT₇. En cambio, Klaassen et al. (2002) propusieron que los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{2C} están implicados en la secreción y el aumento de los niveles de glucocorticoides en la sangre. Sin embargo, no sabemos a qué tipo de receptores se acopla el indorrenato y si los cambios que produce son irreversibles.

3. Tejidos involucrados en la homeostasis de la glucosa.

Además, los estudios realizados con las ratas diabéticas del modelo propuesto demostraron que los tejidos implicados en la homeóstasis de la glucosa sufren muchos cambios.

En el **tracto gastrointestinal**, los cambios debidos a la diabetes han sido reportados como un aumento en el diámetro del tracto gastrointestinal, principalmente a nivel del duodeno y el yeyuno. Este aumento de diámetro modifica y estimula la proliferación de las células enterocromafines presentes en las vellosidades, lo que conduce a un aumento de la concentración plasmática de 5-HT y glucosa (Yabut et al., 2015). El presente estudio corroboró que existe un aumento del índice porcentual de este tejido. A nivel histológico, se corroboró el cambio en la tamaño de las vellosidades que lo conforman.

Por otro lado, se observó que el tratamiento con metformina, indorrenato y la combinación de estos dos fármacos disminuye la luz intestinal a nivel del duodeno. Esto a pesar que la metformina se administró por diferente vía a la usualmente utilizada.

A nivel microscópico, se observó que el tratamiento con indorrenato y metformina más indorrenato modificaba la población celular de las crestas vellosas del intestino. Esto podría deberse a un aumento del peristaltismo, estimulado por los receptores de serotonina, a cambios en la mucosa gástrica, así como una menor o mayor cantidad de mucopolisacáridos en los que se ha visto que participan los receptores de tipo 4 a 5-HT.

Estos cambios pueden contribuir a ralentizar la absorción de la glucosa por la disminución de los enterocitos y el aumento del peristaltismo, lo que habrá que corroborar en estudios posteriores.

En el **tejido pancreático** de los islotes de Langerhans, principalmente en las células beta, la 5-HT puede actuar estimulando la secreción de insulina mediada por el acoplamiento de esta molécula a los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2B} (Bennet et al., 2016). Estudios previos en el laboratorio reportaron que el indorrenato a dosis de 10 ml/kg

parece incrementar la secreción de insulina. Estos datos faltan de ser corroborados y reportados con los grupos realizados en este estudio.

En cuanto a los cambios en el **músculo esquelético**, la tendencia observada es una pérdida de la masa que lo conforma en las ratas diabéticas. Debido al modelo utilizado y al tiempo que la rata permaneció con hiperglucemia elevada, este cambio no se observó en su totalidad.

Los grupos tratados con metformina y metformina más indorrenato parecen aumentar el índice porcentual de masa muscular en relación con el grupo diabético. Estos datos son muy similares a los que mencionan que la metformina detiene la pérdida de masa muscular en la diabetes. Y aunado al ejercicio de las ratas puede contribuir a la ganancia en la musculatura.

En el **tejido hepático**, las ratas diabéticas y la dosis de 10 mg/kg de indorrenato parecen estimular el estado de fibrosis y esteatosis, respectivamente. El hallazgo de estos datos apoya firmemente la interacción del indorrenato con los receptores 5-HT₂. Estos receptores se han asociado con la serotonina como reguladora de la esteatosis y la posible promoción de la carcinogénesis hepática (Niture et al. 2018; Choi et al., 2018; da Silva, Eudy, & Deminice, 2020; Namkung et al., 2018). La dosis de indorrenato y de metformina más indorrenato parecen disminuir los efectos de la fibrosis hepática provocada por la metformina. Todavía no entendemos del todo el mecanismo del indorrenato, y a dosis bajas, parece no afectar a los receptores que promueven la esteatosis hepática.

Con los tratamientos de indorrenato, metformina y metformina en combinación con indorrenato, se observó que había una disminución del **tejido adiposo** visceral en todos los grupos administrados, en primera instancia, parece que el indorrenato está estimulando la lipólisis al interactuar con el 5-HTR₂ (Yun et al, 2018 y Mao et al., 2019), o podría impedir la captación de glucosa medida por el receptor GLUT-2 (Nakamura et al, 2018; Rozenblit-Susan et al, 2019). Además, diferentes autores de la metformina informaron de su efecto en la disminución del tejido adiposo visceral, por lo que no es

sorprendente que nuestros resultados también muestren esta disminución. Sin embargo, la acción de la metformina parece ser más lenta que la pérdida de tejido adiposo estimulada por el indorrenato.

4. Interacción combinación Indorrenato y metformina.

Con nuestros datos, determinamos que la dosis ideal de metformina para combinarla con el indorrenato es de 100 mg/kg; con esta dosis se incrementó el descenso de la glucosa en sangre, obteniendo un descenso rápido pero sin generar un efecto hipoglucémico. Las dosis de 50 y 25 mg/kg combinadas con indorrenato también parecen aumentar en comparación con la dosis de metformina administrada sola.

Aún falta realizar un estudio más profundo sobre la interacción de indorrenato y la metformina, pero con este primer acercamiento se quería comprobar que puede haber un sinergismo, que ambos fármacos se pueden complementar para cubrir las deficiencias de administrar un solo fármaco.

Aún queda por definir si el indorrenato produce cambios en la secreción de cortisol y si, en combinación con la metformina, potencia el efecto beneficioso de ambos compuestos en un tratamiento crónico.

VII. Conclusiones

El análisis de órganos propuesto en este estudio en ratas diabéticas muestra que el exceso de glucosa en sangre provoca cambios en el TAPV, lo que puede desencadenar alteraciones en la perfusión de los órganos y alterar la morfofisiología de los mismos; las alteraciones provocadas por la enfermedad aumentan la probabilidad de comorbilidades, ECV y un rápido deterioro del individuo.

En el tejido hepático, la probabilidad de desarrollar fibrosis hepática aumenta con la DM, mientras que los cambios en el duodeno se observan con el aumento del lumen del tracto gastrointestinal en los pacientes con DM.

Con nuestras observaciones, parece que una dosis subcrónica de 1 mg/kg atenúa eficazmente los defectos causados por la diabetes en diferentes órganos, principalmente en el endotelio vascular y la glándula adrenal. Es de nuestro escaso conocimiento, que estos aspectos han sido poco estudiados o no se han estudiado con otros tratamientos para la DM.

Por ello, consideramos que tenemos que completar la elucidación de los cambios producidos por el indorrenato, para proponerlo en el tratamiento de la DM2 y que es seguro administrarlo en conjunto con la metformina. Con esta primera aproximación preclínica, se observó que, en comparación con el grupo diabético, el indorrenato y su combinación con la metformina reducen el índice porcentual de la glándula suprarrenal, el tejido hepático, el duodeno y la grasa visceral, pero también coadyuvó en restablecer la respuesta relajante y contráctil del endotelio vascular, que desempeña un papel esencial en la homeostasis de la glucosa.

Las modificaciones en las células de la corteza, más a detalle en la zona fascicular, de la glándula suprarrenal a dosis de 10 mg/kg de indorrenato nos llevan a preguntarnos si existe una inhibición de la síntesis de glucocorticoides o si sólo se estimula la secreción de estos. La disminución de los niveles de glucocorticoides en sangre puede modificar la resistencia a la insulina inducida por los glucocorticoides y corregir la glucemia.

Por otra parte, la estimulación excesiva de la liberación de glucocorticoides conduce a un estado de agotamiento parcial de la glándula suprarrenal, lo que lleva a un estado hipoglucémico tras la liberación excesiva de cortisol. Efecto al cual podría deberse el cambio hipoglucemiante en las PTGO con dosis de 10 mg/kg de indorrenato en ratas normoglucémicas.

Aún desconocemos las respuestas moleculares que produce la administración subcrónica y crónica del indorrenato, debido a la posibilidad de interacciones que puede tener con los receptores a serotonina y que estos pueden desencadenar muchos cambios, tenemos mucho trabajo para seguir investigando.

VIII. Perspectivas

- Concluir la cuantificación de los niveles séricos de insulina y glucocorticoides en todos los grupos que se realizaron para este trabajo.
- Aclarar las modificaciones que el indorrenato produce a nivel de la glándula suprarrenal, por ejemplo, la síntesis de glucocorticoides, mineralocorticoides, hormonas sexuales y catecolaminas.
- Categorizar la interacción del indorrenato sobre los receptores 5-HT₂, 5-HT₄ y 5-HT₇.
- Concebir la administración de indorrenato en ratas diabéticas con la enfermedad largamente establecida.
- Investigar y ampliar las interacciones del indorrenato y la metformina. (0,5, 1 y 2,5 mg/kg de indorrenato).
- Examinar la interacción del indorrenato y el microbioma del tracto digestivo.
- Analizar los cambios moleculares producidos por el indorrenato en la vía de señalización de la insulina.

IX. Bibliografía

- Bader, M. (2020). Inhibition of serotonin synthesis: A novel therapeutic paradigm. *Pharmacology and Therapeutics*, 205, 107423. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.107423>
- Care, D., & Suppl, S. S. (2019). 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetesd2019. *Diabetes Care*, 42(January), S13–S28. <https://doi.org/10.2337/dc19-S002>
- Choi, W., Moon, J. H., & Kim, H. (2020). Serotonergic regulation of energy metabolism in peripheral tissues. *Journal of Endocrinology*, 245(1), R1–R10. <https://doi.org/10.1530/JOE-19-0546>
- Choi, W., Namkung, J., Hwang, I., Kim, H., Lim, A., Park, H. J., ... Kim, H. (2018). Serotonin signals through a gut-liver axis to regulate hepatic steatosis. *Nature Communications*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07287-7>
- Cryer, P. E. (2013). Mechanisms of hypoglycemia-associated autonomic failure in diabetes. *New England Journal of Medicine*, 369(4), 362–372. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1215228>
- da Silva, R. P., Eudy, B. J., & Deminice, R. (2020). One-Carbon Metabolism in Fatty Liver Disease and Fibrosis: One-Carbon to Rule Them All. *The Journal of Nutrition*, 150(5), 994–1003. <https://doi.org/10.1093/jn/nxaa032>
- Erspamer, V., & Asero, B. (1952). Identification of Enteramine, the Specific Hormone of the Enterochromaffin Cell System, as 5-Hydroxytryptamine. *Nature*, 169(4306), 800–801. <https://doi.org/10.1038/169800b0>
- Fex, M. (2018). *5-Hydroxytryptamine in the Endocrine Pancreas. Serotonin: The Mediator that Spans Evolution*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800050-2.00004-8>
- Fernández-Guasti, A., Escalante, A., Hong, E., & Agmo, A. (1990). Behavioural actions of the serotonergic anxiolytic indorenate. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 37(1), 83–88. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(90\)90045-J](https://doi.org/10.1016/0091-3057(90)90045-J)
- Hemningsen, B., Lund, S. S., Gluud, C., Vaag, A., Almdal, T. P., Hemningsen, C., &

Wetterslev, J. (2013). Targeting intensive glycaemic control versus targeting conventional glycaemic control for type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2013(11). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008143.pub3>

Halder, I., Muldoon, M. F., Ferrell, R. E., & Manuck, S. B. (2007). Serotonin receptor 2A (HTR2A) gene polymorphisms are associated with blood pressure, central adiposity, and the metabolic syndrome. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 5(4), 323–330. <https://doi.org/10.1089/met.2007.0008>

Hong, E. (1981). A Serotonergic Antihypertensive Agent. *Molecular Basis of Drug Action*.

IDF Atlas 9th edition and other resources. (2019). International Diabetes Federation. <https://diabetesatlas.org/en/resources/>

Jones, L. A., Sun, E. W., Martin, A. M., & Keating, D. J. (2020). The ever-changing roles of serotonin. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 125(May), 105776. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105776>

Kannen, V., Bader, M., Sakita, J. Y., Uyemura, S. A., & Squire, J. A. (2020). The Dual Role of Serotonin in Colorectal Cancer. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 31(8), 611–625. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2020.04.008>

Kovatchev, B. P. (2017). Metrics for glycaemic control-from HbA1c to continuous glucose monitoring. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(7), 425–436. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.3>

López-Meraz, M. L., Neri-Bazán, L., & Rocha, L. (2006). Indorenate modifies a 1 -adrenergic and benzodiazepine receptor binding in the rat brain: an autoradiography study . *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58(9), 1243–1248. <https://doi.org/10.1211/jpp.58.9.0011>

Mao, Z., Lin, H., Su, W., Li, J., Zhou, M., Li, Z., ... Zhang, W. (2019). Deficiency of ZnT8 promotes adiposity and metabolic dysfunction by increasing peripheral serotonin production. *Diabetes*, 68(6), 1197–1209. <https://doi.org/10.2337/db18-1321>

Martin, A. M., Yabut, J. M., Choo, J. M., Page, A. J., Sun, E. W., Jessup, C. F., ... Keating, D. J. (2019). The gut microbiome regulates host glucose homeostasis via peripheral serotonin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America*, 116(40), 19802–19804.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1909311116>
- Martin, A. M., Young, R. L., Leong, L., Rogers, G. B., Spencer, N. J., Jessup, C. F., & Keating, D. J. (2017). The diverse metabolic roles of peripheral serotonin. *Endocrinology*, 158(5), 1049–1063. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1839>
- Martínez-Mota, L., Estrada-Camarena, E., & López-Rubalcava, C. (2002). Indorenate produces antidepressant-like actions in the rat forced swimming test via 5-HT_{1A} receptors. *Psychopharmacology*, 165(1), 60–66. <https://doi.org/10.1007/s00213-002-1222-z>
- Matthes, S., & Bader, M. (2018). Peripheral Serotonin Synthesis as a New Drug Target. *Trends in Pharmacological Sciences*, 39(6), 560–572.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.03.004>
- Miyake, A, Mochizuki S, Takemoto Y, Akuzawa S. Molecular cloning of human 5-hydroxytryptamine₃ receptor: heterogeneity in distribution and function among species. *Mol Pharmacol*. 1995 Sep;48(3):407-16. PMID: 7565620.
- Nakamura, M., Shintani-Ishida, K., & Ikegaya, H. (2018). 5-HT_{2A} receptor agonist-induced hyperthermia is induced via vasoconstriction by peripheral 5-HT_{2A} receptors and brown adipose tissue thermogenesis by peripheral serotonin loss at a high ambient temperature. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 367(2), 356–362. <https://doi.org/10.1124/jpet.118.250217>
- Namkung, J., Shong, K. E., Kim, H., Oh, C. M., Park, S., & Kim, H. (2018). Inhibition of serotonin synthesis induces negative hepatic lipid balance. *Diabetes and Metabolism Journal*, 42(3), 233–243. <https://doi.org/10.4093/dmj.2017.0084>
- Nichols, D. E., & Nichols, C. D. (2008). Serotonin Receptors. *Chemical Reviews*, 108(5), 1614–1641. <https://doi.org/10.1021/cr078224o>
- Niture, S., Gyamfi, M. A., Kedir, H., Arthur, E., Ransom, H., Deep, G., & Kumar, D. (2018). Serotonin induced hepatic steatosis is associated with modulation of autophagy and notch signaling pathway. *Cell Communication and Signaling*, 16(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12964-018-0282-6>
- Paulmann, N., Grohmann, M., Voigt, J. P., Bert, B., Vowinckel, J., Bader, M., ... Walther, D. J. (2009). Intracellular serotonin modulates insulin secretion from

- pancreatic β -cells by protein serotonylation. *PLoS Biology*, 7(10), 1–10.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000229>
- Petersen, M. C., Vatner, D. F., & Shulman, G. I. (2017). Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(10), 572–587. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.80>
- Polonsky, K. S. (2012). The past 200 years in diabetes. *New England Journal of Medicine*, 367(14), 1332–1340. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1110560>
- Rozenblit-Susan, S., Chapnik, N., & Froy, O. (2019). Serotonin Prevents Differentiation of Brown Adipocytes by Interfering with Their Clock. *Obesity*, 27(12), 2018–2024. <https://doi.org/10.1002/oby.22606>
- Silva Arzave Abigail. (2015). “Efecto antihiperglucemiante e hipoglucemiante de un análogo de la serotonina en ratas Wistar Kyoto alimentadas con fructosa”. Tesis de maestría.
- Snell-Bergeon, J. K. (2017). Cardiovascular benefits of metformin in T1DM. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(10), 565–566. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.116>
- Steinberg, G. R. (2018). Cellular energy sensing and metabolism—implications for treating diabetes: The 2017 outstanding scientific achievement award lecture. *Diabetes*, 67(2), 169–179. <https://doi.org/10.2337/dbi17-0039>
- Turnbull, F. M., Abaira, C., Anderson, R. J., Byington, R. P., Chalmers, J. P., Duckworth, W. C., ... Woodward, M. (2009). Intensive glucose control and macrovascular outcomes in type 2 diabetes. *Diabetologia*, 52(11), 2288–2298. <https://doi.org/10.1007/s00125-009-1470-0>
- Wang, L., Fan, X., Han, J., Cai, M., Wang, X., Wang, Y., & Shang, J. (2020). Gut-Derived Serotonin Contributes to the Progression of Non-Alcoholic Steatohepatitis via the Liver HTR2A/PPAR γ 2 Pathway. *Frontiers in Pharmacology*, 11(May), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00553>
- Weiss, M., Steiner, D. F., & Philipson, L. H. (2000). *Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships*. MDText.com, Inc., South Dartmouth (MA). Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/25905258>
- Yanovski, J. A., & Cutler, G. B. (1994). Glucocorticoid Action and the Clinical Features of Cushing’s Syndrome. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*,

23(3), 487–509. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0889-8529\(18\)30080-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0889-8529(18)30080-X)
Yun, J., Jin, H., Cao, Y., Zhang, L., Zhao, Y., Jin, X., & Yu, Y. (2018). RNA-seq analysis reveals a positive role of HTR2A in adipogenesis in yan yellow cattle. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms19061760>

IX. Anexos

1. Anexos informáticos

Cultivo de glándulas adrenales para su estimulación con indorrenato.

Antes de realizar los cultivos tridimensionales, se preparó la caja de cultivo que se utilizó. En esta ocasión utilizamos cajas multipozo de 6 pozos. Añadir medio de cultivo de a 2.5-5 ml, colocarlo en la incubadora a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂. Se Preparó la matriz con un día de antelación. Se recomienda utilizar una concentración de alginato- medio de cultivo que mimetice la rigidez del tejido adiposo.

Se colocó la matriz diluida en un tubo de centrifuga y adicionaron las glándulas a cultivar. Se tomó con una micropipeta todo el volumen y proceder a la gelificación o polimerización de la matriz, puede ser agentes catalíticos como Ca²⁺.

Colocar en un medio DMEM previamente templado e incubar durante 24 horas a 37°C en una incubadora con 5% de CO₂.

Para adicionar el tratamiento, se administró entre 30 o 45 después de realizar el cultivo para asegurar que el cultivo ha comenzado a desarrollarse.

El medio de cultivo debe ser revisado diariamente y en caso de presentar un color diferente se cambió sin adicionar de nuevo el tratamiento.

2. Anexos figuras

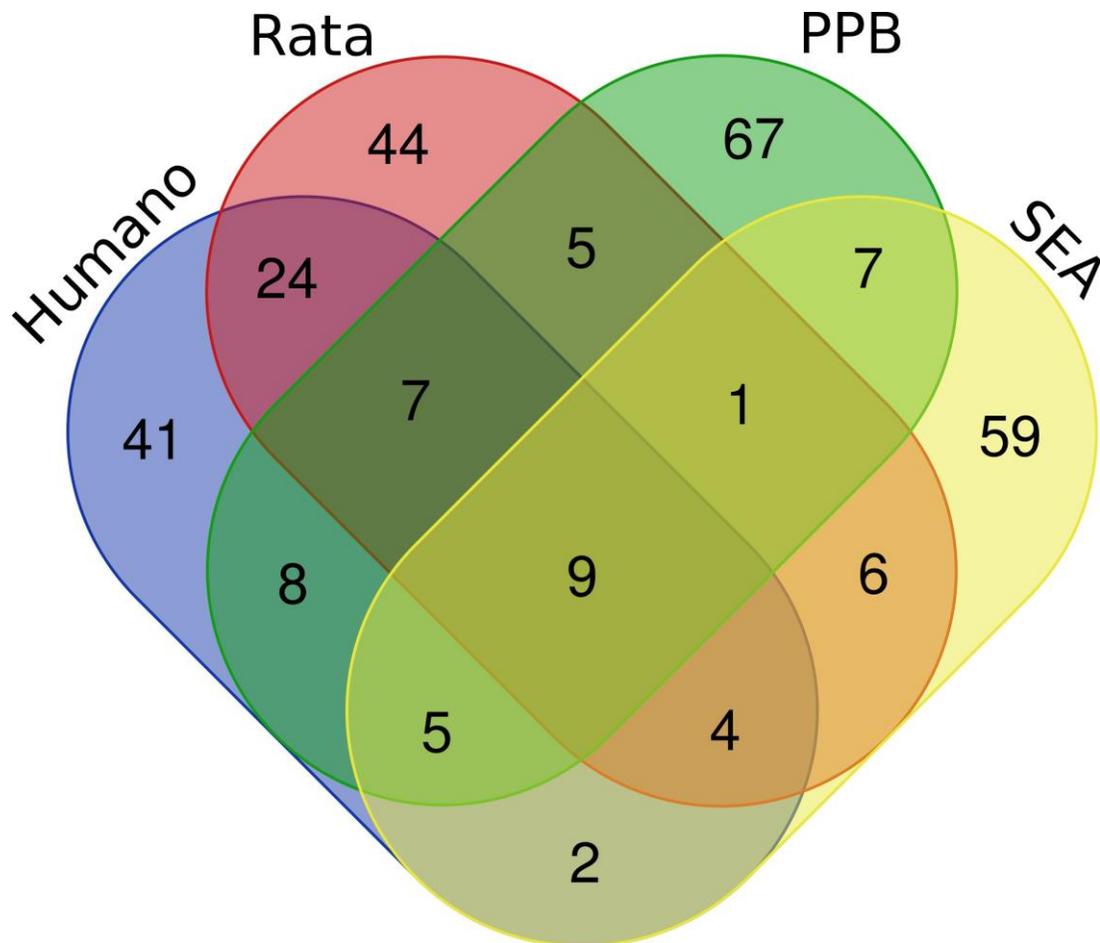


FIGURA 1 ANEXO. DIAGRAMA DE VENN DEL ANÁLISIS IN SILICO DEL INDORRENATO. PARA REALIZAR EL ESTUDIO IN SILICO SOBRE LA POSIBLE INTERACCIÓN DEL INDORRENATO CON LOS RECEPTORES, SE UTILIZARON TRES PROGRAMAS DE LIBRE ACCESO; "SWISSTARGETPREDICTION", "SEA RESEARCH PREDICTION" Y "POLYPHARMACOLOGY BROWSER". SE HIZO UN DIAGRAMA PARA ANALIZAR LAS COINCIDENCIAS. LOS TRES PROGRAMAS COINCIDEN EN QUE PUEDE UNIRSE A LOS RECEPTORES 5-HTR_{1A}, SLC6A4, 5-HTR₄, 5-HTR_{2B}, 5-HTR_{1B}, 5-HTR_{2C}, 5-HTR₇, 5-HTR_{2A} Y 5-HTR_{1D}.

% de contracción de noradrenalina de anillos de la arteria torácica

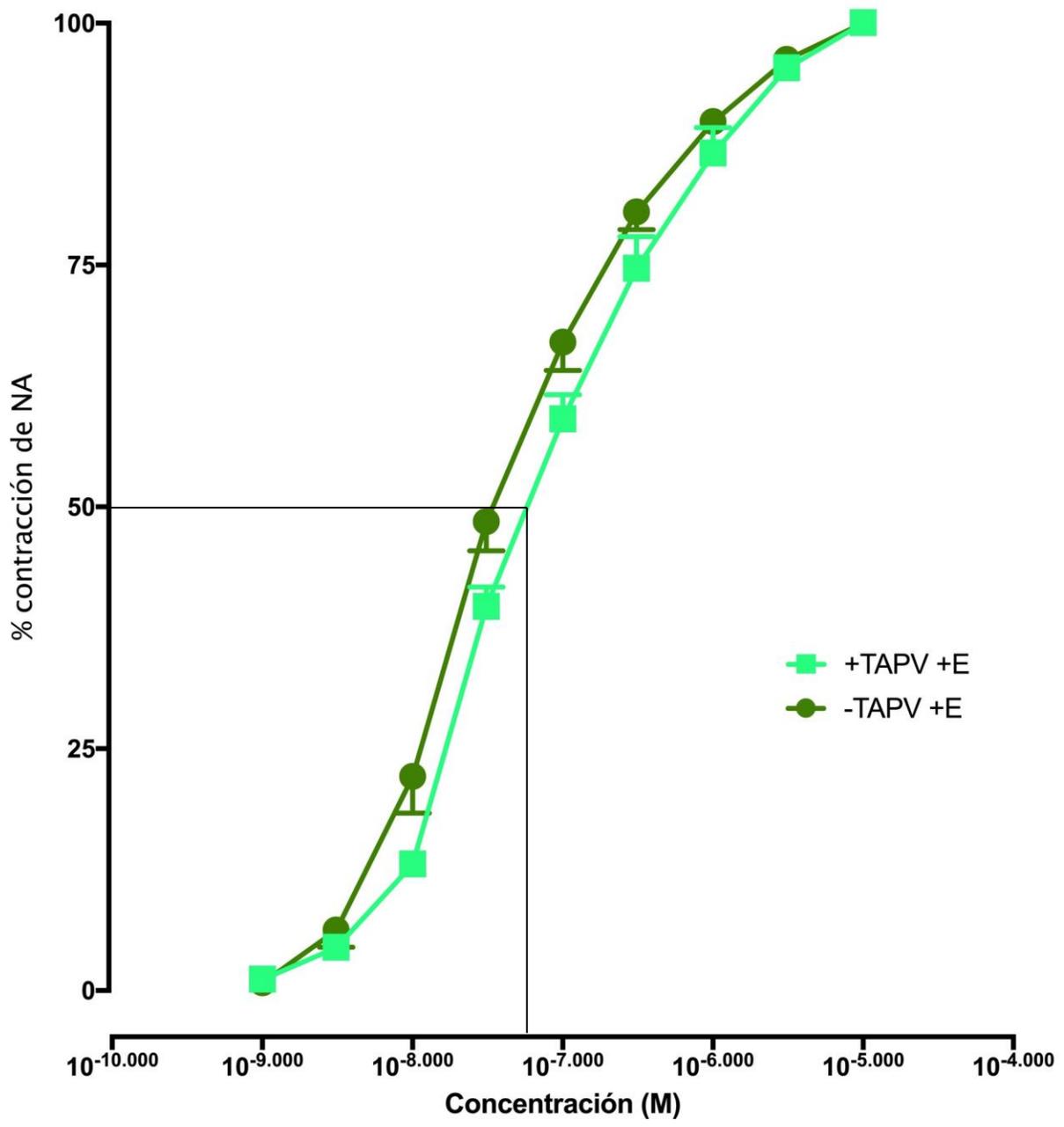


FIGURA 2 ANEXO. CURVA DOSIS RESPUESTA DE CONTRACCIÓN ESTIMULADA CON NE. LA CURVA SE REALIZÓ PARA ESTIMULAR LAS AORTAS DE LOS GRUPOS TRATADOS CON LA DE₅₀ QUE CORRESPONDE A 1×10^{-7} M

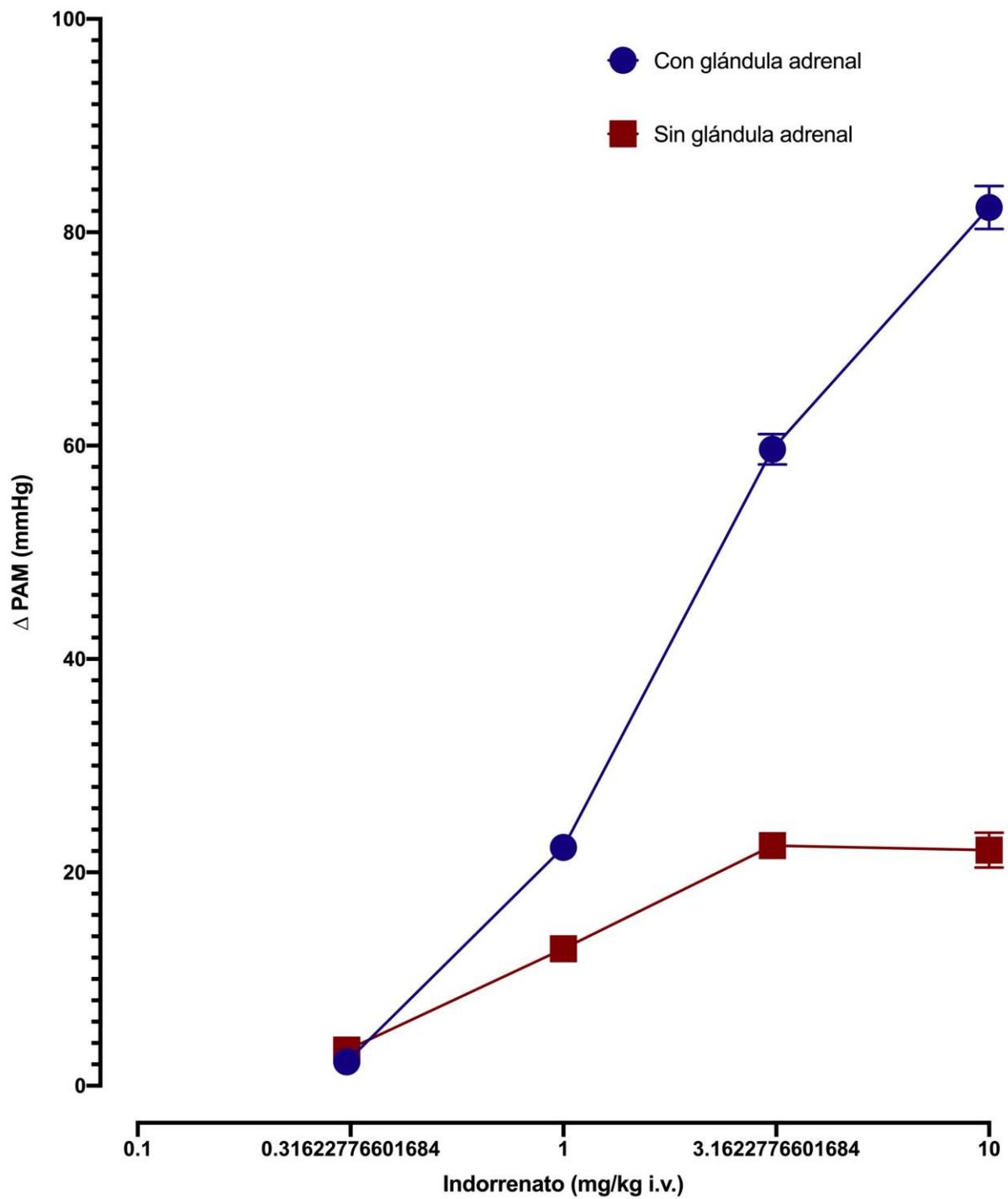


FIGURA 3 ANEXO. CURVA DOSIS-RESPUESTA DE Δ PAM CON LA ADMINISTRACIÓN I. V. DE INDORRENATO EN RATA DESCEREBRADA Y DESMEDULADA. LA PAM AUMENTA CON LA ADMINISTRACIÓN DE INDORRENATO SI PERMANECEN LAS GLÁNDULAS ADRENALES INTACTAS. SI LAS GLÁNDULAS ADRENALES SE EXTRAEN LA PAM NO REVASA LOS 20 MMHG. LOS RESULTADOS SON EXPRESADOS EN LA MEDIA \pm S.E.M. DE 6 EXPERIMENTOS POR GRUPO

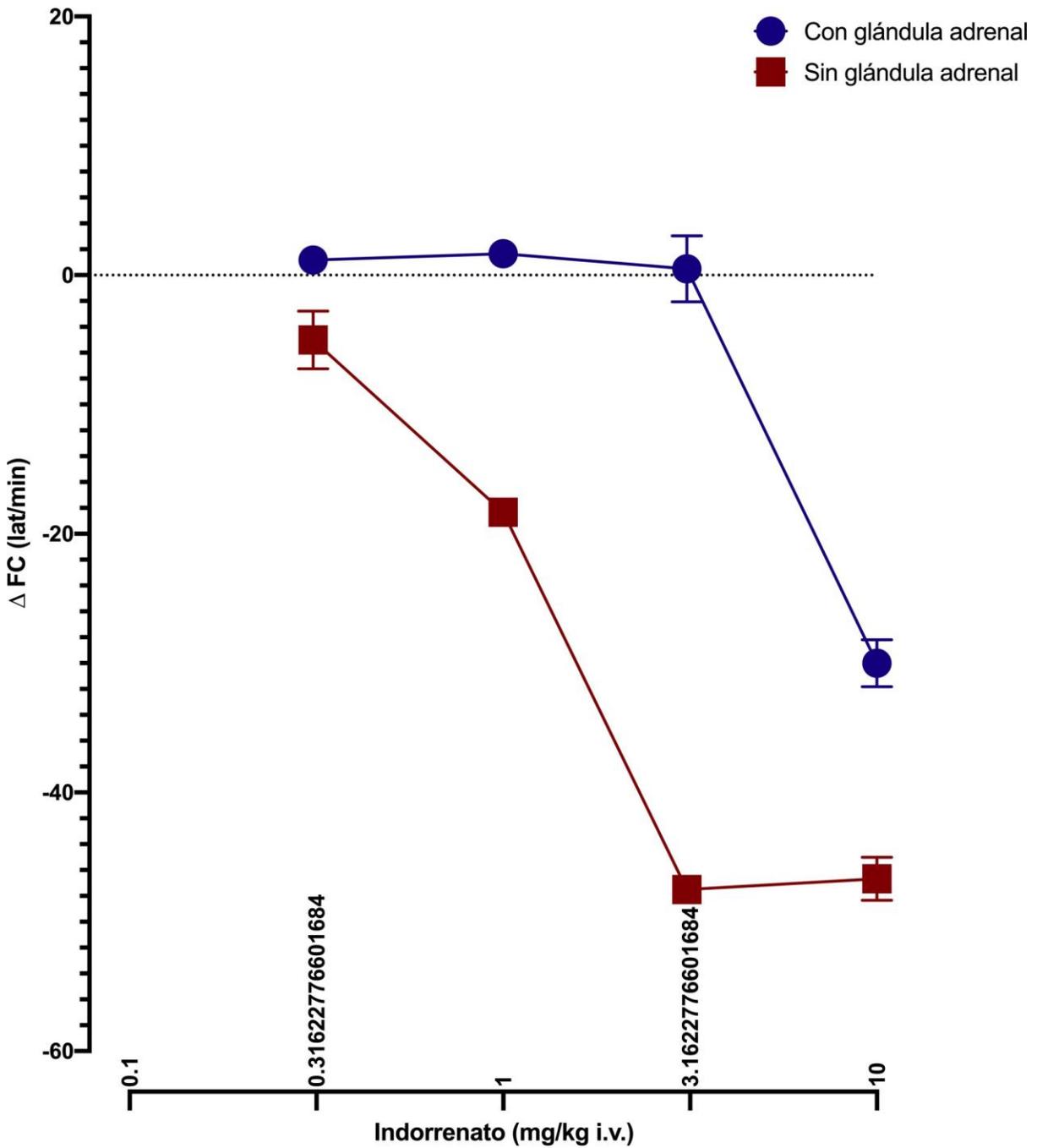


FIGURA 4 ANEXO. CURVA DOSIS-RESPUESTA DE Δ FC CON LA ADMINISTRACIÓN I. V. DE INDORRENATO EN RATAS DESCEREBRADAS Y DESMEDULADAS. LA FC NO DISMINUYE EN LAS PRIMRAS DOSIS SI LAS GLÁNDULAS ADRENALES PERMANECEN INTACTAS. SI LAS GLÁNDULAS ADRENALES SE EXTIRPAN LOS Δ FC AUMENTAN HASTA LA DOSIS DE 3.1 MG/KG. LOS RESULTADOS SON EXPRESADOS EN LA MEDIA \pm S.E.M. DE 6 EXPERIMENTOS POR GRUPO

CULTIVO CONTROL

CULTIVO TRATADO CON INDORRENATO



10X



40X



FIGURA 5 ANEXO. IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE CULTIVO TRIDIMENSIONAL DE LA GLÁNDULA ADRENAL INCUBADAS 4 HORAS A 37°C Y 5 % DE CO₂. N=3 CON Y SIN INDORRENATO (10µM). LAS IMÁGENES SUPERIORES REPRESENTAN CULTIVOS TRIDIMENSIONALES DE LAS GLÁNDULAS SUPRARRENALES CULTIVADAS EN ALGINATO, TRATANDO DE IMITAR UN ENTORNO MÁS NORMAL, GRUPO DE CONTROL LADO DERECHO Y GRUPO TRATADO LADO IZQUIERDO N=3. EN LA SIGUIENTE LÍNEA DE IMÁGENES SE OBSERVA LA ULTRAESTRUCTURA INICIAL DE LA GLÁNDULA SE OBSERVA LA PERDIDA DE LA DELIMITACIÓN DE LAS ZONAS QUE COMPONEN EL ÁREA DE LA CORTEZA. FINALMENTE, LA ÚLTIMA SERIE DE IMÁGENES CORRESPONDE A UN AUMENTO DE 40X, EN LA IMAGEN DE LA DERECHA SE VISUALIZA LA PÉRDIDA DE LAS VESÍCULAS QUE ALMACENAN LOS GLUCOCORTICOIDES EN EL LADO IZQUIERDO DE LA IMAGEN SE OBSERVA LA ZONA DE LA CORTEZA SIN CAMBIOS.