



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
PUEBLA**

**Facultad de Medicina
Licenciatura en Biomedicina**

Laboratorio de Fisiología Cardiovascular

**Estudio de la señal de calcio intracelular en células del
músculo liso vascular aisladas de aorta de ratas de la
cepa *Zucker Diabetic Fatty*.**

Tesis presentada para obtener el grado de:

LICENCIADO EN BIOMEDICINA

Presenta:

Job Pérez Becerra

Director de tesis:

DC. Roberto Berra Romani

Director metodológico:

DC. Mario García Carrasco

Puebla, Octubre 2018

Instituto de Fisiología

Licenciatura en Biomedicina

**Eficiencia terminal
Facultad de Medicina**

Índice

1. Resumen	8
2. Introducción.....	9
2.1. Diabetes Mellitus.....	9
2.1.1. Diabetes Mellitus tipo 2.....	10
3. Antecedentes.....	11
3.1. Antecedentes generales.....	11
3.1.1. Enfermedad vascular y Diabetes Mellitus.....	11
3.1.2. Modelos experimentales utilizados en el estudio de la Diabetes Mellitus	12
3.1.2.1. La cepa Zucker Diabetic Fatty como modelo animal de Diabetes Mellitus	
tipo 2	12
3.1.3. Sistema cardiovascular.....	13
3.1.3.1. Estructura de los vasos sanguíneos	13
3.1.4. Función del músculo liso vascular	15
3.1.4.1. Acople excitación-contracción en el músculo liso vascular	16
3.1.4.1.1. Acople excitación-contracción fármaco-mecánico	16
3.1.4.1.1.1. Receptor-canal purinérgico (P2X)	19
3.1.4.1.2. Acople excitación-contracción electromecánico	20
3.1.4.1.2.1. Canales de Ca ²⁺ voltaje-dependiente (Cav).....	20
3.1.5. El Ca²⁺ intracelular como regulador de la actividad contráctil del	
músculo liso.....	20
3.1.5.1. Mecanismos que reducen la [Ca ²⁺] _i en CMLV	21
3.1.5.1.1. Intercambiador Na ⁺ -Ca ²⁺ (NCX)	22
3.1.5.1.2. ATP-asa de Ca ²⁺ de la membrana plasmática (PMCA)	22
3.1.5.1.3. ATP-asa de Ca ²⁺ del retículo sarcoplásmico (SERCA)	22
3.2. Antecedentes específicos	22
4. Planteamiento del problema.....	24
4.1. Pregunta de investigación.....	25
5. Hipótesis	25
6. Objetivos.....	25
6.1. Objetivo general	25
6.2. Objetivos específicos	25
7. Material y métodos.....	26
7.1. Técnicas y procedimientos	26
7.1.1. Curva de tolerancia a la glucosa	26
7.1.2. Obtención y aislamiento de las células de músculo liso vascular.....	27

7.1.3.	Medición de la $[Ca^{2+}]$ libre intracelular	28
7.1.4.	Protocolos experimentales para el estudio de la señal de Ca^{2+} intracelular en CMLV	30
7.1.5.	Prueba estadística y análisis de resultados	31
7.1.5.1.	Definición de las variables y escalas de medición	32
7.2.	Bioética	34
7.3.	Logística	34
7.4.	Estrategia de trabajo.....	35
8.	Resultados	36
8.1.	Parámetros morfométricos y bioquímicos de las ratas ZDF	36
8.2.	Efecto de la DM2 sobre la señal de Ca^{2+} intracelular generada por ATP en CMLV aislado de aorta de rata ZDF.....	39
8.3.	Efecto de la DM2 sobre la señal de Ca^{2+} generada por cafeína en CMLV aisladas de aorta de rata ZDF	46
8.4.	Efecto de la DM2 sobre la señal de Ca^{2+} generada por la aplicación de KCl en CMLV aisladas de aorta de rata ZDF	48
8.5.	Efecto de la DM2 sobre la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} operados por los almacenes intracelulares de Ca^{2+} (SOC) en CMLV aislado de aorta de rata ZDF.	49
8.6.	Efecto de la DM2 sobre la actividad de la SERCA en CMLV aisladas de aorta de rata ZDF.	52
8.7.	Efecto de la DM2 sobre la actividad del NCX en CMLV aisladas de aorta de rata ZDF.....	54
8.8.	Efecto de la DM2 sobre la actividad de la PMCA en CMLV aisladas de aorta de rata ZDF.....	55
9.	Discusión	57
10.	Conclusiones.....	68
11.	Bibliografía.....	69

Abreviaturas

ADA	Asociación Americana de Diabetes
ATP	Adenosin trifosfato
Ca²⁺	Ión calcio
Ca-CaM	Complejo Ca ²⁺ -calmodulina
[Ca²⁺]_i	Concentración de Ca ²⁺ libre intracelular
[Ca²⁺]_{RE}	Concentración de Ca ²⁺ contenido en el RE
CaM	Calmodulina
Ca_v	Canales voltaje-dependientes de Ca ²⁺
CE	Células endoteliales
CICR	Liberación de Ca ²⁺ inducida por Ca ²⁺
CMLV	Células de músculo liso vascular
CPA	Ácido ciclopiazónico
DAG	Diacilglicerol
EE	Error Estándar
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
Gq	Proteína G _{qαq-11}
GLM	Modelo lineal generalizado
GPCR	Receptor acoplado a proteína G

IP₂	Inositol difosfato
IP₃	Inositol 1,4,5-trisfosfato
IP₃R	Receptor-canal activado por inositol 1,4,5-trisfosfato
Kv2.1	Canal voltaje-dependiente de Potasio 2.1
LZDF	Lean Zucker Diabetic Fatty
MLC	Cadena ligera de la miosina
MLCK	Cinasa de cadena ligera de la miosina
MLCP	Enzima fosfatasa de cadena ligera de la miosina
NCX	Intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺
NFAT	Factor nuclear de células T activadas
Orai	Proteína-canal de Ca ²⁺ activado por la liberación de Ca ²⁺
ON	Óxido nítrico
OZDF	Obese Zucker Diabetic Fatty
PKA	Proteína Cinasa A
PLC	Fosfolipasa C
PMCA	Bomba ATP-asa de Ca ²⁺ de la membrana plasmática
PSS	Solución salina fisiológica
P2Y	Receptor purinérgico metabotrópico
P2X	Receptor purinérgico inotrópico
ROCE	Entrada de Ca ²⁺ operada por receptor
ROI	Región de interés

RyR	Receptor rianodínico
SERCA	Bomba ATP-asa de Ca^{2+} del retículo endoplásmico
SOC	Canal Operado por almacenes intracelulares
SOCE	Entrada de Ca^{2+} operada por almacenes intracelulares
STIM	Molécula de interacción estromal.
TRPC	Canales receptores de potencial transitorio
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
ZDF	Zucker Diabetic Fatty
0 Ca^{2+}	Ausencia de Ca^{2+} extracelular

1. Resumen

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2), una enfermedad caracterizada por altos niveles de glucosa producidos por la resistencia a la insulina, constituye el 90% de los casos de diabetes mellitus en los seres humanos a nivel mundial. Además, la DM2 aumenta de 2 a 3 veces el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares como hipertensión o aterosclerosis donde el funcionamiento de las células de músculo liso vascular (CMLV), encargadas de regular el tono arterial de los vasos sanguíneos, podría estar comprometido. Muchas funciones de las CMLV, entre ellas la contracción muscular, están reguladas por la concentración de calcio (Ca^{2+}) intracelular. Diversas investigaciones reportan que la DM2 genera alteraciones en el manejo del Ca^{2+} extracelular en CMLV, sin embargo, la mayor parte de estos estudios han sido realizados en condiciones distintas a las establecidas en esta tesis. Por lo tanto, la hipótesis propuesta en la presente tesis es que la DM2 causa alteraciones en la homeostasis de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en CMLV aisladas de aorta de ratas Zucker Diabetic Fatty (ZDF). La cepa ZDF es un modelo animal que desarrolla obesidad y DM2, útil debido a su similitud con el cuadro clínico presentado por los pacientes humanos. Las ratas ZDF fueron agrupadas de acuerdo a parámetros morfométricos y metabólicos en: LZDF (control-delgadas) y OZDF (diabéticas-obesas). Se diseccionó la aorta abdominal y las CMLV se aislaron enzimáticamente, posteriormente fueron incubadas con el indicador de Ca^{2+} Fura-2/AM y por medio de microscopia de epifluorescencia evaluamos la señal de Ca^{2+} intracelular inducida por distintos agonistas vasoactivos (ATP, cafeína, KCl y CPA) que incrementan la liberación/entrada de Ca^{2+} por medio de diferentes mecanismos. Utilizando herramientas farmacológicas evaluamos las alteraciones causadas por la DM2 sobre la actividad de los mecanismos que regulan la concentración de Ca^{2+} intracelular en las CMLV (SERCA, NCX y PMCA). Nuestros resultados demuestran que la DM2 causa una desensibilización de la señal de Ca^{2+} evocada por cafeína y ATP en presencia de Ca^{2+} extracelular, un incremento en la actividad de la SERCA y disminución de la actividad del NCX. En conjunto estos resultados confirman que la DM2 causa alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en CMLV.

2. Introducción

2.1. Diabetes Mellitus

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad heterogénea comprendida por distintos factores genéticos y ambientales que conllevan a la pérdida de células β del páncreas manifestándose clínicamente con altos niveles de glucosa sanguínea (American Diabetes Association (ADA), 2017). El alcance de esta enfermedad se exhibe desde edades tempranas, como la adolescencia o la niñez, hasta la edad avanzada (Agirbasli et al., 2015). En el mundo hay más de 422 millones de personas con DM (Zhou et al., 2016) mientras que en México hay más de 11,5 millones de pacientes que padecen esta enfermedad (International Diabetes Federation, 2013). Se estima que en el 2015 los gastos para tratar y prevenir la DM oscilaron entre los 673,000 y 1,197,000 millones de dólares (International Diabetes Federation, 2013). Otro elemento importante a resaltar es la complejidad del diagnóstico y tratamiento que presentan los pacientes con DM ya que están sujetos a la amplia variabilidad biológica predeterminada por factores étnicos y epigenéticos (Menke et al., 2014). A continuación se anexa una tabla con los parámetros anunciados por la ADA para el diagnóstico de la DM.

Prueba de diagnóstico	Parámetros normales	Parámetros en DM
A1C (Hemoglobina glucosilada)	$\leq 5.6\%$	$\geq 6.5\%$
Prueba de tolerancia a la glucosa oral (medición posterior a las dos horas de ingesta de 75 gramos de glucosa)	≤ 140 mg/dL	≥ 200 mg/dL
Glucosa plasmática en ayuno (ayuno de 8 horas)	80– 100 mg/dL	≥ 126 mg/dL
Glucosa plasmática casual		≥ 200 mg/dL

Tabla I. Criterios de la ADA para el diagnóstico de la DM

Dado que la DM es considerada como una enfermedad multicausal (Guire & Marx, 2015) se ha propuesto clasificarla de la siguiente manera:

- **DM tipo I (insulinodependiente) (DM1).** Trastorno crónico característico por surgir desde la niñez y causada por la destrucción autoinmune de las células β ubicadas en los islotes de Langerhans dentro del páncreas, lo que conlleva a la baja o nula producción de insulina (Li, Cheng, & Zhou, 2016).
- **DM gestacional.** Generada durante el embarazo y originado a partir de cambios físicos y endocrinos importantes que pueden originar un estado diabetogénico que lleva a la resistencia de insulina (Mottola & Artal, 2016).
- **Otras variantes de DM.** Generadas de forma química a causa de la administración de fármacos antipsicóticos o retrovirales (por ejemplo, terapia contra VIH); también puede originarse por el desarrollo de trastornos pancreáticos (Guire & Marx, 2015).
- **DM tipo II (DM2).** Provocada por la resistencia a la insulina y caracterizada por la pérdida progresiva en la producción de insulina por parte de las células β del páncreas (American Diabetes Association (ADA), 2017). Es el tipo de diabetes con mayor prevalencia a nivel mundial (Zimmet et. al, 2016).

2.1.1. Diabetes Mellitus tipo 2

Actualmente se sabe que el 90-95% de los casos de DM se concentra en la DM2 (American Diabetes Association (ADA), 2017) y se estima que en México más del 15% de la población tiene diabetes, lo que lo convierte en el país número uno con esta enfermedad (Indicators, 2017). La DM2, denominada también como no insulinodependiente, es aquella en la que los pacientes generan resistencia a la insulina y ocasionalmente deficiencia en la producción de esta hormona (American Diabetes Association (ADA), 2017). Los pacientes que tienden a generar esta patología pueden llegar a presentar disfunción de las células β -pancreáticas, causando la progresiva pérdida en la producción de insulina.

El cuadro clínico que genera la DM2 es amplio, ya que impacta en distintos sistemas del cuerpo, como el renal, nervioso y cardiovascular, entre otros. Algunas de las afectaciones que puede provocar la DM2 son: nefropatías, neuropatías,

retinopatías, úlceras en extremidades inferiores y alteraciones en el sistema cardiovascular, como la enfermedad vascular periférica, aterosclerosis, infarto agudo al miocardio e hipertensión arterial (American Diabetes Association (ADA), 2017; Zhou et al., 2016).

3. Antecedentes

3.1. Antecedentes generales

3.1.1. Enfermedad vascular y Diabetes Mellitus

Existen diversas investigaciones epidemiológicas que demuestran la cercana asociación entre la DM2 y el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (Tao et al., 2015). Uno de estos estudios es el de Framingham (Framingham Heart Study), iniciado en 1948 por el servicio de Salud Pública de Estados Unidos con el fin de determinar la epidemiología y factores de riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. Del estudio antes señalado, en 1974 se concluyó que la DM incrementa de 2 a 3 veces la probabilidad de padecer enfermedades asociadas al sistema cardiovascular. Entre estas enfermedades podemos encontrar a la cardiopatía coronaria, enfermedad cerebrovascular (accidentes cerebrovasculares) y a la enfermedad vascular periférica (Donnell & Elosua, 2008).

En la actualidad se sabe que las enfermedades cardiovasculares son generadas a causa de alteraciones en la fisiología del endotelio vascular (Goligorsky, 2017). La oxidación de ácidos grasos durante la aterosclerosis, la glucosilación de proteínas, la respuesta inflamatoria desregulada, la baja biodisponibilidad del óxido nítrico (ON) y el incremento en los niveles de endotelina son algunos de los factores que afectan la fisiología del endotelio vascular (Yang et al., 2016). Sin embargo, muchas de estas alteraciones podrían no ser exclusivas del endotelio ya que otros estudios en modelos animales mencionan que el funcionamiento de las células de músculo liso vascular (CMLV) podría estar comprometido (Fernández-velasco et al., 2014). También se ha demostrado

experimentalmente que las alteraciones vasculares persisten incluso cuando el endotelio está ausente (Pinho et al., 2010).

A la fecha se han realizado un gran número de investigaciones con la finalidad de conocer los mecanismos moleculares precisos por los cuales la DM causa las enfermedades cardiovasculares antes mencionadas. Muchas de estas investigaciones se han realizado utilizando modelos animales que presentan características similares a las que presentan las personas diabéticas.

3.1.2. Modelos experimentales utilizados en el estudio de la Diabetes Mellitus

3.1.2.1. *La cepa Zucker Diabetic Fatty como modelo animal de Diabetes Mellitus tipo 2*

Dado que la DM es una enfermedad multifactorial, han surgido diferentes variantes de modelos animales para el estudio de la DM tipo I y tipo II (Al-awar et al., 2016a). Dentro de esta gama de modelos encontramos los que desarrollan resistencia a la insulina (DM no insulino dependiente), y en algunos casos, alteraciones en las células β del páncreas. En esta variedad de animales podemos encontrar modelos obesos (poligénicos y monogénicos), no obesos (ratones KK, rata OLEFT y ratones NZO), con obesidad inducida (prominente ingesta calórica), alterados genéticamente (ratones *hiAPP*,) y otros modelos no roedores; como gatos, primates, perros y porcinos (Al-awar et al., 2016b; Kitada et al., 2016). También se han establecido modelos monogénicos que presentan defectos en la señalización de la leptina, hormona que disminuye el apetito por incrementar la producción de péptidos anorexígenos. Entre estos modelos animales encontramos a los ratones *Lep^{ob/ob}*, *Lepr^{db/db}* y las ratas Zucker Diabetic Fatty (ZDF) (Chatzigeorgiou et al., 2009; Etuk, 2010; King, 2012; Rees & Alcolado, 2005).

La cepa de ratas Zucker Diabetic Fatty (ZDF) es un modelo animal útil para el estudio de la DM2, caracterizado por tener una mutación genética en el receptor de leptina (gen *fa*) (Al-awar et al., 2016a; B. Wang et al., 2014). Esta cepa cuenta con dos fenotipos distintos: las ratas Lean Zucker Diabetic Fatty (LZDF), heterocigota (*fa/+*) u homocigota (*+/+*), delgada y normo glucémica; y la rata

Obese Zucker Diabetic Fatty (OZDF), homocigota (*fa/fa*), la cual desarrolla una conducta hiperfágica que la lleva a desarrollar obesidad a partir de la tercera semana de edad, siendo severa a las 5 semanas (B. Wang et al., 2014). La concentración de glucosa plasmática en las ratas OZDF llega a incrementarse en comparación de su control a partir de la 7^a-9^a semana (Shiota & Printz, 2012) presentando diabetes entre las 8 a 10 semanas de edad (Katsuda et al., 2014). El fenotipo OZDF muestra varias características similares a las presentes en el cuadro clínico de DM2 desarrollado en el humano, lo que justifica su uso en el estudio de esta patología (Shiota & Printz, 2012). Algunos de los signos presentados por la cepa ZDF son los siguientes: dislipidemia, hiperglicemia, hiperinsulinemia, disfunción de células β -pancreáticas, resistencia a la insulina, hipertensión arterial (Al-awar et al., 2016b; Kitada et al., 2016) y disfunción vascular (C. L. Oltman et al., 2008; C. Oltman et al., 2006). El uso de la cepa ZDF ha sido ampliamente reportado en la bibliografía ya que es un modelo animal utilizado en el estudio de los efectos de la obesidad, la señalización de la leptina y la DM2 (B. Wang et al., 2014). Además, el estudio de los efectos de la DM2 sobre la fisiología del sistema cardiovascular en el modelo ZDF es amplio (T. Lu et al., 2005, 2008; X. Lu et al., 2010; Marsh et al., 2007; Mizuno, Sada, Kato, & Koike, 2002; C. L. Oltman et al., 2008; C. Oltman et al., 2006; Siwy et al., 2012).

3.1.3. Sistema cardiovascular

El sistema cardiovascular se encarga de distribuir distintos nutrientes, gases disueltos, hormonas y otros factores que ayudan al correcto funcionamiento del organismo. Este sistema está integrado por: sangre, corazón y vasos sanguíneos (venas y arterias). Estos últimos constituyen el sistema de conducción de la sangre (Boron & Boulpaep, 2017).

3.1.3.1. Estructura de los vasos sanguíneos

Las arterias y venas están formadas principalmente por tres capas tisulares (ver **Figura 1**):

- ⊙ **Túnica íntima (capa interna):** Está compuesta por una monocapa de células endoteliales (CE) que recubren la pared interna de los vasos

sanguíneos, la lámina basal del endotelio y tejido conectivo subendotelial. Las funciones de las CE son diversas: actúa como barrera semipermeable en la modulación del transporte transendotelial, regulan procesos fisiológicos como la hemostasia, angiogénesis y el control del tono vascular mediante la producción de agentes vasorrelajantes (ej. óxido nítrico y prostaciclina) y/o vasoconstrictores (ej. endotelina) (McCarron et al., 2017).

- ⊕ **Túnica adventicia (capa externa):** Está ubicada en la pared externa de los vasos sanguíneos, conformada por tejido conjuntivo laxo, fibroblastos, terminales nerviosas de origen simpático y una red de pequeños vasos que forman la vasculatura propia de las arterias y venas de mayor tamaño denominada *vasa vasorum*. Las fibras de colágeno y elastina conforman la *lámina elástica externa* que divide a la túnica adventicia con su contigua, la túnica media (Ritman & Lerman, 2007).
- ⊕ **Túnica media:** Se encuentra justo en medio de las dos capas antes mencionadas y se compone por proteínas de la matriz extracelular, como colágeno y elastina. Algunas de estas proteínas sirven como límite entre la túnica media de la íntima para formar la *lámina elástica interna*, otras son necesarias para mantener la estructura del vaso. En esta capa es donde se encuentran las células de músculo liso vascular (CMLV) (Tonar et al., 2015).

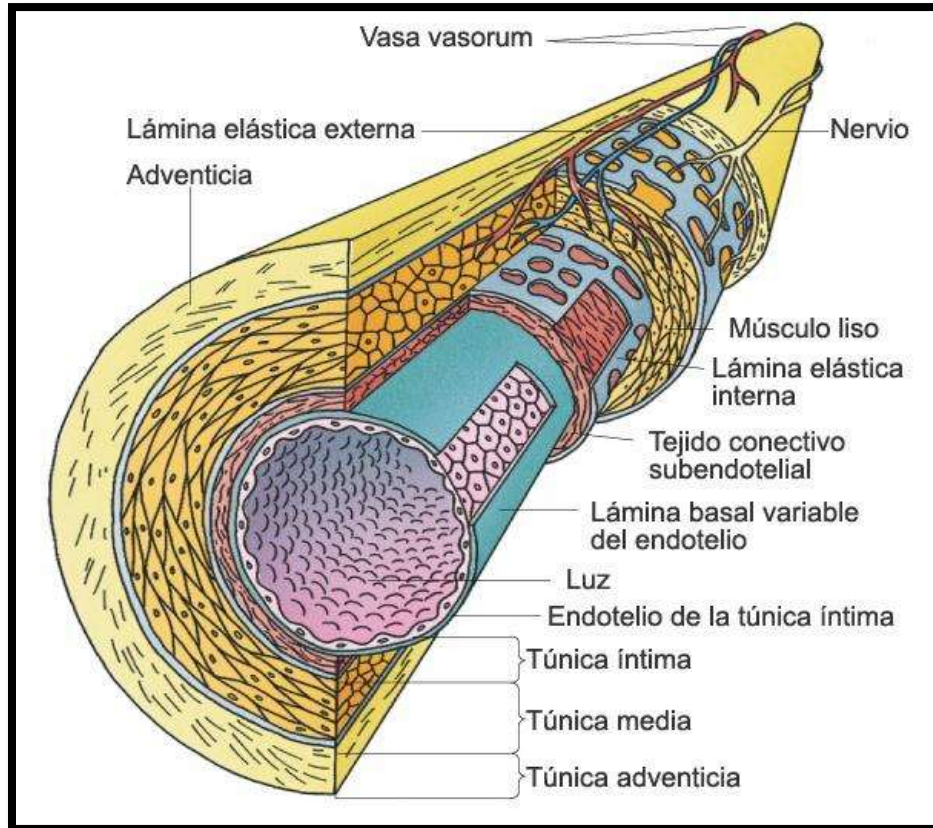


Figura 1. Estructura de los vasos sanguíneos. Estructura general de la mayoría de los vasos sanguíneos. Imagen tomada de http://morfocitologia.blogspot.mx/2008/07/microscopia-virtual-vasos_25.html

3.1.4. Función del músculo liso vascular

Las CMLV son alargadas, fusiformes y su función primordial es la generación de fuerza para producir contracción. La contracción de las CMLV regula el diámetro de los vasos sanguíneos y por consiguiente la resistencia periférica, presión arterial y flujo sanguíneo dentro de los órganos y tejidos según las demandas metabólicas y fisiológicas del organismo (Creager et al., 2013). La actividad de las CMLV está modulada por estímulos de distintos tipos: *estímulos neurales*, dada su innervación autónoma gobernada por terminales nerviosas (varicosidades) liberadoras de neurotransmisores (noradrenalina, neuropéptido Y o ATP); *estímulos químicos*, que son afines a receptores sensibles a ligandos circulantes del torrente sanguíneo y generan cambios en la fisiología interna de las CMLV por la activación de distintas vías de señalización (Bastin & Heximer, 2011;

Kim et al., 2008; Mohrman, 2012); y *estímulos físicos*, mediante la apertura de canales mecano-sensibles producida por la presión arterial y deformaciones en la membrana (Ji et al., 2002; Smani et al., 2015). Gracias al mecanismo de contracción generado por canales mecano-sensibles, las arterias son capaces de generar el *tono miogénico*, control de la contracción-relajación dependiente de la presión intraluminal del vaso sanguíneo (Rhoades, 2013). Los estímulos ya mencionados dan lugar al acople excitación-contracción que se explica a continuación.

3.1.4.1. Acople excitación-contracción en el músculo liso vascular

El mecanismo molecular por el cual se inicia el proceso contráctil en las células musculares se conoce comúnmente como “acople excitación-contracción”. En el músculo liso vascular se han propuesto dos mecanismos para explicar el acople excitación-contracción: uno es el acople electromecánico y el otro ha sido denominado acople fármaco-mecánico (Rhoades, 2013).

3.1.4.1.1. Acople excitación-contracción fármaco-mecánico

El acople fármaco-mecánico consiste en la activación de la contracción en pequeñas arterias y arteriolas a partir de la estimulación de las CMLV por diferentes moléculas vasoactivas como son neurotransmisores, hormonas, sustancias derivadas del endotelio y metabolitos locales, con la finalidad de asegurar un flujo sanguíneo adecuado hacia los tejidos de acuerdo a sus demandas metabólicas. Las sustancias vasoactivas, ejercen su acción en las CMLV causando un incremento en la concentración de Ca^{2+} libre intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) (S.A. Fisher, 2017).

En condiciones de reposo, es decir, en CMLV no estimuladas, la concentración de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es de aproximadamente 100 nM (Marchand et al., 2012), mientras que en retículo endoplásmico (RE) y mitocondrias, los principales almacenes de Ca^{2+} intracelular, es de alrededor de 500 μM (Dupont & Croisier, 2010). Diversas moléculas vasoactivas (ligandos) tales como noradrenalina, angiotensina II, vasopresina, endotelina-1, y adenosin trifosfato (ATP), al unirse a receptores específicos presentes en la membrana plasmática de las CMLV

(Amberg & Navedo, 2013; S A Fisher, 2010; Gonzalez-Cobos & Trebak, 2010) causan un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ alcanzando valores entre 400 nM (Castro et al., 1994) y 1 μ M (Brock et al., 1985).

El mecanismo por el cual las sustancias vasoactivas causan el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ se inicia cuando el agonista vasoactivo (ligando) se une a un receptor acoplado a proteína G (GPCR) (**ver Figura 2**) y activa a la proteína trimérica de tipo $G_{\alpha q-11}$ (Gq), la cual incrementa a su vez, la actividad de la fosfolipasa C (PLC) (Ghosh et al., 2017). La PLC hidroliza el fosfolípido de membrana, fosfatidilinositol difosfato (IP_2), produciendo diacilglicerol (DAG) y fosfatidilinositol trifosfato (IP_3) (van Breemen et al., 2013). El DAG usualmente induce la apertura de canales operados por receptor (de tipo TRPC) que median la entrada de Ca^{2+} y en ocasiones la de Na^+ para contribuir al proceso contráctil (Gonzalez-Cobos & Trebak, 2010). Algunas de las isoformas de los TRPC presentes en la CMLV son: 1, 3, 4, 5 y 6 (Gonzalez-Cobos & Trebak, 2010; Hill-eubanks et al., 2011; Trebak, 2012).

Por otro lado, el IP_3 difunde hasta la membrana del RE y se une de manera selectiva a los receptores sensibles a esta molécula (IP_3R) presentes en la membrana de este organelo, causando la apertura de estos canales. La apertura de los IP_3R , permite la liberación de Ca^{2+} almacenado en el RE hacia el citoplasma con el consecuente aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ (Amberg & Navedo, 2013). Los IP_3R encontrados en CMLV son tres (IP_3R -I/II/III) y en todos ellos, en adición a su activación por IP_3 , su probabilidad de apertura incrementa por una elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ (Tykocki, Boerman, & Jackson, 2017).

El aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ causado por liberación de Ca^{2+} del RE a través de los IP_3R puede activar a los receptores ryanodínicos (RyR), canales de Ca^{2+} presentes en la membrana del RE, lo que origina un proceso común en las CMLV denominado "liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR) (Abou-Saleh et al., 2013; Althoff & Offermanns, 2015). Se sabe que son tres las isoformas (RyR 1-3) que se encuentran en CMLV pertenecientes a mamíferos. Los RyR en CMLV pueden activarse por la aplicación de cafeína 10 mM (Ghosh et al., 2017) y son

bloqueados por el alcaloide ryanodina (Savoia et al., 2014) a una concentración de 100 μM (Alexander et al., 2017).

Cuando la concentración de Ca^{2+} en el interior del RE disminuye, por ejemplo, por la apertura de los IP_3R y/o RyR , se activa un mecanismo conocido como entrada de Ca^{2+} dependiente de los almacenes intracelulares de Ca^{2+} o SOCE del inglés “store operated Ca^{2+} entry”. La SOCE, comprende la interacción entre dos moléculas: la proteína STIM (Stromal Interaction Molecule) que se encuentra en la membrana del RE y Orai, proteína presente en la membrana plasmática que en forma de tetrámeros forma los canales SOC (Putney, 2017) (ver **Figura 2**). Cuando se reduce la concentración de Ca^{2+} dentro del RE, el Ca^{2+} se disocia de su sitio de unión en el extremo N-terminal de la proteína STIM (motivos EF-hand) que es sensible al catión (Trebak, 2012), esto ocasiona que varias STIM se agreguen en regiones de la membrana del RE conocidas como “puncta”. El complejo “puncta” causa una deformación de la membrana del RE que permite que el agregado de proteínas STIM se aproximen a la membrana plasmática (Kuang et al., 2017; Spinelli & Trebak, 2015). De esta manera, el extremo C-terminal citoplasmático de STIM interacciona directamente con el dominio C-terminal citosólico de tetrámeros de Orai. El resultado es un reclutamiento de tetrámeros de Orai para formar canales de Ca^{2+} activos (SOC) que median la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana de las CMLV (Chaudhari & Ma, 2016).

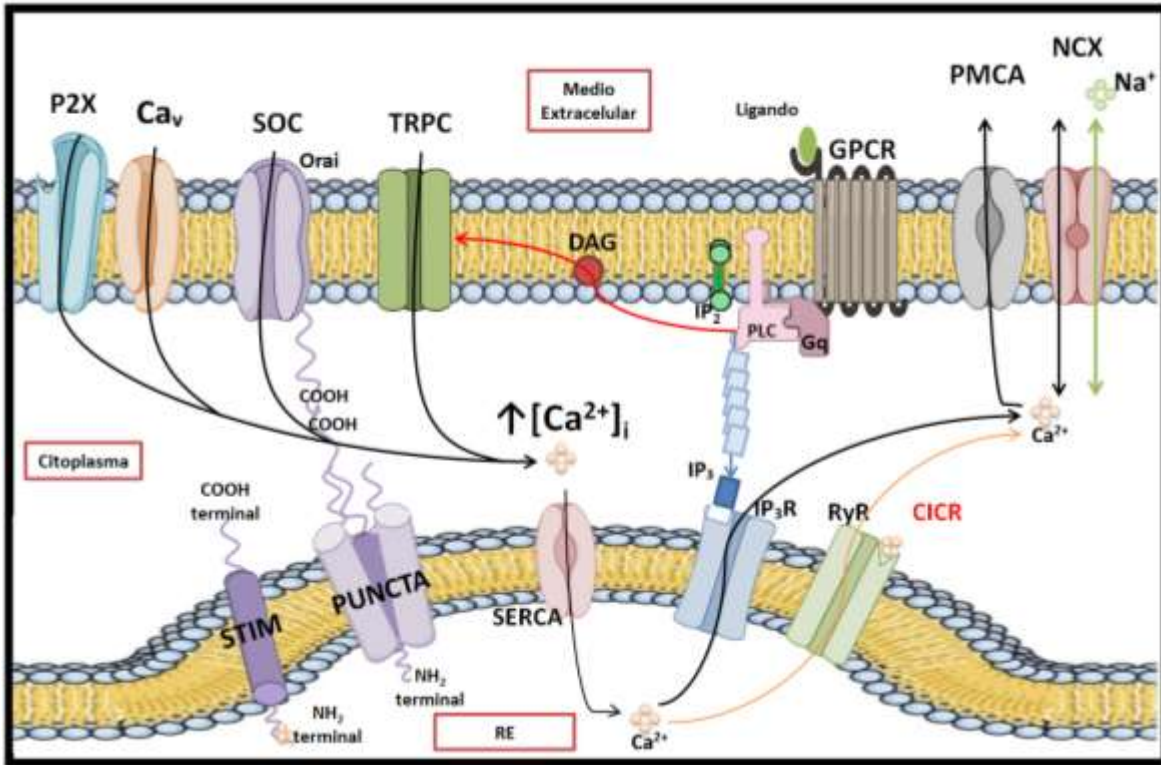


Figura 2. Mecanismos moleculares que participan en la regulación de la $[Ca^{2+}]_i$ en células de músculo liso vascular. Receptor inotrópico purinérgico (P2X), canal de Ca^{2+} voltaje-dependiente (Ca_v), canal operado por almacenes intracelulares de Ca^{2+} (SOC), canales iónicos Receptores de Potencial Transitorio (TRPC), receptor acoplado a proteína G (GPCR), fosfolipasa C (PLC), diacilglicerol (DAG), fosfatidilinositol difosfato (IP_2), fosfatidilinositol trifosfato (IP_3), receptor a fosfatidilinositol trifosfato (IP_3R), proteína Gq-11 (Gq), ATP-asa de Ca^{2+} de membrana plasmática (PMCA), intercambiador Na^+/Ca^{2+} (NCX), ATP-asa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (SERCA), receptor rianodínico (RyR), liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR).

3.1.4.1.1.1. Receptor-canal purinérgico (P2X)

Entre las sustancias vasoactivas que activan la contracción de las CMLV, se encuentra el ATP, el cual actúa sobre dos tipos de receptores: P2Y y P2X. Los receptores P2Y son receptores acoplados a proteínas Gq y cuya vía de señalización fue descrita en el apartado anterior. Por otra parte los receptores P2X (ver Figura 2) son de tipo ionotrópico (receptor-canal), que al ser activados por ATP permiten la entrada de Ca^{2+} y Na^+ del medio extracelular (Gil & Mauban, 2017). Se ha reportado la expresión de los receptores punérgicos de tipo P2X en CMLV, sin embargo su expresión difiere según el tipo de arteria y especie animal,

un ejemplo es el receptor P2X1, el cual se expresa en las CMLV provenientes de aorta de rata (Burnstock, 2017; Erlinge & Burnstock, 2008).

Los cambios fisiológicos que genera el ATP como ligando extracelular pueden ser a corto y largo plazo: induciendo la contracción de CMLV y/o por la activación de factores de transcripción (Burnstock et al., 2016; Burnstock, 2017). En el caso de los receptores P2X, se propone que su funcionamiento es primordial durante el proceso contráctil de las CMLV, ya que la apertura de estos canales puede inducir la despolarización de la membrana (Erlinge & Burnstock, 2008).

3.1.4.1.2. Acople excitación-contracción electromecánico

En el acople electromecánico, la contracción de CMLV es activada por un incremento en la presión intraluminal del vaso, lo que causa la despolarización y apertura de canales de Ca^{2+} voltaje-dependiente (Ca_v), incrementando la entrada de Ca^{2+} para la contracción sostenida en pequeñas arterias (Ghosh et al., 2017). La contracción vascular activada por la presión intraluminal se conoce como “tono miogénico”, y es necesario para mantener un flujo sanguíneo relativamente constante incluso cuando hay variaciones en la presión arterial (Ghosh et al., 2017; Martinsen et al., 2014).

3.1.4.1.2.1. Canales de Ca^{2+} voltaje-dependiente (Ca_v)

En las CMLV, el acople electromecánico ocurre por un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$; dado por la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular hacia el citoplasma a través de dos diferentes tipos de canales iónicos sensibles a voltaje presentes en la membrana celular. Los Ca_v (ver **Figura 2**) encontrados en CMLV de tipo L y T incrementan su probabilidad de apertura cuando ocurre una despolarización de la membrana, dando como resultado un influjo de Ca^{2+} hacia el interior de la célula (Tykocki et al., 2017).

3.1.5. El Ca^{2+} intracelular como regulador de la actividad contráctil del músculo liso.

El incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que se origina por los dos mecanismos antes mencionados (acople electromecánico y fármaco-mecánico) desencadena la contracción de las CMLV por medio de la asociación de Ca^{2+} con la proteína

citoplasmática, calmodulina (CaM) (Marchand et al., 2012). En la **Figura 3** se esquematiza la manera en la que el Ca^{2+} inicia la contracción en CMLV.

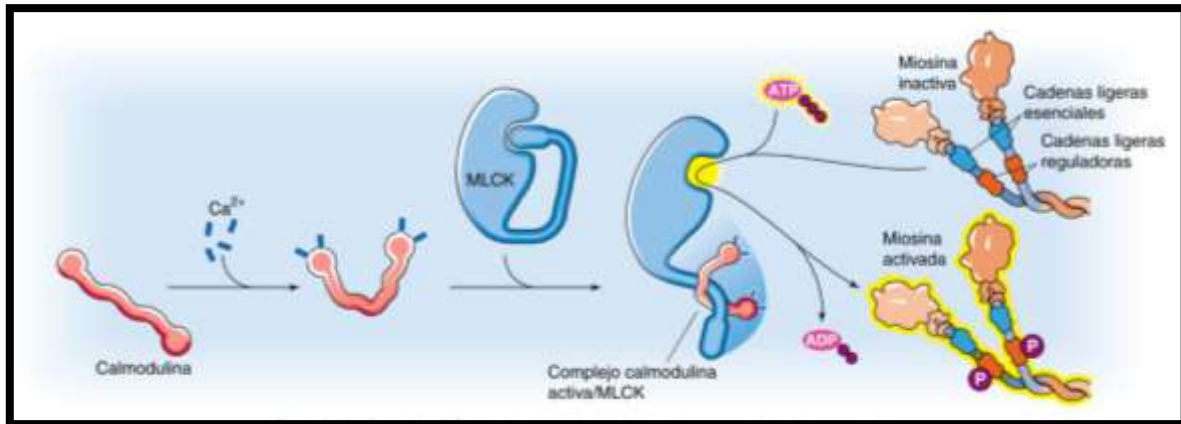


Figura 3. Papel del Ca^{2+} en la contracción del músculo liso. 4 iones de Ca^{2+} se unen a la CaM formando el complejo Ca^{2+} -CaM el cual induce un cambio conformacional en la MLCK para activarla. La MLCK fosforila la cadena reguladora de la miosina para activar a la miosina dimérica y generar la contracción del músculo liso. Imagen tomada de (Boron & Boulpaep, 2012).

El complejo Ca-CaM promueve la activación de la cinasa de cadena ligera de la miosina (MLCK), una enzima serina/treonina específica que fosforila a la cadena ligera reguladora que se encuentra asociada con cada cuello de la cadena pesada de la miosina dimérica tipo II (Hong et al., 2011). La fosforilación de esta proteína genera un cambio conformacional de la cabeza de la miosina, que permite la interacción de la miosina con la actina, generando la contracción del músculo liso vascular (Martinsen et al., 2014; Rhoades, 2013) (ver **Figura 3**).

3.1.5.1. Mecanismos que reducen la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en CMLV

La terminación de la contracción en las CMLV requiere de la activación de la enzima fosfatasa de cadena ligera de la miosina (MLCP) y reducción de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Kuo & Ehrlich, 2015). La remoción del Ca^{2+} citoplasmático ocurre por dos mecanismos: el Ca^{2+} puede ser recapturado en el RE por medio de la ATP-asa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (SERCA) o ser expulsado de las células a través de la membrana plasmática por el funcionamiento de la ATP-asa de membrana plasmática (PMCA) o por la acción del intercambiador Na^+ - Ca^{2+} (NCX) (Ghosh et al., 2017) (ver **Figura 2**).

3.1.5.1.1. Intercambiador Na⁺-Ca²⁺ (NCX)

Uno de los mecanismos celulares por los que el Ca²⁺ puede ser expulsado hacia el medio extracelular es el NCX. Esta proteína de membrana tiene dos modos de funcionamiento: directo y reverso. En el modo directo este internaliza Na⁺ y expulsa Ca²⁺ en proporción 3:1 iones respectivamente, mientras que en el modo reverso expulsa Na⁺ e internaliza el Ca²⁺ (Jernigan & Resta, 2013). El funcionamiento de este transportador se inhibe por la presencia de bloqueadores, como el SEA0400 o por la ausencia de Na⁺ en el medio extracelular (Zulian et al., 2010). Se sabe que las isoformas NCX1 y NCX3 se encuentran en CMLV (S.A. Fisher, 2017).

3.1.5.1.2. ATP-asa de Ca²⁺ de la membrana plasmática (PMCA)

Por medio de la PMCA, las CMLV pueden regular la [Ca²⁺]_i, ya que esta bomba ATP-asa expulsa Ca²⁺ hacia el medio extracelular (Fernández-velasco et al., 2014). Las isoformas comunes que se encuentran en los vasos sanguíneos son PMCA1 y PMCA4 y se ha demostrado que estas juegan un papel funcional importante en la regulación del tono vascular y el control de la presión arterial durante la hipertensión arterial (Cartwright et al., 2011). Su inhibición puede darse por la aplicación de pequeños péptidos llamados caloxinas, eosina o vanadato de Na⁺ (Pande et al., 2011).

3.1.5.1.3. ATP-asa de Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico (SERCA)

La recaptura de Ca²⁺ en el RE lo lleva a cabo la SERCA, proteína ubicada en la membrana del RE que ingresa dos iones de Ca²⁺ al interior del RE hidrolizando una molécula de ATP (Wynne et al., 2009). Las isoformas más expresadas en CMLV son la SERCA2a, 2b y 3b y su funcionamiento puede inhibirse con la aplicación de ácido ciclopiazónico o tapsigargina (Davies, 2015; Searls et al., 2010).

3.2. Antecedentes específicos

Estudios realizados en 2008 reportaron alteraciones en la homeostasis del Ca²⁺ intracelular de CMLV aisladas de aorta de rata con diabetes inducida por streptozotocina (modelo DM1). Los transientes de Ca²⁺ evocados por la activación de la vía del IP₃ y de los canales RyR del retículo endoplásmico fueron menores

en condiciones patológicas que en la condición control. La expresión de los receptores-canal IP_3R y RyR también se encontró disminuida en las ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina (Ma et al., 2008). Estos datos sugieren que la DM1 es causante de la hiporreactividad de las CMLV cuando son expuestas a agonistas que inducen la liberación de Ca^{2+} vía IP_3 y RyR (Ma et al., 2008). Posteriormente, Bittel y colaboradores caracterizaron la señal de Ca^{2+} intracelular y nuclear en CMLV de aorta de ratas DR-BB (modelo con DM1) y ratas tratadas con estreptozotocina (Searls et al., 2010). Este grupo de investigación encontró que los transientes de Ca^{2+} inducidos por la aplicación de taspigargina y vasopresina son de menor amplitud y mayor duración en condiciones patológicas. Estas alteraciones podrían estar causadas por diferencias en la expresión de proteínas como la SERCA, receptores a IP_3 y sobre expresión de RyR (Searls et al., 2010).

Posteriormente en 2009 se encontró que CMLV de la rata Goto Kakizaki, un modelo animal con DM2, presentaba una mayor entrada de Ca^{2+} al aplicar Angiotensina II como agonista en durante el fenotipo proliferativo de las CMLV. En esta investigación se propone que algunos TRPC's, específicamente el TRPC6, podrían estar implicados en las alteraciones que se observan en las CMLV durante la DM2 (Evans et al., 2009).

Tykocki y colaboradores estudiaron la actividad en forma de chispas de Ca^{2+} , liberaciones de Ca^{2+} iniciadas por Ca_v que activan RyR para hiperpolarizar la membrana y reducir la excitabilidad de CMLV mediante la apertura de canales de potasio sensibles a Ca^{2+} , los BK_{Ca} (Tykocki et al., 2017). Ellos encontraron que en el CMLV de arterias cerebrales de un modelo de DM2 (ratón dB/dB) existe una mayor actividad de los Canales de Ca^{2+} tipo L, lo que incrementa la corriente generada por el canal, dando lugar a una mayor cantidad de chispas de Ca^{2+} (Navedo et al., 2010a). Esta actividad particular en forma de chispas de Ca^{2+} durante la DM2 fue suprimida con la inhibición de la vía de la PKA, sugiriendo que esta proteína es importante dentro de la generación de chispas de Ca^{2+} en CMLV de arterias cerebrales. La actividad en forma de chispas de Ca^{2+} está asociada a

factores de transcripción (NFATc3) y a la expresión del canal Kv2.1 durante la patología de la DM2 (Navedo et al., 2010a). Otro grupo de investigación evaluó la misma actividad en forma de chispas de Ca^{2+} en CMLV de arteria cerebral encontrando que la amplitud y duración fue significativamente menor en condiciones de DM2. Lo anterior podría correlacionarse a la disminución en la expresión de la subunidad $\beta 1$ del canal BK_{Ca} que ellos mismos reportan (Rueda Angelica et al., 2013).

A la fecha existe poca información acerca de las alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en el CMLV durante la DM2, específicamente en la cepa de ratas ZDF. Sin embargo se ha comprobado que en CMLV del modelo ZDF induce alteraciones en canales de K^{+} sensibles a voltaje y Ca^{2+} de diferentes conductancias (SK_{Ca} , IK_{Ca} y BK_{Ca}) (Burnham, Johnson, & Weston, 2006; T. Lu et al., 2008).

4. Planteamiento del problema

Las estadísticas más recientes mencionan que el 90-95% de las personas diabéticas tienen DM2 (American Diabetes Association (ADA), 2017). Esta enfermedad genera un gran impacto económico ya que proyecciones estadísticas mencionan que en el 2040 el gasto sanitario causado por la DM en México rondará cerca de los 19,000 millones de dólares (International Diabetes Federation, 2013). Existen diversas investigaciones epidemiológicas que demuestran la asociación entre DM2 y el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (Tao et al., 2015). Sin embargo, aún se desconoce con exactitud cómo la DM2 afecta a los vasos sanguíneos, además de que la mayoría de los estudios en la homeostasis del Ca^{2+} en CMLV han sido realizados en células en cultivo (fenotipo muscular proliferativo), condiciones fisiológicas celulares donde el manejo del Ca^{2+} es diferente al presentado por el fenotipo contráctil (músculo aislado “en fresco”) (Berra-Romani, Mazzocco-spezia, Pulina, & Golovina, 2008). Al día de hoy existen pocos estudios involucrados en el estudio del Ca^{2+} en CMLV aisladas en fresco (fenotipo contráctil) durante la fisiopatología de la DM2, condiciones experimentales donde el estudio de la señal de Ca^{2+} se asocia más al

proceso de contracción-relajación. Es importante destacar que la importancia de proyecto radica en que no se ha estudiado la señal de Ca^{2+} durante la DM2 en CMLV aisladas de aorta de rata ZDF, por ello la elaboración de esta tesis permitirá dilucidar sobre los mecanismos por los que esta enfermedad ejerce alteraciones sobre la señalización del Ca^{2+} en el tejido ya mencionado. Considerando la bibliografía que antecede a nuestro trabajo de investigación, nos planteamos la siguiente pregunta:

4.1.Pregunta de investigación

¿Cuáles son los efectos que produce la DM2 sobre los mecanismos de regulación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en CMLV aisladas de aorta de rata Zucker Diabetic Fatty?

5. Hipótesis

La DM2 causa alteraciones en la homeostasis de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en CMLV aisladas de aorta de rata *Zucker Diabetic Fatty*.

6. Objetivos

6.1.Objetivo general

Estudiar las alteraciones causadas por la DM2 sobre los mecanismos que regulan la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en CMLV aislado de aorta de rata *Zucker Diabetic Fatty*.

6.2.Objetivos específicos

1. Evaluar las alteraciones causadas por la DM2 sobre la señal de Ca^{2+} intracelular generada por ATP en CMLV aislado de aorta de rata ZDF.
2. Evaluar las alteraciones causadas por la DM2 sobre la señal de Ca^{2+} intracelular generada por cafeína en CMLV aislado de aorta de rata ZDF.
3. Evaluar las alteraciones causadas por la DM2 sobre la señal de Ca^{2+} intracelular generada por la aplicación de KCl en CMLV aisladas de aorta de rata ZDF.
4. Evaluar las alteraciones causadas por la DM2 sobre el contenido de Ca^{2+} en el retículo endoplásmico en CMLV aislado de aorta de rata ZDF.

5. Evaluar las alteraciones causadas por la DM2 sobre la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} operados por los almacenes intracelulares de Ca^{2+} (SOC) en CMLV aislado de aorta de rata ZDF.
6. Evaluar las alteraciones causadas por la DM2 sobre la actividad de la SERCA en CMLV aislado de aorta de rata ZDF.
7. Evaluar las alteraciones causadas por la DM2 sobre la actividad del NCX en CMLV aisladas de aorta de rata ZDF.
8. Evaluar las alteraciones causadas por la DM2 sobre la actividad de la PMCA en CMLV aisladas de aorta de rata ZDF.

7. Material y métodos

7.1. Técnicas y procedimientos

Las ratas de la cepa ZDF fueron proporcionadas por el bioterio “Claude Bernard” de esta Universidad, donde se mantuvieron con acceso libre a agua y comida (*ad libitum*) en ciclos de luz y oscuridad de 12 horas. Se seleccionaron ratas macho de la cepa ZDF de 3 a 4 meses de edad con la siguiente masa corporal: LZDF con un peso entre los 250-300 gramos y OZDF entre los 400-500 gramos. Ambos criterios establecidos por la elaboración de una curva de crecimiento en función a la edad de la rata estandarizada en este laboratorio (no mostrado). En adición, con el uso de una cinta métrica, se midió la longitud de la rata y la circunferencia abdominal. Con una balanza analítica se determinó el peso de la grasa epididimal. Finalmente, se calculó el índice de masa corporal (IMC), el cual se obtuvo de la división del peso entre el cuadrado de la longitud de la rata en ambos grupos.

7.1.1. Curva de tolerancia a la glucosa

Con el objetivo de contextualizar nuestras investigaciones en el marco de la DM2 optamos por la realización de una curva de tolerancia a la glucosa, la cual contuvo una N experimental de 14 ratas para cada grupo. Después de un ayuno de 4 horas, la muestra de sangre se obtuvo por punción capilar de la punta de la cola de la rata en los tiempos 0, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos después de la

administración de Dextrosa (dosis: 2 gr/kg). La gota de sangre fue colocada en las tiras reactivas del Accu-Check® para la determinación de glucosa sanguínea por medio de fotometría.

7.1.2. Obtención y aislamiento de las células de músculo liso vascular

La técnica para la obtención de las CMLV ha sido reportada previamente por (Berra-Romani et al., 2008; Golovina et al., 2003; Zulian et al., 2013) y el procedimiento se detalla a continuación.

Las ratas fueron anestesiadas con Ketamina-Xilacina (dosis: 0.2 ml/100 gr) vía intraperitoneal (NOM-062-ZOO-1999, 8.1., 9.1., 9.4.2.1.3.). Posteriormente se les practicó una toracotomía bilateral para poner al descubierto la aorta torácica. La aorta fue canulada y perfundida con solución fisiológica fría PSS1 (Physiological Salt Solution) con la siguiente composición (en mM): 140 NaCl, 5.36 KCl, 0.34 Na₂HPO₂, 0.44 K₂HPO₄, 10 HEPES, 1.2 MgCl₂, 0.05 CaCl₂, y 10 D-glucosa (pH 7.2 con NaOH). Inmediatamente se removió el tejido conectivo circundante y la aorta se transfirió a un tubo de ensayo conteniendo solución PSS1 y colagenasa tipo II (1 mg/ml) durante 40 minutos a 37°C. Esta primera digestión enzimática se realizó con el propósito de facilitar la remoción mecánica de la túnica adventicia sujetándola de un extremo al mismo tiempo que se sostiene la túnica media y separándolas como si fuera una media o calcetín.

Una vez removida la adventicia, se hizo un corte longitudinal de la aorta, exponiendo la superficie interna. Utilizando tijeras de micro disección se frotó la túnica íntima mecánicamente con la finalidad de remover el endotelio. Posteriormente, utilizando tijeras de microdisección, la aorta se cortó en pequeños segmentos (<1 mm de ancho), mismos que se incubaron por 10 minutos en PSS1 a 37°C. Los segmentos de aorta se transfirieron a un tubo de ensayo conteniendo PSS1, 2 mg/ml de colagenasa tipo XI, 2 mg/ml de albumina de suero bovino y 0.16 mg/ml de Elastasa tipo IV. El tiempo de la digestión duró 35-40 minutos a 37° C. Posteriormente el tejido obtenido se disoció pipeteando suavemente el tejido con una pipeta Pasteur cuya punta fue previamente pulida con fuego y evitando la formación de burbujas. El tejido disociado se lavó 3 veces con solución PSS1 fría

(4°C) centrifugando a 42 G durante un minuto (en un rotor de 15 cm) entre cada uno de los lavados. Las células obtenidas fueron resuspendidas en un volumen final de 1 ml en PSS1 y almacenadas a 4°C hasta su utilización. Se colocaron 2 gotas de solución con CMLV en un cubreobjetos y se dejaron reposar por 35 minutos a 4°C con la finalidad de que las células se adhirieran al cubreobjetos.

7.1.3. Medición de la $[Ca^{2+}]$ libre intracelular

Los cubreobjetos con las células adheridas se incubaron en PSS1 conteniendo Fura-2/AM (3 μ M) durante 40 minutos a temperatura ambiente (22°C). Posteriormente los cubreobjetos se transfirieron a una caja de Petri conteniendo PSS1 durante 15 minutos para permitir la desesterificación del Fura-2/AM. El Fura-2/AM es uno de los marcadores más utilizados en el estudio de la señal de Ca^{2+} en distintos tipos de células, incluyendo las involucradas en procesos fisiopatológicos como la DM (Monaghan et al., 2015; Sheikh et al., 2012).

Por último, los cubreobjetos, con las células incubadas con Fura-2, se fijaron al fondo de una caja de Petri con un punto de silicón y rápidamente se les adicionó PSS2. La caja de Petri se colocó en la platina de un microscopio de epifluorescencia (Axiolab Carl Zeiss, Germany) equipado con una lámpara de mercurio como fuente de luz (50-W) (ver **Figura 4**). Un objetivo de inmersión en agua (Achromplan Zeiss X63, 0.9 apertura numérica, distancia libre de trabajo de 2.0 mm) fue utilizado para visualizar las células. Las células cargadas con el marcador de fluorescencia fueron excitadas alternadamente a 340 y 380 nm mientras que la emisión se detectó a 510 nm. Los filtros de excitación estuvieron montados en una rueda girafiltros. Un obturador (Lambda 10, Sutter Instrument, Novato, CA, USA) permitió el paso de luz mientras se adquirían las imágenes. Para la captura de las fotos se utilizó una cámara de alta sensibilidad (Extended-ISIS, Photonic Science, Millham, UK). La relación de intensidad de luz emitida a 510 nm por la excitación del Fura-2/AM a 340 nm y 380 nm permitió la generación del ratio (340/380 nm), parámetro que es proporcional a los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ (Simard et al., 2015). Las imágenes obtenidas por la cámara se almacenaron en una computadora para su posterior análisis. Un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ causaría un

incremento en la intensidad de fluorescencia y por lo tanto un incremento en el ratio. El ratio es independiente de la concentración de marcador, intensidad de luz y distancia óptica (Lambert & Simpson, 1999). El cambio en la señal de Ca^{2+} se estudió a partir de las regiones de interés (“regions of interest”, ROI), regiones elípticas delimitadas manualmente con la ayuda de un software de computadora. Cada ROI seleccionado delimitó el área celular. Este análisis de imagen se realizó con el software ImageJ, mientras que la señal de Ca^{2+} se midió con el programa Clampfit 9.2. Además, se realizó una normalización de la señal de Ca^{2+} (F/F_0) dividiendo la intensidad de la ratio 340/380 nm (F) sobre la media de la fluorescencia basal (F_0). La normalización se hizo con la finalidad de igualar el valor basal de los transientes de Ca^{2+} y facilitar así la comparación visual entre estos. El equipo utilizado para el registro de la señal de Ca^{2+} se esquematiza en la **Figura 4** que se presenta a continuación.

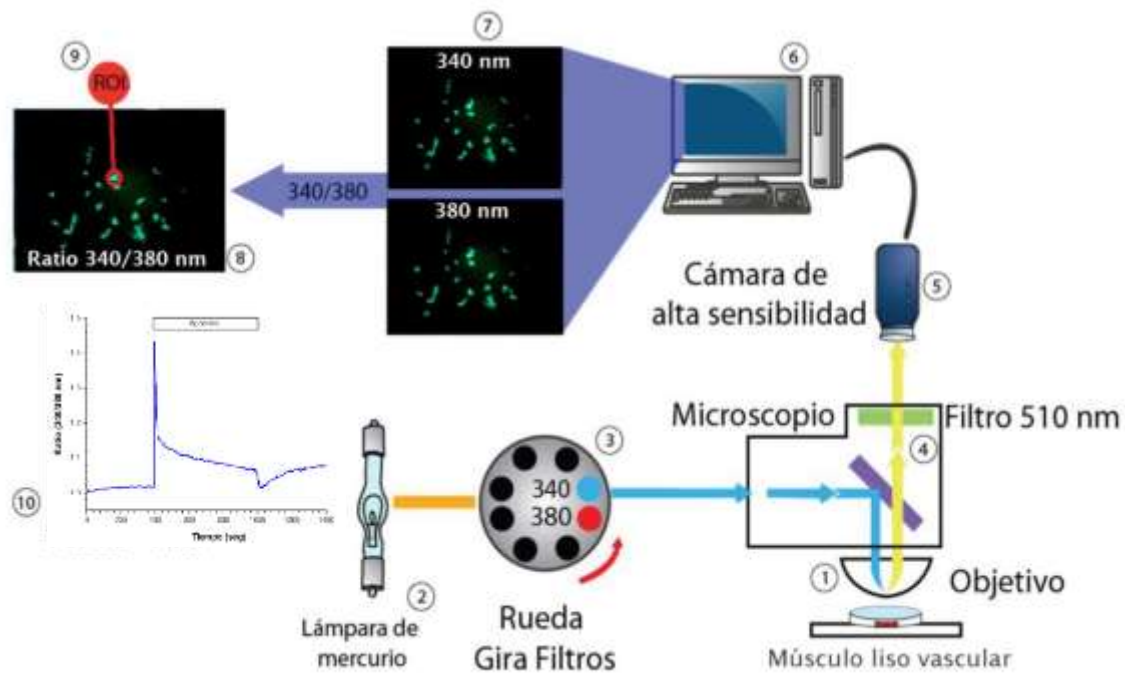


Figura 4. Sistema de captura de la señal de Ca^{2+} intracelular. Las CMLV adheridas en la caja Petri con PSS son colocadas bajo el objetivo de inmersión para fluorescencia (1). Una fuente de luz (lámpara de mercurio) emite un haz de luz (2) que pasa por los filtros de 340 y 380 nm alternativamente, estos montados en una rueda gira filtros (shutter) controlada por la computadora (3). La luz filtrada es redirigida por un espejo dicróico hacia la muestra (4). La luz emitida por las

CMLV atraviesa el espejo dicróico (4) hasta llegar al filtro de emisión de 510 nm y ser captada por una cámara de alta sensibilidad (5). La cámara toma una imagen para cada filtro de excitación (340 y 380 nm) (7). Las imágenes capturadas se almacenan en una computadora para su posterior análisis (6). Con un programa de computadora se realiza una relación de las imágenes tomadas (340/380) conocido como Ratio (8). Las células son delimitadas por regiones de interés (ROI) a lo largo del experimento (9). Finalmente, los datos son graficados y medidos (10).

Todas las CMLV disponibles en el campo visual del microscopio fueron contempladas para su estudio y medición de la señal de Ca^{2+} intracelular. No fueron consideradas en el análisis aquellas células que presentaron cambios en la fluorescencia durante condiciones basales. Los protocolos de medición de Ca^{2+} fueron realizados en presencia de solución PSS2 con la siguiente composición de solutos (en mM): 140 NaCl, 5 KCl, 1.2 NaH_2PO_4 , 5 NaHCO_3 , 10 HEPES, 1.4 MgCl_2 , 1.8 CaCl_2 y 11.5 D-glucosa, (pH 7.4 con NaOH). En el uso de PSS adicionada con KCl 75 mM se realizó una solución equimolar quitando 70 mM de NaCl. La adquisición de la ratio fue cada 0.7 segundos (1.4 Hz) o cada 3 segundos (0.33Hz) según el ensayo de fluorescencia y a temperatura ambiente (20°C-25°C).

7.1.4. Protocolos experimentales para el estudio de la señal de Ca^{2+} intracelular en CMLV

Todos los experimentos para la medición de Ca^{2+} se iniciaron con 400 segundos de registro en ausencia de cualquier estímulo, al registro obtenido en estas condiciones se denominó como basal. Por otro lado, un quelante de Ca^{2+} (EGTA 0.05 mM) fue añadido en PSS durante ensayos en los que se retiró el Ca^{2+} extracelular. El tiempo que pasaron las CMLV en esta PSS sin Ca^{2+} extracelular fue menor a los 200 segundos para evitar el vaciamiento de los almacenes intracelulares (a excepción del protocolo de la SOCE). El tiempo durante el cual se analizó el transiente de Ca^{2+} inducido por la aplicación de un agonista de Ca^{2+} fue de 400 segundos, a excepción del empleo de la solución KCl 75 mM la cual duró 600 segundos.

Para el estudio de la señal de Ca^{2+} se necesitó utilizar distintas sustancias químicas, las cuales se enlistan en la **Tabla II** indicando la acción que estas generan y el modo en el que son aplicados. Durante la realización de los

experimentos se utilizaron los siguientes fármacos con diferentes mecanismos de acción:

Sustancia química (concentración)	Acción	Modo de aplicación	Referencia
ATP (30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M, 100 μ M, 300 μ M)	Agonista de receptores P ₂ X y P ₂ Y	De forma aguda	(Linde et al., 2012; Lohman et al., 2012; Tykocki et al., 2017)
Cafeína 10 mM	Agonista de receptores RyR	De forma aguda	(Ghosh et al., 2017; Vallot et al., 2001)
KCl (75 mM)	Despolarización de las CMLV para la activación de Cav.	De forma aguda	(C. Oltman et al., 2006)
CPA (10 μ M)	Inhibidor de la SERCA	-Incubación por 25 minutos para el vaciamiento de almacenes intracelulares de Ca ²⁺ y evaluar la SOCE -De forma aguda para evaluar la función de la SERCA en la remoción de Ca ²⁺ intracelular	(Gonzalez-Cobos & Trebak, 2010; Spinelli & Trebak, 2015)
SEA0400 (3 μ M)	Inhibidor del NCX	Incubación por 5 minutos (200 segundos en 1.8 mM de Ca ²⁺ y 100 segundos en 0 Ca ²⁺)	(Blaustein et al., 2009; Zhang et al., 2010)
Ortovanadato de Sodio (500 μ M)	Inhibidor de la PMCA	Incubación por 10 minutos (500 segundos en 1.8 mM de Ca ²⁺ y 100 segundos en 0 Ca ²⁺)	(Nakano et al. 2009; Zhang et al., 2010)

Tabla II. Sustancias químicas utilizadas para evaluar los transportadores que regulan la [Ca²⁺]_i.

7.1.5. Prueba estadística y análisis de resultados

El modelo estadístico utilizado para la comparación entre grupos (LZDF y OZDF) fue un diseño anidado mixto (modelo lineal generalizado, GLM) donde el efecto fijo fue la cepa de la rata y el factor aleatorio, el número de

réplicas de cada cepa, es decir la n experimental (N=6 ratas para cada grupo en los ensayos de medición de Ca²⁺ intracelular). El GLM fue realizado con el software de uso libre R. En el estudio de otras comparaciones la prueba no paramétrica U de Mann Whitney se utilizó para variables donde la distribución no fue normal.

7.1.5.1. Definición de las variables y escalas de medición

Las variables y escalas, unidades de escala, así como sus definiciones operacionales y conceptuales se encuentran en la **Tabla III**. Posteriormente, en la **Figura 5** se ejemplifica un transiente de Ca²⁺ con los parámetros de medición de esta señal:

Variables de estudio	Definición conceptual	Definición operacional	Escala de medición	Unidades de escala
Fenotipo de la cepa Zucker Diabetic Fatty	Fenotipo que define la condición patológica de la rata	Niveles altos de glucosa sanguínea y características fenotípicas de obesidad	Categorica	Diabético (OZDF) y no diabético (control, LZDF)
Parámetros morfométricos de las ratas				
Peso	Peso de la rata	Pesaje de la rata utilizando una balanza granataria	Cuantitativa continua	Gramos
Largo	Longitud corporal de la rata	Distancia comprendida desde la base de la cola hasta la punta de la nariz	Cuantitativa continua	Centímetros
Circunferencia abdominal	Longitud de la circunferencia de la parte media del abdomen	Medición de la parte media abdominal	Cuantitativa continua	Centímetros
Grasa epididimal	Tejido adiposo que circunda al epididimo	Extracción y pesaje de la grasa epididimal que rodean a ambos testículos	Cuantitativa continua	Gramos
IMC	Relación del peso y la	División del peso (en	Cuantitativa continua	gr/cm ²

	longitud	gramos) sobre el cuadrado de la longitud (en cm ²)		
Parámetro metabólico				
Glucosa	Concentración de glucosa en sangre	Determinación por fotometría (Accu-Check®)	Cuantitativa continua	mg/dL
Parámetros de medición de la señal de Ca²⁺ intracelular				
Amplitud del transiente de Ca²⁺	Diferencia del valor máximo (pico) de la respuesta y el valor basal	Diferencia (resta) del pico máximo (máximo valor de fluorescencia) en presencia de un agonista y el valor de la fluorescencia basal (sin agonista)	Cuantitativa continua	Ratio de la emisión de fluorescencia (340/380 nm)
Tiempo de decaída del transiente de Ca²⁺	Tiempo que tarda en decaer la señal en determinado punto de su amplitud	Tiempo que tarda, la amplitud del pico de la señal de Ca ²⁺ en reducirse a un 90%, 60% y 30% de su amplitud	Cuantitativa continua	Segundos
Área bajo la Curva del transiente de Ca²⁺	Área delimitada por el transiente de Ca ²⁺	Es el área delimitada por el registro de la señal de Ca ²⁺ desde que se aplica el estímulo hasta que se remueve el agonista	Cuantitativa continua	Ratio*Segundo (Unidades arbitrarias)

Tabla III. Variables y escalas de medición.

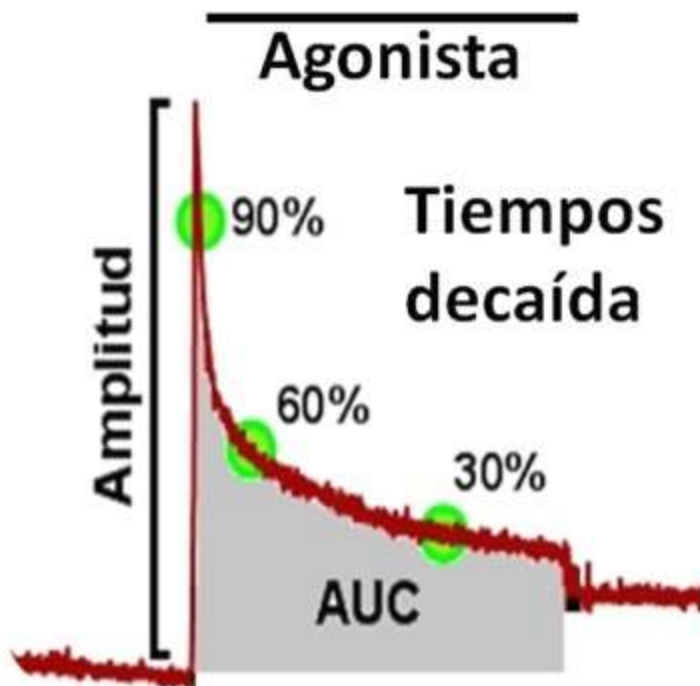


Figura 5. Parámetros de medición de la señal de Ca^{2+} intracelular en CMLV. Amplitud, área bajo la curva (AUC), Tiempos de decaída al 90%, 60% y 30% (en color verde) de amplitud de la señal de Ca^{2+} (trazo en rojo) durante la presencia de un agonista.

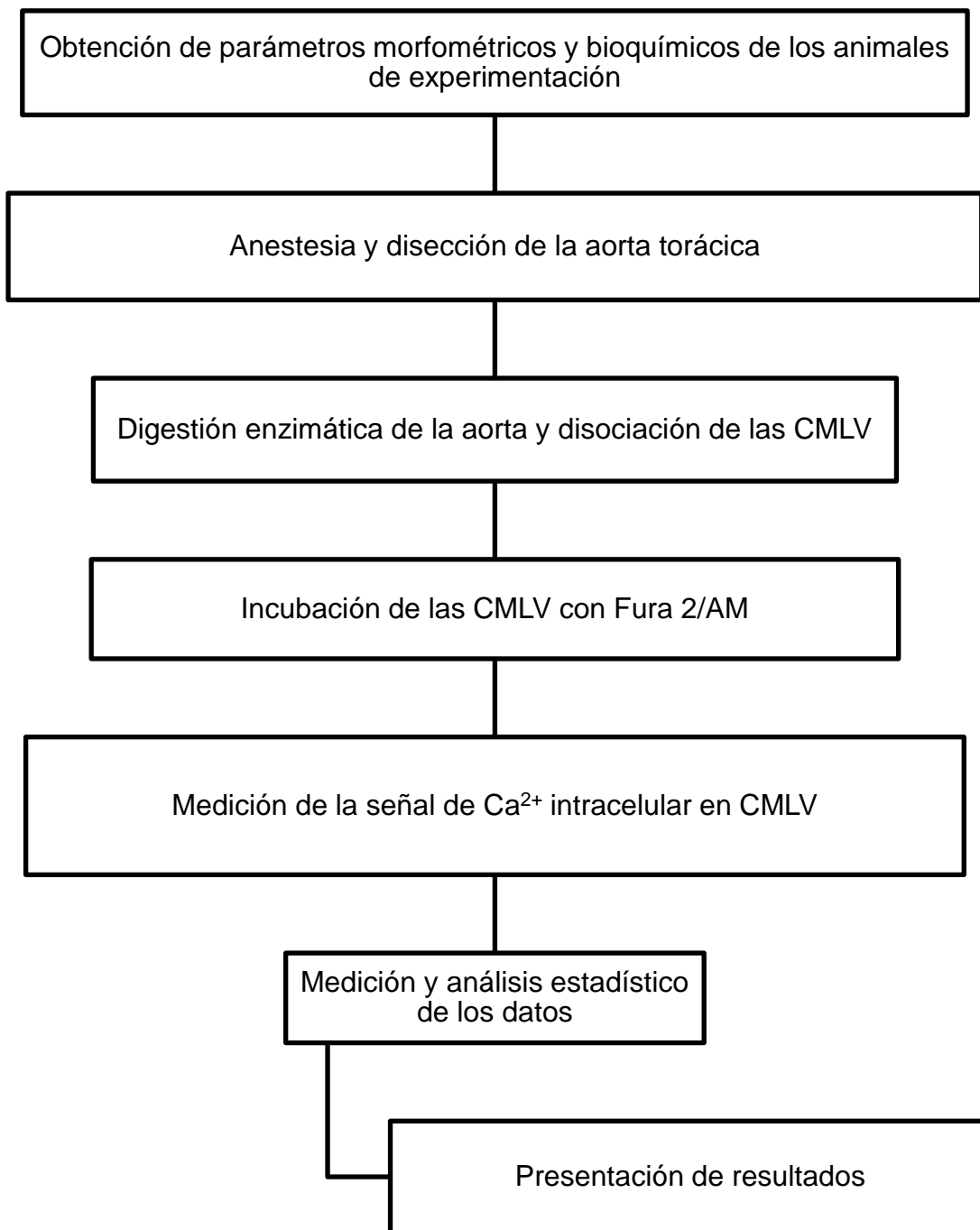
7.2. Bioética

El manejo de las ratas durante el procedimiento experimental se llevó a cabo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Las ratas estuvieron confinadas en el vivario de la Facultad de Medicina, donde se les dio un mantenimiento y desecho de los cadáveres adecuado. Las ratas se colocaron en cajas con agua y alimento ad libitum en ciclos de luz y oscuridad de 12 horas. La eutanasia se realizó por un incremento en la inoculación del anestésico a dosis recomendadas para tal efecto (NOM-062-ZOO-1999, 9.1.).

7.3. Logística

Los recursos materiales para el desarrollo de la presente tesis fueron proporcionados por el Laboratorio de Fisiología Cardiovascular de la Facultad de Medicina de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).

7.4.Estrategia de trabajo



8. Resultados

8.1. Parámetros morfométricos y bioquímicos de las ratas ZDF

En la **Figura 6** se muestran una fotografía de una rata OZDF (izquierda) y una rata LZDF (derecha) de la misma edad. En esta imagen las diferencias morfométricas de ambos grupos experimentales de ratas resultan ser evidentes a simple vista.



Figura 6. Fotografía de ratas de la cepa Zucker Diabetic Fatty. Los dos fenotipos de la cepa ZDF, delgado (LZDF) a la derecha y obeso (OZDF) a la izquierda con una edad entre los 3 y 4 meses.

En la **Figura 7** se muestran las gráficas de los parámetros morfométricos obtenidos de ambos grupos de ratas LZDF (en azul, N=29) y OZDF (en rojo, N=22) empleadas en esta tesis.

Como lo demuestra el análisis estadístico, las ratas OZDF presentaron un aumento significativo del: 66% en la masa corporal (LZDF, 297.8 ± 3.87 vs OZDF, 494.3 ± 5.86 gr; **Figura 7A**); 6% de la longitud nariz-cola (LZDF, 22.19 ± 0.25 vs OZDF, 23.64 ± 0.36 cm; **Figura 7B**); 38% en la circunferencia abdominal (LZDF, 13.35 ± 0.15 cm vs OZDF, 17.13 ± 0.27 cm; **Figura 7C**); 505.2% en la grasa epididimal (LZDF, 2.50 ± 0.15 vs OZDF, 12.63 ± 0.72 gr; **Figura 7D**); y 48% en el

IMC (LZDF, 0.5924 ± 0.009 vs OZDF, 0.8766 ± 0.009 , **Figura 7E**) (Test de Mann Whitney * $P < 0.05$).

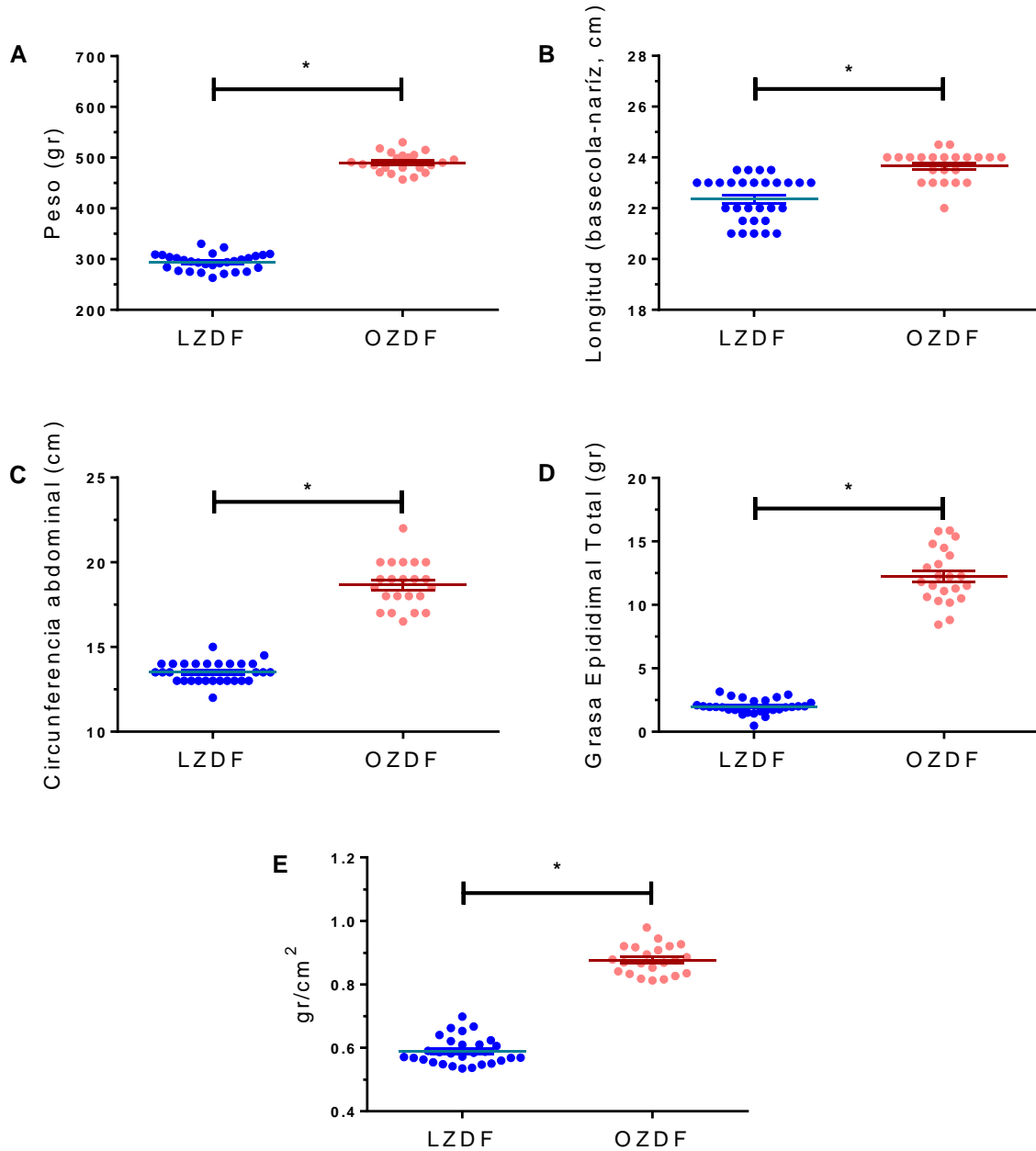


Figura 7. Parámetros morfométricos de las ratas pertenecientes a la cepa ZDF. A) Peso (gr), **B)** largo (cm), **C)** circunferencia abdominal (cm), **D)** grasa epididimal (gr) e **E)** IMC (gr/cm^2) obtenidos de ratas LZDF (círculos en azul) y OZDF (círculos en rojo). Cada símbolo representa el valor obtenido de una rata. Sobrepuesta, se muestra la media \pm el Error Estándar correspondiente a cada grupo experimental. Test de Mann Whitney * $P < 0.05$.

En la **Figura 8** se muestra la media \pm Error Estándar (EE) de los valores de glucosa plasmática obtenidos del grupo de ratas LZDF (círculos azules) y OZDF (círculos rojos) después de un ayuno de 4 horas, ver tiempo cero en la gráfica (LZDF, 88.25 ± 1.77 mg/dl vs OZDF, 90.42 ± 7.32 mg/dl); y a los 15 (LZDF, 266.1 ± 25.40 vs OZDF, 363.4 ± 18.61); 30 (LZDF, 275.6 ± 20.55 vs OZDF, 324.8 ± 21.39); 60 (LZDF, 216.2 ± 21.53 vs OZDF, 305.9 ± 22.01); 90 (LZDF, 158.9 ± 14.1 vs OZDF, 272.0 ± 24.82) y 120 (LZDF, 122.1 ± 6.43 vs OZDF, 232.8 ± 27.31) minutos posteriores a la administración intraperitoneal de 2 gr/Kg de D-glucosa. Como se puede observar en la **Figura 8**, la concentración de glucosa plasmática resultó incrementada de forma significativa en las ratas OZDF a los 15, 60, 90 y 120 minutos posteriores de la aplicación de la glucosa (T-student $*P < 0.05$).

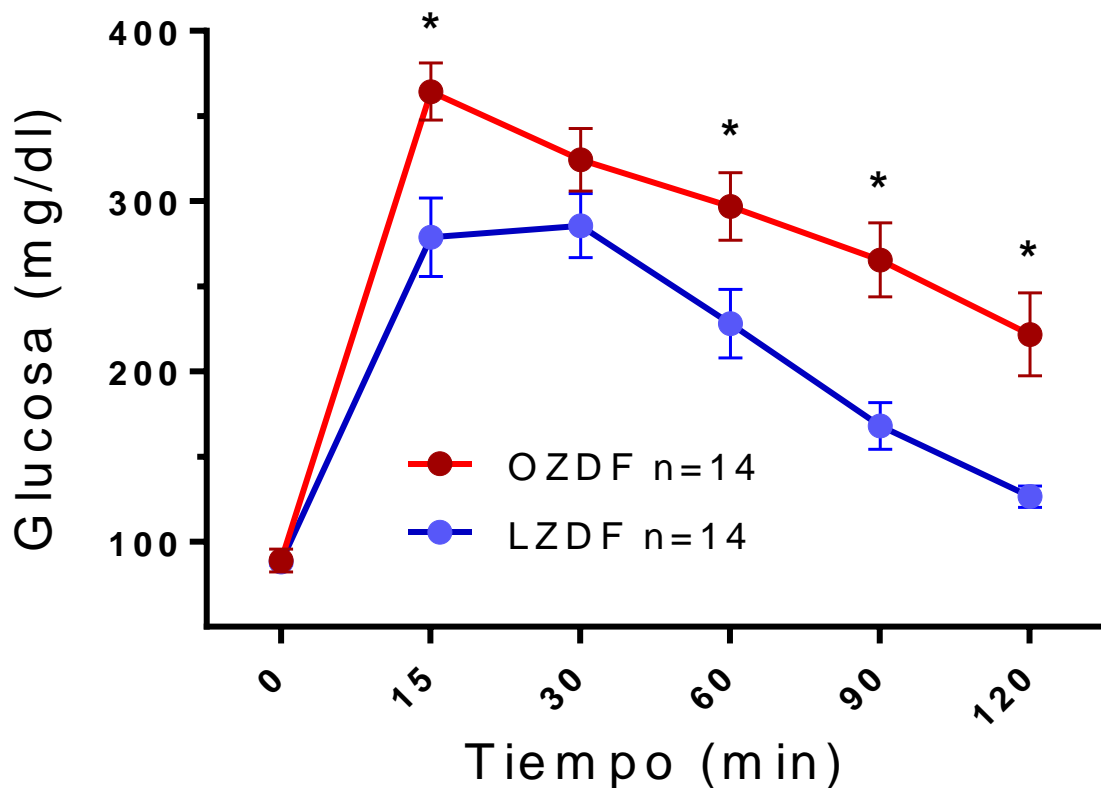


Figura 8. Curva de tolerancia a la glucosa de la cepa ZDF. Media \pm EE de la concentración de glucosa sanguínea (mg/dl) en ratas LZDF (círculos azules) y OZDF (círculos rojos) después de

cuatro horas de ayuno (tiempo 0) y después de 15, 30, 60, 90 y 120 minutos después de la administración intraperitoneal de 2 g/Kg de D-glucosa (N=14, T-student * P<0.05).

8.2.Efecto de la DM2 sobre la señal de Ca²⁺ intracelular generada por ATP en CMLV aislado de aorta de rata ZDF

En la **Figura 9A** se muestran las medias normalizadas (F/F₀) de los registros de la señal de Ca²⁺ intracelular obtenidas de CMLV de aorta de rata LZDF (azul) y OZDF (rojo), en respuesta a la aplicación no acumulativa de concentraciones crecientes del agonista ATP, (**a**: 30 nM, **b**: 100 nM, **c**: 300 nM, **d**: 1 μM, **e**: 3 μM, **f**: 10 μM, **g**: 30 μM, **h**: 100 μM y **i**: 300 μM). En la **Figura 9B** se muestra la curva concentración-respuesta no acumulativa dependiente de la concentración de ATP como agonista de la señal de Ca²⁺ intracelular en CMLV de aorta de rata ZDF; en ella se observa que la curva perteneciente a las CMLV aisladas de la aorta de rata OZDF muestra un desplazamiento hacia la derecha a comparación de la rata control LZDF. En efecto la EC₅₀, parámetro que determina la concentración del fármaco en la que se observa la mitad de la respuesta máxima (en este caso fluorescencia), resultó ser casi 30 veces mayor en la rata diabética OZDF (0.685 μM vs 20.38 μM). La amplitud del transiente fue menor en el grupo OZDF a comparación de su control (**Figura 9B y Ad**: 1 μM, **Ae**: 3 μM, **Af**: 10 μM). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la amplitud de la respuesta de Ca²⁺ al aplicar concentraciones menores (**Figura 9B y Aa**: 30 nM, **Ab**: 100 nM, **Ac**: 300 nM) y mayores de ATP (**Figura 9B y Ag**: 30 μM, **Ah**: 100μM, **Ai**: 300 μM). En la **Figura 9C** se muestra la comparación de la media±EE de: la amplitud, AUC y tiempos de decaída al 90%, 60 % y 30% de la amplitud de los transientes de Ca²⁺ inducidos por la concentración máxima de ATP (300 μM), concentración a la cual no se encontraron diferencias significativas en la señal de Ca²⁺ registrada de CMLV de aorta de ratas LZDF y OZDF.

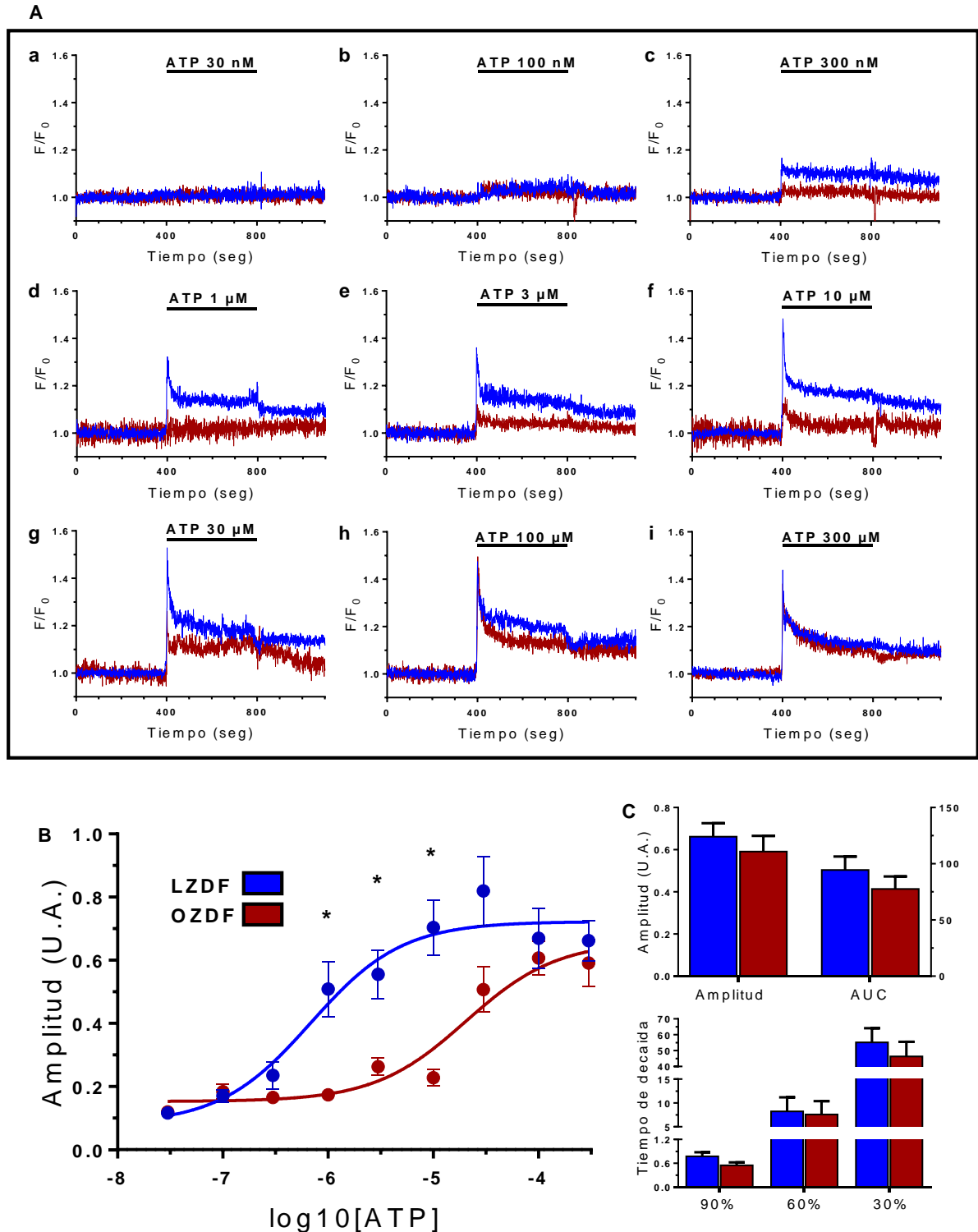


Figura 9. Curva concentración-respuesta no acumulativa de la señal de Ca^{2+} intracelular inducida por ATP en CMLV aisladas de aorta de rata ZDF. A) Media normalizada (F/F_0) de la señal de Ca^{2+} intracelular inducido por la aplicación de diferentes concentraciones de ATP (a. 30

nM, b. 100 nM, c. 300 nM, d. 1 μ M, e. 3 μ M, f. 10 μ M, g. 30 μ M, h. 100 μ M, i. 300 μ M)., así como **B)** curva concentración- respuesta de la media \pm EE de la amplitud en función de la concentración de distintas concentraciones de ATP en CMLV de aorta de ratas LZDF (en azul) y OZDF (en rojo). Coeficiente de determinación (proporción de variación de los datos con respecto al modelo) $R^2=0.9527$ en curva LZDF y $R^2= 0.9426$ en curva OZDF. Concentración efectiva 50, $EC50=0.6851$ μ M en la curva de ratas LZDF y $EC50=20.38$ μ M en la curva de OZDF. **C)** Media \pm EE de la amplitud, AUC y tiempos de decaída al 90%, 60 % y 30% de la amplitud de los transientes de Ca^{2+} inducidos por la concentración máxima de ATP (300 μ M). GLM Análisis de Covarianza (ANCOVA * $P<0.05$).

En la **Figura 10A** se muestra la media normalizada (F/F_0) del transiente de Ca^{2+} evocado por 300 μ M de ATP en presencia (1.8 mM Ca^{2+} , azul oscuro, N= 51) y ausencia de Ca^{2+} extracelular (0 Ca^{2+} , azul claro, N= 48) en CMLV de ratas LZDF. En la **Figura 10B** se muestra la media normalizada (F/F_0) del transiente de Ca^{2+} evocado por 300 μ M de ATP en presencia (1.8 mM Ca^{2+} , rojo oscuro, N= 43) y ausencia de Ca^{2+} extracelular (0 Ca^{2+} , rojo claro, N= 46) en CMLV de ratas OZDF.

La señal de Ca^{2+} inducida por la aplicación de ATP en presencia de 1.8 mM de Ca^{2+} extracelular en ambos grupos de estudio fue de tipo transitorio, es decir, una elevación súbita de la fluorescencia en el momento que se aplica el ATP (pico), seguido por un decaimiento lento de la misma aun en la presencia del agonista (meseta) (**Figura 10A, azul oscuro y B, rojo oscuro**). En estas condiciones no se encontraron diferencias significativas, en ninguno de los parámetros estudiados: amplitud del pico y A.U.C. (**Figura 10C, LZDF y 10D, OZDF**); tiempos de decaída al 30, 60 y 90% (**Figura 10E, LZDF y 10F, OZDF**).

Cuando se aplica la misma concentración de ATP (300 μ M) en ausencia de Ca^{2+} extracelular (0 Ca^{2+}) (**Figura 10A, azul claro, N=48, LZDF**) (**Figura 9B, rojo claro, N=46, OZDF**), todos los parámetros valorados presentaron una reducción significativa con respecto a los obtenidos en presencia de Ca^{2+} intracelular, a excepción del tiempo de decaída al 90% de la amplitud del transiente. La amplitud del transiente se redujo un 43% en las ratas LZDF (1.8 mM Ca^{2+} : 0.6619 ± 0.06 vs 0 Ca^{2+} : 0.3783 ± 0.04) y un 37% en el grupo OZDF (1.8 mM Ca^{2+} : 0.5912 ± 0.07 vs 0

Ca²⁺: 0.3716±0.04) (**Figura 10C, LZDF y D, OZDF**); el AUC disminuyó un 66% en la rata LZDF (1.8 mM Ca²⁺: 94.39±12.07 vs 0 Ca²⁺: 32.30±5.99) y 61.5% en el grupo OZDF (1.8 mM Ca²⁺: 77.53±11.19 vs 0 Ca²⁺: 29.90±6.04) (**Figura 10C, LZDF y D, OZDF**). Así mismo se redujeron de forma significativa los tiempos de decaída al 60% (LZDF: 8.21±2.97 vs 4.75±1.24; OZDF: 7.57±2.80 vs 3.53±0.60) y 30% (LZDF: 55.13±8.98 vs 23.79±5.56; OZDF: 46.37±9.14 vs 20.83±6.04) de la amplitud. En cambio, el tiempo de decaída al 90% de la amplitud no resultó ser estadísticamente diferente en ninguno de los grupos (LZDF: 0.77±0.10 vs 0.67±0.11; OZDF: 0.54±0.07 vs 0.55±0.08) (**Figura 10E y F**) (Test de Mann Whitney *P<0.05).

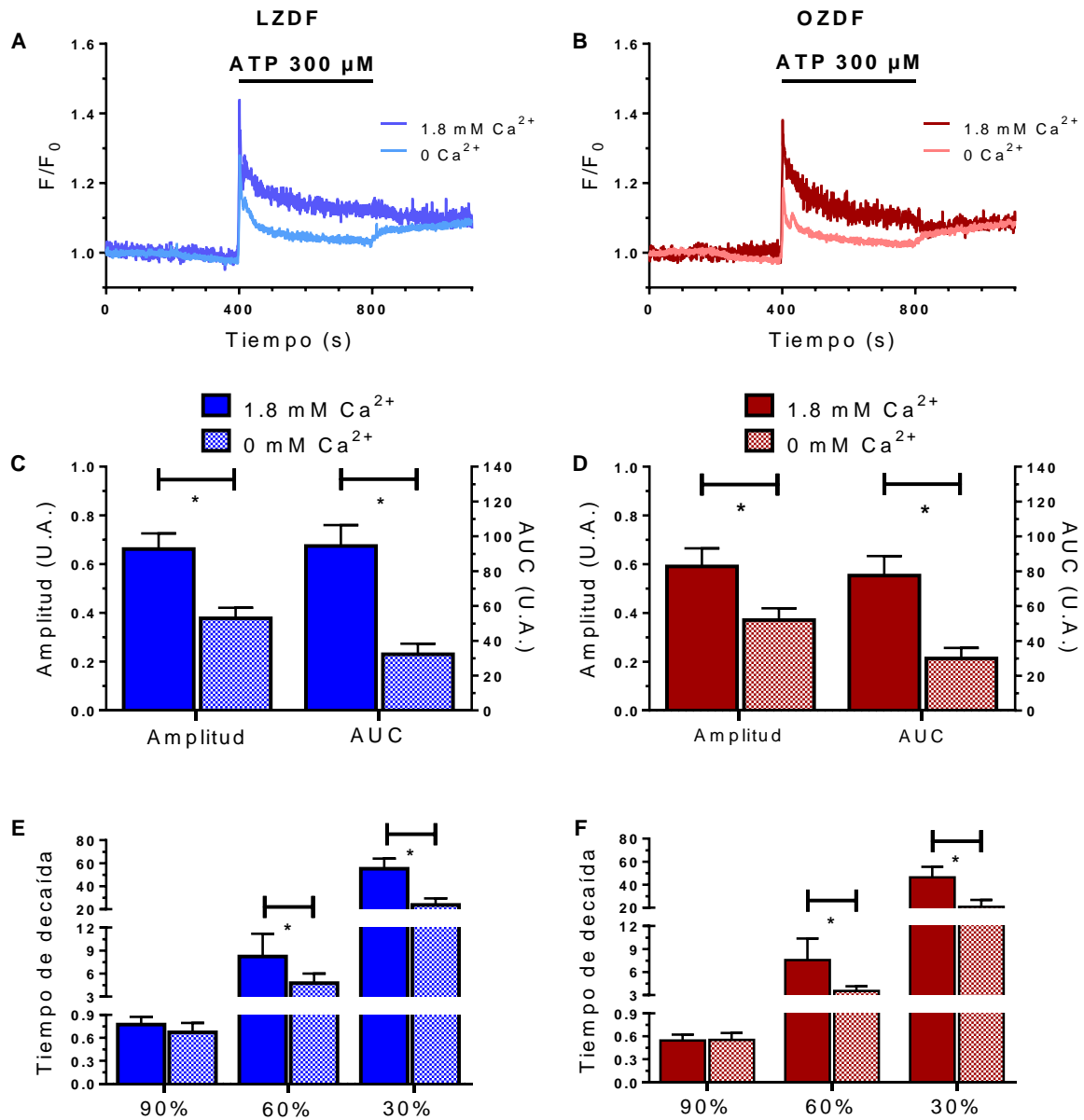


Figura 10. Efecto de la remoción de Ca²⁺ extracelular en la señal de Ca²⁺ evocada por ATP en CMLV de aorta de rata ZDF (LZDF y OZDF). **A)** Media normalizada (F/F₀) de la señal de Ca²⁺ inducida por ATP en presencia (trazo oscuro, 1.8 mM Ca²⁺) y ausencia (trazo claro, 0 mM Ca²⁺) de Ca²⁺ extracelular en ratas LZDF (en azul) y **B)** OZDF (1.8 mM Ca²⁺ en rojo oscuro y 0 mM Ca²⁺ en rojo claro). Media±EE de la **C), D)** Amplitud, AUC y **E)** tiempos de decaída al 90%, 60 % y 30% de la amplitud del transiente de Ca²⁺ de CMLV en ratas LZDF y **F)** OZDF en presencia (1.8 mM Ca²⁺ en colores oscuros) y ausencia (0 mM en colores claros) de Ca²⁺ extracelular. Test de Mann Whitney (* P<0.05).

En la **Figura 11** se muestran sobrepuestas las medias normalizadas (F/F_0) de los transientes de Ca^{2+} inducidos por la aplicación de ATP 300 μ M (**Figura 11A**) en los grupos de ratas LZDF (en azul) y OZDF (en rojo). En la **Figura 11B** se muestra la amplitud (LZDF: 0.37 ± 0.04 , OZDF: 0.37 ± 0.048), el AUC (LZDF: 32.30 ± 5.99 , OZDF: 29.90 ± 6.04) y los tiempos de decaída al 90% (LZDF: 0.67 ± 0.11 , OZDF: 0.55 ± 0.08), 60% (LZDF: 4.75 ± 1.24 , OZDF: 3.53 ± 0.60) y 30% (LZDF: 23.79 ± 5.56 , OZDF: 20.83 ± 6.04) de la señal de Ca^{2+} . Mientras que en la **Figura 11E** se muestra el transiente de fluorescencia (F/F_0) inducido por la aplicación de ATP 10 μ M en CMLV aisladas de aorta de cepa ZDF. En la misma figura se muestra la amplitud (LZDF: 0.065 ± 0.003 , OZDF: 0.067 ± 0.006) (**Figura 11F**), el AUC (LZDF: 1.00 ± 0.95 , OZDF: 2.09 ± 1.84) (**Figura 11H**) y los tiempos de decaída al 90% (LZDF: 0.17 ± 0.04 , OZDF: 0.08 ± 0.009), 60% (LZDF: 0.52 ± 0.08 , OZDF: 0.33 ± 0.03) y 30% (LZDF: 1.68 ± 0.51 , OZDF: 1.23 ± 0.49) (**Figura 11G**). No se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros antes señalados (GLM * $P < 0.05$).

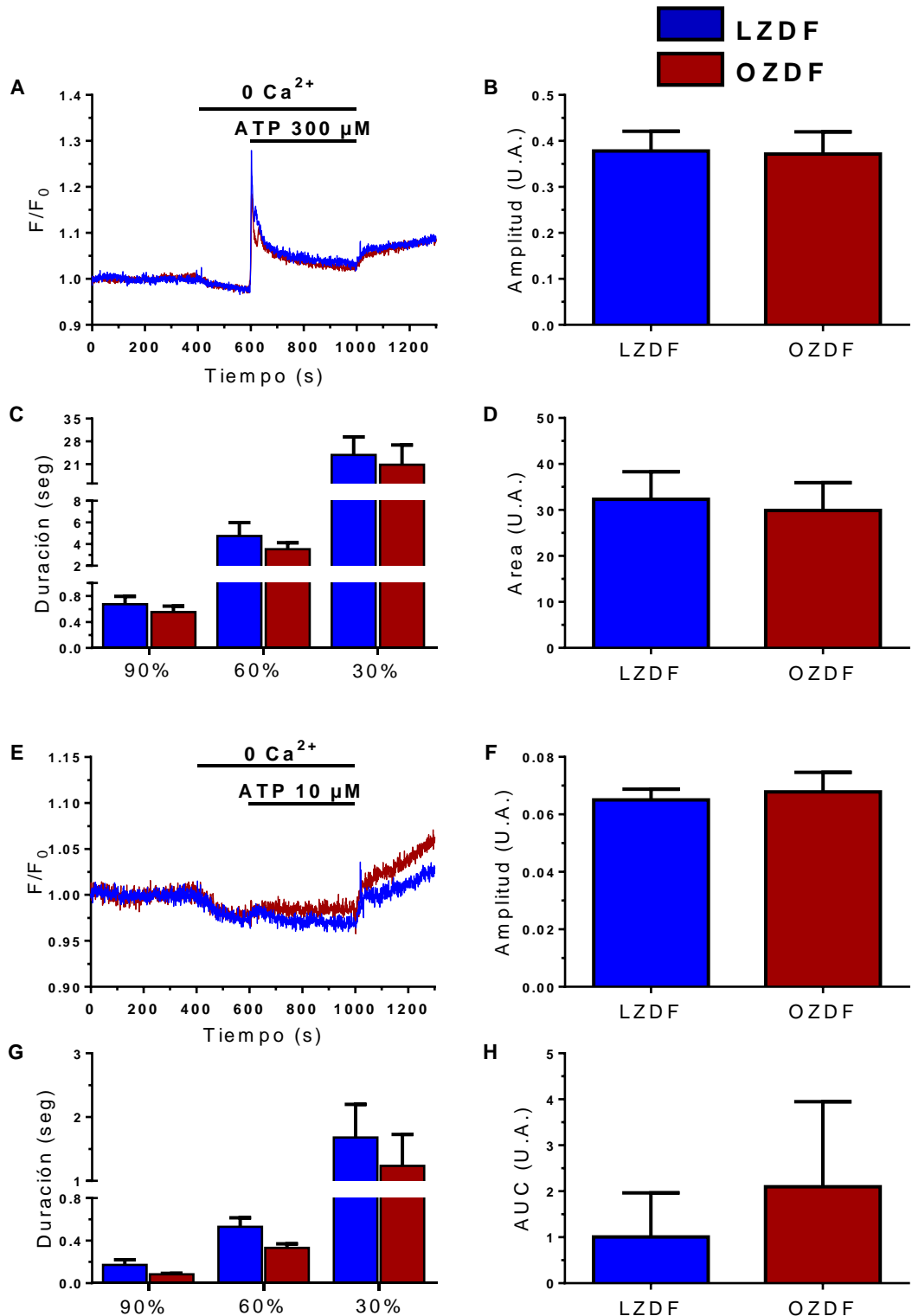


Figura 11. Efecto de la DM2 en la señal de Ca²⁺ intracelular inducida por ATP 10 μM y 300 μM en ausencia de Ca²⁺ extracelular en CMLV de aorta de rata ZDF. A) Media normalizada (F/F₀)

de la señal de Ca^{2+} inducida por ATP 10 μM y **E**) 300 μM en ausencia de Ca^{2+} extracelular (0 mM Ca^{2+}) en ratas LZDF (en azul) y OZDF (en rojo), así como media \pm EE de la **B**), **F**) amplitud, **C**), **G**) tiempos de decaída al 90%, 60% y 30% y **D**), **H**) AUC del transiente de Ca^{2+} de CMLV inducido por ATP 10 inducido por ATP 10 μM y 300 μM . GLM (* $P < 0.05$)

8.3.Efecto de la DM2 sobre la señal de Ca^{2+} generada por cafeína en CMLV aisladas de aorta de rata ZDF

En la **Figura 12** se estudió el efecto de la DM2 en la señal de Ca^{2+} intracelular inducida por cafeína 10 mM en CMLV de aorta de rata ZDF en presencia de Ca^{2+} extracelular. En el panel **A** de la **Figura 12** se muestran las medias normalizadas (F/F_0) de los transitorios de Ca^{2+} evocados por la aplicación de cafeína en ambos grupos de ratas (LZDF, N=46 en color azul y OZDF, N=44 en color rojo). En la **Figura 12B** se observa en CMLV de ratas diabéticas (OZDF) una disminución significativa en comparación con su control (LZDF) equivalente a un: 38% en la amplitud del transiente de Ca^{2+} (LZDF, 0.74 ± 0.05 vs OZDF, 0.45 ± 0.04); de 35% en el AUC (LZDF, 92.15 ± 8.90 , vs OZDF, 59.63 ± 5.78) (**Figura 12D**), así como una disminución del 36% en el tiempo de decaída del transitorio al 90% (LZDF, 0.93 ± 0.11 vs OZDF, 0.60 ± 0.14) y de 48% al 60% de la amplitud (LZDF, 13.90 ± 2.82 vs OZDF, 7.22 ± 1.09) (**Figura 12C**). Mientras que el tiempo de decaída 30% (LZDF, 72.37 ± 10.97 vs OZDF, 66.78 ± 13.61) de la amplitud (GLM * $P < 0.05$), no resultó ser estadísticamente distinto (GLM * $P < 0.05$) (**Figura 12C**).

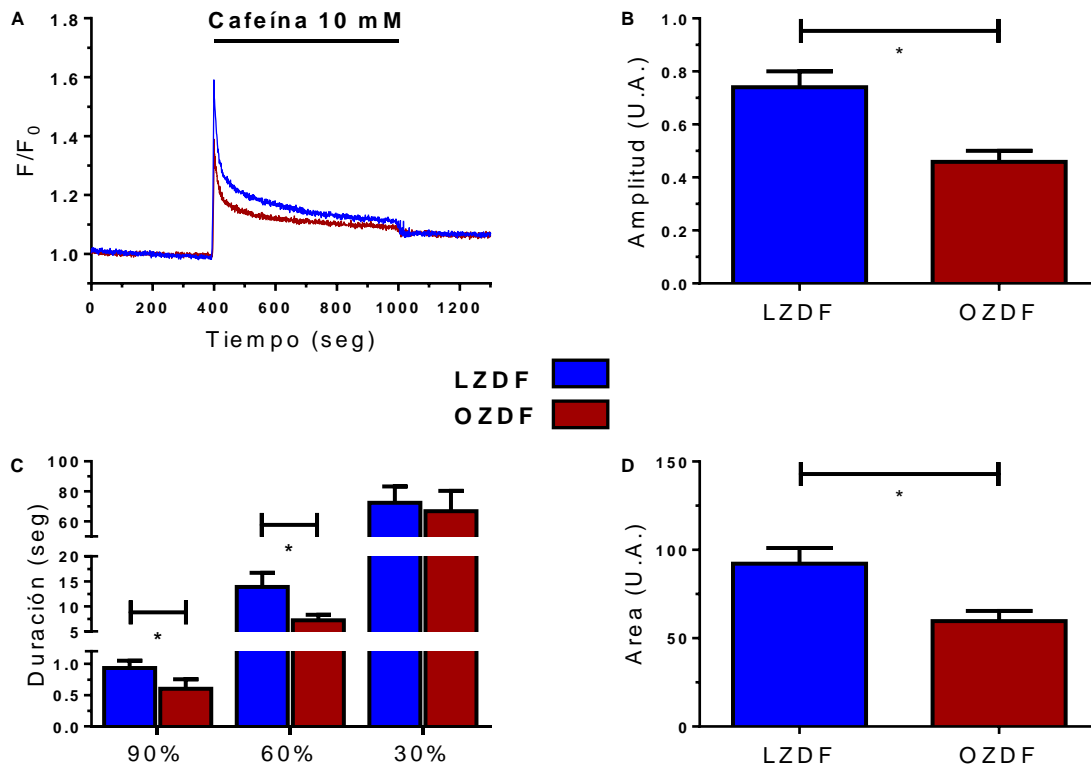


Figura 12. Efecto de la DM2 en la señal de Ca²⁺ intracelular inducida por cafeína 10 mM en presencia de Ca²⁺ extracelular en CMLV de aorta de rata ZDF. A) Media normalizada (F/F₀) de la señal de Ca²⁺ inducida por cafeína 10 mM en presencia de Ca²⁺ extracelular (1.8 mM Ca²⁺) en ratas LZDF (trazo en color azul) y OZDF (trazo en color rojo). Media ±EE de la **B)** amplitud, **C)** tiempos de decaída al 90%, 60% y 30% y **D)** AUC del transiente de Ca²⁺ de CMLV de ratas ZDF. GLM (* P<0.05)

En la **Figura 13** se estudió la señal de Ca²⁺ intracelular inducida por cafeína 10 mM en CMLV de aorta de rata ZDF en la ausencia de Ca²⁺ extracelular (0 Ca²⁺). En el panel **A** de la **Figura 13** se muestran las medias de los transientes normalizados (F/F₀) de Ca²⁺ intracelular de CMLV aisladas de aorta de ratas ZDF en presencia de cafeína 10 mM como agonista de RyR y sin Ca²⁺ en el medio extracelular (LZDF, N=53 en color azul y OZDF, N=40 en color rojo). En la **Figura 13B** se observa que la amplitud (LZDF, 0.43±0.04 vs OZDF, 0.52±0.06), el AUC (LZDF, 33.66±6.03 vs OZDF, 43.13±9.61) (**Figura 13D**) y tiempos de decaída al 90% (LZDF, 0.72±0.12 vs OZDF, 0.64±0.12 vs), 60% (LZDF, 4.55±0.80 vs OZDF,

5.15±0.70) y 30% (LZDF, 24.38±6.10 vs OZDF, 22.06±4.56) de la señal de Ca²⁺ de CMLV aisladas de aorta OZDF no resultaron ser estadísticamente diferente a la de su control (GLM *P<0.05) (**Figura 13C**).

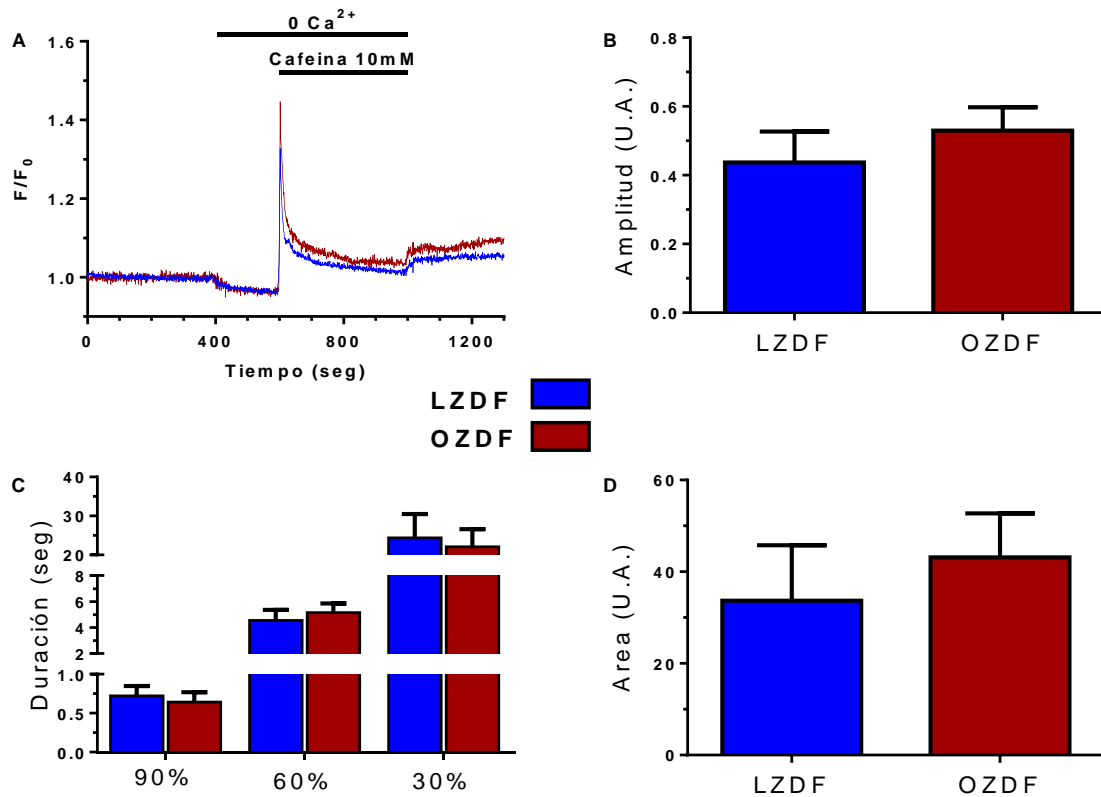


Figura 13. Efecto de la DM2 en la señal de Ca²⁺ intracelular inducida por cafeína 10 mM en ausencia de Ca²⁺ extracelular (0 Ca²⁺) en CMLV de aorta de rata ZDF. A) Media normalizada (F/F₀) de la señal de Ca²⁺ inducida por cafeína 10 mM en ausencia de Ca²⁺ extracelular (0 Ca²⁺) en ratas LZDF (trazo en color azul) y OZDF (trazo en color rojo). Media±EE de la **B)** amplitud, **C)** tiempos de decaída al 90%, 60% y 30% y **D)** AUC del transiente de Ca²⁺ de CMLV en ratas ZDF. GLM (* P<0.05)

8.4. Efecto de la DM2 sobre la señal de Ca²⁺ generada por la aplicación de KCl en CMLV aisladas de aorta de rata ZDF

La respuesta de Ca²⁺ evocada por la aplicación de KCl 75 mM fue estudiada para evaluar la entrada de Ca²⁺ extracelular mediada por los Ca_v y examinar la participación de estos canales en el acople electro-mecánico de las CMLV durante la DM2 (ver **Figura 14**). Como se puede apreciar en la media de la señal de Ca²⁺ normalizada (F/F₀) en la **Figura 14A**, el transiente inducido por la aplicación de

KCl 75 mM induce una señal de amplitud pequeña que se eleva de forma progresiva en el tiempo y disminuye hasta sus niveles basales cuando esta solución es retirada en CMLV aisladas de ambos grupos de ratas (LZDF, N=36 en azul y OZDF, N=31 en rojo). La amplitud (LZDF, 0.081 ± 0.009 vs OZDF, 0.089 ± 0.01) (**Figura 14B**) y el AUC, la cual incrementa un 28% en la rata OZDF (LZDF, 22.72 ± 3.29 vs OZDF, 29.05 ± 6.27), no resultaron ser estadísticamente distintos entre ambos grupos de ratas ZDF (GLM * $P < 0.05$) (**Figura 14C**).

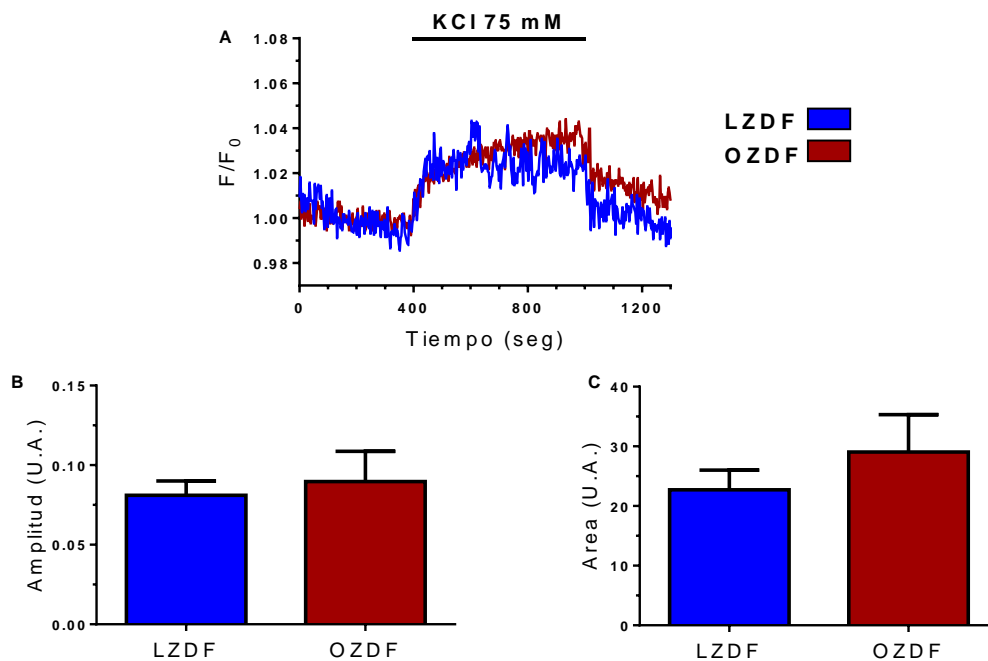


Figura 14. Efecto de la DM2 en la señal de Ca^{2+} intracelular inducida por KCl 75 mM en ausencia de Ca^{2+} extracelular en CMLV de aorta de rata ZDF. A) Media normalizada (F/F_0) de la señal de Ca^{2+} inducida por KCl 75 mM en CMLV de aorta de ratas LZDF (en azul) y OZDF (en rojo); así como la media \pm EE de la **B)** amplitud, **C)** tiempos de decaída al 90%, 60% y 30% y **D)** AUC del transiente de Ca^{2+} . GLM (* $P < 0.05$)

8.5.Efecto de la DM2 sobre la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} operados por los almacenes intracelulares de Ca^{2+} (SOC) en CMLV aislado de aorta de rata ZDF.

El efecto de la DM2 sobre la fuga pasiva de Ca^{2+} del RE, así como la entrada de Ca^{2+} operada por almacenes intracelulares (SOCE) inducida por la

inhibición de la SERCA en ausencia de Ca^{2+} extracelular se muestra en la **Figura 15**. En la **Figura 15A** se muestra la media normalizada (F/F_0) de los transientes de Ca^{2+} en ambos grupos de ratas (LZDF, N=39 en color azul y OZDF, N=52 en color rojo). El transiente inducido por la aplicación de CPA 10 μM produjo un incremento lento en la fluorescencia dado por la fuga pasiva de Ca^{2+} del RE hacia el citoplasma, seguido por una decaída de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, por debajo de los valores basales (iniciales) de Ca^{2+} intracelular, lo que conlleva al vaciamiento de los almacenes intracelulares de Ca^{2+} (Gonzalez-Cobos & Trebak, 2010; Spinelli & Trebak, 2015). Con la finalidad, de comprobar, el completo vaciamiento de los almacenes intracelulares del Ca^{2+} , se procedió a aplicar una concentración máxima de ATP (300 μM) en ausencia de Ca^{2+} extracelular y presencia de CPA (10 μM). Como se puede apreciar (**Figura 15A**), la aplicación de ATP en estas condiciones, no generó cambios significativos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Finalmente para evaluar la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular a través de los canales de Ca^{2+} dependientes del vaciamiento de los almacenes intracelulares, se procedió a restituir la concentración normal de Ca^{2+} extracelular en la continua presencia del inhibidor de la SERCA (CPA). Con este protocolo podemos apreciar que la restitución del Ca^{2+} en el medio extracelular, causa un inmediato aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que se mantiene incrementado en el tiempo (**Figura 15A**).

No se encontraron diferencias en la amplitud del transiente evocado por CPA en ratas LZDF (0.067 ± 0.007) y OZDF (0.068 ± 0.003) (**Figura 15B**). No obstante, el tiempo de decaída al 90% de la amplitud disminuyó significativamente un 53% en la rata OZDF en comparación con su control delgado (LZDF, 1.56 ± 0.45 vs OZDF, 0.73 ± 0.08588) y un 54% al 60% (LZDF, 12.85 ± 4.49 vs OZDF, 5.94 ± 1.34). No así en el tiempo de decaída al 30% de la amplitud del transiente (LZDF: 37.07 ± 9.04 vs OZDF: 26.99 ± 6.11) (**Figura 15C**) ni el AUC (LZDF: 15.83 ± 1.26 vs OZDF: 15.21 ± 1.82) (**Figura 15D**). Por otra parte, la amplitud (LZDF 0.22 ± 0.02 vs OZDF: 0.30 ± 0.03) y el AUC (LZDF: 88.43 ± 9.44 vs OZDF: 118.8 ± 17.46) de la señal de Ca^{2+} mediada por los SOC mostraron una tendencia no significativa al incremento de 27% y 26%, respectivamente, en la rata OZDF con respecto al grupo control LZDF (GLM, $*P < 0.05$) (**Figura 15 E y F**).

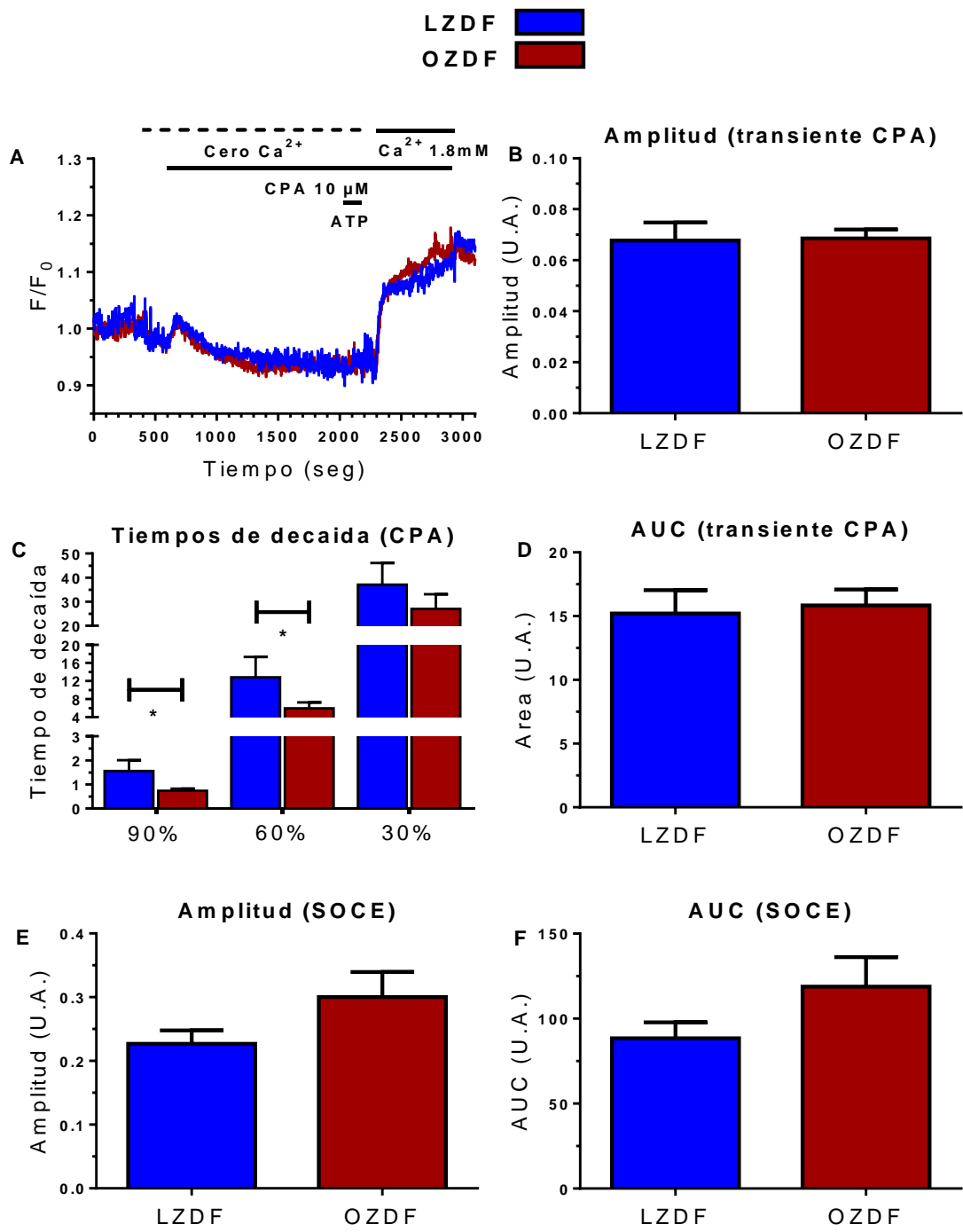


Figura 15. Efecto de la DM2 sobre la entrada de Ca²⁺ extracelular mediada por la SOCE inducida por aplicación de CPA 10 μM en ausencia de Ca²⁺ extracelular en CMLV de aorta de rata ZDF. A) Media normalizada (F/F₀) de la señal de Ca²⁺ inducida por CPA 10 μM en ausencia de Ca²⁺ extracelular (0 Ca²⁺) en CMLV aisladas de aorta de ratas LZDF (en azul) y OZDF (en rojo). Media±EE de la **B)** amplitud, **C)** tiempos de decaída al 90%, 60% y 30% y **D)** AUC del transiente de

Ca²⁺ inducido por CPA 10 μM; así como la **E**) amplitud y **F**) AUC de la SOCE al aplicar 1.8 mM de Ca²⁺ extracelular (incubación previa de CPA 10 μM en PSS 0 Ca²⁺) en CMLV de los grupos LZDF (azul) y OZDF (rojo). GLM (* P<0.05).

8.6.Efecto de la DM2 sobre la actividad de la SERCA en CMLV aisladas de aorta de rata ZDF.

Dado que no observamos diferencias significativas en la liberación de Ca²⁺ inducida por ATP y cafeína de CMLV aisladas de los grupos de ratas LZDF y OZDF (ver **Figuras 11 y 13**), decidimos evaluar el efecto de fármacos bloqueadores de transportadores sobre esta señal de Ca²⁺ (liberación de Ca²⁺ inducida por cafeína 10 mM en ausencia de Ca²⁺ extracelular). El utilizar estas condiciones experimentales (donde no observamos diferencias entre grupos) nos permite eliminar cualquier efecto que no haya sido producto de la aplicación del inhibidor de la SERCA, NCX o PMCA.

En el panel **A** de la **Figura 16** se observa la media normalizada (F/F₀) de los transientes de Ca²⁺ evocados por cafeína 10 mM sin Ca²⁺ extracelular en ausencia (líneas continuas claras) y presencia (líneas punteadas oscuras; LZDF, N=51 en color azul y OZDF, N=30 en color rojo) de CPA 10 μM, el cual fue aplicado al mismo tiempo que se aplica la cafeína en ambos grupos de ratas. El efecto de la inhibición de la SERCA por CPA en la señal de Ca²⁺ de CMLV del grupo LZDF incrementó la amplitud del transiente un 12% (**Figura 16B**), el tiempo de decaída al 90% en un 6%, al 60% un 16%, al 30% por un 123% (**Figura 16C**) y el AUC con un 30% (**Figura 16D**). No obstante, la amplitud de la señal de Ca²⁺ en CMLV de la rata OZDF disminuyó un 3% en presencia del inhibidor (**Figura 16B**), el tiempo de decaída al 90% se incrementó un 97%, al 60% un 70% y al 30% fue de 156% (**Figura 16C**) mientras que el AUC se vio aumentada un 36% (**Figura 16D**). Estos resultados sugieren que la aplicación de CPA en la señal de Ca²⁺ evocada por cafeína 10 mM incrementa la duración y AUC del transiente en CMLV aisladas de ambos grupos de rata (**Figura 16C**), sin embargo, los efectos en la inhibición de la SERCA fueron más notorios en el grupo de ratas con diabetes (OZDF) (**Figura 16D**).

Al comparar directamente el efecto de la DM2 entre ambas cepas al inhibir la SERCA con la aplicación de CPA 10 μM no se encontraron diferencias en la amplitud del transiente de Ca^{2+} (**Figura 16B**). Sin embargo, los tiempos de decaída al 90% (LZDF, 0.76 ± 0.09 vs OZDF, 1.26 ± 0.29) y 60% (LZDF, 5.28 ± 0.61 vs OZDF, 8.74 ± 1.50) de la amplitud del transiente de Ca^{2+} resultaron incrementarse significativamente en ambos casos un 65% más en la rata diabética OZDF en comparación con el grupo control LZDF (**Figura 16C**). No obstante, el tiempo de decaída al 30% de la amplitud (**Figura 16C**) y el AUC no mostraron ser estadísticamente diferentes (GLM * $P < 0.05$) (**Figura 16D**).

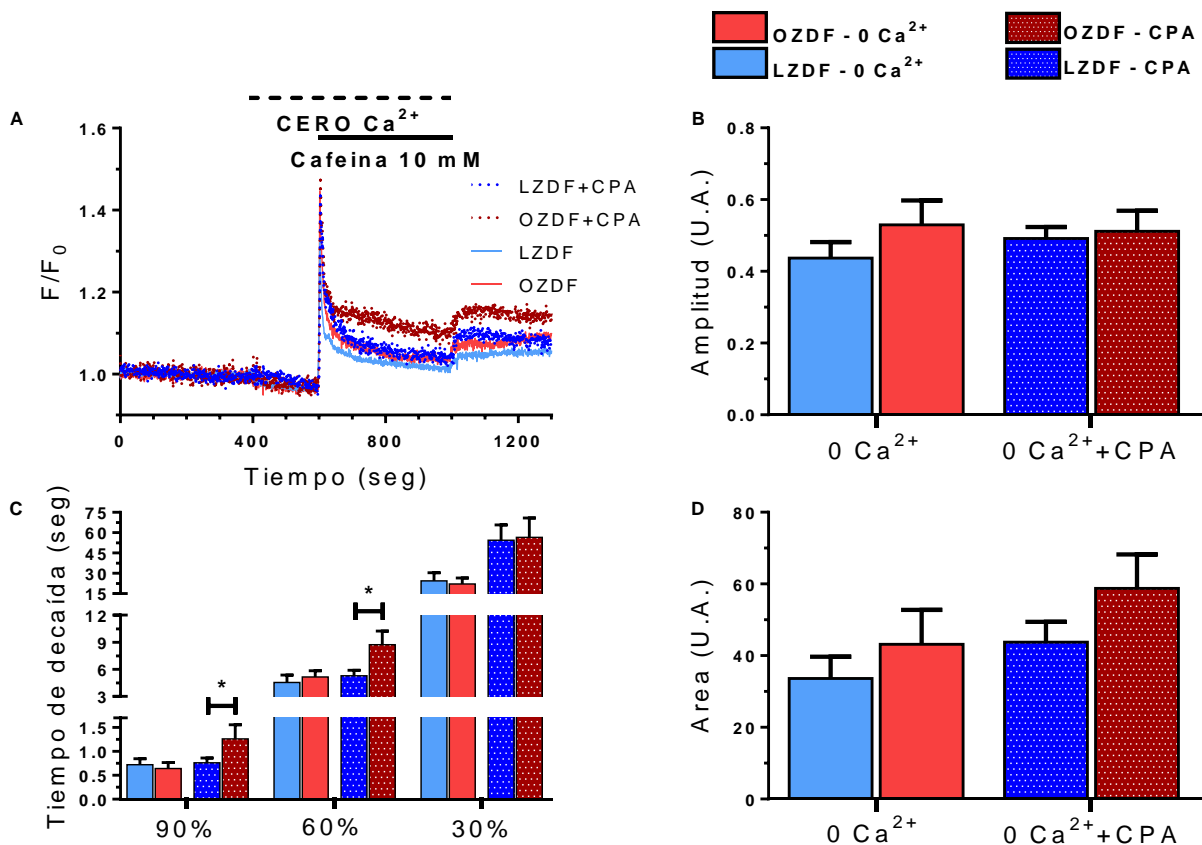


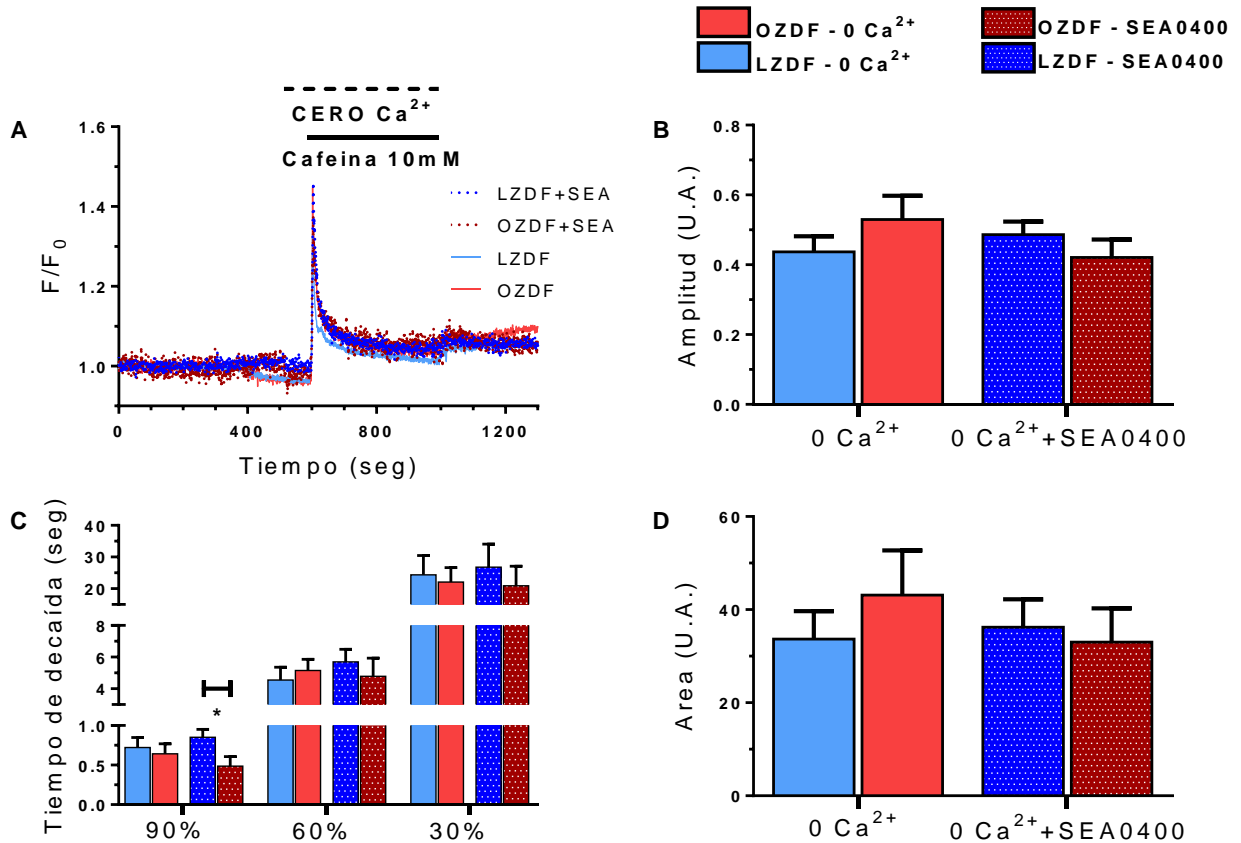
Figura 16. Efecto de la DM2 sobre la actividad de la SERCA en señal de Ca^{2+} inducida por cafeína en CMLV. A) Medias normalizadas (F/F_0) de la señal de Ca^{2+} inducida por cafeína 10 mM en ausencia de Ca^{2+} extracelular (0 Ca^{2+}) en ratas LZDF (en azul), OZDF (en rojo) y en presencia de CPA 10 μM (líneas punteadas). Media \pm EE de la **B)** amplitud, **C)** tiempos de decaída al 90%,

60% y 30% y **D**) AUC del transiente de Ca^{2+} de CMLV en ratas ZDF en ausencia de Ca^{2+} extracelular (barras en color claro) y adicionado con CPA 10 μM (barras oscuras). GLM (* $P < 0.05$)

8.7.Efecto de la DM2 sobre la actividad del NCX en CMLV aisladas de aorta de rata ZDF.

En el panel **A** de la **Figura 17** se graficaron las medias normalizadas (F/F_0) de los transientes de Ca^{2+} evocados por cafeína 10 mM (en 0 Ca^{2+}) de CMLV aisladas de ambos grupos de ratas en ausencia (líneas continuas claras) y presencia (líneas punteadas oscuras; LZDF, N=50 en color azul y OZDF, N=25 en color rojo) de SEA0400 3 μM (preincubado por 5 minutos). Durante estos ensayos se encontró que este fármaco incrementó en un 11% la amplitud del transiente de Ca^{2+} en CMLV aisladas de la aorta de rata LZDF (**Figura 17B**), el tiempo de decaída al 90% de la amplitud del transiente un 18% (LZDF, 0.85 ± 0.09 vs OZDF, 0.48 ± 0.11), al 60% fue de 25%, al 30% fue de 10% (**Figura 17C**) y el AUC fue por un 8% (**Figura 17D**). Sin embargo estas variables se mostraron disminuidas al inhibir el funcionamiento del NCX con SEA0400 3 μM en la señal de Ca^{2+} evocada por cafeína 10 mM de CMLV aisladas la aorta de rata OZDF con DM2 (**Figura 17**) ya que la media de la amplitud del transiente disminuyó un 21% (**Figura 17B**), el tiempo de decaída al 90% de la señal un 24%, al 60% disminuyó un 7% y al 30% fue de 5% (**figura 17C**), al igual que en el AUC, la cual fue 23% menor (**Figura 17C**).

Al hacer una comparación de la señal de Ca^{2+} en CMLV de ambos grupos en presencia de SEA0400 encontramos que el tiempo de decaída al 90% de la amplitud resultó estar disminuido significativamente un 42% en la rata OZDF a comparación del grupo control LZDF, sin embargo no se encontraron diferencias en la amplitud de la señal (**Figura 17B**), en los tiempos de decaída al 60%, 30% (**Figura 17C**) ni en el AUC (GLM * $P < 0.05$) (**Figura 17D**).



8.8. Efecto de la DM2 sobre la actividad de la PMCA en CMLV aisladas de aorta de rata ZDF.

La **Figura 18A** exhibe una comparación entre las media normalizada (F/F_0) de los transientes de Ca²⁺ evocados por cafeína en ausencia (líneas continuas claras) y presencia (líneas punteadas oscuras; LZDF, N=45 en color azul y OZDF, N=37 en color rojo) de Vanadato 500 μ M en CMLV aisladas de ambos grupos de ratas. Con respecto al efecto del este inhibidor sobre la señal de Ca²⁺ en el grupo LZDF, se encontró que este fármaco incrementa un 17% la amplitud

del transiente (**Figura 18B**), el tiempo de decaída al 90% de la amplitud aumentó solo 3%, al 60% un 34% y al 30% un 56% (**Figura 18C**), mientras que el AUC creció 31% (**Figura 18D**). En cuanto a los efectos provocados por Vanadato en el transiente de Ca^{2+} de CMLV en el grupo OZDF, se encontró que la amplitud disminuyó un 4% (**Figura 18B**), mientras que los tiempos de decaída de la fluorescencia aumentaron un 62% en el tiempo al 90% de la amplitud, un 48% al 60%, un 123% al 30% (**Figura 18C**) y el AUC mostró un incremento del 27% (**Figura 18D**).

Al hacer una comparación entre ambos grupos de ratas de la señal de Ca^{2+} evocada por cafeína en CMLV en presencia del inhibidor de la PMCA, encontramos que la amplitud (**Figura 18B**), los tiempos de decaída al 90%, 60% y 30% de la amplitud (**Figura 18C**) así como el AUC del transiente de fluorescencia de CMLV de aorta de rata ZDF, no resultaron ser estadísticamente distintos a pesar de encontrar una tendencia al incremento por parte del grupo OZDF (GLM * $P < 0.05$) (**Figura 18D**).

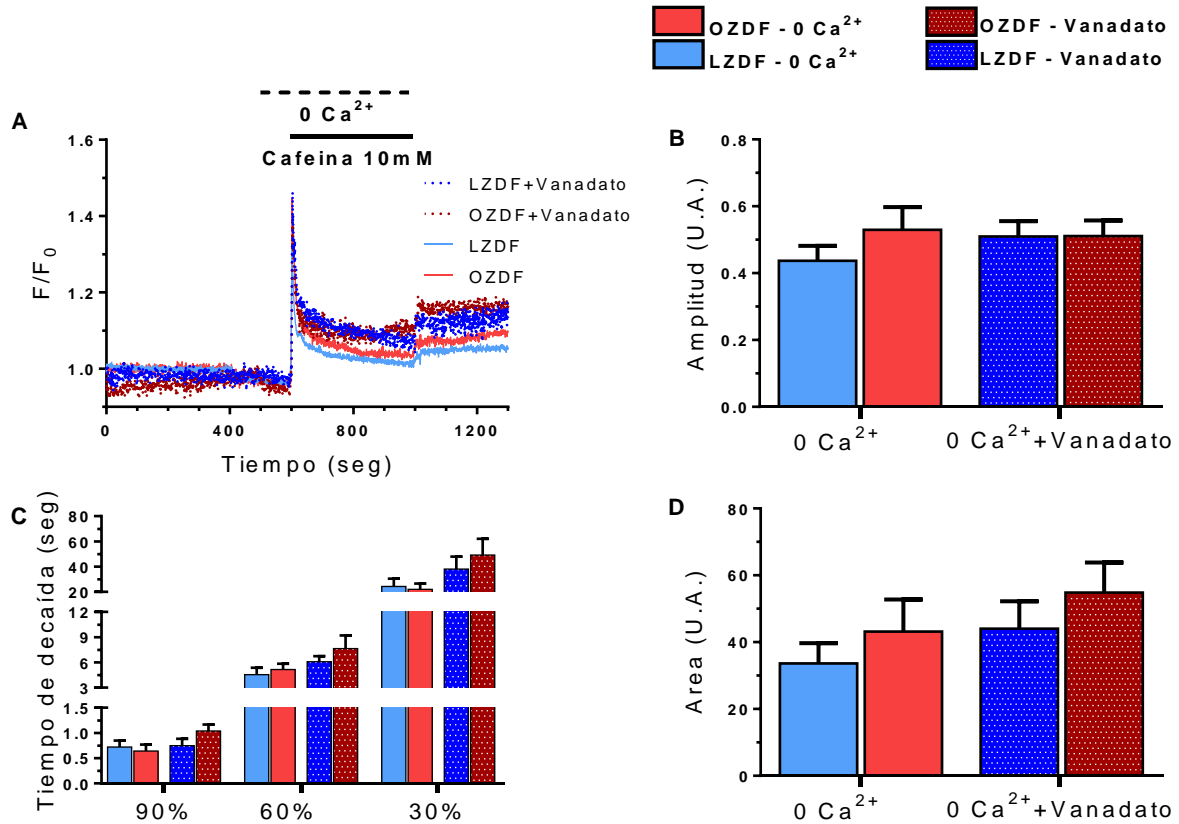


Figura 18. Efecto de la DM2 sobre la actividad de la PMCA en señal de Ca²⁺ inducida por cafeína en CMLV. A) Medias normalizadas (F/F₀) de la señal de Ca²⁺ inducida por cafeína 10 mM en ausencia de Ca²⁺ extracelular (0 Ca²⁺) en ratas LZDF (en azul), OZDF (en rojo) y en ausencia (líneas continuas claras) y presencia (líneas punteadas oscuras) de Ortovanadato de Sodio 500 μM en los grupos LZDF (azul) y OZDF (rojo). **B)** Amplitud, **C)** tiempos de decaída al 90%, 60% y 30% y **D)** AUC del transiente de Ca²⁺ de CMLV en ausencia de Ca²⁺ extracelular (barras en color claro) y adicionado con Ortovanadato de Sodio 500 μM (barras oscuras). GLM (* P<0.05)

9. Discusión

El modelo experimental utilizado en el presente estudio (ratas ZDF) ha sido utilizado ampliamente en el estudio de las alteraciones cardiovasculares causadas por la DM (Hempe et al., 2012; King, 2012; Kitada et al., 2016; Marsh et al., 2007; Shiota & Printz, 2012; B. Wang et al., 2014; Yokoi et al., 2013), en particular porque este modelo presenta varios de los signos clínicos que presentan los pacientes con DM2, como son: obesidad, dislipidemia, hiperglicemia,

hiperinsulinemia, disfunción de células β -pancreáticas, resistencia a la insulina, hipertensión arterial (Al-awar et al., 2016b; Kitada et al., 2016) y disfunción vascular (C. L. Oltman et al., 2008; C. Oltman et al., 2006).

De acuerdo a nuestra metodología, las ratas de 3 a 4 meses de edad fueron proporcionadas por el bioterio Claude Bernard de la BUAP, donde de acuerdo a su fenotipo fueron seleccionadas y agrupadas en ratas delgadas (LZDF) y ratas obesas (OZDF). Como puede observarse en la fotografía mostrada en la **Figura 6**, las diferencias fenotípicas entre las ratas LZDF y OZDF son claramente evidentes a dicha edad. Con el objetivo de cuantificar las diferencias fenotípicas realizamos la medición de: peso, longitud, circunferencia abdominal.

Nuestros resultados demostraron que la rata OZDF es estadísticamente más pesada y más grande (mayor longitud) que su grupo control. El incremento de la longitud del fenotipo obeso nos haría suponer que este sería una causa probable del incremento de su peso. Sin embargo, al calcular el IMC observamos que esta variable resultó ser mayor en la rata OZDF a comparación de su control. Este último dato sugiere que el aumento en el peso puede ser debido a un aumento en el tejido graso, tal como se ha reportado ampliamente en este modelo animal (Katsuda et al., 2014; Kitada et al., 2016; Lum-Naihe et al., 2017; Yokoi et al., 2013) así como por los laboratorios que comercializan la cepa (Charles River Laboratories, Inc.). Para confirmar la presencia de obesidad en nuestras ratas cuantificamos la grasa epididimal y encontramos que este parámetro se incrementó 5 veces más en ratas OZDF. Otras variables como la circunferencia abdominal fueron mayores en el grupo diabético a comparación de su control (**Figura 7**). El equiparar la cantidad de grasa epididimal entre ambos grupos fue importante ya que este parámetro nos indicó que el incremento de peso en el fenotipo obeso no estuvo dado por el crecimiento de masa muscular sino por la generación excesiva de tejido graso en la periferia del abdomen. Con estos resultados podemos concluir que la rata OZDF en efecto, es un modelo animal que presenta obesidad (Al-awar et al., 2016a; Lum-Naihe et al., 2017).

Con respecto a la presencia de hiperglucemia en las ratas ZDF, diversos autores han reportado que no todos los miembros del grupo obeso desarrollan DM2 (Peterson et al., 1990; X. Wang et al., 2014). Por esta razón decidimos realizar una curva de tolerancia a la glucosa (ver Material métodos para más detalles). Los resultados de glucosa basal en ayuno que se muestran en el tiempo 0 (ver **figura 8**) indican que no hay diferencia entre los dos grupos de rata. Después de la administración de la solución fisiológica glucosada, encontramos que la concentración de glucosa sanguínea en la rata OZDF fue estadísticamente mayor que en la rata LZDF en distintos tiempos de la toma de muestra (**Figura 8**). Considerando los criterios aportados por la ADA al funcionamiento de la prueba de tolerancia de glucosa como una herramienta de diagnóstico de DM2, concluimos que nuestro modelo de ratas con obesidad desarrolla DM2, pues los valores de glucosa plasmática no disminuyen después de las 2 horas de administración de glucosa intraperitoneal en ratas OZDF a comparación de su control. Al igual que nuestros estudios, otros grupos de investigación utilizan a la curva de tolerancia como método de diagnóstico de la DM2 en la cepa ZDF (Király et al., 2007; C. Oltman et al., 2006; Peterson et al., 1990).

Berra-Romani y colaboradores demostraron que las CMLV de arteria mesentérica presentan dos distintos almacenes de Ca^{2+} : uno de ellos sensible a cafeína y por lo tanto activado por esta sustancia; el segundo almacén, sensible a ATP, sustancia capaz de inducir la liberación de Ca^{2+} mediada por IP_3 para el vaciamiento de almacenes intracelulares (Berra-romani et al., 2008; Vallot et al., 2001). En esta tesis se estudiaron, de forma independiente, las posibles alteraciones que causa la DM2 sobre estos dos almacenes de Ca^{2+} .

Los resultados de la **Figura 9** demuestran que la DM2 causa una marcada disminución en la sensibilidad al ATP en CMLV. La curva concentración-respuesta obtenida de CMLV de rata OZDF (**Figura 9B**) fue desplazada a la derecha con respecto a la obtenida de ratas LZDF. En efecto, la EC50 resultó ser 30 veces mayor en la rata OZDF comparándola con la de LZDF. A pesar de que las CMLV aisladas de ratas OZDF presentan una desensibilización a concentraciones

intermedias de ATP (1 μM , 3 μM , 10 μM), mientras que a mayores concentraciones (100 y 300 μM), el agonista genera un efecto máximo de similar amplitud entre CMLV provenientes de ambos grupos. Estos resultados sugieren que la DM2 no causa alteraciones en el número de receptores purinérgicos, pero sí una desensibilización de estos o de la vía de señalización cascada abajo activada por la unión de su agonista (ATP). Como ha sido descrito en la sección de antecedentes específicos, la vía de señalización de Ca^{2+} activada por ATP, implica la activación de: mecanismos que promueven la liberación de Ca^{2+} del RE y de mecanismos que median la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular. Con la finalidad de estudiar los efectos causados por la DM2 sobre estos dos mecanismos, evaluamos la señal de Ca^{2+} evocada por ATP, en ausencia de Ca^{2+} en el medio extracelular (0 Ca^{2+}).

Los experimentos mostrados en la **Figura 10**, demuestran que en 0 Ca^{2+} , se reducen significativamente la mayoría de los parámetros evaluados de la señal de Ca^{2+} evocada por 300 μM de ATP (amplitud del pico, A.U.C. y tiempos de decaída) con la excepción del tiempo de decaída al 90% de la amplitud del transiente. Estos mismos cambios se observaron tanto en las ratas delgadas control (**Figura 10 paneles A, C y E**) como en las obesas-diabéticas (**Figura 10, paneles B, D y F**). Estos resultados son acordes con lo reportado ampliamente en la literatura acerca de que, tanto en la fase inicial de la señal de Ca^{2+} (pico) como en la fase tardía del transiente (meseta), se activa una entrada de Ca^{2+} del medio extracelular en CMLV (Capponi et al., 1985; V A Golovina et al., 2001; Putney, 2017; Tsien & Tsien, 1990; Yamamura et al., 2011).

Al sobreponer los registros obtenidos en 0 Ca^{2+} de CMLV de ambos grupos de ratas, LZDF y OZDF, se puede observar que las diferencias existentes en la señal de Ca^{2+} evocada por ATP en presencia de Ca^{2+} extracelular (**Figura 9**) no se observan en 0 Ca^{2+} (**Figura 11 A**) por lo que en estas condiciones no hay diferencias significativas en los parámetros de la señal de Ca^{2+} evaluados (**Figura 11, paneles B, C y D**). Con la finalidad de confirmar estos resultados, se realizaron experimentos en 0 Ca^{2+} aplicando la concentración de ATP 10 μM

(Figura 11, paneles E-H), concentración a la cual se observaron mayores diferencias entre los transientes de Ca^{2+} de los dos grupos experimentales en presencia de Ca^{2+} extracelular (Figura 9). Por lo que confirmamos que las diferencias en la señal de Ca^{2+} vistas en presencia de Ca^{2+} extracelular no están presentes en la respuesta de Ca^{2+} evocada por ATP con 0 Ca^{2+} .

Estos resultados nos dan información relevante, indicando que las alteraciones que causa la DM2 sobre la señal de Ca^{2+} activada por ATP se contextualizan sobre los mecanismos que participan en la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular, y que al parecer no se ven afectados los mecanismos que median la liberación de Ca^{2+} de los almacenes sensibles a ATP e IP_3 . Nuestros resultados coinciden con los reportados por Evans y Cols., quienes usaron Angiotensina-II como agonista para activar la liberación de Ca^{2+} del RE. Ellos mencionaron que la liberación de Ca^{2+} vía GPCR e IP_3 en CMLV aisladas de aorta de rata Goto-Kakizaki (otro modelo de rata con DM2) no se encontraba alterada (Evans et al., 2009). Por otro lado, Velmurugan & White reportan un incremento en la actividad del IP_3R , lo que incrementa la liberación de Ca^{2+} en CMLV aisladas del modelo db/db (Velmurugan & White, 2012). La discrepancia con estos resultados puede deberse al modelo experimental que utilizaron, distinto a la cepa ZDF.

Con la finalidad de saber si las afectaciones causadas por la DM2, sobre la señal de Ca^{2+} evocada por ATP, son específicas sobre la vía de señalización activada por el agonista antes mencionado, nos dimos a la tarea de estudiar las posibles alteraciones que causa la DM2 sobre la señal de Ca^{2+} evocada por otro agonista que activa una vía de señalización diferente a la del ATP, en este caso utilizamos cafeína. Como se ha descrito en la sección de antecedentes, la cafeína es un agonista que activa a los receptores RyR presentes en la membrana del RE, causando su apertura y por lo tanto la liberación de Ca^{2+} del retículo.

De modo similar a lo encontrado con la aplicación de 1, 3 y 10 μM de ATP (Figura 9), la DM2, causa una disminución significativa de la amplitud, tiempos de decaída y AUC del transiente de Ca^{2+} en CMLV aisladas de aorta de rata OZDF

en comparación con su control (ratas LZDF) al ser estimuladas con 10 mM de cafeína (**Figura 12**).

De manera similar a lo encontrado con ATP cuando fue aplicado en ausencia de Ca^{2+} extracelular (0 Ca^{2+}) (ver **Figura 11**), no observamos alteraciones significativas en ninguno de los parámetros medidos de la señal de Ca^{2+} inducida por la misma concentración de cafeína (10 mM) entre ambos grupos de la cepa ZDF aplicada en 0 Ca^{2+} (**Figura 13**).

Estos resultados confirman que la DM2 parece alterar los mecanismos que median el ingreso de Ca^{2+} del medio extracelular o los mecanismos que participan en la remoción del Ca^{2+} citoplasmático. De forma importante, los resultados demuestran también que no hay alteraciones en la activación de los RyR ni en la cantidad de Ca^{2+} liberada de los almacenes intracelulares, sensibles a cafeína.

En la literatura Ma y Cols., reportaron que DM1 causa una disminución en la expresión de RyR en CMLV aisladas del modelo inducido por streptozotocina (Ma et al., 2008), algo similar a lo descrito en el modelo animal db/db por Fernandez-Velasco y Cols., (Rueda Angelica, Fernandez-Velasco Maria, 2013). Al contrario de lo anterior, Searls y Cols., mencionan que CMLV en cultivo al ser incubadas con altas concentraciones de glucosa extracelular, presentaban un aumento en la expresión de RyR (Searls et al., 2010). Estas diferencias pueden deberse al modelo experimental utilizado, tipo de DM y procedimientos experimentales.

Aunque en la presente tesis no se estudiaron los efectos de la DM2 sobre todos y cada uno de los mecanismos que median la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular en CMLV, se estudió el posible efecto de la DM2 sobre los canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje (Ca_v) y sobre los canales dependientes de los almacenes intracelulares (SOCs). En este apartado, discutiremos los resultados obtenidos al examinar los Ca_v y en el siguiente los SOCs. El ensayo de fluorescencia utilizado para activar a los canales de Ca_v en CMLV aisladas en fresco, fue el de causar una despolarización del potencial de membrana de CMLV mediante la aplicación

de 75 mM de KCl extracelular y cuantificar la señal de Ca^{2+} activada por esta maniobra.

En nuestro caso, el transitorio de Ca^{2+} evocado por KCl 75mM fue de pequeña amplitud y sin un ascenso rápido de la fluorescencia, tal como lo reportan otros autores (Mancarella et al., 2013; Touw et al., 2012). Al comparar la entrada de Ca^{2+} evocada por KCl 75 mM entre las CMLV aisladas de ambos grupos, no encontramos diferencias significativas en ninguna de las variables evaluadas, por ello proponemos que la DM2 no genera alteraciones en los canales Ca_v de tipo L y T en CMLV de aorta de rata OZDF. A pesar de que en diversas investigaciones se han reportado alteraciones en el manejo del Ca^{2+} mediado por canales Ca_v en CMLV durante la DM2, aún existen discrepancias con respecto a los efectos que genera esta enfermedad en los canales Ca_v de CMLV (Sturek, 2010). Al contrario de nuestras investigaciones, Navedo y Cols., sostienen que la actividad de canales Ca_v esta incrementada en CMLV durante la DM2 (Navedo et al., 2010b; Nystoriak et al., 2017). Sin embargo sus resultados podrían diferir de los nuestros debido a diferencias en la metodología pues ellos utilizan CMLV aisladas de arterias cerebrales (Nystoriak et al., 2017).

La SOCE es una ruta de ingreso de Ca^{2+} del medio extracelular hacia el interior de la célula, que se activa con el vaciamiento de los almacenes de Ca^{2+} intracelular, en particular del RE (ver apartado 3.1.3.3.1), que finalmente conlleva a la apertura de los canales de Ca^{2+} presentes en la membrana plasmática activados por los almacenes intracelulares (SOC).

Una maniobra experimental para depletar el Ca^{2+} almacenado en el RE y activar la SOCE es a través de la inhibición farmacológica de la bomba de Ca^{2+} presente en la membrana del RE (SERCA) utilizando CPA (ácido ciclopiazónico). Considerando que la membrana del RE tiene canales de Ca^{2+} permanentemente abiertos (canales de fuga) en condiciones fisiológicas, el Ca^{2+} que se fuga a través de esta vía, es rápidamente recapturado por la SERCA en el RE, sin embargo, al inhibir a la SERCA con CPA, el Ca^{2+} se fuga del RE y al no ser recapturado por la SERCA, el RE se vacía. El vaciamiento de Ca^{2+} del RE, causa la apertura de

canales de Ca^{2+} presentes en la membrana plasmática operados por los almacenes intracelulares de Ca^{2+} denominados SOC. En la **Figura 15** se pueden observar los registros de la señal de Ca^{2+} obtenidos al aplicar el protocolo experimental antes descrito. La aplicación de CPA en ausencia de Ca^{2+} extracelular (0 Ca^{2+}) evocó un aumento transitorio de la señal de Ca^{2+} que corresponde al vaciamiento del RE. La amplitud de este aumento transitorio de Ca^{2+} se correlaciona con la cantidad de Ca^{2+} contenido en el RE de CMLV (Berramoni et al., 2008; Curtis, Major, Trimble, & Scholfield, 2003; Fernandez et al., 2015; Mauban et al., 2006).

En los paneles **B-D de la Figura 15**, se muestran los valores de los parámetros medidos de este transiente y encontramos un acortamiento en la duración de la señal de fluorescencia, mas no de su amplitud ni del AUC. Por lo que proponemos que los tiempos de decaída (al 90% y 60% de la amplitud) del transiente inducido por CPA en CMLV de aorta de ratas OZDF están siendo alterados por la velocidad con la que transportadores de extrusión, como el NCX y/o la PMCA, podrían estar reduciendo la $[\text{Ca}^{2+}]_i$; (El-Najjar et al., 2017). Nuestros resultados coinciden con lo reportado por White y Cols., quienes no encontraron alteraciones en la concentración de Ca^{2+} contenido en el RE ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$) en CMLV del modelo db/db (Velmurugan & White, 2012).

Posteriormente al transiente evocado por el CPA en 0 Ca^{2+} , correspondiente a la fuga y vaciamiento de Ca^{2+} almacenado en el RE, procedimos a restituir el Ca^{2+} en el medio extracelular en continua presencia de CPA para bloquear a la SERCA y de esta manera cuantificar la fluorescencia dada por la entrada de Ca^{2+} a través de los SOC. En estos experimentos encontramos que la SOCE se encuentra incrementada de forma no significativa en CMLV aisladas del grupo OZDF con DM2 (ver **Figura 15**). Por lo tanto, contrario a lo que en un principio proponíamos, es probable que la SOCE no influya en la desensibilización de la respuesta de Ca^{2+} evocada por ATP en CMLV aisladas durante la DM2. Aún existe controversia con respecto a la participación de canales TRP's en la SOCE (Putney, 2017), por ello con estos ensayos de fluorescencia no

podemos hacer una clara distinción entre la entrada de Ca^{2+} mediada por los SOC y los canales TRP's, pero si podemos abordar la participación de ambos de una forma general.

Las conclusiones de distintos grupos de investigación con respecto a los efectos de la DM2 en la SOCE y TRP's son aun inciertas. Por ejemplo, Evans y Cols. reportaron que algunos TRPC (entre ellos las isoformas 1, 4 y 5) incrementan la entrada de Ca^{2+} evocada por Angiotensina II en CMLV de aorta de rata en cultivo durante la DM2 en un modelo animal diferente a la ZDF, la rata Goto Kakizaki (Evans et al., 2009). Estas investigaciones coinciden también con reportes donde se indica que la actividad de la SOCE puede incrementarse a través de un mecanismo mediado por endotelina y resistina, las cuales son sobre expresadas en pacientes con obesidad central, hipertensión y DM2 (Chuang et al., 2012). En cambio, Mita y Cols., demostraron que la contracción inducida por la SOCE está disminuida en CMLV de arteria caudal en la ratas Goto Kakizaki, además se demostró que estas ratas expresan una mayor cantidad de TRPC1 y 6 (Mita et al., 2010), sin embargo esto es contrario a lo reportado en el músculo liso contráctil de vena safena aislada de pacientes humanos con DM (Chung et al., 2009).

Dado que no se pudo dilucidar con exactitud el mecanismo por el cual la entrada de Ca^{2+} extracelular disminuye en las CMLV de aorta de rata OZDF, continuamos con nuestras investigaciones bajo el supuesto de que un mecanismo regulador de la remoción de Ca^{2+} citoplasmático podría estar alterado en su funcionamiento durante la DM2. En este trabajo de tesis se estudió el efecto de la inhibición de los mecanismos que regulan la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el transiente de fluorescencia evocado por cafeína 10 mM en ausencia de Ca^{2+} extracelular. Estos ensayos se realizaron en ausencia de Ca^{2+} extracelular (solución 0 Ca^{2+}) para eliminar la entrada de Ca^{2+} por los SOC o el NCX (Gomez-Pinilla et al., 2007; Sheikh et al., 2012)

Primero, nosotros observamos que el transiente de fluorescencia evocado por cafeína en ausencia de Ca^{2+} extracelular y en presencia de CPA tardó en

decaer más en la condición diabética a comparación de su control (ver **Figura 16**), por lo que se podría suponer que el funcionamiento o expresión de la SERCA podría estar incrementado hasta un 65% más en CMLV de aorta de rata OZDF.

Segundo, nuestros resultados fueron consistentes al demostrar que durante la fase inicial de la decaída del transiente de Ca^{2+} (tiempo de decaída al 90% de la amplitud), la fluorescencia tardó menos tiempo en disminuir en CMLV aisladas de rata diabética OZDF (ver **Figura 17**). Lo anterior propondría que la actividad (en modo directo) del NCX se encuentra disminuida un 42% en la fase inicial de la decaída del transiente de fluorescencia en CMLV durante la DM2.

Tercero, al estudiar la inhibición de la PMCA en la respuesta de Ca^{2+} evocada por cafeína encontramos que no existían diferencias significativas entre la condición patológica y control, sin embargo se observó que el Vanadato incrementa la duración del transiente de Ca^{2+} de CMLV en ambos grupos de ratas (ver **Figura 18**).

En síntesis, con respecto a los resultados obtenidos por el estudio de los transportadores de Ca^{2+} , proponemos que durante la DM2 existe en CMLV una sobreactividad de la SERCA que estaría compensando la actividad y/o expresión del NCX.

A pesar de que se han reportado las alteraciones que genera la DM2 en los mecanismos que regulan el Ca^{2+} intracelular en otras células como linfocitos, plaquetas, células β del páncreas y endotelio cardíaco (Adachi, 2010; Chaabane et al., 2007; Herchuelz & Pachera, 2018; Sheikh et al., 2012) los estudios realizados en CMLV son aún insuficientes pues la mayoría de ellos se centran en las alteraciones provocadas por la DM1 (Fernández-velasco et al., 2014), no así en la DM2.

Nuestras propuestas coinciden parcialmente con lo reportado por Hill y colaboradores, quienes estudiaron la señal de Ca^{2+} y su regulación por la SERCA, NCX y PMCA en un modelo porcino de diabetes con dislipidemia (Hill, Price, Dixon, & Sturek, 2003) similar, de acuerdo a las características metabólicas, a la

cepa ZDF. Ellos postulan que el funcionamiento de la SERCA y/o PMCA podría estar incrementado como un método de compensación frente al incremento de la entrada de Ca^{2+} en CMLV durante la DM2 (Hill et al., 2003). Nuestras conclusiones podrían ser esclarecidas con la realización de un Western Blot, método semicuantitativo para determinar la expresión de proteínas. O bien, mediante el uso combinado de fármacos bloqueadores, aislando la actividad de un transportador en específico durante la inducción del transiente de Ca^{2+} , tal como lo hicieron Sheikh y colaboradores en la señal de Ca^{2+} de células endoteliales cardiacas (Sheikh et al., 2012).

En suma, nuestra investigación nos permite proponer que el decremento de la señal de Ca^{2+} en CMLV aisladas de aorta de rata OZDF podría estar dado por una disminución en la actividad de los receptores P2X, canales TRP's y NCX, así como por el incremento en la actividad y/o expresión de la bomba SERCA. En la **Figura 19** se muestran en color rojo (flecha hacia abajo) los canales y transportadores que podrían estar alterados en su funcionamiento durante la DM2 y en color verde (flecha hacia arriba) la proteína SERCA que podría estar incrementada en cantidad y/o funcionamiento durante el estado patológico.

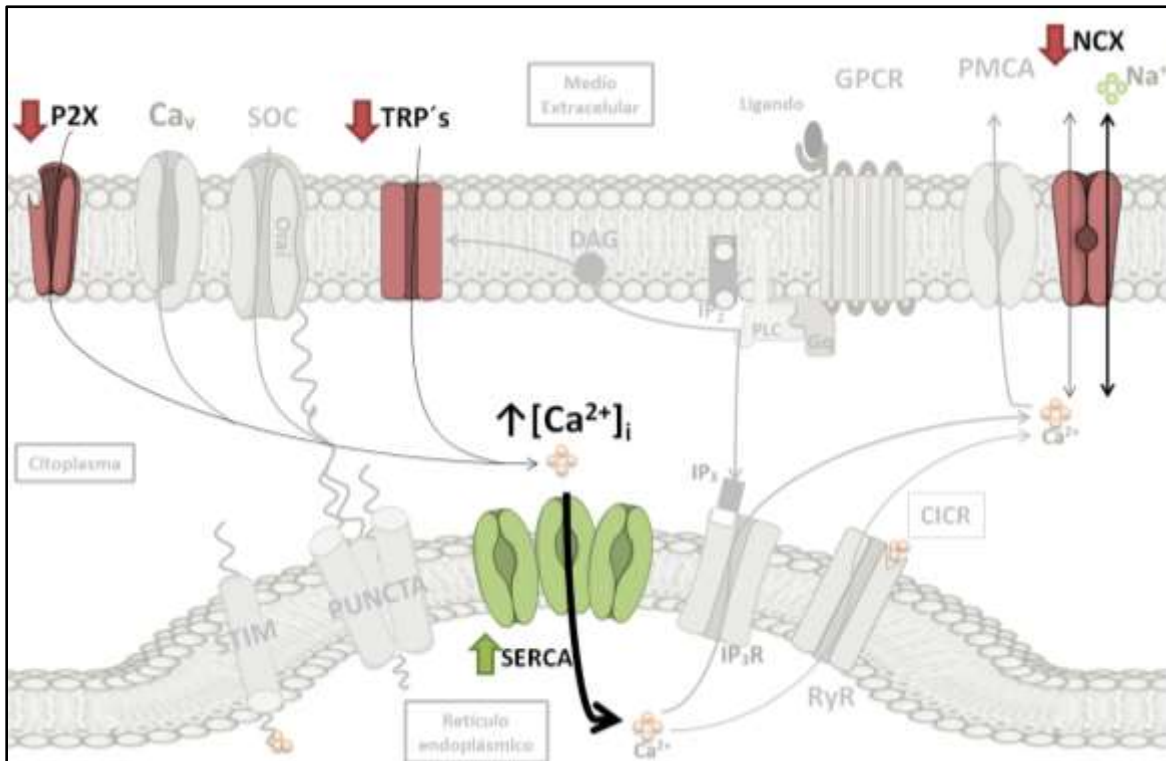


Figura 11. Mecanismos moleculares que podrían verse afectados por la DM2 en la regulación de la $[Ca^{2+}]_i$ en CMLV de aorta de rata ZDF. En color rojo (flecha hacia abajo) se muestran las proteínas que podrían ser afectadas de manera negativa (disminución en la expresión/actividad) por la DM2 en CMLV de aorta: Receptor intróxico purinérgico (P2X), canales iónicos Receptores de Potencial Transitorio (TRP's) e intercambiador Na^+/Ca^{2+} (NCX). En color verde (flecha hacia arriba) se muestra a la ATP-asa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (SERCA), la cual estaría incrementada en expresión/actividad por la DM2 en CMLV de aorta de rata ZDF.

10. Conclusiones

- La DM2 causa una desensibilización de la señal de Ca^{2+} evocada por ATP y cafeína en CMLV de aorta de ratas ZDF.
- La desensibilización no se debe a alteraciones en la $[Ca^{2+}]_{RE}$ ni a la entrada de Ca^{2+} a través de canales Ca_v y SOC.
- La DM2 causa un aumento en la actividad de la SERCA y una disminución en la actividad del NCX en CMLV de aorta de ratas ZDF.

11. Bibliográfia

- Abou-Saleh, H., Pathan, A. R., Daalis, A., Hubrack, S., Abou-Jassoum, H., Al-Naeimi, H., ... Machaca, K. (2013). Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor up-regulation in hypertension is associated with sensitization of Ca²⁺ release and vascular smooth muscle contractility. *Journal of Biological Chemistry*, 288(46), 32941–32951. doi:10.1074/jbc.M113.496802
- Adachi, T. (2010). *Modulation of Vascular Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase in Cardiovascular Pathophysiology. Advances in Pharmacology* (Vol. 59). Elsevier Inc. doi:10.1016/S1054-3589(10)59006-9
- Agirbasli, M., Tanrikulu, A. M., & Berenson, G. S. (2015). Metabolic Syndrome: Bridging the Gap from Childhood to Adulthood. *Cardiovascular Therapeutics*, 34, . doi:10.1111/1755-5922.12165
- Al-awar, A., Kupai, K., Veszelka, M., Attieh, Z., Murlasits, Z., Török, S., ... Varga, C. (2016a). Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models, 2016. doi:10.1155/2016/9051426
- Alexander, S. P. H., Striessnig, J., Kelly, E., Marrion, N. V., Peters, J. A., Faccenda, E., ... Davies, J. A. (2017). The concise guide to pharmacology 2017/18: Voltage-gated ion channels. *British Journal of Pharmacology*, 174, S160–S194. doi:10.1111/bph.13884
- Althoff, T. F., & Offermanns, S. (2015). G-protein-mediated signaling in vascular smooth muscle cells — implications for vascular disease. *Journal of Molecular Medicine*, 973–981. doi:10.1007/s00109-015-1305-z
- Amberg, G. C., & Navedo, M. F. (2013). Calcium Dynamics in Vascular Smooth Muscle. *Microcirculation*, 20(4), 281–289. doi:10.1111/micc.12046
- American Diabetes Association (ADA). (2017). Standard of medical care in diabetes - 2017. *Diabetes Care*, 40 (sup 1)(January), s4–s128. doi:10.2337/dc17-S001

- Bastin, G., & Heximer, S. P. (2011). Intracellular regulation of heterotrimeric G-protein signaling modulates vascular smooth muscle cell contraction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 510(2), 182–189.
doi:10.1016/j.abb.2011.05.008
- Berra-romani, R., Mazzocco-spezia, A., Pulina, M. V, & Golovina, V. A. (2008). Ca²⁺ handling is altered when arterial myocytes progress from a contractile to a proliferative phenotype in culture, 21201. doi:10.1152/ajpcell.00173.2008.
- Blaustein, M. P., Zhang, J., Chen, L., Song, H., Raina, H., Kinsey, S. P., ... Hamlyn, J. M. (2009). The pump, the exchanger, and endogenous ouabain: signaling mechanisms that link salt retention to hypertension. *Hypertension*, 53(2), 291–8. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.119974
- Boron, W. F., & Boulpaep, E. (2012). *Medical Physiology*. (E. L. B. Walter F. Boron, Ed.) *Medical Physiology: A Cellular and Molecular Approach* (2nd Editio.). Elsevier B.V.
- Brock, T. A., Alexander, R. W., Ekstein, L. S., Atkinson, W. J., & Gimbrone, M. A. (1985). Angiotensin increases cytosolic free calcium in cultured vascular smooth cells. *Hypertension*, 7, 1105–1109.
- Burnham, M. P., Johnson, I. T., & Weston, A. H. (2006). Impaired small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel-dependent EDHF responses in Type II diabetic ZDF rats. *Br. J. Pharmacol.*, 148(4), 434–441.
doi:10.1038/sj.bjp.0706748
- Burnstock, G. (2017). Purinergic Signaling in the Cardiovascular System. *Circulation Research*, 120(1), 207–228.
doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309726
- Burnstock, G., & Burnstock, G. (2016). Short- and long-term (trophic) purinergic signalling.
- Capponi, A. M., Lewsj, P. D., & Vallotton, M. B. (1985). Cytosolic Free Calcium

Levels in Monolayers of Cultured Rat Aortic Smooth Muscle Cells, *260*(13), 7836–7842.

Cartwright, E. J., Oceandy, D., Austin, C., & Neyses, L. (2011). Ca²⁺ signalling in cardiovascular disease: the role of the plasma membrane calcium pumps. *Science China. Life Sciences*, *54*(8), 691–8. doi:10.1007/s11427-011-4199-1

Castro, A., Ros, J., Jimenez, W., Claria, J., Llibre, J., Leivas, A., ... Rodes, J. (1994). Intracellular calcium concentration in vascular smooth muscle cells of rats with cirrhosis. *J.Hepatol.*, *21*(0168-8278 SB - IM), 521–526. doi:10.1016/S0168-8278(94)80096-0

Chaabane, C., Dally, S., Corvazier, E., Bredoux, R., Bobe, R., Ftouhi, B., ... Enouf, J. (2007). Platelet PMCA- and SERCA-type Ca²⁺-ATPase expression in diabetes: A novel signature of abnormal megakaryocytopoiesis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *5*(10), 2127–2135. doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02709.x

Chatzigeorgiou, A., Halapas, A., Kalafatakis, K., & Kamper, E. (2009). The use of animal models in the study of diabetes mellitus. *In Vivo (Athens, Greece)*, *23*(2), 245–58. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19414410>

Chaudhari, S., & Ma, R. (2016). Store-operated calcium entry and diabetic complications. *Experimental Biology and Medicine*, *241*(4), 343–352. doi:10.1177/1535370215609693

Chuang, T.-Y., Au, L.-C., Wang, L.-C., Ho, L.-T., Yang, D.-M., & Juan, C.-C. (2012). Potential effect of resistin on the ET-1-increased reactions of blood pressure in rats and Ca²⁺ signaling in vascular smooth muscle cells. *Journal of Cellular Physiology*, *227*(4), 1610–1618. doi:10.1002/jcp.22878

Chung, A. W. Y., Au Yeung, K., Chum, E., Okon, E. B., & van Breemen, C. (2009). Diabetes modulates capacitative calcium entry and expression of transient receptor potential canonical channels in human saphenous vein. *European Journal of Pharmacology*, *613*(1-3), 114–118.

doi:10.1016/j.ejphar.2009.04.029

- Creager, M. A., Beckman, J. A., & Loscalzo, J. (2014). *Vascular Medicine: A Companion to Braunwald's Heart Disease* (2nd editio.). Elsevier B.V.
- Curtis, T. M., Major, E. H., Trimble, E. R., & Scholfield, C. N. (2003). Diabetes-induced activation of protein kinase C inhibits store-operated Ca²⁺ uptake in rat retinal microvascular smooth muscle. *Diabetologia*, *46*(9), 1252–1259. doi:10.1007/s00125-003-1178-5
- Davies, M. G. (2015). New Insights on the Role of SERCA During Vessel Remodeling in Metabolic Syndrome. *Diabetes September*, *64*(9), 3066–3068. doi:10.2337/db15-0761
- Donnell, C. J. O., & Elosua, R. (2008). Factores de riesgo cardiovascular . Perspectivas derivadas del Framingham Heart Study, *61*(I), 299–310.
- Dupont, G., & Croisier, H. (2010). Spatiotemporal organization of Ca dynamics: a modeling-based approach. *HFSP Journal*, *4*(2), 43–51. doi:10.2976/1.3385660
- El-Najjar, N., Kulkarni, R. P., Nader, N., Hodeify, R., & Machaca, K. (2017). Effects of Hyperglycemia on Vascular Smooth Muscle Ca²⁺ Signaling. *BioMed Research International*, *2017*, 1–16. doi:10.1155/2017/3691349
- Erlinge, D., & Burnstock, G. (2008). P2 receptors in cardiovascular regulation and disease. *Purinergic Signalling*, *4*(1), 1–20. doi:10.1007/s11302-007-9078-7
- Etuk, E. . (2010). Animals models for studying diabetes mellitus Department of Pharmacology , College of Health Sciences , Usmanu Danfodiyo University ,. *Agriculture and Biology Journal of North America*, *1*(2), 130–134.
- Evans, J. F., Hee, J., & Ragolia, L. (2009). Ang-II-induced Ca²⁺ influx is mediated by the 1 / 4 / 5 subgroup of the transient receptor potential proteins in cultured aortic smooth muscle cells from diabetic Goto-Kakizaki rats, *302*, 49–57. doi:10.1016/j.mce.2008.12.004

- Fernandez, R. a, Wan, J., Song, S., Smith, K. a, Gu, Y., Tauseef, M., ... Yuan, J. X.-J. (2015). Upregulated expression of STIM2, TRPC6, and Orai2 contributes to the transition of pulmonary arterial smooth muscle cells from a contractile to proliferative phenotype. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 308(8), C581–93. doi:10.1152/ajpcell.00202.2014
- Fernández-velasco, M., Ruiz-hurtado, G., Gómez, A. M., & Rueda, A. (2014). Cell Calcium Ca²⁺ + handling alterations and vascular dysfunction in diabetes. *Cell Calcium*, 56(5), 397–407. doi:10.1016/j.ceca.2014.08.007
- Fisher, S. A. (2010). Vascular smooth muscle phenotypic diversity and function. *Physiol Genomics*. doi:10.1152/physiolgenomics.00111.2010\rphysiolgenomics.00111.2010 [pii]
- Fisher, S. A. (2017). *Smooth Muscle Phenotypic Diversity. Vascular Pharmacology* (1st ed., Vol. 78). Elsevier Inc. doi:10.1016/bs.apha.2016.07.003
- Ghosh, D., Syed, A. U., Prada, M. P., Nystoriak, M. A., & Santana, L. F. (2017). Calcium Channels in Vascular Smooth Muscle, 78, 49–87. doi:10.1016/bs.apha.2016.08.002
- Gil, W., & Mauban, J. R. H. (2017). Autonomic Neuroscience : Basic and Clinical Imaging sympathetic neurogenic Ca²⁺ + signaling in blood vessels. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, (July), 0–1. doi:10.1016/j.autneu.2017.07.007
- Goligorsky, M. S. (2017). Vascular endothelium in diabetes, 266–275. doi:10.1152/ajprenal.00473.2016
- Golovina, V. A., Platoshyn, O., Bailey, C. L., Wang, J., Limsuwan, A., Sweeney, M., ... Yuan, J. X. (2001). Upregulated TRP and enhanced capacitative Ca²⁺ entry in human pulmonary artery myocytes during proliferation. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 280(2), H746–55. doi:10.1152/ajpheart.2001.280.2.H746

- Golovina, V. A., Song, H., James, P. F., Lingrel, J. B., Blaustein, M. P., Vera, A., ... Blaustein, M. P. (2003). Na⁺ pump 2 -subunit expression modulates Ca²⁺ signaling.
- Gomez-Pinilla, P. J., Pozo, M. J., Baba, A., Matsuda, T., & Camello, P. J. (2007). Ca²⁺ extrusion in aged smooth muscle cells. *Biochemical Pharmacology*, *74*(6), 860–869. doi:10.1016/j.bcp.2007.06.037
- Gonzalez-Cobos, J. C., & Trebak, M. (2010). TRPC channels in smooth muscle cells. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, *15*(518), 1023–39. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted
- Guire, D. K. M., & Marx, N. (2015). *Diabetes in Cardiovascular disease*. Elsevier. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Hempe, J., Elvert, R., Schmidts, H.-L., Kramer, W., & Herling, a. W. (2012). Appropriateness of the Zucker Diabetic Fatty rat as a model for diabetic microvascular late complications. *Laboratory Animals*, *46*(1), 32–39. doi:10.1258/la.2011.010165
- Herchuelz, A., & Pachera, N. (2018). The Na⁺/Ca²⁺ exchanger and the Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase in β -cell function and diabetes. *Neuroscience Letters*, *663*, 72–78. doi:10.1016/j.neulet.2017.08.009
- Hill, B. J. F., Price, E. M., Dixon, J. L., & Sturek, M. (2003). Increased calcium buffering in coronary smooth muscle cells from diabetic dyslipidemic pigs. *Atherosclerosis*, *167*(1), 15–23. doi:10.1016/S0021-9150(02)00381-7
- Hill-eubanks, D. C., Werner, M. E., Heppner, T. J., & Nelson, M. T. (2011). Calcium Signaling in Smooth Muscle, 1–20.
- Hong, F., Haldeman, B. D., Jackson, D., Carter, M., & Baker, J. E. (2011). Biochemistry of Smooth Muscle Myosin Light Chain Kinase. *Arch Biochem Biophys*, *510*(2), 135–146. doi:10.1016/j.abb.2011.04.018.Biochemistry
- Indicators, O. (2017). *Education at a Glance 2017*. doi:10.1787/eag-2017-en

- International Diabetes Federation. (2013). *Atlas de la diabetes de la FID*.
International Diabetes Federation. doi:2-930229-80-2
- Jernigan, N. L., & Resta, T. C. (2013). Calcium Homeostasis and Sensitization in Pulmonary Arterial Smooth Muscle. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*, 259–271. doi:10.1111/micc.12096
- Ji, G., Barsotti, R. J., Feldman, M. E., & Kotlikoff, M. I. (2002). Stretch-induced calcium release in smooth muscle. *The Journal of General Physiology*, 119(6), 533–544. doi:10.1085/jgp.20028514
- Katsuda, Y., Ohta, T., & Miyajima, K. (2014). Diabetic complications in obese type 2 diabetic rat models. *Experimental*, 63(October 2013), 121–132. Retrieved from <http://jlc.jst.go.jp/DN/JALC/10033742310?from=Google>
- Kim, H. R., Appel, S., Vetterkind, S., Gangopadhyay, S. S., & Morgan, K. G. (2008). Smooth muscle signalling pathways in health and disease: Contractility in Health and Disease Review Series. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(6A), 2165–2180. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00552.x
- King, A. J. F. (2012). The use of animal models in diabetes research. *British Journal of Pharmacology*, 166(3), 877–894. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x
- Király, M. a., Bates, H. E., Yue, J. T. Y., Goche-Montes, D., Fediuc, S., Park, E., ... Riddell, M. C. (2007). Attenuation of type 2 diabetes mellitus in the male Zucker diabetic fatty rat: the effects of stress and non-volitional exercise. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 56(6), 732–744. doi:10.1016/j.metabol.2006.12.022
- Kitada, M., Ogura, Y., & Koya, D. (2016). Rodent models of diabetic nephropathy: Their utility and limitations. *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease*, 9, 279–290. doi:10.2147/IJNRD.S103784
- Kuang, S. J., Qian, J. S., Yang, H., Rao, F., Chen, X. Y., Zhang, M. Z., ... Deng, C.

- Y. (2017). The enhancement of TXA₂receptors-mediated contractile response in intrarenal artery dysfunction in type 2 diabetic mice. *European Journal of Pharmacology*, 805(November 2016), 93–100.
doi:10.1016/j.ejphar.2017.03.006
- Kuo, I. Y., & Ehrlich, B. E. (2015). Signaling in muscle contraction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(2). doi:10.1101/cshperspect.a006023
- Lambert, D. G., & Simpson, A. W. M. (1999). Calcium Signaling Protocols, 114.
- Li, X., Cheng, J., & Zhou, Z. (2016). Re-visiting multiple models of β -cell function progression in type 1 diabetes: Significance for prevention and cure. *Journal of Diabetes*, n/a–n/a. doi:10.1111/1753-0407.12376
- Linde, C. I., Karashima, E., Raina, H., Zulian, A., Wier, W. G., Hamlyn, J. M., ... Golovina, V. a. (2012). Increased arterial smooth muscle Ca²⁺ signaling, vasoconstriction, and myogenic reactivity in Milan hypertensive rats. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 302(3), H611–20.
doi:10.1152/ajpheart.00950.2011
- Lohman, A. W., Billaud, M., & Isakson, B. E. (2012). Mechanisms of ATP release and signalling in the blood vessel wall. *Cardiovascular Research*, 95(3), 269–280. doi:10.1093/cvr/cvs187
- Loscalzo, J., & Epstein, J. (2013). 224 cardiovascular. *Cardiovascular*, 14, 145.
- Lu, T., Wang, X., He, T., Zhou, W., Kaduce, T. L., Katusic, Z. S., ... Lee, H. (2005). Coronary Arterial Smooth Muscle Cells in Zucker Diabetic Fatty Rats. *System*, 54(July), 2155–2163.
- Lu, T., Ye, D., He, T., Wang, X., Wang, H., & Lee, H.-C. (2008). Impaired Ca²⁺-Dependent Activation of Large-Conductance Ca²⁺-Activated K⁺ Channels in the Coronary Artery Smooth Muscle Cells of Zucker Diabetic Fatty Rats. *Biophysical Journal*, 95(11), 5165–5177. doi:10.1529/biophysj.108.138339
- Lu, X., Guo, X., Karathanasis, S. K., Zimmerman, K. M., Onyia, J. E., Peterson, R.

- G., & Kassab, G. S. (2010). Rosiglitazone reverses endothelial dysfunction but not remodeling of femoral artery in Zucker diabetic fatty rats. *Cardiovascular Diabetology*, 9, 19. doi:10.1186/1475-2840-9-19
- Lum-Naihe, K., Toedebusch, R., Mahmood, A., Bajwa, J., Carmack, T., Kumar, S. A., ... Pulakat, L. (2017). Cardiovascular disease progression in female Zucker Diabetic Fatty rats occurs via unique mechanisms compared to males. *Scientific Reports*, 7(1), 1–16. doi:10.1038/s41598-017-18003-8
- Ma, L., Zhu, B., Chen, X., Liu, J., Guan, Y., & Ren, J. (2008). Abnormalities of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} mobilization in aortic smooth muscle cells from streptozotocin-induced diabetic rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 35(5-6), 568–573. doi:10.1111/j.1440-1681.2007.04832.x
- Mancarella, S., Potireddy, S., Wang, Y., Gao, H., Gandhirajan, R. K., Autieri, M., ... Gill, D. L. (2013). Targeted STIM deletion impairs calcium homeostasis, NFAT activation, and growth of smooth muscle. *FASEB Journal*, 27(3), 893–906. doi:10.1096/fj.12-215293
- Marchand, A., Abi-gerges, A., Saliba, Y., Merlet, E., & Lompré, A. (2012). Calcium Signaling, 740, 795–810. doi:10.1007/978-94-007-2888-2
- Marsh, S. A., Powell, P. C., Agarwal, A., Italia, L. J. D., & Chatham, J. C. (2007). Cardiovascular dysfunction in Zucker obese and Zucker diabetic fatty rats : role of hydronephrosis, 0005, 292–298. doi:10.1152/ajpheart.01362.2006.
- Martinsen, a, Dessy, C., & Morel, N. (2014). Regulation of calcium channels in smooth muscle: New insights into the role of myosin light chain kinase. *Channels*, 8(5), 402–413. doi:10.4161/19336950.2014.950537
- Mauban, J. R. H., Wilkinson, K., Schach, C., Yuan, J. X., Joseph, R. H., Wilkinson, K., & Yuan, J. X. (2006). Histamine-mediated increases in cytosolic [Ca^{2+}] involve different mechanisms in human pulmonary artery smooth muscle and endothelial cells, 0725, 325–336. doi:10.1152/ajpcell.00236.2005.

- Mccarron, J. G., Lee, M. D., & Wilson, C. (2017). The Endothelium Solves Problems That Endothelial Cells Do Not Know Exist. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(4), 322–338. doi:10.1016/j.tips.2017.01.008
- Menke, A., Rust, K. F., Fradkin, J., Cheng, Y. J., & Cowie, C. C. (2014). Associations between trends in race/ethnicity, aging, and body mass index with diabetes prevalence in the United States: A series of cross-sectional studies. *Annals of Internal Medicine*, 161(5), 328–335. doi:10.7326/M14-0286
- Mita, M., Ito, K., Taira, K., Nakagawa, J., Walsh, M. P., & Shoji, M. (2010). Attenuation of store-operated Ca²⁺ entry and enhanced expression of TRPC channels in caudal artery smooth muscle from Type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 37(7), 670–678. doi:10.1111/j.1440-1681.2010.05373.x
- Mizuno, M., Sada, T., Kato, M., & Koike, H. (2002). Renoprotective effects of blockade of angiotensin II AT1 receptors in an animal model of type 2 diabetes. *Hypertension Research : Official Journal of the Japanese Society of Hypertension*, 25(2), 271–8. doi:10.1291/hypres.25.271
- Mohrman, D. (2012). *Cardiovascular Physiology* (8th Editio.). Mc Graw Hill.
- Monaghan, K., McNaughten, J., McGahon, M. K., Kelly, C., Kyle, D., Yong, P. H., ... Curtis, T. M. (2015). Hyperglycemia and Diabetes Downregulate the Functional Expression of TRPV4 Channels in Retinal Microvascular Endothelium. *PLoS One*, 10(6), e0128359. doi:10.1371/journal.pone.0128359
- Mottola, M. F., & Artal, R. (2016). Fetal and maternal metabolic responses to exercise during pregnancy. *Early Human Development*, 1–9. doi:10.1016/j.earlhumdev.2016.01.008
- Nakano, T., Koujin, T., Suda, T., Hiraoka, Y., & Haraguchi, T. (2009). A locally-induced increase in intracellular Ca²⁺ propagates cell-to-cell in the presence of plasma membrane Ca²⁺ ATPase inhibitors in non-excitabile cells. *FEBS Letters*, 583(22), 3593–3599. doi:10.1016/j.febslet.2009.10.032

- Navedo, M. F., Takeda, Y., Nieves-cintrón, M., Molkentin, J. D., & Santana, L. F. (2010a). Elevated Ca²⁺ sparklet activity during acute hyperglycemia and diabetes in cerebral arterial smooth muscle cells. *October*, 211–220. doi:10.1152/ajpcell.00267.2009.
- Navedo, M. F., Takeda, Y., Nieves-cintrón, M., Molkentin, J. D., & Santana, L. F. (2010b). Elevated Ca²⁺ sparklet activity during acute hyperglycemia and diabetes in cerebral arterial smooth muscle cells. *Ajp*, 211–220. doi:10.1152/ajpcell.00267.2009.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio
- Nystoriak, M. A., Nieves-cintrón, M., Patriarchi, T., Buonarati, O. R., Prada, M. P., Morotti, S., ... Navedo, M. F. (2017). Ser 1928 phosphorylation by PKA stimulates the L-type Ca²⁺ channel Ca_v1.2 and vasoconstriction during acute hyperglycemia and diabetes.
- Oltman, C. L., Davidson, E. P., Coppey, L. J., Kleinschmidt, T. L., Lund, D. D., Adebara, E. T., & Yorek, M. a. (2008). Vascular and neural dysfunction in Zucker diabetic fatty rats: A difficult condition to reverse. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 10, 64–74. doi:10.1111/j.1463-1326.2007.00814.x
- Oltman, C., Richou, L., Davidson, E., Coppey, L., Lund, D., & Yorek, M. (2006). Progression of coronary and mesenteric vascular dysfunction in Zucker obese and Zucker diabetic fatty rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291(4), 1780–1787. doi:10.1152/ajpheart.01297.2005.
- Pande, J., Szewczyk, M. M., & Grover, A. K. (2011). Allosteric inhibitors of plasma membrane Ca²⁺ pumps: Invention and application of caloxins. *World Journal of Biological Chemistry*, 2(3), 39–47. doi:10.4331/wjbc.v2.i2.39
- Peterson, R. G., Shaw, W. N., Neel, M., Little, L. a, & Eichberg, J. (1990). Zucker Diabetic Fatty Rat as a Model for Non-insulin-dependent Diabetes Mellitus.

- Pinho, J. F., Medeiros, M. a a, Capettini, L. S. a, Rezende, B. a, Campos, P. P., Andrade, S. P., ... Lemos, V. S. (2010). Phosphatidylinositol 3-kinase- δ up-regulates L-type Ca^{2+} currents and increases vascular contractility in a mouse model of type 1 diabetes. *British Journal of Pharmacology*, 161(7), 1458–71. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00955.x
- Putney, J. W. (2017). Review orai Calcium Channels, (6), 332–342. doi:10.1152/physiol.00011.2017
- Rees, D. a, & Alcolado, J. C. (2005). Animal models of diabetes mellitus. *Diabetic Medicine : A Journal of the British Diabetic Association*, 22(4), 359–370. doi:10.1111/j.1464-5491.2005.01499.x
- Rhoades, R. A. (2013). *Medical physiology: principles for clinical medicine. Igarss 2014*.
- Ritman, E. L., & Lerman, A. (2007). The dynamic vasa vasorum. *Cardiovascular Research*, 75(4), 649–58. doi:10.1016/j.cardiores.2007.06.020
- Rueda Angelica, Fernandez-Velasco Maria, B. J. (2013). Abnormal Ca^{2+} Spark / STOC Coupling in Cerebral Artery Smooth Muscle Cells of Obese Type 2 Diabetic Mice, 8(1). doi:10.1371/journal.pone.0053321
- Savoia, C. P., Liu, Q.-H., Zheng, Y.-M., Yadav, V. R., Zhang, Z., Wu, L.-G., & Wang, Y.-X. (2014). Calcineurin upregulates local Ca^{2+} signaling through ryanodine receptor-1 in airway smooth muscle cells. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 1(518), 781–790. doi:10.1152/ajplung.00149.2014
- Searls, Y. M., Loganathan, R., Smirnova, I. V, & Stehno-Bittel, L. (2010). Intracellular Ca^{2+} regulating proteins in vascular smooth muscle cells are altered with type 1 diabetes due to the direct effects of hyperglycemia. *Cardiovascular Diabetology*, 9, 8. doi:10.1186/1475-2840-9-8
- Sheikh, A. Q., Hurley, J. R., Huang, W., Taghian, T., Kogan, A., Cho, H., ...

- Narmoneva, D. a. (2012). Diabetes alters intracellular calcium transients in cardiac endothelial cells. *PLoS One*, 7(5), e36840.
doi:10.1371/journal.pone.0036840
- Shiota, M., & Printz, R. L. (2012). Animal Models in Diabetes Research, 933.
doi:10.1007/978-1-62703-068-7
- Simard, E., Söllradl, T., Maltais, J.-S., Boucher, J., D'Orléans-Juste, P., & Grandbois, M. (2015). Receptor for Advanced Glycation End-Products Signaling Interferes with the Vascular Smooth Muscle Cell Contractile Phenotype and Function. *Plos One*, 10(8), e0128881.
doi:10.1371/journal.pone.0128881
- Siwy, J., Zoja, C., Klein, J., Benigni, A., Mullen, W., Mayer, B., ... Bahlmann, F. H. (2012). Evaluation of the Zucker Diabetic Fatty (ZDF) Rat as a Model for Human Disease Based on Urinary Peptidomic Profiles. *PLoS ONE*, 7(12), e51334. doi:10.1371/journal.pone.0051334
- Smani, T., Shapovalov, G., Skryma, R., Prevarskaya, N., & Rosado, J. a. (2015). Functional and physiopathological implications of TRP channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1853(8), 1772–1782.
doi:10.1016/j.bbamcr.2015.04.016
- Spinelli, A. M., & Trebak, M. (2015). ORAI Channel-Mediated Ca²⁺ Signals in Vascular and Airway Smooth Muscle. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 0850(717), ajpcell.00355.2015. doi:10.1152/ajpcell.00355.2015
- Sturek, M. (2010). Tuning in to the “right” calcium channel regulation in experimental models of diabetes. *British Journal of Pharmacology*, 161(7), 1455–1457. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00997.x
- Tao, Z., Shi, A., & Zhao, J. (2015). Epidemiological Perspectives of Diabetes. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 73(1), 181–185. doi:10.1007/s12013-015-0598-

- Tonar, Z., Kochova, P., Cimrman, R., Perktold, J., & Witter, K. (2015). Segmental differences in the orientation of smooth muscle cells in the tunica media of porcine aortae. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, *14*(2), 315–332. doi:10.1007/s10237-014-0605-5
- Touw, K., Chakraborty, S., Zhang, W., Obukhov, A. G., Tune, J. D., Gunst, S. J., & Herring, B. P. (2012). Altered calcium signaling in colonic smooth muscle of type 1 diabetic mice. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*, *302*(1), G66–G76. doi:10.1152/ajpgi.00183.2011
- Trebak, M. (2012). STIM/Orai signalling complexes in vascular smooth muscle. *The Journal of Physiology*, *590*(Pt 17), 4201–8. doi:10.1113/jphysiol.2012.233353
- Tsien, R. W., & Tsien, R. Y. (1990). Calcium channels, stores, and oscillations. *Annual Review of Cell Biology*, *6*(1), 715–760.
- Tykocki, N. R., Boerman, E. M., & Jackson, W. F. (2017). Smooth muscle ion channels and regulation of vascular tone in resistance arteries and arterioles. *Comprehensive Physiology*, *7*(2), 485–581. doi:10.1002/cphy.c160011
- Vallot, O., Combettes, L., & Lompre, A. (2001). Functional coupling between the caffeine/ryanodine-sensitive Ca²⁺ store and mitochondria in rat aortic smooth muscle cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, *81*, 363–371.
- van Breemen, C., Fameli, N., & Evans, M. (2013). Pan-junctional sarcoplasmic reticulum in vascular smooth muscle: nanospace Ca²⁺ transport for site- and function-specific Ca²⁺ signalling. *The Journal of Physiology*, *591*(Pt 8), 2043–2054. doi:10.1113/jphysiol.2012.246348
- Velmurugan, G. V., & White, C. (2012). Calcium homeostasis in vascular smooth muscle cells is altered in type 2 diabetes by Bcl-2 protein modulation of InsP₃ R calcium release channels. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *302*(1), H124–H134. doi:10.1152/ajpheart.00218.2011

- Wang, B., Chandrasekera, P. C., & Pippin, J. J. (2014). Leptin- and Leptin Receptor-Deficient Rodent Models: Relevance for Human Type 2 Diabetes. *Current Diabetes Reviews*, 131–145. doi:10.2174/1573399810666140508121012
- Wang, X., Dubois, D. C., Sukumaran, S., Ayyar, V., Jusko, W. J., & Almon, R. R. (2014). Variability in Zucker diabetic fatty rats: Differences in disease progression in hyperglycemic and normoglycemic animals. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 7, 531–541. doi:10.2147/DMSO.S69891
- Wu, M.-Y., Li, C.-J., Hou, M.-F., & Chu, P.-Y. (2017). New Insights into the Role of Inflammation in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), 2034. doi:10.3390/ijms18102034
- Wynne, B. M., Chiao, C.-W., & Webb, R. C. (2009). Vascular Smooth Muscle Cell Signaling Mechanisms for Contraction to Angiotensin II and Endothelin-1. *J Am Soc Hypertens*, 3(2), 84–95. doi:10.1016/j.jash.2008.09.002.Vascular
- Yamamura, A., Yamamura, H., Zeifman, A., & Yuan, J. X.-J. (2011). Activity of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels contributes to regulating receptor- and store-operated Ca entry in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Pulmonary Circulation*, 1(2), 269–79. doi:10.4103/2045-8932.83447
- Yang, S. L., Zhu, L. Y., Han, R., Sun, L. L., Li, J. X., & Dou, J. T. (2016). Pathophysiology of peripheral arterial disease in diabetes mellitus. *Journal of Diabetes*, 9, 133–140. doi:10.1111/1753-0407.12474
- Yokoi, N., Hoshino, M., Hidaka, S., Yoshida, E., Beppu, M., Hoshikawa, R., ... Seino, S. (2013). A Novel Rat Model of Type 2 Diabetes: The Zucker Fatty Diabetes Mellitus ZFDM Rat. *Journal of Diabetes Research*, 2013, 103731. doi:10.1155/2013/103731
- Zhang, J., Ren, C., Chen, L., Navedo, M. F., Antos, L. K., Kinsey, S. P., ... Lf, S. (2010). Knockout of Na⁺ / Ca²⁺ exchanger in smooth muscle attenuates

vasoconstriction and L-type Ca²⁺ channel current and lowers blood pressure. *Ajp*, 21201, 1472–1483. doi:10.1152/ajpheart.00964.2009.

Zhou, B., Lu, Y., Hajifathalian, K., Bentham, J., Di Cesare, M., Danaei, G., ...

Cisneros, J. Z. (2016). Worldwide trends in diabetes since 1980: A pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. *The Lancet*, 387(10027), 1513–1530. doi:10.1016/S0140-6736(16)00618-8

Zimmet, P., Alberti, K. G., Magliano, D. J., & Bennett, P. H. (2016). Diabetes mellitus statistics on prevalence and mortality: facts and fallacies. *Nature Reviews Endocrinology*, 12(10), 616–622. doi:10.1038/nrendo.2016.105

Zulian, A., Baryshnikov, S. G., Linde, C. I., Hamlyn, J. M., Ferrari, P., & Golovina, V. A. (2010). Upregulation of Na⁺ / Ca²⁺ exchanger and TRPC6 contributes to abnormal Ca²⁺ homeostasis in arterial smooth muscle cells from Milan hypertensive rats, 624–633. doi:10.1152/ajpheart.00356.2010.

Zulian, A., Linde, C. I., Pulina, M. V, Baryshnikov, S. G., Papparella, I., Hamlyn, J. M., & Golovina, V. a. (2013). Activation of c-SRC underlies the differential effects of ouabain and digoxin on Ca²⁺ signaling in arterial smooth muscle cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 304(4), C324–33. doi:10.1152/ajpcell.00337.2012