BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS E INVESTIGACIÓN

TESIS

"Efecto de la diabetes mellitus tipo 2 sobre la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en células de músculo liso vascular de rata Zucker Diabetic Fatty"

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS E INVESTIGACIÓN

Presenta:

Germán Alfredo García Moreno

Directores de Tesis:

D. C. Roberto Berra Romani

D. C. Mario García Carrasco

Puebla, Pue. Noviembre de 2018

NOMBRE Y FIRMA DE LOS DIRECTORES DE TESIS

D. C. ROBERTO BERRA ROMANI

D. C. MARIO GARCÍA CARRASCO

SELLO DE LA COORDINACIÓN DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS E INVESTIGACIÓN

NOMBRE Y FIRMA DEL COMITÉ TUTORAL

D. C. BLANCA GUADALUPE BAEZ DUARTE

D. C. IRMA DEL CARMEN ZAMORA GINEZ

D. C. CELSO EMRIQUE CORTÉS ROMERO

AGRADECIMIENTOS

A mis compadres, la Dra. Dulce María García Moreno y el Dr. Harold Pérez Cerdán, por su gran apoyo desde hace muchos años en mi formación académica y profesional.

A mi familia, que siempre ha estado para apoyarme, especialmente a mi Mamá.

A todo el cuerpo académico que conforma el profesorado de la Maestría en Ciencias Médicas e Investigación, por sus invaluables conocimientos impartidos hacia mi persona.

A mis tutores, porque sin sus enseñanzas este trabajo de tesis no hubiera sido concretado.

A todos mis amigos y compañeros que me apoyaron de una u otra forma en la consecución de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el invaluable apoyo con la beca número 773074, durante los dos años que duró el programa de becas de maestría perteneciente al Programa Nacional de Posgrados de Calidad de CONACYT.

DEDICATORIA

A mis sobrinos, que esta tesis sirva de aliciente para que se preparen y logren sus metas.

A mi familia que ya no está presente y que siempre me apoyó incondicionalmente, mi padre, mamá Chelito, mi hermana Pili y mis abuelitos finados, maternos y paternos.

RESUMEN

Antecedentes. La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es considerada como un problema de salud pública importante a nivel mundial de proporciones epidémicas con una prevalencia en México de 9.5 %. Las enfermedades cardiovasculares son las principales responsables de la corta longevidad de los pacientes diabéticos, quienes tienen incrementado el riesgo de mortalidad temprana por cerca de 60 %, y los efectos adversos de la diabetes son amplificados por la hipertensión y la obesidad. La disfunción vascular es uno de los principales marcadores de las complicaciones vasculares de la DM2, entre las que se encuentran: enfermedades coronarias y de arterias periféricas, infarto, retinopatías, nefropatías y neuropatías. Numerosos estudios, demuestran que la DM causa alteraciones en la contractilidad, migración y proliferación de las células de músculo liso vascular (CMLV). Las funciones de las CMLV antes mencionadas están estrechamente reguladas por la concentración de Ca^{2+} libre intracelular $[Ca^{2+}]_i$. A pesar de la relación entre las funciones de las CMLV y la $[Ca^{2+}]_i$ y entre disfunción de las CMLV y DM, a la fecha no se han estudiado con detalle los efectos de la DM2 sobre la homeostasis de Ca^{2+} intracelular en CMLV obtenidas de un modelo animal que emula las características de la DM2 en humano.

Objetivo. Evaluar el efecto de la DM2 sobre la homeostasis de Ca^{2+} intracelular en células de músculo liso de arteria mesentérica de rata de la cepa Zucker Diabetic Fatty.

Material y métodos. Se utilizaron ratas de la cepa Zucker Diabetic Fatty (ZDF) que en su variante obesa (OZDF) presenta las características típicas de la DM2 (obesidad central, hiperglucemia, hipertrigliceridemia, hipertensión y resistencia a la insulina) y la variante delgada (LZDF) como control. Las CMLV fueron obtenidas mediante disociación enzimática de arterias mesentéricas de ratas ZDF y por medio del colorante fluorescente selectivo para Ca^{2+} (Fura-2) y la utilización de microscopía de epifluorescencia se evaluaron los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ en CMLV en reposo y en respuesta a la estimulación con moléculas

vasoactivas (adenosin trifosfato (ATP) y cafeína). En adición, utilizando herramientas farmacológicas selectivas, estudiamos el efecto de la DM2 sobre cuatro mecanismos que participan en la regulación de la $[Ca^{2+}]_i$: 1.- La bomba de Ca^{2+} presente en la membrana del retículo sarcoplásmico (SERCA); 2.- La bomba de Ca^{2+} presente en la membrana plasmática (PMCA); 3.- El intercambiador Na^+/Ca^{2+} y 4.- Los canales de Ca^{2+} regulados por almacenes de Ca^{2+} intracelulares (SOC) en CMLV de arteria mesentérica de ratas ZDF.

Resultados. La DM causa alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, en CMLV de arteria mesentérica obtenidas de ratas de la cepa ZDF. En particular la DM2: 1.- Causa un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ basal en CMLV de arterias mesentéricas; 2.- Causa un incremento en la señal de Ca^{2+} activada por el agonista vasoactivo ATP; 3.- Causa una dramática reducción en la actividad de la bomba de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (SERCA); 4.- Reduce también la actividad del intercambiador Na^+/Ca^{2+} (NCX) y 5.- aumenta la actividad de la bomba de Ca^{2+} presente en la membrana plasmática (PMCA), en adición la DM; 6.- Reduce de forma significativa la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+}, SOC; 7.- Por otro lado la vía de liberación de Ca^{2+} a través de los receptores rianodínicos (RyR) no parece ser modificada por la DM2.

Conclusiones. La DM2 causa alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en células de músculo liso de arteria mesentérica, aumentado los niveles de Ca^{2+} basales y los inducidos por el agonista vasoactivo ATP, posiblemente a través de la disminución de la actividad de la SERCA y el NCX. En adición la DM2 reduce la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} operados por almacenes intracelulares o SOC. Estos hallazgos aportan nueva luz en los mecanismos por los cuales la DM2 causa alteraciones en CMLV y propone a los mecanismos que regulan la homeostasis del Ca^{2+} como un nuevo blanco terapéutico para la prevención de las complicaciones cardiovasculares en pacientes diabéticos.

Contenido

RESUMEN VI

Lista de Abreviaturas XI

Lista de Cuadros XIII

Lista de Figuras XIII

1 ANTECEDENTES 1

1.1 Antecedentes generales 1

1.1.1 Diabetes mellitus 1

1.1.2 El sistema cardiovascular 6

1.2 Antecedentes específicos 15

2 JUSTIFICACIÓN 18

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 19

4 HIPÓTESIS 20

5 OBJETIVO 20

5.1 Objetivo general 20

5.2 Objetivos específicos 20

6 MATERIAL Y MÉTODOS 21

6.1 Diseño del estudio 21

6.2 Ubicación espaciotemporal 21

6.3 Diseño y tipo de muestreo 22

6.4 Tamaño de la muestra 22

6.5 Estrategia de trabajo 23

6.6 Definición de las variables y escalas de medición 24

6.7 Método y técnicas experimentales 24

6.8 Análisis estadístico 30

7 RESULTADOS 31

7.1 Parámetros morfométricos y bioquímicos de las ratas ZDF 31

7.2 Efecto de la DM2 sobre los niveles de Ca^{2+} basal en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF 33

7.3 Efecto de la DM2 sobre la señal de Ca^{2+} generada por ATP en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF. 34

7.4 Efecto de la DM2 sobre la actividad de la bomba de Ca^{2+} ATPasa del retículo sarcoendoplásmico (SERCA) en la regulación de la señal de Ca^{2+} generada por ATP en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF 36

7.5 Efecto de la DM2 sobre la actividad de la bomba de Ca^{2+} ATPasa de la membrana plasmática (PMCA) en la regulación de la señal de Ca^{2+} generada por ATP en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF 39

7.6 Efecto de la DM2 sobre la actividad del intercambiador Na^{+}/Ca^{2+} (NCX) en la regulación de la señal de Ca^{2+} generada por ATP en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF 42

7.7 Efecto de la DM2 sobre la actividad de los canales operados por los almacenes intracelulares de calcio (SOC) en la regulación de la señal de Ca^{2+} generada por el alcaloide Cafeína en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF 44

7.8 Efecto de la DM2 sobre la señal de Ca^{2+} generada por el alcaloide Cafeína en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF 47

8 DISCUSIÓN 49

8.1 Caracterización del modelo animal de DM2. Parámetros morfométricos y bioquímicos de las ratas ZDF 49

8.2 Efecto de la DM2 sobre los niveles de Ca^{2+} basal en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF. 51

8.3 Efecto de la DM2 sobre la señal de Ca^{2+} generada por ATP en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF. 52

8.4 Efecto de la DM2 sobre la actividad de la bomba de Ca^{2+} ATPasa del retículo sarcoendoplásmico (SERCA) en la regulación de la señal de Ca^{2+} generada por ATP en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF 53

8.5 Efecto de la DM2 sobre la actividad de la bomba de Ca^{2+} ATPasa de la membrana plasmática (PMCA) en la regulación de la señal de Ca^{2+} generada por ATP en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF 53

8.6 Efecto de la DM2 sobre la actividad del intercambiador Na^{+}/Ca^{2+} (NCX) en la regulación de la señal de Ca^{2+} generada por ATP en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF 54

8.7 Efecto de la DM2 sobre la actividad de los canales operados por los almacenes intracelulares de calcio (SOC) en la regulación de la señal de Ca^{2+} generada por el alcaloide Cafeína en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF 55

8.8 Efecto de la DM2 sobre la señal de Ca^{2+} generada por el alcaloide Cafeína en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF..... 56

9 CONCLUSIONES 57

10 BIBLIOGRAFÍA..... 59

11 ANEXOS 65

11.1 LOGÍSTICA 65

11.1.1 Recursos humanos..... 65

11.1.2 Recursos materiales 65

11.1.3 Recursos financieros 65

11.2 BIOÉTICA 65

Lista de Abreviaturas

ACh	Acetilcolina
ADA	Asociación Americana de la Diabetes
ATP	Trifosfato de Adenosina
Ca^{2+}	Ión Calcio
$[Ca^{2+}]_i$	Concentración de Ca^{2+} Libre Intracelular
$CaCl_2$	Cloruro de Calcio
CMLV	Células de Músculo Liso Vascular
CPA	Ácido 2-(3-clorofenoxi) propiónico
DAG	Diacilglicerol
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
ECV	Enfermedades Cardiovasculares
ENSANUT	Encuesta Nacional sobre Salud y Nutrición
Fura-2 AM	Fluorocromo Fura-2 Acetometil Éster
HDL	Lipoproteínas de Alta Densidad
INSP	Instituto Nacional de Salud Pública
IP_3	Inositol Trifosfato
K^+	Ión Potasio
KCl	Cloruro de Potasio
KH_2PO_4	Fosfato Diácido de Potasio
LDL	Lipoproteínas de Baja Densidad
LZDF	Fenotipo Delgado de la Cepa Zucker Diabetic Fatty
$MgCl_2$	Cloruro de Magnesio
NA	Noradrenalina

Na^+	Ión Sodio
Na_2HPO_4	Fosfato Disódico
NaCl	Cloruro de Sodio
NCX	Intercambiador Sodio-Calcio
NIH	Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos,
OMS	Organización Mundial de la Salud
ON	Óxido Nítrico
OZDF	Fenotipo Obeso de la Cepa Zucker Diabetic Fatty
PiP2	Fosfatidil Inositol Difosfato
PLC	Fosfolipasa C
PSS1	Solución Salina Fisiológica Baja en Calcio
PSS2	Solución Salina Fisiológica con Calcio Normal
RS	Retículo Sarcoplásmico
SEA	SEA0400 (2-´4-´(2,5-difluorofenil) metoxi´fenoxi´-5-etoxianilina
SERCA	Bomba ATPasa del Retículo Sarcoendoplásmico
SOC	Canales Operados por Almacenes Intracelulares
SOCE	Entrada de Calcio Mediada por los Almacenes Intracelulares de Calcio
TRPC	Canales de Potencial de Receptor Transitorio
ZDF	Cepa de Ratas Zucker Diabetic Fatty

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Criterios metabólicos útiles para el diagnóstico de DM2. 3
Cuadro 2. Datos morfométricos de las ratas de la cepa ZDF en sus fenotipos delgado (LZDF) y obeso (OZDF)..... 32
Cuadro 3- Datos Bioquímicos obtenidos de ratas de la cepa ZDF en sus fenotipos delgado (LZDF) y obeso (OZDF)..... 32

Lista de Figuras

Figura 1. Características anatómicas de los vasos sanguíneos..... 8
Figura 2. Acople farmacomecánico. 11
Figura 3. Función del Ca^{2+} en la contracción del músculo liso. 12
Figura 4. Mecanismos moleculares que regulan la homeostasis de $[Ca^{2+}]_i$ en células de músculo liso vascular. 14
Figura 5. Estrategia de trabajo. 23
Figura 6. Evaluación de la $[Ca^{2+}]$i en CMLV de rata de la cepa ZDF. 28
Figura 7. Parámetros evaluados de los registros de la estimulación de CMLV en la señal de Ca^{2+} intracelular. 30
Figura 8. Fotografía de dos ratas de 3-4 meses de edad, correspondientes a las cepas OZDF (izquierda) y LZDF (derecha). 31
Figura 9. Efecto de la DM2 sobre los niveles de Ca^{2+} basal generada por ATP en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF. 33
Figura 10. Figura 9. Efecto de la DM2 sobre la señal de Ca^{2+} generada por ATP en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF 35
Figura 11. Efecto de la DM2 sobre la actividad de la bomba de Ca^{2+} ATPasa del retículo sarcoendoplásmico (SERCA) en la regulación de la señal de Ca2+ generada por ATP en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF. 38

Figura 12. Efecto de la DM2 sobre la actividad de la bomba de Ca^{2+} ATPasa de la membrana plasmática (PMCA) en la regulación de la señal de Ca^{2+} generada por ATP en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF. 41
Figura 13. Efecto de la DM2 sobre la actividad del intercambiador Na^{+}/Ca^{2+} (NCX) en la regulación de la señal de Ca^{2+} generada por ATP en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF. 43
Figura 14. Efecto de la DM2 sobre la actividad de los canales operados por los almacenes intracelulares de calcio (SOC) en la regulación de la señal de Ca^{2+} generada por el alcaloide Cafeína en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF..... 46
Figura 15. Efecto de la DM2 sobre la señal de Ca^{2+} evocada por el alcaloide cafeína en CMLV de arteria mesentérica de ratas de la cepa ZDF..... 48

1 ANTECEDENTES

1.1 Antecedentes generales

1.1.1 Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es un grupo de enfermedades caracterizadas por un desorden metabólico de etiología múltiple que manifiesta niveles elevados de glucosa en sangre (hiperglucemia), por un defecto de la acción y/o secreción de la insulina (1).

1.1.1.1 Clasificación

La Asociación Americana de la Diabetes (1) y la OMS, clasifican a la DM en 4 grupos:

1. DM tipo 1 (DM1), debida a la destrucción autoinmune de las células β del páncreas, que usualmente conlleva a una deficiencia absoluta de insulina.

2. DM tipo 2 (DM2), debida a una progresiva pérdida de la secreción de insulina por parte de las células β del páncreas, frecuentemente por resistencia de las células del organismo a la acción fisiológica de la insulina.

3. DM gestacional, la cual se diagnostica en el segundo o tercer trimestre del embarazo y en la que claramente no hubo evidencias previas de esta patología antes del embarazo.

4. Otros tipos específicos de diabetes debidos a otras causas, tales como: síndromes de diabetes monogénicos, patologías del páncreas exócrino y diabetes inducida por exposición a drogas y químicos.

La DM2 es el tipo de DM más común en el humano, representando el 95% de los casos de diabetes reportados y la obesidad constituye el mayor factor de riesgo para desarrollar esta enfermedad (2). En adición en la DM2, generalmente

se encuentran elevados los niveles sanguíneos de triglicéridos y colesterol, mientras que los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) disminuyen (3).

1.1.1.2 Prevalencia e incidencia

En el año 1980 la Organización Mundial de la Salud (OMS) informó que había 108 millones de adultos con diabetes. En el año 2014 la cifra fue de 422 millones de adultos. Comparando ambas cifras, la prevalencia mundial normalizada por edades de la diabetes casi se ha duplicado desde ese año, pues ha pasado del 4,7 % al 8,5 % en la población adulta (4).

México ocupa el sexto lugar mundial de personas con DM. En la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (ENSANUT, 2012), el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) informó que había 6.9 millones de mexicanos diagnosticados con diabetes. ENSANUT de medio camino 2016 reporta que la población adulta que tiene diagnóstico previo fue de 9.2 % en el año 2012 y 9.4 % en el año 2016, de los cuales 85 % (2012) y 87.8 % (2016) recibieron tratamiento, el 49.8 % (2012) está en riesgo muy alto de presentar complicaciones, además el 47 % tiene diagnóstico de hipertensión arterial (5,6). El número de personas con DM se ha duplicado en el periodo del año 2000 al año 2012. En México la incidencia de la DM aumenta con la edad, sobre todo en la población de 60 a 64 años, que presenta la más alta incidencia en el año 2011, reportando 1,788 nuevos casos por cada 100 mil habitantes de este grupo de edad (7). Las complicaciones en pacientes con diagnóstico previo fueron: visión disminuida 54.5 %, daño en retina 11.19 %, pérdida de la vista 9.9 %, úlceras 9.14 % y amputaciones 5.5 %, casi tres veces más a lo reportado en el año 2012. Los adultos de 50 a 79 años de edad fueron el grupo mayormente diagnosticado con hipercolesterolemia, el 44.5 % de los adultos se midieron los niveles de colesterol en sangre y el 28.0 % tuvo un diagnóstico médico previo de hipercolesterolemia (6).

1.1.1.3 Diagnóstico

En la publicación anual Estándares de Atención Médica (1) de la Asociación Americana de Diabetes del año 2018, se mencionan los criterios metabólicos útiles para el diagnóstico de la DM2. El diagnóstico debe tener en cuenta al menos una de las cuatro pruebas bioquímicas positivas:

Cuadro 1. Criterios metabólicos útiles para el diagnóstico de DM2.

Criterio Bioquímico	Resultado
Glucosa plasmática con mínimo 8 horas de ayuno	≥ 126 mg/dl
Fracción HbA1c hemoglobina glucosilada	≥ 6.5 %
Glucosa plasmática aleatoria en cualquier momento del día	≥ 200 mg/dl
Prueba oral de tolerancia a la glucosa	≥ 200 mg/dl

1.1.1.4 Modelos animales para el estudio de la DM

En la actualidad se cuenta con diferentes modelos animales para el estudio de la DM, tenemos el modelo quirúrgico, al cual se le practica una pancreatectomía, induciendo de esta manera la falta de producción de insulina; el modelo inducido con fármacos, se administra un fármaco, por ejemplo estreptozotocina, que induce el daño en el páncreas provocando la insuficiencia en la secreción de insulina (8); y el modelo por desarrollo genético, en el que se seleccionan y crían animales por expresión de ciertos caracteres específicos (9).

En la DM1, la menos común en el humano, se emplean los modelos quirúrgico e inducido químicamente. Entre los modelos de DM2 se encuentran los modelos por selección genética, son altamente endogámicos, homogéneos y sobre todo monogénicos. Por ejemplo, el modelo de ratón *(db/db*), presenta una mutación en el receptor de la leptina produciendo hiperfagia, desarrolla rápidamente hiperglucemia ya que sus células β pancreáticas son incapaces de mantener los altos niveles de secreción de insulina requeridos. Desarrollan obesidad con una

dieta normal, pero si hay restricciones en la ingesta energética, hay una disminución en la obesidad e hiperglucemia (10), además de que no hay una homogeneidad entre los individuos en cuanto al desarrollo de peso y talla (11).

La rata espontáneamente diabética Goto-Kakizaki (GK), que es un modelo genético magro de la DM2, se origina de la reproducción selectiva durante muchas generaciones de ratas Wistar no diabéticas intolerantes a la glucosa, sin embargo, la rata GK no se vuelve obesa sin intervención dietética (12), razón por la cual no lo podemos considerar un modelo confiable para DM2.

1.1.1.4.1 Ratas Zucker Diabetic Fatty

La rata Zucker Diabetic Fatty (ZFD), es un modelo animal de crianza que a través de mutaciones genéticas y una dieta de Purina 5008 (dieta rica en grasa que contiene alta energía, de Labdiet, Richmond, USA) se aproxima a la DM2 en humanos junto con sus complicaciones. Estas ratas presentan una mutación en el gen que codifica para el receptor a leptina, causando un acortamiento del receptor, de manera que la leptina no puede interactuar con su receptor. Las características de la cepa son: obesidad, hiperglucemia, resistencia a la insulina, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, neuropatía, nefropatía e hipertensión arterial (9,13). Todas estas características convierten a la rata ZDF en un modelo animal que representa de forma eficiente la fisiopatología de la DM2 y sus complicaciones. La rata ZDF presenta dos fenotipos, delgado-no diabético (+/+), denominado en la presente tesis como LZDF (lean Zucker Diabetic Fatty) y obeso-diabético (*fa/fa*) denominado OZDF (obese Zucker Diabetic Fatty).

La cepa ZDF ha demostrado ser en la que se observan las características más cercanas a la DM2 como se presentan en humanos, incluyendo obesidad y daños cardiovasculares, que otros modelos no presentan.

1.1.1.5 Alteraciones cardiovasculares causadas por la diabetes mellitus

Numerosas investigaciones epidemiológicas y clínicas han demostrado evidencias contundentes sobre la asociación entre DM2 y la mortalidad y morbilidad cardiovascular, representando aproximadamente el 68 % de las muertes entre personas con DM2 (14). En el año 1948, el Servicio de Salud Pública de Estados Unidos inició el estudio del corazón de Framingham (Framingham Heart Study), con la finalidad de determinar la epidemiología y los factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares (ECV) (15). Como resultado de este estudio se concluyó que los pacientes diabéticos tienen un aumento de 2 a 3 veces en la probabilidad de padecer ECV.

Las ECV se clasifican en microvasculares, como la neuropatía, la retinopatía y la nefropatía; y en macrovasculares, como el infarto al miocardio y el accidente cerebrovascular. En pacientes diabéticos, las ECV más frecuentes son la cardiopatía coronaria, la enfermedad cerebrovascular y la enfermedad vascular periférica (15). Si bien, estas enfermedades macrovasculares producen aproximadamente el 80% de las muertes en pacientes con DM, las enfermedades microvasculares deterioran de forma importante la calidad de vida de las personas con esta patología, lo que eleva los costos en el tratamiento de estos pacientes. Las complicaciones generadas por la DM en las enfermedades microvasculares son el producto de la gravedad con la que se ha tenido la constante hiperglucemia (16) y ambos tipos de ECV (macro y microvasculares) se acentúan con la edad (17). En adición, existen diversos factores de riesgo asociados a la ECV, ente los que se encuentran: hipertensión, dislipidemia (caracterizada por una disminución de las HDL, aumento en los triglicéridos y presencia elevada de lipoproteínas de baja densidad (LDL), obesidad, inactividad física, inflamación subclínica.

Uno de los principales marcadores de las ECV causadas por la DM es la disfunción vascular. En particular está bien establecido que la hiperglucemia da como resultado una hiperreactividad vascular en pacientes y modelos animales diabéticos (18). Parte de este efecto puede ser atribuido a la disminución de la

biodisponibilidad del óxido nítrico (ON) (19), así como una reducción en la respuesta vascular de las células del músculo liso al ON (20).

Diversos grupos de investigación han aportado evidencias suficientes que apoyan la hipótesis de que la DM altera la función vascular no únicamente a nivel endotelial, sino que también a nivel de las células del músculo liso vascular (CMLV) (21).

1.1.2 El sistema cardiovascular

La principal función del sistema cardiovascular es el transporte de gases, el oxígeno desde los pulmones hacia el resto del cuerpo y el dióxido de carbono desde los tejidos del cuerpo hacia los pulmones, también transporta los nutrientes para el crecimiento y la reparación desde los lugares de absorción y almacenamiento, y los productos de desecho desde cualquier tejido hasta los sitios de excreción o reciclaje (22). Colabora con la rápida señalización celular por medio del transporte de hormonas y neurotransmisores, tiene funciones importantes en la mediación de la respuesta inflamatoria y del sistema inmune, así como también en el desarrollo embrionario y la disipación y termorregulación del calor corporal. El sistema cardiovascular está integrado por el corazón que impulsa la sangre, la sangre y los vasos sanguíneos que la conducen (23).

1.1.2.1 Estructura de los vasos sanguíneos

Los vasos sanguíneos están constituidos por tres capas o túnicas: la túnica íntima, túnica media y túnica adventicia. En la Figura 1 se muestra un esquema de la estructura de los vasos sanguíneos.

- **La túnica íntima** está formada por las células endoteliales, que constituyen una monocapa celular que reviste todos los segmentos vasculares y

descansa en la lámina basal, ésta última rodeada por tejido conectivo subendotelial (23).

- **La túnica adventicia** es una capa donde se localiza la *vasa vasorum*, que es un grupo de vasos sanguíneos de tamaño variable que se encuentran en todos los vasos sanguíneos de gran calibre y cuya función principal es el aporte de oxígeno y nutrientes a las capas celulares que no los reciben de la luz del vaso (24). Otro de los componentes importantes de la adventicia es la inervación del sistema nervioso autónomo, que contribuye en la regulación de la contractilidad vascular liberando diversos neurotransmisores como noradrenalina (NA), acetilcolina (ACh), ON o adenosin trifosfato (ATP) al espacio extracelular cercano a las CMLV por medio de unas estructuras llamadas varicosidades (23). La inervación de las pequeñas arterias y arteriolas permite que la estimulación simpática aumente la resistencia al flujo sanguíneo y, por tanto, disminuya la velocidad del flujo sanguíneo a través de los tejidos. La inervación de los vasos grandes, en particular de las venas, hace posible que la estimulación simpática disminuya el volumen de estos vasos, lo que empuja la sangre hacia el corazón y, por tanto, desempeña un papel muy importante en la regulación de la función de bomba cardíaca. (25).

- **La túnica media** está constituida por la lámina elástica interna y externa, ambas conformadas por fibras elásticas de elastina cubierta de microfibrillas y fibras de colágeno, que participan en el control de la tensión de los vasos sanguíneos. Las células del músculo liso vascular (CMLV) constituyen las células más importantes en la túnica media y se encuentran presentes en todos los segmentos vasculares, excepto en los capilares y cuya función primordial es la de generar la tensión necesaria para contraer a los vasos sanguíneos (23).

Cabe resaltar que los diferentes tipos de vasos sanguíneos cuentan con algunas modificaciones en sus componentes, por ejemplo, en la aorta la capa de células de músculo liso es más grande, en cambio en vasos de menor calibre pueden estar constituidos incluso por una sola capa de estas células (25).

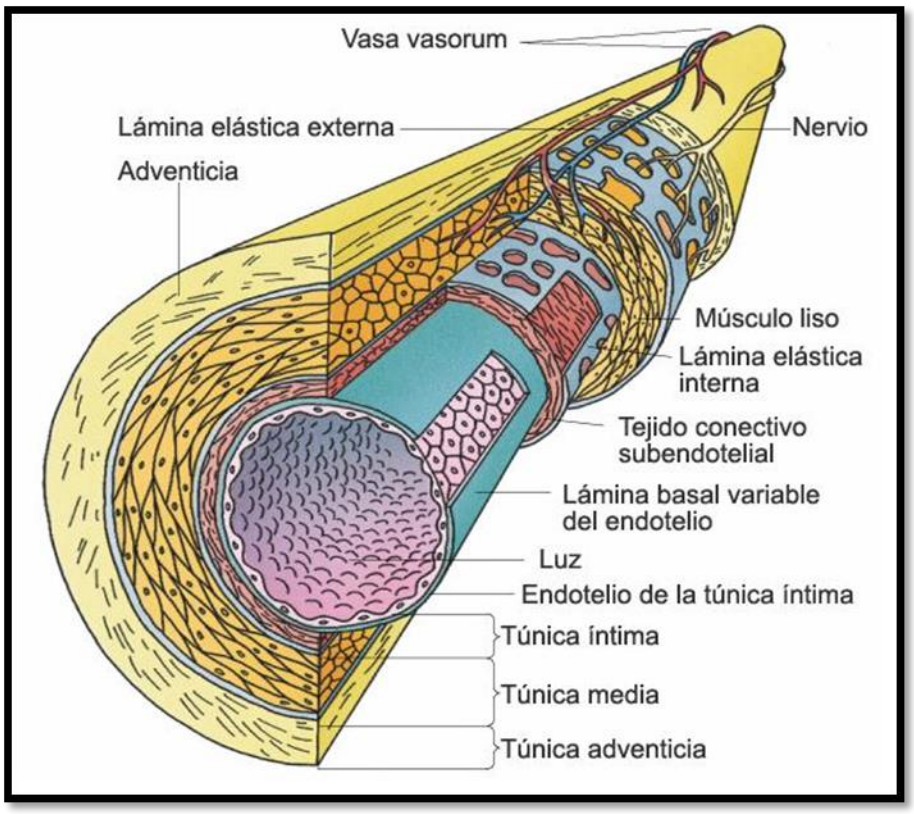

Figura 1. Características anatómicas de los vasos sanguíneos. Se muestran las tres capas de tejidos a las que se les denomina como túnicas que componen la anatomía de los vasos sanguíneos, la túnica íntima constituida principalmente por el endotelio vascular, la media por las células de músculo liso vascular y la túnica adventicia por la vasa-vasorum y las terminales nerviosas del sistema nervioso autónomo. (Tomado de http://morfocitologia.blogspot.com/2008/07/microscopia-virtual-vasos_25.html).

1.1.2.2 Función de las células de músculo liso vascular

Las CMLV son células alargadas y estrechas (fusiformes), de apariencia no estriada (por la disposición oblicua de sus filamentos contráctiles) y con un solo núcleo por célula. Al igual que las células de músculo esquelético y estriado, las CMLV están compuestas por filamentos proteicos de actina (delgados) y miosina (gruesos). Los filamentos delgados se encuentran orientados de forma paralela u oblicua a lo largo de la célula, y suelen formar agrupaciones denominadas cuerpos densos, en zonas especializadas (23,26).

La función principal de las CMLV es la de regular la resistencia total periférica, el tono arterial y venoso mediante su contracción o relajación, modificando así el

diámetro de los vasos sanguíneos y por ende, el flujo sanguíneo y la presión arterial asegurando una adecuada perfusión de todos y cada uno de los órganos del cuerpo según sus demandas metabólicas (26).

La activación de la contracción de las CMLV se puede dar por dos tipos de estímulos, por estímulos físicos (acople electro-mecánico) o por sustancias químicas (acople farmaco-mecánico) (27).

1.1.2.2.1 Acople electro-mecánico en células de músculo liso vascular

El tono o contracción miogénica, es una contracción parcial de las arterias provocada por la presión que ejerce la sangre sobre las paredes de los vasos sanguíneos. Fenómeno conocido como acople electro-mecánico (28) cuya función es la de mantener un flujo sanguíneo continuo en todos los capilares de los tejidos del cuerpo a pesar de variaciones en la presión arterial (25).

En el acople electro-mecánico, la activación de la contracción de las CMLV se da por la apertura de canales catiónicos activada por el estiramiento de la membrana de las CMLV. Los canales que participan en este acople son miembros de la familia de canales de potencial receptor transitorio (TRP), los cuales son canales no selectivos permeables a Na^+ y Ca^{2+}. En adición se ha reportado también la participación de canales de K^+ sensibles al estiramiento, que se cierran y por consecuencia inducen una ligera despolarización del potencial de membrana, incrementando la apertura de canales de Ca^{2+} voltaje dependiente tipo-L, dando como resultado una elevación de la concentración de Ca^{2+} libre intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), iniciando de esta manera la vasoconstricción. Esta constricción vascular sostenida, activada por la presión, es necesaria para mantener un flujo sanguíneo relativamente constante incluso cuando la presión arterial varía (28). La regulación miógena es una propiedad intrínseca de las CMLV (22).

1.1.2.2.2 Acople fármaco-mecánico en células de músculo liso vascular

El Acople farmaco-mecánico, se da en respuesta a diversas sustancias como neurotransmisores, hormonas, sustancias derivadas del endotelio y metabolitos locales, los cuales, al unirse a su receptor específico inducen un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$, que tiene como resultado la contracción del músculo liso vascular, y por ende la vasoconstricción. Este es, principalmente, el mecanismo encargado de regular la resistencia periférica y consecuentemente, la presión arterial en los diferentes órganos y tejidos, según las demandas metabólicas de éstos (29).

En la Figura 2, se muestra un esquema del acople farmaco-mecánico activado por ATP, molécula que es co-liberada de las varicosidades nerviosas junto con NA. El ATP activa dos tipos de receptores purinérgicos presentes en la membrana de las CMLV: los receptores P2X y los receptores P2Y. Los receptores P2X (P2XR), son receptores ionotrópicos, es decir, son receptores acoplados a la apertura de un canal iónico permeable a Ca^{2+} también conocidos como canales operados por receptor (ROC). La activación de los receptores P2X causan una rápida entrada de Ca^{2+} del medio extracelular hacia el citoplasma y por lo tanto un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en las CMLV (28).

Por otra parte, los receptores purinérgicos P2Y (P2YR) son de tipo metabotrópicos, su activación conlleva a la activación de una vía de señalización intracelular mediada por receptores acoplados a proteína G (GPCR). En particular en CMLV la unión de ATP a los receptores P2Y causa un cambio conformacional en el receptor que conlleva a la activación de la proteína Gαq presente en la membrana plasmática de estas células. La proteína Gαq activa a su vez a la fosfolipasa C (PLC), proteína membranal que hidroliza al lípido de membrana fosfatidilinositol difosfato (PiP_2) en diacilglicerol (DAG) e inositol-trifosfato (IP_3). El IP_3, es una molécula hidrosoluble, que difunde hasta la membrana del retículo sarcoplásmico (RS), donde se acopla a su receptor específico denominado IP3R. El IP3R es un receptor-canal permeable a Ca^{2+}. La activación de este receptor-canal da como resultado la salida de Ca^{2+} del RS hacia el citoplasma con el consecuente

incremento de la $[Ca^{2+}]_i$. En adición a los IP3R, en la membrana del RS de las CMLV también se encuentran los receptores rianodínicos (RyR), su nombre deriva de la capacidad que tiene el alcaloide rianodina para activarlos. Fisiológicamente estos receptores son activados por un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$, por un proceso conocido como liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR) (23). Un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$, por ejemplo, por la apertura de canales IP3R, causa la apertura de los RyR con la consecuente liberación adicional de Ca^{2+} del RS. Cabe señalar que los RyR son activados farmacológicamente por concentraciones altas (10 mM) del alcaloide cafeína (30).

En diversos vasos sanguíneos, el Ca^{2+} que es liberado del RS por los mecanismos antes mencionados, es insuficiente para activar la contracción de las CMLV y parte del Ca^{2+} necesario proviene del medio extracelular (23). La $[Ca^{2+}]_i$ puede aumentar debido al ingreso de Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de tipo-L (Cav) (31), canales operados por receptor (ROC) como son los P2X y canales operados por los almacenes de Ca^{2+} intracelular, también conocidos como “store-operated-channels” (SOCs) y/o TRPC (32). En adición el intercambiador Na^+/Ca^{2+} (NCX), trabajando en el modo reverso puede generar un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en el MLV (33).

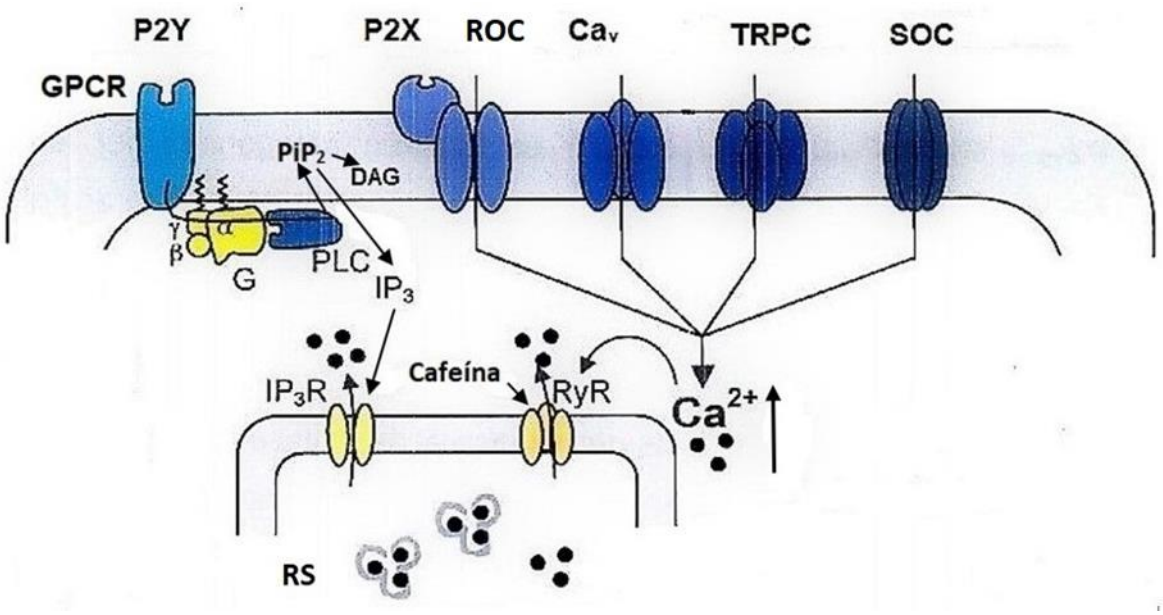

Figura 2. Acople farmacomecánico.

Para el presente estudio se evaluó el acople excitación contracción de la señal evocada por ATP en el acople farmacomecánico. Los receptores purinérgicos para ATP se encuentran en la membrana celular, está el receptor P2X ionotrópico, que, al acoplarse el ATP a su receptor, activa el canal y permite el paso de iones Ca^{2+} incrementando la $[Ca^{2+}]_i$. El receptor purinérgico P2Y metabotrópico, es un receptor acoplado a una proteína G (GPCR), que activa una foslipasa C (PLC) que hidroliza al lípido de membrana, fosfatidilinositol difosfato (PiP2) en diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3), que se une a su receptor en el retículo sarcoplásmico (RS) y abre canales para la liberación de Ca^{2+}. El otro canal del RS es el canal sensible a Rianodina, el cual se activa empleando como agonista al alcaloide cafeína, que se une al receptor de canal rianodínico (RyR) liberando Ca^{2+} al citosol celular. El incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) inicia la contracción muscular (Modificado de Del Valle-Rodríguez, 2005).

1.1.2.2.3 Importancia del Ca^{2+} intracelular en el músculo liso vascular

El ión Ca^{2+} tiene particular importancia en la generación de la contracción del músculo liso vascular, de su concentración dependen los procesos de contracción y relajación, el procedimiento se inicia con la unión de cuatro iones Ca^{2+} a una proteína citoplasmática llamada calmodulina (CaM) (ver Figura 3). Una vez formado el complejo Ca-CaM, este se une a una cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) y la activa, la activación permite que la MLCK fosforile ambas cadenas reguladoras de la miosina. Cuando las cadenas reguladoras de la miosina están fosforiladas, la miosina incrementa su afinidad por los filamentos de actina, formándose así los puentes cruzados entre filamentos de actina y miosina que dan inicio a la contracción de las CMLV (23).

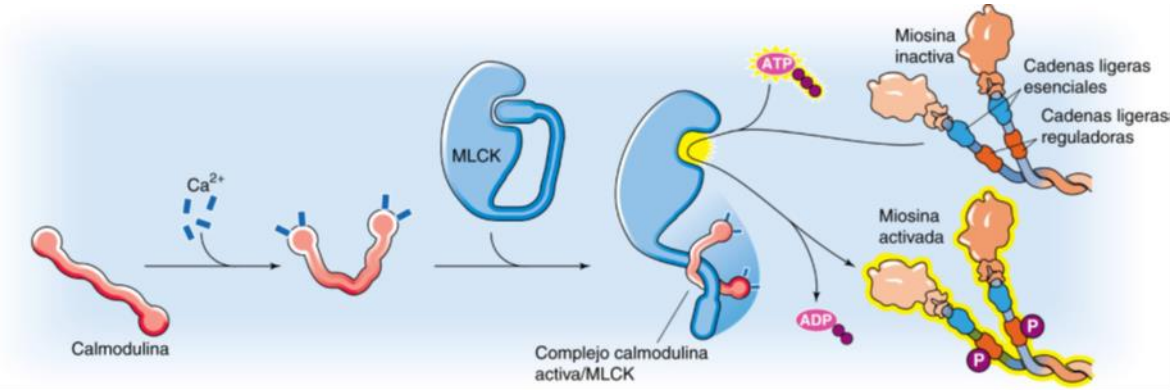

Figura 3. Función del Ca^{2+} en la contracción del músculo liso.

Importancia del ión Ca^{2+} en el proceso de la contracción muscular, la proteína citoplasmática Calmodulina (CaM) capta 4 moléculas ionizadas de Ca^{2+} y se forma el complejo Ca^{2+}-CaM, este complejo activa a la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK), que a su vez fosforila ambas cadenas reguladoras de la miosina. Cuando las cadenas reguladoras de la miosina están fosforiladas, la miosina incrementa su afinidad por los filamentos de actina, formándose así los puentes cruzados entre filamentos de actina y miosina que dan inicio a la contracción (Tomado de Walter F. Boron, 2017).

Para finalizar la contracción es necesario la $[Ca^{2+}]_i$ disminuya como consecuencia de la actividad de dos Ca^{2+}-ATPasas, una localizada en la superficie del retículo sarcoplásmico (SERCA) y otra en la membrana celular (PMCA). La SERCA bombea Ca^{2+} desde el citoplasma hacia el lumen del RS y la PMCA desde el citoplasma hacia el medio extracelular (ver Figura 4). En adición, la actividad del intercambiador sodio-calcio (NCX) actuando en su modo directo promueve la salida de Ca^{2+} del citoplasma hacia el medio extracelular en intercambio por Na^+(34).

La reducción de la $[Ca^{2+}]_i$, disminuye la activación de la cadena ligera de la miosina cinasa y una fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP no esquematizado) desfosforila las cadenas reguladoras de la miosina dando como resultado la relajación de las CMLV (23).

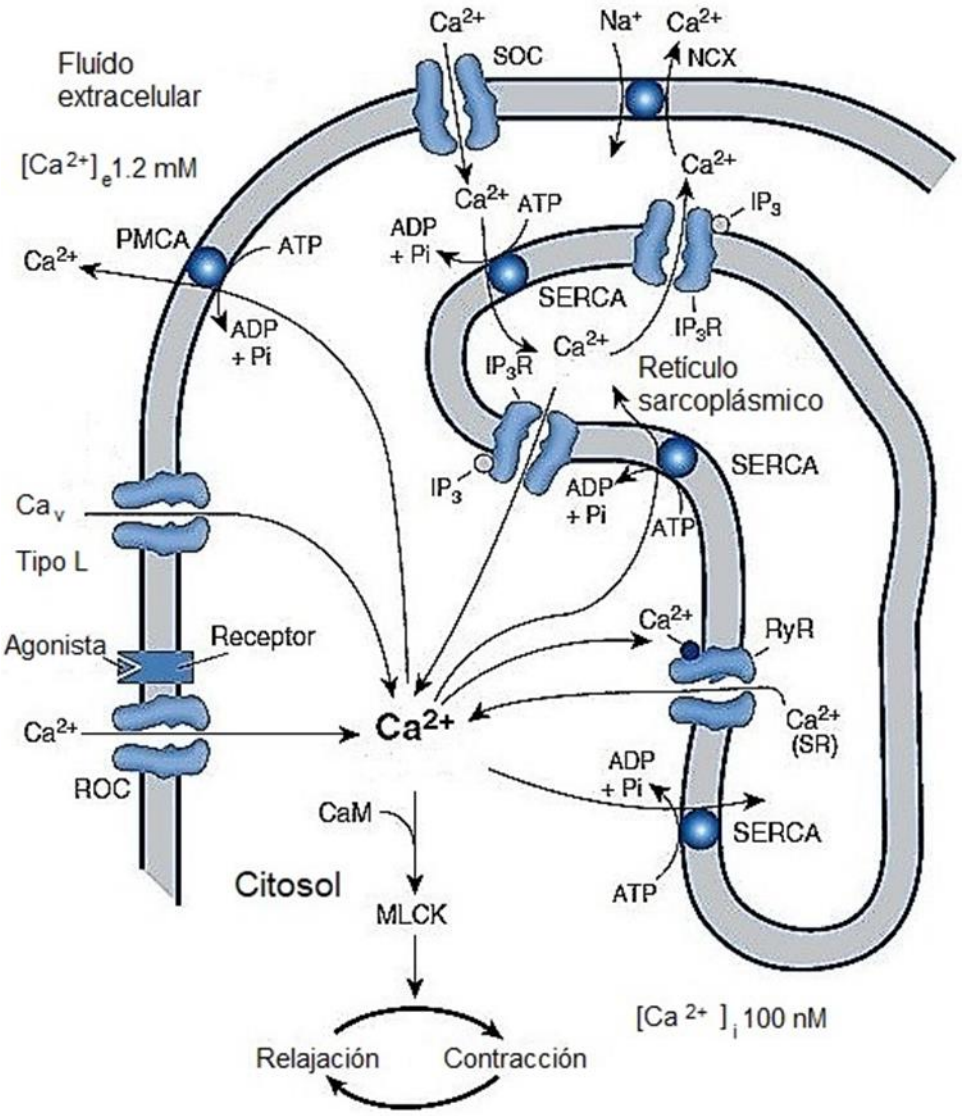

Figura 4. Mecanismos moleculares que regulan la homeostasis de $[Ca^{2+}]_i$ en células de músculo liso vascular.

Intercambiador Na^+/Ca^{2+} (NCX), canal operado por almacenes intracelulares de Ca^{2+} (SOC), bomba ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA), canal de Ca^{2+} voltaje dependiente tipo L (Cav), canal operado por receptor (ROC), cadena ligera de la miosina cinasa (MLCK), bomba ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (SERCA), adenosin trifosfato (ATP), inositol trifosfato (IP3), adenosin difosfato (ADP), fósforo inorgánico (Pi), receptor a IP3 (IP3R), receptor a rianodina (RyR), retículo sarcoplásmico (RS), complejo Ca^{2+}/calmodulina (CaM), cadena ligera de la miosina cinasa (MLCK) (Modificado de Blaustein et al., 2012).

1.2 Antecedentes específicos

A partir de los resultados obtenidos en el estudio del corazón de Framingham (Framingham Heart Study) quedó claramente comprobada la asociación entre DM2 y la mortalidad y morbilidad cardiovascular. En este estudio se concluyó que los pacientes diabéticos tienen un aumento de 2 a 3 veces en la probabilidad de padecer ECV en comparación con personas no diabéticas (35).

La disfunción vascular constituye el principal marcador de las ECV y una de las causas que contribuyen al desarrollo de complicaciones importantes y en su mayoría letales en pacientes diabéticos, tales como hipertensión arterial, infarto al miocardio, enfermedad coronaria y nefropatía. La disfunción vascular asociada con la DM es compleja y multifactorial e incluye alteraciones dramáticas en la función no solo en las células endoteliales que forman parte de los vasos sanguíneos, sino también, en las CMLV.

La disfunción de las células endoteliales asociada con la DM ha sido ampliamente estudiada y ahora sabemos que el endotelio de pacientes diabéticos es afectado por la hiperglucemia, incremento en los ácidos grasos libres y por la resistencia a la insulina. Los factores antes mencionados, causan alteraciones en la función endotelial a través de diferentes vías, entre ellas: reducción en la producción de óxido nítrico asociado con un aumento del estrés oxidativo, apoptosis y estrés del retículo endoplásmico (36–38). En adición Sheikh y Cols., en el año 2012 (39), reportaron que la DM1 causa alteraciones en la $[Ca^{2+}]_i$ debido a una reducción en la actividad de la SERCA y el NCX, esto último podría participar en inducir estrés en el retículo endoplásmico (36)

Diversos grupos de investigación han aportado numerosas evidencias que demuestran que la DM causa alteraciones en la función, no solo de las células endoteliales sino también a nivel de las CMLV. Se ha demostrado que la CMLV provenientes de pacientes diabéticos presentan un incremento en la proliferación,

adhesión y apoptosis, asociados con un incremento del proceso ateromatoso y restenosis (40).

A pesar de la importancia del Ca^{2+} intracelular en las funciones de las CMLV como son la contractilidad, proliferación, migración y apoptosis, pocos estudios han abordado las posibles alteraciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en CMLV causada por la diabetes. Cabe señalar que la mayor parte de los estudios que abordan las alteraciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en CMLV causada por la diabetes, fueron realizados en las siguientes condiciones:

1.- Condiciones de diabetes artificiales, exponiendo a las CMLV a concentraciones elevadas de glucosa (41).

2.- En CMLV obtenidas de modelos animales con DM1, la menos común en el humano (42,43).

3.- En CMLV en cultivo, que fueron expuestas a condiciones artificiales de cultivo (44).

En estos estudios se reportaron las siguientes alteraciones en el manejo de la $[Ca^{2+}]_i$ en CMLV:

Un incremento en la entrada de Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} tipo-L, en células de MLV disociadas en fresco de aorta de un modelo de ratón de DM1 (42).

Por otro lado, existe información contradictoria sobre las alteraciones que causa la DM sobre los SOCs, mientras Curtis y Cols., en el año 2003 demuestran en células de MLV disociadas en fresco de microvasos de retina de un modelo de rata de DM1, una disminución de la entrada de Ca^{2+} vía almacenes intracelulares (SOCE)(43), Evans y Cols., en el año 2009, reportan un incremento en la entrada de Ca^{2+} por esta vía en células en cultivo de MLV de aorta de un modelo de rata con DM2 (44).

Tam y cols., en el año 1997, demostraron que hay un incremento en las oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en células disociadas en fresco de MLV de arteria caudal de rata con DM1 (45).

Fleischhacker y cols., en 1999 describen que hay un incremento en la señal de Ca^{2+} perinuclear evocada por altas concentraciones de cloruro de potasio (KCl) y noradrenalina (NA) en células disociadas en fresco de MLV de arterias uterinas de humanos (46).

Hill y cols., en el año 2003, reportan que existe un aumento en la capacidad de la bomba de Ca^{2+} del retículo sarcoendoplásmico (SERCA) para secuestrar Ca^{2+} en células disociadas en fresco de MLV de arteria coronaria de un modelo de cerdo de DM1 (47).

2 JUSTIFICACIÓN

De acuerdo con la ADA, actualmente en el mundo hay aproximadamente 347 millones de personas diagnosticadas con DM. En México se encuentra entre las primeras causas de muerte, 6.4 millones de personas diagnosticadas y 9.2 % de la población con diagnóstico previo. El 80% de las muertes están asociadas a la DM2 y se deben a causas cardiovasculares.

A pesar de los numerosos estudios clínicos y epidemiológicos que correlacionan los elevados niveles de glucosa en sangre y el desarrollo y progresión de las ECV, en la actualidad se desconocen los mecanismos moleculares precisos por los cuales la DM causa estas alteraciones.

Diversos estudios han demostrado que la DM altera la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en células del MLV, sin embargo la mayor parte de dichos estudios fueron realizado en modelos animales con DM1, la cual representa sólo el 5% de los pacientes enfermos de DM; y en células de músculo liso en cultivo, las cuales son sometidas a tratamientos enzimáticos severos y condiciones artificiales para su subsistencia, lo cual genera cambios en la expresión de las diversas proteínas implicadas en el mantenimiento de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular (48).

Por este motivo es necesario continuar investigando las alteraciones causadas por la DM en MLV disociado que no sea sometido a condiciones de cultivo y obtenido de animales con DM2, la más común en el humano.

Por estas razones, el presente proyecto será realizado en células de MLV de arteria mesentérica disociadas en fresco, obtenidas de un modelo animal que presenta las características típicas de la DM2, las ratas de la cepa ZDF.

La comprensión de los mecanismos involucrados en las alteraciones causadas por la DM sobre la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en las células de MLV, podría aportar información útil para el estudio de esta enfermedad.

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La DM es una de las enfermedades crónicas con mayor presencia en la población adulta y es un problema de salud mundial. Cada año es evidente el aumento en el número de pacientes con DM.

La DM incrementa las complicaciones de las ECV, como por ejemplo la disfunción vascular, incluyendo alteraciones en el MLV. Aunque se han estudiado extensamente los efectos de la DM, a la fecha se desconocen los mecanismos moleculares precisos por los cuales la DM altera la función del MLV. Dada la relación que existe entre la función del músculo liso vascular y la concentración de Ca^{2+} intracelular; y la relación entre diabetes y disfunción de la contractilidad vascular, consideramos que hay pocos estudios que determinen las posibles alteraciones provocadas por la DM sobre la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en el músculo liso vascular.

Además, se han hecho pocos estudios en CMLV disociadas en fresco de modelos experimentales con DM2. En adición, de dichos estudios en su mayoría se han hecho en arterias diferentes a la arteria mesentérica, que dada una de sus funciones esenciales, que es la del control de la presión arterial, nos podría proporcionar información oportuna sobre alteraciones en su función derivadas por la DM.

El empleo de la cepa ZDF nos permite el estudio de las características particulares de la DM2 que se observa mayormente en humanos, aproximadamente 95 % de la población diagnosticada con DM.

Por lo que nos realizamos la siguiente pregunta:

¿Cuáles son los efectos de la DM sobre la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en células de músculo liso de arteria mesentérica de ratas de la cepa ZDF?

4 HIPÓTESIS

La DM causa alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en células de músculo liso vascular de arteria mesentérica de ratas de la cepa ZDF.

5 OBJETIVO

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la DM2 sobre la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en células de músculo liso de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF.

5.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de la DM2 sobre la señal de Ca^{2+} generada por ATP en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF.

2. Evaluar el efecto de la DM2 sobre la actividad de la bomba de Ca^{2+} ATPasa del retículo sarcoendoplásmico (SERCA) en la regulación de la señal de Ca^{2+} generada por ATP en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF.

3. Evaluar el efecto de la DM2 sobre la actividad de la bomba de Ca^{2+} ATPasa de la membrana plasmática (PMCA) en la regulación de la señal de Ca^{2+} generada por ATP en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF.

4. Evaluar el efecto de la DM2 sobre la actividad del intercambiador Na^{+}/Ca^{2+} (NCX) en la regulación de la señal de Ca^{2+} generada por ATP en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF.

5. Evaluar el efecto de la DM2 sobre la actividad de los canales operados por los almacenes intracelulares de calcio (SOC) en la regulación de la señal de Ca^{2+} generada por el alcaloide Cafeína en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF.

6. Evaluar el efecto de la DM2 sobre la señal de Ca^{2+} generada por el alcaloide Cafeína en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF.

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Diseño del estudio

El diseño del estudio es comparativo, de maniobra, experimental, transversal, prolectivo y homodémico.

6.2 Ubicación espaciotemporal

El estudio se llevó a cabo en la Facultad de Medicina, en el Laboratorio de Fisiología Cardiovascular perteneciente a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP); en el periodo comprendido entre agosto de 2016 y julio de 2018.

6.3 Diseño y tipo de muestreo

No probabilístico

6.4 Tamaño de la muestra

Con una “n” de al menos 6 ratas para cada cepa y por cada tipo de tratamiento.

6.5 Estrategia de trabajo

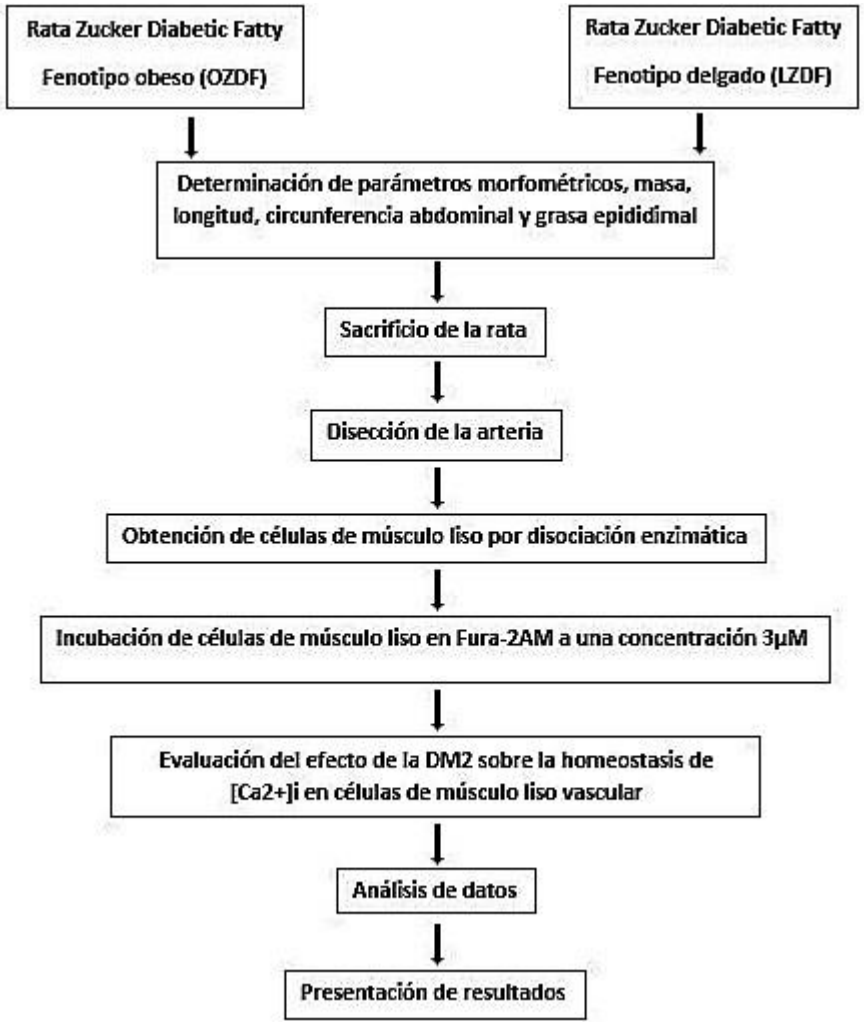

Figura 5. Estrategia de trabajo.

6.6 Definición de las variables y escalas de medición

Variable independiente: DM2.

Variables dependientes:

1. Señal de Ca^{2+} generada por ATP.
2. Actividad de la bomba de Ca^{2+} ATPasa del retículo sarcoplásmico (SERCA) generada por ATP.
3. Actividad de la bomba de Ca^{2+} ATPasa de la membrana plasmática (PMCA) generada por ATP.
4. Actividad del intercambiador Na^{+}/Ca^{2+} (NCX) generada por ATP.
5. Actividad de los canales operados por los almacenes intracelulares de calcio (SOC) generada por el alcaloide Cafeína.
6. Señal de Ca^{2+} generada por Cafeína.

Definición de las variables y escalas de medición ver Anexo 1.

6.7 Método y técnicas experimentales

Para el desarrollo del presente proyecto se utilizaron ratas machos, de 3 a 4 meses de edad, de la cepa ZDF en sus dos fenotipos LZDF con un peso entre 250 y 300 gramos, y OZDF con un peso entre 450 y 500 gramos. Las ratas fueron proporcionadas por el Bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, donde fueron mantenidas bajo condiciones de temperatura y humedad constante, expuestas a ciclos de luz - oscuridad de 12 hrs, con agua y alimento ad libitum.

Cinco días previo al experimento, las ratas fueron sometidas a una prueba de tolerancia a la glucosa, con el fin de constatar que estamos trabajando con ratas ZDF que presentan niveles elevados de glucosa como los presentes en la DM2 en

humanos. Los animales fueron sometidos a un ayuno de 6 h en jaulas metabólicas y con agua ad líbitum. Posteriormente se les administró por vía intraperitoneal (NOM-062-ZOO-1999, 9.4.2.1.3.) una dosis de glucosa, a una concentración de 2 g de glucosa por kilogramo de peso del animal. A las dos horas posteriores a la administración de glucosa, se procedió a obtener una gota de sangre por punción de la vena caudal sin anestesia, la cual fue procesada con el sistema de tiras reactivas de Accucheck® (ROCHE).

A continuación, se detalla la técnica con la finalidad de obtener las muestras de sangre para el análisis bioquímico. Los animales de experimentación, con ayuno de al menos 6 hrs, fueron anestesiados con ketamina-xilacina vía intraperitoneal, 0.2ml por cada 100gr de peso; posteriormente se les practicó una toracotomía anterior para exponer el cayado aórtico y el corazón. A través de la vena cava inferior se obtuvo una muestra de sangre (5ml) con jeringas de 5ml, para la realización de las pruebas metabólicas. La sangre fue transferida a tubos vacutainer sin anticoagulante de 5ml y se permitió la formación de coagulo durante 10 minutos.

Una vez coagulada la sangre, ésta se centrifugó a 10,000 revoluciones por minuto (r.p.m.), durante 15 minutos a 25°C. Posteriormente se extrajo el suero del paquete globular con una micropipeta y fue colocado en tubos Eppendorf de 1ml, los cuales fueron almacenados a 4°C para ser llevados a un laboratorio de análisis clínicos, en donde se realizaron las pruebas de Glucosa, Colesterol total, Triglicéridos, HDL, LDL y VLDL.

El día del experimento y previo a la disección, se procedió a determinar:

1) Masa, utilizando una balanza granataria.

2) Longitud, midiendo la distancia desde la punta de la nariz hasta la inserción de la cola.

3) Circunferencia abdominal, utilizando una cinta métrica convencional posicionándola alrededor de la parte media del abdomen.

Este procedimiento de medición de parámetros biométricos es para corroborar que fenotípicamente estamos empleando ratas ZDF en sus variantes OZDF y LZDF.

Las ratas fueron anestesiadas con ketamina-xilacina vía intraperitoneal (NOM-062-ZOO-1999, 8.1., 9.1., 9.4.2.1.3., anexo 11.2. Bioética), 0.2 ml por cada 100 g de peso; posteriormente se colocaron en una tabla de disección y se les practicó una toracotomía anterior para exponer el cayado aórtico y el corazón. Se retiró el tejido cardiaco y pulmonar haciendo un corte a la altura del cayado aórtico, la aorta fue rápidamente canulada y perfundida con una solución salina fisiológica fría a 4° C, denominada PSS1 (physiological salt solution, PSS1 baja en calcio), cuya composición expresada en mmol/L fue la siguiente: NaCl (140), KCl (5.36), Na_2HPO_4 (0.34), KH_2PO_4 (0.44), HEPES (10), $MgCl_2$ (1.2), glucosa (10) y $CaCl_2$ (0.05), ajustado a un valor de pH de 7.2 con NaOH (49).

El procedimiento para la obtención de células de músculo liso de la arteria mesentérica ha sido descrito por Berra-Romani y Cols., 2005 (50) y se detalla a continuación: se disectó la arteria mesentérica y se colocó en una caja Petri que contenía PSS1 a temperatura ambiente. Utilizando un estereomicroscopio (Nikon SMZ-2T) se procedió a remover el tejido conectivo y graso que circundan a la arteria mesentérica principal y a las arterias colaterales. Posteriormente se realizó un corte longitudinal a través de la arteria mesentérica principal utilizando tijeras para micro-disección, finalmente se removió el endotelio frotando ligeramente la punta de un hisopo contra la pared interna de la arteria. La arteria mesentérica se cortó en trozos de aproximadamente 1 mm y se transfirió a un tubo eppendorf que contenía una solución de enzimas disueltas en PSS1 conteniendo (en mg/ml): albúmina (2), colagenasa tipo XI (2), elastasa tipo IV (0.16) y se incubó en baño maría por 35 minutos a 37°C.

Después de la disociación enzimática, el tejido se lavó tres veces y se centrifugó con la solución PSS1 sin enzimas. El pellet obtenido del tejido digerido fue reconstituido en 500 µl de PSS1, se disoció mecánicamente con una pipeta Pasteur con la punta pulida para obtener una suspensión de células aisladas. Se

colocaron de 4-5 gotas de la suspensión de células dispersadas en un cubreobjetos por 40 min en refrigeración a 4°C, para permitir que las células se adhirieran al vidrio. Las células se mantuvieron en refrigeración a 4ºC, y fueron usadas dentro de 3-4 horas de aislamiento para la medición de la $[Ca^{2+}]_i$ por medio de la técnica fluorimétrica.

Medición de la $[Ca^{2+}]_i$. Para la medición de la $[Ca^{2+}]_i$, las células de músculo liso vascular fueron incubadas en 1 ml de solución PSS1 conteniendo 3 µl del fluorocromo Fura-2 acetometil éster (Fura-2 AM) por 35 minutos. Las células fueron visualizadas a través de un microscopio a epifluorescencia Axiolab Carl Zeiss, Germany, acoplado a una lámpara de mercurio (OSRAM HBO 50) como fuente de luz. Un obturador controlado por computadora bloqueó el paso de la luz cuando se proceda con las mediciones de la fluorescencia y finalmente, un filtro neutro limitó la intensidad de luz. Una rueda gira filtros (Lambda 10, Sutter Instrument, Novato, CA, USA) comandada por una computadora posicionó alternativamente a lo largo del camino óptico los dos filtros que permitió el paso de la luz respectivamente a 340 y 380 nm (ver Figura 6).

La radiación luminosa incidió con un espejo dicróico, permitiendo la separación de la luz de excitación de la de emisión, reflejando la luz a 340 y 380 nm hacia un objetivo de inmersión en agua (Zeiss 40X W Plan –APOCHROMAT) cuya distancia de trabajo es de 2.05mm y una apertura numérica de 1.0. El objetivo concentró la luz sobre la preparación. La preparación de las células en la caja de Petri, emitió luz a varias longitudes de onda, que atravesaron el objetivo y chocaron contra el mismo espejo dicroico, el cual permitió el paso de longitudes de onda superiores a 410 nm las cuales son seleccionadas por un filtro verde a 510 nm. La luz fue dirigida al ocular para finalmente ser captada por una cámara de alta sensibilidad (Extended-ISIS, Photonic Science, Millham, UK) acoplada a éste. La cámara se conectó a una tarjeta de adquisición (CYBEROPTICS PXC200AL, Aegis Electronic Group, USA) instalada en la computadora. Se usó un software personalizado para manejar la cámara de alta sensibilidad, medir y graficar en línea la fluorescencia en las células de músculo liso. Las imágenes obtenidas por la

cámara se almacenaron en la computadora para su posterior análisis, evaluando las variaciones de la intensidad de fluorescencia emitida por cada una de las células delimitadas en regiones de interés o ROI´s (por sus siglas en inglés). Las variaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ fueron monitoreadas evaluando para cada célula la relación de la señal de fluorescencia emitida a 510 nm, cuando las células fueron excitadas a 340 y 380 nm, respectivamente. Un aumento en la relación (Ratio) 340/380 nm corresponde a un aumento en el $[Ca^{2+}]_i$. Se realizaron medidas de la relación 340/380 nm cada 0.7 s para los primeros cuatro objetivos específicos y para la evaluación de los SOC cada 3 segundos, a temperatura ambiente (20°C).

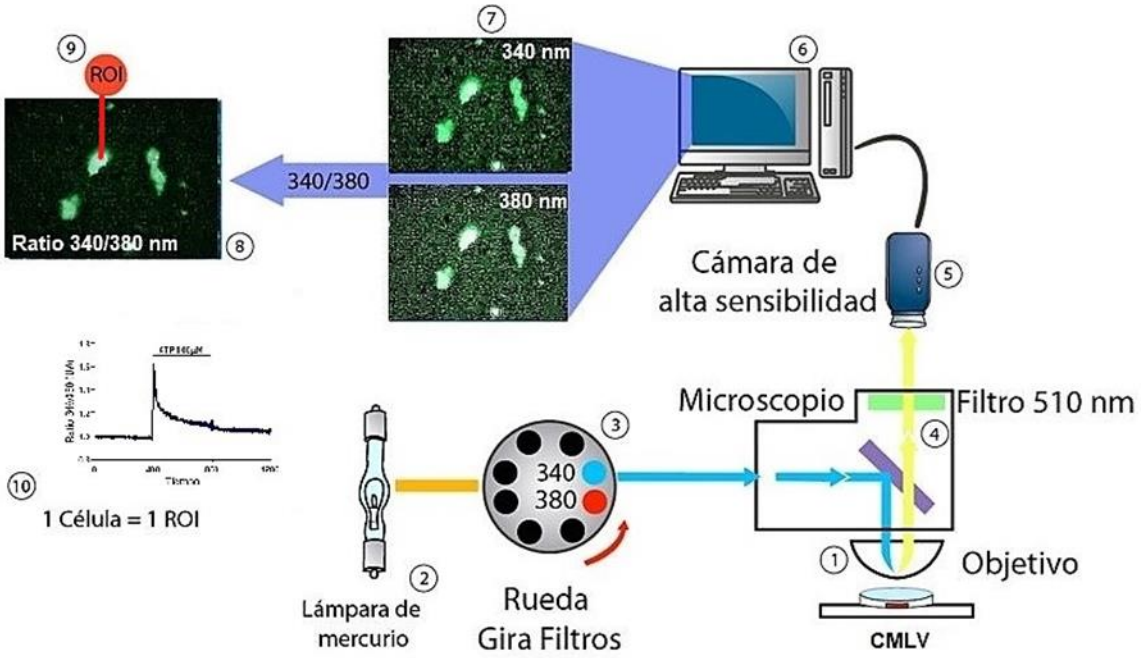

Figura 6. Evaluación de la $[Ca^{2+}]i$ en CMLV de rata de la cepa ZDF.

Las células de musculo liso vascular (CMLV) se colocan en la caja de Petri con solución PSS2 (1) bajo el objetivo de inmersión en agua para fluorescencia. (2) La lámpara de mercurio emite un haz de luz que atraviesa los filtros 340 nm y 380 nm alternadamente, los cuales se encuentran acoplados a una rueda gira-filtros (shutter) (3) comandada por una computadora. La luz filtrada refracta sobre un espejo dicroico que dirige la luz hacia la muestra (4). La luz emitida por las células atraviesa el espejo dicroico (4) hasta llegar al filtro de emisión (510nm) donde nuevamente se filtra la luz para enviarla a la cámara de alta sensibilidad (5). La cámara toma una imagen para cada filtro de excitación cada tres segundos para la evaluación de los SOC y 0.7 segundos para todas las demás evaluaciones (7). Las imágenes obtenidas se almacenan en una computadora para su posterior análisis (6). Utilizando el software Image J (NIH) se procede a realizar las gráficas por cada célula de la relación 340/380 de las imágenes tomadas, conocido como Ratio 340/380 (8). Las células se delimitan en regiones de interés (ROIs por sus siglas en inglés) para realizar la cuantificación de la fluorescencia en cada ROI a lo largo del tiempo de experimento (9). Transiente de la señal de Ca^{2+} obtenido por la estimulación con el agonista ATP a una concentración de 100µM, cada ROI representa una célula (10) (Modificado de Tesis: “Efecto de la Diabetes Mellitus tipo II sobre la señal de Ca^{2+} Intracelular en células endoteliales in situ de aorta de rata.”).

En la figura 7 se aprecian los parámetros que se midieron de los registros de la señal de Ca^{2+} intracelular de células de músculo liso vascular (CMLV) evocadas por la aplicación del agonista ATP a una concentración de 100 µM, sin inhibidores y en los diferentes protocolos aplicando inhibidores de los diferentes mecanismos reguladores de la homeostasis de Ca^{2+}.

Basal: Niveles de fluorescencia iniciales, previos a la estimulación del agonista.

Amplitud del pico: Diferencia entre la señal basal de fluorescencia y el punto más alto de fluorescencia obtenido al estimular a las CMLV con el agonista ATP.

Área bajo la curva: (por sus siglas en inglés area under curve, A.U.C). Es el área que se encuentra por debajo del transiente de Ca^{2+} que comprende el tiempo del efecto del agonista desde su aplicación y hasta que es removido del experimento teniendo como referencia inferior el valor de la señal basal antes de la aplicación del agonista.

Tiempos de decaída de la respuesta a la estimulación del agonista: Tiempo que tarda, la amplitud del pico de la señal de Ca^{2+} en reducirse en un 90, 60 y 30 %, tomando como 100 % el momento en el que se genera el pico inicial de la señal de Ca^{2+} evocada por la aplicación del agonista ATP.

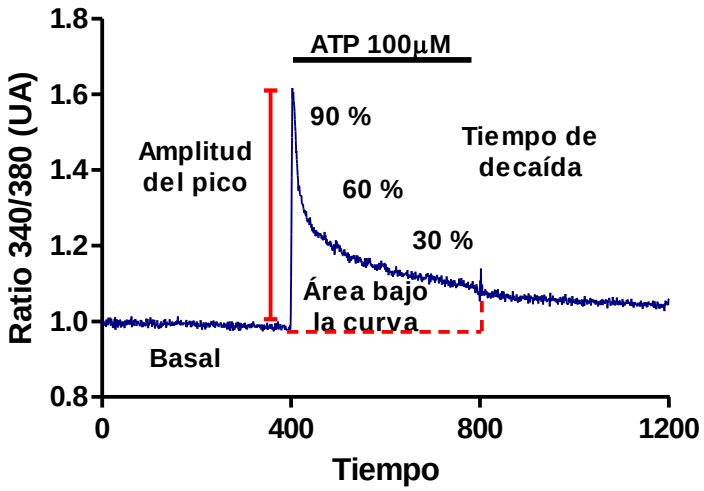

Figura 7. Parámetros evaluados de los registros de la estimulación de CMLV en la señal de Ca^{2+} intracelular.

Se esquematizan los parámetros evaluados para cada registro de la señal de Ca^{2+} evocada por el agonista ATP en cada uno de los objetivos realizados en el proceso experimental. Nivel inicial de fluorescencia de la señal de Ca^{2+}, Basal, previo a la estimulación del agonista. Amplitud del pico, diferencia entre la señal basal y el punto más alto de la fluorescencia obtenido después de la estimulación con el agonista ATP. El área bajo la curva es la zona comprendida por debajo del transiente de Ca^{2+} evocado por el agonista, inicia en el momento de la generación del pico y termina cuando se remueve él agonista. Tiempo de decaída, tiempo en que tarda en disminuir la señal de Ca^{2+} al 90, 60 y 30 % considerando el momento en que se genera la amplitud del pico como el 100 %.

6.8 Análisis estadístico

La obtención de los valores de fluorescencia se realizó con el programa Imag-J (Software libre del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos, NIH por sus siglas en inglés), las gráficas que se obtuvieron de la concentración de calcio y el análisis de los resultados se realizaron con los programas Microcal Origin 8.0 y GraphPad Prism 6.0 respectivamente. Al tratarse de dos grupos de ratas, el análisis estadístico se realizó utilizando la prueba estadística t-student para los datos paramétricos y la prueba estadística Mann Whitney para los datos no paramétricos, todas las pruebas con un valor alfa de 0.05. Se realizaron pruebas estadísticas de normalidad a todos los datos, utilizando la prueba de normalidad Kolmogorov Smirnov cuando los datos superaban los 50 elementos y la prueba Saphiro Wilk para los datos cuyos elementos eran menores a 50 datos. Los resultados obtenidos se muestran como promedio ± error estándar.

7 RESULTADOS

7.1 Parámetros morfométricos y bioquímicos de las ratas ZDF

En la Figura 8 se muestra una fotografía de dos ratas de 3-4 meses de edad correspondientes al grupo OZDF (izquierda) y LZDF (derecha), en las cuales se puede observar a simple vista, las diferencias morfométricas de estos dos grupos experimentales.

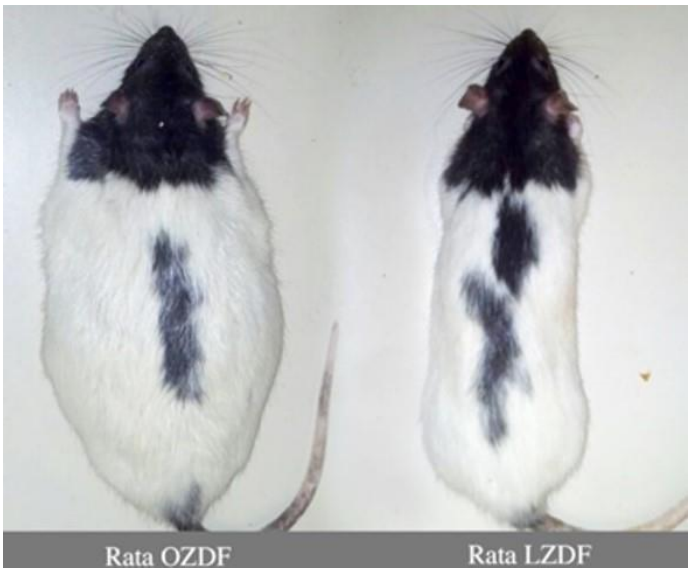

Figura 8. Fotografía de dos ratas de 3-4 meses de edad, correspondientes a las cepas OZDF (izquierda) y LZDF (derecha).

Las ratas OZDF presentan claras diferencias morfométricas en comparación a su control sano (LZDF).

En la Cuadro 2 se muestra la media ± el error estándar (EE) de los parámetros morfométricos y bioquímicos obtenidos para ambos grupos de estudio. Como lo demuestra el análisis estadístico, las ratas OZDF presentaron un aumento significativo del: 66% en la masa corporal, 5% de la longitud nariz-cola, 41.7% en la circunferencia abdominal, 667% en la grasa epididimal y 49% en el valor del índice de masa corporal. Estos datos comprueban que el fenotipo del grupo de ratas OZDF desarrolla obesidad, el cual es un factor de riesgo para desarrollar DM.

Cuadro 2. Datos morfométricos de las ratas de la cepa ZDF en sus fenotipos delgado (LZDF) y obeso (OZDF).

PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS	***LZDF***	***OZDF***
Masa	294.5 ± 2.74	487.5 ± 2.91 *
Longitud	20.99 ± 0.04	22.07 ± 0.12 *
Circunferencia abdominal	13.24 ± 0.09	18.76 ± 0.21 *
Grasa epididimal	1.79 ± 0.12	11.94 ± 0.35 *
Índice de masa corporal	0.67 ± 0.01	1.0 ± 0.01 *

Parámetros morfométricos de las ratas de la cepa ZDF en sus fenotipos delgado (LZDF) y obeso (OZDF), e*l asterisco (*) representa las diferencias significativas observadas al comparar entre grupos LZDF y OZDF.*, se presentan como media ± el error estándar al aplicar la prueba Mann Whitney para masa, longitud, y circunferencia abdominal; para grasa epididimal se utilizó t-Student, todo con un valor de significancia mínimo de 0.05 (valor de p). Para el análisis morfométrico se utilizaron 34 ratas para el fenotipo LZDF y 36 ratas para el fenotipo OZDF.

En el Cuadro 3, se muestra la media ± el error estándar (EE) de los parámetros bioquímicos obtenidos para ambos grupos de estudio. Las ratas OZDF presentaron un incremento significativo respecto a LZDF de un 60 % en los niveles de glucosa basal, 108 % en los niveles de glucosa en sangre 2 hrs posteriores a la administración de 2 gr/kg de peso de glucosa por vía intraperitoneal, 47 % en colesterol, 200 % en VLDL y 343 % en triglicéridos. No se hallaron diferencias significativas en los niveles de HDL. Los datos aquí presentados confirman la condición diabética de las ratas OZDF, además de la presencia de dislipidemia.

Cuadro 3- Datos Bioquímicos obtenidos de ratas de la cepa ZDF en sus fenotipos delgado (LZDF) y obeso (OZDF).

PARÁMETROS BIOQUÍMICOS	*FENOTIPO*	
	LZDF	**OZDF**
Glucosa Basal (mg/dl)	254.8 ± 25.48	407.6 ± 35.94 *
Glucosa 2hr (mg/dl)	123.4 ± 23.07	256.9 ± 31.11*
Colesterol (mg/dl)	90.83 ± 12.22	133 ± 11.82 *
HDL (mg/dl)	61.6 ± 3.02	72.06 ± 8.22
LDL (mg/dl)	26.48 ± 12.09	35.64 ± 13.26
VLDL (mg/dl)	11.53 ± 3.62	34.53 ± 3.95 *
Triglicéridos (mg/dl)	42 ± 10.35	186.1 ± 23.04 *

Los resultados corresponden a la media ± error estándar. Los datos fueron comparados mediante la prueba t-Student con un valor de significancia mínimo de 0.05 (valor de p). El asterisco (*) representa las diferencias significativas observadas al comparar entre grupos LZDF y OZDF. Para el análisis bioquímico se utilizaron al menos 5 ratas de cada grupo.

7.2 Efecto de la DM2 sobre los niveles de Ca^{2+} basal en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF

En la Figura 9**,** se muestra la media ± EE de los niveles de Ca^{2+} basales (en células no estimuladas) obtenidos de CMLV de arteria mesentérica de rata LZDF (barra azul) y OZDF (barra roja). Los resultados demuestran que la DM2 causa un incremento significativo de los niveles basales de Ca^{2+} intracelular en CMLV de rata OZDF (1.4 ± 0.05, n= 100 células provenientes de 7 ratas) comparados con los obtenidos de ratas control LZDF (1.07 ± 0.03, n = 98 células provenientes de 7 ratas), p≤ 0.005.

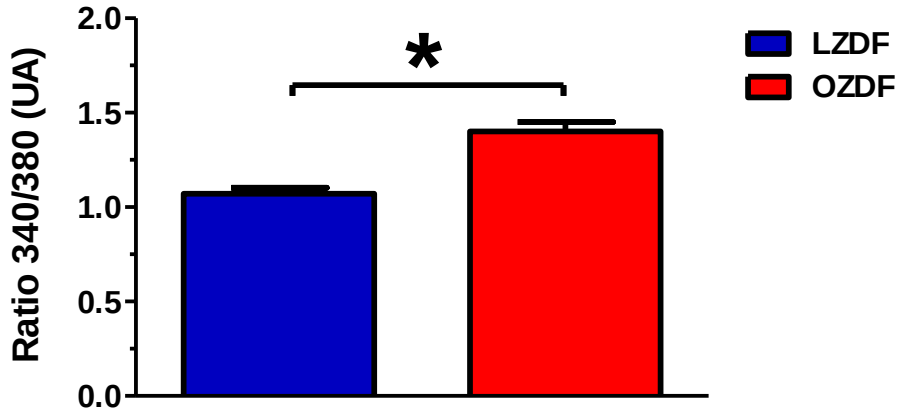

Figura 9. Efecto de la DM2 sobre los niveles de Ca^{2+} basal generada por ATP en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF.

La comparación estadística entre grupos se realizó empleando la prueba estadística Mann Whitney (n=7 por grupo experimental, * = p≤0.05). La barra azul corresponde al valor obtenido de CMLV de ratas LZDF y la barra roja los obtenidos de ratas OZDF.

7.3 Efecto de la DM2 sobre la señal de Ca^{2+} generada por ATP en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF.

En la Figura 10A, se muestra el registro medio de la señal de Ca^{2+} generada por la aplicación de 100µM del agonista ATP en CMLV obtenidas de arteria mesentérica de rata LZDF (línea azul) y OZDF (línea roja). Como se puede observar, en ambos grupos de ratas, la aplicación de ATP causa un incremento transitorio de la señal de Ca^{2+} en CMLV que consiste en un rápido aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inmediatamente después de la aplicación del agonista (pico), seguido por una decaída lenta de la $[Ca^{2+}]_i$ hacia los niveles de Ca^{2+} basales (previos a la estimulación con ATP). Sin embargo, la señal de Ca^{2+} evocada por ATP en CMLV de ratas OZDF, tuvo un incremento significativo en la amplitud del pico (LZDF: 0.59 ± 0.05 vs OZDF: 1.34 ± 0.11) (Figura 10B, izquierda) y área bajo la curva (LZDF: 45.08 ± 5.15 vs OZDF: 99.56 ± 11.11) (Figura 10B, derecha). No se encontraron diferencia significativa entre los dos grupos de rata, en cuanto a la duración del transiente al 90% (LZDF: 0.48± 0.06 vs OZDF: 0.53 ± 0.06), 60% (LZDF: 2.99 ± 0.37 vs OZDF: 3.47 ± 0.43) y 30 % (LZDF: 16.03 ± 2.97 vs OZDF: 24.2 ± 4.34) (Figura 10C).

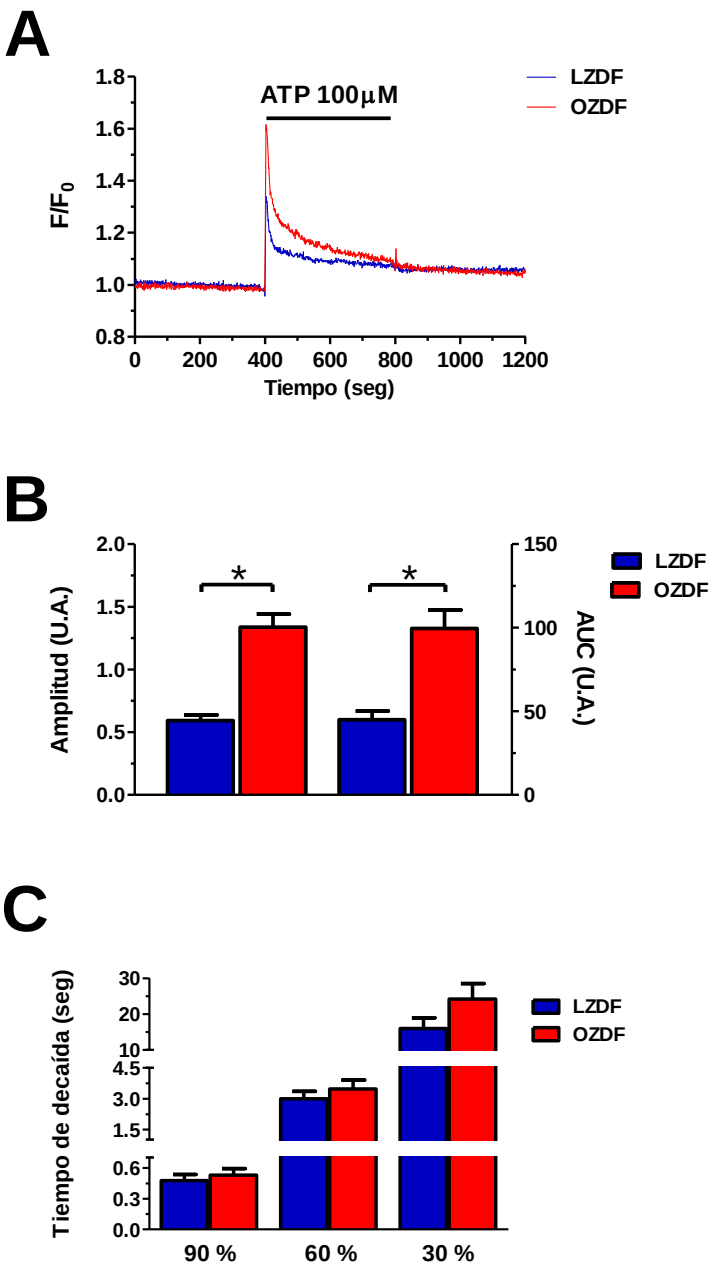

Figura 10. Figura 9. Efecto de la DM2 sobre la señal de Ca^{2+} generada por ATP en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF

(A) Registros medios de la señal de Ca^{2+} evocada por ATP (100 µM) en CMLV, obtenidas de arteria mesentérica de ratas LZDF (azul) y OZDF (rojo). Para fines comparativos, los registros fueron normalizados empleando la fórmula F/F_0. (B) Media ± EE de: amplitud del pico **(**izquierda), y área bajo la curva (AUC) **(**derecha). (C) tiempo de decaída del transiente de Ca^{2+} al 90, 60 y 30% de la amplitud máxima del transiente. La comparación estadística entre grupos se realizó empleando la prueba estadística Mann Whitney (n=7 por grupo experimental, * = p≤0.05). Las barras azules corresponden a los valores obtenidos de CMLV de ratas LZDF y las barras rojas los obtenidos de ratas OZDF.

7.4 Efecto de la DM2 sobre la actividad de la bomba de Ca^{2+} ATPasa del retículo sarcoendoplásmico (SERCA) en la regulación de la señal de Ca^{2+} generada por ATP en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF

En la Figura 11A**,** se muestra la media de la señal de Ca^{2+} evocada por ATP en presencia de CPA, un inhibidor de la SERCA en CMLV de arteria mesentérica de ratas LZDF (línea continua azul) y OZDF (línea continua roja), así como sus respectivos controles (en ausencia de CPA: línea punteada azul para LZDF y línea punteada roja para OZDF).

En el grupo LZDF, la inhibición de la SERCA con CPA indujo un drástico incremento en la amplitud del transiente de Ca^{2+} evocado por ATP (LZDF Ctrl: 0.59 ± 0.05 vs LZDF CPA: 1.393 ± 0.07, p≤0.05) (Figura 11A). En adición la inhibición de la SERCA causó un incremento significativo de los tiempos de decaída al 90 (LZDF Ctrl: 0.48 ± 0.06 LZDF CPA: 0.70 ± 0.07; p≤0.05), 60% (LZDF Ctrl: 2.99 ± 0.37 vs LZDF CPA: 12.17 ± 1.95; p≤0.05) y al 30 % (LZDF Ctrl: 16.03 ± 2.97 vs LZDF CPA: 71.71 ± 6.02; p≤0.05) (Figura 11A), así como el valor del área bajo la curva disminuyó (LZDF Ctrl: 45.08 ± 5.15 vs LZDF CPA: 174.5 ± 11.27; p≤0.05) (Figura 11A).

Contrariamente a lo observado en la rata LZDF, en el caso del grupo OZDF, encontramos una reducción estadísticamente significativa en la amplitud del pico de la señal (OZDF Ctrl: 1.34 ± 0.11 vs OZDF CPA: 1.05 ± 0.09; p≤0.05) (Figura 11A), así como del valor de área bajo la curva (OZDF Ctrl: 99.56 ± 11.11 vs OZDF CPA: 43.49 ± 16.33; p≤0.05) (Figura 11A). El bloqueo de la SERCA con CPA redujo de forma significativa los tiempos de decaída al 90 % (OZDF Ctrl: 0.53 ± 0.06 vs OZDF CPA: 0.39 ± 0.05, p≤0.05), 60% (OZDF Ctrl: 3.47 ± 0.43 vs OZDF CPA: 2.71 ± 0.39, p≤0.05) y al 30% (OZDF Ctrl: 24.20 ± 4.34 vs OZDF CPA: 18.10 ± 4.50, p≤0.05) (Figura 11A).

Dado a que se encontraron diferencias significativas en la señal de Ca^{2+} inducida por ATP entre los grupos LZDF y OZDF (controles) (ver Figura 10)

procedimos a normalizar los valores de los parámetros evaluados en la señal de Ca^{2+} evocada por ATP en presencia de los inhibidores de los mecanismos de remoción de Ca^{2+}, con respecto a la media de cada uno de dichos parámetros determinados previamente en sus controles, es decir, en ausencia de los inhibidores. Al realizar la comparación entre los grupos LZDF y OZDF, pudimos apreciar que la inhibición de la SERCA indujo una disminución significativa en todos los parámetros de la señal de Ca^{2+} inducida por ATP en CMLV obtenidas de arteria mesentérica de ratas OZDF al compararlas con las obtenidas de ratas control (LZDF). En ratas OZDF, se encontraron reducidos: 1.- la amplitud del pico del transiente de Ca^{2+} (LZDF: 2.35 ± 0.16; OZDF: 0.78 ± 0.07, $p \leq 0.05$) (Figura 11B, izquierda); 2.- el área bajo la curva (LZDF, 3.07 ± 1.99; OZDF, 0.4369 ± 0.16) (Figura 11B, derecha); 3.- tiempo de decaída al 90% (LZDF 6.10 ± 2.44; OZDF: 0.7416 ± 0.091); 4.- tiempo de decaída al 60% (LZDF 67.67 ± 50.52; OZDF: 0.7807 ± 0.118); 5.- tiempo de decaída al 30 % (LZDF 29.58 ± 7.09; OZDF: 0.7479 ± 0.19) (Figura 11C).

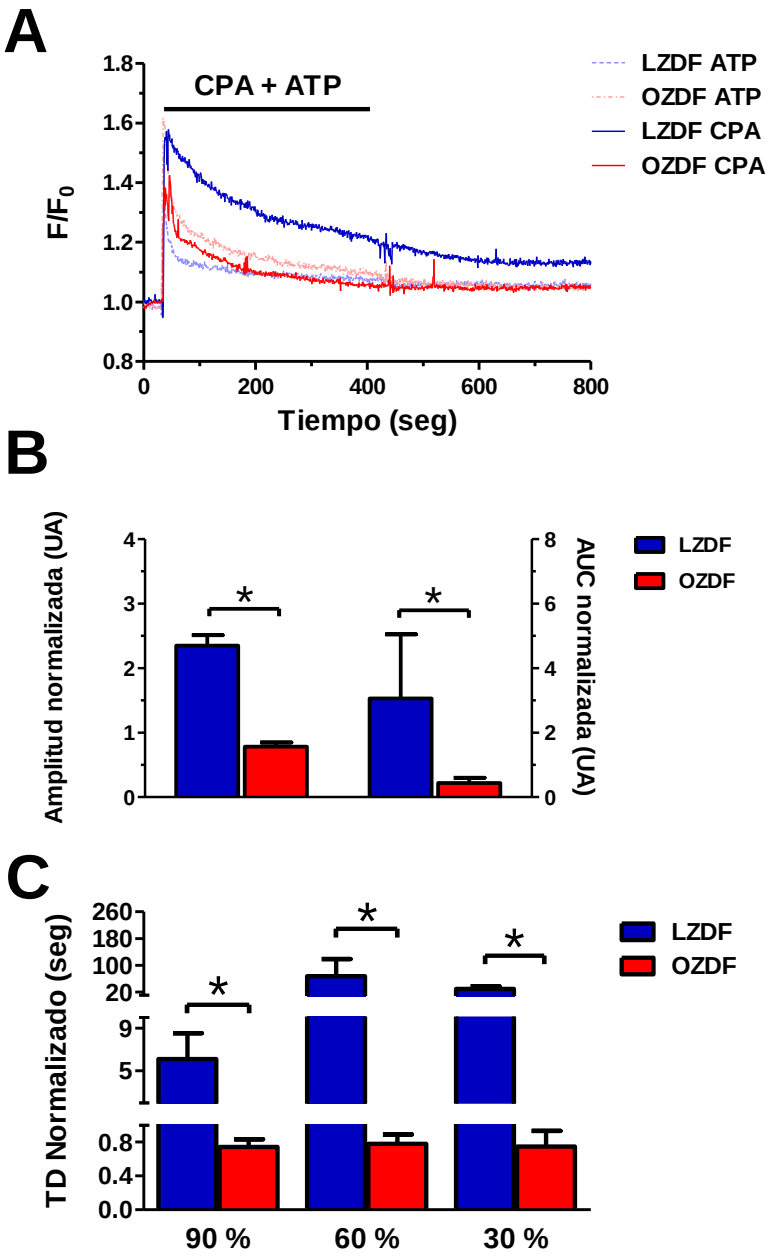

Figura 11. Efecto de la DM2 sobre la actividad de la bomba de Ca^{2+} ATPasa del retículo sarcoendoplásmico (SERCA) en la regulación de la señal de Ca2+ generada por ATP en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF.

(A) Registros medios de la señal de Ca^{2+} evocada por ATP (100µM) en presencia de CPA **(**3µM), un inhibidor de la SERCA, en CMLV obtenidas de arteria mesentérica de ratas LZDF (azul) y OZDF (rojo). Para fines comparativos, los registros fueron normalizados empleando la fórmula F/F_0. (B) Media ± EE de: amplitud del pico (izquierda), y área bajo la curva (AUC) (derecha). (C) tiempo de decaída del transiente de Ca^{2+} al 90, 60 y 30% de la amplitud máxima del transiente. La comparación estadística entre grupos se realizó empleando la prueba estadística Mann Whitney (n = 7 para LZDF y n= 6 para OZDF, * = p≤0.05). Las barras azules corresponden a los valores obtenidos de CMLV de ratas LZDF y las barras rojas los obtenidos de ratas OZDF.

7.5 Efecto de la DM2 sobre la actividad de la bomba de Ca^{2+} ATPasa de la membrana plasmática (PMCA) en la regulación de la señal de Ca^{2+} generada por ATP en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF

En la Figura 12A**,** se muestra la media de la señal de Ca^{2+} generada por la aplicación de 100µM del agonista ATP en combinación con Vanadato (500µM), un inhibidor de la PMCA, en CMLV obtenidas de arteria mesentérica de rata LZDF (línea continua azul) y OZDF (línea continua roja), así como sus respectivos controles (en ausencia de vanadato: línea punteada azul para LZDF y línea punteada roja para OZDF).

En el grupo LZDF, la inhibición de la PMCA con vanadato no modificó la amplitud del transiente de Ca^{2+} evocado por ATP (LZDF Ctrl: 0.59 ± 0.05 vs LZDF Vanadato: 0.67 ± 0.1, p≥0.05) pero si se observó un incremento significativo del área bajo la curva (LZDF Ctrl: 45.08 ± 5.15 vs LZDF Vanadato: 34.24 ± 7.13; p≤0.05). Por otro lado, la inhibición de la PMCA no modificó los tiempos de decaída al 90 % (LZDF Ctrl: 0.48 ± 0.06 LZDF Vanadato: 0.41 ± 0.08; p≥0.05) y al 60 % (LZDF Ctrl: 2.99 ± 0.37 vs LZDF Vanadato: 4.39 ± 1.3; p≥0.05). Únicamente se observa una disminución del tiempo de decaída al 30 % LZDF Ctrl: 16.03 ± 2.97 vs LZDF Vanadato: 13.16 ± 4.14; p≤0.05) (Figura 12A).

En el grupo OZDF la inhibición de la PMCA con vanadato únicamente disminuyó significativamente la amplitud del pico del transiente de Ca^{2+} evocado por ATP (OZDF Ctrl: 1.34 ± 0.11 vs OZDF Vanadato: 0.94 ± 0.06; p≤0.05). No se encontraron diferencias significativas en: área bajo la curva (OZDF Ctrl: 99.56 ± 11.11 vs OZDF Vanadato: 105.4 ± 9.41, p≥0.05); tiempos de decaída al 90 (OZDF Ctrl: 0.53 ± 0.06 vs OZDF Vanadato: 0.62 ± 0.07, p≥0.05); tiempos de decaída al 60 % (OZDF Ctrl: 3.47 ± 0.43 vs OZDF Vanadato: 4.96 ± 0.57, p≥0.05) y tiempo de decaída al 30 % (OZDF Ctrl: 24.20 ± 4.34 vs OZDF Vanadato: 24.36 ± 4.07, p≥0.05).

En la comparación entre grupos encontramos que la señal de Ca^{2+} evocada por ATP en combinación con Vanadato en CMLV de ratas OZDF, no tuvo diferencias en la amplitud del pico (LZDF: 1.13 ± 0.16 vs OZDF: 0.7 ± 0.04), (Figura 12B, izquierda), sin embargo, sí tuvo diferencias significativas sobre los demás parámetros medidos. Presentó un incremento significativo en el área bajo la curva (LZDF: 0.76 ± 0.16 vs OZDF: 1.06 ± 0.09) (Figura 12B, derecha); duración del transiente al 90 % (LZDF: 0.87 ± 0.17 vs OZDF: 1.16 ± 0.14), al 60 % un decremento (LZDF: 1.47 ± 0.43 vs OZDF: 1.43 ± 0.16) y al 30 % un aumento (LZDF: 0.82 ± 0.26 vs OZDF: 1.01 ± 0.17) (Figura 12C).

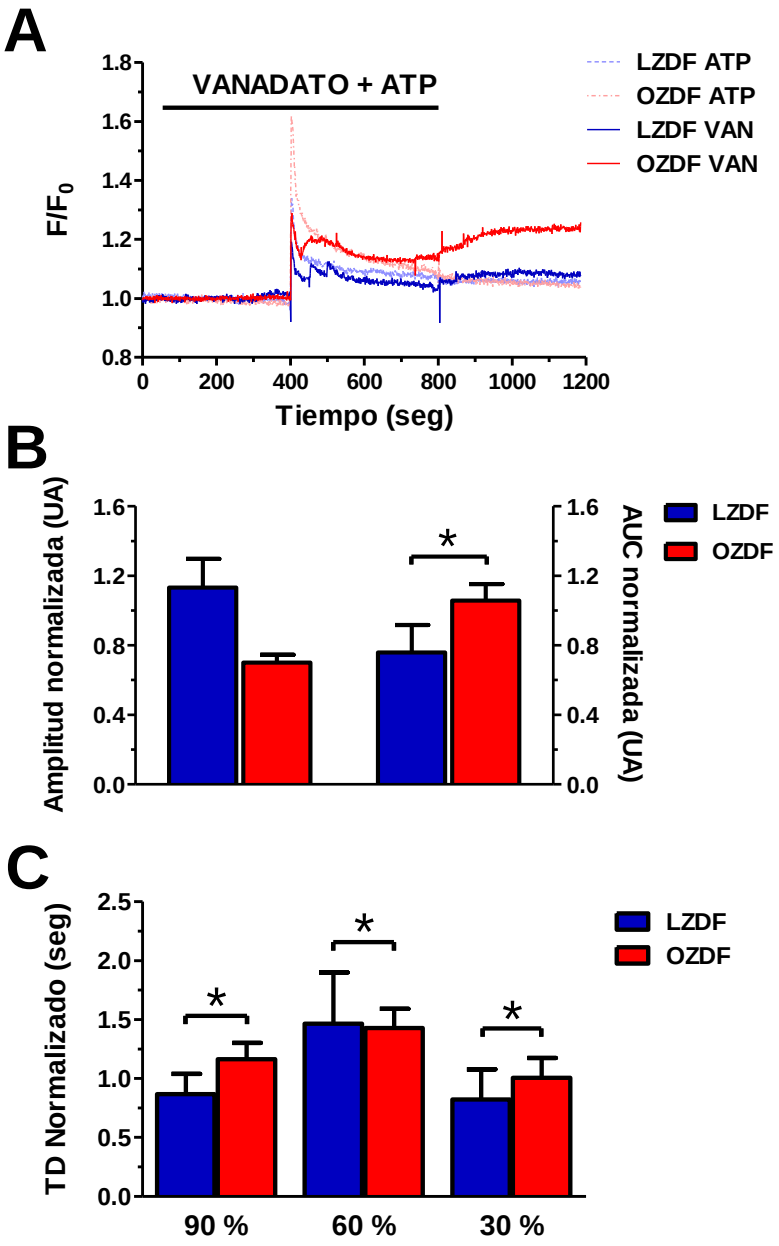

Figura 12. Efecto de la DM2 sobre la actividad de la bomba de Ca^{2+} ATPasa de la membrana plasmática (PMCA) en la regulación de la señal de Ca^{2+} generada por ATP en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF.

(A) Registros medios de la señal de Ca^{2+} evocada por ATP (100µM) en presencia de Vanadato (500µM), un inhibidor de la PMCA en CMLV, obtenidas de arteria mesentérica de ratas LZDF (azul) y OZDF (rojo). Para fines comparativos, los registros fueron normalizados empleando la fórmula F/F_0. (B) Media ± EE de: amplitud del pico (izquierda), y área bajo la curva (AUC) (derecha). (C) tiempo de decaída del transiente de Ca^{2+} al 90, 60 y 30% de la amplitud máxima del transiente. La comparación estadística entre grupos se realizó empleando la prueba estadística Mann Whitney (n = 6 para LZDF y n= 6 para OZDF, * = p≤0.05). Las barras azules corresponden a los valores obtenidos de CMLV de ratas LZDF y las barras rojas los obtenidos de ratas OZDF.

7.6 Efecto de la DM2 sobre la actividad del intercambiador Na^{+}/Ca^{2+} (NCX) en la regulación de la señal de Ca^{2+} generada por ATP en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF

En la Figura 13A**,** se muestra la media de la señal de Ca^{2+} generada por la aplicación de 100µM del agonista ATP en combinación con SEA (3µM), un inhibidor del NCX en CMLV obtenidas de arteria mesentérica de rata LZDF (línea azul) y OZDF (línea Roja), así como sus respectivos controles (en ausencia de SEA: línea punteada azul para LZDF y línea punteada roja para OZDF).

En el grupo LZDF, la inhibición del NCX con SEA no modifica de forma significativa ninguno de los valores de la señal de Ca^{2+} evocada por ATP. En particular no se encontraron diferencias en: 1.- la amplitud del transiente (LZDF Ctrl: 0.59 ± 0.05 vs LZDF SEA: 0.72 ± 0.08, p≥0.05); 2.- área bajo la curva (LZDF Ctrl: 45.08 ± 5.15 vs LZDF SEA: 51.57 ± 14.01; p≥0.05); 3.- tiempo de decaída al 90 % (LZDF Ctrl: 0.48 ± 0.06 vs LZDF SEA: 0.35 ± 0.03; p≥0.05); 4.- tiempo al 60 % (LZDF Ctrl: 2.99 ± 0.37 vs LZDF SEA: 3.84 ± 0.51; p≥0.05); 5.- tiempo al 30 % (LZDF Ctrl: 16.03 ± 2.97 vs LZDF SEA: 21.24 ± 4.15; p≥0.05) (Figura 13A).

En el caso del grupo OZDF, encontramos una reducción significativa en la amplitud del pico de la señal (OZDF Ctrl: 1.34 ± 0.11 vs OZDF SEA: 1.07 ± 0.11; p≤0.05), así como en el valor de área bajo la curva (OZDF Ctrl: 99.56 ± 11.11 vs OZDF SEA: 0.62 ± 0.14). Por otro lado no encontramos diferencias significativas en los tiempos de decaída al 90 % (OZDF Ctrl: 0.53 ± 0.06 vs OZDF SEA: 0.47 ± 0.06, p≥0.05), al 60 % (OZDF Ctrl: 3.47 ± 0.43 vs OZDF SEA: 3.03 ± 0.39, p≥0.05), ni al 30 % (OZDF Ctrl: 24.2 ± 4.34 vs OZDF SEA: 17.05 ± 3.74, p≥0.05) (Figura 13A)

Comparando entre grupos encontramos que la señal de Ca^{2+} evocada por ATP en combinación con SEA en CMLV de ratas OZDF, tuvo una reducción significativa en la amplitud del pico (LZDF: 1.22 ± 0.13 vs OZDF: 0.8 ± 0.08), (Figura 13B, izquierda), así como también en el área bajo la curva (LZDF: 1.14 ± 0.31 vs OZDF: 0.62 ± 0.14) (Figura 13B, derecha). No encontramos diferencias significativas sobre los parámetros medidos en duración del transiente al 90 %

(LZDF: 0.72 ± 0.07 vs OZDF: 0.88 ± 0.11) y al 60 % (LZDF: 1.28 ± 0.17 vs OZDF: 0.87 ± 0.11) pero sí tuvo una diferencia estadística al 30 % (LZDF: 1.33 ± 0.26 vs OZDF: 0.7 ± 0.15) (Figura 13C).

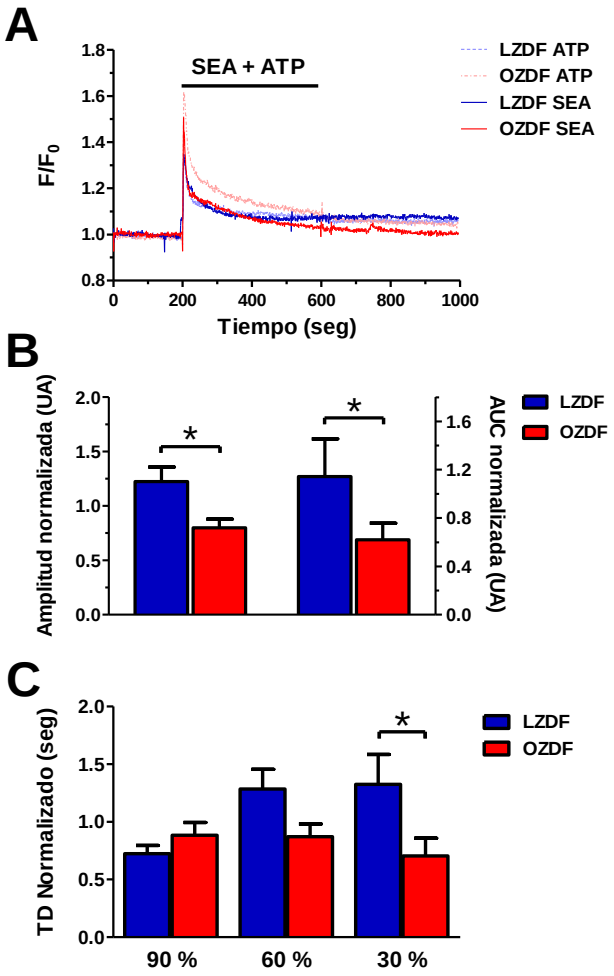

Figura 13. Efecto de la DM2 sobre la actividad del intercambiador Na^+/Ca^{2+} (NCX) en la regulación de la señal de Ca^{2+} generada por ATP en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF.

A) Registros medios de la señal de Ca^{2+} evocada por ATP (100µM) en presencia de SEA (3µM), un inhibidor del NCX en CMLV, obtenidas de arteria mesentérica de ratas LZDF (azul) y OZDF (rojo). Para fines comparativos, los registros fueron normalizados empleando la fórmula F/F_0. (B) Media ± EE de: amplitud del pico (izquierda), y área bajo la curva (AUC) (derecha). (C) tiempo de decaída del transiente de Ca^{2+} al 90, 60 y 30% de la amplitud máxima del transiente. La comparación estadística entre grupos se realizó empleando la prueba estadística Mann Whitney (n = 7 para LZDF y n= 6 para OZDF, * = p≤0.05). Las barras azules corresponden a los valores obtenidos de CMLV de ratas LZDF y las barras rojas los obtenidos de ratas OZDF.

7.7 Efecto de la DM2 sobre la actividad de los canales operados por los almacenes intracelulares de calcio (SOC) en la regulación de la señal de Ca^{2+} generada por el alcaloide Cafeína en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF

En la Figura 14A, se muestra la media de la señal de Ca^{2+} generada al someter a las CLMV al protocolo para activar la SOCE. Como se detalla en material y métodos, este protocolo consiste en inducir el vaciamiento de los almacenes intracelulares de Ca^{2+} (i.e. RS) utilizando ácido ciclopiazónico (CPA) un inhibidor selectivo de la SERCA, la bomba de Ca^{2+} presente en la membrana del RS. Al aplicar CPA (10 µM) en ausencia de Ca^{2+} extracelular, se genera una fuga pasiva de Ca^{2+} del RS hacia el citoplasma a través de canales permanentemente abiertos y presentes en la membrana de este organelo y dado a que la SERCA se encuentra inhibida por el CPA, el ion Ca^{2+} que se fuga del RS no puede ser recapturado, lo que conlleva finalmente al vaciamiento del RS. Para confirmar el vaciamiento del RS, se procedió a la aplicación de 10 mM de cafeína, un agonista que normalmente cuando hay Ca^{2+} induce su liberación. Como podemos observar en la Figura 14, en ambos grupos experimentales, la aplicación de cafeína en Ca0 y en la continua presencia de CPA, no causó cambios significativos en la señal de Ca^{2+}, confirmando el completo vaciamiento del RS. Después del vaciamiento del RS, en la presencia de CPA, se agregó Ca^{2+} al medio extracelular y se puede observar un rápido aumento de la señal de Ca^{2+}, correspondiente a la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular hacia el interior de la célula a través de los canales de Ca^{2+} operados por los almacenes intracelulares de Ca^{2+}, en el proceso conocido como SOCE generando una señal compuesta de una fase de ascenso rápida, seguida de una fase sostenida que no regresa a los niveles basales.

Bajo estas condiciones, se puede observar, en ambos grupos de ratas, LZDF (línea azul) y OZDF (línea roja), un incremento de Ca^{2+} debido a la activación de la SOCE, sin embargo, la amplitud y el área bajo la curva de la señal de Ca^{2+} generada por la activación de esta vía, fueron significativamente menores en CMLV de ratas OZDF en comparación con las obtenidas de ratas control LZDF. La amplitud fue de

0.32 ± 0.02 en ratas LZDF vs 0.25 ± 0.04 para ratas OZDF; p≤0.05 (Figura 14B, izquierda), así mismo el área bajo la curva de la señal de Ca^{2+} de CMLV de ratas LZDF, tuvo un valor de 60.73 ± 5.45 vs 44.13 ± 10.67 en CMLV obtenidas de ratas OZDF; p≤0.05.

Estos resultados demostrando que la DM2 causa una reducción significativa de la entrada de Ca^{2+} a través de los canales SOC en CMLV de arteria mesentérica de rata.

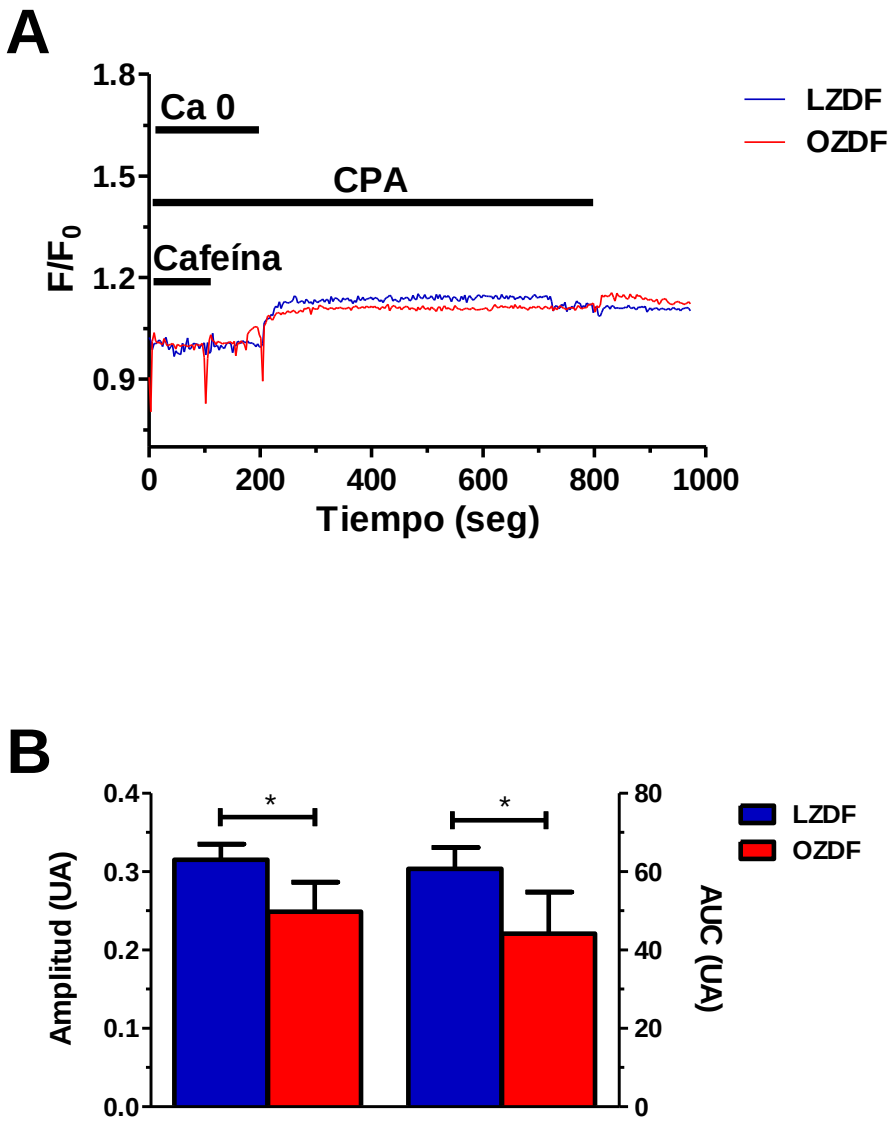

Figura 14. Efecto de la DM2 sobre la actividad de los canales operados por los almacenes intracelulares de calcio (SOC) en la regulación de la señal de Ca^{2+} generada por el alcaloide Cafeína en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF.

A) Registros medios de la señal de Ca^{2+} en presencia, primero de CPA (10µM) un inhibidor de la SERCA y solución fisiológica sin Ca^{2+} (Ca0), y posteriormente en presencia del mismo inhibidor CPA, pero en combinación con solución Ca^{2+} normal (PSS2), en CMLV, obtenidas de arteria mesentérica de ratas LZDF (azul) y OZDF (rojo). Para fines comparativos, los registros fueron normalizados empleando la fórmula F/F_0. (B) Media ± EE de: amplitud del pico (izquierda), y área bajo la curva (AUC) (derecha). La comparación estadística entre grupos se realizó empleando la prueba estadística Mann Whitney (n = 8 para LZDF y n= 6 para OZDF, * = p≤0.05). Las barras azules corresponden a los valores obtenidos de CMLV de ratas LZDF y las barras rojas los obtenidos de ratas OZDF.

7.8 Efecto de la DM2 sobre la señal de Ca^{2+} generada por el alcaloide Cafeína en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF.

En la Figura 15 se estudió el efecto de la DM2 en la señal de Ca^{2+} intracelular inducida por cafeína 10 mM en CMLV de arteria mesentérica de rata ZDF. En el panel A de la Figura 15 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, en color azul y OZDF, en color rojo).

Como se puede observar, en ambos grupos de ratas (LZDF y OZDF), la aplicación de cafeína causa un incremento transitorio de la señal de Ca^{2+} en CMLV que consiste en un rápido aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inmediatamente después de la aplicación del agonista (pico), seguido por una decaída lenta de la $[Ca^{2+}]_i$ hacia los niveles de Ca^{2+} basales (previos a la estimulación con cafeína). Sin embargo, no encontramos diferencia significativa en ninguno de los parámetros estudiados de la señal de Ca^{2+} evocada por cafeína en ambos grupos de rata. La amplitud del pico del transiente de cafeína fue de 0.95 ± 0.11 en células de rata LZDF vs 0.69 ± 0.07, en células de rata OZDF; $p \geq 0.05$ (Figura 15B, izquierda). El área bajo la curva obtenida en células de rata LZDF fue de 0.45 ± 0.13 vs 0.33 ± 0.09 en células de rata OZDF; $p \geq 0.05$ (Figura 15B, derecha). Tampoco encontramos diferencias significativas en la duración del transiente al 90 % (LZDF: 0.81 ± 0.1 vs OZDF: 0.96 ± 0.14), 60 % (LZDF: 0.93 ± 0.14 vs OZDF: 1.01 ± 0.12) y 30 % (LZDF: 0.63 ± 0.11 vs OZDF: 0.47 ± 0.05) (Figura 15C)

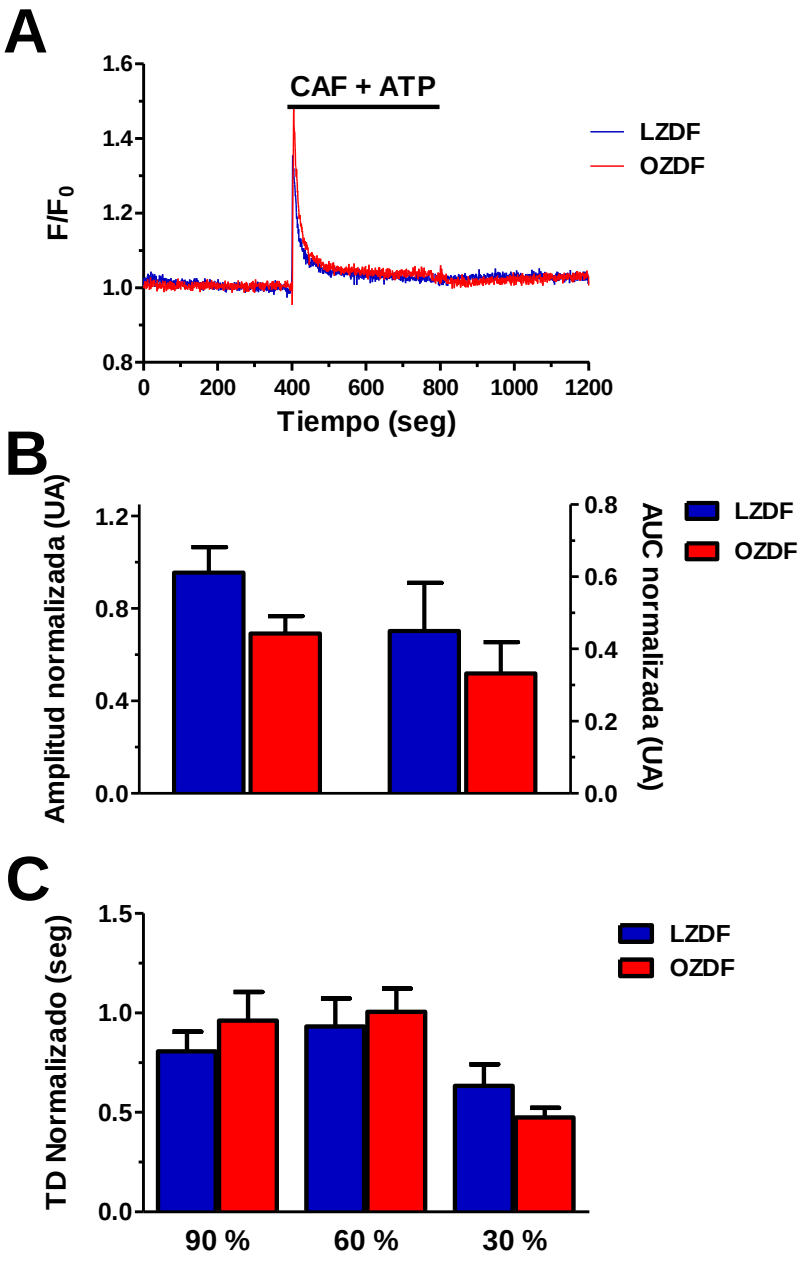

Figura 15. Efecto de la DM2 sobre la señal de Ca^{2+} evocada por el alcaloide cafeína en CMLV de arteria mesentérica de ratas de la cepa ZDF.

(A) Registros medios de la señal de Ca^{2+} evocada por Cafeína (10mM) en CMLV, obtenidas de arteria mesentérica de ratas LZDF (azul) y OZDF (rojo). Para fines comparativos, los registros fueron normalizados empleando la fórmula F/F_0. (B) Media ± EE de: amplitud del pico (izquierda), y área bajo la curva (AUC) (derecha). (C) tiempo de decaída del transiente de Ca^{2+} al 90, 60 y 30% de la amplitud máxima del transiente. La comparación estadística entre grupos se realizó empleando la prueba estadística Mann Whitney (n=7 por grupo experimental, * = p≤0.05). Las barras azules corresponden a los valores obtenidos de CMLV de ratas LZDF y las barras rojas los obtenidos de ratas OZDF.

8 DISCUSIÓN

La DM2 es un conjunto de alteraciones metabólicas que impactan con severidad la funcionalidad del corazón y la vasculatura; de hecho, los reportes que existen sobre las principales causas de muerte en pacientes con DM2 se refieren a problemas en el sistema cardiovascular, como infartos y derrames cerebrales; además de favorecer la aparición de procesos aterogénicos e hipertensión (1). De ahí radica la importancia de estudiar los mecanismos implicados en la disfunción del tejido cardiaco y vascular en el cuadro de la DM2, considerando la disfunción vascular como el factor fisiopatológico para el control del efecto que ejerce la DM en el sistema cardiovascular (2).

8.1 Caracterización del modelo animal de DM2. Parámetros morfométricos y bioquímicos de las ratas ZDF

Para el estudio de la DM se han utilizado distintos modelos animales, en su mayoría para DM1, por la relativa facilidad para generar un modelo diabético que no produzca insulina, sin embargo, el mayor porcentaje de personas con DM es del tipo 2, por lo que el uso de modelos animales que generan DM2 de forma natural es muy importante (8,9). Para el presente estudio se emplearon ratas de la cepa ZDF, que presentan las características más cercanas a la DM2 en humanos, así como algunas de sus patologías y complicaciones (9,13).

Tal y como se aprecia en la Figura 8, a los 3 meses de edad es claramente notoria, a simple vista, la diferencia de tamaño entre las ratas del grupo LZDF respecto a las del grupo OZDF, siendo el tamaño de este último grupo considerablemente mayor. Con la finalidad de cuantificar las diferencias morfológicas, procedimos a determinar los valores de peso, longitud y circunferencia abdominal. Todos los parámetros antes señalados resultaron aumentados significativamente en el grupo OZDF respecto al grupo LZDF. La diferencia en el peso se correlaciona con lo reportado previamente por otros grupos de investigación

(51,52). Dado a que el aumento en el peso podría ser atribuido a un aumento en el tamaño de la rata (a su longitud), procedimos a calcular el IMC para descartar que las diferencias vistas en el peso se debieran a la diferencia de tamaño entre ambos grupos. Del mismo modo, el valor medio del IMC resultó estadísticamente mayor en las ratas OZDF comparado con el grupo LZDF, sugiriendo que el aumento de peso se debe a la obesidad que ha sido ampliamente reportada en la literatura en esta cepa de ratas (9,53–55). La presencia de obesidad en las ratas OZDF fue demostrada por el incremento del 667% en el tejido adiposo formado alrededor del epidídimo. Con todo esto, podemos afirmar que, de acuerdo a lo reportado en la literatura, las ratas OZDF presentan una marcada obesidad a la edad de 3-4 meses.

Para cerciorarnos de que las ratas que empleamos en nuestros protocolos experimentales en efecto presentan DM2, determinamos los parámetros bioquímicos de glucosa basal, prueba de tolerancia a la glucosa (2hr), HDL, LDL, VLDL y triglicéridos. Tanto los niveles de glucosa basal, como de glucosa a las 2 hrs (prueba de tolerancia), se encontraron elevados en OZDF. Cabe mencionar que, en el caso de la glucosa basal, los valores para ambos grupos fueron superiores a 126 mg/dL, lo cual indicaría la presencia de hiperglucemia, según los criterios de diagnóstico indicados por la ADA (56) y descritos en el Cuadro 1. Sin embargo, atribuimos estos valores al efecto hiperglucemiante propio del anestésico que utilizamos (ketamina/xilacina), dicho efecto ha sido reportado por otros investigadores (57). A pesar de esto, aún bajo dichas circunstancias, fue posible apreciar el aumento significativo en la glucosa basal del grupo OZDF en comparación al grupo control. Esta información nos permite corroborar que las ratas OZDF presentan hiperglicemia e intolerancia a la glucosa, ambos criterios que, de acuerdo con la ADA, son suficientes para diagnosticar DM2 en humanos, permitiendo aseverar que las ratas OZDF, en efecto, desarrollan DM2. Además de la glucemia, también se encontraron elevados los niveles plasmáticos de colesterol, triglicéridos y VLDL, siendo evidente la presencia de hiperlipidemia en estos animales; otra característica típica del perfil diabético. El metabolismo de lípidos alterado, en conjunto con la hiperglucemia aumentan considerablemente el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (58).

8.2 Efecto de la DM2 sobre los niveles de Ca^{2+} basal en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF.

La importancia del Ca^{2+} libre intracelular en el proceso contráctil de las células de MLV ha sido descrita ampliamente en el apartado 1.1.2.2.3, de ésta tesis. En las CMLV en reposo, es decir, CMLV no estimuladas, la concentración de Ca^{2+} libre intracelular $[Ca^{2+}]_i$ se encuentra dentro de un rango de 100nM (59). Estos niveles basales de Ca^{2+}, se encuentran estrechamente regulados por una gran variedad de mecanismos moleculares, encargados de mantener la homeostasis del Ca^{2+} y con esto regular de modo preciso el estado contráctil de las CMLV. En el mantenimiento de la $[Ca^{2+}]_i$, participan tanto los mecanismos que contribuyen a aumentar los niveles de Ca^{2+} intracelular por medio de la liberación de este ión de los almacenes intracelulares como son la activación de los receptores canales RyR e IP3R presentes en la membrana del RS, varios canales de membrana que permiten la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular (SOC, ROC, TRP) así como de aquellos mecanismos que contribuyen a reducir la $[Ca^{2+}]_i$, como la SERCA, PMCA y el NCX (23).

Los resultados de las mediciones de la $[Ca^{2+}]_i$ obtenidos en la presente tesis demuestran que la DM2 causa un incremento significativo de aproximadamente 31% en los niveles basales de Ca^{2+} intracelular en CMLV de rata OZDF comparados con los obtenidos de ratas control LZDF (Figura 9). Por si mismo este dato, confirma la hipótesis planteada en la presente tesis: en efecto, la DM causa alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en CMLV de arteria mesentérica de ratas de la cepa ZDF, ya que pierden la capacidad de mantener la $[Ca^{2+}]_i$ en sus valores normales. Esto sugiere que la DM2 causa alteraciones en uno o varios de los múltiples mecanismos que participan en la regulación de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en estas células y que han sido descritos en el párrafo anterior. Con la finalidad de obtener mayor información sobre cuales mecanismos podrían ser afectados por la DM2, se procedió a evaluar la función de varios de ellos, utilizando

herramientas farmacológicas específicas, y los resultados se discuten a continuación.

8.3 Efecto de la DM2 sobre la señal de Ca^{2+} generada por ATP en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF.

Ha sido ampliamente demostrado que el pico de la señal de Ca^{2+} que genera el ATP está dada por los siguientes eventos moleculares: unión del ATP a receptores P2Y, activación de la proteína G_q, activación de la PLC, hidrólisis del IP_2 en IP_3 y DAG. Posteriormente el IP_3 causa la apertura de los IP_3R presentes en la membrana del RS y la consecuente liberación de Ca^{2+} del RS hacia el citoplasma dando como resultado final un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$. De manera secundaria a este evento, también puede ocurrir, la apertura de canales RyR, que también se encuentran en la membrana del RS. Por lo tanto, el aumento significativo de la señal de Ca^{2+} evocada por ATP en CMLV obtenidas de ratas diabéticas y mostrados en la **Figura 10**, podría ser debido a un aumento en la expresión o sensibilidad de las moléculas que participan en la vía antes señalada o a un incremento en el contenido de Ca^{2+} almacenado en el RS.

Con respecto a los IP_3R, estudios realizados en CMLV provenientes de aorta y arteria femoral de ratas con DM1, así como en CMLV en cultivo expuestas a altas concentraciones de glucosa, mostraron una disminución en la expresión de IP_3R, lo que trajo como consecuencia la atenuación de la señal de Ca^{2+} evocada por vasopresina (60). Por el contrario, en CMLV en cultivo de aorta de ratones con DM2 se observó que la excitabilidad de estos canales se encontraba aumentada, resultando en un aumento en la señal de Ca^{2+} en respuesta a IP_3 (61). Estas discrepancias en los resultados podrían deberse a factores como el modelo experimental empleado, tipo de vasos sanguíneos de donde se aislaron las células, progresión de la DM, etc. Ulteriores estudios son necesarios para dilucidar las posibles alteraciones en los mecanismos específicos aquí mencionados.

8.4 Efecto de la DM2 sobre la actividad de la bomba de Ca^{2+} ATPasa del retículo sarcoendoplásmico (SERCA) en la regulación de la señal de Ca^{2+} generada por ATP en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF

La bomba SERCA es una ATPasa que cumple una función doble, causa la relajación muscular mediante la disminución del Ca^{2+} citosólico, y al mismo tiempo para restaurar el almacenamiento de calcio en el RS necesario para la contracción muscular, es el mecanismo de mayor importancia para la homeostasis del Ca^{2+} en el interior de la célula (62). Los resultados de la Figura 11, claramente demuestran que la DM2 causa una dramática disminución de la actividad de la SERCA en CMLV de arteria mesentérica de rata. Cabe resaltar que, aún a pesar de este déficit, el transiente decae hasta los niveles de Ca^{2+} basales lo que significa que la célula sigue siendo capaz de remover el Ca^{2+} citosólico de manera relativamente eficiente, posiblemente debido al aumento en la función de alguno de los mecanismos de remoción restantes (NCX y PMCA) como mecanismo compensatorio.

El funcionamiento de los mecanismos de remoción de Ca^{2+} restantes (PMCA y NCX) también fue evaluado en la presente tesis, y los resultados se detallan en los apartados siguientes.

8.5 Efecto de la DM2 sobre la actividad de la bomba de Ca^{2+} ATPasa de la membrana plasmática (PMCA) en la regulación de la señal de Ca^{2+} generada por ATP en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF

Sustentando la hipótesis de que alguno de los mecanismos que contribuyen en la reducción de la concentración $[Ca^{2+}]_i$ podrían compensar la marcada reducción en la actividad de la SERCA causada por la DM y explicada previamente, nosotros

encontramos un incremento significativo de la actividad de la PMCA en CMLV de arteria mesentérica obtenida de ratas diabéticas (ver Figura 12)

Como se puede observar también en la Figura 12, encontramos una variabilidad considerable entre los datos obtenidos, reflejado por un incremento en el EE, una posible explicación a este fenómeno podría radicar en la inespecificidad del vanadato, el cual, es capaz de inhibir a diversas proteínas como fosfatasas, fosfatasas proteína-fosfotirosina y otras ATPasas, entre ellas la bomba Na^+/K^+ (NKA) (63). En múltiples estudios se ha demostrado que tanto NKA como los canales TRPC6 y el NCX se co-localizan dentro de las uniones membrana plasmática-RS en CMLV y en otros tipos celulares (64).

En la literatura existe muy poca información respecto a cómo la DM2 afecta la PMCA en CMLV, sin embargo, nuestros resultados coinciden con los reportados por El-Najjar y colaboradores, quienes demostraron que en CMLV expuestas a altas concentraciones de glucosa existe un aumento en la actividad de la bomba PMCA dado por el incremento en la expresión de la proteína PMCA4 (41). Resultados similares se observaron en arterias coronarias de cerdos diabéticos y dislipidémicos, en las cuales también se encontró un aumento en la actividad de este transportador (65).

8.6 Efecto de la DM2 sobre la actividad del intercambiador Na^+/Ca^{2+} (NCX) en la regulación de la señal de Ca^{2+} generada por ATP en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF

El NCX es una proteína que se localiza en la membrana plasmática, su función principal es sacar un ión Ca^{2+} del citoplasma al espacio extracelular e introducir tres iones Na^+ del espacio extracelular al citoplasma sin gasto de ATP, utilizando la carga neta positiva del Na^+, participando sustancialmente en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en el proceso de movilización de Ca^{2+} al medio extracelular (66).

En el caso del empleo del inhibidor del NCX, SEA, observamos que hay una reducción estadísticamente significativa de la actividad de este transportador en ratas OZDF.

8.7 Efecto de la DM2 sobre la actividad de los canales operados por los almacenes intracelulares de calcio (SOC) en la regulación de la señal de Ca^{2+} generada por el alcaloide Cafeína en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF

En la literatura se encuentra descrito que la SOCE es el principal mecanismo responsable de introducir Ca^{2+} desde el medio extracelular en las CMLV estimuladas con agonistas vasoactivos (67). Existe evidencia de que la DM altera tanto el funcionamiento como la expresión de los componentes de la SOCE (proteínas STIM1 y Orai1), sin embargo la forma en la que esto ocurre parece depender de varios factores como el tipo de DM, progreso de la enfermedad, segmento de los vasos sanguíneos y especie (humano, rata, ratón, etc.) (68). Los canales operados por almacenes intracelulares (SOC) son únicos entre los canales iónicos, desde su base molecular hasta sus propiedades biofísicas y modo de regulación. Debido a sus conexiones físicas y funcionales íntimas con el RS, desempeñan un papel homeostático en la provisión de Ca^{2+} para rellenar el RS después de que el Ca^{+2} se haya bombeado a través de la membrana plasmática desde el espacio extracelular (69).

En nuestro estudio al inhibir la SERCA, colocar en solución fisiológica libre de Ca^{2+} a las células y vaciar por completo el retículo sarcoplásmico, se efectuó el ingreso masivo de Ca^{2+} vía los SOC, teniendo inhibida la SERCA en dicho proceso; observamos que la DM2 causa una disminución significativa en la amplitud y área bajo la curva de la señal de Ca^{2+} activada por la SOCE. De dichos comportamientos observados podemos evaluar que el ingreso de Ca^{2+} por esta vía se ve disminuido en la variante OZDF.

8.8 Efecto de la DM2 sobre la señal de Ca^{2+} generada por el alcaloide Cafeína en CMLV de arteria mesentérica de rata de la cepa ZDF.

Finalmente, con la intención de explorar con mayor detalle las posibles alteraciones causada por la DM2 sobre la homeostasis del Ca^{2+} en CMLV, procedimos a evaluar si la DM alteraba otra de las vías de liberación de Ca^{2+} del RS de las CMLV, a través de los RyR. A los RyR se les atribuye el fenómeno de *liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+}* (CICR). El principal estímulo fisiológico para la apertura de dichos canales es un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$, aunque también pueden activarse en presencia de altas concentraciones de cafeína (10mM). Utilizando a la cafeína como herramienta farmacológica evaluamos las posibles alteraciones causadas por la DM, sobre este mecanismo de liberación de Ca^{2+}. Los resultados mostrados en la Figura 15**,** demuestran claramente que la DM2 no causa alteraciones en la activación de los RyR ni en la cantidad de $Ca2^{+}$ 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 (70), algo similar a lo descrito en el modelo animal db/db por Fernandez-Velasco y Cols., (21). 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 (60). Estas diferencias pueden deberse al modelo experimental utilizado, tipo de DM y procedimientos experimentales.

Los datos obtenidos en nuestro trabajo presenta hallazgos que son relevantes con respecto al impacto que tiene la DM sobre la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, en particular ahora sabemos que la DM2: 1.- causa un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ basal en CMLV de arterias mesentéricas, 2.- causa un incremento en la señal de Ca^{2+} activada por el agonista vasoactivo ATP, 3.- causa una dramática reducción en la actividad de la bomba de Ca^{2+} del RS (SERCA), 4.- reduce también la actividad del intercambiador Na^{+}/Ca^{2+} (NCX) y aumenta la actividad de la bomba de Ca^{2+} presente en la membrana plasmática (PMCA), 5.- un resultado también interesante

es que la DM2 reduce de forma significativa la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} dependientes del contenido de Ca^{2+} en los almacenes intracelulares, los bien conocidos como SOC, los cuales representan una de las principales vías de entrada de Ca^{2+} del medio extracelular hacia el citoplasma de las CMLV, 6.- por otro lado la vía de liberación de Ca^{2+} a través de los receptores rianodínicos (RyR) no parece ser modificada por la DM2.

Dada la importancia de cada uno de los mecanismos antes mencionados en la regulación del Ca^{2+} intracelular y dada la relación entre Ca^{2+} intracelular y las múltiples funciones que desempeñan las CMLV, en particular de pequeñas arterias como las mesentéricas, resulta evidente el estudio su posible implicación ; por otra parte la actividad del NCX y de los SOC podrían ser interesantes pues podrían colaborar en estudios que se efectúen sobre contractilidad muscular, tono miogénico y dilatación vascular; el empleo de la rata ZDF como modelo de DM2 nos ha permitido tener estos hallazgos que nos parecen fortalecedores del estudio de la DM y las ECV, la técnica de epifluorescencia ha sido suficiente para demostrar las diferencias del comportamiento de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular.

Sin embargo, tenemos debilidades, para poder aseverar que nuestros hallazgos son redundantes deberíamos hacer la parte de biología molecular para corroborar los comportamientos observados de los mecanismos que mantienen la homeostasis del Ca^{2+} intracelularmente, desarrollando el análisis molecular de dichos mecanismos podremos ver si existen sobreexpresiones o subexpresiones de algunos de los mecanismos involucrados, de manera tal que queda pendiente por efectuar dicho análisis molecular.

9 CONCLUSIONES

1.- La DM2 provoca un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ basal en CMLV de arteria mesentérica no estimuladas.

2.- La DM2 causa un incremento en la señal de Ca^{2+} activada por el agonista vasoactivo ATP en CMLV de arteria mesentérica.

3.- La DM2 causa una dramática reducción en la actividad de la bomba de Ca^{2+} de la membrana del retículo sarcoplásmico en CMLV de arteria mesentérica.

4.- La DM2 incrementa la actividad de bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA) en CMLV de arteria mesentérica.

5.- La DM2 reduce la actividad del intercambiador Na^{+}/Ca^{2+} (NCX) en CMLV de arteria mesentérica.

6.-La DM2 reduce la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} dependientes de los almacenes de Ca^{2+} intracelulares, conocidos como SOC en CMLV de arteria mesentérica.

7.- La DM2 no causa alteraciones en la señal de Ca^{2+} evocada por el alcaloide cafeína en CMLV de arteria mesentérica.

Perspectivas del estudio:

Las perspectivas que tenemos son de continuar la evaluación completa con todas las técnicas que manejamos en nuestro laboratorio y hacer las comparaciones respectivas con otros tipos de músculos lisos vasculares que estudiamos, como la contractilidad de la arteria mesentérica, sus arterias colaterales y las arterias de cuarto orden, todas presentes en el conjunto de la arteria mesentérica.

Realizar pruebas de biología molecular para corroborar la disminución o aumento de la expresión y/o actividad de los distintos mecanismos moleculares afectados por la DM2 en este estudio.

Realizar pruebas de la función de las CMLV tales como: contractilidad vascular, proliferación y migración celular evaluando los mecanismos que regulan la homeostasis de Ca^{2+} intracelular aquí estudiados.

10 BIBLIOGRAFÍA

1. American Diabetes Association (ADA). Standards of Medical Care in Diabetes 2018. 2018;41(January).

2. Skyler JS, Bakris GL, Bonifacio E, Darsow T, Eckel RH, Groop L, et al. Differentiation of Diabetes by Pathophysiology, Natural History, and Prognosis. Diabetes [Internet]. 2016;db160806. Available from: http://diabetes.diabetesjournals.org/lookup/doi/10.2337/db16-0806

3. Quispe R, Martin SS, Jones SR. Triglycerides to high-density lipoprotein-cholesterol ratio, glycemic control and cardiovascular risk in obese patients with type 2 diabetes. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes [Internet]. 2016;23(2):150–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26863278

4. Organizacion Mundial de la Salud. Diabetes [Internet]. 2016. 2016. Available from: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/

5. Ensanut. ENSANUT 2012 [Internet]. Instituto Nacional de Salud Pública. 2012. p. 200. Available from: http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf

6. ENSANUT. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. Ensanut. 2016;2016(Ensanut):1–154.

7. Flores Hernández S. Diabetes en adultos : urgente mejorar la atención y el control. México D.F.; 2012.

8. Kitada M, Ogura Y, Koya D. Rodent models of diabetic nephropathy: Their utility and limitations. Int J Nephrol Renovasc Dis. 2016;9:279–90.

9. Al-awar A, Kupai K, Veszelka M, Szűcs G, Attieh Z, Murlasits Z, et al. Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models. J Diabetes Res [Internet]. 2016;2016:1–12. Available from: http://www.hindawi.com/journals/jdr/2016/9051426/

10. Eddouks M, Chattopadhyay D, Zeggwagh NA. Animal models as tools to investigate antidiabetic and anti-inflammatory plants. Evidence-based Complement Altern Med. 2012;2012.

11. Nonato AO, Olivon VC, Dela Justina V, Zanotto CZ, Webb RC, Tostes RC, et al. Impaired Ca2+ Homeostasis and Decreased Orai1 Expression Modulates Arterial Hyporeactivity to Vasoconstrictors During Endotoxemia. Inflammation [Internet]. 2016; Available from: http://link.springer.com/10.1007/s10753-016-0354-y

12. Sonkusare S, Palade PT, Marsh JD, Telemaque S, Pesic A, Rusch NJ.

Vascular calcium channels and high blood pressure: Pathophysiology and therapeutic implications. Vascul Pharmacol. 2006;44(3):131–42.

13. Marsh S a, Powell PC, Agarwal A, Italia LJD, Chatham JC. Cardiovascular dysfunction in Zucker obese and Zucker diabetic fatty rats : role of hydronephrosis. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007;0005:292–8.

14. Bhupathiraju S, Hu F. Epidemiology of obesity and diabetes and their cardiovascular complications. Circ Res [Internet]. 2016;118(11):1723–35. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4887150/pdf/nihms782193.pdf

15. O CJ, Elosua R, Barcelona España CIBER en Epidemiología Salud Pública Barcelona España M. Factores de riesgo cardiovascular. Perspectivas derivadas del Framingham Heart Study Cardiovascular Risk Factors. Insights From Framingham Heart Study. Rev Esp Cardiol. 2008;61(3):299–310.

16. Ferrannini E, DeFronzo RA. Impact of glucose-lowering drugs on cardiovascular disease in type 2 diabetes. Eur Heart J. 2015;36(34):2288–96.

17. Halter J b. Diabetes and Cardiovascular Disease in Older Adults: Current Status and Future Directions. Diabetes. 2014;63.

18. Hien TT, Turczy??ska KM, Dahan D, Ekman M, Grossi M, Sj??gren J, et al. Elevated glucose levels promote contractile and cytoskeletal gene expression in vascular smooth muscle via rho/protein kinase C and actin polymerization. J Biol Chem. 2016;291(7):3552–68.

19. Shi Y, Vanhoutte PM. Macro- and Microvascular Endothelial Dysfunction in Diabetes. J Diabetes [Internet]. 2017; Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28044409%0Ahttp://doi.wiley.com/10.1111/1753-0407.12521

20. Creager MA, Lüscher TF, Cosentino F, Beckman JA. Diabetes and vascular disease. Pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. Circulation. 2003;108(12):1527–32.

21. Fernandez-Velasco M, Ruiz-Hurtado G, Gomez AM, Rueda A. Ca2+ handling alterations and vascular dysfunction in diabetes. Cell Calcium [Internet]. 2014;56(5):397–407. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2014.08.007

22. Mulroney SE, Myers AK, Netter FH. NETTER Fundamentos de Fisiología. Primera. Madrid: Saunders, Elsevier; 2011. 387 p.

23. Walter F. Boron ELB. Fisiología Médica. 3a ed. 2017. 1290 p.

24. Bosque Gómez AR. Proliferación vascular inducida por genes. Rev Fac Med UNAM Enero-Febrero. 2001;44(1):38–41.

25. Guyton, Arthur C.; Hall JE. Fisiología Médica Guyton and Hall 12a Ed. 12a ed. Elsevier, editor. Barcelona, España; 2011. 1083 p.

26. Patton KT, Thibodeau GA. The Human Body In Health & Disease. 6th ed. Elsevier, editor. Maryland: Mosby; 2014. 770 p.

27. Smani T, Shapovalov G, Skryma R, Prevarskaya N, Rosado JA. Functional and physiopathological implications of TRP channels. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res [Internet]. 2015;1853(8):1772–82. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.04.016

28. Blaustein M, Kao J, Matteson D. CELLULAR PHYSIOLOGY AND NEUROPHYSIOLOGY. 2nd ed. ELSEVIER MOSBY; 2012. 337 p.

29. Ghosh D, Syed AU, Prada MP, Nystoriak MA, Santana LF, Nieves-Cintrón M, et al. Calcium Channels in Vascular Smooth Muscle. Adv Pharmacol. 2017;78:49–87.

30. Debertrand F, Nelson MT, Brayden JE. Ryanodine receptors, calcium signaling and regulation of vascular tone in the cerebral parenchymal microcirculation. Biophys Chem. 2005;257(5):2432–7.

31. Hashitani H, Lang RJ. Spontaneous activity in the microvasculature of visceral organs: role of pericytes and voltage-dependent Ca(2+) channels. J Physiol. 2015;3:555–65.

32. Spinelli AM, Trebak M. ORAI Channel-Mediated Ca $^{2+}$ Signals in Vascular and Airway Smooth Muscle. Am J Physiol - Cell Physiol [Internet]. 2015;0850(717):ajpcell.00355.2015. Available from: http://ajpcell.physiology.org/lookup/doi/10.1152/ajpcell.00355.2015

33. Chu X, Xiong Z. Sodium Calcium Exchange: A Growing Spectrum of Pathophysiological Implications. In: Sodium Calcium Exchange: A Growing Spectrum of Pathophysiological Implications [Internet]. 2013. p. 419–31. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3631472&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

34. Brozovich F V, Nicholson CJ, Degen C V, Gao YZ, Aggarwal M, Morgan KG. Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Contraction and the Basis for Pharmacologic Treatment of Smooth Muscle Disorders. Pharmacol Rev [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2016 Oct 19];68(2):476–532. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27037223

35. O’Donnell CJ, Elosua R. Cardiovascular Risk Factors. Insights From Framingham Heart Study. Rev Esp Cardiol. 2008;61(3):299–310.

36. Basha B, Samuel SM, Triggle CR, Ding H. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: Possible involvement of endoplasmic reticulum stress? Exp Diabetes Res. 2012;2012.

37. Ding H, Triggle CR. Endothelial dysfunction in diabetes: Multiple targets for treatment. Pflugers Arch Eur J Physiol. 2010;459(6):977–94.

38. Triggle CR, Samuel SM, Ravishankar S, Marei I, Arunachalam G, Ding H. The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways. Can J Physiol Pharmacol [Internet]. 2012;90(6):713–38. Available from: http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/y2012-073

39. Sheikh AQ, Hurley JR, Huang W, Taghian T, Kogan A, Cho H, et al. Diabetes alters intracellular calcium transients in Cardiac endothelial cells. PLoS One. 2012;7(5):1–9.

40. Casella S, Bielli A, Mauriello A, Orlandi A. Molecular pathways regulating macrovascular pathology and vascular smooth muscle cells phenotype in type 2 diabetes. Int J Mol Sci. 2015;16(10):24353–68.

41. El-najjar N, Kulkarni RP, Nader N, Hodeify R, Machaca K. Effects of Hyperglycemia on Vascular Smooth Muscle Ca 2 + Signaling. 2017;2017.

42. Pinho JF, Medeiros MAA, Capettini LSA, Rezende BA, Campos PP, Andrade SP, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase-?? up-regulates L-type Ca 2+ currents and increases vascular contractility in a mouse model of type 1 diabetes. Br J Pharmacol. 2010;161(7):1458–71.

43. Curtis TM, Major EH, Trimble ER, Scholfield CN. Diabetes-induced activation of protein kinase C inhibits store-operated Ca2+ uptake in rat retinal microvascular smooth muscle. Diabetologia [Internet]. 2003 Sep [cited 2015 May 22];46(9):1252–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12898009

44. Evans JF, Lee JH, Ragolia L. 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. Mol Cell Endocrinol. 2009;302(1):49–57.

45. Tam ESL, Fergusok DG, Bielefeld DR, Loret JN, Cohen RM, Pun RYK. Norepinephrinemmediated calcium signaling is altered in vascular smooth muscle of diabetic rat. 1997;21:143–50.

46. Fleischhacker E, Esenabhalu E, Spitaler M, Holzmann S, Skrabal F, Koidl B, et al. Human diadetes is associated with hyperreactivity of vascular smooth muscle cells due to altered subcellular Ca 2+ distribution. Diabetes. 1999;48:1323–30.

47. Hill BJF, Price EM, Dixon JL, Sturek M. Increased calcium buffering in coronary smooth muscle cells from diabetic dyslipidemic pigs.

Atherosclerosis. 2003;167(1):15–23.

48. Berra-Romani R, Mazzocco-Spezzia A, Pulina M V, Golovina VA. Ca2+ handling is altered when arterial myocytes progress from a contractile to a proliferative phenotype in culture. Am J Physiol Cell Physiol. 2008;295(3):C779–90.

49. Berra-Romani R, Rinaldi C, Raqeeb A, Castelli L, Magistretti J, Taglietti V, et al. The duration and amplitude of the plateau phase of ATP- and ADP-evoked Ca(2+) signals are modulated by ectonucleotidases in in situ endothelial cells of rat aorta. J Vasc Res. 2004;41(2):166–73.

50. Berra-Romani R, Blaustein MP, Matteson DR. TTX-sensitive voltage-gated Na+ channels are expressed in mesenteric artery smooth muscle cells. AJP - Hear Circ Physiol [Internet]. 2005;289(1):H137–45. Available from: http://ajpheart.physiology.org/cgi/content/abstract/289/1/H137

51. Tirmenstein M, Horvath J, Graziano M, Mangipudy R, Dorr T, Colman K, et al. Utilization of the Zucker Diabetic Fatty (ZDF) Rat Model for Investigating Hypoglycemia-related Toxicities. Toxicol Pathol. 2015;43(6):825–37.

52. Fridlyand LE, Philipson LH. Reactive species and early manifestation of insulin resistance in type 2 diabetes. Diabetes Obes Metab. 2006;8(2):136–45.

53. Wang Y-W, Sun G-D, Sun J, Liu S-J, Wang J, Xu X-H, et al. Spontaneous type 2 diabetic rodent models. J Diabetes Res. 2013;2013:401723.

54. King A, Bowe J. Animal models for diabetes: Understanding the pathogenesis and finding new treatments. Biochem Pharmacol. 2016;99:1–10.

55. Shiota M, Printz RL. Animal Models in Diabetes Research. 2012;933.

56. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes. 2018;41(January).

57. Xia J, Grondin JM, Jakubowski JA, Lilly E. Acute Hyperglycemia Induced by KetaminelXylazine Anesthesia in Rats: Mechanisms and Implications for Preclinical Models. BioiMed. 2005;230(4):777–84.

58. Chait A, Bornfeldt KE. Diabetes and atherosclerosis : is there a role for hyperglycemia ? 2009;335–9.

59. Wray S, Burdyga T. Sarcoplasmic Reticulum Function in Smooth Muscle. 2010;113–78.

60. Searls YM, Loganathan R, Smirnova I V, Stehno-bittel L. Intracellular Ca 2 + regulating proteins in vascular smooth muscle cells are altered with type 1 diabetes due to the direct effects of hyperglycemia. 2010;1–17.

61. Velmurugan G V, White C. Calcium homeostasis in vascular smooth muscle cells is altered in type 2 diabetes by Bcl-2 protein modulation of InsP 3 R calcium release channels. 2012;124–34.

62. Periasamy M, Kalyanasundaram A. SERCA pump isoforms: Their role in calcium transport and disease. Muscle and Nerve. 2007;35(4):430–42.

63. Stein WD, Litman T. Primary Active Transport Systems. Channels, Carriers, and Pumps. 2015. 247-328 p.

64. Breemen C Van, Fameli N, Evans AM. Pan-junctional sarcoplasmic reticulum in vascular smooth muscle : nanospace Ca 2 + transport for site- and function-specific Ca 2 + signalling. 2013;8:2043–54.

65. Hill BJF, Price EM, Dixon JL, Sturek M. Increased calcium buffering in coronary smooth muscle cells from diabetic dyslipidemic pigs. Atherosclerosis. 2003;167(1):15–23.

66. Benard LC, Ramírez LMM, Valderrama JEC, Soto EF. Importancia del intercambiador Na+/Ca2+ en la regulación del Ca2+ intracelular en el músculo liso de las vías aéreas. Rev del Inst Nac Enfermedades Respir. 2010;69(1):39–45.

67. Ong HL, Ambudkar IS. STIM-TRP pathways and microdomain organization: Contribution of TRPC1 in store-operated Ca2+ entry: Impact on Ca2+ signaling and cell function. Vol. 993, Advances in Experimental Medicine and Biology. 2017. 159-188 p.

68. Fernández-velasco M, Ruiz-hurtado G, Gómez AM, Rueda A. Cell Calcium Ca 2 + handling alterations and vascular dysfunction in diabetes. Cell Calcium. 2014;56(5):397–407.

69. Prakriya M, Lewis RS. Store-Operated Calcium Channels. Physiol Rev [Internet]. 2015;95(4):1383–436. Available from: http://physrev.physiology.org/lookup/doi/10.1152/physrev.00020.2014

70. Ma L, Zhu B, Chen X, Liu J, Guan Y, Ren J. Abnormalities of sarcoplasmic reticulum CA2+mobilization in aortic smooth muscle cells from streptozotocin-induced diabetic rats. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2008;35(5–6):568–73.

11 ANEXOS

11.1 LOGÍSTICA

11.1.1 Recursos humanos

Investigadores expertos:

D.C. Roberto Berra Romani

D.C. Mario García Carrasco

Alumno de la Maestría en Ciencias Médicas e Investigación:

Germán Alfredo García Moreno

11.1.2 Recursos materiales

Se contó con los recursos materiales del Laboratorio de Fisiología Cardiovascular de la Facultad de Medicina de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).

11.1.3 Recursos financieros

Se contó con los recursos financieros del Laboratorio de Fisiología Cardiovascular de la Facultad de Medicina de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).

11.2 BIOÉTICA

El procedimiento experimental se llevó a cabo de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, descrita bajo el Título 7 de la Ley General de Salud en Materia de Investigación.” No existe otro

procedimiento conocido para hacer ese protocolo sin la utilización de seres vivos. Las ratas estuvieron confinadas en el bioterio de la Facultad de Medicina, a cargo de su cuidado estuvo el MVZ Martín Páez Peláez, encargado del mantenimiento, manejo y desecho de los modelos animales de investigación con los que se trabaja en la Facultad de Medicina. Se colocaron en cajas adecuadas para su movilización y adoptamiento de postura según la especie, protegidos de amenazas externas y de escape de los especímenes, con ventilación adecuada, agua y alimento ad libitum, limpios y secos, en el bioterio sólo se manejan roedores como modelos de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999, 5.1.). La eutanasia se realizó por un incremento en la inoculación del anestésico a dosis recomendadas para tal efecto (NOM-062-ZOO-1999, 9.1.). Los cadáveres se concentraron para su recolección en las instalaciones destinadas para tal efecto en la Facultad de Medicina, siguiendo las instrucciones de la NOM-087-ECOL-2002; 4.3.3., 6. y 7.

Anexo 1. Definición de las variables y escalas de medición

VARIABLES DE ESTUDIO	**DEFINICIÓN CONCEPTUAL**	**DEFINICIÓN OPERACIONAL**	**ESCALA DE MEDICIÓN**	**UNIDADES DE ESCALA**
Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2)	Es un desorden metabólico de etiología múltiple que manifiesta niveles elevados de glucosa en sangre, se caracteriza por un defecto en la acción y/o secreción de la insulina	Niveles de glucosa en sangre mayores a 200 mg/dl en ratas después de aplicar la prueba de tolerancia a la glucosa en ratas	Categórica	con diabetes sin diabetes
Peso	Cantidad en gramos del peso corporal de cada rata	Medición del peso de cada rata	Cuantitativa Continua	gr
Largo	Longitud comprendida entre la base de la cola y la punta de la nariz	Medición de la distancia existente entre la base de la cola y la punta de la nariz	Cuantitativa Continua	cm
Circunferencia abdominal	Longitud de la circunferencia de la parte media del abdomen	Medición de la parte media abdominal	Cuantitativa Continua	cm
Grasa epididimal	Formación de tejido adiposo en la parte superior del epidídimo testicular	Extracción de la grasa epididimal de ambos testículos	Cuantitativa Continua	gr
Parámetros de medición de la señal de Ca^{2+} intracelular				
Basal	Nivel de señal inicial, previo al tratamiento experimental	Niveles de fluorescencia iniciales, previos a la estimulación del agonista	Cuantitativa Continua	Unidades arbitrarias (UA) Ratio F340/F380

Amplitud del pico	Diferencia entre el valor del punto máximo de la señal y el valor basal	Diferencia entre el punto más alto de fluorescencia obtenido al estimular a las células de ML y el valor basal	Cuantitativa Continua	Unidades arbitrarias (UA) Ratio F340/F380
Amplitud de la meseta	Valor de la señal derivada del estímulo que se mantiene constante por encima del valor basal	Aumento en la fluorescencia por arriba de los niveles basales que se mantiene constante después del pico inicial de la señal generado por el estímulo	Cuantitativa Continua	Unidades arbitrarias (UA) Ratio F340/F380
Duración de la respuesta	Tiempo que tarda en reducir el efecto del estímulo	Tiempo que tarda, la amplitud del pico de la señal de Ca^{2+} en reducirse en 90 (tiempo 90%), 60 (tiempo 60%) y 30 % (tiempo 30 %), tomando como tiempo 0 el tiempo en que se genera el pico inicial de la señal de calcio activada por la aplicación del estímulo	Cuantitativa Continua	segundos
Área bajo la curva	Área obtenida del estímulo a partir del registro de la señal	Es el área delimitada por el registro de la señal de calcio desde que se aplica el estímulo hasta que se remueve	Cuantitativa Continua	Unidades arbitrarias (UA) Ratio F340/f380