

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE MEDICINA

Licenciatura en Biomedicina

Laboratorio de Fisiología Cardiovascular

TESIS

“Alteraciones causadas por la Diabetes Mellitus tipo II sobre la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en células endoteliales *in situ* de aorta de rata”

Para obtener el grado de:

Licenciado en Biomedicina

P R E S E N T A

JOSÉ ALONSO ROMERO

DIRECTOR EXPERTO

DC. Roberto Berra Romani

Facultad de Medicina

BUAP

DIRECTOR METODOLÓGICO

DC. Julián Torres Jácome

Instituto de Fisiología

BUAP

Puebla, Puebla.

Julio 2015

INDICE

RESUMEN	3
ABREVIATURAS	5
1. ANTECEDENTES	7
1.1. Endotelio Vascular	7
1.2. Funciones del Endotelio Vascular	7
1.2.1. Barrera Selectiva	7
1.2.2. Control Hemostático	8
1.2.3. Activación de la Angiogénesis	9
1.2.4. Regulación del Tono Vascular	9
1.3. Ca ²⁺ Intracelular y Función Vascular	11
1.3.1. Mecanismos que aumentan la concentración de Ca ²⁺ intracelular	13
1.4. Diabetes Mellitus.....	23
1.4.1. Diabetes Mellitus y Disfunción Endotelial	25
1.4.2. Modelos Animales para el Estudio de la Diabetes Mellitus.....	27
1.4.3. Ratas Zucker Diabetic Fatty (ZDF) como Modelo de Diabetes Mellitus tipo II.	29
2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	30
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	32
5. JUSTIFICACION.....	33
6. HIPOTESIS	34
7. OBJETIVO GENERAL.....	34
8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
9. ASPECTOS ÉTICOS	35
10. ESQUEMA DE TRABAJO	36
11. MATERIAL Y MÉTODOS	37
11.1. Medición de Parámetros Bioquímicos	38

11.2. Disección de la Aorta.....	38
11.3. Medición de Ca ²⁺ Intrcelular	40
11.4. Análisis de Resultados	43
11.5. Soluciones	44
12. RESULTADOS.....	46
12.1. Parámetros Bioquímicos y Somáticos.....	46
12.2. Efecto de la DMII Sobre la Concentración de Ca ²⁺ Basal en Células Endoteliales <i>in situ</i> de Aorta de Rata.....	49
12.3. Efecto de la DMII Sobre la Señal de Ca ²⁺ Evocada por ATP en Células Endoteliales <i>in situ</i> de Aorta de Rata.....	50
12.4. Efecto de la DMII Sobre la Actividad del Intercambiador Na ⁺ -Ca ²⁺ (NCX) en la Regulación de la Señal de Ca ²⁺ Evocada por ATP.....	52
12.4.1. Efecto de la remoción de Na ⁺ extracelular en la señal de Ca ²⁺ inducida por ATP en endotelio <i>in situ</i> de aorta de rata en ausencia de Ca ²⁺ extracelular.	53
12.4.2. Efecto del KB-R 7943 en la señal de Ca ²⁺ inducida por ATP en ausencia de Ca ²⁺ extracelular.	55
12.5. Efecto de la DM Sobre la Actividad de la SERCA en la Regulación de la Señal de Ca ²⁺ Generada por ATP en Ausencia de Ca ²⁺ Extracelular.....	56
12.6. Efecto de la DMII Sobre la Actividad de la PMCA en la Señal de Ca ²⁺ Inducida por ATP en Ausencia de Ca ²⁺ Extracelular.....	58
12.7. Efecto de la DMII Sobre la Entrada de Ca ²⁺ del Medio Extracelular a Través de Canales Activados por los Almacenes Intracelulares de Ca ²⁺ (SOCE).....	60
13. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	64
14. CONCLUSIONES	69
15. BIBLIOGRAFIA	70

RESUMEN

La Diabetes Mellitus (DM) es catalogada como un desorden metabólico de etiología múltiple caracterizado por un aumento de glucosa en sangre. En la actualidad, la DM es una de las principales causas de muerte en nuestro país aumentando de 3-4 veces el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares como son: hipertensión, aterosclerosis, padecimientos coronarios o episodios como infartos, muerte súbita y derrame cerebral. A pesar de los múltiples estudios realizados en la fisiopatología de la DM, a la fecha se desconocen los mecanismos moleculares precisos por los cuales la DM causa estas alteraciones a nivel vascular. A la fecha se sabe que la disfunción del endotelio es el evento que antecede a la aparición y desarrollo de las patologías cardiovasculares antes mencionadas y ésta se caracteriza por una reactividad vascular anormal, disminución en la biodisponibilidad del óxido nítrico, un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno, alteración de la permeabilidad vascular, incremento de sustancias pro-coagulantes, pro-trombóticas, y mediadores pro-inflamatorios. Gran parte de las funciones que realiza el endotelio vascular tiene como común denominador la vía de señalización por Ca^{2+} intracelular. A pesar de las múltiples evidencias que relaciona a la DM - disfunción endotelial y función endotelial - Ca^{2+} intracelular, a la fecha no hay estudios que analicen la señalización de Ca^{2+} intracelular en células endoteliales *in situ* en modelos animales que presenten diabetes mellitus tipo II (DMII), la más común en el humano. Por lo tanto el objetivo del presente trabajo fue el de evaluar el efecto de la DMII sobre los mecanismos de regulación del Ca^{2+} intracelular en células endoteliales *in situ* de aorta de rata de la cepa Zucker Diabetic Fatty (ZDF). Se utilizaron ratas de 3 meses de edad a las cuales se les extrajo la aorta abdominal, la cual fue incubada con Fura-2 y la señal de Ca^{2+} intracelular fue registrada por medio de técnicas de micro-fluorescencia. El fenotipo obeso de las ratas ZDF presentó: obesidad, aumento de grasa epididimal, aumento en la concentración de glucosa en sangre, resistencia a la insulina y dislipidemia. Mediante la disección farmacológica, utilizando bloqueadores específicos para cada uno de los

mecanismos implicados en la regulación de la señal de Ca^{2+} encontramos que la DMII causa: 1) un aumento en la actividad de la bomba de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (SERCA), 2) incremento en la actividad de la bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA), 3) incremento en la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular a través de los canales de Ca^{2+} operados por los almacenes intracelulares de Ca^{2+} (SOC). No encontramos cambios aparentes en la función del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX). Estos resultados nos permiten concluir que la DMII efectivamente causa alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en células endoteliales *in situ* de aorta de rata.

ABREVIATURAS

A.B.C. Área bajo la curva.

ATP. Adenosin-1,4,5-trifosfato.

ACh. Acetilcolina.

ADA. Asociación Americana de Diabetes.

Ca²⁺. Ion calcio.

[Ca²⁺]_i. Concentración de Ca²⁺ libre intracelular.

DM. Diabetes mellitus.

DMI. Diabetes mellitus tipo 1.

DMII. Diabetes mellitus tipo 2.

DMG. Diabetes mellitus gestacional.

EGTA. Etilen-glicol-bis (β-aminoetiléter) N, N, N', N ácido tetrácidoacético).

HDL. Lipoproteínas de alta densidad.

Hb_{A1C}. Hemoglobina glucosilada.

IP₃. Inositol 1, 4, 5-trifosfato.

IP₃R. Receptor al fosfatidilinositoltrifosfato.

LDL. Lipoproteínas de baja densidad.

LE. Long Evans

LZDF. Fenotipo delgado de la cepa Zucker Diabetic Fatty.

Na⁺. Ion sodio.

NCX. Intercambiador Na⁺/Ca²⁺.

NMDG. N-metil D glucamina.

NO. Óxido nítrico.

OMS. Organización Mundial de la Salud.

OZDF. Fenotipo obeso de la cepa Zucker Diabetic Fatty.

PLC. Fosfolipasa C.

PMCA. Bomba ATPasa de Ca^{2+} en la membrana plasmática.

PSS. Solución fisiológica de sales.

RE. Retículo endoplásmico.

ROC. Canales de Ca^{2+} activados por receptor.

ROI. Regiones de interés.

RyR. Receptor a rianodina.

SERCA. Bomba de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico.

SMOC. Canales activados por segundos mensajeros.

SOC. Canales activados por almacenes intracelulares de Ca^{2+} .

SOCE. Entrada de Ca^{2+} activada por los almacenes intracelulares.

STIM-1. Stromal interaction molecule 1.

STZ. Estreptozotocina.

TAG. Triglicéridos.

VLDL. Lipoproteínas de muy baja densidad.

VOC. Canales operados por voltaje.

ZDF. Zucker Diabetic Fatty.

1. ANTECEDENTES

1.1. Endotelio Vascular

El endotelio vascular (EV) recubre la superficie interna de los vasos sanguíneos y cavidades internas del corazón (Alexánder, 2014). Por tal localización anatómica, las células endoteliales (CE's) presentan polaridad, es decir, poseen un extremo apical que interacciona directamente con los componentes del torrente sanguíneo (eritrocitos, plaquetas y células del sistema inmune) y un extremo basal en estrecho contacto con la lámina basal endotelial, la cual se conecta a su vez, con las células de músculo liso de los vasos sanguíneos (Boron, 2012).

1.2. Funciones del Endotelio Vascular

Por muchos años la capa endotelial fue considerada un tejido inerte, una mera barrera física entre el torrente sanguíneo y el intersticio; actualmente se reconoce al EV como un tejido metabólicamente activo, cuya posición estratégica le permite desempeñar una función importante en el control de la homeostasis vascular, con actividad parácrina, endócrina, autócrina (Sena, Pereira, & Seif, 2013b) y juxtácrina (o contacto dependiente) (Oakley & Tharakan, 2014). Las funciones que realizan las CE's, pueden ser clasificadas de la siguiente manera:

1.2.1. Barrera Selectiva

El EV constituye una barrera selectiva y semipermeable para moléculas y células que se mueven del torrente sanguíneo al intersticio y de manera contraria. El área total estimada de esta barrera es de aproximadamente 500 m² (Alexánder, 2014). En condiciones fisiológicas, la permeabilidad endotelial permite el libre paso de agua y solutos de pequeñas dimensiones con un peso molecular menor a 200 kDa (por ejemplo, iones, aminoácidos y glucosa), pero no de proteínas. Sin

embargo, en condiciones patológicas las CE's puede consentir el paso de elementos celulares, tal como ocurre en los procesos inflamatorios e inmunitarios (De Bock *et al.*, 2013). Dos rutas principales controlan el paso de proteínas, solutos y fluidos a través de la barrera endotelial, regulando de ésta manera la permeabilidad del endotelio vascular y la homeostasis de los fluidos: la **vía paracelular** que consiste en intercambio de solutos de < 3nm de radio a través de las uniones inter-endoteliales que incluyen a las uniones ocluyentes y las uniones adherentes; y **vía transcelular**, que consiste en el intercambio de macromoléculas, como la albúmina, atravesando a las CE's mediante tráfico vesicular (Goddard & Iruela-Arispe, 2013; Komarova & Malik, 2010).

1.2.2. Control Hemostático

El EV tiene una función fundamental en el control de la hemostasia, gracias a sus propiedades: **a) antiplaquetarias**, mediante la liberación de sustancias vaso-activas, como el óxido nítrico, prostaciclina y ecto-nucleotidasas, evitando que las plaquetas y los factores de la coagulación alcancen la matriz extracelular (de Groot, Urbanus, & Roest, 2012), **b) anticoagulantes**, función mediada por trombomodulina que actúan de manera directa en la trombina convirtiéndosela en un complejo llamado trombina-trombomodulina. **c) fibrinolíticas**, sintetizando el activador de plasminógeno tisular (t-PA) factor von Willebrand (vWF), inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI), y el receptor activado por proteasa (PAR) (Tanaka, Key, & Levy, 2009; LaMattina *et al.*, 2014). En adición, en procesos infecciosos, el endotelio media la adhesión de leucocitos a moléculas de adhesión presentes en la membrana de las mismas CE's (selectinas e integrinas) (Ghasemzadeh & Hosseini, 2013; Versteeg, Heemskerk, Levi, & Reitsma, 2013).

1.2.3. Activación de la Angiogenesis

Las CE's son las principales formadoras de nuevos vasos sanguíneos durante el proceso conocido como angiogenesis. Las CE's dejan el vaso preexistente moviéndose a través de la matriz extracelular, proliferando y finalmente deteniendo su actividad mitogénica y reorganizándose en lo que será un nuevo vaso sanguíneo. La proliferación y migración de las CE's, que representan el inicio del proceso de angiogenesis, parten de la activación de los receptores con actividad de tirosin cinasa (VEGFR-1 y VEGFR-2) por el acople del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), la interacción con moléculas de adhesión (CAMs) incluyendo integrinas, cadherinas, selectinas y proteínas de la super-familia de las inmunoglobulinas (Persson & Buschmann, 2011; Rahimi *et al.*, 2012; Diaz-Santana, Shan, & Stroock, 2015).

1.2.4. Regulación del Tono Vascular

Las CE's controlan el estado contráctil de los vasos sanguíneos a través de la producción y liberación de una gran variedad de sustancias vaso-activas que actúan de forma parácrina sobre las células musculares lisas adyacentes, regulando su contracción (Triggle *et al.*, 2012). Dentro de los factores vasoconstrictores más potentes liberados por el endotelio se encuentran la endotelina-1 (ET-1) (Rapoport & Zuccarello, 2012) y vía actividad de la enzima convertidora de angiotensina endotelial (ACE) que se encuentra localizada en la superficie luminal de las CE's, tenemos a la angiotensina II (Ang II) (Triggle *et al.*, 2012). Las CE's también expresan la sintetasa de tromboxano y pueden sintetizar el vasoconstrictor tromboxano A; en adición la PGI₂ a altas concentraciones puede activar a los receptores de tromboxano y mediar la vasoconstricción (Sandoo *et al.*, 2010; Bełtowski & Jamroz-Wiśniewska, 2014). En los últimos años se han caracterizado diferentes factores **vaso-relajantes** derivados del endotelio, entre los más estudiados se encuentran: el óxido nítrico (NO) (Furchgott & Zawadzki,

1980; Palmer, Ferrige, & Moncada, 1987), prostaciclina (PGI_2) y el factor hiperpolarizante derivado de endotelio comúnmente conocido como EDHF (Flammer & Lüscher, 2010). Recientemente se han identificado otras sustancias que se han incluido en la lista de factores vaso-relajantes como son: el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Silva *et al.*, 2013), sulfuro de hidrógeno (H_2S) (Mustafa *et al.*, 2011), monóxido de carbono (CO) (Triggle *et al.*, 2012), productos del citocromo P450 tales como el ácido epoxy-eicosatrienoico (EETs) (Roman, 2002) y otros más se encuentran en estudio.

1.2.4.1. Óxido Nítrico y Tono Vascular

La importancia del endotelio en la regulación de la función vascular fue reconocida por primera vez como resultado de las observaciones hechas por Robert Furchgott y su investigador asistente, John Zawadzki, demostrando que la relajación de la aorta de conejo inducida por la aplicación de acetilcolina era dependiente del endotelio vascular (Furchgott & Zawadzki, 1980). Estos estudios sugirieron que la relajación de la aorta estaba dada por un factor difusible, denominado entonces como “factor relajante derivado del endotelio (EDRF) (Furchgott & Zawadzki, 1980). En 1987, como resultado de los trabajos realizados por Moncada y colaboradores, el EDRF fue convincentemente identificado como óxido nítrico (NO) (Palmer *et al.*, 1987). Ahora sabemos que además de su función relajante sobre el músculo liso, tiene una acción parácrina primordialmente protectora. El - NO Inhibe: la agregación y adhesión plaquetaria (Alheid, Frölich, & Förstermann, 1987; Busse, Lückhoff, & Bassenge, 1987), adhesión de leucocitos (Kubes, Suzuki, & Granger, 1991), síntesis de DNA, mitogénesis y proliferación de células del músculo liso vascular (Garg & Hassid, 1989; Hogan, Cerami, & Bucala, 1992; Nakaki, Nakayama, & Kato, 1990; Nunokawa & Tanaka, 1992). En adición, el NO estimula la angiogénesis (Förstermann & Sessa, 2012; Murohara *et al.*, 1998) y la activación de CE’s progenitoras (Huang, Fleissner, Sun, & Cooke, 2010; Landmesser *et al.*, 2004). El endotelio es capaz de sintetizar NO gracias a una

enzima llamada óxido nítrico sintetasa (NOS). Esta enzima tiene tres isoformas diferentes, una de ellas, la isoforma constitutiva, óxido nítrico sintetasa endotelial eNOS (NOS-III), óxido nítrico sintetasa neuronal (nNOS/nNOS-I) e iNOS inducible (iNOS/NOS-II), bajo ciertas condiciones, son capaces de sintetizar NO (Sönmez & Tascioglu, 2015). El NO es sintetizado a partir de L-arginina por la enzima eNOS en el endotelio vascular, esta es una enzima estrictamente dependiente del complejo Ca^{2+} -Calmodulina. Este complejo se forma cuando aumenta la concentración de Ca^{2+} libre intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) en las CE's en respuesta a diferentes agonistas vaso-activos (Quillon, Fromy, & Debret, 2015), o estímulos físicos. En la **Figura 1** se esquematiza el mecanismo de la síntesis del óxido nítrico (NO).

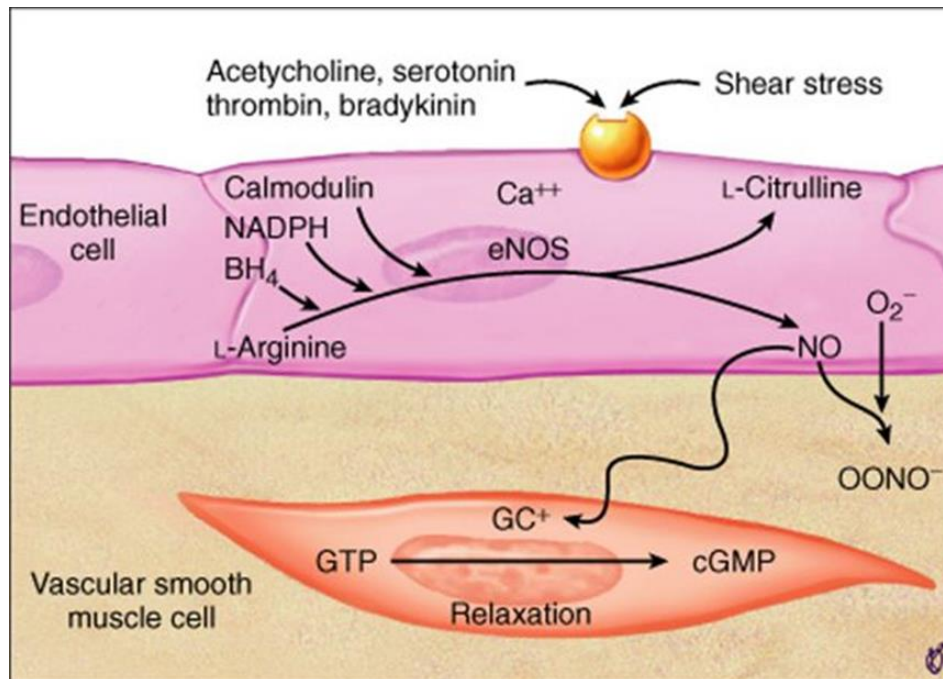


Figura 1. Síntesis de óxido nítrico. A partir de distintos estímulos como pueden ser farmacológicos: acetilcolina, serotonina, trombina y bradicinina o estímulos físicos como puede ser: la fuerza de estrés mecánico que genera el flujo del torrente sanguíneo sobre las paredes arteriales, se produce un aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$; provocando que la enzima óxido nítrico sintetasa (eNOS) en las células endoteliales sintetice el óxido nítrico (NO) y L-citrulina en presencia de L-arginina y cofactores como tetrahidrobiopterina, NADPH y calmodulina. El NO activa a las guanilato ciclasas solubles del músculo liso vascular, para producir la conversión de trifosfato de guanosina cíclico (cGTP) en monofosfato de guanosina cíclico (cGMP), que finalmente induce la relajación de los vasos sanguíneos. Imagen obtenida de Braunwald E. "Tratado de cardiología" 7 ed.

El ion calcio (Ca^{2+}) es un segundo mensajero que participa en numerosos mecanismos de transducción de señales. La vía de señalización por Ca^{2+} , está presente en el control de mayoría de los procesos celulares (Tidow et al., 2012), desde los orígenes de un nuevo organismo al momento de la fertilización; a lo largo de los procesos nerviosos que lo acompañan; con cada latido de su corazón y en cada paso que sus músculos conduzcan, el Ca^{2+} interviene en la homeostasis celular, traduciendo señales externas al lenguaje interno de la célula y de esta manera responder, adaptarse y continuar con el fenómeno de la vida. Actualmente es clara la participación del Ca^{2+} en procesos como: proliferación, transcripción, exocitosis, apoptosis, respuesta inmune, neurotransmisión, entre muchas otras.

En particular, gran parte de las funciones que desempeñan las CE's en el sistema cardiovascular, anteriormente mencionadas, están moduladas por la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. En células del endotelio en reposo, es decir no estimuladas, la concentración citoplasmática de Ca^{2+} libre es baja, de aproximadamente 100-300 nM (Majewski & Kuznicki, 2015a), en comparación con la concentración del espacio extracelular (2 mM) (Tidow et al., 2012) o la concentración del principal reservorio de Ca^{2+} intracelular, el retículo endoplásmico (RE) (1 - 1.2mM) (Dupont & Croisier, 2010; Moccia, et al., 2012). Esta diferencia de concentraciones favorece un gradiente de concentración de Ca^{2+} en dirección al interior citoplasmático de las células. Los niveles de Ca^{2+} intracelular aumentan tras la activación celular.

Debido a que el EV se encuentra en la interfaz de la pared del vaso sanguíneo y torrente sanguíneo, las CE's están expuestas a **estímulos químicos** como son: hormonas circulantes, autacoides, citocinas, factores de crecimiento y diversos fármacos, así como a **estímulos mecánicos**; tales como el estiramiento pulsátil, estrés mecánico que genera el flujo del torrente sanguíneo sobre las paredes arteriales y cambios en la presión osmótica local. Ambos estímulos promueven un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (de aproximadamente 100nM a un rango de concentración de 50-100 μM) (Majewski & Kuznicki, 2015a). Tal aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, puede activar la producción y secreción de factores vaso-activos, como la ET1, las

prostaciclina, el NO (ver **Figura 1**) y el factor von Willebrand, aumentar la permeabilidad vascular (Mumtaz *et al.*, 2011; Moccia *et al.*, 2012; Rahimi *et al.*, 2012), estimula la proliferación y migración de las CE's para la formación de nuevos vasos sanguíneos o procesos de reparación de lesiones del EV, o incluso promover la muerte celular (Shen *et al.*, 2015).

1.3.1. Mecanismos que aumentan la concentración de Ca^{2+} intracelular

Una gran variedad de agonistas, tales como adenosintrifosfato (ATP) (Moccia *et al.*, 2001; Berra-Romani *et al.*, 2001.), acetilcolina (ACh) (Moccia *et al.* 2004; Bagher *et al.*, 2011), bradicinina (BK) y diferentes factores de crecimiento (Moccia *et al.*, 2004; Dragoni *et al.*, 2011) incrementan la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en las CE's. Los agonistas antes mencionados causan un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el endotelio mediante la activación de dos principales procesos: **1)** liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares como el RE y/o **2)** entrada de iones Ca^{2+} del medio extracelular a través de canales iónicos de la membrana plasmática. A continuación se describen estos dos mecanismos:

1.3.1.1. Liberación de Ca^{2+} del Retículo Endoplásmico

La cascada de señalización que desemboca en la liberación de Ca^{2+} por parte de los reservorios intracelulares, principalmente del RE, se inicia con la interacción de agonistas vaso-activos con sus receptores específicos de membrana formando un complejo ligando-receptor y se esquematiza en la **Figura 2, izquierda**. En el EV los receptores presentes en la membrana de estas células generalmente se encuentran acoplados a proteínas G (Tran & Watanabe, 2006; Datar *et al.*, 2010; Berra-Romani *et al.*, 2012). La interacción ligando-receptor induce cambios conformacionales en la proteína G, que se traducen en la activación de una

enzima presente en la membrana plasmática, la fosfolipasa C (PLC) cuya actividad enzimática consiste en la hidrólisis del fosfatidil-inositol-difosfato (PIP₂), un fosfolípido de la membrana celular. La hidrólisis del PIP₂ genera dos moléculas, el diacilglicerol (DAG) y el inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP₃) (Balla, Szentpetery, & Kim, 2009; Datar *et al.*, 2010; Michel & Vanhoutte, 2010). El IP₃ producido difunde en el citoplasma, llega a la membrana del RE donde se encuentran localizados receptores específicos para ésta molécula (los receptores a IP₃, IP₃R) (Béliveau, Lessard, & Guillemette, 2014). Los IP₃R son también canales iónicos, de tal manera que la unión del IP₃ con su receptor (IP₃R) causa la apertura del canal y por gradiente de concentración, da como resultado la liberación del Ca²⁺ contenido en el lumen del RE hacia el citoplasma (Zhang *et al.*, 2011). A la fecha se han identificado tres subtipos de IP₃R (IP₃R-1, IP₃R-2, y IP₃R-3) y todos los subtipos de IP₃R han sido identificados en CE's, tanto en condiciones de cultivo celular como en vasos intactos (Isakson, 2008). El orden de afinidad de los IP₃R para su ligando es; IP₃R2 > IP₃R1 > IP₃R3. En adición a su sensibilidad a IP₃, los IP₃R son sensibles a la [Ca²⁺]_i. Concentraciones bajas de Ca²⁺ intracelular, aumentan la probabilidad de apertura del canal; en caso contrario, cuando las concentraciones de Ca²⁺ son elevadas, los IP₃R tienden a cerrarse. Otros receptores-canal presentes en la membrana del RE que podrían mediar la liberación de Ca²⁺ de RE, son los canales rianodínicos (RyR), nombrados así, por su alta sensibilidad al alcaloide rianodina (Echeverri *et al.*, 2010). Los RyR, son sensibles a concentraciones elevadas de Ca²⁺, lo cual favorece la liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺, fenómeno conocido como CICR (calcium-induce-calcium-release). Se han identificado 3 isoformas de RyR; RyR-1, RyR-2 y RyR-3. Estos receptores poseen un gran dominio citosólico NH₂ que comprende alrededor del 90% de la secuencia de aminoácidos del receptor. Esta región sirve como sitio de anclaje para numerosas proteínas moduladoras o reguladoras, tales como calmodulina, calstabin, sorcina, y también presenta sitios de unión para iones moduladores citosólicos, como: Ca²⁺, Mg²⁺ y nucleótidos de adenina. Mediante pruebas de RT-PCR (reverse transcription-polymerasa chain reaction) se ha comprobado que las CE's principalmente expresan el receptor RYR-3 y por medio de marcaje

inmunológico se identificó que RYR-3 se encuentra expresado en la membrana nuclear, crestas mitocondriales y la membrana del RE (Uehara et al., 2004). A pesar de que los canales a rianodina han sido identificados en CE´s humanas, de conejo y cerdo, hasta el momento, su participación en la fisiología endotelial es controversial (Uehara et al., 2004).

1.3.1.2. Entrada de Ca^{2+} del Medio Extracelular

La entrada de Ca^{2+} del medio extracelular al citosol de las CE´s puede llevarse a cabo a través de diversos canales de membrana, lo cuales, por su naturaleza y mecanismos de acción, han sido clasificados de la siguiente forma:

1.3.1.2.1. Canales de Ca^{2+} Activados por Voltaje (VOC)

Los canales de Ca^{2+} activados por voltaje (VOC) son activados en respuesta a una despolarización de la membrana celular (**Figura 3C**). Estos canales están presentes principalmente en células excitables, es decir que presentan la actividad eléctrica conocida como potencial de acción, como tejido neuronal, muscular y glandular entre otras. Estudios han demostrado la presencia de VOC en CE´s, consideradas clásicamente como células no excitables, en particular en CE´s de capilares sanguíneos y en aorta canina (Quast *et al.*, 1994). Sin embargo, existe controversia en cuanto a su participación en la regulación de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular. En particular experimentos realizados por Berra-Romani y Cols. (Berra-Romani *et al.*, 2008) en endotelio *in situ* de aorta de rata demuestran nula participación de estos canales en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular del endotelio vascular.

1.3.1.2.2. Canales de Ca^{2+} activados por receptor (ROC)

Los canales tipo ROC son activados por la unión de un agonista a su receptor de membrana; los cuales, a su vez son clasificados en dos tipos:

- a. *Ionotrópicos*: cuya apertura está mediada por la interacción directa del agonista con su receptor (**Figura 3E**).
- b. *Metabotrópicos*: en este caso, la unión del agonista con su receptor membranal, genera segundos mensajeros o fosforilan moléculas intracelulares que finalmente activaran a los canales iónicos, permitiendo la entrada de Ca^{2+} (**Figura 3D**).

1.3.1.2.3. Canales de Ca^{2+} activados por segundos mensajeros (SMOC)

Los canales activados por segundos mensajeros (SMOC), son canales presentes en la membrana plasmática cuya activación es mediada por segundos mensajeros que se producen intracelularmente (**Figura 3B**) como: diacilglicerol (DAG), ácido araquidónico (AA) y sus derivados (eicosanoides y anandamida), ADP ribosa (ADPr) y nucleótidos cíclicos (Francesco Moccia, Berra-Romani, & Tanzi, 2012b).

1.3.1.2.4. Canales de Ca^{2+} activados por los almacenes intracelulares de Ca^{2+} (SOC)

La disminución de la concentración de Ca^{2+} en los almacenes intracelulares, en particular en el RE, causa la apertura de canales específicos de membrana (**Figura 3A**) denominados “Store Operated Channels” (SOC), cuya apertura permite la entrada de Ca^{2+} extracelular al medio citoplasmático del endotelio, fenómeno conocido como: entrada de Ca^{2+} activada por almacenes intracelulares (SOCE, “store operated calcium entry”). Como se mencionó anteriormente la disminución de la concentración de Ca^{2+} en el RE que activa la SOCE, puede darse en respuesta a la estimulación por un agonista vaso-activo (ATP, ACh o Bradicinina), que induce la formación de IP_3 y la consecuente liberación de Ca^{2+}

del RE (**Figura 2**) (Parekh & Putney, 2005; Lodola *et al.*, 2012; Socha, Behringer, & Segal, 2012).

Recientemente se han identificado las proteínas que participan en el fenómeno de la SOCE, se trata de las proteínas STIM-1 (Stromal interaction molecule 1) y Ora-1 (Trebak, 2009; Zhang *et al.*, 2011). La proteína STIM-1 es una proteína localizada en la membrana del RE que funciona como sensor de los niveles de Ca^{2+} en el lumen de este organelo, esta proteína al detectar una disminución de la concentración de Ca^{2+} en el lumen del RE, promueve el reclutamiento de otras proteínas STIM-1, formando un conglomerado de estas proteínas llamados “puncta” (**Figura 2**). Las punctas inducen un re-modelamiento de la estructura del RE para favorecer el contacto físico de STIM-1 (presente en la membrana del RE) con canales de la membrana plasmática de tipo SOC (Ora-1 o TRPC) e inducir su apertura (Lodola *et al.*, 2012; Francesco Moccia *et al.*, 2012). Actualmente se dispone de diversos fármacos que han permitido el estudio de la SOCE; por ejemplo el 2-aminoetoxidifenil borato (2APB) a concentraciones elevadas (25-100 μM) bloquea su actividad, mientras que a dosis bajas (1-20 μM) podría favorecer el ingreso de Ca^{2+} por los SOC (Harteneck & Gollasch, 2011); por otra parte el [N-{4-[3,5-bis(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il]fenil}-4-metil-1,2,3-tiadiazol-5-carboxamida] (BTP2) ejerce un efecto bloqueante que depende del tiempo de incubación a concentraciones de 10 a 100 μM (Putney, 2010).

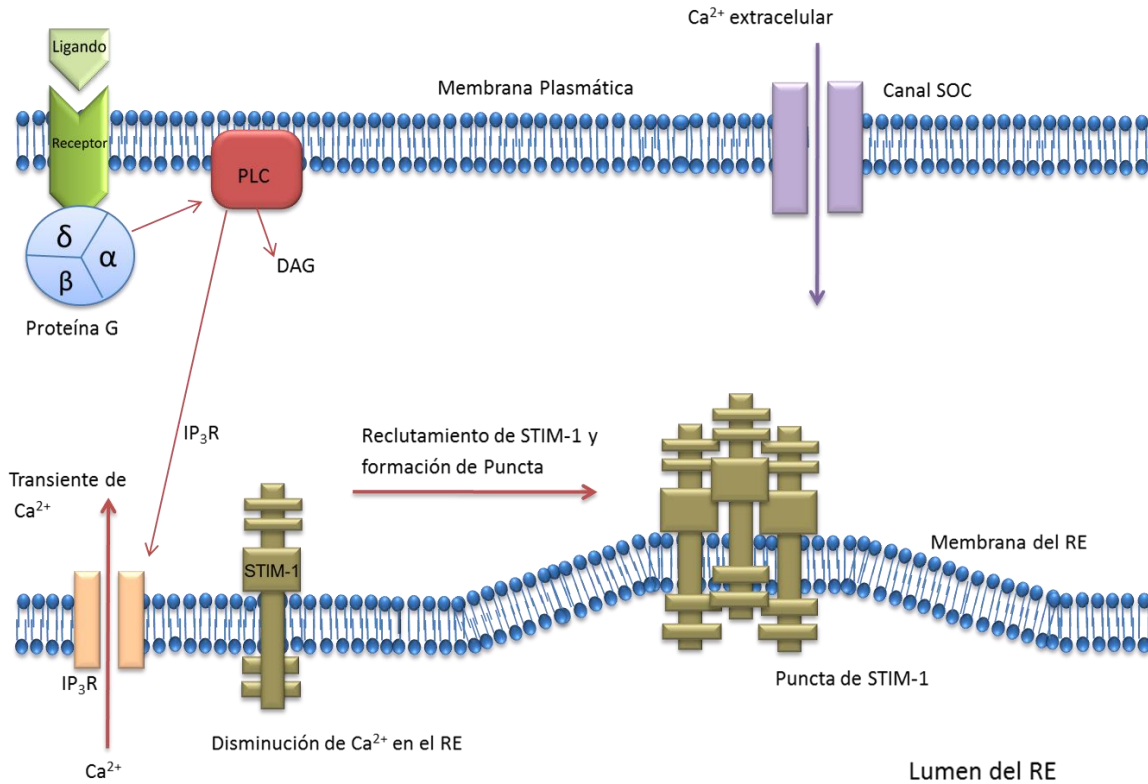


Figura 2. Mecanismo molecular de la activación de los SOC. La interacción de un ligando con su receptor específico de membrana, activa la vía de la PLC la cual conlleva a la liberación de Ca^{2+} del RE, dando como resultado a una disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{R}}$, lo cual es censado por una proteína de la membrana del RE, llamada STIM-1, la cual está encargada hasta donde se sabe, de mantener las $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{R}}$ en los niveles basales. Una vez que la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{R}}$ disminuye, la STIM-1 forma conglomerados con otras STIM-1 y forman complejos localizados en dominios específicos del RE, los cuales se han denominado como "Puncta". Los sitios de la membrana del RE donde se forman las "Punctas" sufren cambios estructurales que permiten que la membrana del RE se aproxime físicamente a regiones de la membrana plasmática que contiene a las proteínas ORAI y/o TRPC, ambos considerados como proteínas que pueden constituir a los "store operated channels (SOC)".

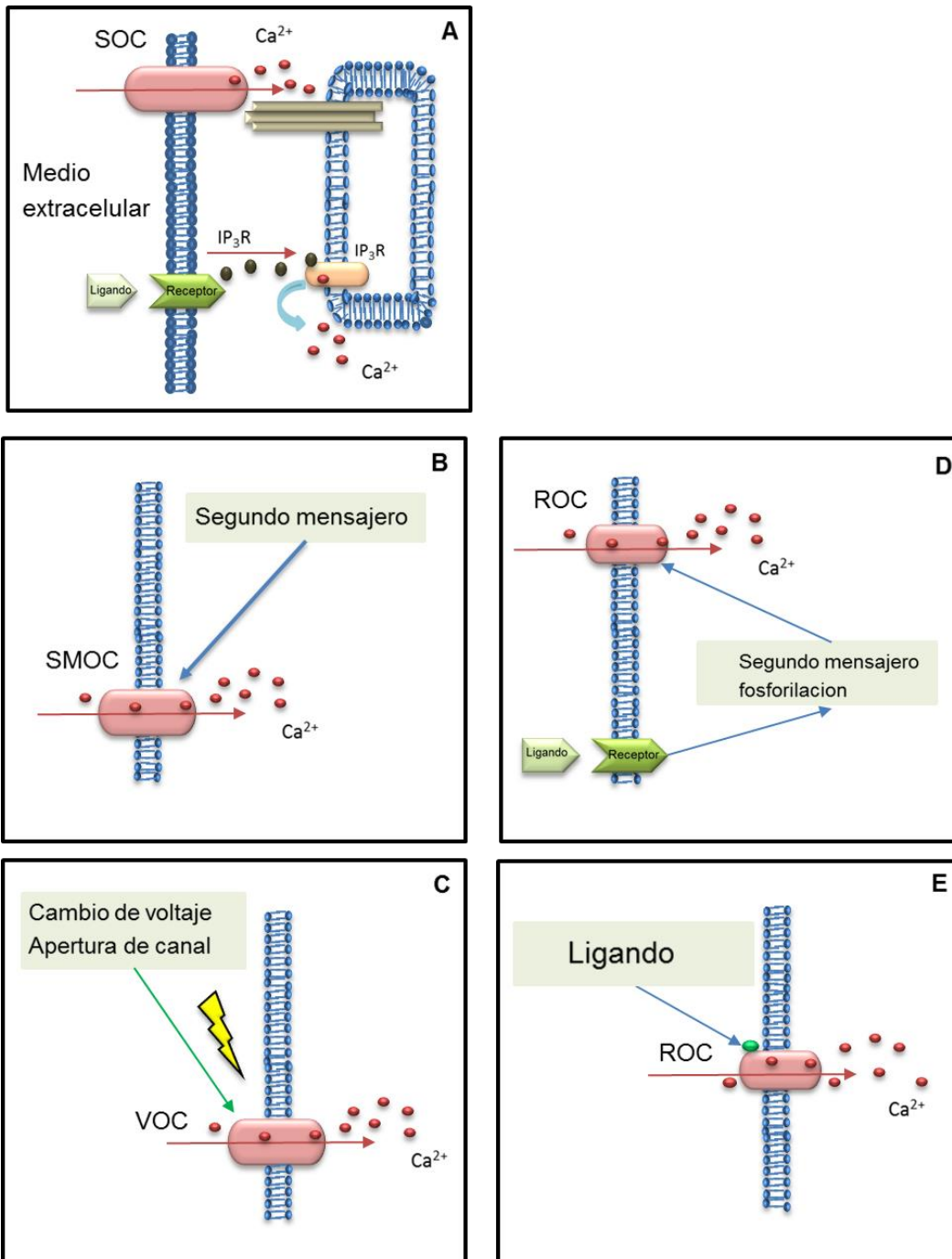


Figura 3. Tipos de canales iónicos implicados en la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular al interior de las células. A) Canales tipo SOC, B) Canales tipo SMOC, C) Canales tipo VOC, D) Canales tipo ROC metabotrópicos y E) Canales tipo ROC ionotrópicos.

1.3.1.3. Mecanismos que reducen la concentración de Ca^{2+} intracelular

Previamente hemos descrito los mecanismos por los cuales se sirve la célula para incrementar la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma y de esa forma inducir alguna respuesta celular, como la producción de sustancias vaso-activas. El incremento de Ca^{2+} en la célula, desencadena también la actividad de proteínas de membrana e intracelulares, encargadas de retornar los niveles de Ca^{2+} a las condiciones basales, por ejemplo, después de que las células han sido estimuladas por algún agonista. Estos mecanismos son responsables de disminuir el Ca^{2+} citosólico, capturándolo en su reservorio intracelular (RE) o expulsándolo al espacio extracelular a través de la membrana plasmática (Berridge, 2012). Entre los principales mecanismos encargados de regular la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en endotelio vascular se encuentran:

1.3.1.3.1. La Ca^{2+} ATPasa del retículo endoplásmico (SERCA).

La SERCA (Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} Pump), se encuentra localizada en la membrana del RE y su función primordial es la de recapturar Ca^{2+} del medio intracelular e internalizarlo en el lumen del RE, por medio de la hidrólisis de ATP para así llevar los niveles de Ca^{2+} a su estado basal (**Figura 4**). Es por esto que la SERCA constituye uno de los elementos clave para el sostenimiento de la distribución asimétrica del Ca^{2+} dentro de la célula (Brini & Carafoli, 2009; Bird, 2011; Berra-Romani et al., 2012). La SERCA se encarga de recuperar Ca^{2+} intracelular que haya sido: liberado del RE por medio de la apertura de los canales-receptores rianodinicos (RYR's) o receptores IP_3 (IP_3R 's), por algún estímulo previo de algún segundo mensajero, o por medio de canales de fuga de Ca^{2+} que se encuentran en el RE. La SERCA es una proteína de entre 97 a 115 kDa con cuatro isoformas (1, 2a, 2b y 3) dentro de las cuales la SERCA2b se expresa únicamente en células del músculo liso, plaquetas y en el EV (Horáková

et al., 2013). Estudios previos demuestran que la proteína SERCA modula preponderantemente la concentración de Ca^{2+} en las células del endotelio vascular (Moccia *et al.*, 2002; Mumtaz *et al.*, 2011).

1.3.1.3.2. La Ca^{2+} ATPasa de la membrana plasmática (PMCA).

A nivel de membrana plasmática se encuentra la PMCA (Plasma Membrane Ca^{2+} ATPase) una bomba de Ca^{2+} dependiente de ATP que tiene alta afinidad por Ca^{2+} , pero una capacidad de transporte baja con respecto a otros transportadores activos de Ca^{2+} ; esta proteína se encarga de transportar iones Ca^{2+} del citoplasma al espacio extracelular (**Figura 4**). Ha sido descrito que la PMCA realiza su función principal cuando los niveles de Ca^{2+} no varían mucho con respecto a los niveles basales (Holton *et al.*, 2010; Giacomello, *et al.*, 2013). Se han identificado cuatro isoformas de la PMCA (1-4) en cerebro, músculo liso, corazón, músculo esquelético y células endoteliales (Brini *et al.*, 2013). La PMCA1 es la principal isoforma encontrada en el EV, aunque también se encuentran niveles bajos de PMCA2 y PMCA4.

1.3.1.3.3. El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) es un transportador bidireccional electrogénico que depende del gradiente de concentración de los iones sustrato y del potencial de membrana; el NCX moviliza tres iones Na^+ por un ion Ca^{2+} en un tipo de contra-transporte (**Figura 4**). En varios tipos celulares, el NCX representa el principal mecanismo de remoción de Ca^{2+} hacia el espacio extracelular, modo directo (forward mode) en células activadas. Sin embargo, el intercambiador puede representar una vía de entrada para el Ca^{2+} al funcionar en su modo reverso (reverse mode) cuando las células son estimuladas por diversos agonistas como ACh o en condiciones patológicas (Berra-Romani *et al.*, 2010; Bird, 2011;

Bondarenko *et al.*, 2013). El NCX comprende una proteína de 9 segmentos transmembranales y tres isoformas identificadas, de las cuales la isoforma 1 se expresa ampliamente en diferentes tipos celulares como el endotelio vascular (Cui *et al.*, 2012).

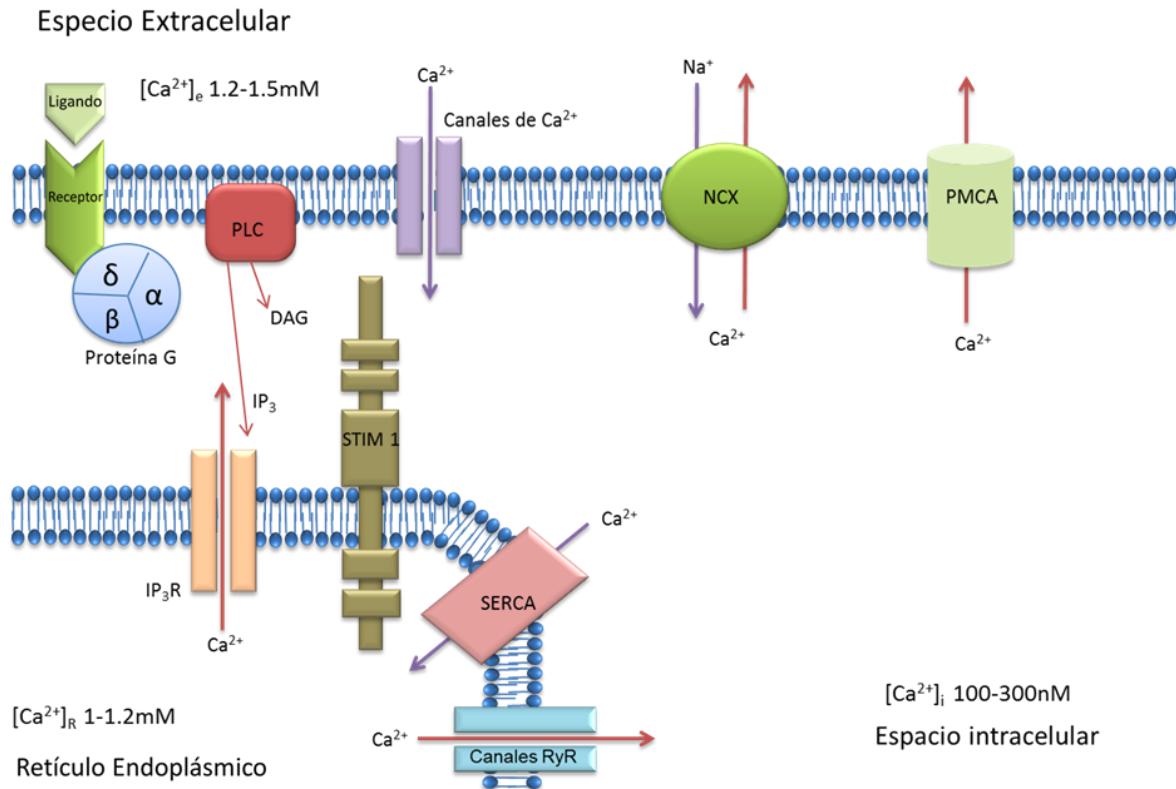


Figura 4. Mecanismos que regulan las $[Ca^{2+}]_i$ en células endoteliales. La unión de un ligando extracelular a su receptor específico de membrana activa la subsecuente vía la PLC, la cual es la encargada en la liberación del Ca^{2+} del RE a través de la hidrólisis de un fosfolípido de membrana: fosfatidilinositol 4,5-difosfato, el cual produce dos productos IP_3 y diacilglicerol. El IP_3 difunde a la membrana del RE donde se acopla a su receptor/canal IP_3R , provocando la apertura y liberación de Ca^{2+} del RE que conlleva a un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$. Las células, cuentan proteínas de membrana plasmática y membrana del RE, encargadas de retornar los niveles de Ca^{2+} a las condiciones basales. La SERCA, que es una bomba de Ca^{2+} dependiente de ATP presente en la membrana del RE, que recaptura Ca^{2+} al interior del RE; la PMCA, que es una proteína semejante a la SERCA, pero presente en la membrana plasmática que conduce los iones Ca^{2+} del citoplasma al espacio extracelular y finalmente el NCX, el cual a través de contranporte con Na^+ , remueve Ca^{2+} citosólico al espacio extracelular.

1.4. Diabetes Mellitus

La Asociación Americana de Diabetes (ADA) define a la Diabetes Mellitus (DM) como un desorden metabólico en el cual las personas manifiestan niveles elevados de glucosa en sangre (hiperglucemia) resultado de defectos en la capacidad del cuerpo para producir o utilizar insulina (American Diabetes Association®, 2015). Los casos de DM se clasifican en cuatro grandes grupos, según la Asociación Americana de Diabetes y la OMS: DM tipo 1 (DMI), DM tipo 2 (DMII), la DM gestacional (DMG) y otros tipos específicos que engloban defectos genéticos en la función de las células productoras de insulina, así como patologías del páncreas o la afectación por exposición a drogas y químicos (American Diabetes Association, 2014).

La diabetes mellitus tipo I (DMI) o también llamada diabetes juvenil o diabetes insulino-dependiente, es una enfermedad causada por un proceso autoinmune que dañan directamente a las células β localizadas en los islotes de Langerhans, cabe señalar que éstas células son las principales productoras de insulina endógena en el organismo.

La DMII, el tipo de DM más común en el humano (90% de los pacientes en el mundo con DM) se caracteriza por la resistencia a la insulina en tejidos y órganos. (American Diabetes Association, 2014; Maraschin, Murussi, Witter, & Silveiro, 2010) lo que conlleva a una menor incorporación de glucosa a tejidos específicos como músculo, hígado y tejido graso; estas circunstancias favorecen niveles elevados de glucosa en sangre. Además se presentan alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas (Lee *et al.*, 2012; Olokoba *et al.*, 2012). La DMII conlleva a la presencia de componentes etiológicos genéticos (alteraciones en canales de potasio en corazón y páncreas; además de factores de transcripción para la síntesis de glucagón) (Olokoba *et al.*, 2012).

La Diabetes mellitus gestacional (DMG) es un trastorno metabólico definido como la intolerancia a la glucosa durante el embarazo y su prevalencia va a en aumento, lo que es esta una preocupación cada vez mayor ya que las mujeres con DMG

tienen un mayor riesgo de desarrollar diabetes post-gestacional, además de la hipertensión, la hiperlipidemia y enfermedad coronaria (Ryckman *et al.*, 2015).

De acuerdo a la norma oficial mexicana (NOM-015-SSA2-2010) “Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus”, se establece el diagnóstico de diabetes, si se cumple con cualquiera de los siguientes criterios (NOM, 2010):

- a) Presencia de síntomas clásicos (polidipsia, polifagia, poliuria y/o pérdida de peso).
- b) Glucemia plasmática casual >200 mg/dl (11,1 mmol/l).
- c) Glucemia plasmática en ayuno >126 mg/dl (7 mmol/l) medida en dos ocasiones aleatorizadamente.
- d) Glucemia >200 mg/dl (11,1 mmol/l) a las dos horas después de una carga oral de 75 g de glucosa disuelta en agua, se puede realizar una curva de tolerancia a la glucosa que indicaría alteraciones en el metabolismo de la misma.

En la publicación Annual Standards of Medical Care de la Asociación Americana de Diabetes del 2014 (American Diabetes Association, 2014), establece además que se hace diagnóstico de diabetes en pacientes con una hemoglobina glucosilada (Hb_{A1C}) mayor a 6.5% (American Diabetes Association, 2014), permitiendo evaluar los niveles de glucosa plasmática en los últimos 3 meses. En la **Tabla 1**, se muestran los parámetros antes mencionados para el diagnóstico de diabetes.

Diagnostico de Diabetes	Glucosa Normal	Glucosa en prediabetes	Glucosa en Diabetes
HbA1c.	≤ 5.7 %.	5.7% - 6.4 %.	≥ 6.5 %.
Glucosa plasmática en ayunas	80 mg/dL - 100 mg/dL.	100mg/dL - 125mg/dL.	≥ 126 mg/dL.
Prueba de tolerancia a la glucosa oral	≤ 140 mg/dL.	140mg/dL - 199 mg/dL.	Despues de 2 hrs. ≥ 200 mg/dL.
Prueba casual de glucosa plasmática			≥ 200 mg/dL.

Tabla 1. Parámetros de glucosa para el diagnóstico de diabetes. La American Diabetes Association (ADA) establece cuatro criterios para el diagnóstico de diabetes mellitus. Un resultado positivo en uno de estos parámetros es suficiente para el diagnóstico. Se muestran también los parámetros para el diagnóstico de la prediabetes.

1.4.1. Diabetes Mellitus y Disfunción Endotelial

En adición, los pacientes con diabetes, pueden presentar un cuadro de anormalidades metabólicas, entre ellos la dislipidemia. La dislipidemia asociada a la diabetes se encuentra presente en hasta un 60% de las personas con DMII y contribuye en gran medida al incremento de riesgo cardiovascular y morbimortalidad que presentan estos pacientes (Hormigo-Pozo et al., 2015). La dislipidemia diabética es una alteración del metabolismo lipídico que se caracteriza por un exceso de triglicéridos, un déficit del colesterol HDL y una alteración de la composición de las lipoproteínas que consiste sobre todo en un exceso de partículas LDL pequeñas y densas (Jaiswal, Schinske, & Pop-Busui, 2014).

La DMII es un importante factor de riesgo para el desarrollo de patologías del sistema cardiovascular ya que se han identificado alteraciones estructurales y de funcionamiento del corazón y en la micro y macro-vasculatura, lo cual incrementa el pronóstico para la aparición de enfermedades como hipertensión, aterosclerosis, padecimiento coronario arterial o episodios como infartos, muerte súbita y derrame cerebral (Aréchiga et al., 2010; Rodriguez et al., 2014). Se ha encontrado que las complicaciones cardiovasculares en los diabéticos, son de 3 a 4 veces más frecuentes que en los no diabéticos. Incluso se ha considerado a la DM como una enfermedad cardiovascular (Fisman & Tenenbaum, 2008). Estudios recientes han mostrado que en pacientes diabéticos, los niveles elevados de

glucosa en sangre (hiperglucemia) crónicos y/o agudos, generan una disfunción de las CE's (Aziz & Wheatcroft, 2011; Davel *et al.*, 2011; Georgescu, 2011). La disfunción endotelial se caracteriza por una reactividad vascular anormal (vaso-relajación mediada por endotelio reducida), una disminución en la biodisponibilidad del NO, un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno, alteración de la permeabilidad vascular, comprometiendo el transporte en suministros como nutrientes, oxígeno, hormonas; y la remoción de productos del metabolismo, desregulación de la hemodinamia (reducción de las propiedades fibrinolíticas), incremento de sustancias procoagulantes, protrombóticas, mediadores proinflamatorios, sobreproducción de factores de crecimiento, incremento de la expresión de moléculas de adhesión y de genes inflamatorios (Balakumar *et al.*, 2009; Ayaori *et al.*, 2013; Bagi *et al.*, 2013; Rodriguez *et al.*, 2014).

Numerosos factores de riesgo contribuyen directamente a la disfunción endotelial. Algunos de los más importantes son: colesterol LDL (Low Density Lipoprotein) elevado, LDL oxidado, disminución del colesterol HDL (High-Density Lipoprotein), triglicéridos elevados, hipertensión, aumento de proteína C-reactiva (CRP) y lipoproteína circulante asociada a fosfolipasa A2 (Lp-PLA2, un marcador específico de la inflamación vascular), elevación de la relación omega-6: omega-3, hiperinsulinemia, niveles elevados de homocisteína, aumento de fibrinógeno y inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), insuficiencia de vitamina D, tabaquismo y sobre todo hiperglucemia (Sena, Pereira, & Seíça, 2013a).

Se ha identificado que la DM genera alteraciones específicas sobre la vasculatura, tales como la glucosilación de proteínas y lípidos, la hiperactividad de la cinasa de tipo C (PKC) el incremento de la vía de la hexosamina, el aumento del estrés oxidativo y finalmente, inflamación del tejido vascular; todos estos factores son considerados como promotores para el desarrollo de la disfunción del endotelio (Fisman & Tenenbaum, 2009).

1.4.2. Modelos Animales para el Estudio de la Diabetes Mellitus

Múltiples aspectos de la DM incluyendo el genético, fisiológico, bioquímico, las complicaciones del desarrollo causadas por ésta e incluso la prevención y los ensayos clínicos de nuevas terapias, han sido estudiados en diversos modelos animales. Los diferentes modelos experimentales utilizados en distintas especies animales se pueden agrupar según la metodología usada para la inducción de la diabetes en cuatro grandes grupos: los modelos que utilizan agentes químicos para la inducción de la diabetes (diabetes química); los modelos en los que se induce la diabetes mediante procedimientos quirúrgicos (diabetes quirúrgica); aquellos en los que la diabetes se induce por infecciones víricas (diabetes vírica); y, por último los modelos de diabetes espontánea (Acharjee, Ghosh, Al-Dhubiab, & Nair, 2013).

1.4.2.1. Diabetes química.

Se ha demostrado que la administración de diferentes sustancias químicas en animales provoca situaciones experimentales similares a la diabetes. Entre estos agentes químicos, el aloxano y la estreptozotocina (STZ) parecen ser los más específicos y son los más comúnmente utilizados. Ambas sustancias, son análogos tóxicos de la glucosa, que preferencialmente se acumulan en la células β del páncreas, vía el transportador de glucosa GLUT-2. El aloxano y altas dosis de STZ actúan destruyendo, selectivamente a las células β -pancreáticas productoras de insulina, por lo que provocarían diabetes DMI (King, 2012). Tanto el aloxano como la STZ producen DMI en un elevado número de especies. Los animales tratados tanto con aloxano como con STZ presentan la mayoría de las complicaciones asociadas a la diabetes como son las cardiomiopatías, las neuropatías, las disfunciones arteriales coronarias, las alteraciones hepáticas,

traqueales, del tejido conectivo, gastrointestinales, etc. (Oztürk, Altan, & Yildizoğlu-Ari, 1996).

1.4.2.2. Diabetes quirúrgica.

El origen pancreático de la DM fue descubierto por primera vez en 1889 por Oskar Minkowski al realizar una pancreatectomía total en perros. Se desarrollaron entonces los modelos experimentales de diabetes quirúrgica consistentes en la realización de una pancreatectomía que desencadenan estados hiperglucémicos parecidos a la DMI (Acharjee *et al.*, 2013).

1.4.2.3. Diabetes viral.

Se han utilizado varios virus para inducir la diabetes experimental en diversas especies animales, como por ejemplo el virus de la encefalomiocarditis, el virus coxackie, el virus de la rubeola, retrovirus y el virus de la encefalitis equina de Venezuela. La susceptibilidad genética frente a la infección y la resistencia de las células β -pancreáticas a las lesiones virales son puntos que no están en la actualidad totalmente clarificados. Los modelos de diabetes vírica presentan además numerosas dificultades experimentales, por lo que son muy poco utilizados en investigación (King, 2012).

1.4.2.4. Diabetes espontánea.

Se trata de estirpes que se mantienen relativamente inalteradas mediante cruces endogámicos y que proceden de un animal en el que se ha detectado la diabetes espontánea, a veces no son totalmente “espontáneos” en el sentido que se requieren modificaciones dietéticas adicionales para generar la diabetes en el seno de una predisposición genética (Lin & Sun, 2010). Dentro de los modelos espontáneos más usados están los ratones ob/ob y db/db que presentan

características similares con la diferencia de que el último presenta una hiperglucemia más severa, el ratón KK (KuoKundo) es un modelo poligénico de obesidad y DMII producido por selección endogámica, presenta una hiperglucemia y obesidad moderada sin embargo por su naturaleza poli génica los resultados son difíciles de comparar entre las colonias de cada laboratorio. La rata GK (GotoKakizaki) quizá el modelo más usado representa un modelo de selección endogámica donde la intolerancia a la glucosa a través de varias generaciones produce DMII, sin embargo los estudios más confiables son sobre los efectos de la DM en el sistema renal, el nervioso y el ocular (Tarquini, Lazzeri, Pala, Rotella, & Gensini, 2011). En vista de la prevalencia de enfermedades cardiovasculares en la población diabética, es muy importante identificar animales diabéticos que presentan lesiones cardiovasculares, entre ellos se encuentra la rata JCR:LA-cp, el cual es un modelo que desarrolla resistencia a la insulina con la presencia de obesidad, y presenta tanto enfermedades vasculares periféricas como coronarias (Russell & Proctor, 2007). El problema con las ratas JCR: LA-cp como modelo de diabetes pura es que es normo-glucémica.

1.4.3. Ratas Zucker Diabetic Fatty (ZDF) como Modelo de Diabetes Mellitus tipo II.

La rata Zucker obesa diabética (ZDF fa/fa) es otro modelo animal de DM, que presenta las características de la DMII en humanos. En este modelo el desarrollo de enfermedades vasculares es menos severo que en el modelo de rata JCR:Lacp, sin embargo presenta hiperglucemia, por lo que constituye un modelo adecuado para estudiar los efectos de la DMII sobre la función cardiovascular (Lin & Sun, 2010). El fenotipo de la rata ZDF, OZDF es un modelo animal que a través de mutaciones genéticas espontáneas y una dieta de Purina 5008, el fenotipo obeso se aproxima a la DMII en humanos junto con sus complicaciones (Clark, Palmer, & Shaw, 1983). Cuando se alimentan con la dieta Purina 5008 (una dieta rica en grasa que contiene alta energía, de LabDiet, Richmond, USA) los machos

recesivos homocigotos (fa/fa) desarrollan obesidad, hiperlipidemia e hiperglucemia en ayuno (Hirose *et al.*, 1996), además los machos presentan un mayor decremento de la insulina en páncreas que sus contrapartes delgadas (Clark *et al.*, 1983). La hiperglucemia se manifiesta inicialmente alrededor de las 7 semanas de edad, y todas las ratas macho alimentadas con la Purina 5008, presentan una severa hiperglucemia y son totalmente diabéticas a partir de la semana 12 (Erdely *et al.*, 2004). La rata ZDF es un modelo adecuado para la DMII debido a su déficit en la tolerancia a la glucosa causada por la mutación del gen el cual lleva a la resistencia a la insulina. La mutación resulta en un acortamiento del receptor de leptina provocando que no pueda interactuar de manera adecuada con la leptina. Esta mutación es expresada fenotípicamente con obesidad y altos niveles de leptina en sangre. Las características de la cepa son: manchas negras y blancas en la espalda, también presentan un numeroso cuadro de alteraciones fisiológicas como: deficiencias en la cicatrización de heridas, DMII, hiperglucemia, neuropatía, nefropatía, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, hipertensión, incremento de la reactividad plaquetaria, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia (Laboratories Charles Rivers, 2011). Las ratas OZDF muestran un incremento significativo en la incorporación de glucosa al tejido adiposo (Leonard, Watson, Loomes, Phillips, & Cooper, 2005), presentan incremento del contenido de triacilglicerol (TAG) en el los islotes del páncreas así como una relación directa entre la disminución de RNAm de insulina y un aumento de los niveles de glucosa (Harmon, Gleason, Tanaka, Poitout, & Robertson, 2001).

2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Estudios recientes han mostrado que la hiperglucemia crónica o aguda genera disfunción del endotelio (Joshi *et al.*, 2014; Sena *et al.*, 2013a). La disfunción endotelial es la pérdida del control de las funciones del tejido endotelial sobre el sistema cardiovascular, caracterizada por la disminución de la biodisponibilidad del

NO y generando un incremento de sustancias pro-coagulantes, protrombóticas, mediadores pro-inflamatorios e incrementando la constricción del músculo liso arterial (Sena et al., 2013a).

La mayoría de los estudios que se han enfocado en investigar la aparición y progresión de la disfunción endotelial causada por la DM, apuntan al estrés oxidativo como causa principal. Sin embargo, se han descrito otros posibles mecanismos no correlacionados con estrés oxidativo, que conllevan a la disfunción del endotelio, tales como: la disminución de BH₄ (tetrahidrobioterina), Prostaciclina (PGI₂) y Bradicinina (BK); la sobreexpresión de PGH₂ (prostaglandina H₂), TXA₂, ET₁, AngII (Angiotensina II); el incremento de moléculas de adhesión (ICAM-I, VCAM-I, E-selectina, vWF y PDGF) y la alteración en el metabolismo de los lípidos (dislipidemia) (Roberts & Porter, 2013), y en últimos años, a las alteraciones en la homeostasis del Ca²⁺ intracelular en las CE's (Sheikh *et al.*, 2012).

Tang y Li en el 2004 demuestran que la exposición de CE's en cultivo de aorta bovina a altas concentraciones de glucosa (22 y 44 mmol/L) reduce la amplitud de la señal de Ca²⁺ y la liberación de NO evocada por aplicación del agonista bradicinina (Tang & Li, 2004). Por otro lado Tauber y cols., en el 2004, demuestran que la aplicación aguda de altas concentraciones de glucosa aumentan la [Ca²⁺]_i basal, debido a la relativa actividad del transportador Na⁺/glucosa y el intercambiador NCX, además reportan que ocurre un aumento en la liberación de NO (Taubert *et al.*, 2004). En el 2012 Sheik y cols., trabajando con CE's cardiacas de rata en cultivo, evaluaron la señal de Ca²⁺ evocada por un agonista de los receptores P₂Y₂ (Uracil Trifosfato, UTP) en un modelo animal tratado con estreptozotocina para emular un cuadro DMI; encontrando que la duración del transiente de Ca²⁺ evocado por UTP se alarga y esto estuvo correlacionado con una reducción de la actividad y la expresión del NCX y la SERCA (Sheikh *et al.*, 2012).

Cabe señalar que la mayoría de estudios descritos anteriormente han sido realizados en CE's en cultivo (Estrada *et al.*, 2012a) las cuales son sometidas a tratamientos enzimáticos y condiciones artificiales de crecimiento, lo cual genera cambios en la expresión de receptores y canales iónicos (Fernández-Velasco, Ruiz-

Hurtado, Gómez, & Rueda, 2014), y por ende cambios en los mecanismos involucrados en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular. Por estas razones, se remarca la importancia de estudiar el endotelio intacto (*in situ*).

A partir del 2008 el grupo de investigación del Dr. Berra-Romani implementó una técnica para cuantificar la señal de Ca^{2+} en CE's de aorta de rata *in situ*. En su primer trabajo con esta nueva técnica, Berra y Cols., caracterizaron la señal de Ca^{2+} evocada por ATP en CE's *in situ* de aorta de rata (Berra-Romani *et al.*, 2008). A partir de entonces, sus estudios se han encaminado en el entendimiento de algunos elementos que regulan el Ca^{2+} intracelular en las CE's, como la SERCA y el NCX (Berra-Romani *et al.*, 2010). Esta técnica permite estudiar la regulación del Ca^{2+} en el EV bajo condiciones más fisiológicas.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La DM es una alteración metabólica que provoca una disfunción del endotelio vascular, la cual se caracteriza por una alteración en la biodisponibilidad de óxido nítrico. La producción de sustancias vaso-activas en el endotelio (como el óxido nítrico o endotelina-1) es regulada mediante la señalización de Ca^{2+} intracelular. Existe poca información que relacione la Diabetes Mellitus con la regulación del Ca^{2+} en las células del endotelio *in situ*. La mayoría de los estudios abordados en este tema utilizan modelos de DMI y células endoteliales en cultivo que han sido procesadas para sobrevivir en condiciones artificiales.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

*¿Cuál es el efecto que genera la DM tipo II sobre la regulación del Ca^{2+} intracelular, en células endoteliales *in situ* de aorta de rata de la cepa Zucker Diabetic Fatty?*

5. JUSTIFICACION

La DMII es una de las principales enfermedades de los últimos años, la cual se encuentra en el décimo lugar de las enfermedades causales de muerte, pero para el 2030 según las proyecciones de la OMS, la diabetes será la séptima causa de muerte. En el mundo hay más de 347 millones de personas con Diabetes. En el 2012 aproximadamente, fallecieron más de 1.5 millones de personas en el mundo por causa de enfermedades cardiovasculares provocadas por la hiperglucemia, la cual es una de las principales características de la Diabetes. Más del 80% de las muertes registradas, son en países de ingresos bajos y medios (Organización Mundial de la Salud. 2015). Según la Organización Panamericana de la Salud, se prevé que el número de personas que sufren diabetes en América Latina se incremente en más de un 200% en los próximos 15 años pasando de 13,3 millones en el 2000 a 32,9 millones en el 2030.

A pesar de las evidencias disponibles sobre la relación entre Ca^{2+} intracelular y función de las CE's, así como disfunción endotelial y diabetes, a la fecha, hay poca información acerca de los efectos de la DM sobre la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en el EV. Los estudios realizados hasta el momento se enfocan a modelos de DMI (la menos frecuente en el humano) utilizando CE's en cultivo, las cuales son sometidas a tratamientos enzimáticos y condiciones artificiales de crecimiento, lo cual genera cambios en la expresión de receptores y canales iónicos (Fernández-Velasco et al., 2014), y por ende cambios en los mecanismos involucrados en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular. Por estas razones, se remarca la importancia de estudiar el endotelio *in situ* lo cual representa una condición más fisiológica con respecto a las células en cultivo (Sandow & Grayson, 2009).

En este proyecto de investigación aprovecharemos la técnica implementada por Berra-Romani y Cols., que permite estudiar la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en CE's *in situ* (Berra-Romani et al., 2004), lo que permite conocer con mejor detalle

los posibles mecanismos por los cuales la DMII causa una disfunción endotelial en células vasculares. En adición, los experimentos se realizarán en un modelo de experimentación murino ya que presenta numerosas ventajas en comparación con otros modelos animales: bajo costo de manutención, presenta ciclos de vida cortos aproximadamente 2 años, lo que permite estudiar la patología en edades correspondientes a las edades en que se presenta esta enfermedad en el humano y principalmente porque contamos con modelos murinos que desarrollan diabetes mellitus tipo II. Nuestro laboratorio cuenta con la cepa de ratas Zucker Diabetic Fatty (ver sección de modelos animales), un modelo animal con DMII (la más común en el humano).

El comprender los mecanismos involucrados en la homeostasis de Ca^{2+} intracelular nos permitiría entender más a fondo la fisiopatología de la DMII, pero también, nos aportaría información útil para el desarrollo de algún marcador terapéutico o herramienta de diagnóstico que permita de una forma más oportuna y confiable, la detección de alteraciones cardiovasculares en personas con DMII.

6. HIPOTESIS

La Diabetes Mellitus tipo II causa alteraciones en los mecanismos que regulan la concentración de Ca^{2+} intracelular en células endoteliales *in situ* de aorta de rata Zucker-Diabetic Fatty.

7. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la Diabetes Mellitus tipo II, sobre los mecanismos que regulan la concentración de Ca^{2+} intracelular en células endoteliales *in situ* de aorta de rata.

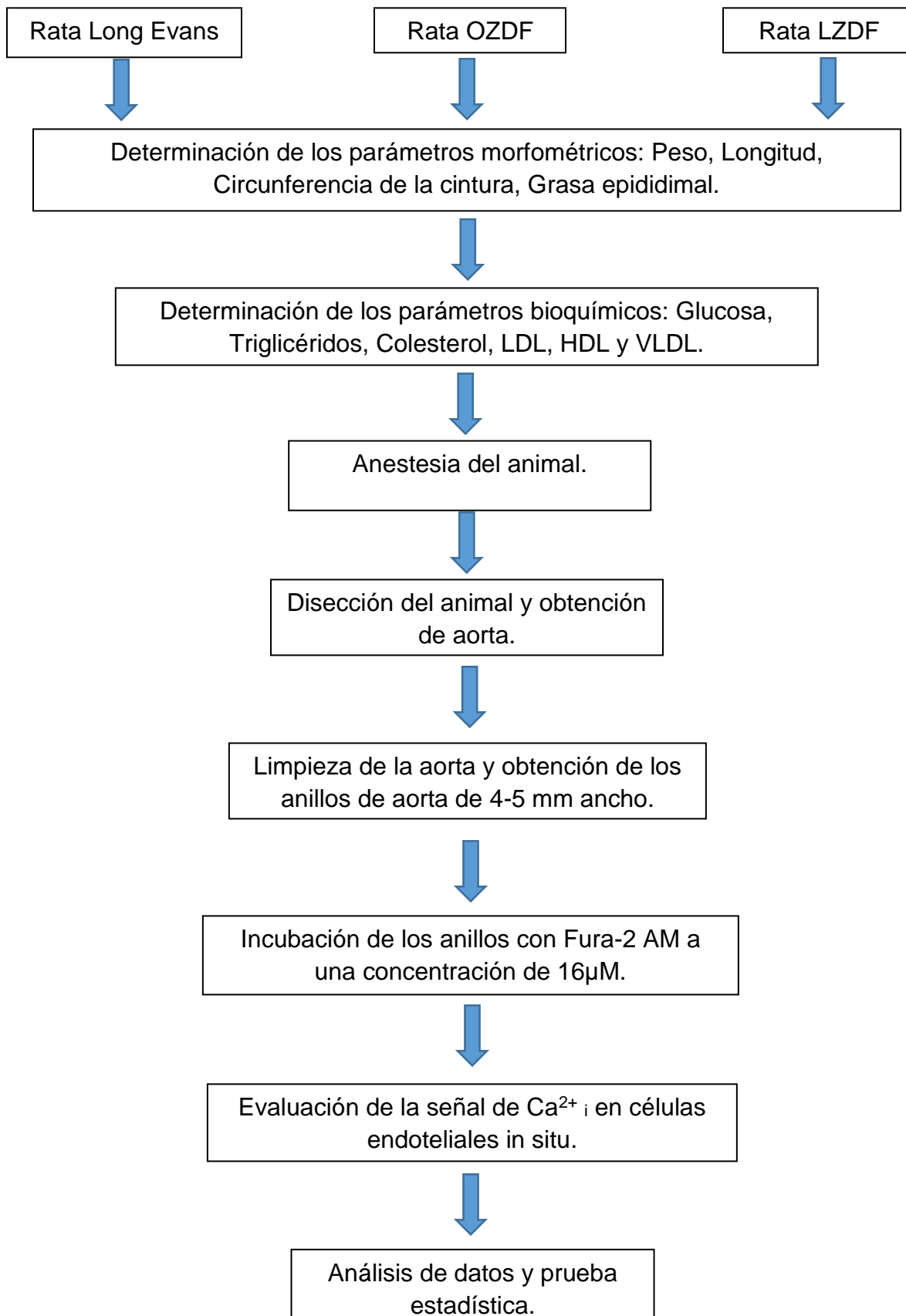
8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Evaluar el efecto de la DMII sobre la señal de Ca^{2+} intracelular evocada por ATP en células endoteliales *in situ* de aorta.
- II. Evaluar el efecto de la DMII sobre la actividad del intercambiador $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ (NCX) en la regulación de la señal de Ca^{2+} intracelular evocada por ATP.
- III. Evaluar el efecto de la DMII sobre la actividad de la bomba de Ca^{2+} -ATPasa del retículo endoplásmico (SERCA) en la regulación de la señal de Ca^{2+} intracelular evocada por ATP.
- IV. Evaluar el efecto de la DMII sobre la actividad de la bomba de Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática (PMCA) en la regulación de la señal de Ca^{2+} intracelular evocada por ATP.
- V. Evaluar el efecto de la DMII sobre la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular a través de canales activados por los almacenes intracelulares de Ca^{2+} (SOCE).

9. ASPECTOS ÉTICOS

Todas las ratas usadas para el desarrollo del presente estudio fueron proporcionadas por el Bioterio "Claude Bernard" de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. El manejo, mantenimiento y sacrificio de los animales se realizó en apego a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. El sacrificio de los animales fue realizado únicamente por personal de laboratorio que previamente recibió la capacitación y la certificación necesaria para el uso y manejo del modelo murino por parte de los expertos del Bioterio Claude Bernard de nuestra Universidad. Los animales fueron anestesiados con éter (apartado 9.4.1.2 de la NOM-062-ZOO-1999) en un espacio bien ventilado y en ausencia de flamas u otras fuentes de ignición (apartado 9.4.1.2.1 de la NOM-062-ZOO-1999).

10. ESQUEMA DE TRABAJO



11. MATERIAL Y MÉTODOS

Para el desarrollo del presente proyecto se utilizaron ratas macho de tres a cuatro meses de edad de la cepa Zucker Diabetic Fatty (ZDF) en sus dos fenotipos, OZDF (Obese Zucker Diabetic Fatty) y LZDF (Lean Zucker Diabetic Fatty). En adición se utilizaron ratas de la cepa Long Evans (LE), utilizadas universalmente como ratas sanas control, esto con la finalidad de descartar que las posibles alteraciones encontradas en las ratas ZDF puedan ser debidas a las alteraciones genéticas de la cepa y no a las alteraciones causadas por la DM por sí misma (**Figura 5**) (Marsh *et al.*, 2007; Sárközy *et al.*, 2013).

Cinco días previos al día del experimento, las ratas fueron sometidas a una prueba de tolerancia a la glucosa. Los animales fueron sometidos a un ayuno de 8 h en jaulas metabólicas y con agua *ad libitum*. Posteriormente se les administro por vía intraperitoneal 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 se procedió con la punción de la vena caudal sin anestesia, para la obtención de una gota de sangre, la cual fue procesada con el sistema de tiras reactivas de Accucheck® (ROCHE).

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

- 1) Peso, utilizando una balanza granataria.
- 2) Largo, midiendo la distancia existente entre la base de la cola y la punta del hocico.
- 3) Circunferencia, utilizando una cinta métrica convencional posicionándola alrededor de la parte media del abdomen.

11.1. Medición de Parámetros Bioquímicos

A continuación, se detallará la técnica que se empleó con la finalidad de obtener muestras de sangre para el análisis bioquímico. Los animales de experimentación con ayuno de al menos 8 horas fueron anestesiados con ketamina-xilacina vía intraperitoneal, 0.2 ml por cada 100gr de peso; posteriormente se les practico 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. La sangre fue transferida a tubos vacutainer sin anticoagulante de 5 ml y se permitió la formación de un coagulo durante 10 minutos. Una vez coagulada la sangre, está se centrifugo a 11200 fuerzas centrífugas relativas, durante 15 minutos a 25°C. Posteriormente se extrajo el suero del paquete globular con una micropipeta y esta fue colocada en tubos eppendorf de 1mL, y fueron almacenados a 4°C para ser llevados a un laboratorio de análisis clínicos, donde se realizaron las pruebas de glucosa, colesterol, colesterol total, triglicéridos, HDL, LDL y VLDL. En adición se recolecto la grasa epididimal de ambos testículos y se pesaron en una balanza granataria electrónica, este dato se incluyó al análisis somático de los animales.

11.2. Disección de la Aorta

El procedimiento para la disección de la aorta, ha sido descrito por el grupo de investigación del Dr. Berra-Romani (Berra-Romani et al., 2004) y se detallara a continuación.

Previamente a la extracción de la aorta, las ratas fueron anestesiadas con éter etílico; se practicó una toracotomía para exponer al corazón y el cayado aórtico. El corazón fue removido y la aorta canulada y perfundida con solución salina fisiológica (PSS). La aorta se removió y fue colocada en una caja de Petri con PSS. Utilizando un estéreo-microscopio marca Nikon modelo SMZ-2T, se procedió a remover el tejido graso y conectivo circundante (**Figura 5a**). Cabe mencionar que solo se empleó la aorta torácica, por ser de mayor tamaño que la abdominal.

La aorta fue cortada en anillos de 3 a 4 mm de ancho (**Figura 5b**). Los anillos de aorta obtenidos fueron incubados durante una hora a temperatura ambiente en PSS que contenía Fura-2 a una concentración 16 μ M. Después del periodo de incubación los anillos aórticos fueron transferidos a una caja de Petri con solución PSS por una hora con la finalidad de eliminar los remanentes de Fura-2 y permitir la desesterificación del colorante. Utilizando una tijera de micro-disección, los anillos fueron cortados cuidadosamente para abrirlos y obtener tiras de aorta con el endotelio intacto (**Figura 5c**). Las tiras de aorta así obtenidas fueron fijadas con 4 alfileres de 0.4mm de diámetro al fondo de una caja de Petri que contenía PSS, y cuyo fondo se encontraba recubierto por un silicón blando inerte de tal manera que el endotelio quedara expuesto hacia arriba (**Figura 5d**).

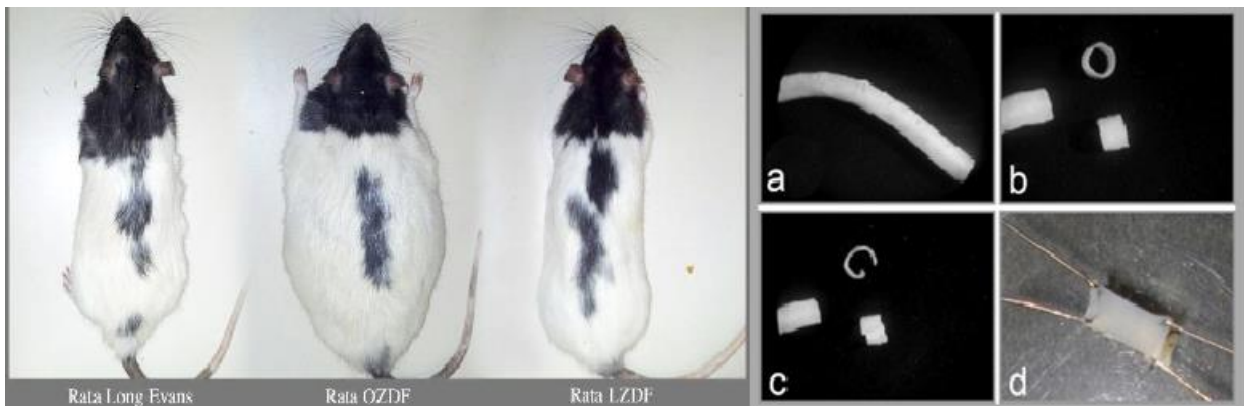


Figura 5. Animales de experimentación y preparación de endotelio. En el presente proyecto se emplearon ratas Long Evans, y de la cepa ZDF en sus dos fenotipos, obeso (OZDF) y el delgado (LZDF). Del lado izquierdo se muestra una fotografía de una rata Long Evans, una rata LZDF y una rata OZDF, se puede apreciar la marcada obesidad de esta última rata. Las ratas fueron sacrificadas y se les extrajo la aorta (**a**), la cual fue cortada en anillos de aproximadamente 4mm de ancho (**b**). Los anillos fueron incubados en solución fisiológica con Fura-2 (16 μ M) durante 1hr para que el fluoróforo pudiera permear el endotelio y servir como marcador de Ca²⁺. Posteriormente, los anillos de aorta fueron colocados, durante una hora, en solución fisiológica para eliminar los remanentes del fluoróforo y permitir su desesterificación en el citoplasma de las células. Cuidadosamente se procedió a abrir los anillos aórticos con una tijera fina de disección, evitando tocar la pared interna del vaso (**c**); el tejido aórtico fue fijado en una superficie de silicón blando inerte dentro de una caja de Petri, utilizando alfileres de 0.4 mm de diámetro, exponiendo la superficie luminal de la aorta hacia arriba (**d**).

11.3. Medición de Ca^{2+} Intracelular

Para la medición de las variaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el EV, se utilizó el fluorocromo Fura-2 acetoximetil ester (Fura-2 AM). El Fura-2 es fácilmente introducido en las células por la esterificación de sus grupos ácidos carboxílicos, haciendo a esta molécula lipofílica y por lo tanto permeable en la membrana celular, una vez en el interior celular, existen enzimas que desesterifican al Fura-2 AM, dejando solo Fura-2 el cual no permea la membrana y permite su unión a Ca^{2+} (Barreto-Chang & Dolmetsch, 2009). La elección de este colorante se basó en su propiedad de excitación dual (ratiométrico) que consiste en lo siguiente: cuando existe una baja concentración de Ca^{2+} , el Fura-2 muestra un amplio espectro de excitación entre 300 y 400 nm, con un pico máximo aproximadamente a 370 nm. Cuando el Fura-2 se une a Ca^{2+} , el pico de excitación se incrementa en intensidad desplazándose en el espectro UV. Consecuentemente si el Fura-2 es excitado a 340 nm la unión del Ca^{2+} causará un incremento en la fluorescencia, mientras que se observará una disminución de la fluorescencia cuando este fluorocromo sea excitado a 380 nm; para ambas longitudes de onda de excitación, la emisión de la fluorescencia es monitoreada a 510 nm (Ozcan, Saatci, Ayar, Canpolat, & Kelestimur, 2015). Por lo tanto se miden los dos picos de fluorescencia y se combinan en una relación 340/380, denominada como "ratio". Este "ratio" está construido de tal manera que la longitud de onda en la cual la fluorescencia presenta un máximo cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es alta y un mínimo cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es baja, se divide entre la longitud de onda que presenta lo opuesto (un máximo cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es baja y un mínimo cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es alta). Excitando sucesiva y rápidamente a 340 y 380 nm, la relación (Ratio) de las respectivas señales de emisión fueron usadas para monitorear la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. La ventaja del uso de este fluorocromo ratiométrico con respecto a los de una sola longitud de onda de excitación, reside en que el valor del ratio no depende de la concentración del fluorocromo o de la intensidad de la luz, movimiento de la célula(s) en caso de que este ocurra, o del grosor de las mismas, dando mediciones libres de artefactos (Schwaller, 2012).

Para monitorear las variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$, las CE's fueron visualizadas en un microscopio de epifluorescencia (Axiolab Carl Zeiss, Germany) (**Figura 6**), acoplado a una lámpara de mercurio (OSRAM HBO 50) como fuente de luz. Un obturador controlado por computadora permitió el paso de la luz en el momento en que fueron realizadas las mediciones de la fluorescencia, 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 permitiendo el paso de la luz respectivamente a 340 y 380 nm.

La luz emitida por la lámpara de mercurio incidió en un espejo dicróico, que permitió así la separación de los haces de luz de excitación y de emisión, reflejando la luz a 340 y 380 nm hacia el objetivo de inmersión en agua (Zeiss 40X W Plan-APOCHROMAT) cuya distancia de trabajo fue de 2.05 mm y una apertura numérica de 1.0. El objetivo concentró la luz sobre la preparación. La preparación de las CE's en la placa de Petri, emitió luz a varias longitudes de onda, que atravesaron al objetivo y chocaron contra el mismo espejo dicróico, el cual permitió el paso de longitudes de onda superiores a 410 nm las cuales fueron seleccionadas por un filtro verde a 510 nm. La luz se dirigió 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 una computadora. Las imágenes obtenidas por la cámara, se almacenaron en una computadora para posteriormente analizar las variaciones de la intensidad de fluorescencia emitida por cada una de las células delimitadas en regiones de interés o ROI (por sus siglas en inglés). Cada ROI que fue seleccionado correspondió a una célula. Debido a los inconvenientes acerca del procedimiento para calibrar los valores de $[Ca^{2+}]_i$, como son: fluorescencia de fondo, autofluorescencia del tejido o células, la temperatura, fuerza iónica, pH (ya que los pequeños cambios en el pH de las soluciones de calibración afectarían a la medición de la fluorescencia), en nuestro estudio los cambios de la $[Ca^{2+}]_i$, para cada ROI, se evaluaron en función de los cambios de la relación de fluorescencia

340/380 (Ratio 340/380); esto quiere decir que un aumento en las mediciones del Ratio 340/380, indican un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$. El Ratio 340/380 fue medido cada 3 segundos a temperatura ambiente (**Figura 6**).

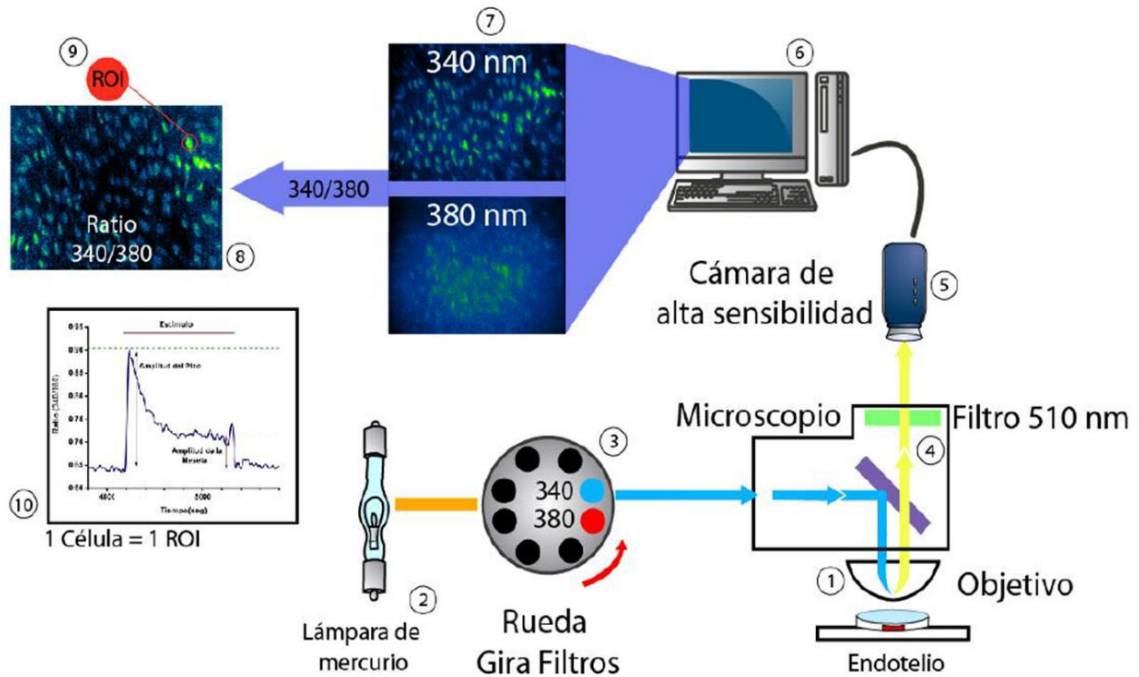


Figura 6. Técnica de microfluorimetría para la medición de Ca^{2+} Intracelular en endotelio *in situ* de aorta de rata. El anillo de aorta previamente cargado con el fluoróforo Fura-2, fue colocado en un microscopio directo de fluorescencia [1]. Las CE's del anillo fueron excitadas con luz directamente enfocada de una lámpara de mercurio [2], la cual fue filtrada de forma alterna entre dos longitudes de onda, 340 o 380 nM empleando filtros de excitación fijados en un revolver gira-filtros [3]. La luz que fue emitida por las células pasó a través de un filtro de 510 nM [4] y fue detectada por una cámara de alta sensibilidad [5]. Las imágenes obtenidas por la cámara fueron obtenidas cada 3 segundos y se almacenaron en una computadora [6] para su subsecuente migración a otra computadora para su análisis. Empleando un software personalizado, partiendo de las imágenes correspondiente a los filtros de excitación 340/380 nM [7] se obtuvo el Ratio 340/380 [8] de regiones de interés [9], que fueron dibujadas manualmente. Cada ROI fue dibujado individualmente alrededor de cada célula. Finalmente, con el software Origin Pro 7.0 se graficó el Ratio 340/380 y se realizaron las mediciones correspondientes.

Para evaluar las alteraciones que causa la DM sobre la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en el endotelio *in situ* de aorta de rata utilizamos el agonista: adenosintrifosfato (ATP) para estimular un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular. La elección de esta molécula se basa en las siguientes consideraciones: **1)** el ATP es una molécula que se libera fisiológicamente de las terminales simpáticas posganglionares a nivel vascular, tejido hipóxico, plaquetas agregadas y paredes vasculares lesionadas, además de que es liberado por las mismas células endoteliales **2)** el ATP de manera fisiológica causa la liberación de factores vasoactivos del endotelio y finalmente **3)** nuestro grupo de investigación ha caracterizado detalladamente la señal de Ca^{2+} evocada por este agonista en células endoteliales *in situ* de aorta de rata (Berra-Romani et al., 2004).

11.4. Análisis de Resultados

Para la obtención de los valores de fluorescencia, elaboración de las gráficas y análisis de resultados se efectuaron utilizando los programas Image J, Microcal Origin 7.0 y GraphPad Prism 5.0 respectivamente. El análisis estadístico se realizó con la ejecución de pruebas t-Student no pareada con un valor de la significancia mínima de 0.05 (valor de p). Los datos obtenidos fueron expresados como promedio \pm error estándar. Los protocolos evaluados se realizaron en anillos aórticos provenientes de al menos 3 ratas de cada uno de los grupos (OZDF, LZDF Y LE). Los parámetros que se midieron en los registros de la señal de Ca^{2+} intracelular de células del endotelio estimuladas por la aplicación de ATP 300 μM) y en sus diferentes protocolos fueron los siguientes (**Figura 7**):

- a) **Basal PSS.** Niveles de Ca^{2+} iniciales, previos a la estimulación con el agonista obtenidos cuando las células fueron perfundidas con solución PSS (que contiene Ca^{2+}) (ver sección de soluciones).
- b) **Basal 0Ca.** Niveles de Ca^{2+} durante 200 seg en los cuales se perfunde una solución libre de Ca^{2+} .

- c) Amplitud del pico.** Diferencia entre el punto máximo de fluorescencia obtenido al estimular a las células endoteliales con ATP (300 μ M) y el valor de Ca^{2+} previo a la estimulación (Basal 0Ca).
- d) Duración de la respuesta al 90, 60 y 30 % de la amplitud del pico.** La duración de la respuesta de Ca^{2+} se evaluó considerando la amplitud del pico (ver inciso anterior) como 100%. Se midió el tiempo en el cual la señal de Ca^{2+} se encuentra a un 90%, 60 y 30% de su valor inicial (100%).
- e) Área bajo la curva.** (A.B.C). Es el área delimitada por el registro de la señal de Ca^{2+} desde que se aplica el ATP hasta que se remueve. Este parámetro se evaluó midiendo la integral del transiente desde la aplicación de ATP hasta el momento en que se remueve el agonista. Este parámetro fue medido utilizando el programa Graph-Phad.

11.5. Soluciones

La solución salina fisiológica (PSS) tuvo la siguiente composición en mmol/L: 150 NaCl, 6 KCl, 1.5 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 10 Glucosa, 10 HEPES y se ajustó a un pH de 7.4 con NaOH, para la preparación de la solución libre de Ca^{2+} (0Ca), se eliminó el Ca^{2+} y se agregó EGTA 0.5mM y el pH fue ajustado a 7.4 con HCl. La solución $0\text{Na}-0\text{Ca}$, fue preparada sustituyendo NaCl por N-metil-d-glucamina (NMDG) 150mM y EGTA 0.5 mM en lugar del CaCl_2 , respectivamente. Para llevar la solución a pH fisiológico se empleó HCl.

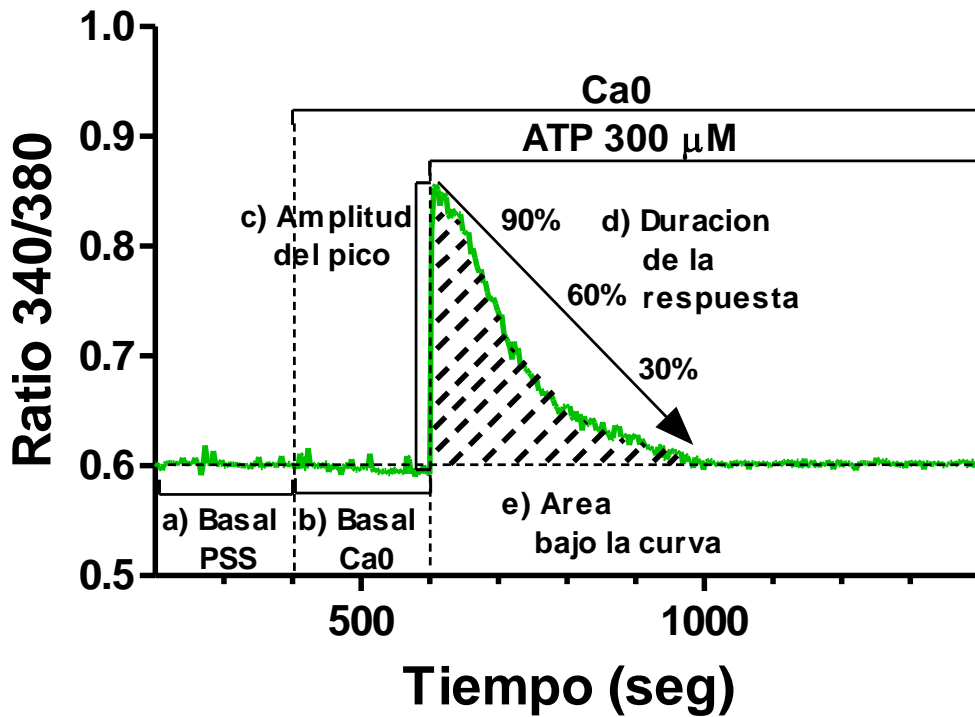


Figura 7. Mediciones realizadas en los registros de Ca^{2+} intracelular de células del endotelio. Esquemáticamente, se muestran los parámetros a evaluar para cada registro de Ca^{2+} obtenidos en cada uno de los protocolos propuestos. Los niveles basales de Ca^{2+} **a**, **b**), previos a la estimulación con el agonista y niveles basales en 0Ca^{2+} . Amplitud del pico **c**), es el punto más alto de la fluorescencia con respecto al nivel basal inicial obtenido al estimular a las células con ATP. La velocidad de recuperación **d**), de la señal de Ca^{2+} al 90, 60 y 30 % considerando la amplitud del pico como el valor del 100%. Finalmente se evaluó el área bajo la curva **e**), evaluada solamente en el tiempo que permaneció el agonista en la preparación del endotelio. La medición de este parámetro se realizó utilizando el software Graph Phad.

12. RESULTADOS

12.1. Parámetros Bioquímicos y Somáticos

En la **Tabla 2**, se muestran los parámetros bioquímicos y somáticos obtenidos de los tres grupos de animales de experimentación que fueron empleados en el presente trabajo: ratas OZDF, LZDF y Long Evans.

Parámetros Morfométricos	Cepa		
	Long Evans	LZDF	OZDF
Peso (gr)	301.5 ± 6.264	301.1 ± 5.100	467.7 ± 8.380 ^{a,b}
Largo (cm)	21.55 ± 0.2670	21.45 ± 0.2503	22.07 ± 0.1937
Cintura (cm)	13.48 ± 0.2026	13.82 ± 0.2316	18.57 ± 0.1954 ^{a,b}
Grasa Epididimal (gr)	2.759 ± 0.1557	3.241 ± 0.2658	12.44 ± 0.4994 ^{a,b}
Parámetros Bioquímicos			
Glucosa Basal (mg/dL)	210.4 ± 46.29	254.8 ± 25.48	407.6 ± 35.94 ^{a,b}
Glucosa 2h (mg/dL)	64.60 ± 4.675	123.4 ± 23.07	256.9 ± 31.11 ^{a,b}
Colesterol (mg/dL)	77.8 ± 2.746	90.83 ± 12.22	133 ± 11.82 ^{a,b}
HDL (mg/dL)	54.46 ± 1.362	61.6 ± 3.016	72.06 ± 8.217
LDL (mg/dL)	19.33 ± 4.802	28.48 ± 12.09	35.64 ± 13.26
VLDL (mg/dL)	12.04 ± 3.709	11.53 ± 3.619	34.53 ± 3.948 ^{a,b}
Triglicéridos (mg/dL)	44.2 ± 8.57	42 ± 10.35	186.1 ± 23.04 ^{a,b}

Tabla 2. Parámetros morfométricos y bioquímicos de ratas provenientes de la cepa Long Evans y ZDF en su fenotipo delgado (LZDF) y su fenotipo obeso (OZDF). Las metodologías empleadas para obtener la determinación de los parámetros fueron: Glucosa basal, Hexoquinasa; tolerancia a la glucosa (2hrs) Accucheck® ROCHE; Colesterol total, HDL, LDL, VLDL y Triglicéridos, GOD-PAP. Los valores expresados en la tabla corresponden al promedio ± error estándar. Los datos fueron comparados mediante la prueba t-Student con un valor de significancia mínimo de 0.05 (valor de p). La letra **a** representa las diferencias significativas observadas al comparar el grupo OZDF con respecto al grupo Long Evans. La letra **b** indica, las diferencias significativas encontradas entre el grupo OZDF con respecto al grupo LZDF. El análisis de parámetros somáticos y bioquímicos se realizó con una n mínima de 5 animales para los tres grupos de ratas.

El análisis de los parámetros morfométricos muestra que el grupo de ratas Long Evans es parecido al grupo de ratas de fenotipo delgado de la cepa Zucker Diabetic Fatty (LZDF) en los siguientes parámetros evaluados: peso, largo, circunferencia abdominal y grasa epididimal. En contraste, las ratas con fenotipo OZDF, mostraron alteraciones morfométricas significativas al compararlas con las ratas LZDF y Long Evans, estas diferencias se pueden apreciar con facilidad al observar su fenotipo (**Figura 5**) y cuantitativamente, con los resultados reportados en la **Tabla 2**.

Las ratas OZDF presentaron un peso de 467.7 ± 8.380 gr, mientras que el peso de las ratas LZDF fue de 301.1 ± 5.100 y Long Evans, 301.5 ± 6.264 , lo que representa que las ratas OZDF tengan un aumento de su peso en aproximadamente un 55.12% más que los otros dos grupos. El aumento en el peso de las ratas OZDF no es debido a un tamaño mayor (largo) del grupo OZDF que en comparación de los otros dos grupos control, ya que no hubo diferencia significativa entre los tres grupos. Sin embargo, la dimensión de la cintura se encuentra incrementada aproximadamente en un 37.75% en comparación con las ratas Long Evans y LZDF. Cabe mencionar, que se encontró un aumento de la grasa epididimal de un aproximado de 383.83% en la rata OZDF en comparación a la rata LZDF y un 450.88% en OZDF comparándola con la rata Long Evans. Simplificando el porcentaje, se encontró 4 veces más grasa epididimal en la rata OZDF en comparación a los grupos de LZDF y Long Evans.

Estos datos, nos permitieron comprobar que el fenotipo obeso de la cepa Zucker Diabetic Fatty (OZDF) expresa un aumento en las características presentes en la **Tabla 2** con excepción de su longitud (hocico-ano). Además, nos indican que el fenotipo delgado de la cepa ZDF, posee valores semejantes al de la rata Long Evans, una rata considerada universalmente como rata sana control.

Los resultados bioquímicos, reportados en la **Tabla 1**, confirman también otras de las características del modelo de rata OZDF: la hiperglicemia y dislipidemia. En efecto, los niveles de glucosa, tanto en la prueba de glucosa basal, como en la prueba de tolerancia a la glucosa (ver material y métodos) resultaron ser

significativamente mayores en el grupo de ratas OZDF con respecto al grupo control.

Los niveles de glucosa basal, después de 8 horas de ayuno, fueron de 407.6 ± 35.94 mg/dl en el grupo de ratas OZDF en comparación con 254.8 ± 25.48 y 210.4 ± 46.29 mg/dl en ratas LZDF y Long-Evans respectivamente (**Tabla 2**). Estos datos muestran un aumento de la concentración de glucosa en sangre de ratas OZDF de aproximadamente 93% con respecto a las ratas Long-Evans y de aproximadamente 60% con respecto a las ratas LZDF. No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los valores basales de glucosa de ratas Long-Evans y LZDF, $p > 0.05$. Cabe señalar que los valores de glucosa reportados exceden a los esperados para muestras de sangre obtenidas de ratas, esta discrepancia se debe a que el anestésico utilizado para la toma de sangre y la extracción de la aorta, altera los valores de glucosa, tal y como se reporta en (Povlsen et al., 2013; Salley, Mishra, Tiwari, Jadhav, & Ndisang, 2013; Zanchi et al., 2013); sin embargo, este efecto no impide ver las diferencias en los niveles de glucosa entre los grupos de ratas.

Para confirmar los resultados antes mencionados se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa en ratas no anestesiadas, a las cuales se les administraron 2 g/Kg de peso de glucosa por vía intra-peritoneal y después de transcurridas 2 horas se le toma una muestra de sangre por punción de la vena caudal y la concentración de glucosa fue determinada utilizando el sistema de tiras reactivas de Accucheck® (ROCHE) (ver sección de material y métodos), como se aprecia en la **Tabla 2**, también en este caso, los niveles de glucosa en sangre fueron aproximadamente un 400% mayores en las ratas OZDF en comparación con las ratas Long-Evans y LZDF. Si bien los valores de glucosa en las ratas Long-Evans fueron inferiores a los que presentaron las ratas LZDF, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$), por lo que concluimos que no hay diferencia en la homeostasis de la glucosa entre los grupos de ratas Long-Evans y el fenotipo delgado de la cepa Zucker Diabetic Fatty y comprueba que la rata OZDF, es diabética.

En adición a la hiperglicemia, las ratas obesas (OZDF) también presentan un incremento de aproximadamente 46% en los niveles de colesterol total (133 ± 11.82 mg/dl en ratas OZDF vs 90.83 ± 12.22 mg/dl en ratas LZDF y 77.8 ± 2.746 mg/dl en ratas Long-Evans), de 186% en los niveles de VLDL entre OZDF vs Long Evans y 199.47% entre OZDF vs LZDF (34.53 ± 3.948 mg/dl en ratas OZDF vs 11.53 ± 3.619 mg/dl en ratas LZDF y 12.04 ± 3.709 mg/dl en ratas Long-Evans) y 320% en los niveles de triglicéridos en comparación con las ratas Long-Evans y LZDF (186.1 ± 23.04 mg/dl en ratas OZDF vs 42 ± 10.35 mg/dl en ratas LZDF y 44.2 ± 8.57 mg/dl en ratas Long-Evans) (ver **Tabla 1**) lo que denota una clara alteración en la regulación de los lípidos en la rata obesa-diabética OZDF. Una vez caracterizados nuestros grupos de ratas OZDF como diabéticas, fenotipo delgado de la Zucker Diabetic Fatty (LZDF) (no diabético) y control universal Long-Evans (no diabético), procedimos a evaluar la señal de Ca^{2+} en células endoteliales *in situ* de aorta de rata.

12.2. Efecto de la DMII Sobre la Concentración de Ca^{2+} Basal en Células Endoteliales *in situ* de Aorta de Rata

El primer parámetro evaluado fue el efecto de la DMII sobre la concentración basal de Ca^{2+} intracelular, es decir, sobre los niveles de Ca^{2+} intracelular que presentan las células endoteliales en reposo (no estimuladas) (ver sección de análisis de datos, **Figura 7**). En la **Figura 8** se muestra el promedio \pm EE del valor de la $[Ca^{2+}]_i$ basal medido en presencia de Ca^{2+} en el medio extracelular (1.5 mM) (**Figura 8, izquierda, Ca^{2+}**). El valor de la concentración de Ca^{2+} basal fue de 0.6031 ± 0.0049 en ratas Long Evans (barra gris, n=40); 0.5908 ± 0.0074 en ratas LZDF (barra azul, n=38) y 0.5900 ± 0.0065 en ratas OZDF (barra roja, n=43). No se encontraron diferencias significativas en la $[Ca^{2+}]_i$ basal entre los tres grupos de ratas ($p < 0.05$).

Dado que en el presente trabajo, la mayoría de los experimentos fueron realizados en ausencia de Ca^{2+} en el medio extracelular ($0Ca^{2+}$), con la finalidad

de evaluar la actividad de los diferentes mecanismos que regulan la $[Ca^{2+}]_i$ en condiciones en las cuales el agonista utilizado (ATP en este caso) causa únicamente la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares, se midió la $[Ca^{2+}]_i$ basal en ausencia de Ca^{2+} extracelular y el promedio \pm EE se muestran en la **Figura 8, derecha, $0Ca^{2+}$** . En estas condiciones tampoco se encontraron diferencias significativas en el Ca^{2+} basal de los tres grupos de ratas ($p < 0.05$).

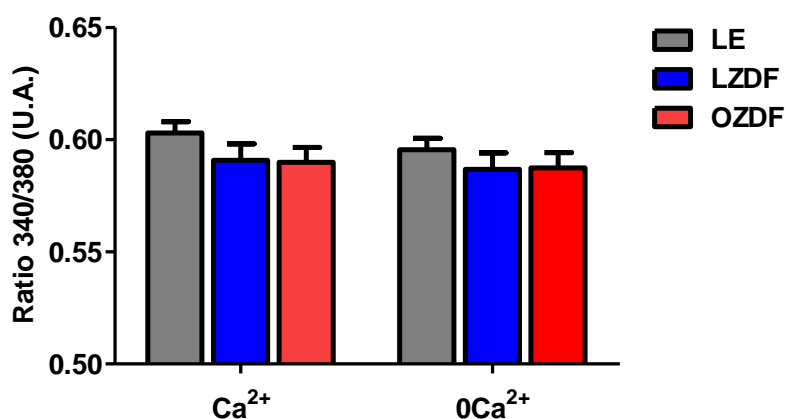


Figura 8. Concentración basal de Ca^{2+} libre intracelular en células endoteliales *in situ* de aorta de ratas Long Evans, LZDF y OZDF medidos en presencia (Ca^{2+}) y ausencia de Ca^{2+} ($0Ca^{2+}$) en el medio extracelular. Las barras representan la media \pm EE. Long Evans (barra gris, n=40), LZDF (barra azul, n=38) y OZDF (barra roja, n=43).

12.3. Efecto de la DMII Sobre la Señal de Ca^{2+} Evocada por ATP en Células Endoteliales *in situ* de Aorta de Rata

En la **Figura 9A**, se muestra el promedio \pm EE de la señal de Ca^{2+} inducida en una solución extracelular libre de Ca^{2+} ($0Ca^{2+}$) por la aplicación de 300 μ M del agonista adenosintrifosfato (ATP) en endotelio *in situ* de aorta de rata obtenido de: ratas Long-Evans (línea gris), ratas LZDF (línea azul) y ratas OZDF (obesa-diabética, línea roja). Como se puede observar, la aplicación de ATP 300 μ M, generó un aumento transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$, que consiste de dos fases: 1) un rápido aumento

de la $[Ca^{2+}]_i$ (pico), seguido de 2) una fase lenta de descenso de la $[Ca^{2+}]_i$ hacia valores de Ca^{2+} basales, (previos a la aplicación de ATP), a esta fase se le denomina como fase de decaída. La señal de Ca^{2+} inducida por ATP 300 μ M fue similar en los tres grupos de ratas (**Figura 9A**). En efecto, no encontramos diferencias significativas en los parámetros medidos de la señal de Ca^{2+} en ninguno de los grupos experimentales. Específicamente, no se encontraron cambios significativos en: la amplitud del pico (Long-Evans, 0.2232 ± 0.02462 , $n=6$; LZDF 0.1844 ± 0.009751 , $n=7$; y OZDF 0.2044 ± 0.01596 , $n=5$, **Figura 9B**); duración de la fase de decaída al 90, 60 y 30 % (**Figura 9C**); y área bajo la curva (A.B.C.) (Long-Evans, 34.95 ± 3.712 ; LZDF 26.43 ± 1.843 , y OZDF 30.28 ± 4.540 , **Figura 9D**). Aunque estos resultados sugieren que la DMII no altera la señal de Ca^{2+} inducida por la aplicación de ATP (300 μ M), no se puede descartar la posibilidad de que alguno de los múltiples mecanismos que regulan la concentración de Ca^{2+} intracelular en endotelio se encuentren alterados por la DMII y que esta disfunción sea enmascarada por la función de los otros mecanismos; por este motivo decidimos continuar con la determinación de la señal de Ca^{2+} inducida por ATP 300 μ M.

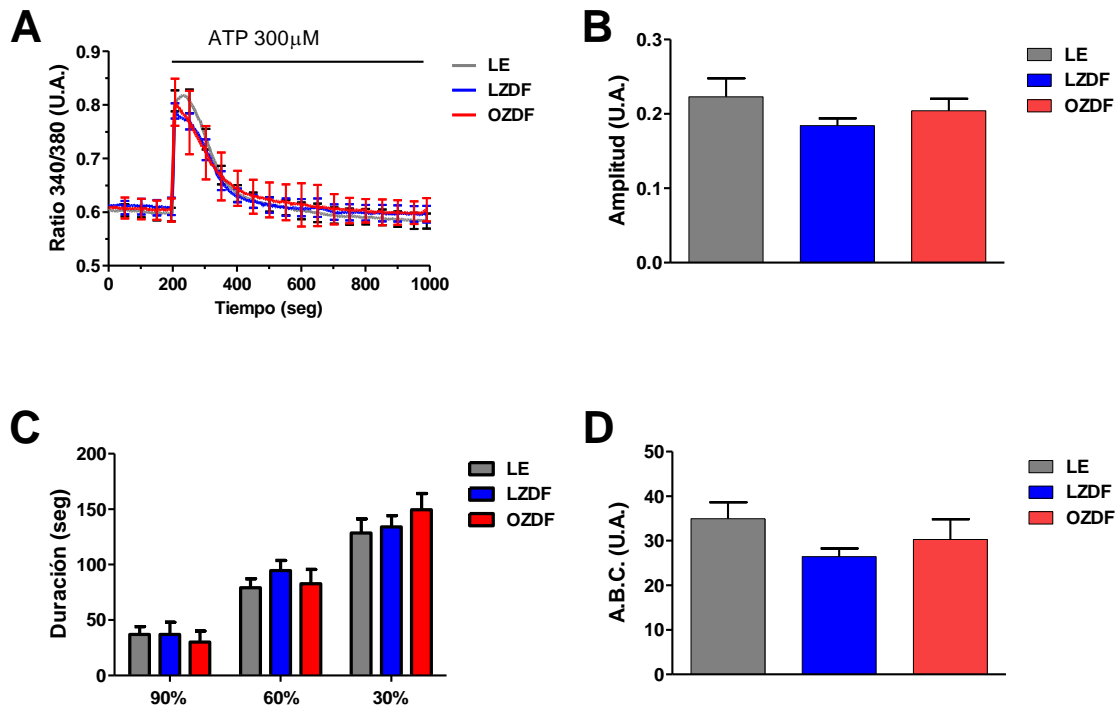


Figura 9. Señal de Ca^{2+} intracelular en CE's *in situ* de aorta de ratas Long Evans, LZDF y OZDF inducida por ATP 300 μM en ausencia de Ca^{2+} extracelular. A, promedio \pm EE de la señal de Ca^{2+} inducida en una solución extracelular libre de Ca^{2+} (0Ca^{2+}) por la aplicación de 300 μM del ATP en endotelio *in situ* de aortas de rata obtenido ratas Long-Evans (línea gris), LZDF (línea azul) y OZDF (línea roja). **B,** Media \pm EE de la amplitud del pico. **C,** duración de la fase de descenso al 90, 60 y 30 % de la amplitud del pico y **D)** A.B.C.

12.4. Efecto de la DMII Sobre la Actividad del Intercambiador $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ (NCX) en la Regulación de la Señal de Ca^{2+} Evocada por ATP

En ausencia de Ca^{2+} en el medio extracelular (0Ca^{2+}), se realizaron dos protocolos para evaluar las posibles alteraciones en la actividad del NCX, causadas por la DMII en las CE's de aorta de rata. El primer protocolo consistió en sustituir equimolarmente el cloruro de Na^+ (NaCl) de la solución fisiológica externa con un análogo del ión Na^+ impermeable para la célula, el N-metil D glucamina (NMDG). Al no haber iones Na^+ en el medio extracelular que se intercambien por iones Ca^{2+} del medio intracelular, la actividad del NCX se suprime. Los resultados se muestran en la **Figura 10**.

El segundo protocolo consistió en bloquear el modo directo de la actividad del NCX, el cual consiste en la remoción del Ca^{2+} intracelular hacia el espacio extracelular y la consecuente entrada de iones Na^+ . Para lograr este objetivo se utilizó el inhibidor KB-R 7943 (ácido carbamidotioico, 2-[2-[4-(4-nitrobenziloxi)fenil]etil]isotiourea metanosulfonato) utilizando una concentración de 8 μM (Amran, Homma, & Hashimoto, 2003). Se ha reportado que el KB-R es un inhibidor específico del NCX que bloquea principalmente el modo directo, a través de un efecto competitivo con el ión Ca^{2+} en el NCX (Amran et al., 2003). Los resultados obtenidos con este protocolo se presentan en la **Figura 11**.

A continuación se describen en detalle los resultados obtenidos con cada uno de los protocolos antes señalados.

12.4.1. Efecto de la remoción de Na^+ extracelular en la señal de Ca^{2+} inducida por ATP en endotelio *in situ* de aorta de rata en ausencia de Ca^{2+} extracelular.

El panel **A** de la **Figura 10** muestra el promedio \pm EE de los de la señal de Ca^{2+} intracelular en respuesta a la aplicación de ATP 300 μM en una solución extracelular libre de Ca^{2+} y libre de Na^+ extracelular (el Na^+ extracelular fue sustituido equimolarmente por NMDG ($\text{Na}0$)). Las líneas punteadas representan los registros típicos de la señal de Ca^{2+} en presencia de Na^+ (solución fisiológica libre de Ca^{2+} extracelular (0Ca^{2+})) y las líneas continuas representan aquellos registros que se realizaron bajo las condiciones de $0\text{Na}^+/0\text{Ca}^{2+}$. Los registros en línea punteada corresponden a los registros obtenidos en condiciones control con ATP y que se muestran en la **Figura 9A**.

El bloqueo del NCX durante la señal de Ca^{2+} inducida por ATP 300 μM causa: **a)** una reducción de la amplitud del pico de Ca^{2+} en los tres grupos de ratas, pero únicamente se observa diferencia significativa en el endotelio de la rata Long-Evans (0.2232 ± 0.0246 , $n=6$, barra gris sólido, $\text{Ca}0$ vs 0.14 ± 0.0077 , $n=6$, barra

gris entramado, Ca0/Na0; $p < 0.05$) (**Figura 10B**); **b**) reducción significativa de los tiempos de recuperación del transiente al 90, 60, y 30% en los tres grupos de rata (**Figura 10C**); y **c**) reducción en el A.B.C de los tres grupos de ratas, pero solo de forma significativa en endotelio de ratas LE y OZDF (**Figura 10D**).

Los cambios descritos anteriormente se observan cuando se compara la respuesta control (Ca0, líneas punteadas vs grupo con inhibición del intercambiador, Ca0/Na0, líneas continuas). Sin embargo, cabe señalar que estos cambios se observaron por igual en los tres grupos de rata y no se encontraron diferencias estadísticas en ninguno de los grupos estudiados al perfundir el endotelio con solución 0Na⁺/0Ca²⁺ (compare barras con entramado entre sí **Figura 10A-D**).

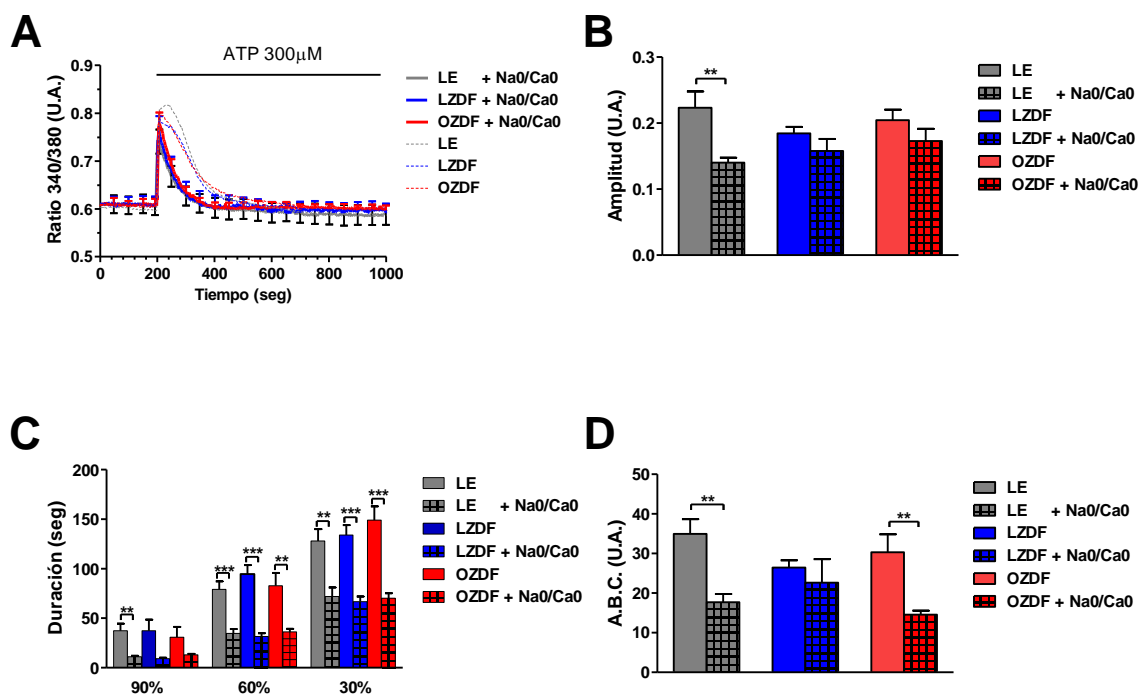


Figura 10. Efecto de la remoción del Na⁺ extracelular en la señal de Ca²⁺ generada por la estimulación por ATP en una solución libre de Ca²⁺ extracelular. A) Promedio \pm EE de la señal de Ca²⁺ inducida por ATP en una solución libre de Ca²⁺ (líneas punteadas) y en una solución libre de Ca²⁺ y de Na⁺ (Na0/Ca0) (líneas continuas). **B**, **C** y **D** muestra los parámetros evaluados con ATP 300 μ M en Na0. Las diferencias significativas que se muestran, se obtuvieron a partir de la aplicación de la prueba t-Student con un nivel de significancia de 0.05.

12.4.2. Efecto del KB-R 7943 en la señal de Ca^{2+} inducida por ATP en ausencia de Ca^{2+} extracelular.

El inhibidor específico del NCX, KBR7943 tuvo un efecto similar al que tuvo la remoción del Na^+ extracelular (experimentos mostrados en la sección anterior) sobre el transiente de Ca^{2+} evocado por ATP en ausencia de Ca^{2+} extracelular. En la **Figura 11A** se muestra el promedio \pm EE de la señal de Ca^{2+} inducida por la aplicación de 300 μM de ATP en una solución extracelular libre de Ca^{2+} (control, líneas punteadas) y adicionando a la solución libre de Ca^{2+} , 8 μM de KBR 7943 (líneas continuas).

El bloqueo del NCX con KBR7943 durante la señal de Ca^{2+} inducida por ATP 300 μM causa en los tres grupos de ratas estudiados: **a)** una reducción significativa de la amplitud del pico (**Figura 11B**); **b)** reducción significativa de los tiempos de recuperación del transiente al 90, 60, y 30% (**Figura 11C**); y **c)** reducción en el A.B.C (**Figura 11D**).

Sin embargo no encontramos diferencia significativa en ninguno de los parámetros medidos al comparar los tres grupos de ratas estudiados en respuesta al tratamiento con KBR7943 (compare barras con entramado en **Figura 11A-D**).

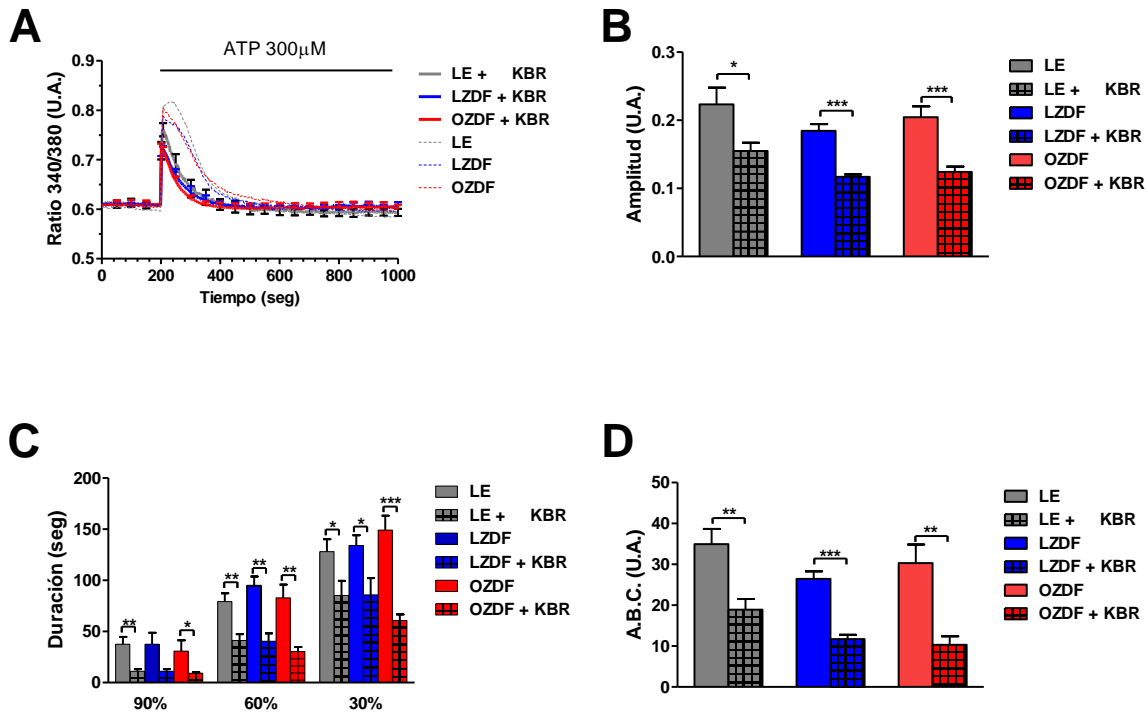


Figura 11. Efecto del KBR7943 en la señal de Ca²⁺ intracelular evocada por ATP en CEs *in situ* de aorta de rata en ausencia de Ca²⁺ extracelular. A) Promedio \pm EE de la señal de Ca²⁺ inducida por ATP en una solución libre de Ca²⁺ (líneas punteadas) y en una solución libre de Ca²⁺ adicionando KBR7943 8 μ M. **B, C y D** muestra los parámetros evaluados. Las diferencias significativas que se muestran, se obtuvieron a partir de la aplicación de la prueba t-Student con un nivel de significancia de 0.05.

12.5. Efecto de la DMII Sobre la Actividad de la SERCA en la Regulación de la Señal de Ca²⁺ Generada por ATP en Ausencia de Ca²⁺ Extracelular.

En el estudio de la contribución de la actividad de la proteína SERCA y su posible alteración en las ratas ZDF se procedió con la utilización del bloqueador específicos de la actividad de la SERCA, ácido ciclopiazónico (CPA), durante la estimulación del endotelio con ATP. El ácido ciclopiazónico (CPA) es una micotoxina aislada de *Penicillium* (*P. cyclopium*, *P. griseofulvum*, *P. camemberti*, *P. urticae* y *P. commune*) y *Aspergillus* (*A. versicolor*, *A. flavus* y *A. oryzae*) (Hymery, Masson, Barbier, & Coton, 2014), la cual, desde hace más de dos décadas, se le ha descrito que tiene un efecto bloqueador específico de la

proteína SERCA. Trabajos previos de medición de Ca^{2+} en EV y células progenitoras endoteliales, demuestran el efecto bloqueante del CPA sobre la SERCA a una concentración de 10 μM (Berra-Romani et al., 2012; Dragoni et al., 2011; Lodola et al., 2012).

El protocolo experimental utilizando CPA (10 μM) consistió en la aplicación simultánea del agonista (ATP, 300 μM) y el bloqueador (CPA) sobre el endotelio y los datos obtenidos se describen en la **Figura 12**. En el panel A se observa el promedio \pm EE de la señal de Ca^{2+} causada por ATP 300 μM en presencia de CPA 10 μM en una solución libre de Ca^{2+} (líneas continuas) y se comparan con la señal de Ca^{2+} evocada por ATP 300 μM en una solución sin Ca^{2+} (Ca^0) (líneas discontinuas). Se puede observar que el CPA incrementa todos los parámetros medidos de la señal de Ca^{2+} únicamente en las células endoteliales de aorta de rata obtenidas de ratas diabéticas (OZDF) **Figura 12A**. En particular, la amplitud de la señal de Ca^{2+} en rata OZDF se incrementó de 0.2044 ± 0.0159 ($n=5$) en 0Ca^{2+} a 0.2580 ± 0.0124 ($n=5$) en $0\text{Ca}^{2+} + \text{CPA}$ (**Figura 12B**), $p < 0.05$. Los tiempos de decaída de la amplitud del transiente al 60 y 90% fueron aumentados significativamente en endotelio de rata OZDF de 82.77 ± 12.94 a 120.9 ± 10.21 seg y de 149 ± 14 a 216 ± 32 seg respectivamente (**Figura 12C**). Así mismo el A.B.C. de la señal de Ca^{2+} en rata OZDF fue aumentado por el CPA de 30.28 ± 4.54 a 58.37 ± 7.09 U.A; $p < 0.05$ (**Figura 12D**). Estos resultados demuestran que la DMII altera la actividad de la SERCA en endotelio *in situ* de aorta de rata.

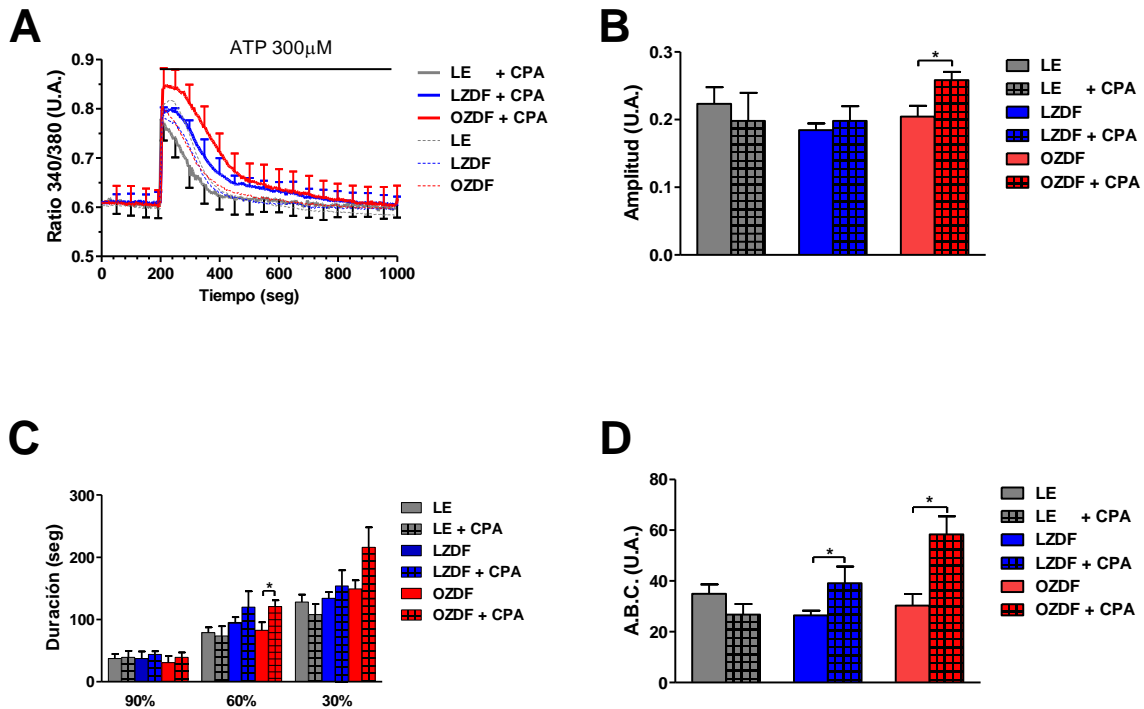


Figura 12. Efecto del CPA en la señal de Ca^{2+} en CE's de aorta de ratas estimuladas con ATP en una solución libre de Ca^{2+} . A muestra el promedio \pm EE de la señal de Ca^{2+} inducida por ATP 300 μ M en presencia de CPA 10 μ M. Las líneas punteadas representan los promedios obtenidos con la aplicación del agonista sin CPA. B, C y D muestran los valores de los parámetros analizados para ATP. Las diferencias significativas que se muestran (asteriscos), se obtuvieron a partir de la aplicación de la prueba t-Student con un nivel de significancia de 0.05.

12.6. Efecto de la DMII Sobre la Actividad de la PMCA en la Señal de Ca^{2+} Inducida por ATP en Ausencia de Ca^{2+} Extracelular.

Para el estudio de la contribución de la PMCA en la regulación de Ca^{2+} así como en su posible afectación en el grupo obeso de la cepa ZDF, se procedió a utilizar un bloqueador de la actividad de la bomba de Ca^{2+} dependiente de ATP de la membrana plasmática. La carboxieosina (Carbeo) es una molécula que ha sido utilizada como inhibidor de la actividad de la PMCA en células HeLa (Pulina, Rizzuto, Brini, & Carafoli, 2006) en epitelio olfatorio (Griff, Kleene, & Kleene, 2012)

y recientemente en células del endotelio vascular (Sheikh et al., 2012a). Los protocolos consistieron en la aplicación conjunta del agonista (ATP 300 μ M) y carboxieosina 20 μ M; los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 13**.

En el panel A de la **Figura 13**, se muestra el promedio \pm EE de la señal de Ca^{2+} generada en respuesta a la aplicación de ATP 300 μ M en presencia de Carb 20 μ M (líneas sólidas). También se incluyen los registros obtenidos de los transientes generados sin el inhibidor (control en 0Ca^{2+}) previamente descritos. En el panel **A** y **B** se puede observar que la carboxieosina reduce de forma significativa la amplitud del transiente de Ca^{2+} en los tres grupos de ratas estudiados con respecto al transiente control. Sin embargo este efecto sobre la amplitud del transiente fue mayor en el endotelio de aorta proveniente de ratas LZDF (ver columnas con entramado **Figura 13A** y **B**).

Al analizar la duración en la fase de recuperación del transiente, observamos que la carboxieosina tiene un efecto dual, reduce el tiempo de decaída al 90% de la amplitud del transiente en los tres grupos de ratas (**Figura 13C**) y posteriormente aumenta el tiempo de recuperación al 30% de la amplitud del transiente en los tres grupos de ratas con respecto a su control. Sin embargo se puede observar que el aumento de la duración del transiente al 30% fue estadísticamente mayor en las ratas LZDF y OZDF comparado con la LE (**Figura 13C**, comparara barras entramadas).

Debido al efecto dual de la carboxieosina sobre la duración del transiente, principalmente del obtenido en ratas LZDF y OZDF, el A.B.C. no muestra diferencia significativa en estos grupos de ratas y solo se observa en el grupo de ratas LE en donde el efecto de la carboxieosina sobre la duración del transiente fue estadísticamente menor (**Figura 13D**).

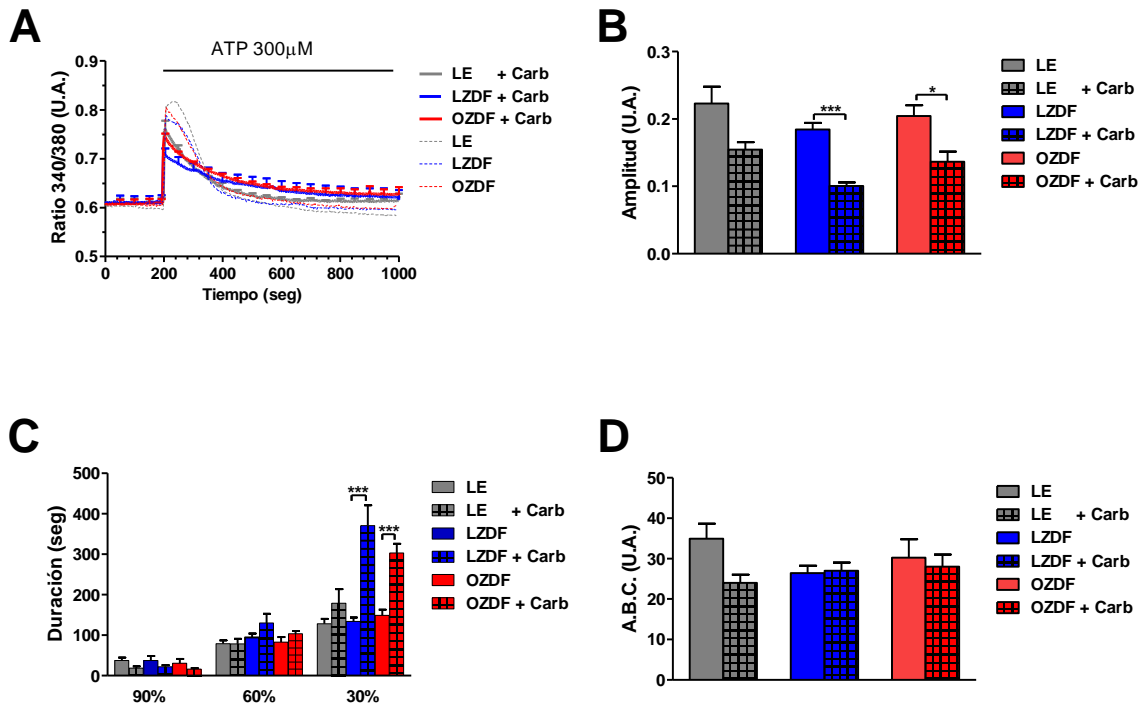


Figura 13. Efecto de la Carboxieosina, en la señal de Ca^{2+} inducida por ATP en CEs *in situ* de aorta de rata en ausencia de Ca^{2+} extracelular. A corresponden a los promedios \pm EE de la señal de Ca^{2+} generada por ATP en presencia de Carbeo, un bloqueador de la PMCA (líneas continuas). Las líneas discontinuas representan el promedio de la señal de Ca^{2+} evocada por ATP en ausencia de Ca^{2+} extracelular y de Carbeo. Los paneles **B**, **C** y **D** corresponden a los parámetros del transiente medidos. Los asteriscos representan la diferencia significativa con un valor de $p < 0.05$.

12.7. Efecto de la DMII Sobre la Entrada de Ca^{2+} del Medio Extracelular a Través de Canales Activados por los Almacenes Intracelulares de Ca^{2+} (SOCE).

La disminución de la concentración de Ca^{2+} en los almacenes intracelulares, en particular en el RE, causa la apertura de canales específicos de membrana denominados "Store Operated Channels" (SOC), cuya apertura permite la entrada de Ca^{2+} extracelular al medio citoplasmático del endotelio, fenómeno conocido como: entrada de Ca^{2+} activada por almacenes intracelulares (SOCE, "store

operated calcium entry”) (Parekh & Putney, 2005; Lodola et al., 2012; Socha, Behringer, & Segal, 2012).

Con la finalidad de evaluar posibles alteraciones causadas por la DMII sobre la SOCE, se procedió a realizar un protocolo ampliamente utilizado para activar la SOCE en células endoteliales (Estrada et al., 2012b; Lodola et al., 2012) y en una gran variedad de células (Majewski & Kuznicki, 2015b).

El protocolo consiste en vaciar los almacenes intracelulares de Ca^{2+} , en particular el RE, utilizando un inhibidor de la SERCA, el CPA. Una vez bloqueada la SERCA, el Ca^{2+} contenido en el RE difunde lentamente del lumen del RE hacia el citoplasma a través de canales de fuga presentes en el RE. En condiciones normales, este Ca^{2+} que se fuga del RE sería recapturado por la SERCA, pero si la SERCA es bloqueada con CPA, la continua fuga de Ca^{2+} del RE conllevaría al vaciamiento del RE y a la consecuente apertura de los SOC. De esta forma la reincorporación de Ca^{2+} al medio extracelular en la continua presencia de CPA, daría como resultado la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular hacia el citoplasma a través de los SOC, causando un aumento rápido de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Los resultados obtenidos al realizar este protocolo, se muestran en la **Figura 14**.

En el panel **A**, se muestra el promedio \pm EE de la señal de Ca^{2+} generada por la activación de la SOCE en endotelio *in situ* de aorta de rata Long Evans (línea gris), LZDF (línea azul) y OZDF (línea roja). Se puede observar que la aplicación de CPA en una solución libre de Ca^{2+} extracelular, causa un aumento transitorio de Ca^{2+} de baja amplitud, que corresponde a la fuga de Ca^{2+} del RE a través de canales de fuga antes mencionados. Aún en la continua presencia de CPA, este aumento discreto de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ regresa a los niveles de Ca^{2+} basal, esto debido a la participación de los mecanismos que remueven Ca^{2+} del citosol hacia el espacio extracelular, como son el NXC y la PMCA. Para comprobar que efectivamente el RE estuviera vacío (es decir sin Ca^{2+}) por el tratamiento con CPA, se procedió a aplicar ATP 300 μM en la continua presencia de CPA y ausencia de Ca^{2+} extracelular. Como se puede apreciar con esta maniobra no se observa aumento significativo de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, confirmando el completo vaciamiento del RE.

Posteriormente se procedió a reintroducir el Ca^{2+} en el medio extracelular y se observó la SOCE en los tres grupos de ratas. Sin embargo, como se muestra en el panel **B** (derecha, SOCE), la amplitud de la SOCE que se obtuvo en endotelio de ratas OZDF (0.1557 ± 0.0152 , $n=7$) fue estadísticamente menor al que presentó el endotelio de ratas LZDF (0.20740 ± 0.02018 , $n=5$) y LE (0.2321 ± 0.0192 , $n=7$). No se encontraron diferencias significativas en la amplitud del transiente de Ca^{2+} evocado por CPA (panel **B** izquierda, CPA).

En el panel **C** de la **Figura 14**, se observa que el A.B.C. del transiente evocado por CPA fue similar en los tres grupos de ratas, mientras que el A.B.C de la SOCE fue estadísticamente menor en endotelio de ratas OZDF (107.4 ± 9.56 , $n=7$) vs LZDF (143 ± 12.13 , $n=5$) y LE (165.80 ± 13.61 , $n=7$).

Estos resultados sugieren que la DMII causa alteraciones en la SOCE de células endoteliales *in situ* de aorta de rata sin afectar el contenido de Ca^{2+} en el RE.

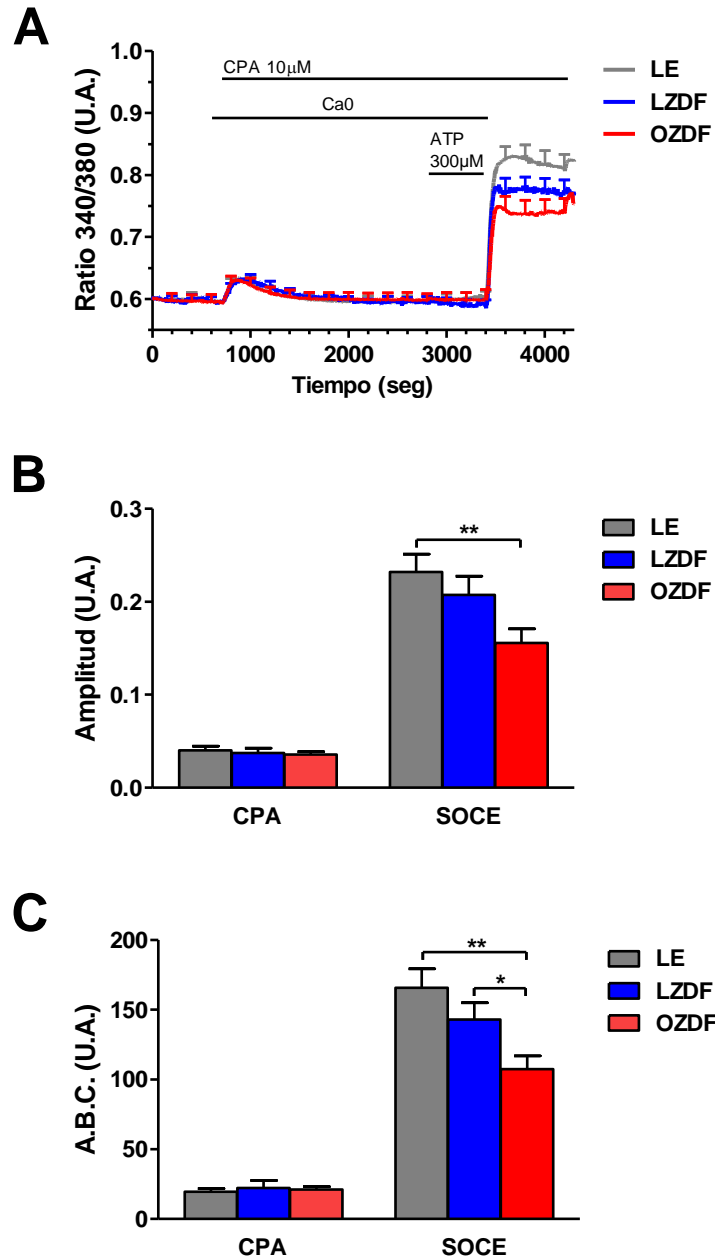


Figura 14. Efecto de la diabetes mellitus tipo II sobre la SOCE en CEs *in situ* de aorta de rata. **A** Promedios \pm EE de la señal de Ca^{2+} generada por la activación de la SOCE en endotelio de ratas Long-Evans (línea gris), LZDF (línea azul) y OZDF (línea roja). El endotelio fue pre-incubado con CPA 10 μ M en ausencia de Ca^{2+} extracelular. Para comprobar el vaciamiento de los almacenes intracelular, se aplicó ATP 300 μ M en presencia de CPA y ausencia de Ca^{2+} extracelular. Finalmente se restituye el Ca^{2+} al medio extracelular en presencia de CPA para activar la SOCE. **C** Promedio \pm EE de la amplitud del transiente evocado por CPA (barras izquierda, CPA) y SOCE (barras derecha, SOCE). **D** Promedio \pm EE del A.B.C. calculada para la señal de Ca^{2+} evocada por la aplicación de CPA (barras izquierda, CPA) y para la SOCE (barras derecha, SOCE). Los asteriscos representan la diferencia significativa con un valor de $p < 0.05$.

13. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La DMII es un conjunto de alteraciones metabólicas que impactan con severidad la funcionalidad del corazón y los vasos sanguíneos; más del 65% de los pacientes con DM mueren por enfermedades cardiovasculares. La disfunción endotelial es un fenotipo distintivo encontrado en la DM y puede ser la causa de la alta incidencia de infarto al miocardio, derrame cerebral y el daño de diversos órganos en el paciente diabético.

A pesar del gran número de evidencias que correlacionan a alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular y disfunción endotelial en la DM, no se han esclarecido completamente los mecanismos moleculares implicados (Fernández-Velasco et al., 2014).

A la fecha se han realizado pocos estudios sobre las posibles afectaciones que causa la DM sobre la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en células endoteliales, en adición, estos estudios han sido realizados en células endoteliales en cultivo (Tang & Li, 2004; Taubert *et al.*, 2004) que han sido sometidas a tratamientos enzimáticos y de crecimiento artificial que, *per se*, causan alteraciones en los mecanismos moleculares que participan en la regulación del Ca^{2+} intracelular en el endotelio vascular. Además los estudios se realizaron en células endoteliales de modelos animales con DMI, la menos frecuente en el humano (Sheikh *et al.*, 2012b).

Por estas razones, queremos resaltar la relevancia de nuestro estudio, en cuanto a: **a)** los resultados fueron obtenidos en células endoteliales *in situ*, que no fueron tratadas enzimáticamente ni fueron sometidas a condiciones artificiales de cultivo, lo cual permite obtener resultados en condiciones más fisiológicas **b)** los resultados fueron obtenidos de un modelo animal que presenta DMII, la más común en el humano y por lo tanto más útil para comprender los mecanismos fisiopatológicos de esta enfermedad.

La investigación en el campo de la DM conlleva a la utilización de diversos modelos celulares y animales. En el presente estudio se empleó la cepa de rata Zucker Diabetic Fatty (ZDF) (Panchal & Brown, 2011). La rata Zucker Diabetic Fatty (ZDF) es un modelo ampliamente utilizado como herramienta para el estudio de la DMII; diversos trabajos de investigación han descrito sus alteraciones como sobrepeso, incremento de la ingesta de alimento e hiperglucemia (Reimer *et al.*, 2014), dislipidemia (Carrier *et al.*, 2014), nefropatías (Togashi & Miyamoto, 2012) y cardiopatías (Povlsen *et al.*, 2013). La principal razón por la cual escogimos este modelo animal de DMII es que se ha reportado que estos animales presentan alteraciones vasculares desde temprana edad.

Con base a nuestros resultados las ratas OZDF presentaron alteraciones morfométricas en comparación con su grupo control delgado LZDF y con el grupo control sano LE, ya que se muestran incremento, significativo, en el peso. El incremento en el peso de los animales OZDF lo atribuimos principalmente al aumento del tejido adiposo en el organismo, debido a que los niveles de grasa epididimal fueron cuatro veces mayores a los encontrados en las ratas LZDF y LE; además al correlacionar los datos la longitud del animal, descartamos que el incremento de nuestros valores de peso y grasa en las ratas OZDF sea producto del aumento de la talla del animal.

Por otra parte con el nuestro estudio bioquímico demostramos que en la rata OZDF hay niveles elevados de glucosa en sangre (hiperglucemia) con respecto a los animales control y delgado. Es necesario mencionar que los niveles de glucosa en las ratas LZDF y LE también resultaron elevados, para ser considerados como animales sanos; no obstante, nosotros atribuimos este fenómeno al efecto generado por el tipo de anestésico que utilizamos, el cual podría incrementar los valores de glucosa aún a pesar de ello, considerando que los tres grupos estuvieron bajo los efectos del mismo anestésico, se pudo observar el incremento de glucosa plasmática en los animales OZDF en comparación con los otros grupos.

Por la complejidad de la interpretación de los datos de la glucosa basal, se decidió realizar otra prueba para la determinación de los niveles de glucosa plasmáticos; en esta ocasión una administración vía intraperitoneal de una dosis de glucosa (2 gr de D-glucosa/Kg de peso del animal) y la determinación en sangre a las dos horas de la concentración de glucosa demostró que el grupo OZDF mantiene niveles elevados de glucosa en sangre en comparación con los obtenidos en los otros dos grupos evaluados. Con estos resultados respaldamos la hipótesis de que en el fenotipo obeso de la rata ZDF hay una alteración del metabolismo de la glucosa, la cual corresponde a una de las características que define a la DMII. En adición la rata OZDF presentó alteraciones en el metabolismo de los lípidos, en particular los niveles elevados de colesterol, VLDL y triglicéridos, estos datos respaldan la idea de una alteración metabólica en lípidos, alteración que no está presente en los grupos control y delgado. El incremento de triglicéridos, descenso de los HDL e incremento de los VLDL, son consecuencias de la DMII y factores de riesgo para el desarrollo o aparición de la aterosclerosis. El riesgo de la dislipidemia en la DMII, es el incremento de la probabilidad para aterosclerosis. En tanto los parámetros somáticos como los encontrados en nuestras determinaciones bioquímicas, demuestran que los animales utilizados en nuestro proyecto, las ratas de la cepa OZDF tienen un fenotipo obeso, y alteraciones metabólicas semejantes a las que definen a la DMII.

Cabe señalar que la mayor parte de los experimentos que se presentan en la presente tesis, fueron realizados en ausencia de Ca^{2+} en el medio extracelular, esta maniobra fue desarrollada con la finalidad de disecar la señal de Ca^{2+} debida a la liberación de Ca^{2+} únicamente de los almacenes intracelulares y así estudiar la contribución de los diferentes mecanismos que regulan el Ca^{2+} intracelular en estas condiciones. Posteriores estudios se deberán realizar para evaluar la participación de los mecanismos reguladores de Ca^{2+} en el control del Ca^{2+} que proviene tanto intracelularmente como del extracelular.

Los resultados mostrados en la **Figura 9** muestran el efecto de la aplicación de 300 μM de ATP en una solución libre de Ca^{2+} extracelular en los tres grupos de

ratas estudiados. Aunque estos resultados sugieren que la DMII no altera la señal de Ca^{2+} inducida por la aplicación de ATP (300 μM) no se descartó la posibilidad de que alguno de los múltiples mecanismos que regulan la concentración de Ca^{2+} intracelular en endotelio se encuentren alterados por la DMII, ya que es posible que la disfunción en un mecanismo en particular sea enmascarada (compensada) por la función de las proteínas encargadas de mantener los niveles de Ca^{2+} en rangos fisiológicos, y en efecto este fue el caso, como se describe más adelante.

El primer elemento estudiado fue el NCX, utilizando dos maniobras: 1) remoción del Na^+ extracelular (**Figura 10**) y 2) utilizando el inhibidor selectivo KBR (**Figura 11**). En general podemos decir que ambos protocolos experimentales causaron una reducción de la amplitud, duración y A.B.C. del transiente de Ca^{2+} en los tres grupos de ratas, siendo el efecto del KBR más marcado (**Figura 11**). Estos efectos causados por la remoción del Na^+ y por KBR fueron inesperados, por la siguiente razón:

En ausencia de Ca^{2+} extracelular, podría esperarse que un aumento de Ca^{2+} intracelular inducido por la aplicación de ATP, hiciera que el Ca^{2+} citoplasmático liberado del RE, saliera a través del NCX bajo el gradiente de concentración de Ca^{2+} prevalente en estas condiciones (alto Ca^{2+} intracelular y 0Ca^{2+} extracelular). Esta salida de Ca^{2+} sería acompañada por un contra-transporte de Na^+ hacia el medio citosólico. Este movimiento iónico determinaría la morfología del transiente de Ca^{2+} evocada por ATP en 0Ca^{2+} y es la que se muestra en las **Figuras 10A y 11A**, líneas punteadas (condiciones control).

Cuando la actividad del NCX es bloqueada, removiendo el Na^+ extracelular (de tal manera que no haya intercambio de Na^+ extracelular por Ca^{2+} intracelular) o aplicando KBR, uno esperaría, que la salida de Ca^{2+} generada por el gradiente de concentración de Ca^{2+} , se detuviera y haría que la duración del transiente evocado por ATP aumentara. Sin embargo, como se puede observar en la **Figura 10A**, $\text{Na}0$ y **Figura 11A**, KBR, líneas continuas, la duración del transiente se acorta significativamente. Estos resultados fueron observados por igual en los tres grupos de rata estudiados, de tal manera que parecería que la actividad del NXC no es

modificada por la DM, sin embargo, no tenemos una explicación adecuada para interpretar estos resultados.

Para evaluar el efecto de la DM sobre la actividad de la SERCA, se procedió a aplicar simultáneamente el inhibidor de la SERCA (CPA) y el agonista ATP. Aunque es de esperarse que la SERCA no se encuentre bloqueada completamente, por el corto tiempo en el que se aplica el CPA, observamos que la DMII altera la función de la SERCA ya que la amplitud del pico, duración del transiente al 60% (y aunque de forma no significativa al 30%), y en el A.B.C. del transiente de Ca^{2+} obtenido en endotelio de ratas OZDF **Figuras 12**. Estos datos sugieren que la actividad o expresión de la SERCA se encuentra aumentada en el endotelio de ratas diabéticas, ya que su inhibición retarda de forma significativa la decaída de la $[Ca^{2+}]_i$ hacia sus valores basales en comparación con ratas LE y LZDF. Estos datos se contraponen a lo reportado por Sheik y Cols., 2012, ellos encuentran que en células endoteliales de corazón de ratones tratados con estreptozotocina la DMI reduce la actividad y expresión de la SERCA. Es posible que el mecanismo por el cual la DM altera la función del endotelio sea diferente en DMI y en DMII.

En la **Figura 13A**, se muestra que el bloqueo de la PMCA, con carboxieosina, reduce de forma significativa la amplitud del transiente evocado por ATP 300 μ M en el endotelio obtenido de las ratas de la cepa Zucker Diabetic Fatty tanto control (LZDF) como obesa (OZDF) e incrementa de forma significativa el tiempo de decaída al 30% de la amplitud del transiente, únicamente en estos dos grupos de rata. Estos resultados indican que la alteración en la actividad y/o expresión de la PMCA puede estar ligada a la mutación genética que tienen las ratas de la cepa Zucker Diabetic Fatty y no relacionada con la DMII.

La **Figura 14** muestra claramente que la DM causa una reducción significativa de la amplitud y A.B.C de la SOCE. Este último resultado es de suma importancia ya que podría explicar el mecanismo por el cual la DM causa disfunción endotelial. Curtis y Cols., 2003, demostraron que las alteraciones en el manejo de Ca^{2+} contribuyen al deterioro de los vasos sanguíneos en la diabetes, en particular

estos autores observaron que la SOCE fue significativamente reducida en músculo liso vascular de microvasos de retina obtenidos de ratas pre-tratadas con estreptozotocina (Curtis, Major, Trimble, & Scholfield, 2003). Sin embargo, hasta donde sabemos, estos resultados constituyen la primera evidencia experimental que la DMII reduce la SOCE en endotelio vascular y dadas las evidencias que sugieren que la entrada de Ca^{2+} a través de los SOC promueve la producción de óxido nítrico (Fernandez-Rodriguez, Edwards, Newton, & Griffith, 2009) este hallazgo podría aportar una nueva explicación de la fisiopatología de la DMII.

14. CONCLUSIONES

I. La DMII no modifica los niveles basales de Ca^{2+} intracelular ni la señal de Ca^{2+} intracelular evocada por ATP 300 μM en ausencia de Ca^{2+} extracelular en células endoteliales *in situ* de aorta de rata.

II. La DMII no modifica la señal de Ca^{2+} evocada por ATP 300 μM en ausencia de Ca^{2+} extracelular, al inhibir la actividad del intercambiador $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ (NCX) con una solución libre de Na^+ y Ca^{2+} extracelular o por la aplicación de KBR, un inhibidor selectivo del NCX.

III. La DMII causa un aumento de la actividad y/o expresión de la bomba de Ca^{2+} -ATPasa del retículo endoplásmico (SERCA) en células endoteliales *in situ* de aorta de rata.

IV. La actividad y/o expresión de la bomba de Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática (PMCA) se encuentra aumentada en las cepas de rata ZDF (tanto LZDF como OZDF). Este efecto parece ligado a la mutación genética que portan estas ratas y no al efecto de la DMII.

V. La DMII disminuye la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular a través de canales activados por los almacenes intracelulares de Ca^{2+} (SOCE).

15. BIBLIOGRAFIA

- Acharjee, S., Ghosh, B., Al-Dhubiab, B. E., & Nair, A. B. (2013). Understanding Type 1 Diabetes: Etiology and Models. *Canadian Journal of Diabetes*, 37(4), 269–276.
- Alexánderon, E. (2014). Alexánderon . Fisiología cardiovascular.
- Alheid, U., Frölich, J. C., & Förstermann, U. (1987). Endothelium-derived relaxing factor from cultured human endothelial cells inhibits aggregation of human platelets. *Thrombosis Research*, 47(5), 561–71.
- American Diabetes Association. (2014). Standards of medical care in diabetes--2014. *Diabetes Care*, 37 Suppl 1(Supplement_1), S14–80.
- American Diabetes Association®. (2015). Diabetes tipo 2: American Diabetes Association®.
- Amran, S., Homma, N., & Hashimoto, K. (2003). Pharmacology of KB-R7943: A Na⁺ – Ca²⁺ exchange inhibitor, 21(4), 255–276.
- Aréchiga-Figueroa, I. A., Rodríguez-Martínez, M., Albarado, A., Torres-Jácome, J., & Sánchez-Chapula, J. A. (2010). Multiple effects of 4-aminopyridine on feline and rabbit sinoatrial node myocytes and multicellular preparations. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 459(3), 345–55. doi:10.1007/s00424-009-0734-3
- Ayaori, M., Iwakami, N., Uto-Kondo, H., Sato, H., Sasaki, M., Komatsu, T., ... Ikewaki, K. (2013). Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors attenuate endothelial function as evaluated by flow-mediated vasodilatation in type 2 diabetic patients. *Journal of the American Heart Association*, 2(1), e003277. doi:10.1161/JAHA.112.003277
- Aziz, A., & Wheatcroft, S. (2011). Insulin resistance in Type 2 diabetes and obesity: implications for endothelial function. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 9(4), 403–7. doi:10.1586/erc.11.20
- Bagher, P., Davis, M. J., & Segal, S. S. (2011). Visualizing calcium responses to acetylcholine convection along endothelium of arteriolar networks in Cx40BAC-GCaMP2 transgenic mice. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 301(3), H794–802. doi:10.1152/ajpheart.00425.2011
- Bagi, Z., Feher, A., Dou, H., & Broskova, Z. (2013). Selective up-regulation of arginase-1 in coronary arteries of diabetic patients. *Frontiers in Immunology*, 4, 293. doi:10.3389/fimmu.2013.00293

- Balakumar, P., Chakkarwar, V. A., Krishan, P., & Singh, M. (2009). Vascular endothelial dysfunction: a tug of war in diabetic nephropathy? *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomédecine & Pharmacothérapie*, *63*(3), 171–9. doi:10.1016/j.biopha.2008.08.008
- Balla, T., Szentpetery, Z., & Kim, Y. J. (2009). Phosphoinositide signaling: new tools and insights. *Physiology (Bethesda, Md.)*, *24*, 231–44. doi:10.1152/physiol.00014.2009
- Barreto-Chang, O. L., & Dolmetsch, R. E. (2009). Calcium imaging of cortical neurons using Fura-2 AM. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (23). doi:10.3791/1067
- Béliveau, E., Lessard, V., & Guillemette, G. (2014). STIM1 Positively Regulates the Ca²⁺ Release Activity of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor in Bovine Aortic Endothelial Cells. *PLoS One*, *9*(12), e114718. doi:10.1371/journal.pone.0114718
- Bełtowski, J., & Jamroz-Wisniewska, A. (2014). Hydrogen Sulfide and Endothelium-Dependent Vasorelaxation. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *19*(12), 21183–21199. doi:10.3390/molecules191221183
- Berra-Romani, R., Avelino-Cruz, J. E., Raqeeb, A., Della Corte, A., Cinelli, M., Montagnani, S., ... Tanzi, F. (2013). Ca²⁺-dependent nitric oxide release in the injured endothelium of excised rat aorta: a promising mechanism applying in vascular prosthetic devices in aging patients. *BMC Surgery*, *13 Suppl 2*, S40. doi:10.1186/1471-2482-13-S2-S40
- Berra-Romani, R., Mazzocco-Spezia, A., Pulina, M. V., & Golovina, V. A. (2008). Ca²⁺ handling is altered when arterial myocytes progress from a contractile to a proliferative phenotype in culture. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *295*(3), C779–90. doi:10.1152/ajpcell.00173.2008
- Berra-Romani, R., Raqeeb, A., Avelino-Cruz, J. E., Moccia, F., Oldani, A., Speroni, F., ... Tanzi, F. (2008). Ca²⁺ signaling in injured in situ endothelium of rat aorta. *Cell Calcium*, *44*(3), 298–309. doi:10.1016/j.ceca.2007.12.007
- Berra-Romani, R., Raqeeb, A., Guzman-Silva, A., Torres-Jácome, J., Tanzi, F., & Moccia, F. (2010). Na⁺-Ca²⁺ exchanger contributes to Ca²⁺ extrusion in ATP-stimulated endothelium of intact rat aorta. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *395*(1), 126–30. doi:10.1016/j.bbrc.2010.03.153
- Berra-Romani, R., Raqeeb, A., Torres-Jácome, J., Guzman-Silva, A., Guerra, G., Tanzi, F., & Moccia, F. (2012). The mechanism of injury-induced intracellular calcium concentration oscillations in the endothelium of excised rat aorta. *Journal of Vascular Research*, *49*(1), 65–76. doi:10.1159/000329618

- Berra-Romani, R., Rinaldi, C., Raqeeb, A., Castelli, L., Magistretti, J., Taglietti, V., & Tanzi, F. (2004). The duration and amplitude of the plateau phase of ATP- and ADP-evoked Ca²⁺ signals are modulated by ectonucleotidases in in situ endothelial cells of rat aorta. *Journal of Vascular Research*, *41*(2), 166–73. doi:10.1159/000077146
- Berridge, M. J. (2012, April 10). Cell Signalling Biology: Module 2 - Cell signalling pathways. *Biochemical Journal*. doi:10.1042/csb0001002
- Bird, I. M. (2011). Endothelial nitric oxide synthase activation and nitric oxide function: new light through old windows. *The Journal of Endocrinology*, *210*(3), 239–41. doi:10.1530/JOE-11-0216
- Bondarenko, A. I., Drachuk, K., Panasiuk, O., Sagach, V., Deak, A. T., Malli, R., & Graier, W. F. (2013). N-arachidonoyl glycine suppresses Na⁺ + /Ca²⁺ exchanger-mediated Ca²⁺ entry into endothelial cells and activates BK Ca channels independently of GPCRs. *British Journal of Pharmacology*, *169*(4), 933–948. doi:10.1111/bph.12180
- Boron, W. (2012). *Medical Physiology, 2e Updated Edition* | 978-1-4377-1753-2 | Elsevier.
- Brini, M., Cali, T., Ottolini, D., & Carafoli, E. (2013). The plasma membrane calcium pump in health and disease. *The FEBS Journal*, *280*(21), 5385–97. doi:10.1111/febs.12193
- Brini, M., & Carafoli, E. (2009). Calcium pumps in health and disease. *Physiological Reviews*, *89*(4), 1341–78. doi:10.1152/physrev.00032.2008
- Busse, R., Lückhoff, A., & Bassenge, E. (1987). Endothelium-derived relaxant factor inhibits platelet activation. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *336*(5), 566–71.
- Carrier, B., Wen, S., Zigouras, S., Browne, R. W., Li, Z., Patel, M. S., ... Rideout, T. C. (2014). Alpha-lipoic acid reduces LDL-particle number and PCSK9 concentrations in high-fat fed obese Zucker rats. *PloS One*, *9*(3), e90863. doi:10.1371/journal.pone.0090863
- Clark, J. B., Palmer, C. J., & Shaw, W. N. (1983). The diabetic Zucker fatty rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, *173*(1), 68–75.
- Cui, K.-Z., Liu, D., Liu, J.-W., Xu, Y., Li, Y.-B., Sun, Y.-M., & Su, Y. (2012). Role of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger on the development of diabetes mellitus and its chronic complications. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *426*(4), 445–7. doi:10.1016/j.bbrc.2012.08.130

- Curtis, T. M., Major, E. H., Trimble, E. R., & Scholfield, C. N. (2003). Diabetes-induced activation of protein kinase C inhibits store-operated Ca²⁺ uptake in rat retinal microvascular smooth muscle. *Diabetologia*, *46*(9), 1252–9. doi:10.1007/s00125-003-1178-5
- Datar, R., Kaesemeyer, W. H., Chandra, S., Fulton, D. J., & Caldwell, R. W. (2010). Acute activation of eNOS by statins involves scavenger receptor-B1, G protein subunit Gi, phospholipase C and calcium influx. *British Journal of Pharmacology*, *160*(7), 1765–72. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00817.x
- Davel, A. P., Wenceslau, C. F., Akamine, E. H., Xavier, F. E., Couto, G. K., Oliveira, H. T., & Rossoni, L. V. (2011). Endothelial dysfunction in cardiovascular and endocrine-metabolic diseases: an update. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et Al.]*, *44*(9), 920–32.
- De Bock, M., Wang, N., Decrock, E., Bol, M., Gadicherla, A. K., Culot, M., ... Leybaert, L. (2013). Endothelial calcium dynamics, connexin channels and blood–brain barrier function. *Progress in Neurobiology*, *108*, 1–20.
- De Groot, P. G., Urbanus, R. T., & Roest, M. (2012). Platelet interaction with the vessel wall. *Handbook of Experimental Pharmacology*, (210), 87–110. doi:10.1007/978-3-642-29423-5_4
- Diaz-Santana, A., Shan, M., & Stroock, A. D. (2015). Endothelial cell dynamics during anastomosis in vitro. *Integrative Biology: Quantitative Biosciences from Nano to Macro*. doi:10.1039/c5ib00052a
- Dragoni, S., Laforenza, U., Bonetti, E., Lodola, F., Bottino, C., Berra-Romani, R., ... Moccia, F. (2011). Vascular endothelial growth factor stimulates endothelial colony forming cells proliferation and tubulogenesis by inducing oscillations in intracellular Ca²⁺ concentration. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, *29*(11), 1898–907. doi:10.1002/stem.734
- Dupont, G., & Croisier, H. (2010). Spatiotemporal organization of Ca dynamics: a modeling-based approach. *HFSP Journal*, *4*(2), 43–51. doi:10.2976/1.3385660
- Echeverri, D., Montes, F. R., Cabrera, M., Galán, A., & Prieto, A. (2010). Caffeine's Vascular Mechanisms of Action. *International Journal of Vascular Medicine*, *2010*, 834060. doi:10.1155/2010/834060
- Erdely, A., Freshour, G., Maddox, D. A., Olson, J. L., Samsell, L., & Baylis, C. (2004). Renal disease in rats with type 2 diabetes is associated with decreased renal nitric oxide production. *Diabetologia*, *47*(10), 1672–6. doi:10.1007/s00125-004-1509-1

- Estrada, I. A., Donthamsetty, R., Debski, P., Zhou, M.-H., Zhang, S. L., Yuan, J. X.-J., ... Makino, A. (2012a). STIM1 Restores Coronary Endothelial Function in Type 1 Diabetic Mice. *Circulation Research*, 111(9), 1166–1175. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.275743
- Estrada, I. A., Donthamsetty, R., Debski, P., Zhou, M.-H., Zhang, S. L., Yuan, J. X.-J., ... Makino, A. (2012b). STIM1 Restores Coronary Endothelial Function in Type 1 Diabetic Mice. *Circulation Research*, 111(9), 1166–1175. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.275743
- Fernandez-Rodriguez, S., Edwards, D. H., Newton, B., & Griffith, T. M. (2009). Attenuated store-operated Ca²⁺ entry underpins the dual inhibition of nitric oxide and EDHF-type relaxations by iodinated contrast media. *Cardiovascular Research*, 84(3), 470–8. doi:10.1093/cvr/cvp239
- Fernández-Velasco, M., Ruiz-Hurtado, G., Gómez, A. M., & Rueda, A. (2014). Ca(2+) handling alterations and vascular dysfunction in diabetes. *Cell Calcium*, 56(5), 397–407. doi:10.1016/j.ceca.2014.08.007
- Fisman, E. Z., & Tenenbaum, A. (2008). Cardiovascular diabetology: clinical, metabolic and inflammatory facets. Preface. *Advances in Cardiology*, 45, xi–xiii.
- Fisman, E. Z., & Tenenbaum, A. (2009). A cardiologic approach to non-insulin antidiabetic pharmacotherapy in patients with heart disease. *Cardiovascular Diabetology*, 8, 38. doi:10.1186/1475-2840-8-38
- Flammer, A. J., & Lüscher, T. F. (2010). Human endothelial dysfunction: EDRFs. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 459(6), 1005–13. doi:10.1007/s00424-010-0822-4
- Förstermann, U., & Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*, 33(7), 829–37, 837a–837d. doi:10.1093/eurheartj/ehr304
- Furchgott, R. F., & Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288(5789), 373–6.
- Garg, U. C., & Hassid, A. (1989). Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromocyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 83(5), 1774–7. doi:10.1172/JCI114081

- Georgescu, A. (2011). Vascular dysfunction in diabetes: The endothelial progenitor cells as new therapeutic strategy. *World Journal of Diabetes*, 2(6), 92–7. doi:10.4239/wjd.v2.i6.92
- Ghasemzadeh, M., & Hosseini, E. (2013). Platelet-leukocyte crosstalk: Linking proinflammatory responses to procoagulant state. *Thrombosis Research*, 131(3), 191–197.
- Giacomello, M., De Mario, A., Scarlatti, C., Primerano, S., & Carafoli, E. (2013). Plasma membrane calcium ATPases and related disorders. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45(3), 753–62. doi:10.1016/j.biocel.2012.09.016
- Goddard, L. M., & Iruela-Arispe, M. L. (2013). Cellular and molecular regulation of vascular permeability. *Thrombosis and Haemostasis*, 109(3), 407–15. doi:10.1160/TH12-09-0678
- Griff, E. R., Kleene, N. K., & Kleene, S. J. (2012). A selective PMCA inhibitor does not prolong the electrofuroctogram in mouse. *PloS One*, 7(5), e37148. doi:10.1371/journal.pone.0037148
- Harmon, J. S., Gleason, C. E., Tanaka, Y., Poitout, V., & Robertson, R. P. (2001). Antecedent hyperglycemia, not hyperlipidemia, is associated with increased islet triacylglycerol content and decreased insulin gene mRNA level in Zucker diabetic fatty rats. *Diabetes*, 50(11), 2481–6.
- Harteneck, C., & Gollasch, M. (2011). Pharmacological modulation of diacylglycerol-sensitive TRPC3/6/7 channels. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 12(1), 35–41.
- Hirose, H., Lee, Y. H., Inman, L. R., Nagasawa, Y., Johnson, J. H., & Unger, R. H. (1996). Defective fatty acid-mediated beta-cell compensation in Zucker diabetic fatty rats. Pathogenic implications for obesity-dependent diabetes. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(10), 5633–7.
- Hogan, M., Cerami, A., & Bucala, R. (1992). Advanced glycosylation endproducts block the antiproliferative effect of nitric oxide. Role in the vascular and renal complications of diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Investigation*, 90(3), 1110–5. doi:10.1172/JCI115928
- Holton, M. L., Wang, W., Emerson, M., Neyses, L., & Armesilla, A. L. (2010). Plasma membrane calcium ATPase proteins as novel regulators of signal transduction pathways. *World Journal of Biological Chemistry*, 1(6), 201–8. doi:10.4331/wjbc.v1.i6.201

- Horáková, L., Strosova, M. K., Spickett, C. M., & Blaskovic, D. (2013). Impairment of calcium ATPases by high glucose and potential pharmacological protection. *Free Radical Research*, 47 Suppl 1, 81–92. doi:10.3109/10715762.2013.807923
- Hormigo-Pozo, A., Mancera-Romero, J., Perez-Unanua, M. P., Alonso-Fernandez, M., Lopez-Simarro, F., & Mediavilla-Bravo, J. J. (2015). [Consensus document on the treatment of dyslipidemia in diabetes]. *Semergen / Sociedad Española de Medicina Rural Y Generalista*, 41(2), 89–98.
- Huang, N. F., Fleissner, F., Sun, J., & Cooke, J. P. (2010). Role of nitric oxide signaling in endothelial differentiation of embryonic stem cells. *Stem Cells and Development*, 19(10), 1617–26. doi:10.1089/scd.2009.0417
- Hymery, N., Masson, F., Barbier, G., & Coton, E. (2014). Cytotoxicity and immunotoxicity of cyclopiazonic acid on human cells. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 28(5), 940–947. doi:10.1016/j.tiv.2014.04.003
- Isakson, B. E. (2008). Localized expression of an Ins(1,4,5)P3 receptor at the myoendothelial junction selectively regulates heterocellular Ca²⁺ communication. *Journal of Cell Science*, 121(Pt 21), 3664–73. doi:10.1242/jcs.037481
- Jaiswal, M., Schinske, A., & Pop-Busui, R. (2014). Lipids and lipid management in diabetes. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 28(3), 325–38.
- Joshi, M., Kotha, S. R., Malireddy, S., Selvaraju, V., Satoskar, A. R., Palesty, A., ... Maulik, N. (2014). Conundrum of pathogenesis of diabetic cardiomyopathy: role of vascular endothelial dysfunction, reactive oxygen species, and mitochondria. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 386(1-2), 233–49. doi:10.1007/s11010-013-1861-x
- King, A. J. F. (2012). The use of animal models in diabetes research. *British Journal of Pharmacology*, 166(3), 877–94. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x
- Komarova, Y., & Malik, A. B. (2010). Regulation of endothelial permeability via paracellular and transcellular transport pathways. *Annual Review of Physiology*, 72, 463–93. doi:10.1146/annurev-physiol-021909-135833
- Kubes, P., Suzuki, M., & Granger, D. N. (1991). Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(11), 4651–5.

- Laboratories Charles Rivers. (2011). Animal Models of Disease. Retrieved from <http://www.criver.com/products-services/basic-research/find-a-model/zucker-diabetic-fatty-%28zdf%29-rat>
- LaMattina, J. C., Burdorf, L., Zhang, T., Rybak, E., Cheng, X., Munivenkatappa, R., ... Barth, R. N. (2014). Pig-to-baboon liver xenoperfusion utilizing GalTKO.hCD46 pigs and glycoprotein Ib blockade. *Xenotransplantation*, *21*(3), 274–86. doi:10.1111/xen.12093
- Landmesser, U., Engberding, N., Bahlmann, F. H., Schaefer, A., Wiencke, A., Heineke, A., ... Drexler, H. (2004). Statin-induced improvement of endothelial progenitor cell mobilization, myocardial neovascularization, left ventricular function, and survival after experimental myocardial infarction requires endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, *110*(14), 1933–9. doi:10.1161/01.CIR.0000143232.67642.7A
- Lee, M.-S., Song, K.-D., Yang, H.-J., Solis, C. D., Kim, S.-H., & Lee, W.-K. (2012). Development of a type II diabetic mellitus animal model using Micropig®. *Laboratory Animal Research*, *28*(3), 205–8. doi:10.5625/lar.2012.28.3.205
- Leonard, B. L., Watson, R. N., Loomes, K. M., Phillips, A. R. J., & Cooper, G. J. (2005). Insulin resistance in the Zucker diabetic fatty rat: a metabolic characterisation of obese and lean phenotypes. *Acta Diabetologica*, *42*(4), 162–70. doi:10.1007/s00592-005-0197-8
- Lin, Y., & Sun, Z. (2010). Current views on type 2 diabetes. *The Journal of Endocrinology*, *204*(1), 1–11. doi:10.1677/JOE-09-0260
- Lodola, F., Laforenza, U., Bonetti, E., Lim, D., Dragoni, S., Bottino, C., ... Porta, C. (2012). Store-operated Ca²⁺ entry is remodelled and controls in vitro angiogenesis in endothelial progenitor cells isolated from tumoral patients. *PLoS One*, *7*(9), e42541. doi:10.1371/journal.pone.0042541
- Majewski, L., & Kuznicki, J. (2015a). SOCE in neurons: Signaling or just refilling? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.01.019
- Majewski, L., & Kuznicki, J. (2015b). SOCE in neurons: Signaling or just refilling? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.01.019
- Maraschin, J. D. F., Murussi, N., Witter, V., & Silveiro, S. P. (2010). Clinical Update Diabetes Mellitus Classification. *Arq Bras Cardiol*, *95*(2), e40–e47.
- Marsh, S. A., Powell, P. C., Agarwal, A., Dell'Italia, L. J., & Chatham, J. C. (2007). Cardiovascular dysfunction in Zucker obese and Zucker diabetic fatty rats: role

of hydronephrosis. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 293(1), H292–8. doi:10.1152/ajpheart.01362.2006

Michel, T., & Vanhoutte, P. M. (2010). Cellular signaling and NO production. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 459(6), 807–16. doi:10.1007/s00424-009-0765-9

Moccia, F., Baruffi, S., Spaggiari, S., Coltrini, D., Berra-Romani, R., Signorelli, S., ... Tanzi, F. (2001). P2y1 and P2y2 receptor-operated Ca²⁺ signals in primary cultures of cardiac microvascular endothelial cells. *Microvascular Research*, 61(3), 240–52. doi:10.1006/mvre.2001.2306

Moccia, F., Berra-Romani, R., Baruffi, S., Spaggiari, S., Signorelli, S., Castelli, L., ... Tanzi, F. (2002). Ca²⁺ uptake by the endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in rat microvascular endothelial cells. *The Biochemical Journal*, 364(Pt 1), 235–44.

Moccia, F., Berra-Romani, R., & Tanzi, F. (2012a). Update on vascular endothelial Ca(2+) signalling: A tale of ion channels, pumps and transporters. *World Journal of Biological Chemistry*, 3(7), 127–58. doi:10.4331/wjbc.v3.i7.127

Moccia, F., Berra-Romani, R., & Tanzi, F. (2012b, July 26). Update on vascular endothelial Ca(2+) signalling: A tale of ion channels, pumps and transporters. *World Journal of Biological Chemistry*, pp. 127–58. doi:10.4331/wjbc.v3.i7.127

Moccia, F., Frost, C., Berra-Romani, R., Tanzi, F., & Adams, D. J. (2004). Expression and function of neuronal nicotinic ACh receptors in rat microvascular endothelial cells. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 286(2), H486–91. doi:10.1152/ajpheart.00620.2003

Mumtaz, S., Burdyga, G., Borisova, L., Wray, S., & Burdyga, T. (2011). The mechanism of agonist induced Ca²⁺ signalling in intact endothelial cells studied confocally in in situ arteries. *Cell Calcium*, 49(1), 66–77. doi:10.1016/j.ceca.2010.11.010

Murohara, T., Asahara, T., Silver, M., Bauters, C., Masuda, H., Kalka, C., ... Isner, J. M. (1998). Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *The Journal of Clinical Investigation*, 101(11), 2567–78. doi:10.1172/JCI11560

Mustafa, A. K., Sikka, G., Gazi, S. K., Steppan, J., Jung, S. M., Bhunia, A. K., ... Snyder, S. H. (2011). Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulfhydrates potassium channels. *Circulation Research*, 109(11), 1259–68. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.240242

- Nakaki, T., Nakayama, M., & Kato, R. (1990). Inhibition by nitric oxide and nitric oxide-producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *European Journal of Pharmacology*, 189(6), 347–53.
- Nunokawa, Y., & Tanaka, S. (1992). Interferon-gamma inhibits proliferation of rat vascular smooth muscle cells by nitric oxide generation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 188(1), 409–15.
- Oakley, R., & Tharakan, B. (2014). Vascular hyperpermeability and aging. *Aging and Disease*, 5(2), 114–25.
- Olokoba, A. B., Obateru, O. A., & Olokoba, L. B. (2012). Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. *Oman Medical Journal*, 27(4), 269–73. doi:10.5001/omj.2012.68
- Organizacion Mundial de la Salud. (2015). OMS | Organización Mundial de la Salud.
- Ozcan, M., Saatci, T., Ayar, A., Canpolat, S., & Kelestimur, H. (2015). Leptin activates cytosolic calcium responses through protein kinase-C dependent mechanism in immortalized RFamide-related peptide-3 neurons. *Brain Research*. doi:10.1016/j.brainres.2014.12.053
- Oztürk, Y., Altan, V. M., & Yildizoğlu-Ari, N. (1996). Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions. *Pharmacological Reviews*, 48(1), 69–112.
- Palmer, R. M., Ferrige, A. G., & Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327(6122), 524–6. doi:10.1038/327524a0
- Panchal, S. K., & Brown, L. (2011). Rodent models for metabolic syndrome research. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2011, 351982. doi:10.1155/2011/351982
- Parekh, A. B., & Putney, J. W. (2005). Store-operated calcium channels. *Physiological Reviews*, 85(2), 757–810. doi:10.1152/physrev.00057.2003
- Persson, A. B., & Buschmann, I. R. (2011). Vascular Growth in Health and Disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 4, 14. doi:10.3389/fnmol.2011.00014
- Povlsen, J. A., Løfgren, B., Dalgas, C., Birkler, R. I. D., Johannsen, M., Støttrup, N. B., & Bøtker, H. E. (2013). Protection against myocardial ischemia-reperfusion injury at onset of type 2 diabetes in Zucker diabetic fatty rats is associated with

altered glucose oxidation. *PloS One*, 8(5), e64093.
doi:10.1371/journal.pone.0064093

Pulina, M. V, Rizzuto, R., Brini, M., & Carafoli, E. (2006). Inhibitory interaction of the plasma membrane Na⁺/Ca²⁺ exchangers with the 14-3-3 proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(28), 19645–54.
doi:10.1074/jbc.M602033200

Putney, J. W. (2010). Pharmacology of store-operated calcium channels. *Molecular Interventions*, 10(4), 209–18. doi:10.1124/mi.10.4.4

Quast, U., Guillon, J. M., & Caverio, I. (1994). Cellular pharmacology of potassium channel openers in vascular smooth muscle. *Cardiovascular Research*, 28(6), 805–10.

Quillon, A., Fromy, B., & Debret, R. (2015). Endothelium microenvironment sensing leading to nitric oxide mediated vasodilation: a review of nervous and biomechanical signals. *Nitric Oxide : Biology and Chemistry / Official Journal of the Nitric Oxide Society*. doi:10.1016/j.niox.2015.01.006

Rahimi, N., Rezazadeh, K., Mahoney, J. E., Hartsough, E., & Meyer, R. D. (2012). Identification of IGPR-1 as a novel adhesion molecule involved in angiogenesis. *Molecular Biology of the Cell*, 23(9), 1646–56.
doi:10.1091/mbc.E11-11-0934

Rapoport, R. M., & Zuccarello, M. (2012). Endothelin(A)-endothelin(B) receptor cross talk in endothelin-1-induced contraction of smooth muscle. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 60(5), 483–94.
doi:10.1097/FJC.0b013e31826f32c1

Reimer, R. a, Grover, G. J., Koetzner, L., Gahler, R. J., Lyon, M. R., & Wood, S. (2014). Combining sitagliptin/metformin with a functional fiber delays diabetes progression in Zucker rats. *The Journal of Endocrinology*, 220(3), 361–73.
doi:10.1530/JOE-13-0484

Roberts, A. C., & Porter, K. E. (2013). Cellular and molecular mechanisms of endothelial dysfunction in diabetes. *Diabetes & Vascular Disease Research : Official Journal of the International Society of Diabetes and Vascular Disease*, 10(6), 472–82. doi:10.1177/1479164113500680

Rodriguez, M. P., Emond, Z. M., Wang, Z., Martinez, J., Jiang, Q., & Kibbe, M. R. (2014). Role of metabolic environment on nitric oxide mediated inhibition of neointimal hyperplasia in type 1 and type 2 diabetes. *Nitric Oxide : Biology and Chemistry / Official Journal of the Nitric Oxide Society*, 36, 67–75.
doi:10.1016/j.niox.2013.12.005

- Roman, R. J. (2002). P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiological Reviews*, 82(1), 131–85. doi:10.1152/physrev.00021.2001
- Russell, J. C., & Proctor, S. D. (2007). Increased insulin sensitivity and reduced micro and macro vascular disease induced by 2-deoxy-D-glucose during metabolic syndrome in obese JCR: LA-cp rats. *British Journal of Pharmacology*, 151(2), 216–25. doi:10.1038/sj.bjp.0707226
- Ryckman, K., Spracklen, C., Smith, C., Robinson, J., & Saftlas, A. (2015). Maternal lipid levels during pregnancy and gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. doi:10.1111/1471-0528.13261
- Salley, T. N., Mishra, M., Tiwari, S., Jadhav, A., & Ndisang, J. F. (2013). The heme oxygenase system rescues hepatic deterioration in the condition of obesity comorbid with type-2 diabetes. *PloS One*, 8(11), e79270. doi:10.1371/journal.pone.0079270
- Sandoo, A., van Zanten, J. J. C. S. V., Metsios, G. S., Carroll, D., & Kitas, G. D. (2010). The endothelium and its role in regulating vascular tone. *The Open Cardiovascular Medicine Journal*, 4, 302–12. doi:10.2174/1874192401004010302
- Sandow, S. L., & Grayson, T. H. (2009). Limits of isolation and culture: intact vascular endothelium and BKCa. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 297(1), H1–7. doi:10.1152/ajpheart.00042.2009
- Sárközy, M., Zvara, A., Gyémánt, N., Fekete, V., Kocsis, G. F., Pipis, J., ... Csont, T. (2013). Metabolic syndrome influences cardiac gene expression pattern at the transcript level in male ZDF rats. *Cardiovascular Diabetology*, 12, 16. doi:10.1186/1475-2840-12-16
- Schwaller, B. (2012). The regulation of a cell's Ca(2+) signaling toolkit: the Ca (2+) homeostasome. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 740, 1–25. doi:10.1007/978-94-007-2888-2_1
- Sena, C. M., Pereira, A. M., & Seiça, R. (2013a). Endothelial dysfunction — A major mediator of diabetic vascular disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1832(12), 2216–2231.
- Sena, C. M., Pereira, A. M., & Seiça, R. (2013b). Endothelial dysfunction - a major mediator of diabetic vascular disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1832(12), 2216–31. doi:10.1016/j.bbadis.2013.08.006

- Sheikh, A. Q., Hurley, J. R., Huang, W., Taghian, T., Kogan, A., Cho, H., ... Narmoneva, D. a. (2012a). Diabetes alters intracellular calcium transients in cardiac endothelial cells. *PloS One*, 7(5), e36840. doi:10.1371/journal.pone.0036840
- Sheikh, A. Q., Hurley, J. R., Huang, W., Taghian, T., Kogan, A., Cho, H., ... Narmoneva, D. A. (2012b). Diabetes alters intracellular calcium transients in cardiac endothelial cells. *PloS One*, 7(5), e36840. doi:10.1371/journal.pone.0036840
- Shen, T., Wang, N., Yu, X., Shi, J., Li, Q., Zhang, C., ... Zhu, D. (2015). The Critical Role of Dynamin-Related Protein 1 in Hypoxia-Induced Pulmonary Vascular Angiogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*. doi:10.1002/jcb.25154
- Silva, B. R., Pernomian, L., Grando, M. D., Amaral, J. H., Tanus-Santos, J. E., & Bendhack, L. M. (2013). Hydrogen peroxide modulates phenylephrine-induced contractile response in renal hypertensive rat aorta. *European Journal of Pharmacology*, 721(1), 193–200.
- Socha, M. J., Behringer, E. J., & Segal, S. S. (2012). Calcium and electrical signalling along endothelium of the resistance vasculature. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 110(1), 80–6. doi:10.1111/j.1742-7843.2011.00798.x
- Sönmez, M. F., & Tascioglu, S. (2015). Protective effects of grape seed extract on cadmium-induced testicular damage, apoptosis, and endothelial nitric oxide synthases expression in rats. *Toxicology and Industrial Health*. doi:10.1177/0748233714566874
- Tanaka, K. A., Key, N. S., & Levy, J. H. (2009). Blood coagulation: hemostasis and thrombin regulation. *Anesthesia and Analgesia*, 108(5), 1433–46. doi:10.1213/ane.0b013e31819bcc9c
- Tang, Y., & Li, G. D. (2004). Chronic exposure to high glucose impairs bradykinin-stimulated nitric oxide production by interfering with the phospholipase-C-implicated signalling pathway in endothelial cells: evidence for the involvement of protein kinase C. *Diabetologia*, 47(12), 2093–104. doi:10.1007/s00125-004-1589-y
- Tarquini, R., Lazzeri, C., Pala, L., Rotella, C. M., & Gensini, G. F. (2011). The diabetic cardiomyopathy. *Acta Diabetologica*, 48(3), 173–81. doi:10.1007/s00592-010-0180-x

- Taubert, D., Rosenkranz, A., Berkels, R., Roesen, R., & Schömig, E. (2004). Acute effects of glucose and insulin on vascular endothelium. *Diabetologia*, *47*(12), 2059–71. doi:10.1007/s00125-004-1586-1
- Tidow, H., Poulsen, L. R., Andreeva, A., Knudsen, M., Hein, K. L., Wiuf, C., ... Nissen, P. (2012). A bimodular mechanism of calcium control in eukaryotes. *Nature*, *491*(7424), 468–72. doi:10.1038/nature11539
- Togashi, Y., & Miyamoto, Y. (2012). Urinary cystatin C as a biomarker for diabetic nephropathy and its immunohistochemical localization in kidney in Zucker diabetic fatty (ZDF) rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*. doi:10.1016/j.etp.2012.06.005
- Tran, Q. K., & Watanabe, H. (2006). Calcium signalling in the endothelium. *Handbook of Experimental Pharmacology*, (176 Pt 1), 145–87.
- Trebak, M. (2009). STIM1/Orai1, ICRAC, and endothelial SOC. *Circulation Research*, *104*(9), e56–7. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.196105
- Triggle, C. R., Samuel, S. M., Ravishankar, S., Marei, I., Arunachalam, G., & Ding, H. (2012). The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *90*(6), 713–38. doi:10.1139/y2012-073
- Uehara, K., Onoue, H., Jeyakumar, L. H., Fleischer, S., & Uehara, A. (2004). Localization of ryanodine receptor 3 in the sinus endothelial cells of the rat spleen. *Cell and Tissue Research*, *317*(2), 137–45. doi:10.1007/s00441-004-0904-8
- Versteeg, H. H., Heemskerk, J. W. M., Levi, M., & Reitsma, P. H. (2013). New fundamentals in hemostasis. *Physiological Reviews*, *93*(1), 327–58. doi:10.1152/physrev.00016.2011
- Zanchi, C., Locatelli, M., Benigni, A., Corna, D., Tomasoni, S., Rottoli, D., ... Zoja, C. (2013). Renal expression of FGF23 in progressive renal disease of diabetes and the effect of ACE inhibitor. *PloS One*, *8*(8), e70775. doi:10.1371/journal.pone.0070775
- Zhang, S., Fritz, N., Ibarra, C., & Uhlén, P. (2011). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor subtype-specific regulation of calcium oscillations. *Neurochemical Research*, *36*(7), 1175–85. doi:10.1007/s11064-011-0457-7
- Zhang, W., & Trebak, M. (2011). STIM1 and Orai1: novel targets for vascular diseases? *Science China. Life Sciences*, *54*(8), 780–5. doi:10.1007/s11427-011-4206-6

