



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA

Licenciatura en Biomedicina

Laboratorio de Fisiología Cardiovascular

TESIS

**“Efecto de la Diabetes Mellitus Tipo 2 en la Homeostasis del Ca^{2+}
Intracelular en Cultivos Primarios de Células de Músculo Liso de
Aorta de rata de la cepa Zucker Diabetic Fatty”**

Para obtener el título de Licenciada en Biomedicina

Presenta:

Adriana Paola Moreno Salgado

Eje terminal: Fisiología

Director de Tesis:

D.C. Roberto Berra Romani

Director Metodológico:

D.C. Mario García Carrasco

Puebla, Pue., Noviembre 2018

Dedicado a Dios, a mis padres y a cada uno de los que con su apoyo, conocimiento y cariño contribuyeron a la realización de este trabajo: Muchas gracias.

INDICE

1. RESUMEN	7
2. INTRODUCCIÓN	9
2.1. Diabetes Mellitus	9
2.1.1. Clasificación.....	9
2.1.2. Prevalencia e incidencia	10
2.1.3. Criterios de diagnóstico.....	11
2.1.4. Modelos experimentales de diabetes mellitus	11
2.1.4.1. Modelos experimentales de DM-1.....	12
2.1.4.2. Modelos experimentales de DM-2.....	12
2.1.4.3. La rata Zucker Diabetic Fatty como modelo de DM-2	13
3. ANTECEDENTES	14
3.1. Antecedentes Generales	14
3.1.1. Enfermedad cardiovascular y Diabetes Mellitus.....	14
3.1.2. Sistema cardiovascular	15
3.1.3. Músculo liso vascular	17
3.1.4. Papel del Ca ²⁺ intracelular en el músculo liso vascular	18
3.1.5. Modulación fenotípica del músculo liso vascular	24
3.2. Antecedentes Específicos.....	27
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
5. HIPÓTESIS	32
6. OBJETIVOS	32
5.1. Objetivo General	32
5.2. Objetivos Específicos.....	32
7. BIOÉTICA	33
8. MATERIAL Y MÉTODOS	34
8.1. Caracterización del modelo animal.....	34
8.2. Aislamiento y cultivo primario de las CMLV.....	35
8.3. Medición de Ca ²⁺ intracelular.....	36
8.4. Protocolo para evaluar la señal de Ca ²⁺ intracelular evocada por ATP.....	39
8.5. Protocolo para evaluar la SOCE.....	40

8.6. Quenching del Fura-2 por Mn ²⁺ para evaluar la SOCE.....	41
8.7. Inhibición farmacológica de los mecanismos que remueven el Ca ²⁺ intracelular	41
8.8. Análisis de resultados.....	42
8.9. Soluciones	44
9. RESULTADOS.....	45
9.1. Parámetros morfométricos y bioquímicos.....	45
9.2 Efecto de la DM-2 sobre la señal de Ca ²⁺ intracelular evocada por ATP en CMLV en cultivo de aorta de rata.....	47
9.3 Efecto de la DM-2 sobre la señal de Ca ²⁺ intracelular evocada por ATP en ausencia de Ca ²⁺ extracelular en CMLV en cultivo de aorta de rata	50
9.4. Efecto de la DM-2 sobre la entrada de Ca ²⁺ operada por almacenes intracelulares (SOCE) en CMLV en cultivo de aorta de rata.....	54
9.5. Efecto de la DM-2 sobre la velocidad de entrada de Mn ²⁺ a través de los SOC en CMLV en cultivo de aorta de rata	57
9.6. Efecto de la DM-2 sobre la actividad de la SERCA en CMLV en cultivo de aorta de rata	59
9.6.1. Efecto de la DM-2 sobre la actividad de la SERCA en presencia de Ca ²⁺ en el medio extracelular.....	59
9.6.2. Efecto de la DM-2 sobre la actividad de la SERCA en ausencia de Ca ²⁺ en el medio extracelular.....	63
9.7. Efecto de la DM-2 sobre la actividad de la PMCA en CMLV en cultivo de aorta de rata	67
9.7.1. Efecto de la DM-2 sobre la actividad de la PMCA en presencia de Ca ²⁺ en el medio extracelular.....	67
9.7.2. Efecto de la DM-2 sobre la actividad de la PMCA en ausencia de Ca ²⁺ en el medio extracelular.....	71
9.8. Efecto de la DM-2 sobre la actividad del NCX en CMLV en cultivo de aorta de rata	75
9.8.1. Efecto de la DM-2 sobre la actividad del NCX en presencia de Ca ²⁺ en el medio extracelular.....	75
9.8.2. Efecto de la DM-2 sobre la actividad del NCX en ausencia de Ca ²⁺ en el medio extracelular.....	79
10. DISCUSIÓN.....	83
10.1. Caracterización del modelo animal.....	83
10.2. Efecto de la DM-2 sobre la señal de Ca ²⁺ intracelular evocada por ATP en CMLV en cultivo de aorta de rata.....	84
10.3. Efecto de la DM-2 sobre la señal de Ca ²⁺ intracelular evocada por ATP en ausencia de Ca ²⁺ extracelular en CMLV en cultivo de aorta de rata	86

10.4. Efecto de la DM-2 sobre la entrada de Ca^{2+} operada por almacenes intracelulares (SOCE) en CMLV en cultivo de aorta de rata.....	90
10.5. Efecto de la DM-2 sobre la actividad de la SERCA en CMLV en cultivo de aorta de rata	91
10.6. Efecto de la DM-2 sobre la actividad de la PMCA en CMLV en cultivo de aorta de rata	94
10.7. Efecto de la DM-2 sobre la actividad del NCX en CMLV en cultivo de aorta de rata	97
11. CONCLUSIONES.....	101
12. BIBLIOGRAFÍA.....	103

ABREVIATURAS

[Ca²⁺]_i Concentración de calcio intracelular

ADA Asociación Americana de Diabetes

AGE Productos de glicosilación avanzada

Ang II Angiotensina II

ATP Adenosin trifosfato

AUC Área bajo la curva

BK_{Ca} Canal de potasio sensible a calcio

Ca_v Canales de calcio dependientes de voltaje tipo L

CICR Liberación de calcio inducida por calcio

CMLV Células de músculo liso vascular

CPA Ácido ciclopiazónico

CREB Proteína unida a elemento en respuesta a AMPc

DAG Diacilglicerol

DM Diabetes mellitus

DM-1 Diabetes mellitus tipo 1

DM-2 Diabetes mellitus tipo 2

DREAM Modulador de elemento regulatorio antagonista río abajo

Fura 2-AM Fura 2-acetoximetil éster

IP₃ Fosfatidil inositol trifosfato

IP₃R Receptor a fosfatidil inositoltrifosfato

LZDF Fenotipo delgado de la cepa Zucker Diabetic Fatty

NCX Intercambiador Na⁺/Ca²⁺

NFAT Factor nuclear de células T activadas

NF-κB Factor nuclear kappa-beta

NO Óxido nítrico

OZDF Fenotipo obeso de la cepa Zucker Diabetic Fatty

PLC Fosfolipasa C

PMCA Bomba de calcio de la membrana plasmática

PSS1 Solución salina fisiológica baja en calcio

PSS2 Solución salina fisiológica

RE Retículo endoplásmico

ROC Canales activados por receptor

ROI Región de interés

ROS Especies reactivas de oxígeno

RyR Canal rianodínico

SERCA Bomba de calcio del retículo sarco/endoplásmico

SOC Canales operados por almacenes intracelulares

SOCE Entrada de calcio operada por almacenes intracelulares

SRF Factor de respuesta a suero

STIM1 Molécula de interacción estromal 1

TRPC Canal-receptor catiónico de potencial transitorio

ZDF Zucker Diabetic Fatty

1. RESUMEN

La DM es un conjunto de enfermedades metabólicas cuya principal característica es la hiperglicemia. Aproximadamente el 90% de los casos corresponden a DM-2, la cual se caracteriza por una pérdida de la acción de la insulina. En la actualidad, esta enfermedad constituye una de las primeras causas de muerte en nuestro país, debido a las complicaciones cardiovasculares que la acompañan. Se sabe que la DM-2 es capaz de afectar a los componentes del sistema cardiovascular a través de mecanismos como la glicosilación de proteínas, estrés oxidativo, producción de citocinas y factores proinflamatorios. Entre estos componentes se encuentran los vasos sanguíneos, los cuales se encargan de conducir sangre hacia los tejidos y participan de manera importante en la regulación de la presión arterial mediante la modulación de la resistencia periférica. Particularmente, el músculo liso vascular constituye un elemento clave en el desempeño adecuado de estas y otras funciones, al ser responsable de llevar a cabo procesos de suma importancia fisiológica como son la contracción, reparación vascular y angiogénesis; todos estos dependientes de Ca^{2+} intracelular, por lo que alteraciones en el manejo de dicho ion podrían impactar de manera significativa su funcionamiento. Hasta el momento, existe poca información respecto a cómo la DM-2 afecta la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en el músculo liso vascular; específicamente a los mecanismos de remoción de Ca^{2+} (SERCA, PMCA y NCX). Por tales motivos, el objetivo del presente trabajo consistió en evaluar el manejo del Ca^{2+} intracelular en cultivos primarios de células de músculo liso vascular aisladas de aorta de rata Zucker Diabetic Fatty, un modelo animal de DM-2, empleando el fluoróforo sensible a Ca^{2+} *Fura-2AM*. En particular, se evaluó la señal de Ca^{2+} intracelular evocada por el agonista adenosintrifosfato (ATP) en presencia y ausencia de Ca^{2+} extracelular, así como la entrada de Ca^{2+} operada por almacenes intracelulares (SOCE) y la función de los mecanismos de remoción de Ca^{2+} . Los resultados obtenidos en el presente trabajo revelan que la DM-2 altera el manejo del Ca^{2+} intracelular durante la estimulación con ATP; específicamente, encontramos que existe una aceleración de la etapa temprana

de la fase de decaída del transiente de Ca^{2+} y un incremento en la amplitud de la meseta en presencia de Ca^{2+} extracelular, así como una disminución en la liberación de Ca^{2+} proveniente de almacenes intracelulares. No encontramos alteraciones en la cantidad de Ca^{2+} dentro del RE ni en la amplitud global de la SOCE, sin embargo pudimos identificar un aumento en la actividad de los SOC, sugiriendo la existencia de un incremento en la función de los mecanismos de remoción de Ca^{2+} como un método de compensación ante tal evento. Finalmente, la evaluación particular de cada uno de estos mecanismos reveló que, en efecto, las alteraciones en la etapa temprana de la decaída de la señal de Ca^{2+} intracelular evocada por ATP están dadas por un aumento en la actividad de remoción de Ca^{2+} por parte de la SERCA, PMCA y NCX, mientras que el incremento visto en la amplitud de la meseta es causado tanto por el aumento de la entrada de Ca^{2+} a través del modo reverso del NCX, como por una drástica disminución en la actividad de la SERCA durante la etapa tardía de la decaída del transiente. Estos efectos se encuentran estrechamente regulados por la entrada de Ca^{2+} proveniente del medio extracelular.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Diabetes Mellitus

El término diabetes mellitus (DM), comprende un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por un aumento en los niveles de glucosa plasmática (hiperglucemia) debido a defectos en la secreción y/o acción de la insulina. La hiperglucemia crónica está estrechamente asociada con el desarrollo de enfermedades renales, oculares, nerviosas y cardiovasculares (American Diabetes Association, 2017).

2.1.1. Clasificación

Según la asociación americana de la diabetes (ADA), la DM se clasifica en cuatro categorías según su etiología:

1. DM tipo 1: Provocada por la destrucción autoinmune de las células β -pancreáticas, lo que conlleva a una deficiencia absoluta de insulina.
2. DM tipo 2: Provocada por una pérdida progresiva de la secreción de insulina por parte de las células β -pancreáticas, frecuentemente asociada con insulinoresistencia.
3. Diabetes gestacional: Se presenta durante el segundo o tercer trimestre de embarazo.
4. Tipos de diabetes específicos con otras causas como diabetes neonatal, enfermedades del páncreas exócrino (fibrosis quística), diabetes inducida por fármacos (uso de glucocorticoides, tratamiento de VIH/SIDA, etc.) (American Diabetes Association, 2017).

La DM-2 o no insulino dependiente es la forma más común de diabetes. Se estima que representa el 90% de los casos de DM en todo el mundo. La DM-2 generalmente ocurre en adultos, sin embargo cada vez es más común observarla en niños y adolescentes (Federación Internacional de Diabetes, 2015). Existe una estrecha relación entre la DM-2 y los malos hábitos alimenticios, así como la

inactividad física. Típicamente los pacientes diabéticos presentan sobrepeso y/o obesidad, así como aumento de grasa en la región abdominal y dislipidemia. Es más común en mujeres con antecedentes de diabetes gestacional y está fuertemente asociada con la predisposición genética. (Federación Internacional de Diabetes, 2015).

2.1.2. Prevalencia e incidencia

La DM es una enfermedad con elevados índices de mortalidad y morbilidad. Según cifras de la OMS, el número de casos de diabetes aumentó de 108 millones en 1980 a 422 millones en 2014 (World Health Organization, 2016). Durante la última década, la mortalidad por DM aumentó considerablemente en países en vías de desarrollo; en 2015 se registraron cerca de 5 millones de muertes de personas de entre 20 y 79 años de edad, lo que equivale a una muerte cada seis segundos (Mathers & Loncar, 2015).

La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino en el 2016, reportó que, en México, la prevalencia de diabetes pasó de 9.2% en 2012 a 9.4% en 2016, ocupando el 6to lugar a nivel mundial en número de personas con dicha enfermedad (ENSANUT, 2016). La DM constituye la primera causa de muerte en nuestro país; en 2014 se le atribuyó el 14.8% de las muertes registradas, por encima de las enfermedades isquémicas del corazón y los tumores malignos (Soto-estrada & Moreno-altamirano, 2016). La DM se ha convertido en el mayor reto para el Sistema Nacional de Salud, siendo la principal causa de demanda de atención médica en consulta externa, así como una de las principales causas de hospitalización; es la enfermedad que más recursos económicos consume en las instituciones de salud pública del país (del 15% al 20%) (Hernández-Romieu y cols. 2011).

2.1.3. Criterios de diagnóstico

La ADA en su publicación del 2017 acerca del cuidado de la DM, menciona las pruebas que deben realizarse para emitir un diagnóstico certero de DM, así como los parámetros a partir de los cuales se determina la presencia de dicha enfermedad. La DM puede ser diagnosticada cuantificando los niveles de glucosa plasmática ya sea en ayuno (8 hrs sin ingerir alimento) o en 2 hrs posteriores a la ingesta de 75 gr de glucosa durante una prueba de tolerancia a la glucosa. También puede cuantificarse la cantidad de hemoglobina glucosilada (A1C), la cual funciona como un valor de referencia que indica el estado glucémico del paciente durante los últimos 3 meses. En adición puede ser diagnosticada con una prueba de glucosa plasmática casual. En la **tabla 1** se muestran los valores bioquímicos propuestos por la Asociación Americana de la Diabetes para el diagnóstico de la diabetes.

Prueba	Parámetros normales	Parámetros en DM
A1C	≤5.6%	≥6.5%
Prueba de tolerancia a la glucosa oral	≤140 md/dL	≥200 mg/dL
Glucosa plasmática en ayuno	80– 100 mg/dL	≥126mg/dL
Glucosa plasmática casual		≥200mg/dL

(Standards of Medical Care in Diabetes, ADA, 2017)

Tabla 1. Parámetros bioquímicos para el diagnóstico de diabetes según la ADA.

2.1.4. Modelos experimentales de diabetes mellitus

Con el fin de estudiar la fisiopatología de la DM, así como sus complicaciones, se han desarrollado numerosos modelos experimentales, los cuales están conformados en su mayoría por animales de laboratorio a los que se les induce diabetes mediante distintos métodos, según el objetivo del estudio que se pretende realizar.

2.1.4.1. Modelos experimentales de DM-1

La destrucción de las células β -pancreáticas que caracteriza a la DM-1 puede inducirse en modelos animales como son la rata y ratón de laboratorio de forma química, quirúrgica, por manipulación genética, o bien puede aparecer de forma espontánea (Al-awar et al., 2016).

- Diabetes química: Inducida por la administración de sustancias tóxicas para las células β como el aloxano y la streptozotocina (STZ). La destrucción de las células β finalmente conlleva a la inhibición de la secreción de insulina (Pasek & Gannon, 2013).
- Diabetes quirúrgica: Consiste en realizar una pancreatectomía parcial con el fin de reducir la cantidad de células β y por ende, la secreción de insulina (King & Bowe, 2016).
- Diabetes espontánea: Existen modelos animales que desarrollan DM-1 de forma espontánea. El mantenimiento de estas cepas se logra a través de cruces endogámicos y del control de factores ambientales y alimenticios. Entre ellos se encuentran el ratón no obeso-diabético (NOD), el ratón Akita, la rata BioBreeding (BB), la rata Komeda propensa a desarrollar diabetes (KDP) y la rata LEW-1AR1 (B. Wang, Chandrasekera, & Pippin, 2014).
- Manipulación genética: Consiste en la producción de animales transgénicos con el fin de identificar genes clave en el desarrollo de DM-1 (Belizário, 2009).

2.1.4.2. Modelos experimentales de DM-2

Al igual que la DM-1, la DM-2 también puede ser inducida experimentalmente, ya sea a través de la ingesta de una dieta hipercalórica, o bien, mediante la cruce de animales propensos a desarrollar la enfermedad debido a factores genéticos.

Debido a que la obesidad es un factor de riesgo importante para el desarrollo de DM-2, algunos de estos modelos animales poseen dicha característica, lo que permite estudiar la relación entre obesidad y diabetes.

- DM-2 inducida por dieta: Se logra mediante la administración de una dieta alta en grasas. La obesidad se asocia con resistencia a la insulina y un metabolismo inadecuado de la glucosa, aunque no suele ser suficiente para el desarrollo de DM-2 por sí misma (King & Bowe, 2016).
- Modelos monogénicos y poligénicos: Surgen como resultado de mutaciones genéticas espontáneas. Entre ellos se encuentran el ratón $Lep^{ob/ob}$, el ratón $Lept^{db/db}$, la rata Goto-Kakizaki y la rata Zucker Diabetic Fatty (B. Wang et al., 2014).

2.1.4.3. La rata Zucker Diabetic Fatty como modelo de DM-2

Descubierta en 1961, la cepa de rata ZDF surgió de la cruce de ratas Merck y Sherman. La mutación homocigota en el gen que codifica para el receptor de la hormona leptina (fa/fa) produce un receptor defectuoso que provoca que las ratas desarrollen un comportamiento hiperfágico, y por ende, obesidad a partir de las 4 semanas de edad (Al-awar et al., 2016). Al ser alimentados con una dieta alta en energía, los machos desarrollan DM-2 a partir de las 8-10 semanas de edad. Estas ratas se caracterizan por tener hiperinsulinemia, hiperlipidemia, hipertensión y enfermedades cardiovasculares, así como baja tolerancia a la glucosa. Asimismo, poseen una disminución en la cantidad de células β -pancreáticas, lo que las vuelve incapaces de compensar la insulinoresistencia severa (Katsuda et al., 2014). Todas estas características convierten a la rata ZDF en un modelo animal que representa de forma eficiente la fisiopatología de la DM-2 y sus complicaciones.

3. ANTECEDENTES

3.1. Antecedentes Generales

3.1.1. Enfermedad cardiovascular y Diabetes Mellitus

Entre las complicaciones más comunes y letales de la DM se encuentran las enfermedades de tipo cardiovascular, siendo la causa de aproximadamente el 70% de las muertes en pacientes diabéticos (Kennedy, 2017). Diversos estudios han demostrado que en estos pacientes existe un riesgo aumentado de padecer enfermedades cardiovasculares como la enfermedad coronaria, infarto al miocardio, hipertensión y aterosclerosis. Uno de estos estudios es el estudio de Framingham (Framingham Heart Study) realizado en 1948 por el Servicio de Salud Pública de Estados Unidos, en el cual se pretendía determinar cuáles eran los factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Se identificó a la DM como un factor de riesgo importante, incrementando de 2-3 veces la probabilidad de padecer enfermedades cardiovasculares, siendo las mujeres más propensas a desarrollar alteraciones cardiovasculares como consecuencia de esta enfermedad (Kannel & Daniel, 1979).

La hiperglucemia, así como anomalías en el metabolismo de lípidos y la insulinoresistencia están estrechamente relacionadas con el incremento en el riesgo cardiovascular, generando alteraciones en los distintos componentes estructurales de los vasos sanguíneos (Szuszkiewicz-Garcia & Davidson, 2014). Se han identificado diversos mecanismos a través de los cuales la diabetes genera daño vascular. Por ejemplo, se sabe que niveles elevados de glucosa plasmática aumentan el proceso de glicosilación de proteínas importantes en diversos procesos celulares, llevando a cabo modificaciones postraduccionales (productos de glicosilación avanzada - AGEs) que afectan el funcionamiento de las mismas (Chaudhari & Ma, 2016b). Se ha visto también que durante la DM, existe un aumento en la expresión de los receptores para AGEs (RAGE), los cuales se encuentran presentes en varios tipos celulares, incluyendo células endoteliales y músculo liso vascular (Yang et al., 2016). La unión de dichos productos con su

receptor induce la activación de la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NAPDH), lo cual favorece la producción y acumulación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS/RNS), las cuales, dañan de forma directa el ADN, ARN, lípidos y proteínas (Marco et al., 2015).

A nivel endotelial, las ROS/RNS disminuyen la producción y biodisponibilidad de óxido nítrico, dando como resultado el desarrollo de disfunción endotelial. Las ROS/RNS también favorecen el reclutamiento y retención de células inflamatorias dentro del espacio subíntimo y aumentan la producción de citocinas y factores proinflamatorios como ICAM-1, VCAM-1, IL-1a, IL-6 y TNF- α (Ramasamy, Yan, & Schmidt, 2015).

A nivel del músculo liso vascular, se ha reportado que la hiperinsulinemia aumenta el estrés oxidativo y provoca disfunción mitocondrial, incrementando la migración y proliferación de las CMLV, las cuales son clave durante el proceso aterogénico (Abhijit et al., 2013). Todo este ambiente proinflamatorio, pro-oxidativo y protrombótico es favorable tanto para el desarrollo de aterosclerosis, como para la posterior desestabilización de la placa aterosclerótica, teniendo consecuencias letales comunes en pacientes diabéticos como infarto al miocardio y accidente cerebral-vascular (Szuszkiewicz-Garcia & Davidson, 2014). Aunque existe amplia evidencia de que la DM genera daño vascular mediante la alteración directa de la función de las células endoteliales y del músculo liso vascular, aún queda mucho por estudiar respecto a las alteraciones producidas en éste último.

3.1.2. Sistema cardiovascular

El sistema cardiovascular se encarga de distribuir gases disueltos y nutrientes contenidos en la sangre hacia los tejidos. Está constituido por 3 elementos funcionales: la **sangre**, la cual es bombeada por el **corazón** a través de los **vasos sanguíneos** hacia todo el organismo. Este sistema de conducción está dividido en dos circuitos principales: la *circulación pulmonar*, en la cual la sangre es expulsada por el ventrículo derecho del corazón y se dirige hacia los pulmones a través de las arterias pulmonares para llevar a cabo el intercambio gaseoso y la

circulación sistémica, en la cual la sangre es expulsada por el ventrículo izquierdo y, a través de las arterias, perfunde el resto de los tejidos del organismo para posteriormente retornar al corazón a través del sistema venoso (Walter F. Boron, Emile L. Boulpaep, 2013).

En la **Figura 1** se muestra un esquema de la estructura de los vasos sanguíneos. Tanto arterias como venas, están conformadas por 3 capas de tejido a las que se les denomina *túnicas*.

- **Túnica íntima:** compuesta por el endotelio vascular y la capa subendotelial. El endotelio vascular consiste en una monocapa de células que recubren el lumen del vaso, constituyendo la porción más interna. El endotelio vascular tiene diversas funciones, entre las que destacan su capacidad para formar una barrera selectiva y modular el intercambio de células y moléculas entre la sangre y el intersticio, su papel antitrombótico, la secreción de sustancias vasoactivas como óxido nítrico y endotelina y la regulación de procesos como la hemostasia y la angiogénesis. Por otro lado, la capa subendotelial está conformada por tejido conectivo suelto y algunas fibras de músculo liso. En arterias, la túnica íntima también incluye a la lámina elástica interna, la cual está compuesta de elastina y es fenestrada, lo que permite la difusión de sustancias provenientes de la sangre.
- **Túnica adventicia:** es la capa más externa y gruesa de los vasos sanguíneos. Está conformada por fibroblastos, células de músculo liso vascular (CMLV) y proteínas de la matriz extracelular; principalmente colágeno tipo I. Posee también terminales nerviosas y en arterias y venas de mayor tamaño, una red de pequeños vasos denominada *vasa vasorum* que irriga a los vasos de mayor calibre.

Túnica media: se encuentra en medio de las túnicas íntima y adventicia. Está compuesta por fibras de músculo liso, las cuales al contraerse modifican el diámetro del lumen de los vasos. Las CMLV de esta capa también producen proteínas de matriz extracelular como colágeno tipo III y elastina que brindan soporte y elasticidad al vaso. En arterias, la túnica media también puede poseer

una lámina elástica externa, que la separa de la túnica más externa (adventicia) (Ash, Morton, & Scott, 2013; Mescher, 2016).

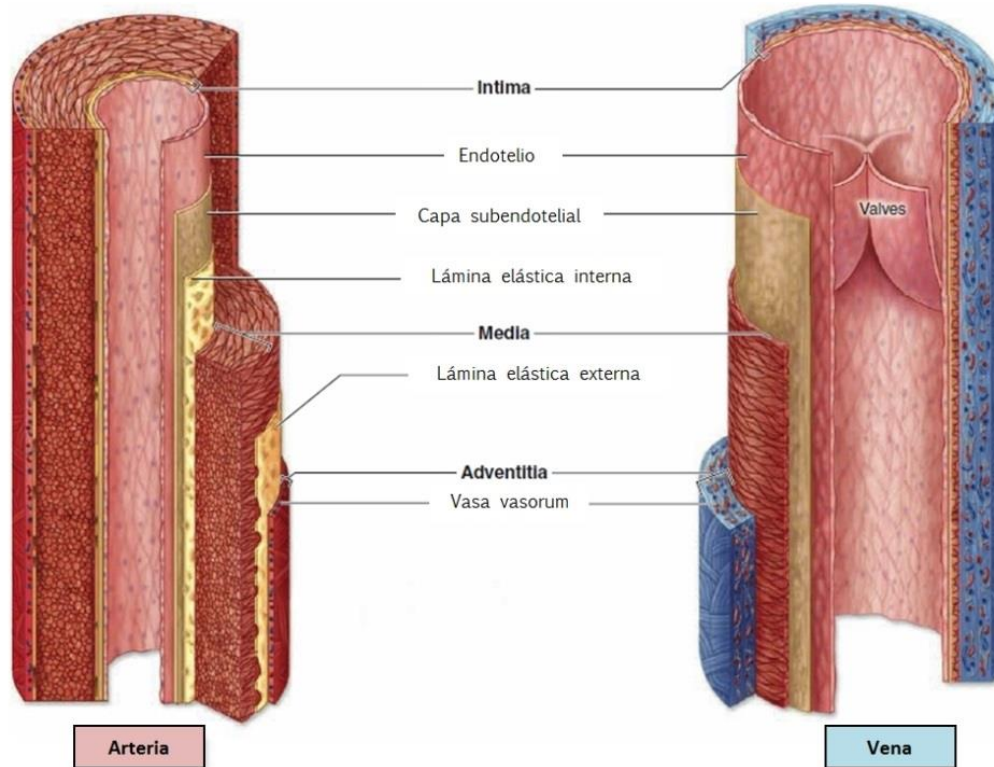


Figura 1. Estructura de los vasos sanguíneos. Tanto arterias como venas están conformadas por 3 capas de tejido denominadas *túnicas*: la **íntima**, compuesta por el endotelio vascular, la capa subendotelial y la lámina elástica interna; la **media**, conformada por el músculo liso vascular y la lámina elástica externa; y la **adventicia**, conformada por fibroblastos y proteínas de la matriz extracelular, así como terminales nerviosas y pequeños capilares conocidos como *vasa vasorum*. Modificada de (Mescher, 2016).

3.1.3. Músculo liso vascular

Al igual que las células de músculo esquelético y estriado, las CMLV están compuestas por filamentos proteicos de actina (delgados) y miosina (gruesos). Los filamentos delgados se encuentran orientados de forma paralela u oblicua a lo largo de la célula, y suelen formar agrupaciones denominadas *cuerpos densos*, en zonas especializadas. Los filamentos gruesos son más escasos que en el músculo esquelético y estriado y están intercalados con los filamentos delgados. Las CMLV se caracterizan por ser alargadas, de forma fusiforme y su labor principal es la de regular el tono vascular a través de su contracción o relajación, modificando así el

diámetro de los vasos sanguíneos y por ende, la presión arterial (Walter F. Boron, Emile L. Boulpaep, 2013).

Las CMLV ejercen tensión de la pared vascular a través de dos mecanismos según el estímulo al que se sometan: el acople electromecánico y el acople farmacomecánico. El primero se da en respuesta a un estiramiento de las CMLV como consecuencia del aumento de la presión intraluminal del vaso, lo que produce una despolarización de la membrana plasmática y la apertura de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes, favoreciendo la entrada de este ion a la célula y activando una contracción sostenida en arterias de pequeño calibre. Esta contracción sostenida se denomina *tono miogénico* y es necesaria para el mantenimiento de un flujo sanguíneo constante (Davis, Hill, & Kuo, 2008).

Por otro lado, el acople fármacomecánico ocurre en respuesta a diversas sustancias como neurotransmisores, hormonas, sustancias derivadas del endotelio y metabolitos locales, los cuales, al unirse a su receptor inducen un aumento en la concentración de Ca^{2+} libre intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) que tiene como resultado la contracción del músculo liso vascular, y por ende la vasoconstricción. Este es, principalmente, el mecanismo encargado de regular la resistencia periférica y consecuentemente, la presión arterial (Ghosh, Syed, Prada, Nystoriak, & Santana, 2017).

3.1.4. Papel del Ca^{2+} intracelular en el músculo liso vascular

El Ca^{2+} es una molécula fundamental para el mantenimiento de la homeostasis celular, ya que participa en múltiples procesos vitales para la célula como migración y proliferación, regulación enzimática, transcripción de genes mediante la regulación de factores de transcripción, transporte vesicular, apoptosis y contracción en el caso de las células musculares (Matchkov, Kudryavtseva, & Aalkjaer, 2011). En las CMLV, la concentración de Ca^{2+} citosólico $[\text{Ca}^{2+}]_c$ se encuentra dentro de un rango de 100 – 300 nM (Wray & Burdyga, 2010), mientras que en el exterior se encuentra a ~2 mM. El principal almacén intracelular de Ca^{2+}

es el retículo endoplásmico (RE). Dentro de éste, la concentración de dicho ion en su forma libre es de $\sim 500 \mu\text{M}$ (Esfandiarei et al., 2013).

Existen varios mecanismos celulares conformados por proteínas que funcionan como canales, transportadores o bombas, cuya función es introducir y/o remover el Ca^{2+} del citosol. Cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se eleva en respuesta a un estímulo eléctrico o químico, las CMLV se contraen como consecuencia de un proceso llamado *acople excitación-contracción*. En la **Figura 2** se esquematiza el papel funcional del Ca^{2+} en la contracción del músculo liso vascular. En este proceso, el Ca^{2+} del citosol se une a la proteína calmodulina (CaM) para formar el complejo Ca^{2+} -CaM, el cual activa a la enzima cinasa de cadena ligera de miosina (MLCK) que se encarga de fosforilar a la cadena ligera de miosina asociada a la molécula de miosina II. Esta fosforilación aumenta la actividad ATPasa de la cabeza de la miosina, permitiendo su interacción con los filamentos de actina y generando así el *golpe de fuerza*, que da como resultado la contracción muscular (Walter F. Boron, Emile L. Boulpaep, 2013).

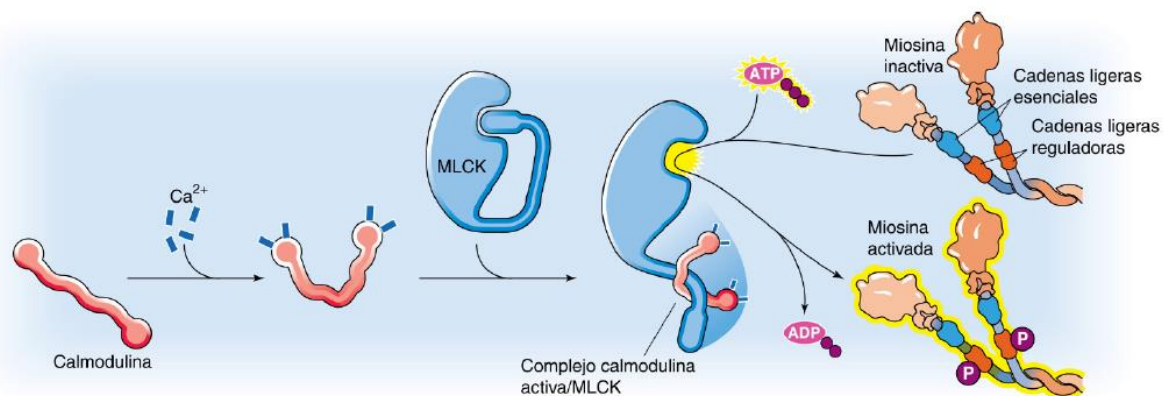


Figura 2. Papel del Ca^{2+} en la contracción del músculo liso. El Ca^{2+} se une a la calmodulina para formar el complejo Ca^{2+} -CaM, el cual activa la cinasa de cadena ligera de la miosina (MLCK) que a su vez, fosforila la cadena ligera reguladora de la miosina II. Esto produce un cambio conformacional en la molécula, así como un aumento de su actividad ATPasa, favoreciendo así su interacción con la actina. Tomada de (Walter F. Boron, Emile L. Boulpaep, 2013).

En las CMLV gran parte del Ca^{2+} que entra desde el medio extracelular hacia el citosol es transportado por canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes localizados en la membrana celular en respuesta a una despolarización de la misma. La mayoría de

estos canales son de tipo L (Ca_v) y la entrada de Ca^{2+} a través de estos es la principal responsable de generar el acople excitación-contracción (Stammers et al., 2015) (**Figura 3**). En numerosos estudios se ha demostrado que en el fenotipo proliferativo, las CMLV pierden la expresión y función de estos canales (Matchkov et al., 2011).

Existen también otras fuentes de ingreso de este ion que no son voltaje-dependientes, como lo es la *entrada de Ca^{2+} operada por almacenes intracelulares (SOCE)*, la cual se activa en respuesta a un vaciamiento parcial o total de Ca^{2+} del RE. La SOCE está regulada por dos familias de proteínas: STIM y Orai (**Figura 3**). En mamíferos, se expresan dos homólogos de STIM: STIM1 y STIM2, mientras que de Orai se expresan 3 homólogos: Orai1-3 (Prakriya & Lewis, 2015). Las proteínas STIM se expresan en la membrana del RE y funcionan como sensores capaces de detectar el vaciamiento de Ca^{2+} del RE. Una vez que esto ocurre, se aglomeran en la membrana de éste, formando un complejo denominado *puncta*, el cual permite la interacción de STIM con la proteína Orai que se expresa en la membrana plasmática. Esta interacción activa los canales SOC (Store Operated Channels), a través de los cuales entra Ca^{2+} del medio extracelular (Spinelli & Trebak, 2016). Numerosos estudios demuestran que esta vía de entrada de Ca^{2+} promueve el crecimiento y proliferación de las CMLV (Kudryavtseva et al., 2013; Takahashi et al., 2007) Otra fuente de entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular ocurre a través de canales TRPC (Transient Receptor Potential Canonical) (**Figura 3**), los cuales constituyen una familia de siete canales catiónicos no selectivos (TRPC1-7) y cuya totalidad de isoformas se encuentra presente en la vasculatura (en su mayoría TRPC1, 4 y 6) (Simo-Cheyou et al.; Van Breemen et al., 2013). Se tiene evidencia de que la expresión de estos canales aumenta cuando las CMLV adquieren el fenotipo proliferativo y están implicados en patologías como restenosis, hipertensión pulmonar y aterosclerosis (Dietrich, et al., 2006; S. House et al., 2008).

Además de la entrada desde el medio extracelular, la $[Ca^{2+}]_i$ también puede aumentar en respuesta a una liberación de Ca^{2+} proveniente del RE. Existen dos

tipos de canales a través de los cuales ocurre esta liberación: *el receptor-canal IP₃R* y el canal sensible a rianodina (RyR) (**Figura 3**); ambos se expresan en la membrana de dicho organelo (Tao et al., 2013). Los IP₃R son sensibles al segundo mensajero IP₃ y participan en la *entrada de Ca²⁺ operada por receptor (ROCE)*, en la cual un agonista se une a su receptor de membrana. Este receptor está acoplado a una proteína G_{αq-11} y activa una fosfolipasa C (PLC) que hidroliza el fosfolípido de membrana fosfatidil inositol difosfato (IP₂), resultando en la producción de diacilglicerol (DAG) y fosfatidilinositol trifosfato (IP₃) (Ghosh, et al., 2017) (**Figura 3**). Cuando el IP₃ se une al receptor-canal IP₃R, induce la liberación de Ca²⁺ proveniente del RE a través de este. Como ejemplos de agonistas que pueden activar esta vía de señalización podemos mencionar a sustancias vasoactivas como angiotensina II, noradrenalina, endotelina, vasopresina, prostaglandinas y ATP (Navarro-dorado, Garcia-alonso, Breemen, Tejerina, & Fameli, 2014). La liberación de Ca²⁺ a través de los IP₃R puede activar la transcripción de genes de respuesta temprana/proliferación mediante la activación de la SOCE, o bien, por la vía calcineurina-NFAT (Kudryavtseva, Aalkjaer, & Matchkov, 2013). Asimismo, se ha demostrado que las ondas de Ca²⁺ mediadas por los IP₃R son necesarias para la transición de las CMLV del fenotipo contráctil al proliferativo (Ghosh et al., 2017). En lo que respecta a los RyR, a estos se les atribuye la *liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺*. El principal estímulo fisiológico para la apertura de dichos canales es un aumento de la [Ca²⁺]_i, aunque también pueden activarse en presencia de cafeína y ser modulados por PKA o PKC. Existen 3 distintas isoformas del canal RyR (RyR1-3) siendo RyR3 la que más se expresa en el músculo liso vascular de aorta de rata (Rossi & Sorrentino, 2002). RyR1 y RyR2 median un tipo de señal de Ca²⁺ conocida como *chispas de calcio*, las cuales consisten en liberaciones de Ca²⁺ del RE a través de los canales RyR, capaces de activar otros canales como los canales de potasio sensibles a calcio (BK_{Ca}) y los canales de cloro sensibles a calcio (Cl_{Ca}) (Amberg & Navedo, 2014).

Así como existen diversas vías para elevar la [Ca²⁺]_i también existen mecanismos que se encargan de reducirla, con el fin de mantener la homeostasis del Ca²⁺ en el medio intracelular. Uno de ellos es la bomba de Ca²⁺ del RE

(SERCA) (**Figura 3**), la cual bombea Ca^{2+} desde el citosol hacia el RE. La SERCA es codificada por 3 distintos genes (SERCA1, 2 y 3), dando lugar por *splicing* alternativo a más de 10 distintas isoformas expresadas en diversos tejidos. Estas isoformas difieren entre sí en su afinidad por Ca^{2+} , resistencia al estrés oxidativo y modulación por fosfolambano y la cinasa Ca^{2+} /calmodulina II (Stammers et al., 2015). Cuando las CMLV pierden su fenotipo contráctil, se disminuye la expresión de distintas proteínas, entre ellas la SERCA2a (Chaudhari & Ma, 2016).

En la membrana plasmática, también existen otras proteínas encargadas de transportar el Ca^{2+} del citosol hacia el medio extracelular: la bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA) y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) (Walter F. Boron, Emile L. Boulpaep, 2013) (**Figura 3**). Al igual que la SERCA, la PMCA es una bomba con alta afinidad a Ca^{2+} que moviliza dicho ion en contra de su gradiente de concentración, en este caso hacia el exterior de la célula. En mamíferos, existen 4 genes distintos que dan lugar a las principales isoformas (PMCA1-4). Diversas proteínas y cinasas pueden regular las distintas isoformas de la PMCA, siendo el complejo Ca^{2+} - calmodulina (CaM) su principal regulador (Krebs, 2014). Por otro lado, el NCX, se encarga de transportar Na^+ y Ca^{2+} de manera bidireccional, introduciendo Na^+ y expulsando Ca^{2+} del citosol, o bien funcionando de modo *reverso* dependiendo del potencial de membrana (V_m) y del gradiente electroquímico de ambos iones. Hasta el momento, se han identificado 3 genes que codifican para el NCX (NCX1-3); en CMLV, NCX1 es el único que se expresa y está involucrado en el control de la vasoconstricción (El-najjar, Kulkarni, Nader, Hodeify, & Machaca, 2017). En 2005, Zhang y colaboradores demostraron que el NCX podría tener un papel importante en la proliferación del músculo liso vascular al observar que en cultivos de CMLV humanas de arteria pulmonar y arteria coronaria, la actividad del NCX en modo *reverso* se encontraba aumentada, en el primer caso debido a un aumento en su expresión y en el segundo, por un incremento en las corrientes de Na^+ , lo que generó un incremento en los niveles de Ca^{2+} citoplasmático, promoviendo así la proliferación celular (Yuan et al., 2005; S. Zhang et al., 2005).

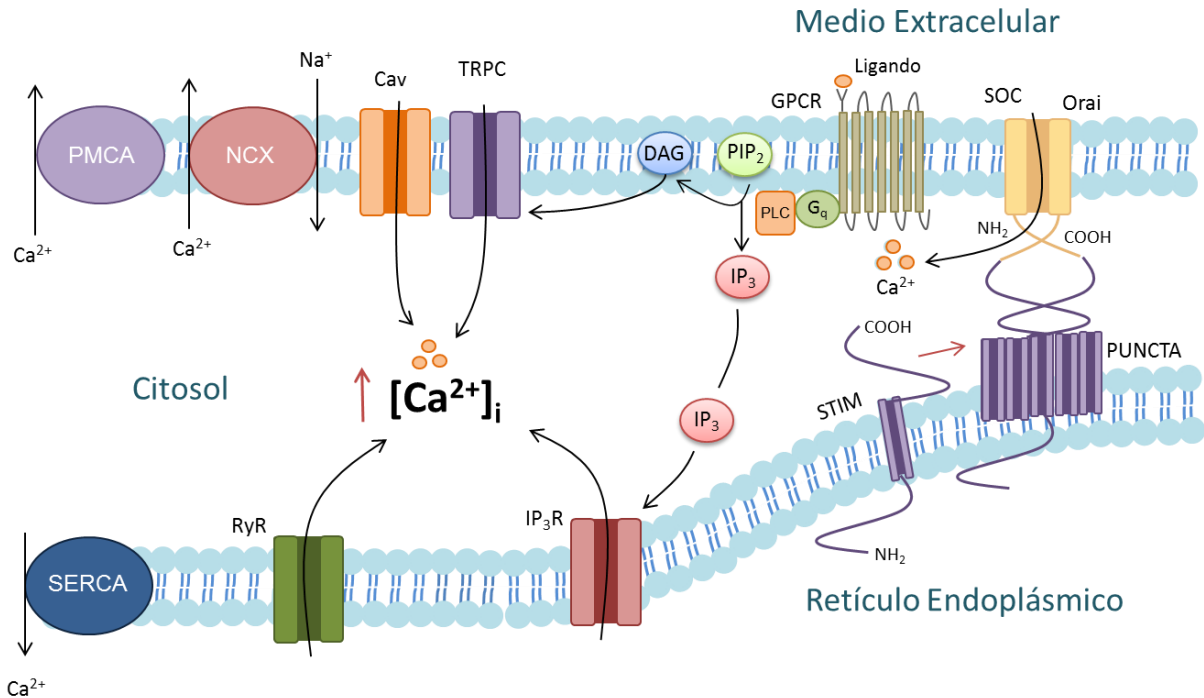


Figura 3. Principales mecanismos que participan en la regulación de la $[Ca^{2+}]_i$ en CMLV. Los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes tipo L (Ca_v) constituyen el principal mecanismo de entrada de Ca^{2+} proveniente del medio extracelular en CMLV en su fenotipo contráctil. En el fenotipo proliferativo, esta función es reemplazada por los canales SOC, los cuales se activan en respuesta a una reducción en la $[Ca^{2+}]$ dentro del RE, que es detectada por las proteínas STIM. Cuando existe un vaciamiento del RE, las proteínas STIM1 son reclutadas en la membrana del RE, formando un complejo denominado PUNCTA, que al interactuar con la proteína de membrana Orai1, induce la apertura de los canales SOC. Este fenómeno se denomina *entrada de Ca^{2+} operada por almacenes intracelulares (SOCE)*. Además de los SOC, los canales TRPC, localizados en la membrana plasmática, también pueden introducir Ca^{2+} a la célula. Diversos agonistas también son capaces de inducir un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ mediante su unión a receptores acoplados a proteína G (GPCR), los cuales promueven la apertura del receptor-canal IP_3R mediante la producción de IP_3 , permitiendo la liberación de Ca^{2+} proveniente del RE. Los canales rianodínicos (RyR) también tienen la capacidad de transportar Ca^{2+} desde el RE hacia el citosol. Finalmente, tanto la bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA), como el intercambiador Na^+/Ca^{2+} (NCX) y la bomba de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (SERCA) se encargan de remover el Ca^{2+} del citosol y así disminuir la $[Ca^{2+}]_i$, contribuyendo de manera importante al mantenimiento de la homeostasis de éste.

Existe evidencia experimental que demuestra que durante la DM, la homeostasis del Ca^{2+} intracelular se encuentra alterada en el músculo liso vascular, afectando una diversidad de procesos que van desde la contracción de las CMLV, hasta su modulación fenotípica, migración y proliferación. Todos estos están directamente relacionados con el desarrollo de procesos patológicos característicos de la DM como son hipertensión arterial y aterosclerosis.

3.1.5. Modulación fenotípica del músculo liso vascular

Una de las características más representativas de las CMLV es su alto grado de plasticidad, ya que tienen la capacidad de llevar a cabo una modulación fenotípica, dependiendo de las condiciones en las que se encuentren. Dicha transición es un proceso adaptativo y se da en respuesta a estímulos ambientales como la presencia de factores de crecimiento, mediadores de la inflamación, mitógenos y estímulos mecánicos (Kudryavtseva, Aalkjær, & Matchkov, 2013). En condiciones fisiológicas, la transición de las CMLV desde un fenotipo contráctil hacia uno proliferativo (no contráctil) es un mecanismo altamente regulado que participa principalmente en la reparación vascular y la angiogénesis; suele ser reversible, sin embargo, se ha demostrado que bajo ciertas circunstancias, puede contribuir en el desarrollo de patologías como aterosclerosis, microvasos hipertensivos y restenosis (S. House, Potier, & Bisailon, 2008). Durante esta transición, las CMLV comienzan a crecer, proliferan, migran y sintetizan mayor cantidad de matriz extracelular. Hay pérdida de la maquinaria contráctil y aumenta la expresión de genes relacionados con el crecimiento celular, proliferación y/o migración. Se sabe que múltiples factores de transcripción como la *proteína unida a elemento en respuesta a AMPc (CREB)*, el *factor nuclear de células T activadas (NFAT)* y el *factor de respuesta a suero (SRF)* están directamente asociados a genes que codifican para proteínas contráctiles y del citoesqueleto, así como genes de respuesta temprana que estimulan la síntesis de DNA y el crecimiento celular y proliferación. La activación selectiva de estos genes define las características de las CMLV y como consecuencia, su fenotipo (Kudryavtseva, Aalkjaer, et al., 2013; Ren, Albinsson, & Hellstrand, 2010).

Además de participar en el acople excitación-contracción, el Ca^{2+} juega un papel importante durante la modulación fenotípica de las CMLV. Gran parte de los factores de transcripción involucrados en este proceso son activados directa o indirectamente (a través de proteínas fosfatasas o cinasas) por un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (S. J. House, Potier, Bisailon, Singer, & Trebak, 2008). Por ejemplo, el factor de transcripción SRF es capaz de activar la expresión de genes propios del

fenotipo contráctil a través de la entrada de Ca^{2+} por canales Ca_v . Este evento estimula la activación de la cinasa RhoA/Rho, que a su vez activa a SRF. Paradójicamente, se ha demostrado que la transcripción de algunos genes característicos del fenotipo proliferativo de las CMLV, es también dependiente de SRF. Se cree que la forma en la que SRF discrimina entre la activación de genes del fenotipo contráctil y proliferativo podría ser a través de la acción de diversos co-factores como el factor similar a Krüppel 4 (KLF4) (Wamhoff et al., 2004).

Otro factor de transcripción importante durante la modulación fenotípica de las CMLV es CREB, el cual puede promover la transcripción de genes característicos tanto del fenotipo contráctil, como del fenotipo proliferativo. Un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es capaz de activar proteínas cinasas nucleares como la *cinasa calcio-calmodulina tipo 4* (Ca^{2+} -CaMKIV), la cual posee un papel dominante sobre la activación de CREB. Este factor de transcripción puede ser regulado positiva o negativamente por otras cinasas de la misma familia, como Ca^{2+} -CaMKII, la cual ejerce un efecto inhibitorio. La inactivación de CREB también puede darse por la acción de proteínas fosfatasa (Matchkov, Kudryavtseva, & Aalkjaer, 2011).

Las características de la señal de Ca^{2+} como son la duración, amplitud, frecuencia, así como los transportadores que participan en dicho evento, determinan qué factores de transcripción son activados, y en consecuencia, regulan la modulación fenotípica de las CMLV. Por ejemplo, se ha demostrado que el aumento sostenido de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que se da a través de los canales Ca_v activa CREB, mientras que la salida de Ca^{2+} proveniente del RE a través de los canales RyR inhibe su fosforilación y por ende, su activación. También se ha demostrado que la translocación nuclear y activación de NFAT, otro factor de transcripción, son procesos altamente sensibles a cambios dinámicos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y, en particular, a oscilaciones de Ca^{2+} , debido a que la activación de este factor es dependiente de la proteína calcineurina. En las CMLV, la activación de NFAT favorece la migración y proliferación celular (Kudryavtseva, Aalkjær, & Matchkov, 2013).

En las **Figuras 4 y 5** se muestran los principales transportadores de Ca^{2+} capaces de activar distintos factores de transcripción en el fenotipo contráctil (Figura 4) y proliferativo (Figura 5) de las CMLV respectivamente.

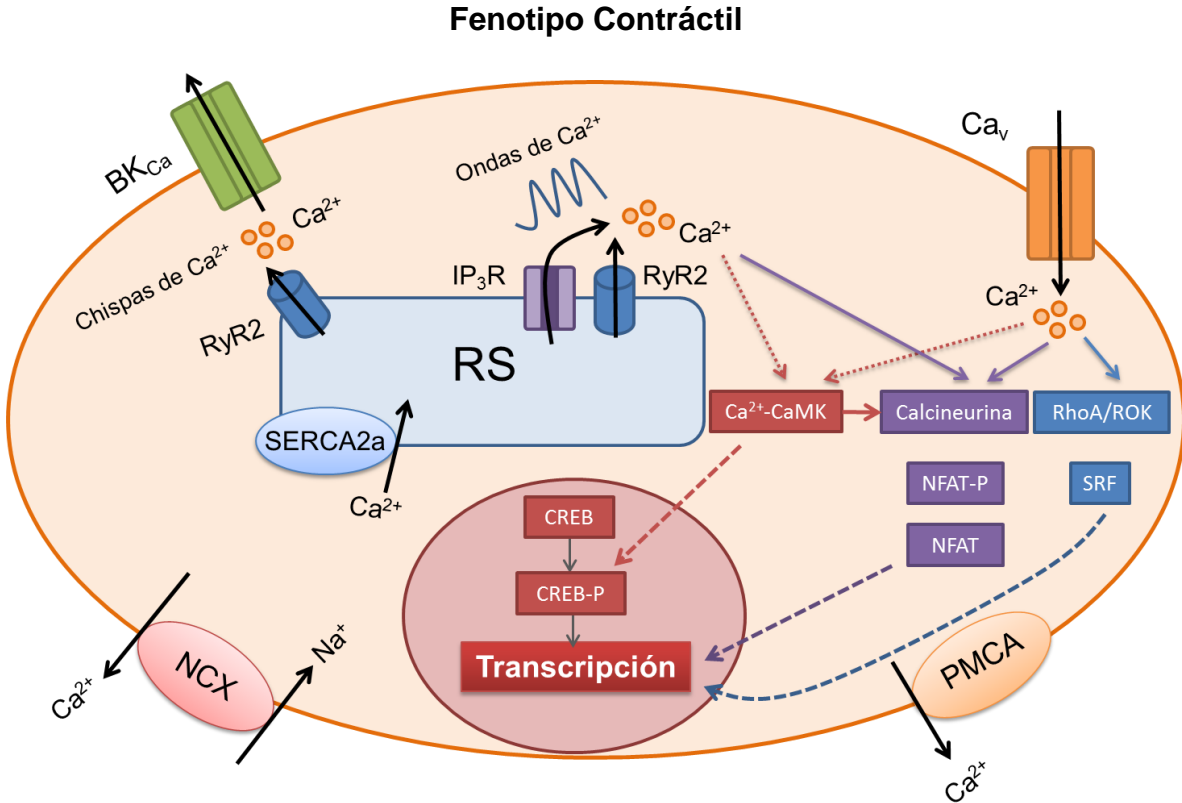


Figura 4. Principales mecanismos que regulan el manejo del Ca^{2+} intracelular y la activación de factores de transcripción en el fenotipo contráctil del músculo liso vascular. Los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes (Ca_v), así como los canales rianodínicos (RyR) y los receptores a IP_3 (IP_3R) constituyen los principales transportadores de Ca^{2+} hacia el medio intracelular en el fenotipo contráctil del músculo liso vascular. La entrada de Ca^{2+} a través de uno o varios de estos mecanismos, es capaz de activar factores de transcripción como CREB, NFAT y SRF, involucrados en el crecimiento celular, la proliferación y la modulación fenotípica.

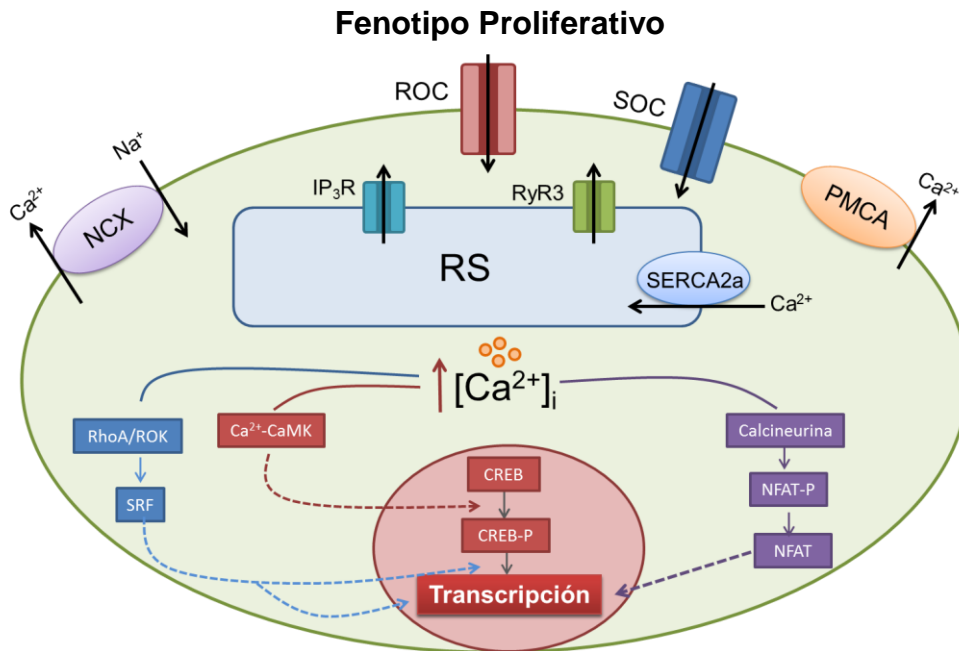


Figura 5. Principales mecanismos que regulan el manejo del Ca^{2+} intracelular y la activación de factores de transcripción en el fenotipo proliferativo del músculo liso vascular. Los canales operados por receptor (ROC), así como los canales operados por almacenes intracelulares (SOC) y los receptores a IP_3 (IP_3R) constituyen los principales transportadores de Ca^{2+} hacia el citosol en el fenotipo proliferativo del músculo liso vascular. Estos, a través de la inducción de un aumento global en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, son capaces de activar factores de transcripción como CREB, NFAT y SRF, involucrados en procesos de migración, proliferación y modulación fenotípica.

Para ambos fenotipos, el contráctil y proliferativo, el Ca^{2+} es una molécula de suma importancia, ya que participa en diversos procesos celulares necesarios para el adecuado funcionamiento de las CMLV.

3.2. Antecedentes Específicos

La disfunción vascular es una condición que tiene estrecha relación con la DM, siendo esta una de las causas que contribuyen al desarrollo de complicaciones importantes y en su mayoría letales en pacientes diabéticos, tales como hipertensión arterial, infarto al miocardio, enfermedad coronaria, nefropatía y retinopatía. Estas complicaciones están relacionadas con una regulación anormal del flujo sanguíneo hacia los distintos órganos y tejidos.

La disfunción vascular es compleja y multifactorial, sin embargo, existen estudios que demuestran la existencia de alteraciones en los diversos

componentes que regulan la homeostasis del Ca^{2+} en las células que conforman los vasos sanguíneos durante la DM, particularmente en CMLV y células endoteliales.

En estudios realizados en cultivos primarios de CMLV de humano y ratón expuestas a altas concentraciones de glucosa, se ha demostrado que existe un incremento en la densidad de corriente de los canales de Ca^{2+} tipo L $\text{Ca}_v1.2$, así como un aumento en la actividad *sparklet* de los mismos, debido a la modulación por PKA (Nystoriak et al., 2017); esto conlleva al desarrollo de hipertrofia y proliferación excesiva de las CMLV, mediante la activación del factor de transcripción NFAT. Se ha demostrado también que en arterias coronarias, así como en CMLV de arteria mesentérica de rata, altos niveles de glucosa afectan la función de los canales K_v , conllevando a una disminución en la corriente de potasio a través de estos, mediante la nitración del canal, teniendo como consecuencia una disminución en la vasodilatación mediada por AMPc (Tykocki, Boerman, & Jackson, 2017). En la línea celular A7r5 de aorta de rata bajo estas mismas condiciones, se encontró que los niveles de Ca^{2+} citosólicos se encuentran disminuidos, así como la amplitud de las respuestas evocadas por vasopresina y taspigargina, debido a una disminución en la expresión y/o función de los receptores IP_3R y la SERCA (Searls, Loganathan, Smirnova, & Stehno-bittel, 2010). En este mismo modelo, se ha visto que existe un incremento en la expresión de los canales RyR así como una redistribución de los mismos desde el RE hacia la membrana nuclear (Tykocki et al., 2017). También se ha reportado que existe un aumento en la actividad y expresión de la PMCA (El-najjar et al., 2017).

Por otro lado, en CMLV de aorta de ratas con DM-1 inducida por streptozotocina (STZ) se ha reportado que existe un incremento en el acoplamiento funcional de los receptores de angiotensina II con los canales de Ca^{2+} tipo L. También existe evidencia de una disminución en la expresión y función de los canales de potasio voltaje-dependientes K_v , y BK_{Ca} , lo cual podría ser un factor importante en el aumento de la reactividad vascular característica de

esta enfermedad (Ko et al., 2010). En arterias coronarias, se ha encontrado que existe una disminución en la vasodilatación inducida por ácido araquidónico, la cual involucra a los canales BK_{Ca} . Asimismo, en CMLV de arteriolas retinales de rata, también se ha encontrado una disminución en la función de los canales BK_{Ca} (Tykocki et al., 2017). En CMLV en fresco de aorta y de arteria femoral de este mismo modelo animal, se ha reportado que existe un aumento en la $[Ca^{2+}]_c$ en reposo, así como una disminución y/o redistribución de las proteínas IP_3R y $SERCA$, lo que conlleva a una reducción en la amplitud de los transientes de Ca^{2+} evocados por vasopresina y a un aumento de la $[Ca^{2+}]_c$ en reposo. Estos efectos, aún más marcados, también se observan en CMLV obtenidas de ratas DR-BB, otro modelo de DM-1 (Searls et al., 2010). Resultados similares fueron obtenidos por Zhu y colaboradores, quienes además de reportar una reducción en la expresión de IP_3R , encontraron disminuida la expresión de los canales RyR , lo cual dio como resultado una disminución en la amplitud de la señal evocada por fenilefrina (Zhu, Chen, Liu, Guan, & Ren, 2008).

En CMLV retinales y de aorta de ratas STZ se ha visto que la SOCE se encuentra disminuida. Esta disminución genera una reducción en la respuesta contráctil de los vasos sanguíneos y es reversible mediante la administración de insulina (Curtis, Major, Trimble, & Scholfield, 2003). Asimismo, en ratones bajo el mismo tratamiento, se ha encontrado un aumento en la actividad de los canales $Ca_v1.2$, mediado por $PI3K\delta$, que conlleva a un estado de hipercontractilidad en anillos de aorta torácica (Pinho, Medeiros, & Capettini, 2010).

En lo que respecta a los modelos experimentales de DM-2, en 2010 Mita y colaboradores demostraron que la contracción inducida por la SOCE en fibras de músculo liso de arteria caudal de ratas Goto-Kakizaki, se encuentra reducida, sin embargo, la expresión de las proteínas $TRPC1$ y $TRPC6$ se ve aumentada en las ratas diabéticas en comparación con su control sano, siendo este último fenómeno responsable de la disminución en la contracción evocada por cirazolina, un agonista de los receptores α_1 -adrenérgicos, debido a la formación de canales heteromultiméricos con propiedades electrofisiológicas distintas (Mita et al., 2010).

En este mismo modelo animal, Evans y colaboradores encontraron que la entrada de Ca^{2+} evocada por angiotensina II está aumentada en las CMLV en cultivo de las ratas diabéticas, debido a un incremento en la actividad de los canales TRPC (Evans, Hee, & Ragolia, 2009).

En CMLV en fresco, provenientes de ratones db/db, se ha demostrado que existe una disminución en la expresión de los canales RyR en modelos animales de ambos tipos de diabetes, que conlleva a una disminución en la frecuencia, duración, amplitud y tamaño de las *chispas de Ca^{2+}* generadas por los mismos, teniendo como consecuencia una incorrecta activación de los canales BK_{Ca} y por ende, una disminución de la vasodilatación (Benitah, 2013). En adición a esto, también se encontró un aumento en la excitabilidad del receptor-canal IP_3R en respuesta a su interacción con la proteína Bcl-x_L en este modelo animal (Velmurugan & White, 2012). Este fenómeno tiene un papel importante en procesos celulares como apoptosis y proliferación.

En 2003, Hill y colaboradores reportaron que, en CMLV disociadas de arterias coronarias de cerdos a los cuales se les indujo DM-2 mediante la ingesta de una dieta hipercalórica y la administración de aloxano, la actividad de la SERCA y de la PMCA se encontró aumentada, removiendo más Ca^{2+} del medio intracelular (Hill, Price, Dixon, & Sturek, 2003). En este mismo modelo, también se encontró que existe un aumento en la vasoconstricción inducida por $\text{PGF}_{2\alpha}$ y una disminución en la dilatación mediada por adenosina, ambas asociadas con una reducción en las chispas de Ca^{2+} y la actividad de los canales BK_{Ca} (Tykocki et al., 2017).

Contrario a lo reportado en la mayoría de los estudios realizados en modelos animales, en venas safenas obtenidas de pacientes con DM-2, tanto la SOCE inducida por la aplicación de ácido ciclopiazónico, como la contracción dependiente de ésta, se encuentran aumentadas. Este efecto se atribuye a un aumento en la expresión del canal TRPC4 (Chung, Yeung, Chum, Okon, & Breemen, 2009).

Hasta el momento, en la rata Zucker Diabetic Fatty, otro modelo animal de DM-2, se ha reportado que existe una disminución en la hiperpolarización inducida por los canales de K^+ de larga conductancia activados por Ca^{2+} (BK_{Ca}) en miocitos de arteria mesentérica y arteria coronaria, lo cual induce un aumento de la reactividad vascular (Burnham, Johnson, & Weston, 2006; Lu et al., 2008)

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el mundo existen más de 422 millones de personas que padecen DM. Nuestro país ocupa el 6to lugar a nivel mundial en número de pacientes diabéticos, siendo la DM-2 la que tiene mayor incidencia. Más del 70% de las muertes generadas por la DM se deben a las complicaciones cardiovasculares que la acompañan, como son hipertensión arterial, aterosclerosis, enfermedad coronaria e infarto al miocardio, entre otras. Actualmente se sabe que existen varios mecanismos por los cuales la DM afecta la función del sistema cardiovascular como lo son la glicosilación de proteínas, el estrés oxidativo y el aumento en la producción de mediadores de la inflamación, dando como resultado la afectación de sus distintos componentes, principalmente el endotelio y el músculo liso vascular.

Aunque la disfunción endotelial ya se ha estudiado ampliamente, es poco lo que se sabe sobre las alteraciones que la DM genera sobre el músculo liso vascular. La mayor parte de los estudios reportados en la literatura se han realizado en CMLV provenientes de líneas celulares cultivadas en un ambiente extracelular con alta glucosa, lo cual no simula de forma efectiva la fisiopatología de esta enfermedad. En lo que respecta los estudios realizados en modelos animales, la mayoría de ellos se han practicado en modelos de DM-1, la cual, es mucho menos frecuente entre la población a comparación de la DM-2. A pesar de que ya se ha reportado en la literatura que la DM-2 altera la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en el músculo liso vascular y que estas alteraciones tienen una estrecha relación con la disfunción vascular, dichos estudios se han centrado en estudiar exclusivamente las alteraciones en la actividad de los mecanismos que

aumentan la $[Ca^{2+}]_i$, como lo son los canales de Ca^{2+} tipo L o los canales RyR, así como la SOCE. Es necesario profundizar más en las investigaciones referentes al tema, especialmente en lo que respecta al funcionamiento de los mecanismos celulares que remueven el Ca^{2+} citosólico (NCX, PMCA y SERCA), empleando un modelo experimental que represente de manera eficaz esta enfermedad, con el fin de comprender con más exactitud cómo la DM-2 genera disfunción vascular y trabajar en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y de prevención. Para esto, formulamos la siguiente pregunta: ¿Cuáles son los efectos de la DM-2 sobre la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en células en cultivo de músculo liso vascular de aorta de ratas de la cepa Zucker Diabetic Fatty?

5. HIPÓTESIS

La Diabetes Mellitus Tipo 2 causa alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} Intracelular en células de músculo liso de aorta de ratas de la cepa Zucker Diabetic Fatty.

6. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de la DM-2 sobre la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en cultivos primarios de células de músculo liso de aorta de ratas Zucker Diabetic Fatty.

5.2. Objetivos Específicos

1. Evaluar el efecto de la DM-2 sobre la señal de Ca^{2+} evocada por ATP en CMLV en cultivo de aorta de rata Zucker Diabetic Fatty.
2. Evaluar el efecto de la DM-2 sobre la señal de Ca^{2+} evocada por ATP en ausencia de Ca^{2+} extracelular en CMLV en cultivo de aorta de rata Zucker Diabetic Fatty.

3. Evaluar el efecto de la DM-2 sobre la entrada de Ca^{2+} operada por almacenes intracelulares (SOCE) en CMLV en cultivo de aorta de rata Zucker Diabetic Fatty.
4. Evaluar el efecto de la DM-2 sobre la actividad de la bomba de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (SERCA) en la señal de Ca^{2+} evocada por ATP en CMLV en cultivo de aorta de rata Zucker Diabetic Fatty.
5. Evaluar el efecto de la DM-2 sobre la actividad de la bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA) en la señal de Ca^{2+} evocada por ATP en CMLV en cultivo de aorta de rata Zucker Diabetic Fatty.
6. Evaluar el efecto de la DM-2 sobre la actividad del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) en la señal de Ca^{2+} evocada por ATP en CMLV en cultivo de aorta de rata Zucker Diabetic Fatty.

7. BIOÉTICA

El procedimiento experimental se llevó a cabo de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, descrita bajo el Título 7 de la Ley General de Salud en Materia de Investigación.” Las ratas estuvieron confinadas en el vivario de la Facultad de Medicina, a cargo de su cuidado estuvo el MVZ Martín Páez Peláez, encargado del mantenimiento, manejo y desecho de los modelos animales de investigación con los que se trabaja en la Facultad de Medicina. Se colocaron en cajas adecuadas para su movilización y adoptamiento de postura según la especie, protegidos de amenazas externas y de escape de los especímenes, con ventilación adecuada, agua y alimento ad libitum, limpios y secos. En el bioterio sólo se manejan roedores como modelos de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999, 5.1.). La eutanasia se realizó por un incremento en la inoculación del anestésico a dosis recomendadas para tal efecto (NOM-062-ZOO-1999, 9.1.). Los cadáveres se concentraron para su recolección en las instalaciones destinadas para tal efecto en la Facultad de Medicina, siguiendo las instrucciones de la NOM-087-ECOL-2002; 4.3.3., 6. y 7.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1. Caracterización del modelo animal

Para llevar a cabo el presente proyecto, se emplearon ratas macho de 3-4 meses de edad de la cepa Zucker Diabetic Fatty en sus dos fenotipos: obeso (OZDF) y delgado (LZDF) como control sano. Las ratas fueron proporcionadas por el bioterio *Claude Bernard* de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, donde fueron mantenidas bajo condiciones ambientales controladas, expuestas a ciclos de luz – oscuridad de 12 hrs con consumo *ad libitum* de agua y alimento.

Para determinar si las ratas en efecto, desarrollaban DM-2, cinco días previos al experimento se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa. Para esto, los animales se sometieron a un ayuno de 6 horas en jaulas metabólicas con libre acceso a agua. Inmediatamente después, se les administró una dosis de glucosa de 2 gr/kg de peso por vía intraperitoneal (NOM-062-ZOO-1999, 9.4.2.1.3.) y 2 horas después se obtuvo una muestra de sangre mediante punción de la vena caudal para medir los niveles de glucosa empleando el sistema Accucheck® (ROCHE).

El día del experimento, se procedió a medir la masa corporal de la rata en gramos, empleando una balanza granataria. También se midió el largo (distancia desde la punta de la nariz hasta la base de la cola) y la circunferencia abdominal, utilizando una cinta métrica. Para descartar que las diferencias observadas en la masa corporal fueran debidas al cambio encontrado en la longitud de las ratas, se calculó el índice de masa corporal empleando la siguiente fórmula:

$$IMC = Masa\ corporal\ (gr) / Longitud\ (cm)^2$$

Asimismo, se obtuvo una muestra de sangre venosa para determinar los parámetros bioquímicos de glucosa basal (método enzimático/hexoquinasa) colesterol total, triglicéridos, HDL, LDL y VLDL (método GOD-PAP); el procedimiento se detalla en el apartado siguiente.

8.2. Aislamiento y cultivo primario de las CMLV

El aislamiento y cultivo de las CMLV se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Berra-Romani y cols. (Berra-Romani, Mazzocco-Spezia, Pulina, & Golovina, 2008) y se detalla a continuación:

Después de un periodo de ayuno de 6 horas, las ratas fueron anestesiadas con una dosis de 0.2 ml/100 gr de peso de ketamina-xilacina. Posteriormente se les realizó una toracotomía bilateral para exponer el cayado aórtico y el corazón. A través de la vena cava inferior, se obtuvo una muestra de sangre de 5 ml, la cual fue transferida a tubos vacutainer sin anticoagulante. Se permitió la formación de un coágulo durante 10 minutos. Una vez ocurrido esto, la sangre fue centrifugada a 10,000 rpm durante 15 minutos a 25°C para separar el suero del paquete globular. Posteriormente, el suero fue transferido a tubos eppendorf de 1 ml para su almacenamiento a 4°C. Las muestras fueron llevadas a un laboratorio de análisis clínicos para la determinación de los parámetros metabólicos previamente mencionados. Una vez que se obtuvo la sangre, el corazón y tejido pulmonar fueron removidos y la aorta torácica fue canulada utilizando una cánula de metal y perfundida con solución fisiológica con baja concentración de Ca^{2+} (PSS1). Finalmente, se aisló la aorta torácica, la cual fue puesta en esta misma solución. A partir de este momento, el resto del procedimiento se realizó bajo la campana de flujo laminar, en condiciones de esterilidad. Posteriormente, se removió el tejido adiposo y conectivo circundante y la arteria fue transferida a una solución de digestión enzimática compuesta por solución PSS1 y 1 mg/ml de colagenasa tipo II. La digestión se llevó a cabo a 37°C por 40 min. Una vez transcurrido este tiempo, se enjuagó la aorta varias veces con solución PSS1 y se removió la túnica adventicia utilizando pinzas de microdissección. Se realizó un corte longitudinal para exponer la túnica íntima del vaso y se removió el endotelio mecánicamente empleando pinzas de microdissección. El tejido se cortó en segmentos de aproximadamente 1 mm x 1 mm y se incubó en otra solución de digestión enzimática cuya composición es: PSS1, albúmina (2 mg/ml), colagenasa tipo XI (2 mg/ml) y elastasa tipo IV (0.16 mg/ml) por ~40 min a 37°C. Una vez transcurrida la

digestión enzimática, se trituró el tejido varias veces para disociar las células utilizando una pipeta Pasteur de vidrio con la punta flameada para evitar dañarlas. Posteriormente, se agregaron 10 ml de medio completo (medio DMEM con 10% de SBF) con el fin de detener la actividad de las enzimas y se separaron las células mediante centrifugación a 300×g durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y las CMLV fueron resuspendidas en 1 ml de medio completo.

Se agregaron de 4-5 gotas de la suspensión de células en cada caja Petri y se dejaron adhiriendo al fondo de la caja por ~25 min a 37°C. Posteriormente se añadieron 2 ml de medio completo a cada caja y se mantuvieron en una incubadora con un ambiente humidificado a 5% CO₂-95% de aire a 37°C por 7 días para realizar experimentos de microfluorimetría. El medio de cultivo se cambió en los días 4 y 6.

8.3. Medición de Ca²⁺ intracelular

Para evaluar la señal de Ca²⁺ intracelular, se empleó el marcador fluorescente de Ca²⁺: Fura-2 acetoximetil éster (Fura-2AM), el cual, una vez que se encuentra en su forma esterificada, se vuelve una molécula lipofílica, la cual atraviesa la membrana plasmática con facilidad. Una vez dentro de la célula, es desesterificado por las esterasas presentes en el citosol, quedando atrapado dentro de la célula. El Fura-2 es un marcador de excitación dual. Su espectro de excitación se encuentra entre los 300 y 400 nm y emite a 510 nm. Al ser excitado a 340 nm, es posible detectar la intensidad de fluorescencia emitida por el colorante unido a Ca²⁺, mientras que si se excita a 380 nm se puede apreciar la fluorescencia emitida por el colorante en su forma libre. De esta manera, se puede calcular la tasa de fluorescencia o *ratio* que consiste en la división de la intensidad de fluorescencia del Fura-2 cuando se excita a 340 nm sobre la intensidad de fluorescencia cuando es excitado a 380 nm, y así monitorear los cambios en la [Ca²⁺]_i. El valor del *ratio* es independiente de la concentración del marcador e intensidad de luz, dándole al Fura-2 gran ventaja sobre otros marcadores fluorescentes.

Otra característica importante de este fluoróforo es la presencia de un *punto isobéptico*: cuando el Fura-2 es excitado a 360 nm, es posible apreciar cambios en la fluorescencia que no son dependientes de la $[Ca^{2+}]$; debido a que a esta longitud de onda, los espectros de excitación del marcador unido a Ca^{2+} (340 nm) y libre (380 nm) coinciden. Además de ser sensible a Ca^{2+} , el Fura-2 también puede unirse a Mn^{2+} , otro catión divalente al cual también son permeables algunos canales que median el paso de Ca^{2+} hacia el interior de la célula. Al unirse a Fura-2, el Mn^{2+} tiene la capacidad de *apagar* (en inglés *quench*) su fluorescencia; dicho fenómeno puede apreciarse cuando el marcador es excitado a 360 nm, su punto isobéptico. Por lo tanto, mediante esta maniobra es posible evaluar la entrada de este Mn^{2+} a la célula y así evaluar la actividad de canales que normalmente introducen Ca^{2+} a la célula, como son los SOC (Lambert, 1999). En la **Figura 6** se muestra el espectro de excitación de Fura-2 en presencia de distintas concentraciones de Ca^{2+} .

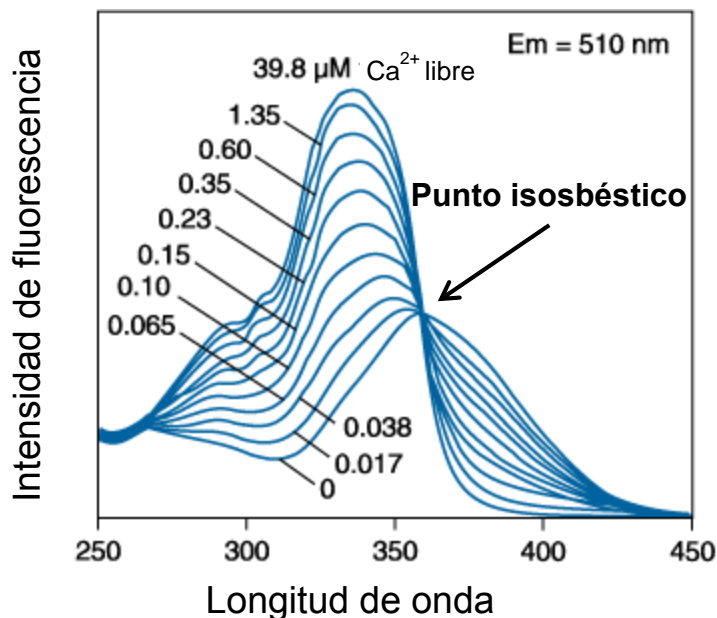


Figura 6. Espectro de excitación del Fura-2 en un rango de soluciones que contienen de 0-39.8 μM de Ca^{2+} . Al excitar a 340 nm es posible apreciar los cambios en la fluorescencia dados por la unión de Fura-2 con Ca^{2+} , mientras que al excitar a 380 nm se aprecian las variaciones dadas por el Fura-2 libre. Asimismo, al excitar a 360 nm, el punto isobéptico del Fura-2, es posible observar cambios en la intensidad de fluorescencia que no son dependientes de Ca^{2+} , permitiendo evaluar la entrada de Mn^{2+} , a través de algunos canales que permiten el paso de Ca^{2+} , como son los SOC. Modificada de Molecular Probes, Inc.

Antes de iniciar el experimento, las CMLV fueron cargadas con Fura-2AM a una concentración de 3 μM en solución fisiológica PSS2 por 35 min. Posteriormente las células fueron enjuagadas en PSS2 por 15 minutos antes de iniciar el experimento. Para monitorear las variaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante el experimento, las CMLV fueron visualizadas en un microscopio de epifluorescencia (Axiolab, Carl Zeiss, Germany) acoplado a una lámpara de mercurio de 100-W como fuente de luz. Los filtros de excitación fueron montados en una rueda gira filtros, equipada con un obturador (Lambda 10, Sutter Instrument, Novato, CA, USA), ambos controlados por computadora. Se alternó la longitud de onda del haz de excitación entre 340 y 380 nm. Un espejo dicróico permitió la separación de los haces de luz de excitación y de emisión hacia un objetivo de inmersión en agua (A Zeiss X63 Achroplan), concentrando el haz de luz sobre la preparación. La luz emitida por la preparación, fue separada con un filtro de emisión de 510 nm, longitud de onda a la que emite el Fura-2, y fue captada por una cámara de alta sensibilidad acoplada al microscopio (Extended-ISIS, Photonic Science, Millham, UK), con la cual se obtuvieron imágenes de las células. Posteriormente, estas imágenes fueron transferidas a una computadora y empleando un software especializado, fue posible seleccionar las regiones de interés o ROI (por sus siglas en inglés); cada una correspondiendo a una célula distinta e identificada por un número. Esto permitió monitorear los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante el experimento, midiendo la tasa de fluorescencia emitida a 510 nm o ratio correspondiente para cada ROI (F_{340}/F_{380}). Un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es equivalente a un incremento en el Ratio (F_{340}/F_{380}). Las mediciones fueron realizadas cada 3 segundos. Los experimentos se llevaron a cabo a una temperatura de 22°C. En la **Figura 7** se muestra un esquema de los componentes del sistema utilizado para la medición de la señal de Ca^{2+} intracelular.

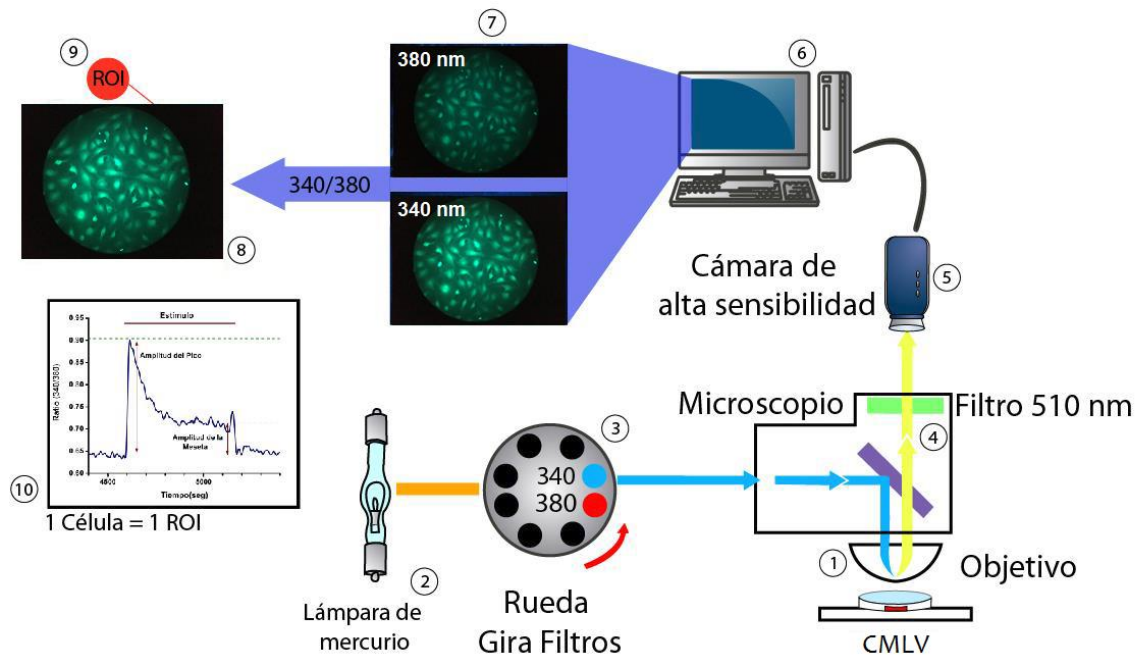


Figura 7. Metodología para medir la señal de Ca^{2+} intracelular. (1) Las CMLV, después de ser cargadas con el fluoróforo sensible a Ca^{2+} Fura-2, son colocadas bajo un objetivo de inmersión para fluorescencia. (2) Una lámpara de mercurio (fuente de luz) emite un haz que es (3) descompuesto en dos longitudes de onda distintas: 340 y 380 nm a las cuales es excitada la preparación. (4) Un espejo dicróico desvía la luz hacia la muestra y la fluorescencia que esta emite lo atraviesa, dirigiéndose hacia un filtro de emisión de 510 nm, donde es filtrada y enviada a una cámara de alta sensibilidad. (5) La cámara captura una imagen cada 3 segundos para cada longitud de onda de excitación. (6) Las imágenes obtenidas son almacenadas en una computadora para su posterior análisis. (7) (8) (9) Empleando el software ImageJ (NIH) se obtiene la tasa de fluorescencia (Ratio 340/380) para cada región de interés (ROI) que equivale a una célula, (10) la cual es graficada en función del tiempo en segundos usando el programa Origin 7.0.

8.4. Protocolo para evaluar la señal de Ca^{2+} intracelular evocada por ATP

El nucleótido adenosin 5'-trifosfato (ATP) es una sustancia, la cual, entre sus múltiples funciones, posee capacidad vasoactiva. Fisiológicamente, en la vasculatura, el ATP es secretado por eritrocitos y células endoteliales en el lumen del vaso y por el músculo liso vascular, así como por terminales nerviosas que lo inervan (Wier & Mauban, 2017). El ATP se considera un co-transmisor, debido a que es secretado junto con el neurotransmisor noradrenalina. A nivel endotelial, es capaz de inducir la producción de óxido nítrico a través de un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, induciendo vasodilatación. Por el contrario, si actúa directamente sobre las CMLV, induce vasoconstricción, de igual forma a través de un mecanismo Ca^{2+} -

dependiente, estimulando la producción de IP_3 y favoreciendo la apertura de los IP_3R , promoviendo así una liberación de Ca^{2+} del RE y activando el acople excitación-contracción. La liberación del ATP puede ser autócrina, o bien, parácrina, y su acción depende del tipo celular sobre el que actúe. Además de ser producido en condiciones fisiológicas, el ATP puede liberarse como consecuencia de estímulos nocivos como hipoxia, y participar en el desarrollo de patologías como hipertensión, hiperemia, proliferación de las CMLV durante la aterosclerosis y restenosis arterial (Lohman, Billaud, & Isakson, 2012). Debido a su capacidad para inducir un aumento en la $[Ca^{2+}]$ en CMLV, así como la relevancia de su función tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, decidimos emplear esta molécula para estudiar la señal de Ca^{2+} intracelular evocada por la misma. Para ello, 500 segundos después de iniciado el experimento, se realizó una aplicación de ATP a una concentración de 300 μM con el fin de inducir un aumento en la $[Ca^{2+}]$. Una vez que la tasa de fluorescencia regresó a sus niveles iniciales (~800 segundos después), se procedió a lavar las CMLV con solución PSS2. El experimento finalizó 300 segundos después del lavado.

Este mismo protocolo también se realizó en ausencia de Ca^{2+} extracelular. Para ello, 500 segundos después de iniciar el experimento, se removió el Ca^{2+} del medio extracelular. 200 segundos después de esto, se procedió a estimular con ATP a una concentración de 300 μM , aún en ausencia de Ca^{2+} extracelular. Una vez transcurridos 800 segundos desde la aplicación, las CMLV se lavaron con PSS2, restableciendo así la concentración de Ca^{2+} intracelular.

8.5. Protocolo para evaluar la SOCE

El ácido ciclopiazónico (CPA) es una micotoxina proveniente de *Penicillium cyclopium*, a la cual se le ha atribuido la capacidad de bloquear la bomba SERCA, cuando se usa a una concentración de 10 μM (Lodola et al., 2012).

Con el fin de evaluar la entrada de Ca^{2+} operada por almacenes intracelulares (SOCE), se procedió a realizar el protocolo que se detalla a continuación: 500 segundos después de iniciado el experimento, se removió el

Ca^{2+} extracelular y, 200 segundos después se aplicó CPA, bloqueando así la SERCA y favoreciendo la salida de Ca^{2+} del RE a través de canales de fuga presentes en la membrana de este organelo, lo que provocó su vaciamiento (Albert, Saleh, Peppiatt-Wildman, & Large, 2007). Para comprobar que el RE se haya vaciado completamente, se hizo una aplicación de ATP a una concentración de 300 μM , 25 minutos después de haber aplicado CPA, a la cual no debió haber respuesta. Posteriormente se restablecieron los niveles de Ca^{2+} extracelular, pudiendo apreciar así la entrada de Ca^{2+} a través de los canales SOC. La señal obtenida como consecuencia de este último evento, corresponde a la SOCE.

8.6. Quenching del Fura-2 por Mn^{2+} para evaluar la SOCE

Aunque son altamente selectivos para Ca^{2+} , los canales SOC también son permeables a otros cationes divalentes, entre ellos Mn^{2+} . El Mn^{2+} es capaz de unirse al Fura-2 y *apagar* (de ahí el término *quenching*) la fluorescencia que este emite. Es posible detectar este apagado cuando el fluoróforo es excitado a 360 nm, su punto isobéptico (Lambert, 1999; Zuccolo et al., 2016). Utilizando este método, se puede detectar la entrada de Mn^{2+} a través de los canales SOC y así evaluar su funcionamiento. Para llevar a cabo este protocolo, durante todo el experimento, se empleó una longitud de onda de excitación de 360 nm. 500 segundos después de haber iniciado el experimento, se removió el Ca^{2+} del medio extracelular. Posteriormente se aplicó CPA a una concentración de 10 μM para vaciar el RE. ~25 minutos después se aplicó una solución libre de Ca^{2+} extracelular suplementada con 100 μM de MnCl_2 , la cual indujo el apagado de la fluorescencia, debido a la entrada de Mn^{2+} a través de los canales SOC.

8.7. Inhibición farmacológica de los mecanismos que remueven el Ca^{2+} intracelular

Con el fin de evaluar el funcionamiento de los mecanismos de remoción de Ca^{2+} intracelular (NCX, PMCA y SERCA) durante el transiente de Ca^{2+} evocado por ATP, se emplearon los siguientes inhibidores selectivos: SEA0400 para el NCX, Ortovanadato de sodio para la PMCA y CPA para la SERCA. Todos los

protocolos fueron realizados tanto en presencia como en ausencia de Ca^{2+} del medio extracelular.

Para evaluar la función del NCX, una vez iniciado el experimento, las CMLV fueron incubadas con 3 μM de SEA0400 por 5 minutos. Posteriormente se aplicó ATP a una concentración de 300 μM en presencia del inhibidor (Matsuda et al., 2001; J. Zhang et al., 2010)

En lo que respecta a la PMCA, las CMLV fueron incubadas con 500 μM de Ortovanadato de sodio por 10 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se aplicó ATP a 300 μM en presencia del inhibidor (Nakano, Koujin, Suda, Hiraoka, & Haraguchi, 2009; W. B. Zhang & Kwan, 2016).

Finalmente, para evaluar el funcionamiento de la SERCA, se aplicaron 10 μM de CPA y 300 μM de ATP simultáneamente. El CPA no fue preincubado debido a que dicho inhibidor por sí mismo induce un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y tiene la capacidad de vaciar el RE (Annunziato, 2013).

8.8. Análisis de resultados

Para obtener la tasa de fluorescencia, elaborar las gráficas y analizar los resultados, se emplearon los programas ImageJ, Micrococcal Origin 7.0 y GraphPad Prism 6.0 respectivamente. Para el análisis estadístico, se llevó a cabo la prueba t-test no pareada con un valor de $p \leq 0.05$. Los datos obtenidos fueron expresados como promedio \pm error estándar (ES). Se empleó una n mínima de 4 ratas por protocolo experimental y por grupo de estudio. Los parámetros que se midieron en los registros de la señal de Ca^{2+} intracelular en los distintos protocolos fueron los siguientes (**ver Figura 8**):

- **Basal:** Media de los valores de fluorescencia previos a la aplicación del agonista, estimada dentro del intervalo que va del tiempo 0 hasta la aplicación del agonista ATP (aproximadamente 500 seg después de iniciado el experimento).

- **Basal Ca 0:** Media de los valores de fluorescencia posteriores a la remoción del Ca^{2+} del medio extracelular y previo a la estimulación con el agonista (aproximadamente 200 seg).
- **Amplitud:** Diferencia entre el valor máximo de fluorescencia después de la aplicación del agonista y el valor previo a la estimulación.
- **Amp600:** Diferencia entre el valor basal y el valor máximo de fluorescencia obtenido 600 segundos posteriores a la aplicación de ATP y que corresponde a la fase tardía de la decaída del transiente o bien fase conocida como meseta.
- **Tiempos de decaída (TD) (90, 60 y 30%):** Tiempo (expresado en segundos) que tarda la señal en decaer al 90, 60 y 30% de su amplitud máxima (100%).
- **Área bajo la curva (AUC):** Área que se encuentra por debajo de una función graficada, en este caso, la tasa de fluorescencia obtenida desde que se aplica el agonista hasta que se remueve. Se obtuvo calculando la integral de ésta

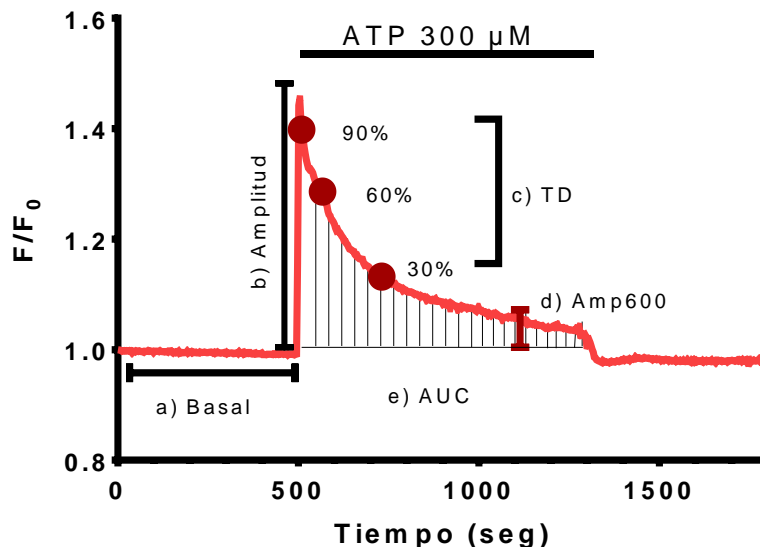


Figura 8. Parámetros medidos de la señal de Ca^{2+} evocada por ATP ($300 \mu\text{M}$) en CMLV. a) Niveles basales de fluorescencia previos a la aplicación del agonista, b) amplitud de la respuesta evocada por la aplicación del agonista, que es la diferencia entre el punto más alto de fluorescencia y la basal, c) tiempo que tarda la señal de Ca^{2+} en decaer al 90, 60 y 30% de su amplitud (100%), d) amplitud de la señal de Ca^{2+} , 600 seg posteriores a la aplicación del agonista y e) área bajo la curva.

Con el fin de sobreponer los registros de la señal de Ca^{2+} y de esta forma, poder apreciar las diferencias entre ambos grupos experimentales, el valor de Ratio fue normalizado empleando la fórmula F/F_0 ; donde F es igual al valor de fluorescencia y F_0 equivale al valor de fluorescencia en condiciones basales, previo a la estimulación con el agonista.

En lo que respecta al protocolo de quenching del Fura-2 por Mn^{2+} , la señal se ajustó a una regresión lineal y se midió la pendiente de esta, con el fin de evaluar la velocidad de entrada del Mn^{2+} a través de los canales SOC.

Finalmente, para poder realizar la comparación estadística entre grupos de los resultados obtenidos en presencia de los inhibidores de los mecanismos de remoción de Ca^{2+} , procedimos a normalizar los datos dividiendo el valor del parámetro medido en la señal de Ca^{2+} evocada por ATP en presencia del inhibidor de cada célula de un grupo experimental entre la media de los valores de dicho parámetro, determinada en ausencia del inhibidor dentro del mismo grupo experimental. Por ejemplo:

$$AN = AI (U.A.) / \bar{x}A (U.A.)$$

Dónde:

AN: valor de amplitud normalizado

AI: valor de amplitud en presencia del inhibidor

$\bar{x}A$: media de los valores de amplitud en ausencia del inhibidor

8.9. Soluciones

Para el aislamiento de las CMLV, así como las mediciones de la señal de Ca^{2+} intracelular, se emplearon diversas soluciones fisiológicas, cuya composición en mmol/L se detalla a continuación.

- PSS1 – Solución salina fisiológica con baja concentración de Ca^{2+} : 140 NaCl, 5.36 KCl, 0.34 Na_2HPO_4 , 0.44 KH_2PO_4 , 10 HEPES, 1.2 MgCl_2 , 10 D-glucosa y 0.05 CaCl_2 con un pH ajustado a 7.2.

- PSS2 – Solución salina fisiológica: 140 NaCl, 5 KCl, 1.2 NaH₂PO₄, 5 NaHCO₃, 10 HEPES, 1.4 MgCl₂, 1.8 CaCl₂ y 11.5 D-glucosa con un pH ajustado a 7.4.
- PSS2 Ca⁰ – Solución salina fisiológica libre de Ca²⁺ intracelular: 140 NaCl, 5 KCl, 1.2 NaH₂PO₄, 5 NaHCO₃, 10 HEPES, 1.4 MgCl₂, 1.8 CaCl₂, 11.5 D-glucosa y 0.05 EGTA con un pH ajustado a 7.4.

9. RESULTADOS

9.1. Parámetros morfométricos y bioquímicos

En la **Figura 9** se muestra una fotografía de dos ratas de 3-4 meses de edad correspondientes al grupo OZDF (izquierda) y LZDF (derecha), en las cuales se puede observar a simple vista, las diferencias morfométricas de estos dos grupos experimentales.

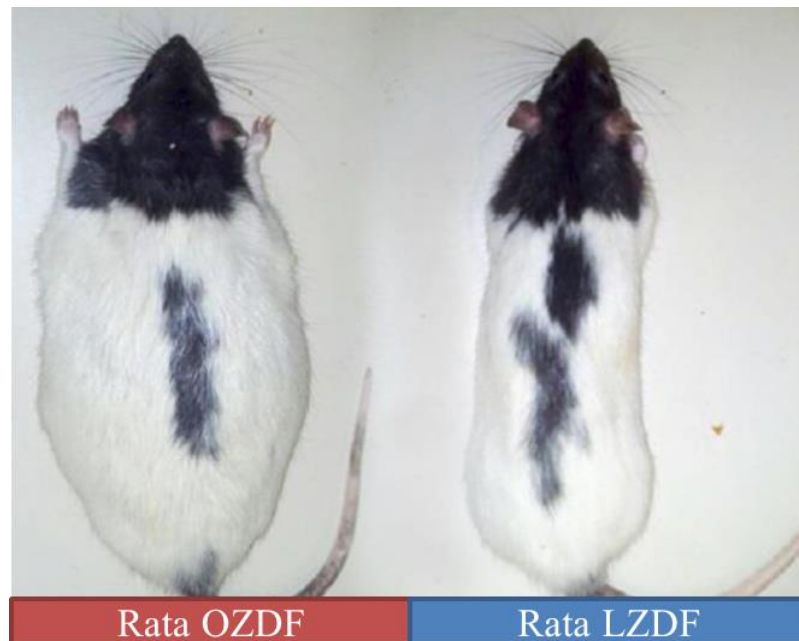


Figura 9. Fotografía de dos ratas de 3-4 meses de edad, correspondientes a las cepas OZDF (izquierda) y LZDF (derecha). Las ratas OZDF presentan claras diferencias morfométricas en comparación a su control sano (LZDF).

En la **Tabla 2** se muestra la media \pm el error estándar (ES) de los parámetros morfométricos y bioquímicos obtenidos para ambos grupos de estudio. Como lo demuestra el análisis estadístico, las ratas OZDF presentaron un aumento significativo del: 66% en la masa corporal (LZDF: 297.8 ± 3.87 gr vs OZDF: 494.3 ± 5.86 gr); 7% de la longitud nariz-cola (LZDF: 22.19 ± 0.25 cm vs OZDF: 23.64 ± 0.36 cm); 28% en la circunferencia abdominal (LZDF: 13.35 ± 0.15 cm vs OZDF: 17.13 ± 0.27 cm), 405% en la grasa epididimal (LZDF: 2.50 ± 0.15 gr vs OZDF: 12.63 ± 0.72 gr) y 45% en el valor del IMC (LZDF: 0.6059 ± 0.01 gr/cm² vs OZDF: 0.8804 ± 0.02 gr/cm).

En lo que respecta a las pruebas bioquímicas, se encontró que las ratas OZDF presentaron un incremento significativo respecto a LZDF de un 60% en los niveles de glucosa basal (LZDF: 254.8 ± 25.48 , OZDF: 407.6 ± 35.94); 91% en los niveles de glucosa en sangre 2 hrs posteriores a la administración de 2 gr/kg de peso de glucosa por vía intraperitoneal (LZDF: 122.10 ± 6.43 vs OZDF: 232.8 ± 27.31), 47% en colesterol (LZDF: 90.83 ± 12.22 , OZDF: 133.1 ± 11.79); 200 % en VLDL (LZDF: 11.53 ± 3.619 , OZDF: 34.53 ± 3.94) y 343 % en triglicéridos (LZDF: 42.00 ± 10.35 , OZDF: 186.1 ± 23.04). No se hallaron diferencias significativas en los niveles de HDL (LZDF: 61.60 ± 3.01 , OZDF: 72.06 ± 8.21) y LDL (LZDF: 26.48 ± 12.09 , OZDF: 35.64 ± 13.26).

Parámetros Morfométricos		
	LZDF	OZDF
Masa corporal (gr)	297.8 ± 3.87	494.3 ± 5.86*
Longitud (cm)	22.19 ± 0.25	23.64 ± 0.36*
Circunferencia abdominal (cm)	13.35 ± 0.15	17.13 ± 0.27*
Grasa epididimal (gr)	2.50 ± 0.15	12.63 ± 0.72*
IMC (gr/cm ²)	0.6059 ± 0.01	0.8804 ± 0.02*
Parámetros Bioquímicos (mg/dL)		
Glucosa Basal	254.8 ± 25.48	407.6 ± 35.94*
Glucosa 2h	122.1 ± 6.43	232.8 ± 27.31*
Colesterol	90.83 ± 12.22	133.1 ± 11.79*
HDL	61.60 ± 3.01	72.06 ± 8.21
LDL	26.48 ± 12.09	35.64 ± 13.26
VLDL	11.53 ± 3.61	34.53 ± 3.94*
Triglicéridos	42.00 ± 10.35	186.1 ± 23.04*

Tabla 2. Parámetros morfométricos y bioquímicos de las ratas LZDF y OZDF. Media ± error estándar de cada uno de los parámetros morfométricos evaluados: masa corporal, longitud, circunferencia abdominal, grasa epididimal e índice de masa corporal (IMC), así como los parámetros bioquímicos: glucosa basal (hexoquinasa), glucosa 2 hr (Accuchek® ROCHE), HDL, LDL, VLDL y Triglicéridos (GOD-PAP) para ambas cepas de rata. La comparación entre cepas se realizó empleando la prueba estadística t-test con un valor de $p \leq 0.05$. “*” equivale a la existencia de una diferencia significativa. Se empleó una n mínima de 5 ratas por grupo experimental.

9.2 Efecto de la DM-2 sobre la señal de Ca^{2+} intracelular evocada por ATP en CMLV en cultivo de aorta de rata

En la **Figura 10A**, se muestran las medias de la señal de Ca^{2+} evocada por la aplicación de 300 μ M del agonista ATP en células de musculo liso vascular en cultivo obtenidas de ratas LZDF (línea azul) y OZDF (línea roja). No se encontraron diferencias significativas en los valores de la amplitud del pico (LZDF: 0.7324 ± 0.03 vs OZDF: 0.6860 ± 0.03) (**Figura 10B, izquierda**) y área bajo la curva (LZDF: 132.3 ± 10 vs OZDF: 134.3 ± 8.42) (**Figura 10D**) entre los dos grupos experimentales. Sin embargo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la fase de decaída de la $[Ca^{2+}]_i$ hacia los niveles de Ca^{2+} basales.

Con la finalidad de describir las alteraciones causadas por la DM-2 sobre esta fase de decaída, se procedió a clasificarlas como: a) alteraciones en la etapa temprana y b) alteraciones en la etapa tardía de la decaída del transiente. Las alteraciones en la etapa temprana se evaluaron cuantificando los tiempos que tarda la señal de Ca^{2+} en decaer al 90, 60 y 30% de su amplitud, mientras que las correspondientes a la etapa tardía se evaluaron midiendo la amplitud del transiente 600 segundos después de la aplicación de ATP (Amp600). La amplitud correspondiente a la etapa tardía de la decaída (Amp600) se encontró aumentada significativamente por un 695% en el grupo OZDF (LZDF: 0.0161 ± 0.01 vs OZDF: 0.128 ± 0.01) (**Figura 10B, derecha**) con respecto a las ratas LZDF. Esto se puede apreciar en los registros, como un aumento sostenido de la señal por encima de los niveles basales (meseta) claramente mayor en ratas OZDF. En la **Figura 10C** se muestran los tiempos de decaída del transiente de Ca^{2+} evocado por ATP 300 μM , donde se puede apreciar que en la rata OZDF se redujeron de forma significativa los tiempos de decaída en la etapa temprana del transiente, al 90% (LZDF: 6.856 ± 0.50 ; OZDF: 4.855 ± 0.21) y al 60% (LZDF: 71.12 ± 6.19 ; OZDF: 40.07 ± 4.03) al compararlo con el obtenido de CMLV provenientes de ratas LZDF. No se observaron diferencias significativas en el tiempo de decaída al 30% entre grupos (LZDF, 174.0 ± 8.54 ; OZDF, 174.3 ± 11.28) (**Figura 10C**).

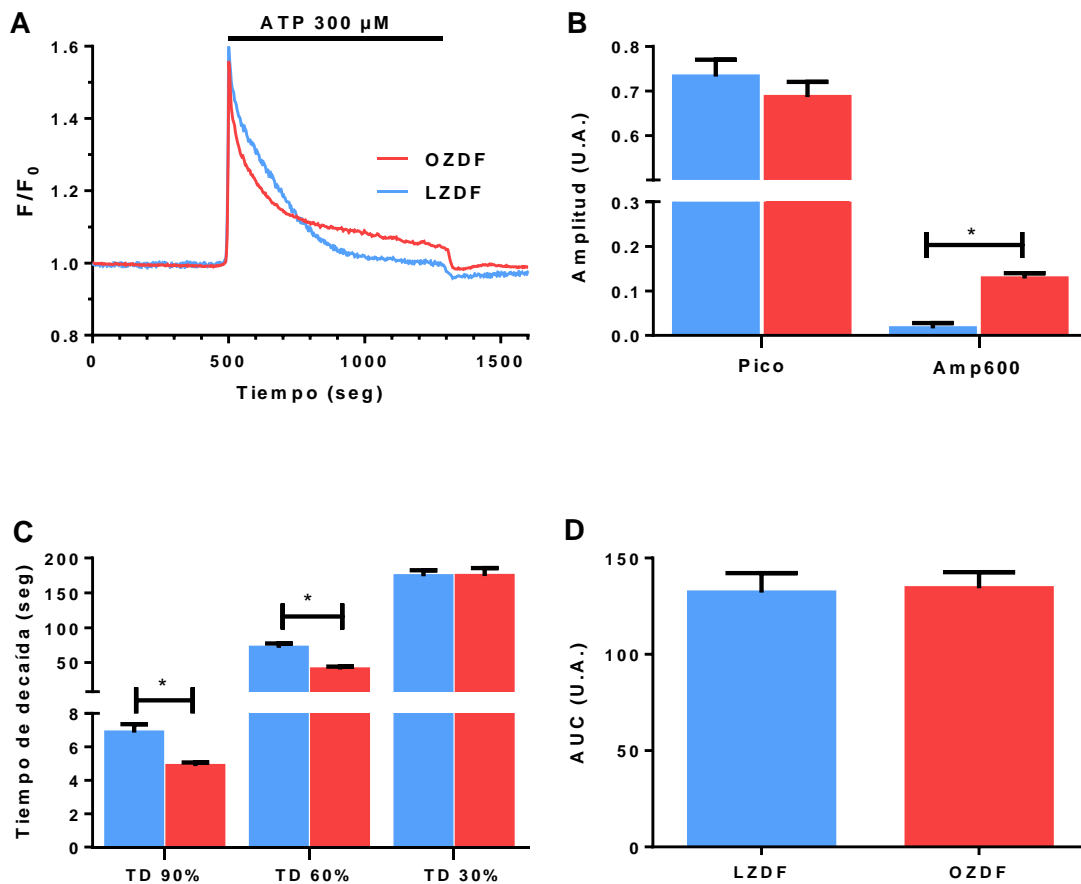


Figura 10. Efecto de la DM-2 sobre la señal de Ca²⁺ evocada por ATP en CMLV. Registros medios de la señal de Ca²⁺ evocada por ATP (300 μ M) en CMLV en cultivo, obtenidas de aorta de ratas LZDF (azul) y OZDF (rojo) **(A)**. Media \pm ES de: amplitud del pico **(B, izquierda)**, amplitud 600 seg después de la aplicación del agonista (Amp600) **(B, derecha)**, tiempo de decaída del transiente de Ca²⁺ evocado por ATP **(C)** y área bajo la curva (AUC) **(D)**. Para fines comparativos, los registros fueron normalizados empleando la fórmula F/F₀. La comparación estadística entre grupos se realizó empleando la prueba estadística t-test (n=6 por grupo experimental, * = p \leq 0.05). Las barras azules corresponden a los valores obtenidos de CMLV de ratas LZDF y las barras rojas los obtenidos de ratas OZDF.

9.3 Efecto de la DM-2 sobre la señal de Ca^{2+} intracelular evocada por ATP en ausencia de Ca^{2+} extracelular en CMLV en cultivo de aorta de rata

En la **Figura 11** se muestra la media de los registros de la señal de Ca^{2+} , registrada de CMLV en cultivo obtenidas de aortas de ratas LZDF (panel A) y OZDF (panel D) en respuesta a la aplicación del agonista ATP (300 μM) en presencia (línea punteada) y ausencia (línea continua) de Ca^{2+} en el medio extracelular.

Al remover el Ca^{2+} del medio extracelular, en CMLV de rata LZDF se observó una disminución en los valores de amplitud (0.7466 ± 0.03 vs 0.6529 ± 0.02) (**Figura 11B, izquierda**), área bajo la curva (AUC) (132.3 ± 10 vs 57.94 ± 3.13) (**Figura 11B, derecha**), tiempo de decaída al 90% (6.624 ± 0.49 vs 4.57 ± 0.27), 60% (70.17 ± 6.08 vs 28.35 ± 1.43) y 30% (168.4 ± 8.51 vs 80.39 ± 3.20) respecto a su control en presencia de Ca^{2+} extracelular (**Figura 11C**).

En lo que respecta a las CMLV provenientes de rata OZDF, el comportamiento fue similar a lo observado en el grupo LZDF. Tanto la amplitud (0.6742 ± 0.04 vs 0.5783 ± 0.01) (**Figura 11E, izquierda**), como el AUC (132 ± 8.39 vs 48.97 ± 1.85) (**Figura 11E, derecha**) y los tiempos de decaída al 60% (39.99 ± 4.03 vs 28.35 ± 1.43) y al 30% (173 ± 11.23 vs 80.39 ± 3.20) se redujeron cuando se removió el Ca^{2+} extracelular (**Figura 11F**).

Esta información nos permite señalar que, tanto en células provenientes de ratas LZDF como en aquellas que provienen de ratas OZDF, la remoción de Ca^{2+} extracelular genera una disminución tanto en amplitud como en duración del transiente evocado por ATP (300 μM), así como la desaparición de la fase de meseta, permitiéndonos aseverar que ésta última es dependiente de mecanismos que permiten la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular hacia el citoplasma.

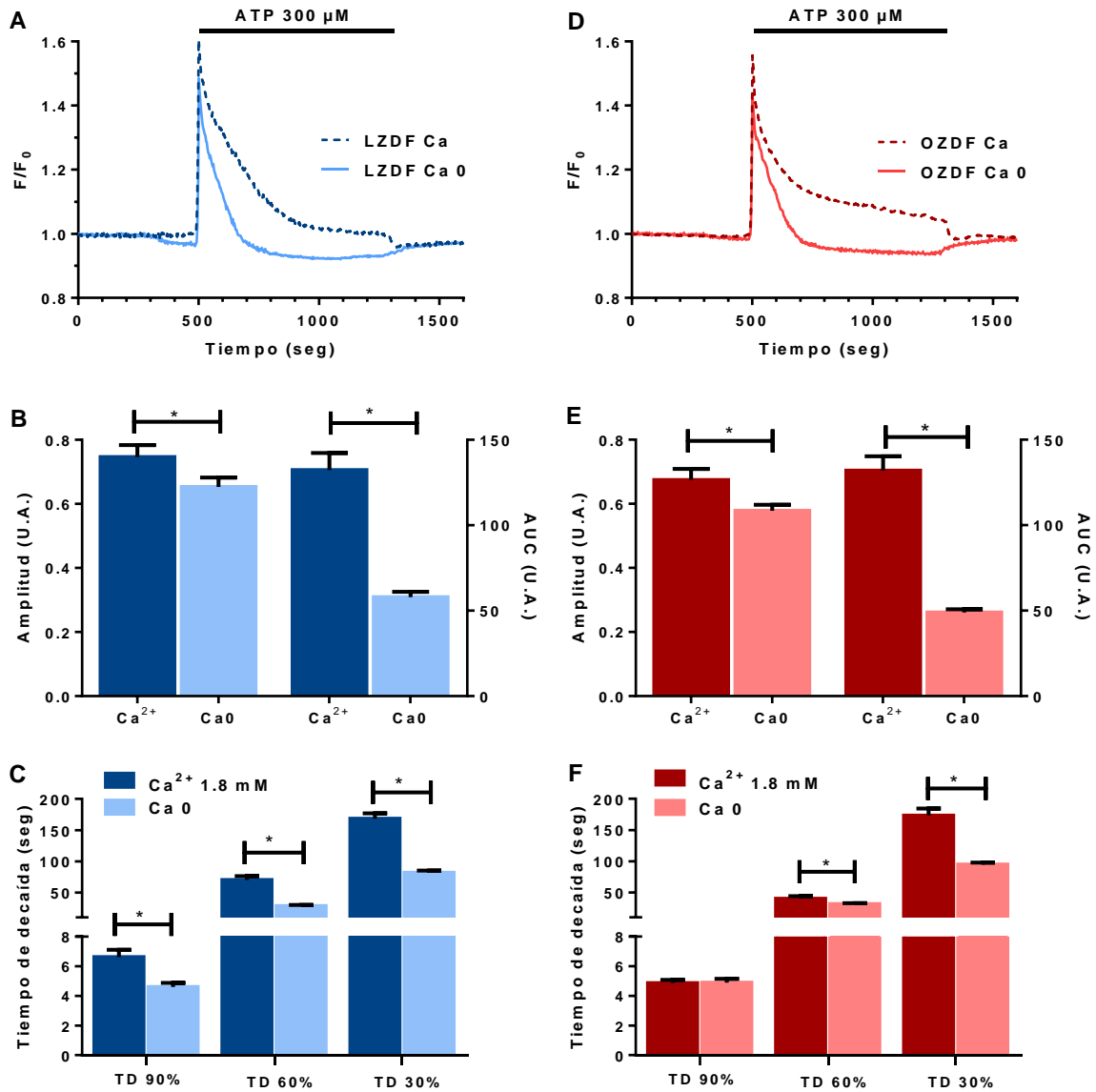


Figura 11. Efecto de la remoción del Ca^{2+} extracelular sobre la señal de Ca^{2+} evocada por ATP en CMLV. Registros medios de la señal de Ca^{2+} evocada por ATP ($300 \mu M$) en presencia (línea punteada) y ausencia (línea continua) de Ca^{2+} extracelular en CMLV en cultivo obtenidas de aorta de rata LZDF (azul) (A) y OZDF (rojo) (D). Media \pm ES de: amplitud (B, izquierda), área bajo la curva (AUC) (B, derecha) y tiempo de decaída de la señal de Ca^{2+} (C) para el grupo LZDF así como de amplitud (E, izquierda), AUC (E, derecha) y tiempos de decaída (F) para el grupo OZDF del transiente de Ca^{2+} evocado por ATP. Para fines comparativos, los registros fueron normalizados empleando la fórmula F/F_0 . La comparación entre grupos se realizó empleando la prueba estadística t-test ($n=6$ por protocolo experimental, $*$ = $p \leq 0.05$). Las barras azules corresponden a los valores obtenidos de CMLV de ratas LZDF y las barras rojas corresponden a los obtenidos de ratas OZDF.

Con la finalidad de comparar mejor la respuesta a ATP en ausencia de Ca^{2+} en el medio extracelular, en la **Figura 12A** se muestran las medias de los registros de la señal de Ca^{2+} evocada por ATP (300 μM), en ausencia del ion antes mencionado, correspondientes a los grupos LZDF y OZDF. Bajo estas condiciones, se puede observar que existe una reducción significativa tanto en la amplitud (LZDF, 0.6529 ± 0.02 ; OZDF, 0.5783 ± 0.01) como en el área bajo la curva (LZDF, 57.94 ± 3.13 ; OZDF, 48.97 ± 1.85) de la señal en las células provenientes de ratas OZDF en comparación a su control sano (**Figura 12B**). Respecto a la duración del transiente, no encontramos diferencias al 90% (LZDF, 4.57 ± 0.27 ; OZDF, 4.894 ± 0.26) ni al 60% (LZDF, 28.35 ± 1.43 ; OZDF, 31.33 ± 1.56), sino hasta que la señal decayó al 30% de su amplitud total, alargándose aproximadamente un 16% en OZDF en comparación al grupo control (LZDF, 80.39 ± 3.2 ; OZDF, 94.69 ± 3.21) (**Figura 12C**).

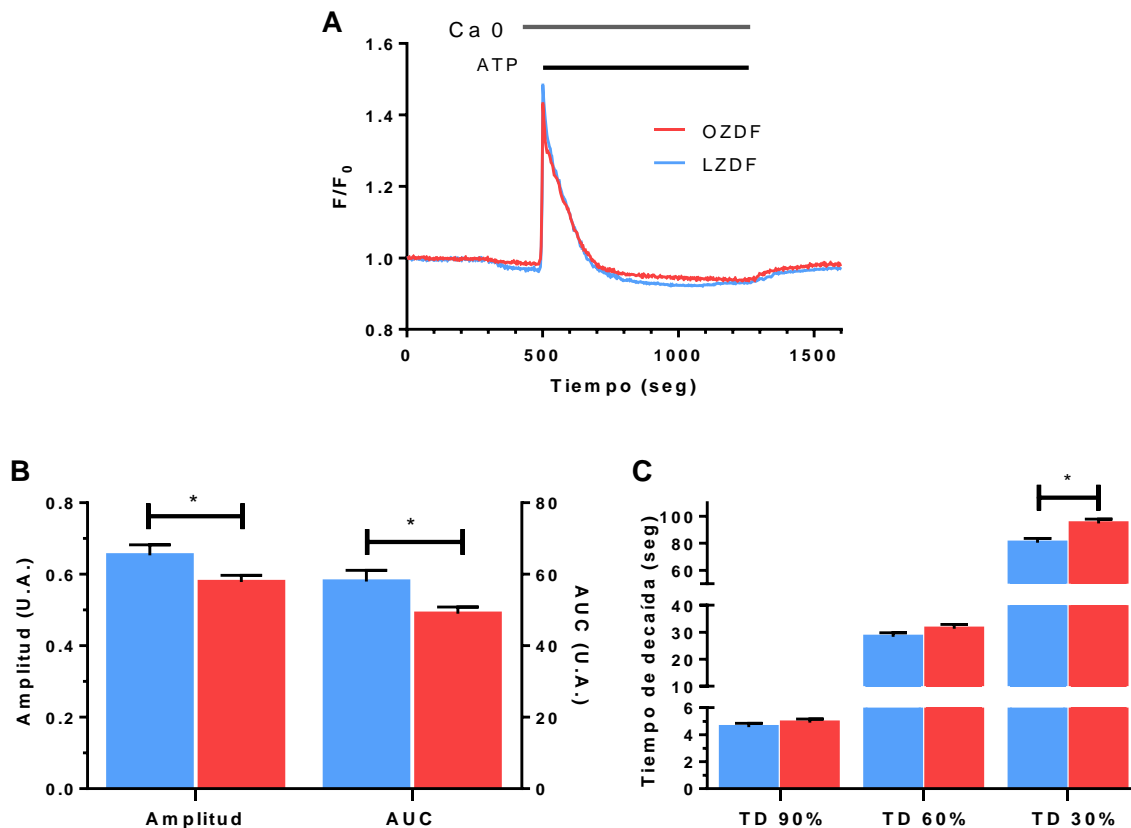


Figura 12. Efecto de la DM-2 sobre la señal de Ca²⁺ evocada por ATP en CMLV en ausencia de Ca²⁺ extracelular. Registros medios de la señal de Ca²⁺ evocada por ATP (300 μ M) de CMLV en cultivo obtenidas de aorta de rata LZDF (azul) y OZDF (rojo) en ausencia de Ca²⁺ extracelular (**A**). Media \pm ES de: amplitud (**B, izquierda**), área bajo la curva (AUC) (**B, derecha**) y tiempo de decaída del transiente de Ca²⁺ evocado por ATP (**C**). Para fines comparativos, los registros fueron normalizados empleando la fórmula F/F₀. La comparación entre grupos se realizó empleando la prueba estadística t-test (n=6 por grupo experimental, * = p \leq 0.05). Las barras azules corresponden a los valores obtenidos de CMLV de ratas LZDF y los rojos corresponden a los obtenidos de ratas OZDF.

En resumen, los resultados hasta aquí presentados confirman nuestra hipótesis de trabajo: la DM-2 causa alteraciones en la homeostasis del Ca²⁺ intracelular en células de músculo liso de aorta de rata estimuladas con ATP (300 μ M). En particular la DM-2 causa una aceleración de la etapa temprana de la decaída del transiente e incrementa considerablemente la amplitud de la etapa tardía del mismo (meseta). Dado a que estos efectos se observan solo en presencia de Ca²⁺ en el medio extracelular (**Figura 10**) y no en ausencia de Ca²⁺ (**Figuras 11 y 12**), podemos confirmar que la DM-2 altera los mecanismos encargados de regular el manejo del Ca²⁺ que proviene del medio extracelular.

Uno de los mecanismos encargados de introducir Ca^{2+} a la célula es la SOCE, la cual es activada como consecuencia del vaciamiento del RE en respuesta a la estimulación con agonistas que inducen la liberación de Ca^{2+} de este almacén intracelular. La siguiente parte de esta tesis consistió en evaluar el funcionamiento de la SOCE en CMLV de aorta de rata.

9.4. Efecto de la DM-2 sobre la entrada de Ca^{2+} operada por almacenes intracelulares (SOCE) en CMLV en cultivo de aorta de rata

En la **Figura 13A** se muestran las medias de los registros de la señal de Ca^{2+} de CMLV en cultivo de aorta de ratas LZDF (azul) y OZDF (rojo) al someter a las CLMV al protocolo para activar la SOCE. Como se detalla en material y métodos, este protocolo consiste en inducir el vaciamiento de los almacenes intracelulares de Ca^{2+} (i.e. RE) utilizando ácido ciclopiazónico (CPA) un inhibidor selectivo de la SERCA, la bomba de Ca^{2+} presente en la membrana del RE. Al aplicar CPA (10 μM) en ausencia de Ca^{2+} extracelular, se puede observar un aumento transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Este aumento transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ corresponde a la fuga pasiva de Ca^{2+} del RE hacia el citoplasma a través de canales permanentemente abiertos y presentes en la membrana de este organelo y dado a que la SERCA se encuentra inhibida por el CPA, el ion Ca^{2+} que se fuga del RE no puede ser recapturado, lo que conlleva finalmente al vaciamiento del RE. Por otra parte la sucesiva disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en la continua ausencia de Ca^{2+} extracelular y presencia de CPA, es debida a la remoción de Ca^{2+} desde el interior de la célula hacia el medio extracelular por la PMCA y el NCX. Posteriormente, después del vaciamiento del RE, en la presencia de CPA, se agrega Ca^{2+} al medio extracelular y se puede observar un rápido aumento de la señal de Ca^{2+} , correspondiente a la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular hacia el interior de la célula a través de los canales de Ca^{2+} operados por los almacenes intracelulares de Ca^{2+} , en el proceso conocido como SOCE generando una señal compuesta de una fase de ascenso rápida, seguida de una fase sostenida de decaída lenta, que no regresa a los niveles basales.

Respecto a la señal evocada por CPA, y que corresponde a la fuga de Ca^{2+} del RE, no se encontraron diferencias en amplitud (LZDF, 0.2448 ± 0.012 ; OZDF, 0.2655 ± 0.01) (**Figura 13B, izquierda**) área bajo la curva (LZDF, 121.4 ± 6.07 ; OZDF, 130.1 ± 5.67) (**Figura 13B, derecha**) ni tiempos de decaída al 90 (LZDF, 10 ± 1.44 ; OZDF, 11.55 ± 1.34) y al 30% (LZDF, 314.4 ± 10.45 ; OZDF, 340.4 ± 8.55) (**Figura 13C**). Sin embargo, el tiempo que tardó en decaer la señal al 60% de su amplitud se encontró aumentado significativamente en el grupo OZDF (158.5 ± 6.64) respecto a LZDF (124.4 ± 6.85) (**Figura 13C**).

Por otro lado, en lo que respecta a la SOCE, no se encontraron diferencias en amplitud entre los dos grupos (LZDF, 0.4122 ± 0.01 ; OZDF, 0.3794 ± 0.01) (**Figura 13D, izquierda**) ni en el tiempo de decaída al 90% (LZDF, 24.9 ± 3.02 ; OZDF, 19.29 ± 2.51) (**Figura 13E**). Sin embargo, el área bajo la curva se encontró disminuida significativamente para OZDF (LZDF, 244.9 ± 9.81 ; OZDF, 200 ± 9.00) (**Figura 13D, derecha**), al igual que el tiempo de decaída al 60% (LZDF, 331.6 ± 17.66 ; OZDF, 226.3 ± 11.14) (**Figura 13E**).

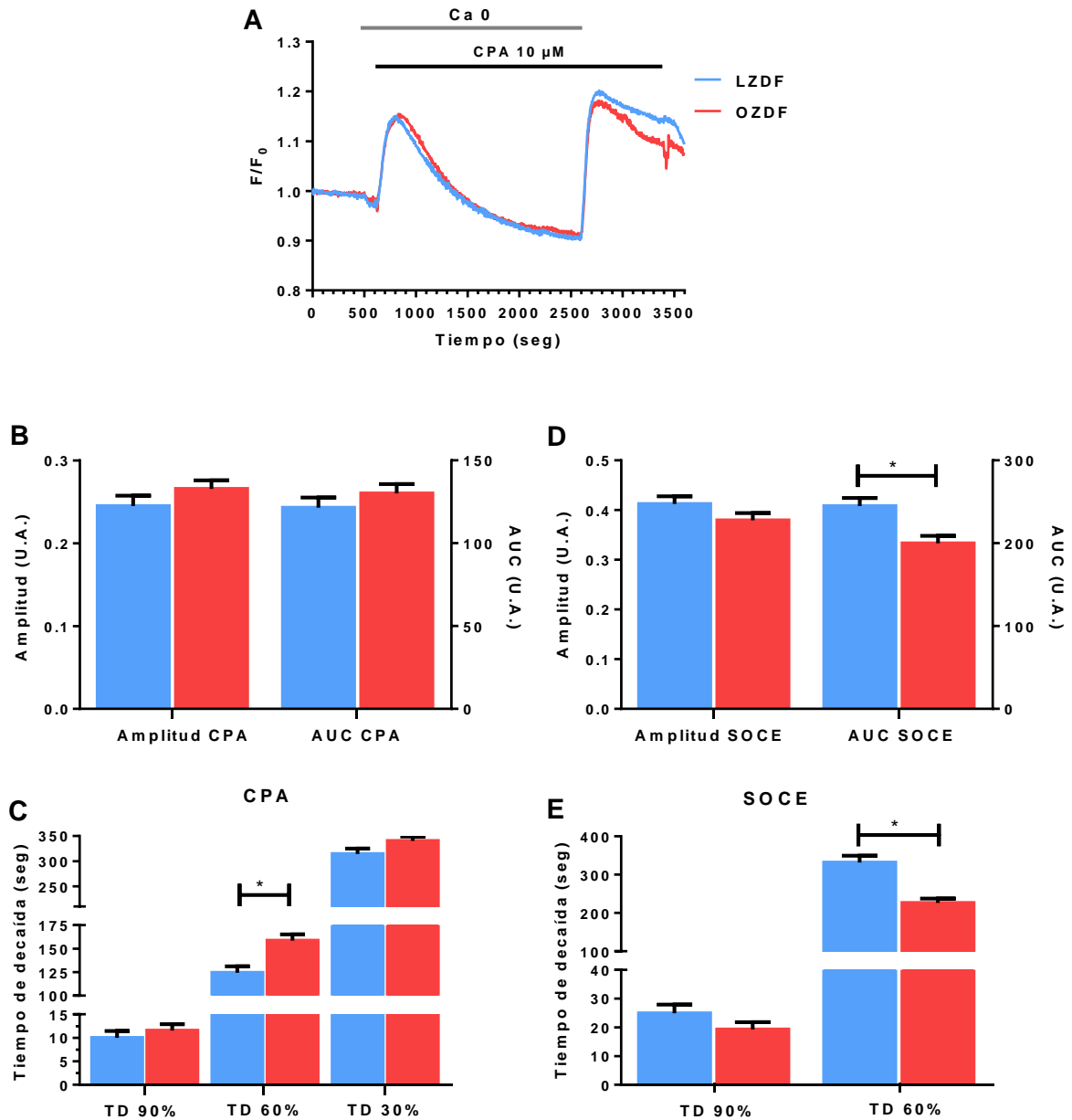


Figura 13. Efecto de la DM-2 sobre la SOCE en CMLV. Registros medios de la señal de Ca^{2+} correspondiente a la entrada de Ca^{2+} operada por almacenes intracelulares en CMLV en cultivo obtenidas de aorta de ratas LZDF (azul) y OZDF (rojo) (A). Media \pm ES de: amplitud (B, izquierda), área bajo la curva (AUC) (B, derecha), tiempo de decaída (C) de la señal de Ca^{2+} evocada por CPA, así como de amplitud (D, izquierda), AUC (D, derecha) y tiempos de decaída (E) de la SOCE. Para fines comparativos, los registros fueron normalizados empleando la fórmula F/F_0 . La comparación entre grupos se realizó empleando la prueba estadística t-test ($n=6$ por grupo experimental, $* = p \leq 0.05$). Las barras azules corresponden a los valores obtenidos de CMLV de ratas LZDF y las barras rojas a los obtenidos de ratas OZDF.

9.5. Efecto de la DM-2 sobre la velocidad de entrada de Mn^{2+} a través de los SOC en CMLV en cultivo de aorta de rata

En la **Figura 14A** se muestran los registros de la señal de fluorescencia del Fura-2 al ser excitado a una longitud de onda de 360 nm (punto isobéptico) en CMLV en cultivo de aorta de ratas LZDF (azul) y OZDF (rojo) con la finalidad de evaluar el funcionamiento de los canales SOC sin la interferencia de los mecanismos de remoción de Ca^{2+} . Una vez vació el RE como consecuencia de la aplicación de CPA (10 μ M) en ausencia de Ca^{2+} extracelular, se añadió $MnCl_2$ a una concentración de 100 μ M, promoviendo así su entrada a través de los SOC. Dicho fenómeno se tradujo en el apagado de la fluorescencia (“quenching”), debido a la unión irreversible del Fura-2 con Mn^{2+} .

Para medir la velocidad de entrada del Mn^{2+} a través de los SOC, la señal generada por la aplicación de Mn^{2+} se ajustó a una regresión lineal y se calculó la pendiente de esta. La velocidad de entrada de Mn^{2+} a través de los SOC se encontró aumentada significativamente un 48% en OZDF respecto al grupo control LZDF (LZDF, 0.01209 ± 0.0011 ; OZDF, 0.01789 ± 0.0013) (**Figura 14B**).

Después de estudiar la SOCE, se procedió a evaluar la actividad de los mecanismos que remueven el Ca^{2+} intracelular (SERCA, PMCA y NCX). Esta evaluación se realizó en presencia y ausencia de Ca^{2+} extracelular (Ca_0); la primera condición se empleó con el fin de determinar la participación de estos mecanismos en la remoción tanto del Ca^{2+} que es liberado del RE, como del que proviene desde el medio extracelular, mientras que la segunda (Ca_0) se empleó con la finalidad de evaluar la participación de dichos mecanismos en la remoción del Ca^{2+} liberado del RE exclusivamente.

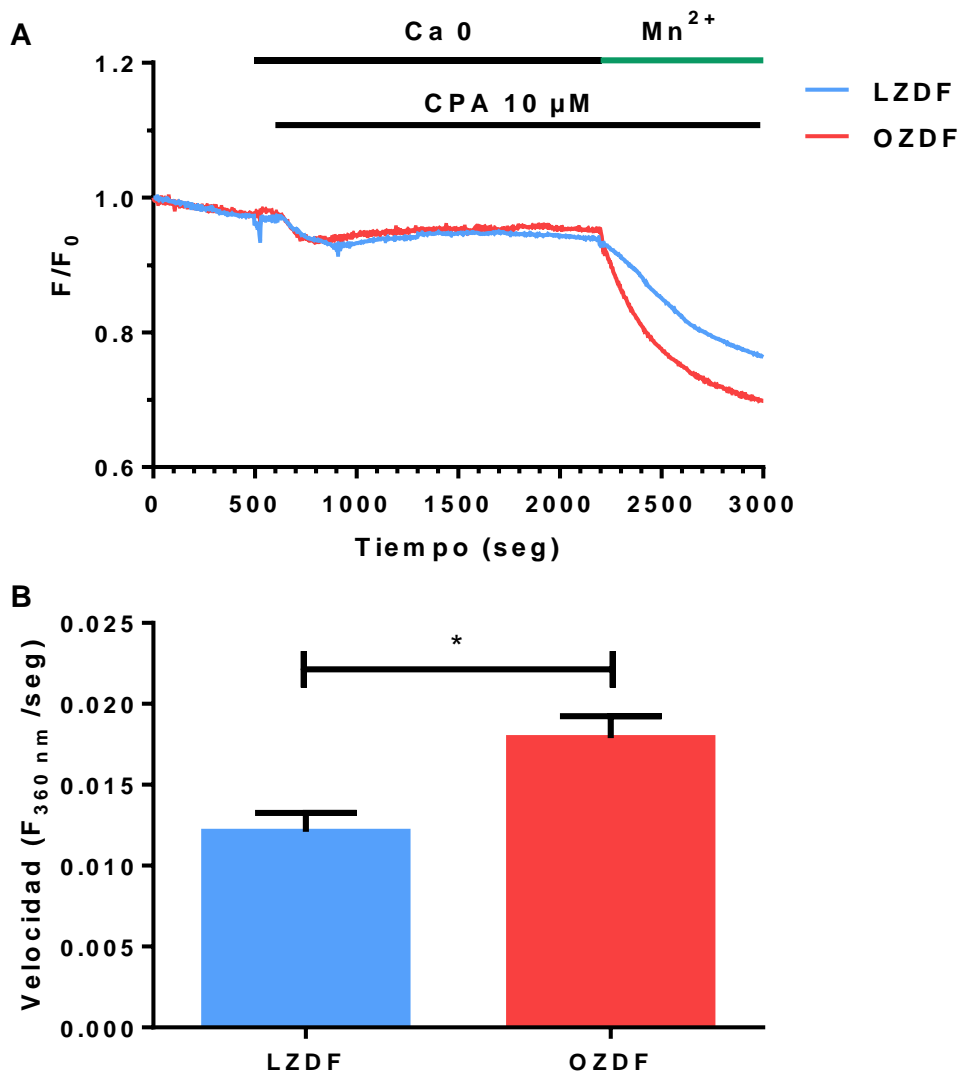


Figura 14. Efecto de la DM-2 sobre la entrada de Mn²⁺ a través de los canales SOC en CMLV. Registros medios del apagado de la fluorescencia de Fura-2 dado por la entrada de Mn²⁺ a través de los SOC en CMLV en cultivo obtenidas de aorta de ratas LZDF (azul) y OZDF (rojo) **(A)**. Media ± ES de la velocidad del apagado de la fluorescencia **(B)**. Para fines comparativos, los registros fueron normalizados empleando la fórmula F/F₀. La comparación entre grupos se realizó empleando la prueba estadística t-test (n=6 por grupo experimental, * = p≤0.05). Las barras azules corresponden a los valores obtenidos de CMLV de ratas LZDF y las barras rojas corresponden a los obtenidos de ratas OZDF.

9.6. Efecto de la DM-2 sobre la actividad de la SERCA en CMLV en cultivo de aorta de rata

9.6.1. Efecto de la DM-2 sobre la actividad de la SERCA en presencia de Ca^{2+} en el medio extracelular

En la **Figura 15A** se muestran las medias de los registros de la señal de Ca^{2+} evocada por ATP en presencia de CPA, un inhibidor de la SERCA, en CMLV en cultivo de aorta de ratas LZDF (línea continua azul) y OZDF (línea continua roja), así como sus respectivos controles (en ausencia de CPA: línea punteada azul para LZDF y línea punteada roja para OZDF). Estos experimentos fueron realizados en presencia de Ca^{2+} extracelular.

En el grupo LZDF, la inhibición de la SERCA con CPA no indujo alteraciones en la amplitud del pico del transiente (LZDF Ctrl: 0.7324 ± 0.03 vs LZDF CPA: 0.7370 ± 0.01) (**Figura 15B, izquierda**). Sin embargo, la inhibición de la SERCA causó un incremento significativo de la amplitud de la etapa tardía de la fase de decaída (Amp600) (LZDF Ctrl: 0.0161 ± 0.01 vs LZDF CPA: 0.3934 ± 0.008) (**Figura 15C, izquierda**), como los tiempos de decaída al 90 (LZDF Ctrl: 6.856 ± 0.5 vs LZDF CPA: 8.562 ± 0.65) y 60% (LZDF Ctrl: 71.12 ± 6.19 vs LZDF CPA: 320 ± 18.5) (**Figura 15D**), así como el valor del área bajo la curva (LZDF Ctrl: 132.1 ± 10.13 vs LZDF CPA: 253.6 ± 8.59) (**Figura 15E, derecha**).

En el caso del grupo OZDF, tampoco encontramos diferencias estadísticas en la amplitud del pico de la señal (OZDF Ctrl: 0.686 ± 0.03 vs OZDF CPA: 0.737 ± 0.01) (**Figura 15B, derecha**), sin embargo, al igual que en el grupo LZDF, el bloqueo de la SERCA con CPA en presencia de Ca^{2+} extracelular indujo un incremento significativo en la amplitud de la etapa tardía de la decaída (Amp600) (OZDF Ctrl: 0.128 ± 0.01 vs OZDF CPA: 0.3259 ± 0.01) (**Figura 15C, derecha**), los tiempos de decaída al 90 (OZDF Ctrl: 4.855 ± 0.21 vs OZDF CPA: 9.432 ± 0.83) y 60% (OZDF Ctrl: 40.07 ± 4.03 vs OZDF CPA: 227.4 ± 14.96) (**Figura 15D**), así como el valor de área bajo la curva (OZDF Ctrl: 134.3 ± 8.42 vs OZDF CPA: 298.2 ± 7.8) (**Figura 15E, derecha**).

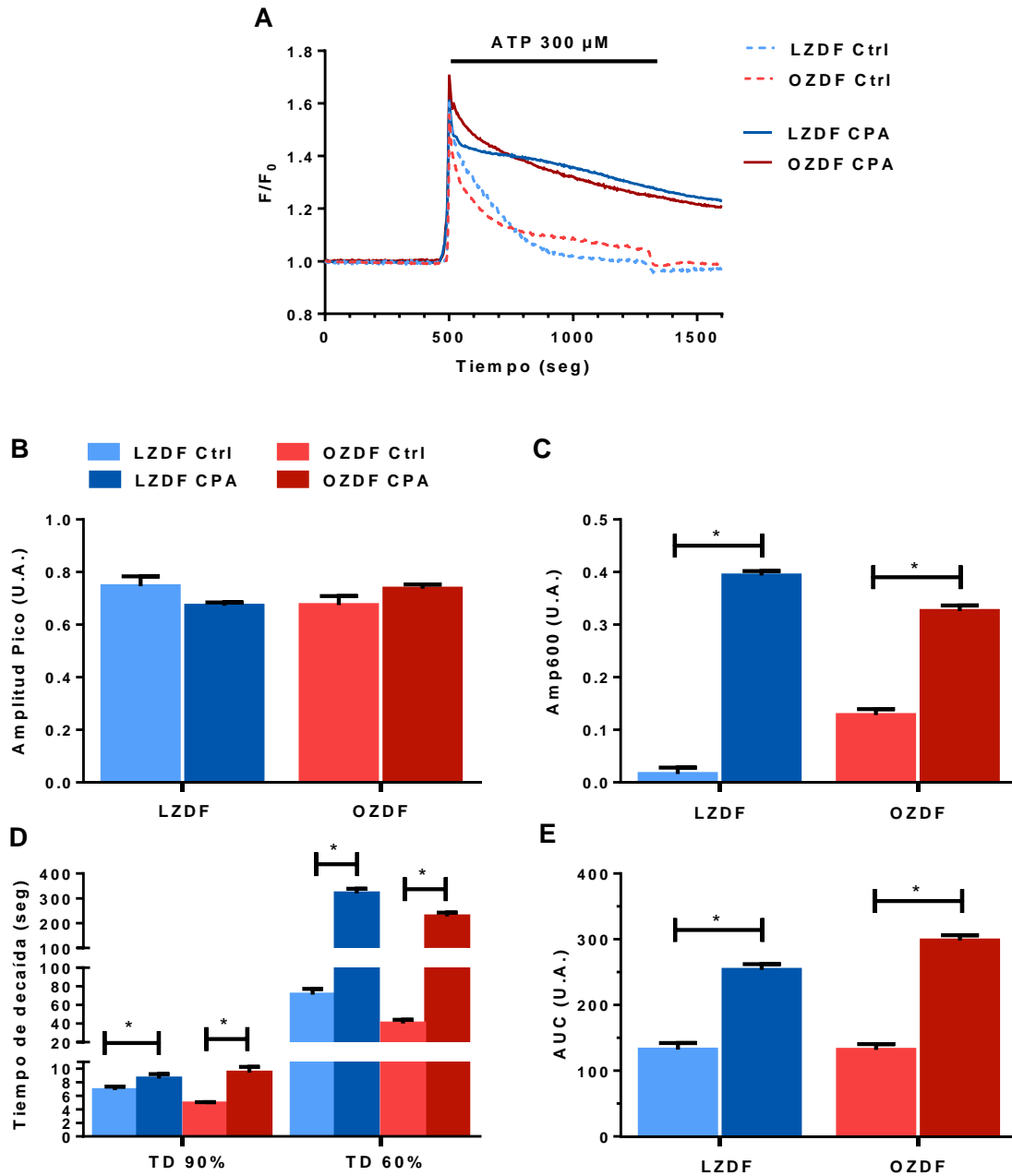


Figura 15. Efecto de la inhibición de la SERCA sobre el transiente de Ca^{2+} evocado por ATP en presencia de Ca^{2+} extracelular en CMLV. Registros medios de la señal de Ca^{2+} evocada por ATP en presencia de CPA (10 μM), un inhibidor de la SERCA, en CMLV obtenidas de aorta de ratas LZDF (línea continua azul) y OZDF (línea continua roja), así como sus respectivos controles (línea punteada azul para LZDF y línea punteada roja para OZDF). Para fines comparativos, los registros fueron normalizados empleando la fórmula F/F_0 . **(A)**. Media \pm ES de: amplitud del pico **(B)**, amplitud 600 seg después de la aplicación del agonista (Amp600) **(C)**, tiempos de decaída **(D)** y área bajo la curva (AUC) **(E)** del transiente de Ca^{2+} evocado por ATP. La comparación entre grupos se realizó empleando la prueba estadística t-test ($n=6$ por grupo experimental, * = $p \leq 0.05$).

Dado a que se encontraron diferencias significativas en la señal de Ca^{2+} inducida por ATP entre los grupos LZDF y OZDF (controles) (**ver Figura 10**), procedimos a normalizar los valores de los parámetros evaluados en la señal de Ca^{2+} evocada por ATP en presencia de los inhibidores de los mecanismos de remoción con respecto a la media de cada uno de estos parámetros determinados previamente en sus controles, es decir, en ausencia de los inhibidores. Con la finalidad de conocer el efecto neto de la inhibición de los mecanismos de remoción y poder realizar la comparación entre ambos grupos experimentales.

Al realizar la comparación entre los grupos LZDF y OZDF, pudimos apreciar que la inhibición de la SERCA en presencia de Ca^{2+} extracelular indujo un aumento significativo en el valor de amplitud del pico del transiente de Ca^{2+} obtenido de células de ratas OZDF (LZDF: 0.9173 ± 0.01 ; OZDF: 1.074 ± 0.01) (**Figura 16A, izquierda**), y una disminución significativa de la amplitud de la etapa tardía de la decaída del transiente (Amp600) (LZDF: 24.34 ± 0.5 vs OZDF: 2.546 ± 0.08) en este mismo grupo de ratas (**Figura 16A, derecha**). En lo que respecta a los tiempos de decaída, estos se encontraron aumentados de forma significativa tanto al 90 (LZDF 1.249 ± 0.09 ; OZDF: 1.943 ± 0.17), como al 60% en OZDF respecto al grupo control (LZDF, 4.499 ± 0.26 ; OZDF, 5.675 ± 0.37) (**Figura 16B**). Finalmente, el área bajo la curva se encontró incrementada significativamente en OZDF (LZDF, 1.920 ± 0.06 ; OZDF, 2.220 ± 0.05) (**Figura 16C**).

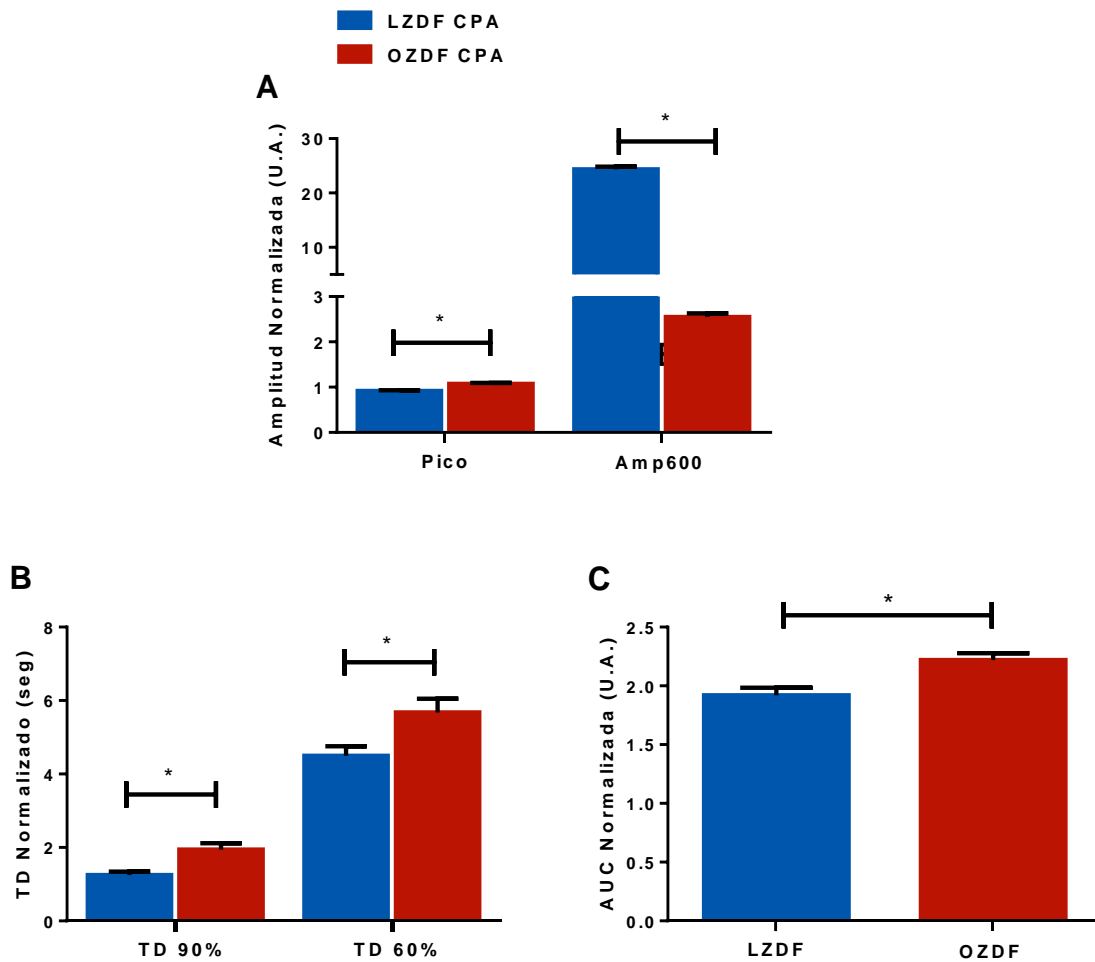


Figura 16. Efecto de la DM-2 sobre la actividad de la bomba SERCA en CMLV en presencia de Ca^{2+} extracelular. Media \pm ES de: amplitud del pico (**A, izquierda**), amplitud 600 seg después de la aplicación del agonista (Amp600) (**A, derecha**), tiempos de decaída (**B**) y área bajo la curva (AUC) (**C**) del transiente de Ca^{2+} evocado por ATP en presencia de CPA (10 μM), un inhibidor de la SERCA, en CMLV de ratas LZDF (barras azules) y OZDF (barras rojas). La comparación entre grupos se realizó empleando la prueba estadística t-test ($n=6$ por grupo experimental, $* = p \leq 0.05$).

9.6.2. Efecto de la DM-2 sobre la actividad de la SERCA en ausencia de Ca^{2+} en el medio extracelular

En la **Figura 17A** se muestran las medias de los registros de la señal de Ca^{2+} evocada por ATP en presencia de CPA, en un medio extracelular libre de Ca^{2+} , de CMLV en cultivo de aorta de ratas LZDF (línea continua azul) y OZDF (línea continua roja), así como sus respectivos controles (línea punteada azul para LZDF y línea punteada roja para OZDF).

En el grupo LZDF, el bloqueo de la SERCA con CPA en ausencia de Ca^{2+} extracelular, provocó la disminución significativa del valor de la amplitud del pico del transiente (LZDF Ctrl: 0.6529 ± 0.02 vs LZDF CPA: 0.49 ± 0.01) (**Figura 17B, izquierda**). La amplitud de la etapa tardía de la fase de decaída (Amp600) (LZDF Ctrl: -0.0678 ± 0.003 vs LZDF CPA: 0.0262 ± 0.008) se encontró aumentada significativamente (**Figura 17C, izquierda**). Tanto los tiempos de decaída al 90 (LZDF Ctrl: 4.57 ± 0.27 vs LZDF CPA: 7.698 ± 0.39), 60 (LZDF Ctrl: 28.35 ± 1.43 vs LZDF CPA: 75.86 ± 4.54) y 30% (LZDF Ctrl: 80.39 ± 3.2 vs LZDF CPA: 177.6 ± 9.91) (**Figura 17D**) así como el área bajo la curva (LZDF Ctrl: 57.94 ± 3.13 vs LZDF CPA: 115.8 ± 9.28) (**Figura 17E, izquierda**) se encontraron incrementados significativamente.

En el caso del grupo OZDF, el bloqueo de la SERCA en Ca^0 no indujo cambios en la amplitud del pico del transiente (OZDF Ctrl: 0.5783 ± 0.01 vs OZDF CPA: 0.5332 ± 0.01) (**Figura 17B, derecha**), sin embargo, los valores de Amp600 (OZDF Ctrl: -0.0712 ± 0.002 vs OZDF CPA: -0.018 ± 0.002) (**Figura 17C, derecha**) tiempos de decaída al 90 (OZDF Ctrl: 4.894 ± 0.26 vs OZDF CPA: 9.295 ± 0.56), 60 (OZDF Ctrl: 31.33 ± 4.56 vs OZDF CPA: 73.05 ± 2.54) y 30% (OZDF Ctrl: 95.15 ± 3.19 vs OZDF CPA: 154.8 ± 3.64) (**Figura 17D**), así como el área bajo la curva (OZDF Ctrl: 48.97 ± 1.85 vs OZDF CPA: 75.27 ± 3.6) (**Figura 17E, derecha**), se encontraron incrementados respecto a su control (en ausencia del inhibidor).

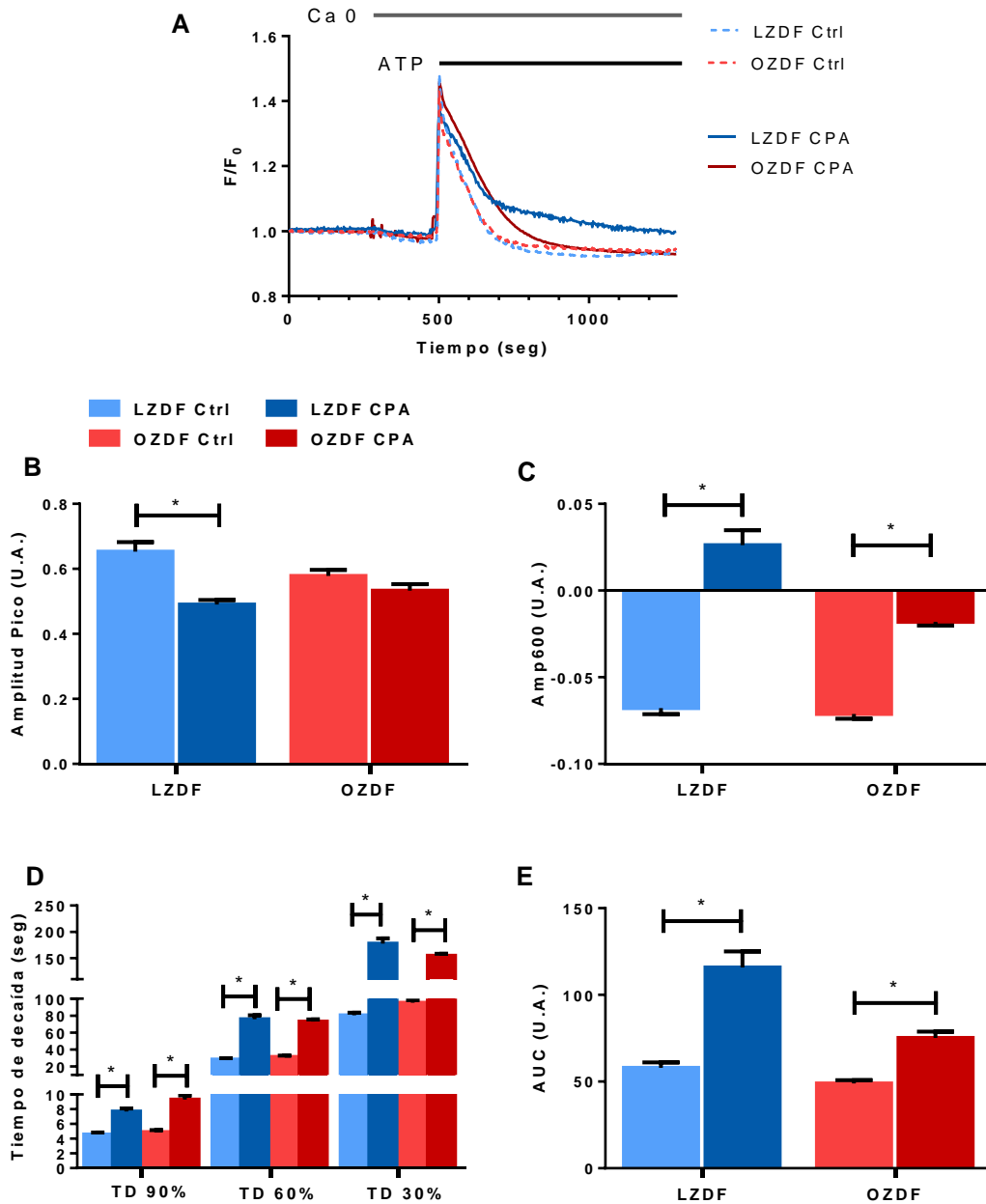


Figura 17. Efecto de la inhibición de la SERCA sobre el transiente de Ca^{2+} evocado por ATP en ausencia de Ca^{2+} extracelular CMLV. Registros medios de la señal de Ca^{2+} evocada por ATP en presencia de CPA (10 μ M), un inhibidor de la SERCA, en CMLV obtenidas de aorta de ratas LZDF (línea continua azul) y OZDF (línea continua roja) y sus respectivos controles (línea punteada azul para LZDF y línea punteada roja para OZDF) en Ca_0 . Para fines comparativos, los registros fueron normalizados empleando la fórmula F/F_0 . **(A)**. Media \pm ES de: amplitud del pico **(B)**, amplitud 600 seg después de la aplicación del agonista (Amp600) **(C)**, tiempos de decaída **(D)** y área bajo la curva (AUC) **(E)** del transiente de Ca^{2+} evocado por ATP. La comparación entre grupos se realizó empleando la prueba estadística t-test ($n=7$ para LZDF y $n=6$ para OZDF, $* = p \leq 0.05$).

Finalmente, cuando comparamos ambos grupos experimentales, pudimos observar que la inhibición de la SERCA con CPA en ausencia de Ca^{2+} extracelular indujo un incremento significativo en la amplitud del pico (LZDF: 0.7506 ± 0.02 vs OZDF: 0.922 ± 0.03) en OZDF (**Figura 18A, izquierda**). La amplitud de la etapa tardía de la decaída (Amp600) se encontró reducida significativamente en OZDF respecto a LZDF (LZDF: 0.3836 ± 0.01 vs OZDF: -0.2529 ± 0.03) (**Figura 18A, derecha**). No se encontraron diferencias estadísticas en los tiempos de decaída al 90 (LZDF: 1.684 ± 0.08 vs OZDF: 1.899 ± 0.11) y 60% (LZDF: 2.676 ± 0.16 vs OZDF: 2.335 ± 0.08) entre grupos, sin embargo, el tiempo de decaída al 30% se encontró reducido significativamente en OZDF (LZDF: 2.209 ± 0.12 vs OZDF: 1.635 ± 0.03) (**Figura 18B**). En lo que respecta al área bajo la curva, se encontró una disminución significativa en OZDF en comparación a LZDF (LZDF: 1.99 ± 0.16 vs OZDF: 1.536 ± 0.07) (**Figura 18D**).

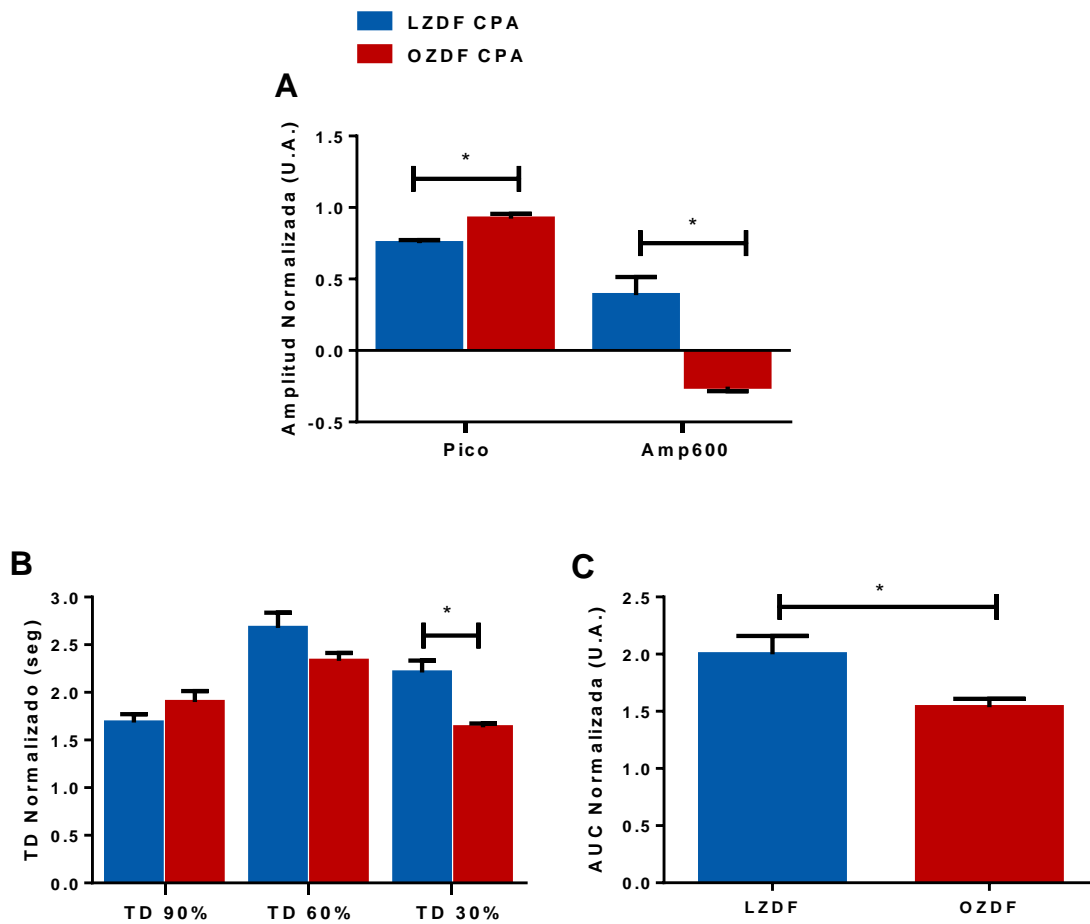


Figura 18. Efecto de la DM-2 sobre la actividad de la bomba SERCA en CMLV en ausencia de Ca^{2+} extracelular. Media \pm ES de: amplitud del pico (**A**, izquierda), amplitud 600 seg después de la aplicación del agonista (Amp600) (**A**, derecha), tiempos de decaída (**B**) y área bajo la curva (AUC) (**C**) del transiente de Ca^{2+} evocado por ATP en presencia de CPA (10 μM), un inhibidor de la SERCA, en CMLV de ratas LZDF (barras azules) y OZDF (barras rojas) en Ca^0 . La comparación entre grupos se realizó empleando la prueba estadística t-test ($n=7$ para LZDF y $n=6$ para OZDF, * = $p \leq 0.05$).

En resumen, los datos sugieren que la DM-2 causa un aumento de la actividad de la SERCA durante la fase inicial del transiente (pico y tiempo de decaída al 90 y 60%) y una drástica disminución de la actividad de este sistema de remoción de Ca^{2+} durante la fase tardía del transiente (tiempo al 30% y Amplitud600) evocado por ATP en CMLV de aorta de rata en cultivo. Estos efectos fueron mayores en presencia de Ca^{2+} extracelular.

9.7. Efecto de la DM-2 sobre la actividad de la PMCA en CMLV en cultivo de aorta de rata

9.7.1. Efecto de la DM-2 sobre la actividad de la PMCA en presencia de Ca^{2+} en el medio extracelular

En la **Figura 19A** se muestran las medias de la señal de Ca^{2+} evocada por ATP en presencia de Ortovanadato (Van), un inhibidor de la PMCA, en CMLV en cultivo de aorta de ratas LZDF (línea continua azul) y OZDF (línea continua roja), así como sus controles en ausencia del inhibidor (línea punteada azul para LZDF y línea punteada roja para OZDF). Estos experimentos fueron realizados en presencia de Ca^{2+} extracelular. En el grupo LZDF, la inhibición de la PMCA con Ortovanadato no indujo cambios en la amplitud del pico del transiente (LZDF Ctrl: 0.7324 ± 0.03 vs LZDF Van: 0.6878 ± 0.01) (**Figura 19B, izquierda**). El valor de Amp600 se encontró aumentado significativamente (LZDF Ctrl: 0.0161 ± 0.01 vs LZDF Van: 0.2906 ± 0.01) (**Figura 19C, izquierda**). Respecto a los tiempos de decaída, no encontramos diferencias significativas al 90 (LZDF Ctrl: 6.856 ± 0.50 vs LZDF Van: 6.742 ± 0.31) y 60% (LZDF Ctrl: 71.12 ± 6.19 vs LZDF Van: 58.22 ± 4.62), sin embargo, el tiempo al 30% se encontró incrementado en presencia del inhibidor (LZDF Ctrl: 174.0 ± 8.545 vs LZDF Van: 263.5 ± 10.92) (**Figura 19D**). Asimismo, el área bajo la curva también se encontró aumentada significativamente (LZDF Ctrl: 132.1 ± 10.13 vs LZDF Van: 209.7 ± 5.95) (**Figura 19E, izquierda**). En lo que respecta al grupo OZDF, bajo estas mismas condiciones observamos una disminución significativa en la amplitud del pico del transiente (OZDF Ctrl: 0.6860 ± 0.03 vs OZDF Van: 0.5406 ± 0.01) (**Figura 19B, derecha**). Tanto el valor de Amp600 (OZDF Ctrl: 0.1280 ± 0.01 vs OZDF Van: 0.2001 ± 0.01) (**Figura 19C, derecha**), como los tiempos de decaída al 90 (OZDF Ctrl: 4.855 ± 0.21 vs OZDF Van: 5.944 ± 0.39), 60 (OZDF Ctrl: 40.07 ± 4.031 vs OZDF Van: 71.67 ± 5.37) y 30% (OZDF Ctrl: 174.3 ± 11.28 vs OZDF Van: 261.5 ± 12.52) (**Figura 19D**), así como el área bajo la curva (**Figura 19E, derecha**) se encontraron aumentados significativamente en presencia del inhibidor (OZDF Ctrl: 134.3 ± 8.42 vs OZDF Van: 173.3 ± 5.57).

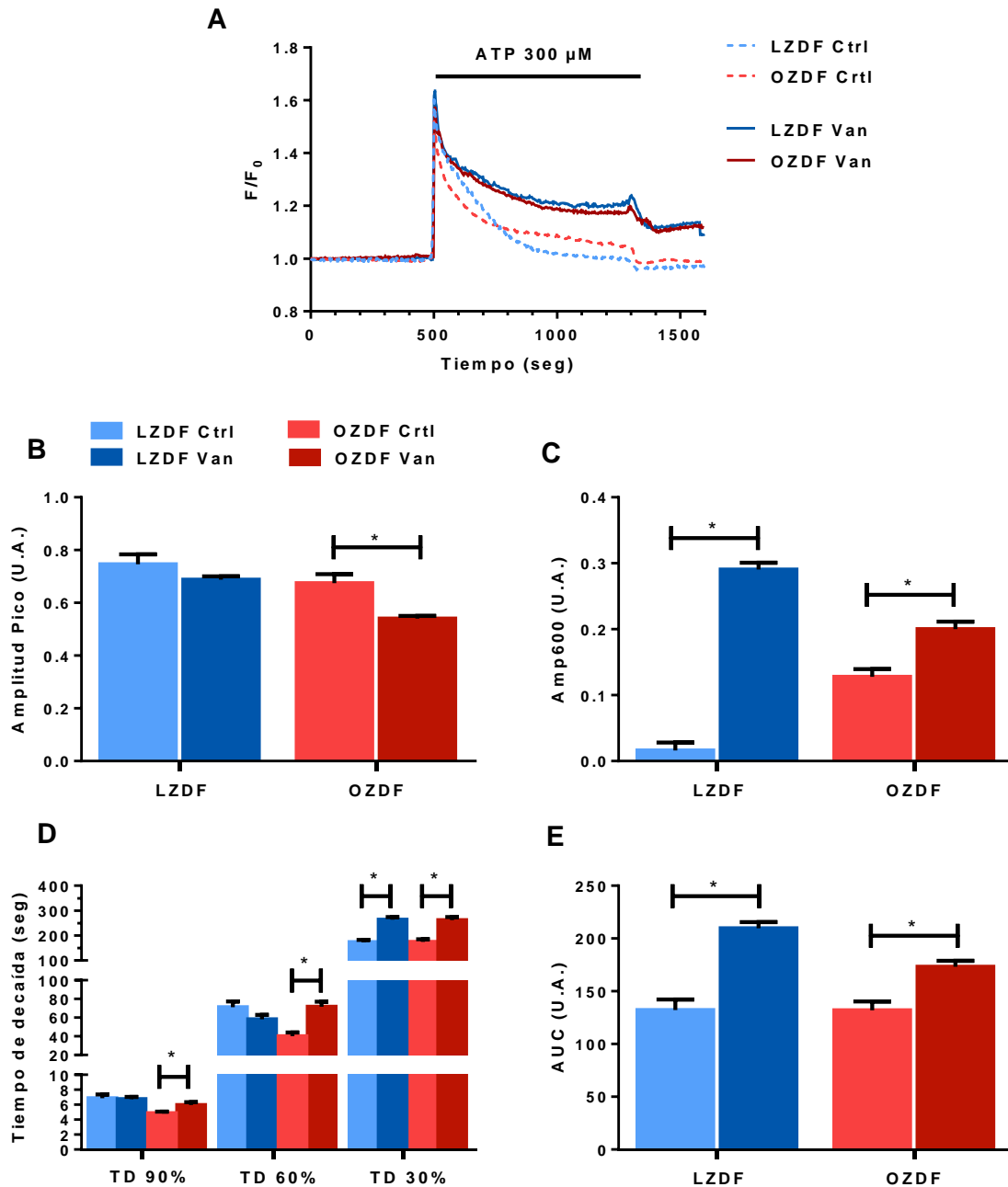


Figura 19. Efecto de la inhibición de la PMCA sobre el transiente de Ca²⁺ evocado por ATP en presencia de Ca²⁺ extracelular en CMLV. Registros medios de la señal de Ca²⁺ evocada por ATP (300 μM) en presencia de ortovanadato de sodio (500 μM), un inhibidor de la PMCA, en CMLV obtenidas de aorta de ratas LZDF (línea continua azul) y OZDF (línea continua roja) y sus respectivos controles (línea punteada azul para LZDF y línea punteada roja para OZDF). Para fines comparativos, los registros fueron normalizados empleando la fórmula F/F₀. **(A)**. Media ± ES de: amplitud del pico **(B)**, amplitud 600 seg después de la aplicación del agonista (Amp600) **(C)**, tiempos de decaída **(D)** y área bajo la curva (AUC) del transiente de Ca²⁺ evocado por ATP **(E)**. La comparación entre grupos se realizó empleando la prueba estadística t-test (n=6 por grupo experimental, * = p≤0.05).

Al realizar la comparación entre grupos, encontramos que la inhibición de la PMCA en presencia de Ca^{2+} extracelular indujo una disminución significativa tanto en la amplitud del pico (LZDF: 0.9391 ± 0.01 vs OZDF: 0.788 ± 0.01) como en la amplitud de la etapa tardía de la decaída del transiente (Amp600) en OZDF (LZDF: 17.99 ± 0.63 vs OZDF: 1.563 ± 0.08) (**Figura 20A**). Respecto a la duración de la fase de decaída de la señal, los tiempos tanto al 90 (LZDF: 0.9833 ± 0.04 vs OZDF: 1.224 ± 0.08) como al 60% (LZDF: 0.8186 ± 0.06 vs OZDF: 1.789 ± 0.13) se encontraron aumentados significativamente en OZDF respecto a LZDF. No se encontraron diferencias estadísticas entre grupos en el tiempo de decaída al 30% (LZDF: 1.515 ± 0.06 vs OZDF: 1.5 ± 0.07) (**Figura 20B**). Finalmente, el área bajo la curva se encontró reducida significativamente en OZDF (LZDF: 1.587 ± 0.04 vs OZDF: 1.291 ± 0.04) (**Figura 20C**).

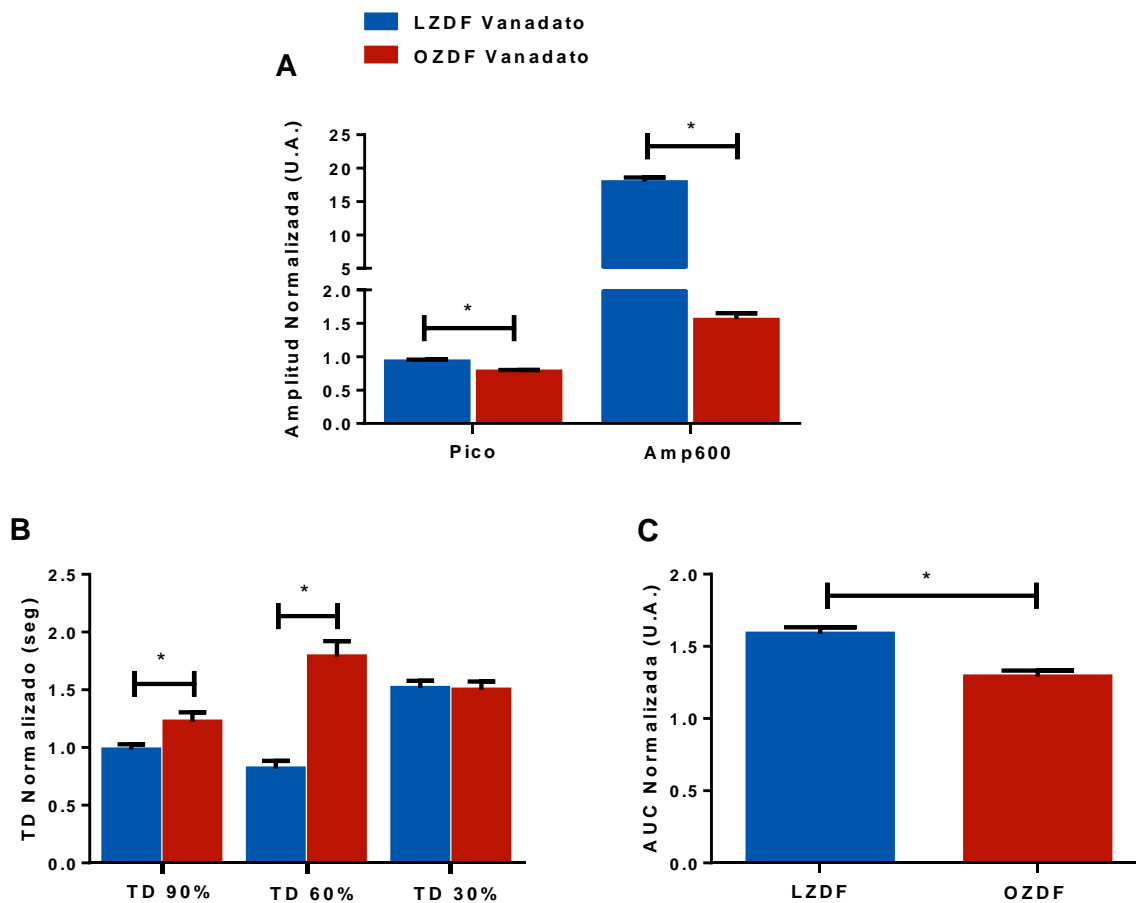


Figura 20. Efecto de la DM-2 sobre la actividad de la PMCA en presencia de Ca^{2+} extracelular en CMLV. Media \pm ES de: amplitud del pico (**A, izquierda**), amplitud 600 seg después de la aplicación del agonista (Amp600) (**A, derecha**), tiempos de decaída (**B**) y área bajo la curva (AUC) (**C**) del transiente de Ca^{2+} evocado por ATP en presencia de ortovanadato de sodio (500 μM), un inhibidor de la PMCA, en CMLV de ratas LZDF (barras azules) y OZDF (barras rojas). La comparación entre grupos se realizó empleando la prueba estadística t-test ($n=6$ por grupo experimental, $* = p \leq 0.05$).

9.7.2. Efecto de la DM-2 sobre la actividad de la PMCA en ausencia de Ca^{2+} en el medio extracelular

En la **Figura 21A** se muestran los registros medios de la señal de Ca^{2+} evocada por ATP (300 μM) en presencia de Ortovanadato (Van), en CMLV en cultivo de aorta de ratas LZDF (línea continua azul) y OZDF (línea continua roja), así como sus controles en ausencia del inhibidor (línea punteada azul para LZDF y línea punteada roja para OZDF) en un medio extracelular libre de Ca^{2+} .

En el grupo LZDF, la inhibición de la PMCA con ortovanadato en ausencia de Ca^{2+} extracelular indujo una reducción significativa en la amplitud del pico del transiente (LZDF Ctrl: 0.6529 ± 0.029 vs LZDF Van: 0.3612 ± 0.008) (**Figura 21B, izquierda**). Por el contrario, tanto los valores de Amp600 (LZDF Ctrl: -0.06782 ± 0.003 vs LZDF Van: 0.04849 ± 0.006) (**Figura 21C, izquierda**), como los tiempos de decaída al 90 (LZDF Ctrl: 4.570 ± 0.27 vs LZDF Van: 7.339 ± 0.27), 60 (LZDF Ctrl: 28.35 ± 1.43 vs LZDF Van: 47.36 ± 1.36) y 30% (LZDF Ctrl: 80.39 ± 3.2 vs LZDF Van: 105.9 ± 1.87) (**Figura 21D**) aumentaron significativamente. El valor del área bajo la curva se encontró reducido significativamente (LZDF Ctrl: 57.94 ± 3.13 vs LZDF Van: 48.77 ± 1.58) (**Figura 21E, izquierda**).

En OZDF, la aplicación de ortovanadato también causó una disminución significativa en la amplitud del pico del transiente (OZDF Ctrl: 0.5783 ± 0.01 vs OZDF Van: 0.4453 ± 0.01) (**Figura 21B, derecha**). De manera similar a lo ocurrido en LZDF, se observó un incremento significativo en los valores de Amp600 (OZDF Ctrl: -0.07123 ± 0.002 vs OZDF Van: 0.05942 ± 0.009) (**Figura 21C, derecha**) y tiempos de decaída al 90 (OZDF Ctrl: 4.894 ± 0.26 vs OZDF Van: 6.855 ± 0.3) 60 (OZDF Ctrl: 31.33 ± 1.56 vs OZDF Van: 45.77 ± 2.56) y 30% (OZDF Ctrl: 95.15 ± 3.19 vs OZDF Van: 124.7 ± 6.3) (**Figura 21D**). El área bajo la curva se encontró incrementada significativamente en este grupo (OZDF Ctrl: 48.97 ± 1.85 vs OZDF Van: 62.91 ± 3.19) (**Figura 21E**).

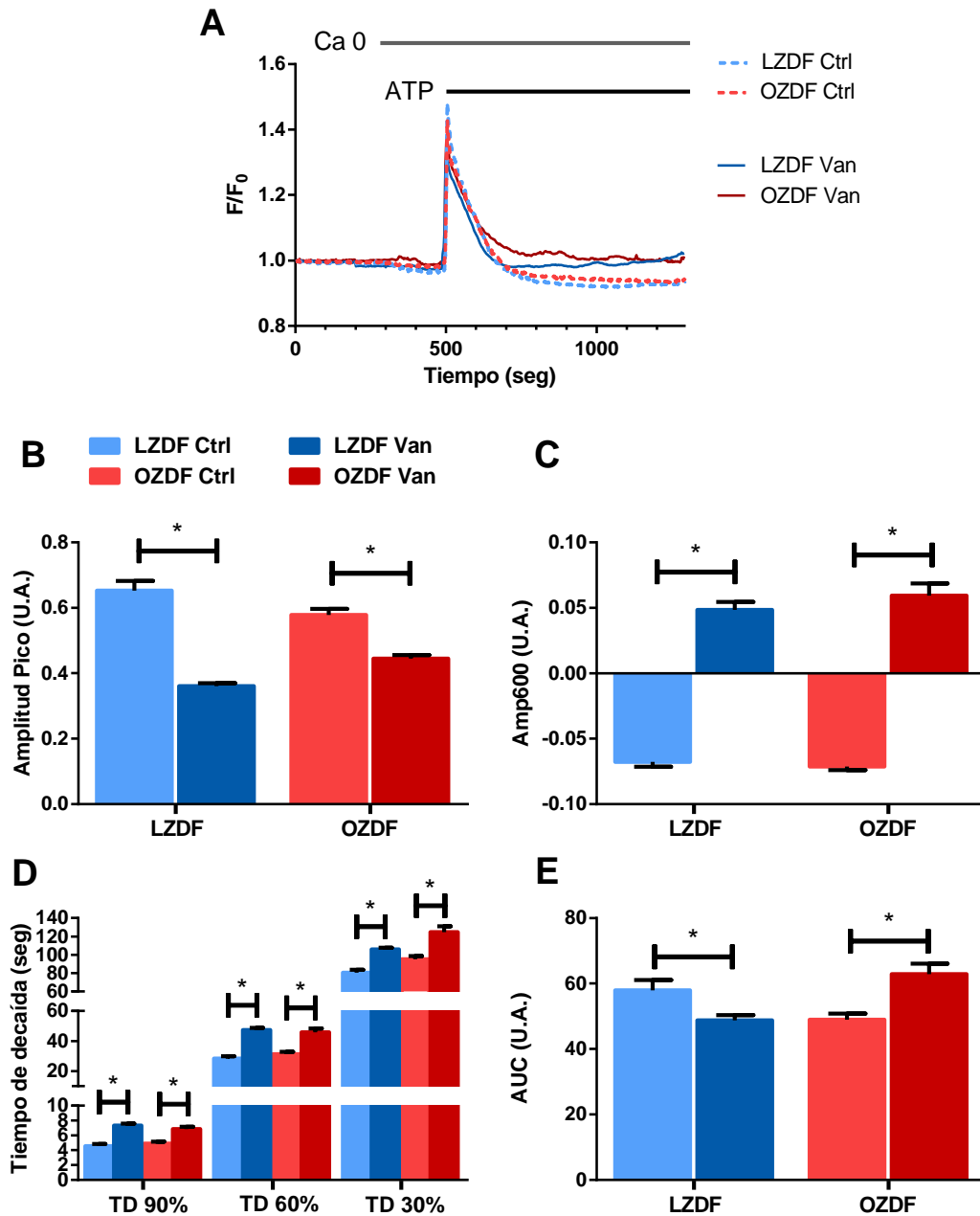


Figura 21. Efecto de la inhibición de la PMCA sobre el transiente de Ca^{2+} evocado por ATP en ausencia de Ca^{2+} extracelular en CMLV. Registros medios de la señal de Ca^{2+} evocada por ATP en presencia de ortovanadato de sodio ($500 \mu\text{M}$), un inhibidor de la PMCA, en CMLV obtenidas de aorta de ratas LZDF (línea continua azul) y OZDF (línea continua roja) y sus respectivos controles (línea punteada azul para LZDF y línea punteada roja para OZDF) en $\text{Ca}0$. Para fines comparativos, los registros fueron normalizados empleando la fórmula F/F_0 (A). Media \pm ES de: amplitud del pico (B), amplitud 600 seg después de la aplicación del agonista (Amp600) (C), tiempos de decaída (D) y área bajo la curva (AUC) (E) del transiente de Ca^{2+} evocado por ATP. La comparación entre grupos se realizó empleando la prueba estadística t-test ($n=6$ para LZDF y $n=4$ para OZDF, * = $p \leq 0.05$).

Al comparar ambos grupos experimentales entre sí pudimos determinar que, la inhibición de la PMCA con Ortovanadato, induce un incremento significativo en la amplitud del pico del transiente de Ca^{2+} evocado por ATP (**Figura 21B, izquierda**) en OZDF (LZDF: 0.5533 ± 0.01 vs OZDF: 0.7699 ± 0.01). No encontramos diferencias estadísticas en los valores de amplitud de la etapa tardía de la decaída de la señal (Amp600) entre ambos grupos experimentales (LZDF: 0.7149 ± 0.08 vs OZDF: 0.8342 ± 0.12) (**Figura 21B, derecha**). Respecto a la duración del transiente, los tiempos de decaída al 90 (LZDF: 1.606 ± 0.05 vs OZDF: 1.401 ± 0.06) y 60% (LZDF: 1.67 ± 0.04 vs OZDF: 1.461 ± 0.08) se encontraron reducidos en OZDF. No encontramos diferencias estadísticas entre grupos en el tiempo de decaída al 30% (LZDF: 1.317 ± 0.02 vs OZDF: 1.317 ± 0.06) (**Figura 21C**). El área bajo la curva se encontró incrementada en OZDF respecto al grupo control (LZDF: 0.8417 ± 0.02 vs OZDF: 1.285 ± 0.06) (**Figura 21D**).

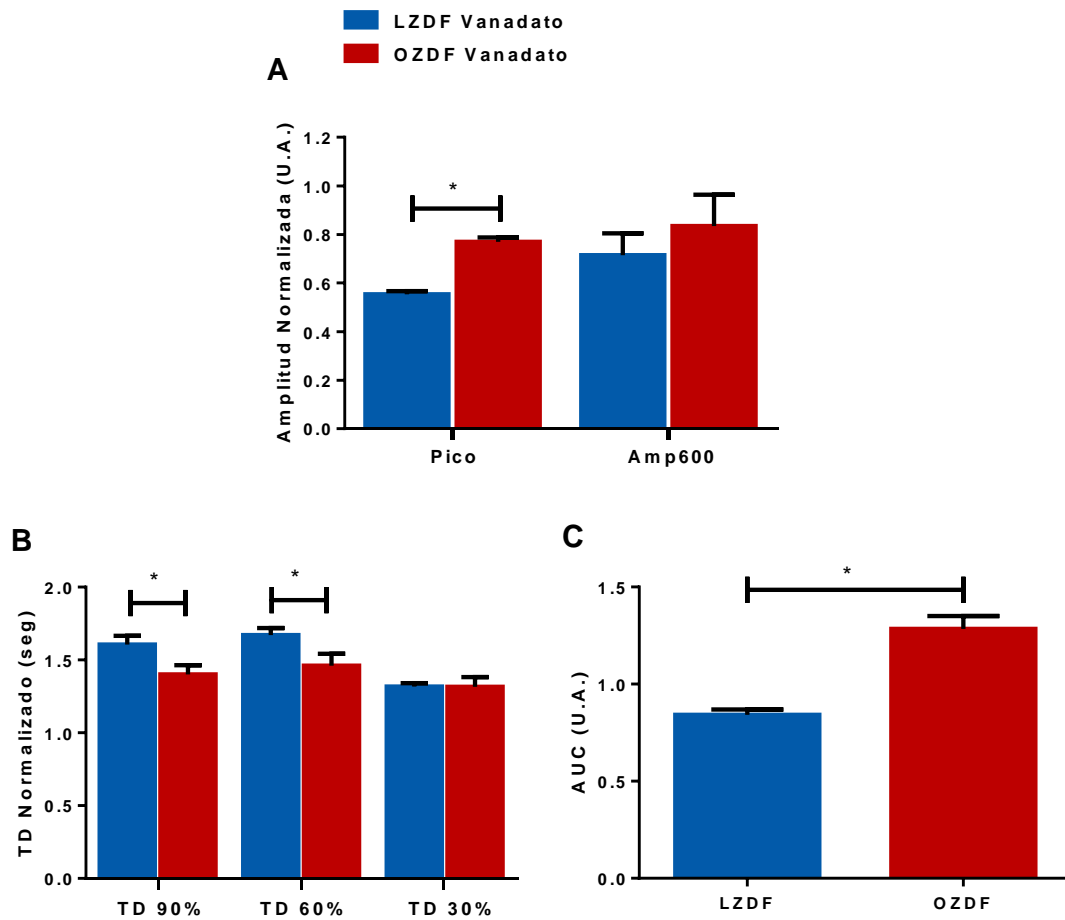


Figura 22. Efecto de la DM-2 sobre la actividad de la PMCA en ausencia de Ca^{2+} extracelular en CMLV. Media \pm ES de: amplitud del pico (**A**, izquierda), amplitud 600 seg después de la aplicación del agonista (Amp600) (**A**, derecha), tiempos de decaída (**B**) y área bajo la curva (AUC) (**C**) del transiente de Ca^{2+} evocado por ATP en presencia de ortovanadato de sodio (500 μM), un inhibidor de la PMCA, en CMLV de ratas LZDF (barras azules) y OZDF (barras rojas) en Ca^0 . La comparación entre grupos se realizó empleando la prueba estadística t-test ($n=6$ para LZDF y $n=4$ para OZDF, * = $p \leq 0.05$).

En resumen, los resultados obtenidos sugieren que en condiciones fisiológicas (presencia de Ca^{2+} en el medio extracelular), la DM-2 causa una disminución en la actividad de la PMCA durante el pico de la señal de Ca^{2+} , posteriormente esta actividad aumenta durante los tiempos de decaída al 90 y 60% y finalmente, disminuye en la fase tardía a los 600 segundos (Amp600). Efectos contrarios se observan en ausencia de Ca^{2+} extracelular, donde la función de la PMCA aumenta durante el pico y se reduce en los tiempos de decaída al 90 y 60% del transiente.

9.8. Efecto de la DM-2 sobre la actividad del NCX en CMLV en cultivo de aorta de rata

9.8.1. Efecto de la DM-2 sobre la actividad del NCX en presencia de Ca^{2+} en el medio extracelular

En la **Figura 23A** se muestran las medias de los registros de la señal de Ca^{2+} evocada por ATP en presencia de SEA0400, un inhibidor selectivo del NCX, en CMLV de aorta de ratas OZDF (línea continua roja) y LZDF (línea continua azul), así como sus controles en ausencia del inhibidor (línea punteada azul para LZDF y línea punteada roja para OZDF). Estos experimentos fueron realizados en presencia de Ca^{2+} extracelular. En el grupo LZDF, el bloqueo del NCX con SEA0400 causó una reducción significativa de la amplitud del pico del transiente (LZDF Ctrl: 0.7324 ± 0.03 vs LZDF SEA0400: 0.5856 ± 0.01) (**Figura 23B, izquierda**). El valor de Amp600 se encontró incrementado significativamente (LZDF Ctrl: 0.01616 ± 0.01 vs LZDF SEA0400: 0.04685 ± 0.007) (**Figura 23C, izquierda**). No se hallaron diferencias estadísticas en los tiempos de decaída al 90 (LZDF Ctrl: 6.856 ± 0.50 vs LZDF SEA0400: 5.978 ± 0.25) y 30% (LZDF Ctrl: 174.0 ± 8.54 vs LZDF SEA0400: 182.7 ± 6.33), sin embargo, el tiempo al 60% (LZDF Ctrl: 71.12 ± 6.19 vs LZDF SEA0400: 52.29 ± 2.61) se encontró reducido significativamente (**Figura 23D**). El área bajo la curva se redujo significativamente bajo esta condición (LZDF Ctrl: 132.1 ± 10.13 vs LZDF SEA0400: 98.28 ± 3.6) (**Figura 23E**). Por otro lado, en el grupo OZDF no hubo diferencias estadísticas en los valores de amplitud del pico en presencia del inhibidor (OZDF Ctrl: 0.6860 ± 0.03 vs OZDF SEA0400: 0.7115 ± 0.01) (**Figura 23B, izquierda**), sin embargo, el valor de Amp600 se redujo significativamente (OZDF Ctrl: 0.1280 ± 0.01 vs OZDF SEA0400: 0.05172 ± 0.007) (**Figura 23C, derecha**). Los tiempos de decaída al 90 (OZDF Ctrl: 4.855 ± 0.21 vs OZDF SEA0400: 7.027 ± 0.3), 60 (OZDF Ctrl: 40.07 ± 4.03 vs OZDF SEA0400: 70.40 ± 3.7) y 30% (OZDF Ctrl: 174.3 ± 11.28 vs OZDF SEA0400: 220.8 ± 7.92) se encontraron aumentados significativamente (**Figura 23D, derecha**). No encontramos diferencias estadísticas en los valores de área bajo la curva (OZDF Ctrl: 134.3 ± 8.42 vs OZDF SEA0400: 136.8 ± 4.88) (**Figura 23E, derecha**).

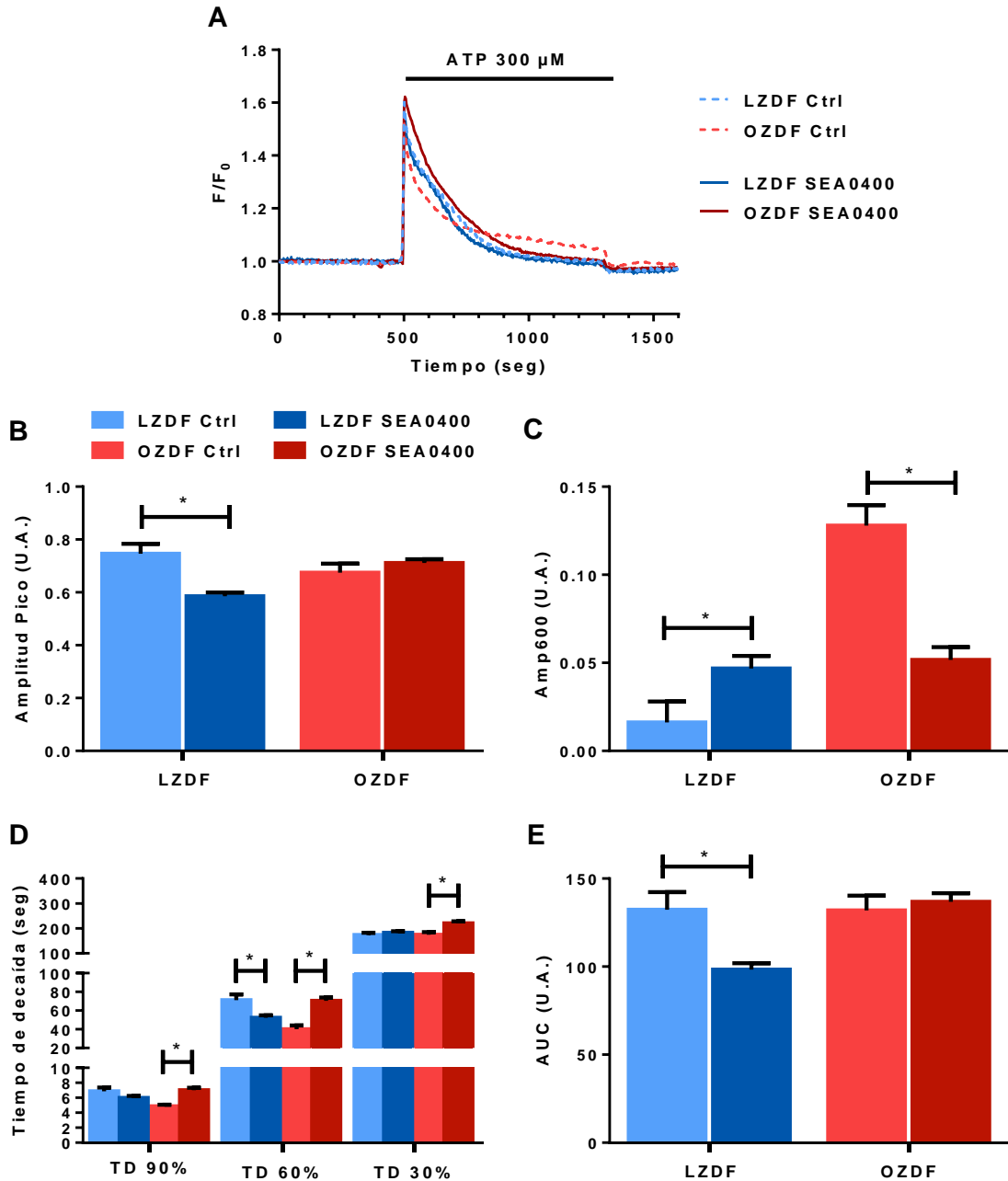


Figura 23. Efecto de la inhibición del NCX sobre el transiente de Ca^{2+} evocado por ATP en presencia de Ca^{2+} extracelular en CMLV. Registros medios de la señal de Ca^{2+} evocada por ATP en presencia de SEA0400 (3 μM), un inhibidor del NCX, en CMLV obtenidas de aorta de ratas LZDF (línea continua azul) y OZDF (línea continua roja) y sus respectivos controles (línea punteada azul para LZDF y línea punteada roja para OZDF). Para fines comparativos, los registros fueron normalizados empleando la fórmula F/F_0 (A). Media \pm ES de: amplitud del pico (B), amplitud 600 seg después de la aplicación del agonista (Amp600) (C), tiempos de decaída (D) y área bajo la curva (AUC) del transiente de Ca^{2+} evocado por ATP (E). La comparación entre grupos se realizó empleando la prueba estadística t-test ($n=6$ por grupo experimental, $* = p \leq 0.05$).

Finalmente, al realizar la comparación entre grupos, observamos que la inhibición del NCX con SEA0400 en presencia de Ca^{2+} extracelular causó un incremento significativo en la amplitud del pico del transiente evocado por ATP en el grupo OZDF (LZDF: 0.7995 ± 0.01 vs OZDF: 1.037 ± 0.02) (**Figura 24A, izquierda**). Asimismo, esta maniobra indujo una reducción en la amplitud de la etapa tardía de la decaída de la señal (Amp600) en OZDF (LZDF: 2.899 ± 0.44 vs OZDF: 0.4041 ± 0.05) (**Figura 24A, derecha**). Los tiempos de decaída tanto al 90 (LZDF: 0.8719 ± 0.03 vs OZDF: 1.447 ± 0.06), como al 60 (LZDF: 0.7352 ± 0.03 vs OZDF: 1.757 ± 0.09) y 30% (LZDF: 1.05 ± 0.03 vs OZDF: 1.267 ± 0.04) (**Figura 24B**), así como el valor de área bajo la curva (LZDF: 0.744 ± 0.02 vs OZDF: 1.019 ± 0.03) se encontraron aumentados en el grupo OZDF (**Figura 24C**).

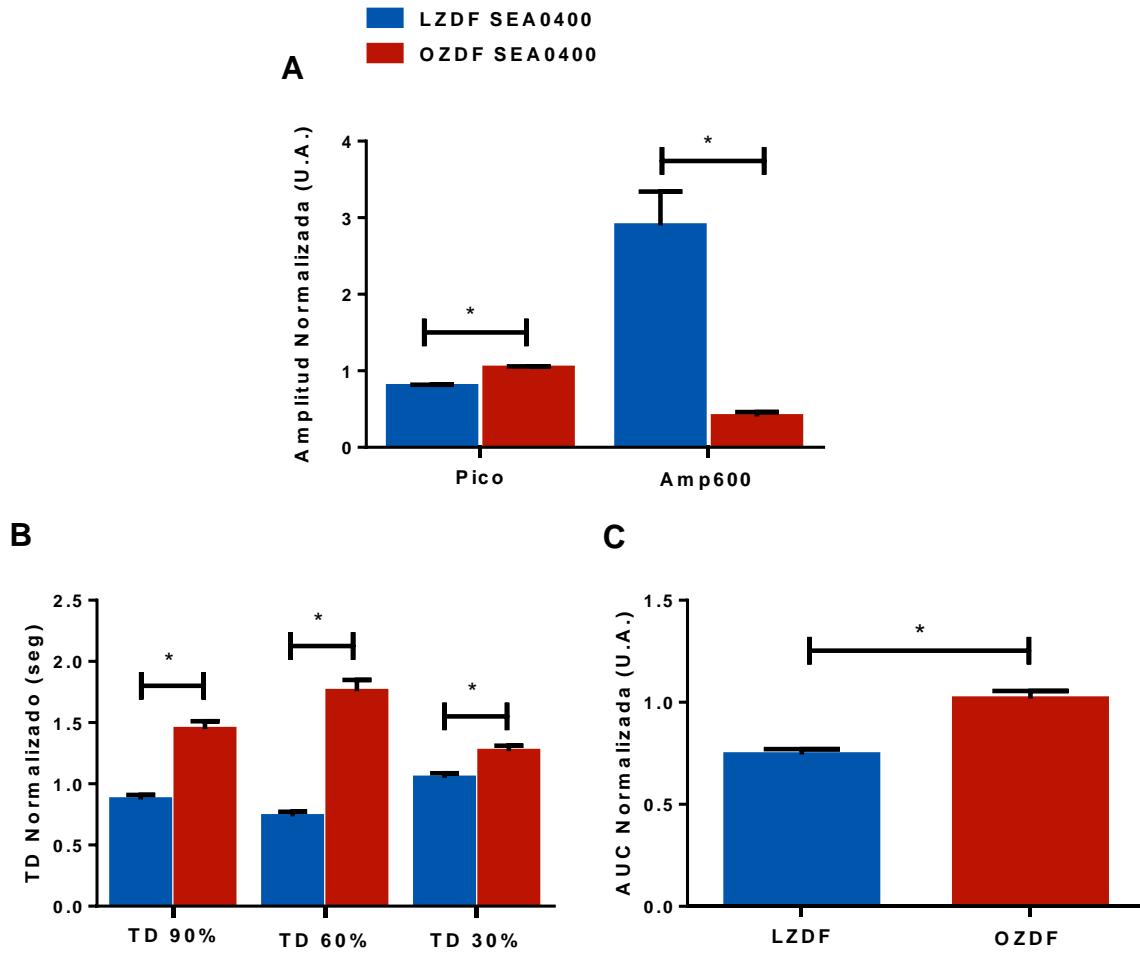


Figura 24. Efecto de la DM-2 sobre la actividad del NCX en presencia de Ca^{2+} extracelular en CMLV. Media \pm ES de: amplitud del pico (**A, izquierda**), amplitud 600 seg después de la aplicación del agonista (Amp600) (**A, derecha**), tiempos de decaída (**B**) y área bajo la curva (AUC) (**C**) del transiente de Ca^{2+} evocado por ATP en presencia de SEA0400 (3 μM), un inhibidor del NCX, en CMLV de ratas LZDF (barras azules) y OZDF (barras rojas). La comparación entre grupos se realizó empleando la prueba estadística t-test ($n=6$ por grupo experimental, $* = p \leq 0.05$).

9.8.2. Efecto de la DM-2 sobre la actividad del NCX en ausencia de Ca^{2+} en el medio extracelular

En la **Figura 25A** se muestran las medias de los registros de la señal de Ca^{2+} evocada por ATP en presencia de SEA0400 en CMLV de aorta de ratas OZDF (línea continua roja) y LZDF (línea continua azul), así como sus controles en ausencia del inhibidor (línea punteada azul para LZDF y línea punteada roja para OZDF) en una solución libre de Ca^{2+} extracelular.

En el grupo LZDF, la inhibición del NCX con SEA0400 en ausencia de Ca^{2+} extracelular causó una reducción significativa de la amplitud del pico del transiente (LZDF Ctrl: 0.6529 ± 0.02 vs LZDF SEA0400: 0.5088 ± 0.012) (**Figura 25B, izquierda**). Asimismo, el valor de la amplitud de la etapa tardía de la fase de decaída (Amp600) fue significativamente mayor en presencia del inhibidor (LZDF Ctrl: -0.06782 ± 0.003 vs LZDF SEA0400: -0.03115 ± 0.003) (**Figura 25C, izquierda**). Los tiempos de decaída al 90 (LZDF Ctrl: 4.570 ± 0.27 vs LZDF SEA0400: 8.131 ± 0.41), 60 (LZDF Ctrl: 28.35 ± 1.43 vs LZDF SEA0400: 46.34 ± 1.48) y 30% (LZDF Ctrl: 80.39 ± 3.2 vs LZDF SEA0400: 95.42 ± 2.72) se encontraron incrementados significativamente (**Figura 25D**), mientras que el área bajo la curva se redujo bajo dichas condiciones (LZDF Ctrl: 57.94 ± 3.13 vs LZDF SEA0400: 41.55 ± 1.52) (**Figura 25E**).

En el caso del grupo OZDF, al inhibir el NCX en Ca_0 , también observamos una reducción significativa de la amplitud del pico de la señal (OZDF Ctrl: 0.5783 ± 0.01 vs OZDF SEA0400: 0.4399 ± 0.01) (**Figura 25B, derecha**), así como un aumento en el valor de Amp600 (OZDF Ctrl: -0.07123 ± 0.002 vs OZDF SEA0400: -0.02227 ± 0.004) (**Figura 25C derecha**), sin embargo, de manera distinta a lo ocurrido en el grupo anterior, los tiempos de decaída al 90 (OZDF Ctrl: 4.894 ± 0.26 vs OZDF SEA0400: 3.908 ± 0.25) y 60% (OZDF Ctrl: 31.33 ± 1.56 vs OZDF SEA0400: 21.75 ± 1.39) se encontraron reducidos significativamente (**Figura 25D**). No hallamos diferencias estadísticas en el tiempo al 30% (OZDF Ctrl: 95.15 ± 3.19 vs OZDF SEA0400: 107.8 ± 6.06) ni en el valor de área bajo la curva (OZDF Ctrl: 48.97 ± 1.85 vs OZDF SEA0400: 48.06 ± 2.62) (**Figura 25E, derecha**).

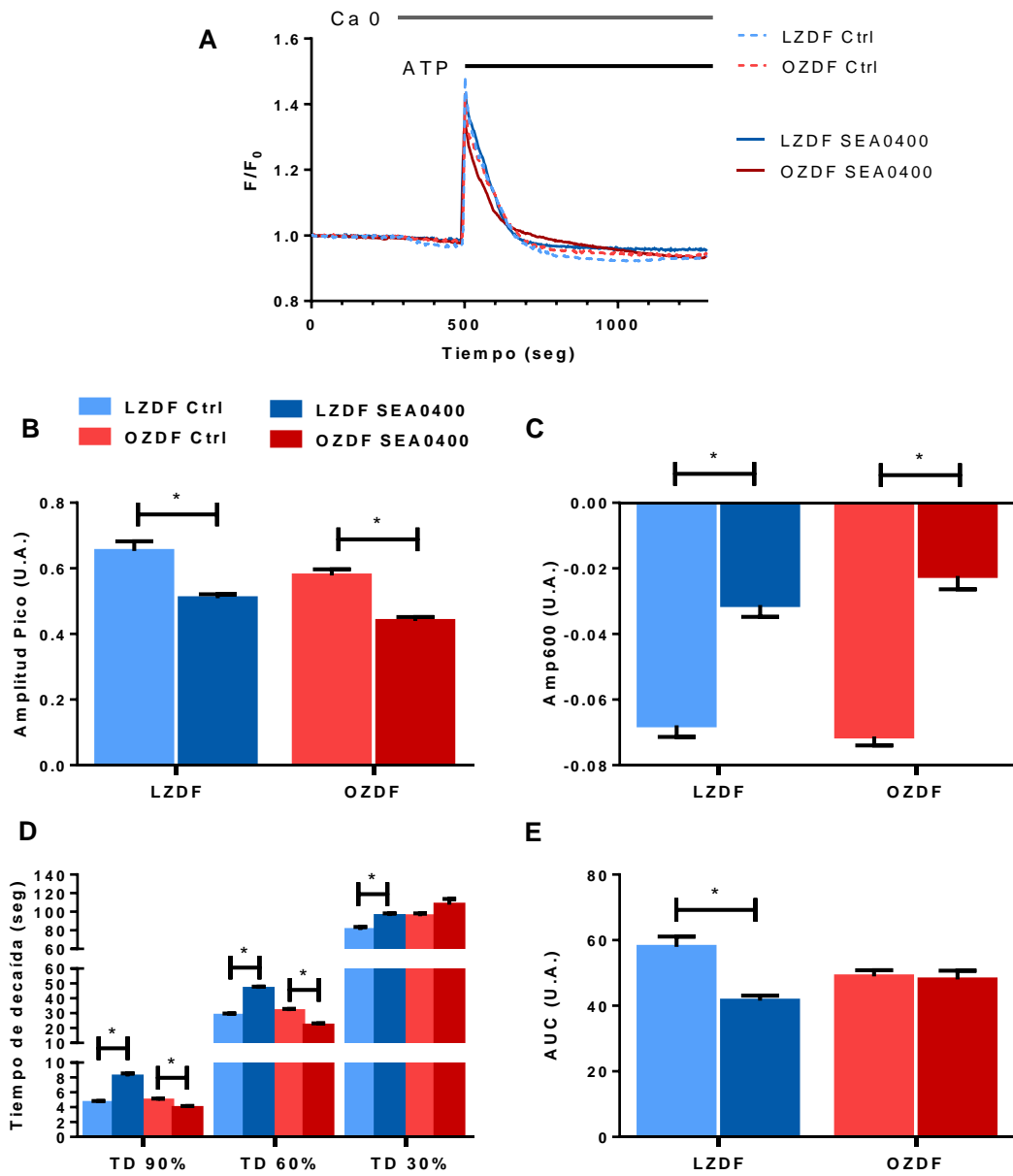


Figura 25. Efecto de la inhibición del NCX en el transiente de Ca^{2+} evocado por ATP en ausencia de Ca^{2+} extracelular. Registros medios de la señal de Ca^{2+} evocada por ATP en presencia de SEA0400 (3 μM) un inhibidor del NCX, en CMLV obtenidas de aorta de ratas LZDF (línea continua azul) y OZDF (línea continua roja) y sus respectivos controles (línea punteada azul para LZDF y línea punteada roja para OZDF) en $\text{Ca}0$ (A). Media \pm ES de: amplitud del pico (B), amplitud 600 seg después de la aplicación del agonista (Amp600) (C), tiempos de decaída (D) y área bajo la curva (AUC) (E) del transiente de Ca^{2+} evocado por ATP. Para fines comparativos, los registros fueron normalizados empleando la fórmula F/F_0 . La comparación entre grupos se realizó empleando la prueba estadística t-test ($n=6$ para LZDF y $n=5$ para OZDF, * = $p \leq 0.05$).

Al realizar la comparación entre ambos grupos experimentales, pudimos observar que durante la inhibición del NCX con SEA0400 en ausencia de Ca^{2+} extracelular no existen diferencias estadísticas en los valores de amplitud del pico (LZDF: 0.7792 ± 0.01 vs OZDF: 0.7607 ± 0.02) y amplitud de la etapa tardía de la decaída (Amp600) (LZDF: -0.4593 ± 0.05 vs OZDF: -0.3127 ± 0.05) del transiente de Ca^{2+} evocado por ATP entre los grupos LZDF y OZDF (**Figura 26A**). Respecto a la fase de decaída de la señal, encontramos una reducción significativa en los tiempos de decaída al 90 (LZDF: 1.779 ± 0.09 vs OZDF: 0.7985 ± 0.05) y 60% (LZDF: 1.634 ± 0.05 vs OZDF: 0.6943 ± 0.04) en OZDF. No se encontraron diferencias significativas entre grupos en el tiempo de decaída al 30% (LZDF: 1.187 ± 0.03 vs OZDF: 1.138 ± 0.06) (**Figura 26B**). Finalmente, el área bajo la curva se encontró aumentada significativamente en OZDF (LZDF: 0.7172 ± 0.02 vs OZDF: 0.9814 ± 0.05) (**Figura 26C**).

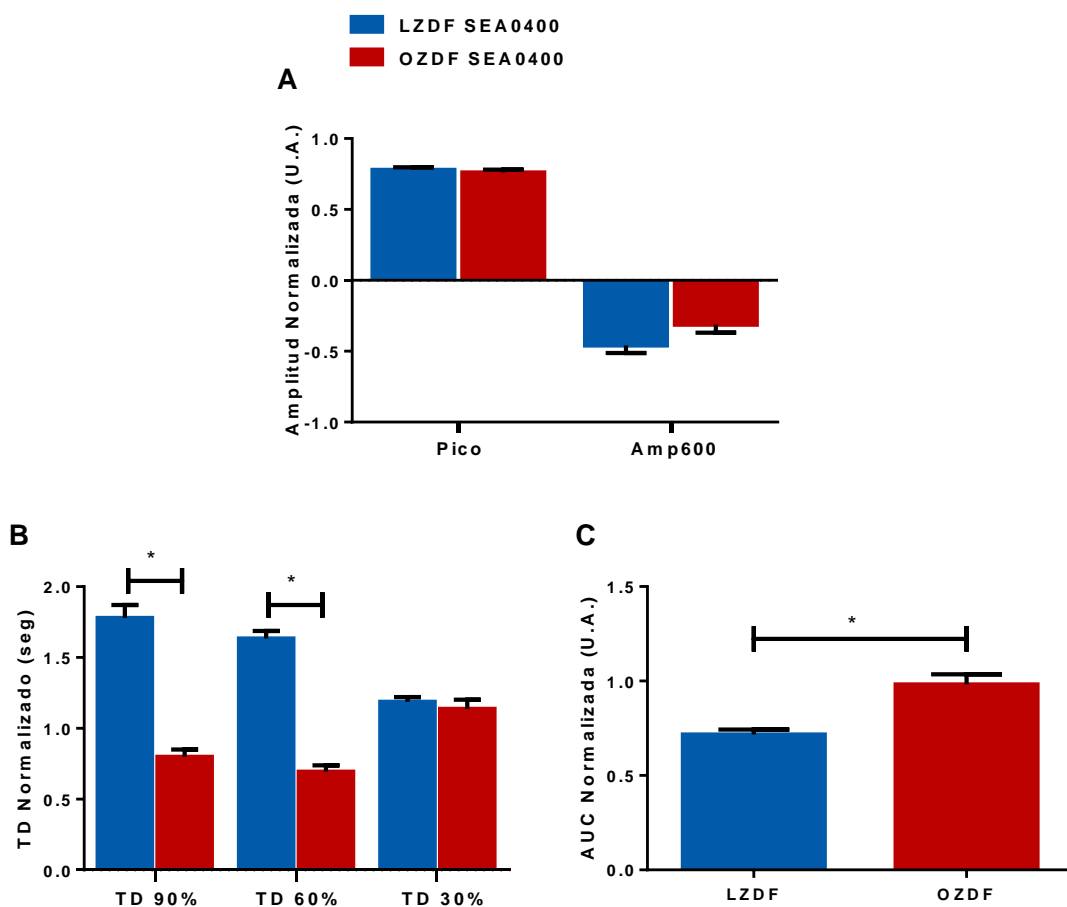


Figura 26. Efecto de la DM-2 sobre la actividad del NCX en ausencia de Ca^{2+} extracelular en CMLV. Media \pm ES de: amplitud del pico (**A, izquierda**), amplitud 600 seg después de la aplicación del agonista (Amp600) (**A, derecha**), tiempos de decaída (**B**) y área bajo la curva (AUC) (**C**) del transiente de Ca^{2+} evocado por ATP en presencia de SEA0400 (3 μM), un inhibidor del NCX, en CMLV de ratas LZDF (barras azules) y OZDF (barras rojas) en Ca^0 . La comparación entre grupos se realizó empleando la prueba estadística t-test (n=6 para LZDF y n=5 para OZDF, * = $p \leq 0.05$).

En resumen, los resultados obtenidos sugieren que en condiciones fisiológicas (presencia de Ca^{2+} en el medio extracelular), la DM-2 causa un aumento en la actividad del NCX durante el pico de la señal de Ca^{2+} , así como durante la etapa temprana de decaída del transiente (90, 60, 30%). Además, existe una disminución de su actividad durante la etapa tardía de la misma (Amp600). Efectos contrarios se observan en ausencia de Ca^{2+} extracelular, ya que bajo esta condición se reduce la función del NCX únicamente al tiempo de decaída al 90 y 60% del transiente.

10. DISCUSIÓN

10.1. Caracterización del modelo animal

Las ratas de la cepa Zucker Diabetic Fatty fueron proporcionadas por el Bioterio Claude Bernard de nuestra Universidad. Cuando las ratas macho alcanzaron los 3-4 meses de edad, fueron separadas por el personal del bioterio con base al fenotipo que presentan, en dos grupos experimentales distintos: ratas LZDF (fenotipo delgado, control sano) y ratas OZDF (fenotipo obeso, grupo diabético). Tal y como se aprecia en la **Figura 9**, a los 3 meses de edad es claramente notoria, a simple vista la diferencia de tamaño entre las ratas del grupo LZDF respecto a las del grupo OZDF, siendo el tamaño de este último grupo considerablemente mayor. Con la finalidad de cuantificar las diferencias morfológicas, notorias a simple vista, procedimos a determinar los valores de peso, longitud y circunferencia abdominal. Todos los parámetros antes señalados resultaron aumentados significativamente en el grupo OZDF respecto al grupo LZDF. La diferencia en el peso se correlaciona con lo reportado previamente por otros grupos de investigación (Fridlyand & Philipson, 2006; Tirmenstein et al., 2015). Dado a que el aumento en el peso podría ser atribuido a un aumento en el tamaño de la rata (a su longitud), procedimos a calcular el IMC para descartar que las diferencias vistas en el peso se debieran a la diferencia de tamaño entre ambos grupos. Del mismo modo, el valor medio del IMC resultó estadísticamente mayor en las ratas OZDF comparado con el grupo LZDF, sugiriendo que el aumento de peso se debe a la obesidad que ha sido ampliamente reportada en la literatura en esta cepa de ratas (Al-awar et al., 2016; King & Bowe, 2016; Shiota & Printz, 2012; Y.-W. Wang et al., 2013). La presencia de obesidad en las ratas OZDF fue demostrada por el incremento del 405% en el tejido adiposo formado alrededor del epidídimo. Con todo esto, podemos afirmar que, de acuerdo a lo reportado en la literatura, las ratas OZDF presentan obesidad a la edad de 3-4 meses. Asimismo, se sabe que al igual que la obesidad, tanto la hiperlipidemia como la resistencia a la insulina aparecen a una edad temprana (7 semanas), sin embargo, esta última es compensada por una mayor secreción de insulina. A

medida que la enfermedad progresa, aumenta la pérdida de las células β -pancreáticas, lo cual finalmente conlleva al desarrollo de hiperglicemia aproximadamente a las 10 semanas de edad (Al-awar et al., 2016; Shiota & Printz, 2012). Para cerciorarnos de que las ratas que empleamos en nuestros protocolos experimentales en efecto presentan DM-2, determinamos los parámetros bioquímicos de glucosa basal, prueba de tolerancia a la glucosa (2 hr), HDL, LDL, VLDL y triglicéridos. Tanto los niveles de glucosa basal, como de glucosa a las 2 hrs (prueba de tolerancia), se encontraron elevados en OZDF. Cabe mencionar que, en el caso de la glucosa basal, los valores para ambos grupos fueron superiores a 126 mg/dL, lo cual indicaría la presencia de hiperglicemia, según los criterios de diagnóstico indicados por la ADA (American Diabetes Association, 2018) y descritos en la **Tabla 1**. Sin embargo, atribuimos estos valores al efecto hiperglicemiante propio del anestésico que utilizamos (ketamina/xilacina), dicho efecto ha sido reportado por otros investigadores (Xia, Grondin, Jakubowski, & Lilly, 2005). A pesar de esto, aún bajo dichas circunstancias, fue posible apreciar el aumento significativo en la glucosa basal del grupo OZDF en comparación al grupo control. Esta información nos permite corroborar que las ratas OZDF presentan hiperglicemia e intolerancia a la glucosa, ambos criterios que, de acuerdo con la ADA, son suficientes para diagnosticar DM-2 en humanos, permitiendo aseverar que las ratas OZDF, en efecto, desarrollan DM-2. Además de la glucemia, también se encontraron elevados los niveles plasmáticos de colesterol, triglicéridos y VLDL, siendo evidente la presencia de hiperlipidemia en estos animales; otra característica típica del perfil diabético. El metabolismo de lípidos alterado, en conjunto con la hiperglicemia aumentan considerablemente el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (Chait & Bornfeldt, 2009).

10.2. Efecto de la DM-2 sobre la señal de Ca^{2+} intracelular evocada por ATP en CMLV en cultivo de aorta de rata

Los experimentos mostrados en la **Figura 10**, confirman la hipótesis planteada en la presente tesis, en efecto, la DM-2 altera la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en CMLV de aorta de rata. En particular, la DM-2 causa dos efectos

importantes sobre el transiente de Ca^{2+} evocado por la aplicación del agonista vasoactivo, ATP (300 μM) a CMLV en cultivo, obtenidas de ratas OZDF: 1) una disminución significativa de los tiempos de decaída al 90 y 60% de la amplitud del transiente (etapa temprana de la fase de decaída de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$) y 2) un aumento significativo en la amplitud de la meseta (etapa tardía de la decaída de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$) en el grupo OZDF.

Con respecto al acortamiento de la fase inicial del transiente este podría ser debido por alteraciones en el funcionamiento de los mecanismos que disminuyen la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Resultados obtenidos por Gómez-Pinilla y Cols., en células de músculo liso detrusor de vejiga de cobayo (Gomez-Pinilla, Pozo, Baba, Matsuda, & Camello, 2007) demuestran que el NCX es el mecanismo que tiene una mayor contribución (56%) en la decaída de la señal de Ca^{2+} inducida por KCl. Esta dominancia se mantiene durante todas las fases de la misma (inicial, intermedia y lenta). Después del NCX se encuentra la SERCA con un estimado del 31% y finalmente la PMCA, con un 27%. Estos últimos parecen tener una mayor actividad durante la etapa inicial de la decaída del transiente. Cabe mencionar que la razón por la cual la suma de estos porcentajes excede el 100%, se debe a que existen interacciones entre los 3 mecanismos, pues durante la remoción de Ca^{2+} del medio intracelular, estos transportadores no operan de manera independiente o aislada, sino más bien funcionan simultáneamente en un *modo cooperativo*. Esto coincide con lo reportado por Goto y Cols., sobre la decaída de la señal evocada por histamina en células endoteliales humanas de aorta (Goto, Miura, & Iijima, 1996).

Con respecto al segundo efecto, el aumento de la fase de meseta visto en OZDF, podría estar dado ya sea por una reducción en los mecanismos que remueven Ca^{2+} o bien, por un incremento de la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular a través de mecanismos como son los canales TRPC, SOC y/o el NCX (funcionando en modo reverso). Existe evidencia de que la DM-2 afecta la función de los canales TRPC; en un estudio realizado en CMLV en cultivo de ratas Goto-Kakizaki, otro modelo animal de DM-2, se reportó un incremento en la

actividad de los canales TRPC1/4/5, lo cual produce un aumento en la entrada de Ca^{2+} inducida por Angiotensina II (Evans, Lee, & Ragolia, 2009). Típicamente, la apertura de los canales TRPC se asocia a la contracción del músculo liso vascular, debido a entrada de Na^+ y Ca^{2+} que trae como consecuencia un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, dado tanto directamente por estos canales como por la consecuente apertura de canales Ca_v (Breemen, Fameli, & Evans, 2013). Paradójicamente, algunas isoformas como TRPC1 se han relacionado con la relajación del músculo liso vascular contráctil, debido a que la entrada de Ca^{2+} a través de estos se asocia a la activación de canales BK_{Ca} , los cuales favorecen la hiperpolarización de la membrana plasmática (Kwan et al., 2009). Dado a que en el fenotipo proliferativo de las CMLV se pierde la capacidad contráctil, un aumento en la entrada de Ca^{2+} dado por los TRPC podría asociarse en mayor parte a la proliferación y migración celular durante procesos de reparación vascular y angiogénesis, así como condiciones patológicas que podrían presentarse durante la DM como aterosclerosis (Daskoulidou et al., 2015).

10.3. Efecto de la DM-2 sobre la señal de Ca^{2+} intracelular evocada por ATP en ausencia de Ca^{2+} extracelular en CMLV en cultivo de aorta de rata

Con la finalidad de valorar la participación del Ca^{2+} extracelular en la señal de Ca^{2+} evocada por el ATP, se procedió a la aplicación de 300 μM de ATP, ahora en ausencia de Ca^{2+} en el medio extracelular (Ca_0). Los resultados obtenidos mediante este protocolo se muestran en la **Figura 11** y demuestran, tanto en CMLV obtenidas de animales control (LZDF) como de animales diabéticos-obesos (OZDF), una disminución significativa en todos los parámetros medidos de la señal de Ca^{2+} (amplitud del pico, tiempos de decaída al 90, 60 y 30 % de la amplitud del transiente, así como del AUC). Estos resultados concuerdan con lo ampliamente reportado en la literatura que demuestra que la señal de Ca^{2+} inducida por la activación de receptores (ROCE) es acompañada por la subsecuente entrada de Ca^{2+} del medio extracelular, la cual ocurre tanto durante la fase inicial del transiente de Ca^{2+} (pico) y sobre todo, durante la etapa tardía de la decaída del mismo (meseta) (Moccia, 2012; Trebak & Putney, 2017; Y. Wang, Deng,

Hewavitharana, Soboloff, & Donald, 2013; Yamamura, Yamamura, Zeifman, & Yuan, 2011). En efecto, en Ca⁰ se reduce significativamente la amplitud del pico y desaparece completamente la meseta en ambos grupos experimentales (LZDF y OZDF). Aunque estos efectos se observan en CMLV de los dos grupos de ratas, los efectos son más marcados en las ratas OZDF en comparación con las ratas LZDF (ver Figura 11, paneles A y D y Figura 12). En resumen, la DM-2 causa una reducción significativamente mayor en: 1) la amplitud del pico del transiente evocado por ATP y 2) en la amplitud de la meseta en comparación con LZDF.

1) La DM-2 causa una reducción de la amplitud del pico del transiente de Ca²⁺ evocado por ATP en ausencia de Ca²⁺ extracelular. Ha sido ampliamente demostrado que el pico de la señal de Ca²⁺ que genera el ATP al ser aplicado en una solución extracelular carente de Ca²⁺ (Ca⁰), está dada por los siguientes eventos moleculares: unión del ATP a receptores P2Y, activación de la proteína G_q, activación de la PLC, hidrólisis del IP₂ en IP₃ y DAG. Posteriormente el IP₃ causa la apertura de los IP₃R presentes en la membrana del RE y la consecuente liberación de Ca²⁺ del RE hacia el citoplasma dando como resultado final un aumento en la [Ca²⁺]_i. De manera secundaria a este evento, también puede ocurrir, la apertura de canales RyR, que también se encuentran en la membrana del RE. Por lo tanto, el primer efecto visto en Ca⁰, es decir, la reducción de la amplitud del transiente de Ca²⁺ evocado por ATP en ratas OZDF, podría ser debido a la reducción en la expresión o sensibilidad de las moléculas que participan en la vía antes señalada o a una reducción del contenido de Ca²⁺ almacenado en el RE.

Con respecto a los IP₃R, estudios realizados en CMLV provenientes de aorta y arteria femoral de ratas con DM1, así como en CMLV en cultivo expuestas a altas concentraciones de glucosa, mostraron una disminución en la expresión de IP₃R, lo que trajo como consecuencia la atenuación de la señal de Ca²⁺ evocada por vasopresina (Searls, Loganathan, Smirnova, & Stehno-bittel, 2010). Por el contrario, en CMLV en cultivo de aorta de ratones con DM-2 se observó que la excitabilidad de estos canales se encontraba aumentada, resultando en un

aumento en la señal de Ca^{2+} en respuesta a IP_3 (Velmurugan & White, 2012). Estas discrepancias en los resultados podrían deberse a factores como el modelo experimental empleado, tipo de vasos sanguíneos de donde se aislaron las células, progresión de la DM, etc. Sin embargo, ya que algunos de estos estudios apuntan a la existencia de una disminución en la expresión y actividad de estos canales, no podemos descartar ésta como una posibilidad para explicar la atenuación de la señal de Ca^{2+} evocada por ATP en ausencia de Ca^{2+} extracelular que observamos en nuestros experimentos en el grupo OZDF.

Por otro lado, en cuanto a los RyR, en el caso del fenotipo proliferativo de las CMLV, se ha reportado que la desdiferenciación de estas células causa una disminución o pérdida total de éste tipo de receptores (Berra-Romani, Mazzocco-Spezia, Pulina, & Golovina, 2008; S. J. House, Potier, Bisailon, Singer, & Trebak, 2008). De acuerdo con estos datos, experimentos realizados en nuestro laboratorio demuestran que la aplicación de cafeína 10 mM como agonista de los RyR a CMLV, no causa modificaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal en estas células (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que la participación de estos receptores es nula o no significativa en la señal de Ca^{2+} evocada por ATP en estas células.

Con respecto a los receptores purinérgicos, se ha reportado que en CMLV en cultivo (fenotipo proliferativo) existe una pérdida de los receptores P2X, los cuales son de carácter ionotrópico. Estos son reemplazados por receptores P2Y₂ (metabotrópicos). Además, se sabe que los subtipos P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ y P2Y₆ no sólo se encuentran presentes en el fenotipo sintético de las CMLV, sino que evocan señales de Ca^{2+} con características distintas entre sí (Govindan & Taylor, 2012). Los efectos que genera el ATP en las CMLV son dependientes de factores como la concentración de éste agonista y el tipo de receptores que están siendo activados. A bajas concentraciones, el ATP es capaz de incrementar la actividad del factor SRF, el cual activa la transcripción de genes específicos del fenotipo contráctil. Por el contrario, cuando las concentraciones de ATP son elevadas, ocurre el efecto inverso, inhibiéndose la actividad del factor SRF y por tanto, la expresión de proteínas características del fenotipo contráctil, dando lugar a la

transición hacia el fenotipo sintético/proliferativo. Asimismo, se encuentra descrito que el ATP posee efectos mitogénicos a través de la activación de PKA, lo cual induce la síntesis de DNA, y por tanto, incrementa la proliferación celular (Erlinge, 2004; Ralevic & Dunn, 2015). Es poco lo que se conoce respecto a la función, distribución y expresión de los receptores P2Y en el músculo liso vascular durante la DM. En músculo liso de arterias coronarias de cerdos diabéticos y dislipidémicos se encontró que existe un aumento en la expresión de receptores P2Y funcionales, lo cual fue capaz de inducir la formación de placas ateroscleróticas a través de la migración de las CMLV. Con esto se demostró que tanto la DM como la hiperlipidemia actúan de manera sinérgica durante el desarrollo de aterosclerosis. (Seye et al., 2007). Contrario a estos hallazgos, en nuestros experimentos la señalización purinérgica vía receptores P2Y no parece estar aumentada en el grupo OZDF, debido a que encontramos una atenuación en la respuesta a ATP. Sin embargo, no podríamos descartar completamente la existencia de alteraciones en esta vía que pudieran estar influyendo en el manejo del Ca^{2+} intracelular. Finalmente, no podemos tampoco descartar, que esta reducción de la amplitud del pico de Ca^{2+} , sea debida a una disminución en la expresión o actividad de la G_q y PLC o producción de DAG. La posibilidad de que este efecto sea debido a una reducción del contenido de Ca^{2+} almacenado en el RE, se aborda de manera particular más adelante.

2) La DM-2 causa una reducción en la amplitud de la meseta activada por ATP en ausencia de Ca^{2+} extracelular. Dado a que la fase de meseta en la rata OZDF fue un 695% mayor a la de las ratas LZDF (**Figura 10**) y dado a que los experimentos en Ca_0 demuestran que esta fase de meseta es debida a la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular, podemos concluir que **la DM causa un incremento en la entrada de Ca^{2+} en células estimuladas con ATP.** Como se ha descrito en párrafos anteriores, las posibles vías de entrada de Ca^{2+} del medio extracelular a través de la membrana de las CMLV son: los canales P2X, canales TRPC, el modo reverso del NCX y a través del fenómeno de la SOCE. En esta tesis, se evaluó el efecto de la DM-2 sobre la entrada de Ca^{2+} a través de los SOCs y se discute a continuación.

10.4. Efecto de la DM-2 sobre la entrada de Ca^{2+} operada por almacenes intracelulares (SOCE) en CMLV en cultivo de aorta de rata

En la literatura se encuentra descrito que la SOCE es el principal mecanismo responsable de introducir Ca^{2+} desde el medio extracelular en el fenotipo proliferativo de las CMLV estimuladas con agonistas vasoactivos (Ong & Ambudkar, 2017). Existe evidencia de que la DM altera tanto el funcionamiento como la expresión de los componentes de la SOCE (proteínas STIM1 y Orai1), sin embargo la forma en la que esto ocurre parece depender de varios factores como el tipo de DM, progreso de la enfermedad, segmento de los vasos sanguíneos y especie (humano, rata, ratón, etc.) (Fernández-velasco, Ruiz-hurtado, Gómez, & Rueda, 2014). Dados los resultados presentados en el apartado anterior y con la finalidad de determinar si en CMLV de ratas OZDF existen alteraciones en la SOCE, procedimos a vaciar el RE con CPA en Ca_0 para, posteriormente, poder inducir la apertura de los SOC. El CPA es un bloqueador de la SERCA, y por ende, inhibe la recaptura de Ca^{2+} del RE, lo cual trae como consecuencia la liberación pasiva de dicho ion a través de canales de fuga presentes en la membrana de este almacén intracelular (**ver sección 7.5 de material y métodos**). Este vaciamiento pasivo puede observarse en el registro como un aumento lento de la fluorescencia (**ver Figura 13, panel A**) que es proporcional al contenido de Ca^{2+} almacenado en el RE. En estos experimentos no encontramos diferencias en la amplitud de la señal evocada por CPA entre OZDF y LZDF (**ver Figura 13, panel B**), lo cual indica que las alteraciones vistas en la señalización del Ca^{2+} intracelular en OZDF, no están dadas por diferencias en el contenido de Ca^{2+} del RE. Esta información coincide con los resultados obtenidos por Velmurugan y colaboradores, quienes tampoco encontraron diferencias en el contenido de Ca^{2+} del RE en un modelo de DM-2 (Velmurugan & White, 2012). Después de inducir el vaciamiento del RE, añadimos nuevamente Ca^{2+} al medio extracelular para inducir la apertura de los canales SOC y evaluar así la SOCE, sin embargo, no hallamos diferencias en amplitud, área bajo la curva ni tiempos de decaída entre las ratas OZDF y LZDF. Esto difiere con lo reportado por otros investigadores en distintos modelos de DM, en los cuales, tanto en ratas tratadas con STZ, como en ratas de

la cepa Goto-Kakizaki, y CMLV expuestas a altas concentraciones de glucosa, se encontró una disminución en la SOCE (Chaudhari & Ma, 2016a; El-najjar, Kulkarni, Nader, Hodeify, & Machaca, 2017). Debido a que existe la posibilidad de que los resultados que encontramos en este protocolo experimental pudieran estar influenciados por la participación de los mecanismos de remoción de Ca^{2+} intracelular, procedimos a evaluar el funcionamiento de los canales SOC de manera particular. Para ello empleamos el apagado de la fluorescencia o *quenching* del Fura-2 con Mn^{2+} . Bajo estas condiciones, encontramos que existe un aumento en la velocidad de entrada de Mn^{2+} a través de los SOC en OZDF (**Figura 14**). Estos resultados nos permiten concluir que, efectivamente, la DM-2 causa un aumento en la actividad y/o expresión de los canales SOC en CMLV. El hecho de que en los resultados de los experimentos mostrados en la **Figura 13** no observemos este último resultado podría deberse a la actividad compensatoria de otros mecanismos, como podrían ser aquellos que remueven el Ca^{2+} del medio intracelular. Debido a esto, la siguiente parte de esta tesis, consistió en evaluar las afectaciones que genera la DM-2 sobre la función de cada uno de los mecanismos que se encargan de disminuir la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, de forma individual utilizando las herramientas farmacológicas específicas con las que contamos al día de hoy, para bloquear el funcionamiento de cada una de estas moléculas y así ver su participación en la señal de Ca^{2+} evocada por el agonista ATP. Tal y como se menciona en la sección de Antecedentes Generales, los principales mecanismos encargados de remover el Ca^{2+} intracelular son la SERCA, la PMCA y el NCX.

10.5. Efecto de la DM-2 sobre la actividad de la SERCA en CMLV en cultivo de aorta de rata

Al inhibir la SERCA empleando CPA, durante la estimulación con ATP en presencia de Ca^{2+} extracelular, pudimos observar un alargamiento de la fase de decaída del mismo en ambos grupos experimentales (**ver Figura 15, paneles A y D**). Sin embargo, este efecto fue mayor durante etapas tempranas de la fase de decaída en OZDF (**ver Figura 16B**). Esto, aunado al aumento visto en la amplitud del pico en dicho grupo, indica que la remoción de Ca^{2+} por parte de la SERCA se

encuentra incrementada en fases iniciales del transiente, y afecta tanto la fase del pico, como la etapa temprana de la decaída del transiente de Ca^{2+} en OZDF (**ver Figura 16 paneles A y B**). Además de esto, en este mismo grupo observamos una aceleración de la etapa tardía de la decaída del transiente respecto a LZDF, reflejado como una disminución en el valor de Amp600 (**ver Figura 16A, derecha**). Este último resultado es consistente con lo visto en este mismo protocolo realizado en ausencia de Ca^{2+} extracelular, en el cual también se observó un acortamiento de la etapa tardía de la decaída de la señal de Ca^{2+} en el grupo OZDF (**ver Figura 18A, derecha**). Aunque, bajo esta condición no encontramos diferencias en los tiempos de decaída al 90 y 60%, la reducción del tiempo al 30% en OZDF pone en evidencia que la disminución en la actividad de la SERCA durante la etapa tardía de comienza a partir de este punto (**ver Figura 18B**). Finalmente, al igual que lo visto en los experimentos realizados en presencia de Ca^{2+} extracelular, pudimos observar que la inhibición de la SERCA indujo un aumento en la amplitud del pico en OZDF (**ver Figura 18A, izquierda**) respecto al grupo LZDF. Estos resultados indican que durante la DM-2, la actividad de remoción de Ca^{2+} intracelular por parte de la SERCA durante fases iniciales de la señal se encuentra incrementada. Este fenómeno parece acentuarse en presencia de Ca^{2+} extracelular, sugiriendo que la entrada de Ca^{2+} proveniente del medio extracelular funge como un componente regulatorio de dicho evento. En la literatura, diversos trabajos de investigación han descrito que en varios tipos celulares, entre ellos el músculo liso, algunos segmentos de la membrana del RE y la membrana plasmática se encuentran localizados muy cerca espacialmente (a una distancia de 10-30 nm aproximadamente); estos espacios reciben el nombre de uniones PM-SR (membrana plasmática-retículo sarcoplásmico). Estas uniones facilitan la interacción de la SERCA con los transportadores y canales localizados en la membrana plasmática, los cuales, en su mayoría introducen Ca^{2+} al citosol desde el medio extracelular como son los canales ROC, SOC y Ca_v (Breemen, Fameli, & Evans, 2013). Esta cercanía permite a la SERCA recapturar Ca^{2+} rápidamente hacia el RE en respuesta a la estimulación con un agonista, por lo cual es de esperarse que este mecanismo sea de los primeros en comenzar a

remover Ca^{2+} de la célula cuando existe un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Como mencionamos previamente, nuestros resultados indican que durante la DM-2 existe un aumento en la actividad de los SOC, por lo que el aumento visto en la función de la SERCA al inicio de la señal podría ser un mecanismo compensatorio inmediato para contrarrestar la entrada excesiva de Ca^{2+} proveniente del medio extracelular a través de estos canales. Este incremento en la actividad de la SERCA podría ser responsable, al menos parcialmente, tanto del acortamiento visto durante las etapas iniciales de la fase de decaída de la señal de Ca^{2+} evocada por ATP, como de la disminución en la amplitud del pico del transiente en ausencia de Ca^{2+} extracelular en el grupo OZDF. Paradójicamente, nuestros resultados también apuntan a la existencia de lo que podría ser una disminución en la actividad de este mecanismo durante la etapa tardía de la decaída del transiente en OZDF. La disminución de la actividad de la SERCA en esta etapa se traduciría en una menor remoción de Ca^{2+} , que podría ser la causa del aumento visto inicialmente en la amplitud de la meseta del transiente evocado por ATP en presencia de Ca^{2+} extracelular en OZDF. Cabe resaltar que, aún a pesar de este déficit, el transiente decae hasta los niveles de Ca^{2+} basales en los experimentos realizados en $\text{Ca}0$, lo que significa que la célula sigue siendo capaz de remover el Ca^{2+} citosólico de manera relativamente eficiente, posiblemente debido al aumento en la función de alguno de los mecanismos de remoción restantes (NCX y PMCA) como mecanismo compensatorio.

En resumen, nuestros resultados indican que durante la DM-2 existe un incremento en la actividad de remoción de Ca^{2+} por parte de la SERCA durante fases iniciales del transiente evocado por ATP. Este efecto parece acentuarse cuando existe entrada de Ca^{2+} proveniente del medio extracelular, y posiblemente dicho fenómeno sea un mecanismo compensatorio ante el aumento visto en la actividad de los SOC. Sin embargo, a medida que pasa el tiempo, este aumento inicial en la función de la SERCA se reduce considerablemente, hasta ocasionar un déficit en la remoción de Ca^{2+} durante la etapa tardía de la decaída del transiente. Esta reducción dependiente del tiempo y de la $[\text{Ca}^{2+}]$ nos lleva a concluir que, el aumento en la actividad de la SERCA solo es eficaz durante fases

iniciales del transiente de Ca^{2+} y se vuelve deficiente en la etapa tardía de la fase de decaída del mismo.

En la literatura se ha reportado tanto el aumento como la disminución de la actividad de la SERCA en distintos modelos de DM. Particularmente, en cerdos diabéticos dislipidémicos, Hill y cols. reportaron la existencia de un incremento en la actividad de este mecanismo (Hill, Price, Dixon, & Sturek, 2003), sin embargo, numerosos estudios parecen apuntar más a la presencia del efecto contrario. En particular, en CMLV provenientes de dos modelos distintos de DM-1, Searls y cols. encontraron una disminución en la expresión de las isoformas 2 y 3 de la SERCA, lo que provocó una menor recaptura de Ca^{2+} hacia el RE, y aunado a la reducción de la expresión de IP_3R , disminuyó la respuesta a vasopresina (Searls, Loganathan, Smirnova, & Stehno-bittel, 2010). Lo mismo se observó en una línea celular de músculo liso aorta de rata expuesta a alta glucosa, sin embargo, en este caso no se encontró diferencia alguna en la respuesta a fenilefrina (El-najjar, Kulkarni, Nader, Hodeify, & Machaca, 2017). En el caso de nuestros resultados, la actividad de la SERCA parece tender a estar incrementada de forma inicial, sin embargo, este aumento se ve mermado a medida que transcurre el tiempo y la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ cambia, lo que resulta en una remoción deficiente de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ al final del transiente.

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

10.6. Efecto de la DM-2 sobre la actividad de la PMCA en CMLV en cultivo de aorta de rata

El siguiente mecanismo a evaluar fue la PMCA, la cual fue inhibida con ortovanadato de sodio. En ambos grupos experimentales, en presencia de Ca^{2+} extracelular, el alargamiento sostenido en la última etapa de decaída parece indicar que la PMCA es un mecanismo que tiene mayor participación durante la etapa tardía de la fase de decaída del transiente (**ver Figura 19, paneles A y C**).

Sin embargo, la reducción significativa en el valor de Amp600 vista en OZDF respecto al grupo control (**ver Figura 20A, derecha**), indicaría que la actividad de la PMCA se encuentra reducida en este grupo durante esta etapa de la decaída de la señal de Ca^{2+} . La presencia de un alargamiento sostenido o meseta también pudo apreciarse en ausencia de Ca^{2+} extracelular (**ver Figura 21C**) aunque en este caso no se observó diferencia estadística entre ambos grupos experimentales (**ver Figura 22A, derecha**). Esto indica que las diferencias vistas entre grupos durante la última etapa de la decaída de la señal son dependientes de la concentración de Ca^{2+} extracelular.

Asimismo, en los experimentos realizados en presencia de Ca^{2+} extracelular, observamos una reducción significativa de la amplitud del pico y el área bajo la curva del transiente en OZDF respecto a LZDF (**ver Figura 20 paneles A y C**). Debido a que estamos bloqueando un mecanismo que se encarga de remover el Ca^{2+} no esperábamos ver dicho efecto. Una posible explicación a este fenómeno podría radicar en la inespecificidad del vanadato, el cual, es capaz de inhibir a diversas proteínas como fosfatasa, fosfatasa proteína-fosfotirosina y otras ATPasas, entre ellas la bomba Na^+/K^+ (NKA) (Stein & Litman, 2015). En múltiples estudios se ha demostrado que tanto NKA como los canales TRPC6 y el NCX se co-localizan dentro de las uniones PM-SR en CMLV y en otros tipos celulares (Breemen et al., 2013). Todas estas proteínas están ligadas funcionalmente, debido a interacciones entre sí. Se ha visto que el bloqueo de NKA con ouabaina, induce un aumento de la $[\text{Na}^+]_i$, así como una acumulación de Na^+ en la cara interna de la membrana plasmática (Di Giuro et al., 2017) (Poburko et al., 2007). Estos elementos pueden favorecer el funcionamiento en *modo reverso* del NCX, en el cual el Ca^{2+} entra a la célula (Annunziato, 2013), lo que podría indicar que en OZDF existe una menor entrada de Ca^{2+} a través del NCX en modo reverso en comparación a LZDF. Asimismo, no descartamos que el ortovanadato pueda interactuar con uno o varios elementos capaces de regular la actividad de otros mecanismos que introducen Ca^{2+} a la célula, o bien, que la actividad de la PMCA se encuentre reducida durante esta fase del transiente cuando existe un aumento excesivo de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ debido a la entrada de Ca^{2+}

proveniente del medio extracelular en el grupo OZDF. Contrariamente, en los experimentos realizados en Ca0, encontramos que la amplitud del pico incrementó significativamente en OZDF respecto a LZDF en presencia de vanadato (**ver Figura 22A, izquierda**). Debido a que bajo esta condición el transiente generado está dado exclusivamente por el Ca^{2+} liberado del RE, este resultado indicaría que en OZDF, la PMCA comienza a remover el Ca^{2+} citosólico de manera acelerada en fases muy tempranas del transiente, afectando de esta manera, la amplitud del pico.

En lo que respecta a los tiempos de decaída del transiente, los efectos que observamos son distintos según la presencia o ausencia de Ca^{2+} extracelular. En los experimentos realizados a concentraciones normales de Ca^{2+} extracelular, encontramos un aumento en los tiempos de decaída al 90 y 60% en OZDF, lo cual indicaría que en este grupo la actividad de la PMCA se encuentra incrementada durante la etapa temprana de la decaída del transiente (**ver Figura 20B**). Sin embargo, en ausencia de Ca^{2+} extracelular observamos el efecto contrario, pues los tiempos de decaída al 90 y 60% se encontraron reducidos (**ver Figura 22B**). Estos resultados nuevamente apuntan al Ca^{2+} extracelular como un regulador de la actividad de los mecanismos de remoción de Ca^{2+} , y en este caso, de la PMCA. Mientras que en presencia de Ca^{2+} extracelular la actividad de la PMCA está aumentada, en condiciones de Ca0, este mecanismo no parece tener una participación significativa en la remoción de Ca^{2+} , más que durante la fase del pico en OZDF.

Con estos resultados, podemos concluir que, durante la DM-2 existe un aumento en la actividad de la PMCA durante la etapa temprana de la decaída del transiente evocado por ATP, sin embargo, ya que este fenómeno solo ocurre en presencia de Ca^{2+} extracelular, este también parece ser un mecanismo compensatorio ante la entrada excesiva de Ca^{2+} proveniente del medio extracelular. Dicho fenómeno podría estar participando en la aceleración de la etapa temprana de decaída del transiente evocado por ATP visto inicialmente en OZDF. Esto es consistente con lo reportado en 2009 por Baryshnikov y cols.,

quienes describieron que existe una relación funcional y de expresión entre la PMCA y la SOCE, ya que la inhibición de la expresión de la proteína Orai1, que forma el canal SOC, reduce considerablemente la expresión de la isoforma 1 de la PMCA (PMCA1) (Baryshnikov, Pulina, Zulian, Linde, & Golovina, 2009). Debido a que en nuestros experimentos encontramos que la función de los canales SOC se encuentra aumentada en OZDF, el aumento en la expresión y/o función de la PMCA podría representar un mecanismo compensatorio ante esta primera alteración. De manera similar a lo observado durante la inhibición de la SERCA, al inhibir la PMCA observamos una disminución en la amplitud de la etapa tardía de la decaída del transiente, que sería un indicador de que la actividad de la PMCA se encuentra disminuida durante esta etapa, sin embargo, este efecto no se observó en ausencia de Ca^{2+} extracelular, lo cual nuevamente apunta a que estas alteraciones son completamente dependientes de la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular, y aunque esta disminución podría explicar en parte el aumento en la fase de meseta visto inicialmente, su participación parece ser menor que la de la SERCA.

En la literatura existe muy poca información respecto a cómo la DM-2 afecta la PMCA en CMLV, sin embargo, nuestros resultados coinciden con los reportados por El-Najjar y colaboradores, quienes demostraron que en CMLV expuestas a altas concentraciones de glucosa existe un aumento en la actividad de la bomba PMCA dado por el incremento en la expresión de la proteína PMCA4 (El-najjar, Kulkarni, Nader, Hodeify, & Machaca, 2017). Resultados similares se observaron en arterias coronarias de cerdos diabéticos y dislipidémicos, en las cuales también se encontró un aumento en la actividad de este transportador (Hill, Price, Dixon, & Sturek, 2003).

10.7. Efecto de la DM-2 sobre la actividad del NCX en CMLV en cultivo de aorta de rata

Por último, decidimos evaluar la actividad del NCX mediante la inhibición de dicho mecanismo con SEA0400. En presencia de Ca^{2+} extracelular, la inhibición del NCX indujo efectos distintos en los grupos estudiados. En LZDF observamos

un acortamiento del transiente, en el que se vieron reducidas tanto la amplitud del pico como la etapa temprana de la fase de decaída, sin embargo, la amplitud de la etapa tardía se encontró incrementada. Por el contrario, en OZDF pudimos observar un alargamiento de la etapa inicial de la fase de decaída, seguido de una reducción en la amplitud de la meseta. Al comparar entre grupos, observamos que existe un aumento significativo tanto en la amplitud del pico (**ver Figura 24A, izquierda**), como en los tiempos de decaída al 90, 60 y 30% del transiente de Ca^{2+} evocado por ATP en OZDF respecto a LZDF (**ver Figura 19C**). También observamos un incremento significativo del área bajo la curva en este mismo grupo (**ver Figura 19D**). Esto demuestra que, en presencia de Ca^{2+} extracelular, el NCX funciona en modo directo, removiendo Ca^{2+} del citosol y que, durante la DM-2, esta función de remoción se encuentra aumentada significativamente desde fases iniciales de la señal, tanto en el pico como durante la etapa temprana de la fase de decaída (**ver Figura 19**). Este incremento en la actividad del NCX podría explicar el acortamiento del transiente de Ca^{2+} evocado por ATP, visto en la fase inicial de decaída. Por el contrario, en ausencia de Ca^{2+} extracelular, observamos que estos efectos se invierten, pues los tiempos de decaída al 90% y 60% se redujeron en OZDF (**ver Figura 20C**). Esto podría ser un indicador de que, en este grupo, el aumento en la actividad de remoción de Ca^{2+} por parte del NCX se encuentra estrechamente regulado por la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular y que probablemente, la maniobra de remover el Ca^{2+} de este, active el modo reverso del NCX, el cual introduce Ca^{2+} a la célula. Como se ha descrito en la literatura, la dirección de transporte del NCX depende principalmente del potencial de membrana (V_m) y del gradiente electroquímico de Na^+ y Ca^{2+} . En CMLV de arterias de pequeño calibre, se ha propuesto que en condiciones de reposo el NCX1 media una entrada neta de Ca^{2+} que contribuye al mantenimiento del tono miogénico, sin embargo, el sentido de transporte del NCX puede ser modificado en cualquier momento cuando la célula lo requiera, bajo determinadas condiciones (Annunziato, 2013). Debido a que el aislamiento de las CMLV para fines experimentales trae consigo la pérdida de múltiples factores *in vivo* como son la influencia hormonal, innervación, regulación de la presión transmural y conexiones

intercelulares, se ha propuesto que estas condiciones favorecen el funcionamiento del NCX en modo directo. Existen estudios realizados en CMLV en cultivo que indican que la reducción o inhibición del NCX retrasa la fase de decaída de la señal de Ca^{2+} evocada por un agonista, lo que indicaría que este funciona como un mecanismo que remueve Ca^{2+} (Annunziato, 2013; Slodzinski, Juhaszova, & Blaustein, 1995). Esto coincide con lo observado en nuestros experimentos en CMLV de ratas OZDF en presencia de Ca^{2+} extracelular.

Cabe mencionar que, aunado a los resultados ya descritos, otro efecto importante que observamos fue la reducción significativa de la fase de meseta en OZDF, la cual puede apreciarse tanto en los registros como en la disminución del valor de Amp600 (**Figura 19, paneles A y B**). Este fenómeno se observó sólo en los experimentos realizados en presencia de Ca^{2+} extracelular y podría evidenciar dos posibilidades: ya sea que la función de remoción de Ca^{2+} por parte del NCX se encuentre disminuida durante la última etapa de la decaída, o bien, que en esta etapa del transiente este mecanismo funcione en modo directo, siendo la entrada de Ca^{2+} a través de este transportador, responsable del aumento en la fase de meseta visto en el grupo OZDF.

Hasta la fecha, no hay mucha información disponible sobre el funcionamiento del NCX durante la DM-2 en el músculo liso vascular. Se ha reportado que en CMLV expuestas a alta glucosa no hay alteraciones en la expresión de esta proteína; estos estudios proponen que es la PMCA en realidad, el mecanismo que tiene mayor participación en la remoción de Ca^{2+} en estas células durante la hiperglucemia (El-najjar, Kulkarni, Nader, Hodeify, & Machaca, 2017). Contrariamente a esto, nuestros resultados sugieren que durante la DM-2, existe un aumento en la actividad del NCX durante la etapa temprana de la fase de decaída del transiente de Ca^{2+} evocado por ATP. En realidad, el incremento en la actividad de remoción de Ca^{2+} del NCX podría ser consecuencia del aumento en el funcionamiento y/o expresión de los canales SOC visto en nuestros experimentos (**ver Figura 14**). Esto coincide con lo reportado por Baryshnikov y cols. acerca de que la expresión de Orai1 está estrechamente asociada con la

expresión de la PMCA y el NCX en CMLV en cultivo de aorta de humano. En estos experimentos se demostró que la inhibición de la expresión de Orai1 indujo una disminución en la expresión de las proteínas NCX1 y PMCA1, lo que dio como resultado una reducción en la remoción del Ca^{2+} intracelular. Este fenómeno parece ser un mecanismo para compensar la disminución de la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de los canales SOC (Baryshnikov, Pulina, Zulian, Linde, & Golovina, 2009).

En resumen, la DM-2 altera el funcionamiento del NCX. En particular, existe un incremento en la función de remoción de Ca^{2+} por parte de dicho mecanismo desde fases iniciales del transiente de Ca^{2+} evocado por ATP (pico y etapa temprana de decaída). Este incremento participaría en el acortamiento del transiente visto en la etapa temprana de la decaída en el grupo OZDF. Este fenómeno es reversible cuando se remueve el Ca^{2+} del medio extracelular, lo que convierte a este en un regulador de la función del NCX. Asimismo, la reducción significativa de la meseta vista en OZDF en presencia de SEA0400 a concentraciones normales de Ca^{2+} extracelular sugiere que en esta etapa, el NCX cambia su dirección de transporte hacia el modo reverso, introduciendo Ca^{2+} a la célula. Esta entrada de Ca^{2+} sería responsable, al menos parcialmente, del aumento en la amplitud de la meseta visto inicialmente en el grupo OZDF.

Con los resultados obtenidos en este trabajo, demostramos que durante la DM-2 existe un incremento en la actividad de los canales SOC, el cual es compensado por un aumento en la remoción de Ca^{2+} intracelular, dado en mayor parte por el NCX y en menor medida por la PMCA y la SERCA. Esta remoción de Ca^{2+} excesiva ocurre durante la etapa temprana de la fase de decaída de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, sin embargo, se vuelve insuficiente hacia la etapa tardía de la misma, denotando la incapacidad de estos mecanismos para contrarrestar el incremento en la entrada de Ca^{2+} proveniente del medio extracelular. Esto puede apreciarse como un aumento en la amplitud de la meseta en el grupo OZDF, dado por un conjunto de factores que comprenden: la disminución en el funcionamiento de la SERCA en mayor medida, seguido de la PMCA y el incremento en la entrada de

Ca^{2+} a través del modo reverso del NCX. Aunado a esto, observamos una reducción en la respuesta de Ca^{2+} evocada por ATP proveniente de almacenes intracelulares. Este fenómeno no parece estar dado por diferencias en la cantidad de Ca^{2+} dentro del RE, indicando que probablemente existen alteraciones en la función de los canales que se encargan de liberar Ca^{2+} del RE; en particular los IP_3R y los receptores P2Y, aunque tampoco descartamos que esto se deba al incremento visto en la actividad de los mecanismos de remoción de Ca^{2+} desde la etapa temprana de la decaída de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, en particular la SERCA y la PMCA. Estas alteraciones vistas en la señalización de Ca^{2+} intracelular pueden impactar de manera importante en procesos clave en el funcionamiento, dentro del marco fisiológico y patológico, del músculo liso vascular como es la activación de genes que modulan la proliferación, migración, crecimiento celular, modulación fenotípica y apoptosis.

11. CONCLUSIONES

1. La DM-2 acelera etapa temprana de la fase de decaída e incrementa la amplitud de la meseta de la señal de Ca^{2+} intracelular evocada por ATP en CMLV de aorta de rata.
2. La DM-2 reduce la liberación de Ca^{2+} evocada por ATP proveniente de almacenes intracelulares en CMLV de aorta de rata.
3. La DM-2 aumenta la actividad de los canales SOC, más esto no altera la amplitud global de la SOCE en CMLV de aorta de rata.
4. La DM-2 incrementa la actividad de remoción de Ca^{2+} por parte de la SERCA durante la etapa inicial de la decaída de la señal de Ca^{2+} intracelular evocada por ATP, sin embargo esta actividad se reduce drásticamente durante la etapa tardía de la decaída del transiente.
5. La DM-2 aumenta la remoción de Ca^{2+} dada por la PMCA durante la etapa temprana de la decaída de la señal de Ca^{2+} intracelular evocada por ATP y la disminuye durante la etapa tardía en presencia de Ca^{2+}

extracelular. Este efecto se invierte al remover el Ca^{2+} del medio extracelular.

6. La DM-2 incrementa la actividad de remoción de Ca^{2+} por parte del NCX durante la etapa temprana de la decaída del transiente evocado por ATP en CMLV de aorta de rata y la disminuye durante la etapa tardía de la decaída en presencia de Ca^{2+} extracelular, mientras que en condiciones Ca_0 , esta actividad se reduce durante la etapa temprana de la decaída de la señal.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Abhijit, S., Bhaskaran, R., Narayanasamy, A., Chakroborty, A., Manickam, N., Dixit, M., ... Balasubramanyam, M. (2013). Hyperinsulinemia-induced vascular smooth muscle cell (VSMC) migration and proliferation is mediated by converging mechanisms of mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 373(1–2), 95–105. <http://doi.org/10.1007/s11010-012-1478-5>
- Al-awar, A., Kupai, K., Veszelka, M., Attieh, Z., Murlasits, Z., Török, S., ... Varga, C. (2016). Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models, 2016. <http://doi.org/10.1155/2016/9051426>
- Albert, A. P., Saleh, S. N., Peppiatt-Wildman, C. M., & Large, W. A. (2007). Multiple activation mechanisms of store-operated TRPC channels in smooth muscle cells. *J Physiol*, 5831, 25–36. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.137802>
- Amberg, G. C., & Navedo, M. F. (2014). Calcium dynamics in vascular smooth muscle. *Microcirculation*, 20(4), 281–289. <http://doi.org/10.1111/micc.12046>. Calcium
- American Diabetes Association. (2017). STANDARDS OF MEDICAL CARE IN DIABETES — 2017 Standards of Medical Care in Diabetes d 2017, 40(January).
- American Diabetes Association. (2018). Standards of Medical Care in Diabetes, 41(January). <http://doi.org/https://doi.org/10.2337/dc18-Sint01>
- Annunziato, L. (2013). Sodium Calcium Exchange: A Growing Spectrum of Pathophysiological Implications. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 961.
- Ash, J. F., Morton, D. A., & Scott, S. A. (2013). *Histology: The Big Picture*.
- Baryshnikov, S. G., Pulina, M. V, Zulian, A., Linde, C. I., & Golovina, V. A. (2009). Orai1, a critical component of store-operated Ca²⁺ entry , is functionally associated with Na⁺/Ca²⁺ exchanger and plasma membrane Ca²⁺ pump in proliferating human arterial myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, 297, C1103-12. <http://doi.org/10.1152/ajpcell.00283.2009>.
- Belizário, J. E. (2009). Immunodeficient Mouse Models: An Overview. *The Open Immunology Journal*, 2, 79–85. <http://doi.org/10.2174/1874226200902010079>
- Benitah, J. (2013). Abnormal Ca²⁺ + Spark / STOC Coupling in Cerebral Artery Smooth Muscle Cells of Obese Type 2 Diabetic Mice, 8(1). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0053321>.
- 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 Berra-Romani R, Mazzocco-Spezia A, Pulina MV, Golovina VA. Ca²⁺ handling is altered when arterial myocytes progress from a contractile t. *Am J Physiol Cell Physiol*, 295, 779–790. <http://doi.org/10.1152/ajpcell.00173.2008>.—Phenotypic
- Breemen, C. Van, Fameli, N., & Evans, A. M. (2013). Pan-junctional sarcoplasmic reticulum in vascular smooth muscle: nanospace Ca²⁺ + transport for site- and function-specific Ca²⁺ + signalling, 8, 2043–2054. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.246348>
- Burnham, M. P., Johnson, I. T., & Weston, A. H. (n.d.). Reduced Ca²⁺ -dependent activation of large-conductance Ca²⁺ -activated K⁺ channels from arteries of Type

2 diabetic Zucker diabetic fatty rats.

- Chait, A., & Bornfeldt, K. E. (2009). Diabetes and atherosclerosis: is there a role for hyperglycemia?, 335–339. <http://doi.org/10.1194/jlr.R800059-JLR200>
- Chaudhari, S., & Ma, R. (2016a). Minireview Store-operated calcium entry and diabetic complications, 343–352. <http://doi.org/10.1177/1535370215609693>
- Chaudhari, S., & Ma, R. (2016b). Store-operated calcium entry and diabetic complications. *Experimental Biology and Medicine*, 241, 343–352. <http://doi.org/10.1177/1535370215609693>
- Chung, A. W. Y., Yeung, K. A., Chum, E., Okon, E. B., & Breemen, C. Van. (2009). Diabetes modulates capacitative calcium entry and expression of transient receptor potential canonical channels in human saphenous vein. *European Journal of Pharmacology*, 613(1–3), 114–118. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.04.029>
- 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*. <http://doi.org/10.1007/s00125-003-1178-5>
- Daskoulidou, N., Zeng, B., Berglund, L. M., Jiang, H., Chen, G. L., Kotova, O., ... Xu, S. Z. (2015). High glucose enhances store-operated calcium entry by upregulating ORAI/STIM via calcineurin-NFAT signalling. *Journal of Molecular Medicine*. <http://doi.org/10.1007/s00109-014-1234-2>
- Davis, M. J., Hill, M. A., & Kuo, L. (2008). Local Regulation of Microvascular Perfusion. *Microcirculation*, 161–284. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-374530-9.00006-1>
- Di Giuro, C. M. L., Shrestha, N., Malli, R., Groschner, K., van Breemen, C., & Fameli, N. (2017). Na⁺/Ca²⁺ exchangers and Orai channels jointly refill endoplasmic reticulum (ER) Ca²⁺ via ER nanojunctions in vascular endothelial cells. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 469(10), 1287–1299. <http://doi.org/10.1007/s00424-017-1989-8>
- Dietrich, A., Chubanov, V., Kalwa, H., Rost, B. R., & Gudermann, T. (2006). Cation channels of the transient receptor potential superfamily: Their role in physiological and pathophysiological processes of smooth muscle cells. *Pharmacology and Therapeutics*, 112(3), 744–760. <http://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.05.013>
- El-najjar, N., Kulkarni, R. P., Nader, N., Hodeify, R., & Machaca, K. (2017). Effects of Hyperglycemia on Vascular Smooth Muscle Ca²⁺ Signaling, 2017. <http://doi.org/10.1155/2017/3691349>
- ENSANUT. (2016). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. *Ensanut, 2016*(Ensanut), 1–154. <http://doi.org/10.21149/8593>
- Erlinge, D. (2004). Extracellular ATP: a central player in the regulation of vascular smooth muscle phenotype. Focus on “Dual role of PKA in phenotype modulation of vascular smooth muscle cells by extracellular ATP”. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 287(2), C260-2. <http://doi.org/10.1152/ajpcell.00217.2004>
- Esfandiarei, M., Fameli, N., Choi, Y. Y. H., Tehrani, A. Y., Hoskins, J. G., & van Breemen, C. (2013). Waves of Calcium Depletion in the Sarcoplasmic Reticulum of Vascular Smooth Muscle Cells: An Inside View of Spatiotemporal Ca²⁺ Regulation. *PLoS ONE*. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0055333>
- Evans, J. F., Hee, J., & Ragolia, L. (2009). Molecular and Cellular Endocrinology Ang-II-

- induced Ca²⁺ influx is mediated by the 1 / 4 / 5 subgroup of the transient receptor potential proteins in cultured aortic smooth muscle cells from diabetic Goto-Kakizaki rats, 302, 49–57. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2008.12.004>
- Evans, J. F., Lee, J. H., & Ragolia, L. (2009). Ang-II-induced Ca²⁺ influx is mediated by the 1/4/5 subgroup of the transient receptor potential proteins in cultured aortic smooth muscle cells from diabetic Goto-Kakizaki rats. *Molecular and Cellular Endocrinology*. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2008.12.004>
- Federación Internacional de Diabetes. (2015). *Atlas de la DIABETES de la FID*.
- Fernández-velasco, M., Ruiz-hurtado, G., Gómez, A. M., & Rueda, A. (2014). Cell Calcium Ca²⁺ handling alterations and vascular dysfunction in diabetes. *Cell Calcium*, 56(5), 397–407. <http://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.08.007>
- Fridlyand, L. E., & Philipson, L. H. (2006). Reactive species and early manifestation of insulin resistance in type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 8(2), 136–145. <http://doi.org/10.1111/j.1463>
- Ghosh, D., Syed, A. U., Prada, M. P., Nystoriak, M. A., Santana, L. F., Nieves-Cintrón, M., & Navedo, M. F. (2017). Calcium Channels in Vascular Smooth Muscle. In *Advances in Pharmacology*. <http://doi.org/10.1016/bs.apha.2016.08.002>
- Gomez-Pinilla, P. J., Pozo, M. J., Baba, A., Matsuda, T., & Camello, P. J. (2007). Ca²⁺ extrusion in aged smooth muscle cells. *Biochemical Pharmacology*, 74(6), 860–869. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.06.037>
- Goto, Y., Miura, M., & Iijima, T. (1996). Extrusion mechanisms of intracellular Ca²⁺ in human aortic endothelial cells. *Eur J Pharmacol*, 314(1–2), 185–192. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=8957235
- Govindan, S., & Taylor, C. W. (2012). P2Y receptor subtypes evoke different Ca²⁺ signals in cultured aortic smooth muscle cells. *Purinergic Signalling*, 8(4), 763–777. <http://doi.org/10.1007/s11302-012-9323-6>
- Hernández-Romieu, A. C., Elnecavé-olaiz, A., Huerta-uribe, N., Reynoso-noverón, N., & C, M. (2011). Análisis de una encuesta poblacional para determinar los factores asociados al control de la diabetes mellitus en México, 53(1), 34–39.
- Hill, B. J. F., Price, E. M., Dixon, J. L., & Sturek, M. (2003). Increased calcium buffering in coronary smooth muscle cells from diabetic dyslipidemic pigs. *Atherosclerosis*, 167(1), 15–23. [http://doi.org/10.1016/S0021-9150\(02\)00381-7](http://doi.org/10.1016/S0021-9150(02)00381-7)
- House, S. J., Potier, M., Bisailon, J., Singer, H. A., & Trebak, M. (2008). The non-excitable smooth muscle: Calcium signaling and phenotypic switching during vascular disease. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*. <http://doi.org/10.1007/s00424-008-0491-8>
- House, S., Potier, M., & Bisailon, J. M. (2008). The non-excitable smooth muscle: Calcium signaling and phenotypic switching during vascular disease, 456(5), 769–785. <http://doi.org/10.1007/s00424-008-0491-8>
- Kannel, W. B., & Daniel, L. (n.d.). *Diabetes and Cardiovascular Disease The Framingham*.
- Katsuda, Y., Ohta, T., Miyajima, K., Kemmochi, Y., Sasase, T., Tong, B., ... Yamada, T. (2014). Diabetic complications in obese type 2 diabetic rat models. *Experimental Animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science*, 63(2), 121–32. <http://doi.org/10.1538/expanim.63.121>

- Kennedy, M. W. (2017). *Intracoronary Insights in Diabetes Mellitus*.
- King, A., & Bowe, J. (2016). Animal models for diabetes: Understanding the pathogenesis and finding new treatments. *Biochemical Pharmacology*, 99, 1–10. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.08.108>
- Ko, E. A., Park, W. S., Firth, A. L., Kim, N., Yuan, J. X. J., & Han, J. (2010). Pathophysiology of voltage-gated K⁺ channels in vascular smooth muscle cells: Modulation by protein kinases. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 103(1), 95–101. <http://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2009.10.001>
- Krebs, J. (2014). Biochimica et Biophysica Acta The plethora of PMCA isoforms: Alternative splicing and differential expression ☆ PL. *BBA - Molecular Cell Research*, 1853(9), 2018–2024. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.12.020>
- Kudryavtseva, O., Aalkjaer, C., & Matchkov, V. V. (2013). Vascular smooth muscle cell phenotype is defined by Ca²⁺-dependent transcription factors. *FEBS Journal*. <http://doi.org/10.1111/febs.12414>
- Kwan, H., Shen, B., Ma, X., Kwok, Y., Huang, Y., & Man, Y. (2009). TRPC1 Associates With BK Ca Channel to Form a Signal Complex in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation Research*, 1. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.188748>
- Lambert, D. G. (1999). Calcium Signaling Protocols. *Methods in Molecular Biology*, 114.
- 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). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0042541>
- Lohman, A. W., Billaud, M., & Isakson, B. E. (2012). Mechanisms of ATP release and signalling in the blood vessel wall. *Cardiovascular Research*, 95(3), 269–280. <http://doi.org/10.1093/cvr/cvs187>
- Lu, T., Ye, D., He, T., Wang, X., Wang, H., & Lee, H. (2008). Impaired Ca²⁺-Dependent Activation of Large-Conductance Ca²⁺-Activated K⁺ Channels in the Coronary Artery Smooth Muscle Cells of Zucker Diabetic Fatty Rats, 95(December). <http://doi.org/10.1529/biophysj.108.138339>
- Marco, E. D., Jha, J. C., Sharma, A., Wilkinson-Berka, J. L., Jandeleit-Dahm, K. A., & de Haan, J. B. (2015). Are reactive oxygen species still the basis for diabetic complications? *Clinical Science*, 129(2), 199–216. <http://doi.org/10.1042/CS20150093>
- Matchkov, V. V., Kudryavtseva, O., & Aalkjaer, C. (2011). MiniReview Intracellular Ca²⁺ Signalling and Phenotype of Vascular Smooth Muscle Cells, 42–48. <http://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2011.00818.x>
- Mathers, C. D., & Loncar, D. (2015). Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030, 3(11). <http://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030442>
- Matsuda, T., Arakawa, N., Takuma, K., Kishida, Y., Kawasaki, Y., Sakaue, M., ... Baba, A. (2001). SEA0400, a novel and selective inhibitor of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger, attenuates reperfusion injury in the in vitro and in vivo cerebral ischemic models. *J Pharmacol Exp Ther*, 298(1), 249–256. Retrieved from <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=11408549&retmode=ref&cmd=prlinks>
- Mescher, A. L. (2016). *Junqueira's Basic Histology*.
- Mita, M., Ito, K., Taira, K., Nakagawa, J., Walsh, M. P., & Shoji, M. (2010). Attenuation of

- store-operated Ca²⁺ entry and enhanced expression of TRPC channels in caudal artery smooth muscle from Type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats, (October 2009), 670–678. <http://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2010.05373.x>
- Moccia, F. (2012). Update on vascular endothelial Ca²⁺ signalling: A tale of ion channels, pumps and transporters. *World Journal of Biological Chemistry*, 3(7), 127. <http://doi.org/10.4331/wjbc.v3.i7.127>
- Nakano, T., Koujin, T., Suda, T., Hiraoka, Y., & Haraguchi, T. (2009). A locally-induced increase in intracellular Ca²⁺ propagates cell-to-cell in the presence of plasma membrane Ca²⁺ ATPase inhibitors in non-excitabile cells. *FEBS Letters*, 583(22), 3593–3599. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.032>
- Navarro-dorado, J., Garcia-alonso, M., Breemen, C. Van, Tejerina, T., & Fameli, N. (2014). Biochemical and Biophysical Research Communications Calcium oscillations in human mesenteric vascular smooth muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 445(1), 84–88. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.01.150>
- Nystoriak, M. A., Nieves-cintrón, M., Patriarchi, T., Olivia, R., Prada, M. P., Morotti, S., ... Navedo, M. F. (2017). Ser1928 phosphorylation by PKA stimulates the L-type Ca²⁺ channel Ca_v1.2 and vasoconstriction during acute hyperglycemia and diabetes., 10(463). <http://doi.org/10.1126/scisignal.aaf9647.Ser>
- Ong, H. L., & Ambudkar, I. S. (2017). *STIM-TRP pathways and microdomain organization: Contribution of TRPC1 in store-operated Ca²⁺ entry: Impact on Ca²⁺ signaling and cell function. Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 993). http://doi.org/10.1007/978-3-319-57732-6_9
- Pasek, R. C., & Gannon, M. (2013). Advancements and challenges in generating accurate animal models of gestational diabetes mellitus. *AJP: Endocrinology and Metabolism*, 305(11), E1327–E1338. <http://doi.org/10.1152/ajpendo.00425.2013>
- Pinho, J., Medeiros, M., & Capettini, L. (2010). L-type Ca²⁺ currents and increases vascular contractility in a mouse model of type 1 diabetes. <http://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00955.x>
- Poburko, D., Liao, C. H., Lemos, V. S., Lin, E., Maruyama, Y., Cole, W. C., & Van Breemen, C. (2007). Transient receptor potential channel 6-mediated, localized cytosolic [Na⁺] transients drive Na⁺/Ca²⁺ exchanger-mediated Ca²⁺ entry in purinergically stimulated aorta smooth muscle cells. *Circulation Research*, 101(10), 1030–1038. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.155531>
- Prakriya, M., & Lewis, R. S. (2015). STORE-OPERATED CALCIUM CHANNELS.
- Ralevic, V., & Dunn, W. R. (2015). Purinergic transmission in blood vessels. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 191, 48–66. <http://doi.org/10.1016/j.autneu.2015.04.007>
- Ramasamy, R., Yan, S. F., & Schmidt, A. M. (2015). Receptor for AGE (RAGE): signaling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications., 88–102. <http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06320.x.Receptor>
- Ren, J., Albinsson, S., & Hellstrand, P. (2010). Distinct effects of voltage- and store-dependent calcium influx on stretch-induced differentiation and growth in vascular smooth muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 285(41), 31829–31839. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.097576>
- Rossi, D., & Sorrentino, V. (2002). Molecular genetics of ryanodine receptors Ca²⁺ - release channels, 32, 307–319. [http://doi.org/10.1016/S0143-4160\(02\)00198-7](http://doi.org/10.1016/S0143-4160(02)00198-7)

- Searls, Y. M., Loganathan, R., Smirnova, I. V., & Stehno-bittel, L. (2010). Intracellular Ca²⁺ + regulating proteins in vascular smooth muscle cells are altered with type 1 diabetes due to the direct effects of hyperglycemia, 1–17.
- Seye, C. I., Kong, Q., Yu, N., Gonzalez, F. A., Erb, L., & Weisman, G. A. (2007). P2 receptors in atherosclerosis and postangioplasty restenosis. *Purinergic Signalling*, 3(1–2), 153–162. <http://doi.org/10.1007/s11302-006-9047-6>
- Shiota, M., & Printz, R. L. (2012). *Animal Models in Diabetes Research*, 933. <http://doi.org/10.1007/978-1-62703-068-7>
- Simo-Cheyou, E. R., Tan, J. J., Grygorczyk, R., & Srivastava, A. K. (2017). STIM-1 and ORAI-1 channel mediate angiotensin-II-induced expression of Egr-1 in vascular smooth muscle cells. *Journal of Cellular Physiology*. <http://doi.org/10.1002/jcp.25810>
- Slodzinski, M. K., Juhaszova, M., & Blaustein, M. P. (1995). Antisense inhibition of Na⁺/Ca²⁺ exchange in primary cultured arterial myocytes. *Am J Physiol*, 269(5 Pt 1), C1340-5.
- Soto-estrada, G., & Moreno-altamirano, L. (2016). Panorama epidemiológico de México , principales causas de morbilidad y mortalidad.
- Spinelli, A. M., & Trebak, M. (2016). Orai channel-mediated Ca²⁺ signals in vascular and airway smooth muscle. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. <http://doi.org/10.1152/ajpcell.00355.2015>
- Stammers, A. N., Susser, S. E., Hamm, N. C., Hlynsky, M. W., Kimber, D. E., Kehler, D. S., & Duhamel, T. A. (2015). The regulation of sarco (endo) plasmic reticulum, 854(January), 843–854.
- Stein, W. D., & Litman, T. (2015). *Primary Active Transport Systems. Channels, Carriers, and Pumps*. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-416579-3.00006-X>
- Szuszkiewicz-Garcia, M. M., & Davidson, J. A. (2014). Cardiovascular disease in diabetes mellitus: Risk factors and medical therapy. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. <http://doi.org/10.1016/j.ecl.2013.09.001>
- Takahashi, Y., Watanabe, H., Murakami, M., Ono, K., Munehisa, Y., Koyama, T., ... Ito, H. (2007). Functional role of stromal interaction molecule 1 (STIM1) in vascular smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 361(4), 934–940. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.07.096>
- Tao, S., Yamazaki, D., Komazaki, S., Zhao, C., Iida, T., Imaizumi, Y., & Takeshima, H. (2013). Facilitated Hyperpolarization Signaling in Vascular Smooth, 288(22), 15581–15589. <http://doi.org/10.1074/jbc.M112.435396>
- Tirmenstein, M., Horvath, J., Graziano, M., Mangipudy, R., Dorr, T., Colman, K., ... Janovitz, E. (2015). Utilization of the Zucker Diabetic Fatty (ZDF) Rat Model for Investigating Hypoglycemia-related Toxicities. *Toxicologic Pathology*, 43(6), 825–837. <http://doi.org/10.1177/0192623315581020>
- Trebak, M., & Putney, J. W. (2017). ORAI Calcium Channels. *Physiology*, 32(4), 332–342. <http://doi.org/10.1152/physiol.00011.2017>
- Tykocki, N. R., Boerman, E. M., & Jackson, W. F. (2017). Smooth muscle ion channels and regulation of vascular tone in resistance arteries and arterioles. *Comprehensive Physiology*, 7(2), 485–581. <http://doi.org/10.1002/cphy.c160011>
- Van Breemen, C., Fameli, N., & Evans, A. M. (2013). Pan-junctional sarcoplasmic reticulum in vascular smooth muscle: nanospace Ca²⁺ transport for site-and

- function-specific Ca²⁺ signalling. *J Physiol*, 5918, 2043–2054. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.246348>
- Velmurugan, G. V., & White, C. (2012). Calcium homeostasis in vascular smooth muscle cells is altered in type 2 diabetes by Bcl-2 protein modulation of InsP₃ R calcium release channels, 124–134. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.00218.2011>
- Walter F. Boron, Emile L. Boulpaep. (2013). *Medical Physiology A Cellular and Molecular Approach. Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53). <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Wamhoff, B. R., Bowles, D. K., McDonald, O. G., Sinha, S., Somlyo, A. P., Somlyo, A. V., & Owens, G. K. (2004). L-type voltage-gated Ca²⁺ channels modulate expression of smooth muscle differentiation marker genes via a Rho kinase/myocardin/SRF-dependent mechanism. *Circulation Research*, 95(4), 406–414. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000138582.36921.9e>
- Wang, B., Chandrasekera, P. C., & Pippin, J. J. (2014). Leptin- and leptin receptor-deficient rodent models: relevance for human type 2 diabetes. *Current Diabetes Reviews*, 10(2), 131–45. <http://doi.org/10.2174/1573399810666140508121012>
- Wang, Y.-W., Sun, G.-D., Sun, J., Liu, S.-J., Wang, J., Xu, X.-H., & Miao, L.-N. (2013). Spontaneous type 2 diabetic rodent models. *Journal of Diabetes Research*, 2013, 401723. <http://doi.org/10.1155/2013/401723>
- Wang, Y., Deng, X., Hewavitharana, T., Soboloff, J., & Donald, L. (2013). STIM, Orai and TRPC channels in the control of calcium entry signals in smooth muscle, 35(May 2007), 1127–1133. <http://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2008.05018.x> STIM
- Wier, W. G., & Mauban, J. R. H. (2017). Imaging sympathetic neurogenic Ca²⁺ signaling in blood vessels. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 207(December 2016), 59–66. <http://doi.org/10.1016/j.autneu.2017.07.007>
- World Health Organization. (2016). Global Report on Diabetes. *Isbn*, 978, 88. <http://doi.org/ISBN 978 92 4 156525 7>
- Wray, S., & Burdya, T. (2010). Sarcoplasmic Reticulum Function in Smooth Muscle, 113–178. <http://doi.org/10.1152/physrev.00018.2008>
- Xia, J., Grondin, J. M., Jakubowski, J. A., & Lilly, E. (2005). Acute Hyperglycemia Induced by Ketamine/Xylazine Anesthesia in Rats: Mechanisms and Implications for Preclinical Models. *BioMed*, 230(4), 777–784.
- Yamamura, A., Yamamura, H., Zeifman, A., & Yuan, J. X.-J. (2011). Activity of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels contributes to regulating receptor- and store-operated Ca entry in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Pulmonary Circulation*, 1(2), 269–79. <http://doi.org/10.4103/2045-8932.83447>
- Yang, S. L., Zhu, L. Y., Han, R., Sun, L. L., Li, J. X., & Dou, J. T. (2016). Pathophysiology of peripheral arterial disease in diabetes mellitus. *Journal of Diabetes*, 9, 133–140. <http://doi.org/10.1111/1753-0407.12474>
- Yuan, J. X. J., Platoshyn, O., Remillard, C. V., Fantozzi, I., Sison, T., Manuscript, A., ... Muscle, S. (2005). Identification of functional voltage-gated Na⁺ channels in cultured human pulmonary artery smooth muscle cells. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*, 451(2), 380–387. <http://doi.org/10.1007/s00424-005-1478-3>
- Zhang, J., Ren, C., Chen, L., Navedo, M. F., Antos, L. K., Kinsey, S. P., ... Lf, S. (2010). Knockout of Na²⁺ / Ca²⁺ exchanger in smooth muscle attenuates vasoconstriction

- and L-type Ca^{2+} channel current and lowers blood pressure. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.00964.2009>.
- Zhang, S., Yuan, J. X.-J., Barrett, K. E., & Dong, H. (2005). Role of Na^{+}/Ca^{2+} exchange in regulating cytosolic Ca^{2+} in cultured human pulmonary artery smooth muscle cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 288(2), C245-52. <http://doi.org/10.1152/ajpcell.00411.2004>
- Zhang, W. B., & Kwan, C. Y. (2016). Pharmacological evidence that potentiation of plasmalemmal Ca^{2+} -extrusion is functionally coupled to inhibition of SR Ca^{2+} -ATPases in vascular smooth muscle cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 389(4), 447–455. <http://doi.org/10.1007/s00210-016-1209-7>
- Zhu, B., Chen, X., Liu, J., Guan, Y., & Ren, J. (2008). ABNORMALITIES OF SARCOPLASMIC RETICULUM Ca^{2+} MOBILIZATION IN AORTIC SMOOTH MUSCLE CELLS FROM STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC RATS, 568–573. <http://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2007.04832.x>
- Zuccolo, E., Bottino, C., Diofano, F., Poletto, V., Codazzi, A. C., Mannarino, S., ... Moccia, F. (2016). Constitutive Store-Operated Ca^{2+} Entry Leads to Enhanced Nitric Oxide Production and Proliferation in Infantile Hemangioma-Derived Endothelial Colony-Forming Cells. *Stem Cells and Development*, 25(4), 301–19. <http://doi.org/10.1089/scd.2015.0240>