Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Instituto de Fisiología

Laboratorio de Cardiología Molecular

ALTERACIONES DE LOS MECANISMOS DE REGULACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR EN CARDIOMIOCITOS DEL VENTRÍCULO DERECHO Y DEL IZQUIERDO EN LA RATA ZUCKER, UN MODELO ANIMAL DE DIABETES MELLITUS TIPO 2

Tesis presentada para obtener el título de:

Maestría en Ciencias Fisiológicas

PRESENTA:

Alfredo Espinosa Corona

ASESOR DE TESIS:

Dr. José Everardo Avelino Cruz

Junio 2016

INDICE

Lista de abreviaturas 4

RESUMEN 6

INTRODUCCIÓN 8

DIABETES MELLITUS 8

CARDIOMIOPATÍA EN LA DIABETES 9

ROL DEL Ca^{2+} EN EL ACOPLE EXCITACIÓN-CONTRACCIÓN CARDIACO 10

REGULACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR EN LA DIABETES 13

JUSTIFICACIÓN 15

HIPÓTESIS 16

OBJETIVO GENERAL 16

OBJETIVOS PARTICULARES 16

MATERIAL Y MÉTODOS 17

Diagrama de trabajo 17

Modelo animal de diabetes mellitus tipo 2 18

Disección de endocardio y obtención de miocitos aislados 19

Medición de calcio 20

Medición in situ de la actividad de RyR, disponibilidad de Ca2+ en RS y extrusión del NCX. 23

Medición de la contracción en los cardiomiocitos de L.E., Lean y ZDF 25

Medición del tamaño de las células 25

Análisis estadístico 26

RESULTADOS 27

Establecimiento del modelo animal de DM2 27

Aislamiento de cardiomiocitos y estandarización de la técnica de medición de $[Ca^{2+}]_i$ 28

Análisis de los transitorios globales de $[Ca^{2+}]_i$ durante el acople excitación –contracción 32

Análisis de la liberación y disponibilidad de Ca2+ desde retículo, y actividad del NCX. 41

Análisis de la contracción de los cardiomiocitos de ventrículo derecho y de izquierdo de L.E., Lean y ZDF. 47

Análisis del tamaño de las células 48

Resumen de resultados 50

DISCUSIÓN 54

CONCLUSIONES 63

ANEXOS 65
Tabla y gráficos de parámetros morfométricos y bioquímicos 65
Tablas de resultados de los transitorios durante el acople E-C 66
Tablas de resultados de los transitorios evocados por cafeína y $NiCl_2$ 69
Tablas de resultados de tamaño de las células 69
Tabla de resultados de contracción de las células 70
Gráficas de las comparaciones hechas entre parámetros de ZDF diabéticas (13 semanas) y ZDF obesa (8 semanas) 71
Referencias: 73

Lista de abreviaturas

$[Ca^{2+}]_i$:	concentración de calcio intracelular
2h-PG:	medición de glucosa plasmática tras 2 horas de ayuno
A_1C:	hemoglobina glucosilada
ADA:	Asociación Americana de Diabetes
AM:	grupo acetoxy-metil ester
ATP:	adenosin trifosfato
Ca^{2+}:	ión calcio
CaMKII:	calcio calmodulina cinasa II
CICR:	liberación de calcio inducida por calcio
CRU:	unidad liberadora de calcio
db/db:	ratones homocigotos con mutación puntual del receptor de leptina
DHPR:	receptor de dihidropiridinas
DM2:	diabetes mellitus tipo 2
E-C:	acople excitación-contracción
FPG:	glucosa plasmática en ayuno
I_{Ca}:	corriente entrante de calcio
IP3r:	receptor de inositol trifosfato
LTCC-$Ca_v1.2$:	canal de calcio voltaje dependiente tipo L
mCU:	uniporte de calcio mitocondrial
MHC:	cadena pesada de la miosina
NCX1:	intercambiador sodio-calcio isoforma 1
NGSP:	Programa Nacional de Estandarización para la medición de hemoglobina glucosilada
Ob-R:	receptor de leptina
OGTT:	Prueba oral de tolerancia a la glucosa
PLB:	fosfolambano

PMCA: ATPasa de calcio de la membrana plasmática

ROS: especies reactivas de oxigeno

RS, SR: retículo sarcoplásmico

RyR, RyR2: receptor de rianodina isoforma 2

SERCA: ATPasa de calcio del retículo sarco/endoplásmico

TnC: subunidad C de la Troponina afín a calcio

WHO: Organización Mundial de la Salud

ZDF*lepr*^{fa}: ratas homocigotas Zucker diabéticas obesas

RESUMEN

La incidencia de la diabetes mellitus tipo 2 a nivel mundial ha ido escalando de manera exponencial en las últimas décadas, ocupando a menudo los primeros lugares en las listas de enfermedades crónicas. Dicha enfermedad y su evolución generan un gran problema tanto en materia de planeación de sistemas y políticas sanitarias efectivas como en la calidad de vida de las personas, principalmente debido a la diversa cantidad de padecimientos orgánicos que son susceptibles a desarrollarse tras la instauración de la diabetes y al desconocimiento preciso sobre los mecanismos fisiopatológicos que inducen a dichos padecimientos después de la aparición del trastorno metabólico, para poder tratarlos eficazmente.

Entre estos padecimientos, ligados a la diabetes, se destacan los de índole cardiovascular por su mayor aporte a las tasas de mortalidad y morbilidad dentro de la población diabética. Independientemente de su clasificación o características, en la mayoría se han reportado alteraciones sobre la función de bombeo del corazón. Teniendo en cuenta la heterogeneidad morfológica del órgano, se han considerado diversos procesos y estructuras implicadas en el desarrollo de tales alteraciones pero indiscutiblemente, cual sea el origen de estas, todas ellas terminan repercutiendo sobre el trabajo contráctil de la musculatura ventricular, presentando como factor común modificaciones en los procesos que desarrollan el acople E-C en dicha musculatura. Ya que se requiere una adecuada regulación dinámica que module de forma oscilatoria la disponibilidad de $[Ca^{2+}]_i$ para llevar a cabo el acople, en varios trabajos se ha sugerido que la DM2 podría alterar los mecanismos encargados de dicha regulación en la musculatura ventricular, sin embargo aún existe controversia sobre la forma en que se afectan tales mecanismos así como de qué manera se conjuntan para poder explicar una disfunción generalizada en el ventrículo y, además considerando que cada ventrículo trabaja con distinta presión y fuerza, si estas alteraciones podrían ser diferentes para cada cámara.

El presente trabajo consistió en hallar y describir las alteraciones que se presenten sobre los mecanismos de regulación de calcio intracelular en el ventrículo derecho y en el izquierdo, de un modelo animal con diabetes mellitus tipo 2. El modelo elegido fue la rata Zucker Diabetic Fatty (ZDF fa/fa), además que como cepas controles para el estudio se usaron a la rata Lean Zucker (Lean Fa/fa) y a la rata Long Evans (L.E.). De las 3 cepas se obtuvieron cardiomiocitos aislados de papilares de ventrículo derecho e izquierdo y mediante microfluorometría, cargando las células con Fluo 4-AM, se registraron en ellas transitorios de $[Ca^{2+}]_i$ evocados por estimulación de campo, de 1 a 5 Hz, para replicar el acople E-C. También se obtuvieron transitorios evocados por pulsos sostenidos de cafeína y $NiCl_2$ para evaluar la respuesta de liberación de calcio luminal desde el retículo sarcoplásmico, su disponibilidad en el organelo y su remoción. Complementando el trabajo se midió el tamaño y la contracción de los cardiomiocitos, a las mismas frecuencias a las que se registraron los transitorios durante el acople.

El análisis realizado arrojó que en el ventrículo derecho de Lean y ZDF hay una disminución en la amplitud de los transitorios durante el acople, pese a tener una mayor disponibilidad de Ca^{2+} y

liberación desde retículo, todo esto comparado con L.E del mismo lado, además que la contracción de las células de ZDF resultó menor a las otras dos condiciones. En el ventrículo izquierdo de ZDF, a bajas frecuencias de estimulación de 1 a 3Hz, hay un aumento en la amplitud de los transitorios durante el acople en comparación a los cardiomiocitos de Lean y L.E. del ventrículo izquierdo, pero al incrementar la estimulación a la frecuencia fisiológica de 5 Hz, su amplitud decrece acumulando progresivamente una mayor cantidad de Ca^{2+} no removido en el citosol respecto a las otras dos condiciones. De igual forma que en el ventrículo derecho, los cardiomiocitos izquierdos de Lean y ZDF, presentan una mayor disponibilidad de Ca^{2+} y liberación desde retículo respeto a L.E. Sin embargo en ambos casos ZDF parece remover una menor cantidad de Ca^{2+} y depender en mayor medida de la remoción por NCX, caso contrario a Lean izquierdo que tiende a prescindir del intercambiador y a su vez remover una mayor cantidad de calcio. También en el ventrículo izquierdo la contracción de ZDF es menor a L.E., mientras que no presenta diferencias contra Lean, cuya contracción es igual entre ventrículo derecho e izquierdo. No obstante la contracción de ventrículo izquierdo de ZDF y L.E. resultan mayores a sus respectivos derechos, pese a que la amplitud de los transitorios por estimulación de campo en el ventrículo izquierdo de L.E. son menores a su contraparte derecha. Finalmente los cardiomiocitos de ventrículo izquierdo de ZDF presentan un mayor tamaño en su perímetro, área y longitud.

Los resultados obtenidos muestran una regulación y alteraciones diferentes para cada ventrículo, aún en las condiciones consideradas como controles, que en el caso del derecho de Lean y ZDF sugieren la existencia de un desarreglo que limita la disponibilidad de Ca^{2+} durante el acople E-C. Por otra parte que en el ventrículo derecho de L.E. parece requerirse una mayor cantidad de Ca^{2+} para llevar a cabo su contracción. Mientras que en el ventrículo izquierdo de ZDF los indicios encontrados de hipertrofia celular y de un aumento progresivo en la acumulación de calcio durante el periodo de relajación muscular, coinciden con modelos de insuficiencia ventricular asociada a diabetes.

INTRODUCCIÓN

DIABETES MELLITUS

El término diabetes mellitus, describe un desorden metabólico caracterizado por la incapacidad para mantener una homeostasis normal en los niveles de glucosa, sea por disfunción de las células β pancreáticas, destrucción de las mismas o por una resistencia tisular periférica a la insulina, lo cual conlleva a una hiperglucemia crónica, que puede presentarse en forma conjunta a otras alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas (Alberti & Zimmet, 1998).

Su diagnóstico, acorde a los criterios de la ADA (American Diabetes Association), de la Organización Mundial de la Salud y del Comité Experto Internacional, se basa principalmente en los resultados de los exámenes de: glucosa en plasma, glucosa plasmática en ayuno (FPG – fasting plasma glucose), glucosa plasmática tras 2 horas (2h-PG) de ingesta de 75g de glucosa oral en una prueba de tolerancia oral (OGTT – oral glucose tolerance test) y hemoglobina glucosilada A_1C (A. D. Association, 2014; Organization, 2014). Estos valores de referencia son mostrados en la Tabla 1.

CRITERIOS	PARÁMETROS
Hemoglobina glucosilada (A1C)	$\geq$ 6.5% El test debe ser desarrollado en un laboratorio usando un método certificado por el National Glycohemoglobin Standarization Program (NGSP) y estandarizado al ensayo del Diabetes Control and Complications Trial (DCCT).
Glucosa plasmática en ayuno FPG	$\geq$ 126 mg/dL (7.0 mM/L) Ayuno es definido como la ausencia de ingesta calórica por al menos 8 horas.
Glucosa plasmática tras 2 horas de ingesta 2h-PG	$\geq$ 200 mg/dL (11.1 mM/L) durante una prueba de tolerancia a la glucosa oral OGTT. El test debe desarrollarse como es descrito por la WHO, usando una carga de glucosa que contenga el equivalente a 75 g glucosa anhidra disuelta en agua.
Síntomas de hiperglucemia o crisis hiperglucémica (polidipsia, polifagia, poliuria, pérdida de peso, fatiga, cambios de ánimo, lenta o escasa curación de heridas, etc).	Glucosa plasmática casual $\geq$ 200 mg/dL (11.1 mM/L) puede efectuarse en cualquier momento sin restricción calórica.
En ausencia inequívoca de hiperglucemia, los resultados deben ser confirmados repitiendo la prueba, en un periodo de 3 a 6 meses.	

Tabla 1. Criterios diagnósticos para diabetes de la ADA y WHO 2012. Solo re requiere de la detección de alguno de los criterios expuestos para diagnosticar a la diabetes.

A lo largo de los diversos estudios sobre su etiología y fisiopatogenia, se ha destacado un mayor impacto epidemiológico y una tendencia a incrementarse exponencialmente de la diabetes mellitus tipo 2 tanto a nivel mundial como regional y sobre todo en los países en vías de desarrollo, donde, tomando de referencia a la población diabética actual, se han llegado a prospectar aumentos cercanos al 70%, dentro de un lapso de 30 años y progresivamente afectando a edades más jóvenes (Danaei et al.; Shaw, Sicree, & Zimmet, 2010). En México la situación no es distinta, siendo la primera causa de muerte a parir de los 45 años y la segunda a partir de los 65, tras la cardiomiopatía isquémica, además de ser la 1ª causa de incapacidad laboral prematura y permanente (Organization, 2014).

CARDIOMIOPATÍA EN LA DIABETES

Con respecto a las repercusiones sistémicas, a mediano y largo plazo, asociadas a la DM2, se ha mantenido una gran preocupación sobre la incidencia de enfermedades cardiovasculares puesto que su riesgo aumenta de dos a tres veces en los pacientes diabéticos, y son este tipo de enfermedades las que prevalecen como primera causa mundial de morbilidad y mortalidad tras desarrollar el trastorno metabólico (Fox et al., 2007; Kengne, Turnbull, & MacMahon, 2010; Shaw, et al., 2010).

Sin embargo, el rol de la diabetes en la patogénesis cardiovascular aún no ha sido esclarecido del todo en cuanto a los mecanismos celulares y moleculares que propiciarían estas afecciones. Generalmente dentro de la gama de alteraciones cardiovasculares vinculadas a la diabetes, resalta una mayor incidencia en la asociación del trastorno metabólico con el desarrollo de insuficiencia cardiaca, comprometiendo su capacidad de bombeo del flujo sanguíneo a través de todo el lecho vascular. Se ha descrito que dicha insuficiencia en pacientes diabéticos se caracteriza por una hipertrofia miocárdica y alteraciones en la capacidad contráctil y de relajación del corazón (Hsueh et al., 2007; Russell & Proctor, 2006; Sharma & McNeill, 2006). En diversos trabajos se ha tratado de explicar que esto podría deberse a modificaciones en la sensibilidad y utilización de los principales sustratos metabólicos del órgano por una sobrecarga tanto de carbohidratos y de ácidos grasos, lo cual desencadenaría estados de lipotoxicidad y de hiper-glicosilación, caracterizados por aparición de estrés oxidativo, sobreproducción de ROS, incremento de la actividad proteolítica, modificaciones de los procesos transcripcionales y transduccionales, cambios estructurales en las proteínas ya existentes y adaptaciones de los procesos fosforilativos, que a su vez, en conjunto, estarían alterando la configuración y funcionalidad del tejido cardiaco (Asbun & Villarreal, 2006; Boudina & Abel, 2007; Scheuermann-Freestone et al., 2003).

Tomando en cuenta la heterogeneidad del corazón en su composición celular y en su arquitectura, gran parte de su capacidad de bombeo recae en los ventrículos y específicamente en la integridad de sus células musculares (Dvorkin, 2010). Con base a ello se ha estipulado que los fenómenos descritos anteriormente, en un caso de insuficiencia funcional, podrían estar afectando preponderantemente a los miocitos de dicha región. Entonces el dilema hasta ahora ha sido determinar qué efectos tienen estos cambios, provocados por la diabetes, sobre la función de los cardiomiocitos ventriculares (A. A. H. Association, 2006; Boudina & Abel, 2007; Grundy et al., 1999).

Por una parte sabiendo que el Ca^{2+} es uno de los principales segundos mensajeros para llevar a cabo: la síntesis proteica, la transcripción nuclear de genes, el transporte vesicular, los procesos de apoptosis, la modelación del citoesqueleto, la estabilización de ciertas uniones mecánicas intercelulares y demás ciclos de modulación para mantener una homeostasis celular; se ha especulado que posibles alteraciones sobre los mecanismos de regulación intracelular de este ión podrían ser tanto causa y efecto de los cambios mencionados, en este caso, sobre los cardiomiocitos ventriculares para desempeñar su función (L. Pereira et al., 2014).

ROL DEL Ca^{2+} EN EL ACOPLE EXCITACIÓN-CONTRACCIÓN CARDIACO

Se entiende que la principal función del cardiomiocito es integrar un estímulo eléctrico, conformado por el potencial de acción cardiaco propagado a través del sistema de conducción del corazón hacia todas las sarcolemas, como el iniciador de una cascada de señalización intracelular, la cual generará un efecto de movilización mecánica del citoesqueleto de la célula, a la par y de forma secuencial con otras, lo que se traduce en un ciclo de contracción -relajación del músculo. Esto de forma global en el órgano se observa y nombra como sístole, al momento de contraer y eyectar la sangre contenida, y como diástole, al momento de cesar la contracción y comenzar a distender para permitir el llenado sanguíneo (Figura 1). Todo este proceso en conjunto se denomina acople excitación-contracción y también depende de Ca^{2+} como se describe a continuación (Donald M. Bers, 2002).

Para llevar a cabo el acople a nivel de la musculatura ventricular, el potencial de acción cardiaco desarrolla una fase característica de "plateau", comúnmente denominada como fase 2 del potencial de acción, y en la que se genera una corriente entrante de calcio I_{Ca} a través de canales de Ca^{2+} tipo L-voltaje dependientes (LTCC o $Ca_v1.2$). Dicha corriente puede replicarse en todo el sarcolema, pero resulta crucial su propagación sobre la disposición espacial de las invaginaciones transversales de la membrana, conocidas como túbulos T, con respecto a la localización del retículo, ya que se requiere una estrecha cercanía entre ambas estructuras, en el que el sarcolema y la membrana del organelo prácticamente se encuentren en una orientación paralela; la literatura describe una brecha de separación no mayor de 7-10 nm. Esta configuración conocida como arreglo sarcotubular permite que la mayor cantidad de Ca^{2+} entrante en esta brecha, a través de los LTCC, ahora sea captado por receptores cardiacos de ryanodina (RyR2) dispuestos en la membrana reticular (D. M. Bers, 2006).

La actividad de los RyR está regulada por las concentraciones de Ca^{2+} dentro y fuera del retículo, en ambos casos un incremento de la concentración sensibiliza la apertura del receptor, de tal forma que con la entrada y captación de Ca^{2+} en el arreglo sarcotubular, se genera una liberación de Ca^{2+} inducida por calcio (Calcium-Induced Calcium Release CICR) desde el lumen del retículo. La amplificación de la liberación de calcio inherente a la CICR, ocurre debido a que cada LTCC puede acoplarse funcionalmente con, aproximadamente, 6 a 20 RyR2´s, manteniendo una relación de 10-25 canales de Ca^{2+} tipo-L por 100-RyR´s en cada acople túbulo T – cisterna terminal (Berridge, Bootman, & Roderick, 2003; Fill & Copello, 2002). Bajo condiciones normales la liberación de Ca^{2+} de un solo couplón no es capaz de activar a las uniones vecinas, ya que el calcio entrante disminuye con la distancia al ser diluido en un volumen mayor de citosol, por lo tanto; para generar la contracción todos los couplones de la célula, aproximadamente 20 000, deben ser activados simultáneamente. En el músculo cardiaco además de la gran cantidad de RyR´s tipo 2, la mayoría de ellos ubicados en los dominios de unión especializados del retículo sarcomplásmico (jSR, del inglés junctional Sarcoplamic Reticulum), la liberación de Ca^{2+} también está regulada por receptores de 1,4,5 – trifosfato IP3, aunque en menor cantidad (Fill & Copello, 2002) (Figura 2).

La liberación de Ca^{2+} desde el retículo incrementa su concentración en el citosol, $[Ca^{2+}]_i$, y permite su interacción con las unidades funcionales móviles del citoesqueleto denominadas sarcomeras, a nivel de la fracciones de Troponina C, TnC, unidas a los complejos de tropomiosina, tal que la interacción provoca un cambio en la disposición de los filamentos de tropomiosina sobre los filamentos de actina globular para dejar libre el sitio de afinidad de éstas últimas a las proteínas motoras de miosina. Posteriormente, eventos de fosforilación por ATP-asas sobre las cabezas de las cadenas pesadas de miosina (MHC) permiten el deslizamiento de los filamentos delgados de actina sobre los filamentos gruesos, conformados por los cuerpos de las cadenas pesadas de miosina, y replicando este evento en todas las sarcómeras del cardiomiocito, se obtiene la contracción. La relajación ahora requerirá de la remoción de la mayor cantidad de Ca^{2+} concentrado en el citosol, lo cual a través de la restitución espacial original del complejo Tn-tropomiosina sobre el filamento de actina, dejara bloqueados los sitios de afinidad a miosina y por ende cesará el deslizamiento de las sarcómeras, volviendo a encontrarse en su longitud inicial. Dicha remoción requiere de la participación de varios mecanismos, los más importantes en los cardiomiocitos son la SERCA2a y el NCX1 (D. M. Bers, 2008; Maack & O'Rourke, 2007).

El intercambiador sodio/calcio (Na^{+}-Ca^{2+} Exchanger, NCX) dispuesto en el sarcolema, al aumentar la concentración citosólica de Ca^{2+} puede inducir una corriente saliente de calcio, favoreciendo la entrada también de sodio hacia el citosol a razón de $1Ca^{2+}$:$3Na^{+}$. Aunque también ante determinadas condiciones donde exista un gradiente electroquímico que así lo permita, el NCX puede actuar como un contra-transportador reversible de Ca^{2+} hacia el interior celular. Este fenómeno favorecería el acoplamiento excitación-contracción aumentando la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} con la finalidad de mantener o aumentar la contracción cardiaca (Stokke, Rivelsrud, Sjaastad, Sejersted, & Swift, 2012).

La bomba de calcio del RS mediada por ATPasa (SERCA), al ser fosforilada y desacoplada de fosfolambano (PLB), estimula el bombeo de Ca^{2+} hacia el interior de la cisterna terminal, garantizando la recaptura de Ca^{2+} necesario para la siguiente CICR (Periasamy & Kalyanasundaram, 2007). La SERCA se halla tanto en la membrana de la cisterna terminal como en la de la región longitudinal del RS. Su estructura constituye una amplia región citosólica anclada a una angosta región transmembranal a través de la cual sería transportado el calcio. Es la región citosólica la que posee el dominio sensor afín a la unión a Ca^{2+} así como el dominio de unión al ATP. Se ha propuesto que la actividad de la SERCA genera un gradiente de concentración de Ca2+ en el que la concentración luminal de Ca2+ es 10 000 veces mayor que la citosólica, resultando que en cada reacción cíclica en la que es hidrolizada una molécula de ATP, 2 iones de Ca^{2+} son bombeados hacia el lumen en intercambio por 2 o 3 iones H^{+} (D. M. Bers, 2008; Toyoshima & Inesi, 2004).

En los ventrículos de rata y ratón, el 90-95% de la activación del ciclo de Ca^{2+}depende del retículo sarcoplasmático y el 5% restante de la actividad del NCX y la I_{Ca}, en contraste, en los humanos la relación es más estrecha y 70% depende del retículo y 30% de la actividad en el sarcolema; en una falla cardiaca con la consecuente disminución de la actividad SERCA 2 y el incremento de la actividad de la NCX, la relación se equilibra a 50-50% (Donald M. Bers, 2002; Rossi & Dirksen, 2006; Scriven, Asghari, & Moore, 2013).

A todo el conjunto de elementos descritos para regular la concentración intracelular de Ca^{2+}, RyR, NCX y SERCA, se le denomina unidad liberadora de calcio o CRU (Calcium Release Unit) y es factible, considerando la cantidad de procesos en los que el calcio es un participe indispensable incluyendo el acoplé excitación-contracción para la función del cardiomiocito ventricular, que los trastornos generados por la diabetes alteren los mecanismos de regulación de esta unidad y por lo tanto se modifique la disponibilidad de Ca^{2+} en citosol tal que repercuta en la actividad contráctil de la célula y en conjunto propicie la disfunción orgánica (D. M. Bers, 2006).

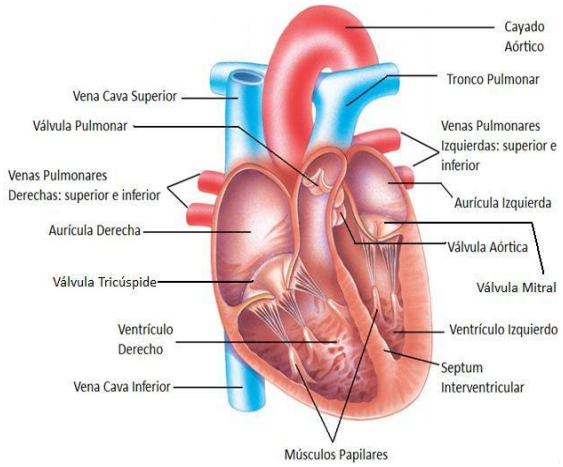


Figura 1 Configuración interna del corazón en mamíferos. La disposición de la musculatura en septums o paredes permite la división del espacio interno en dos atrios superiores y dos ventrículos inferiores, permitiendo solo la comunicación de las aurículas y los ventrículos homolaterales a través de la válvula tricúspide entre aurícula derecha (RA) y ventrículo derecho (RV), y a través de la válvula mitral entre aurícula izquierda (LA) y ventrículo izquierdo (VI). Los músculos papilares, en forma de pirámides salientes desde las paredes ventriculares, desprenden cuerdas tendinosas a las distintas valvas que componen las válvulas aurículo - ventriculares. Modificado de (Burns, 2013)

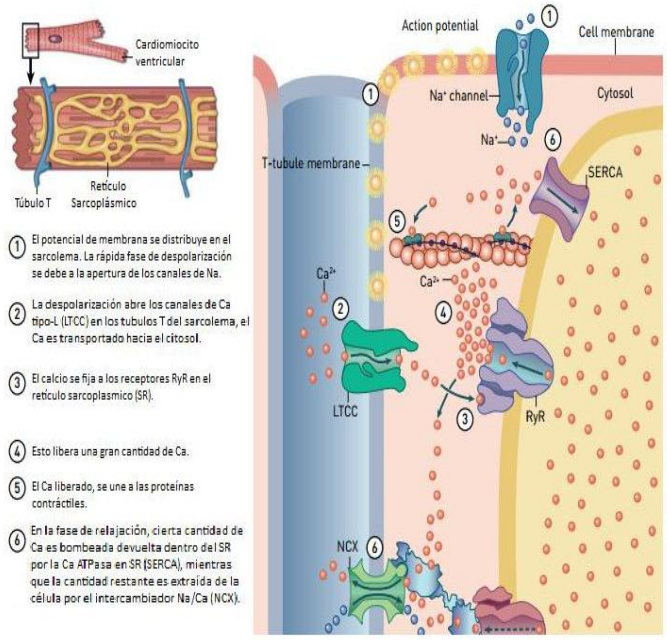


Figura 2. Diagrama esquemático de la diada y del acoplamiento excitación contracción en un cardiomiocito ventricular. Las flechas continuas indican el flujo iónico en un acoplamiento normal, exponiendo la liberación de calcio inducida por calcio en los receptores RyR2. También se observa la acción de algunos otros de los mecanismos reguladores de la concentración intracelular de calcio como el intercambiador sodio calcio y la bomba SERCA. Modificada de (Stokke, et al., 2012)

REGULACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR EN LA DIABETES

Las principales evidencias de trastornos sobre la regulación de calcio en cuadros concomitantes de hipertrofia e insuficiencia cardiaca, asociados a DM2, se han generado a través del estudio de ratones db/db. Los resultados obtenidos a partir de este modelo han expuesto en conjunto alteraciones sobre los distintos niveles de regulación del ión, primero sobre el sarcolema al hallar disminuciones en la corriente I_{Ca} y en la expresión de LTCC y posteriormente decrementos tanto en la expresión y actividad de RyR2 como de SERCA, que en conjunto tienden a disminuir la amplitud de la movilización transitoria de $[Ca^{2+}]_i$. Sin embargo en otros modelos de DM2, los resultados no son concordantes del todo, en las ratas Zucker Diabetic Fatty (ZDF/*epr*^{fa}) pese a que también se han hallado alteraciones en el sarcolema semejantes a las de db/db, a nivel del retículo se ha reportado un incremento de la actividad de la SERCA, conllevando a una sobrecarga del retículo. Este fenómeno resulta contrario a lo expuesto en los ratones db/db lo cual conllevaría a trastornos distintos de la función contráctil, además considerando que los cambios sobre la actividad de la SERCA influyen sobre el volumen movilizado por el intercambiador NCX, también podría considerarse que la actividad de este se modificará de distinta forma, lo cual no ha sido reportado (Laetitia Pereira et al., 2006; Trafford, Díaz, & Eisner, 2001) .

Estas variaciones entre estudios podrían depender de la severidad y estadio o duración de la diabetes. No obstante un factor igual de importante es considerar de nuevo la heterogeneidad del corazón y, enfocándonos en el trabajo de los ventrículos, la sístole ventricular derecha e izquierda permiten el envío de sangre hacia el tronco pulmonar y la aorta, respectivamente. En el primer caso dicho evento suministra el afluente sanguíneo necesario para llevar a cabo el intercambio gaseoso en las membranas alveolo-capilares de los acinos pulmonares, mientras que en el izquierdo la eyección es necesaria para la redistribución sistémica de la sangre, el cual varía en función de las necesidades metabólicas de cada órgano. Por otro lado, en la diástole ambos ventrículos reciben sangre de sus respectivas aurículas, en el primer caso por el retorno venoso sistémico, en el segundo por el retorno de la sangre oxigenada en los pulmones. En condiciones normales el volumen de llenado y el eyectado por cada ventrículo, así como su intensidad de contracción-distensión, son dos factores que tienen capacidad de retroalimentación recíproca y por ende pueden auto ajustarse mutuamente, por ejemplo, un mayor llenado puede producir una mayor distensión, a su vez una mayor fuerza de contracción y por ende un mayor volumen eyección. De igual forma si se inicia con un cambio en la intensidad de contracción o de distensión, esto modificará los volúmenes de trabajo, no solo en el mismo ventrículo, sino también en el contralateral (Dvorkin, 2010).

Bajo esta perspectiva se puede entender que aunque los volúmenes distribuidos por cada cámara sean similares, la carga de trabajo o la presión desarrollada por cada ventrículo no sea igual, y esto implica que la intensidad de contracción cambie y que existan diferencias significativas en la disponibilidad de $[Ca^{2+}]_i$ y en su movilización en cada ventrículo. Esto incluso se ha corroborado en ratones macho de la cepa C57B6, en los cuales la entrada de calcio, el transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ y el máximo acortamiento de las sarcómeras, fueron de mayor amplitud en el endocardio ventricular

izquierdo, y si bien no hallaron diferencias en la expresión de las proteínas que regulan su concentración citosólica, pudiera ser posible que la actividad particular desempañada por estas no fuese igual entre ambas cámaras (Kondo et al., 2006).

JUSTIFICACIÓN

La diabetes mellitus a la fecha es una de las pandemias globales no contagiosas que genera mayor daño para el bienestar socio-económico y la salud de la población en general, debido principalmente a la diversidad de trastornos multi-sistémicos que se desarrollan como consecuencia de este padecimiento metabólico, los cuales aportan un elevado índice tanto en las tasas de morbilidad como de mortalidad a nivel mundial (A. D. Association, 2014; Organization, 2014). Además con base en estudios retro y prospectivos de este padecimiento, se sabe que tenderá a aumentar su incidencia en una frecuencia elevada en países en vías de desarrollo, como en México. En nuestro país el aumento en la aparición de diabetes será drástico, alcanzando para el 2035 al 15.2% de la población de esa fecha (Guariguata et al., 2014; Organization, 2014).

Retomando las tasas de mortalidad que tienen como padecimiento de origen a la diabetes, sobresaltan las afecciones cardiovasculares, las cuales ocupan el 1er lugar como causa de muerte asociada a este trastorno metabólico (Fox, 2010; Kengne, et al., 2010). Entre la diversidad de enfermedades cardiovasculares ligadas a la diabetes, se ha destacado una mayor incidencia en el desarrollo de insuficiencia cardiaca, caracterizada principalmente por alteraciones en la capacidad contráctil y de relajación del corazón. Considerando que gran parte de su capacidad de bombeo recae en los ventrículos y específicamente en la integridad de sus células musculares, es posible que, en un estado de insuficiencia, la función de los cardiomiocitos ventriculares estuviese comprometida.

Estudios previos con modelos de diabetes mellitus tipo 2, sugieren que dichas alteraciones sobre la función de las células musculares podrían radicar en un desacople de la actividad eléctrica y mecánica del corazón, generando trastornos en su ciclo de contracción-relajación, lo cual explicaría la insuficiencia característica de la patología. Tomando en cuenta que el ión Ca^{2+} es indispensable para llevar a cabo el acople, además de que es participe de otros numerosos procesos para la homeostasis celular, es probable que la diabetes generase alteraciones sobre los mecanismos que regulan tanto la cinética de liberación-recaptura, como la concentración intracelular de Ca^{2+} (Laetitia Pereira, et al., 2006; L. Pereira, et al., 2014; Wold, Relling, Duan, Norby, & Ren, 2002).

Si tenemos presente que la arquitectura y la carga de trabajo no es igual entre ambos ventrículos, entonces los posibles cambios sobre los mecanismos de regulación de $[Ca^{2+}]_i$, generados a partir de la diabetes, pudieran ser diferentes entre ambas cámaras y por ende repercutir de modo distinto en la función de cada ventrículo (Bootman, Smyrnias, Thul, Coombes, & Roderick, 2011; Chu et al., 2005).

HIPÓTESIS

La diabetes mellitus tipo 2 altera los mecanismos de regulación de calcio intracelular en los cardiomiocitos del ventrículo derecho e izquierdo.

OBJETIVO GENERAL

Identificar y demostrar los trastornos en los mecanismos de liberación, recaptura y extrusión del [Ca2+]i que afectan a los cardiomiocitos de cada uno de los ventrículos de un modelo animal de Diabetes Mellitus tipo 2.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Inducir y mantener el modelo animal con diabetes mellitus tipo 2 durante 13 semanas.

2. Estandarizar la técnica de medición de calcio intracelular por microfluorimetría en miocitos cardiacos provenientes del endocardio de ambos ventrículos.

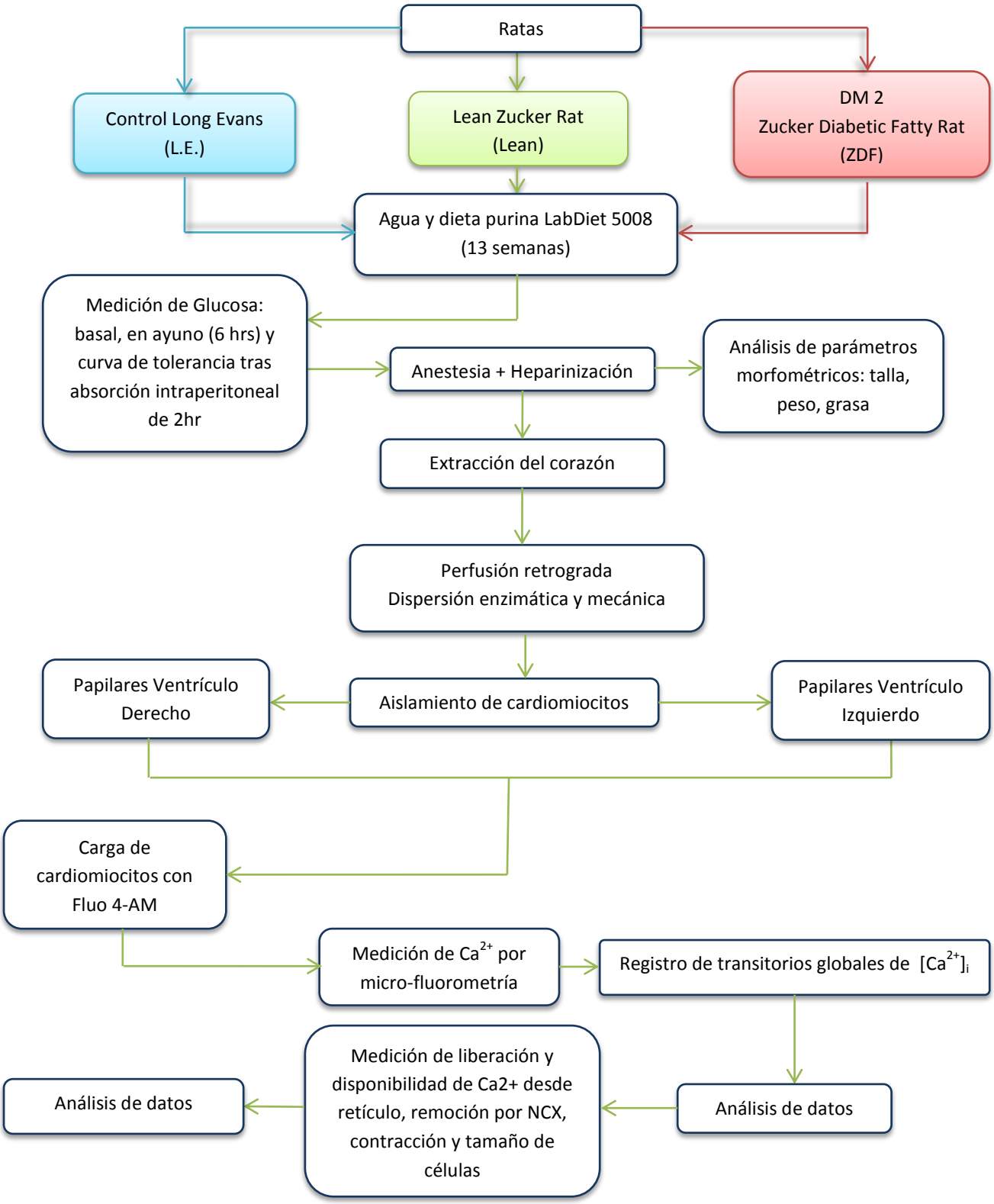
3. Registrar con la técnica de microfluorimetría, los niveles de Ca2+ intracelular, durante el acople excitación-contracción, en miocitos aislados de músculos papilares de ventrículo derecho e izquierdo provenientes de 3 cepas: Zucker Diabetic Fatty ZDF-Lepr^{fa} (*fa/fa*), Lean Zucker (*fa/+ Delgada*) y Long Evans (*Control negativo*).

4. Determinar mediante el análisis de los transitorios de calcio, las diferencias en los niveles de concentración de Ca2+ intracelular así como en los parámetros cinéticos que regulan su disponibilidad en el citosol; entre ambos ventrículos y para cada condición.

5. Determinar mediante el uso de herramientas farmacológicas y la técnica de microfluorimetría, los cambios en la actividad de las proteínas reguladoras de calcio en cada una de las condiciones experimentales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diagrama de trabajo



Modelo animal de diabetes mellitus tipo 2

Usamos a las ratas de la cepa Zucker Diabetic Fatty (ZDF-*lepr*^{fa}), reportada por Julia B. Clark en 1983 (Clark, Palmer, & Shaw, 1983), la cual fue resultado de un programa de crianza endogámica para la conservación del fenotipo diabético, tras la aparición espontánea de diabetes no insulino-dependiente en algunas ratas de una colonia de la cepa Zucker. En los trabajos realizados para el desarrollo de la ZDF se describió que estas se caracterizaron, a diferencia de las Zucker, por una elevada intolerancia a la glucosa y elevados niveles de glucosa plasmática, además de una mayor resistencia a la insulina y una disminución de la grasa corporal y de los niveles de triglicéridos plasmáticos.

Las ratas de esta cepa presentan la mutación puntual autosómica recesiva del gen codificante para el receptor de leptina (*fa/fa*). La mutación A806C, en el gen cambia una glicina por una prolina en la posición 269 del dominio extracelular del receptor a leptina e induce la expresión de isoformas no funcionales del receptor (Ob-R), favoreciendo el desarrollo de resistencia a la leptina y como consecuencia principal a nivel del SNC se inhibe la percepción de saciedad del roedor, así como su capacidad para censar la ingesta calórica con base a la acumulación de reservas en ácidos grasos, la principal fuente de leptina, además de potenciar los demás trastornos de regulación metabólica a los que ha sido asociada una desregulación de la leptina en forma concomitante (Takaya et al., 1996).

Las ratas ZDF comprendieron entonces la población problema, además de establecerse otras dos poblaciones adicionales, empleando ratas de la cepa Long-Evans como control negativo, y ratas Lean (Fa/fa) las cuales son el fenotipo delgado y no diabético de camada de las ZDF; estas son heterocigotas para el gen mutado, no expresan la mutación en el receptor Ob-R aunque si son portadores del alelo recesivo (*fa*) (Heo et al., 2002; Peterson, Shaw, Neel, Little, & Eichberg, 1990). Todas las ratas utilizadas para el proyecto fueron adquiridas y criadas en el Bioterio de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, acorde a los criterios de calidad establecidos por la Norma Oficial Mexicana NOM 062-ZOO-1999, para el cuidado y manejo de animales de laboratorio. Las ratas, de los 3 grupos, fueron sometidas a una dieta alta en grasas (LabDiet 5008), durante un periodo de 3 meses y ambos grupos tendrán libre acceso a agua potable normal.

Tras la finalización del tratamiento y previo al sacrificio del animal, para la caracterización del modelo, procedimos a medir el peso del animal, la circunferencia abdominal y la longitud hocico-ano. Además cuantificamos la grasa epididimal, peripancreática y retroperitoneal, y se realizaron mediciones de glucosa plasmática basal, glucosa plasmática en ayuno y de tolerancia a la glucosa. Para cumplir el punto anterior, previo a la prueba de tolerancia, se registró la glucosa plasmática basal, mediante extracción de sangre, aproximadamente 50 µl, por punción en la vena caudal ventral de la cola de la rata y posteriormente se les retiró el alimento por un periodo de 6 horas, manteniendo libre acceso a agua potable normal para evitar trastornos por alteraciones hidro-electrolíticas. Se consideró que los periodos de ayuno fueran lo más aproximados o acordes a los periodos de descanso dentro de los ciclos circadianos de las ratas. A las 6 horas de ayuno se les administró una dosis intraperitoneal de glucosa a 2 g / kg (Guy B. Mulder, 2010) y se hizo el

registro de glucosa plasmática, a los 30, 60, 90 y 120 minutos después de la administración. Todas las lecturas de glucosa plasmática se realizaron con el sistema Contour™ TS Bayer.

Disección de endocardio y obtención de miocitos aislados

Todas las ratas al término de su tratamiento fueron sacrificadas para la obtención del corazón. Previamente, los animales fueron anestesiados con sevofluorano (5%) y se les administró heparina (200UI/Kg) vía intraperitoneal.

Una vez que se comprobaba la anestesia completa de las ratas se procedía a la extracción y disección del corazón. El procedimiento se describe a continuación. Se realiza una toracotomía con la pared costoesternal vuelta hacia arriba e incidiendo por debajo del apéndice xifoides para acceder en inicio a la cavidad abdominal y enseguida seccionar el músculo diafragma a lo largo de su trayecto de inserción por debajo de los rebordes costo-condrales de la caja. Posteriormente se hacen dos cortes longitudinales y ascendentes para seccionar los arcos costales a cada lado de la caja hasta las costillas superiores y se levanta e invierte la pared condroesternal; ya ubicados en el mediastino inferior de la cavidad torácica se identifican los grandes vasos descentendes, aorta torácica y vena cava caudal, por delante de la columna vertebral, para levantarlos y escindirlos con un corte transversal. A continuación se corta y separa en sentido ascendente el tejido conectivo circundate al trayecto de los vasos adhosados a la columna hasta llegar al mediastino superior donde se termina de aislar en conjunto al corazón y pulmones mediante un único corte a través de los vasos eferentes del cayado aórtico y de la tráquea.

Extraído el corazón se sumerge en solución tirode fría, ~10 ^{O}C, dentro de la cual se retiran los pulmones y los demás restos de tejido fibroadiposo y muscular independientes al corazón. Como medio de referencia ubicado el timo en la región anterosuperior del corazón, se rasga y abre para visualizar el trayecto de salida de la aorta ascendente y su cayado, a continuación se hace un corte longitudinal a través del cayado para separar el trayecto de salida de los 3 vasos aferentes, tronco braquiocefálico derecho, carótida común izquierda y subclavia izquierda, y finalmente con otro corte ahora transversal se separa la aorta ascendente del resto del vaso.

El corazón se suspende en un set de Langendorff, introduciendo una cánula en la aorta ascendente y sujetándola a ésta, a través de la cual se perfunde a todo el corazón y vasos coronarios primero con solución tirode durante 10 minutos y después con solución tirode libre de calcio durante 10 minutos. Tras esta se perfunde con colagenasa a razón de 0.5mg/ml durante 7 minutos y luego durante 5 minutos con proteasa (0.025 mg/ml), diluyendo la enzima en la misma solución previa de tyrode 0 Ca^{2+} con colagenasa. Por último se termina de perfundir el corazón con una solución "*Kraftbrühe*" modificada (Shibukawa, Chilton, MacCannell, Clark, & Giles, 2005), rica en aminoácidos y libre de calcio, para detener la digestión enzimática. Todas las soluciones utilizadas en el set de Langendorff, se mantuvieron a una temperatura de 36.5 ^{O}C.

Concluida la perfusión, el corazón es colocado en una cámara de disección con el fondo recubierto con sylgar y bañado con la solución Kraftbrüeh. Para realizar la disección del endocardio de ambos ventrículos se realiza un corte a lo largo del surco coronario para separar las aurículas de las cámaras ventriculares dejando expuestas las válvulas aurículo-ventriculares. Para facilitar la disección del ventrículo derecho se hace un corte descendente desde el anillo fibroso valvular hacia el ápice del corazón a través del borde derecho de la cámara dejando visible el interior, posteriormente, se realiza un corte de la capa íntima de la pared libre del ventrículo derecho, y posteriormente se repite el mismo proceso en el ventrículo izquierdo.

Para obtener los papilares derechos se separa el anillo de la válvula tricúspide del resto de la pared y reconociendo las valvas del anillo, se tira de estas para traccionar sus cuerdas tendinosas y levantar el músculo papilar del resto de la superficie sin tocarlo y así cortar lo más cercano a su base muscular de origen. Para los papilares izquierdos se corta a través de la región media de la pared lateral del ventrículo izquierdo, en dirección del ápice del corazón. Se separa el anillo de la válvula mitral y sujetando las valvas se procede a separar los músculos papilares del resto de la pared ventricular.

Todas las muestras obtenidas fueron sumergidas por separado en solución de Kraft Brüeh dentro de vasos de precipitado, en los cuales se realizó la dispersión mecánica por agitación constante durante cerca de 30 segundos. Al final la suspensión celular se observa al microscopio y de no tener células se repetía la disociación mecánica.

La composición de la solución Tyrode para la dispersión de miocitos fue, en concentración mM: 140 NaCl, 5.4 KCl, 1 $MgCl_2$, 1 Na_2HPO_4, 10 glucosa, y 1 $CaCl_2$. La solución era equilibrada a un pH de 7.4 con NaOH 2M. La solución Tyrode 0 Ca^{2+} contenía los mismos componentes que la solución Tyrode normal pero se omite la adición del $CaCl_2$. La solución Kraftbrüeh presentaba la siguiente composición, en concentración mM: 20 taurina, 100 ácido glutámico, 5 creatina, 20 glucosa, 10 KH_2PO_4, 2 $MgSO_4$, 25 KCl, 5 HEPES y 0.5 EGTA. El pH era ajustado a 7.4 añadiendo KOH 2M. Para las enzimas se usó colagenasa Tipo II (Worthington CLS2) y proteasa Tipo XIV (Sigma P-5147).

Medición de calcio

La medición de la concentración intracelular de calcio se realizó por espectrofluorometría. El fluorocromo utilizado para cargar las células fue Fluo 4 AM (Invitrogen©). Este colorante sensible al calcio emite fluorescencia en color verde (510 nm) cuando se encuentra unido al calcio y es excitado a una longitud de onda de 494nm (luz azul). Tiene la ventaja de emitir una fluorescencia mayor a otros indicadores de Ca2+ como el Fluo 3 (Invitrogen©) y de mostrar cambios más rápidos en la misma acorde a los cambios en la concentración de Ca^{2+}, esto gracias a que posee una constante de disociación elevada (kd 345) que impide su pronta saturación al unirse a Ca^{2+}, además de garantizar una distribución homogénea y un bajo grado de compartamentalización (Takahashi 2010).

Una vez obtenidos los cardiomiocitos de los músculos papilares fueron incubados en Fluo 4AM 5µM durante 8 minutos, posteriormente el colorante se retiró y el volumen de células cargadas fue diluido en solución extracelular con la siguiente composición (en mM): 136 NaCl, 4 KCl, 1 $MgCl_2$, 10 HEPES, 1.8 $CaCl_2$ y 11 Glucosa y ajustada a un pH de 7.4 con NaOH 2M.

Para la medición se requirió de un set de microscopia invertida por inmersión en aceite para epi fluorescencia Nikon PTI, su conexión se describe a continuación.

Se compone de una lámpara de vapor de mercurio a alta presión, cuya luz es emitida a un set de prismas y espejos alineados para canalizarla a través de un obturador en una red de fibra óptica, de donde se transmite al bloque del filtros debajo del objetivo para ajustar el espectro de la luz a la longitud de onda adecuada para incidir sobre la muestra cargada con Fluo 4 AM y excitarla, así como subsecuentemente para filtrar la luz que emita la muestra por fluorescencia. Por ende la luz que incide sobre la muestra primero atraviesa un filtro de excitación que solamente permite el paso de las longitudes de onda del haz luminoso mayores a 465 nm y menores a 495nm (espectro azul). A continuación la luz filtrada se refleja en un espejo dicroico (500nm) angulado para dirigirla e incidir en la muestra, y una vez que ésta sea estimulada y emita su fluorescencia, el haz de luz generado regresa en dirección opuesta al de excitación y con una longitud de onda mayor, la cual atraviesa el espejo dicroico y se dirige a un filtro de emisión. El filtro de emisión solo permite el paso de las longitudes de onda mayores a 510 nm (espectro verde).

La luz verde filtrada es enviada a un fotomultiplicador, donde se aísla el campo visible para el registro de la fluorescencia celular, y así convertir las señales luminosas en impulsos eléctricos que a su vez mediante un convertidor análogo digital integrado y una tarjeta de datos, permiten convertir los impulsos eléctricos en señales digitales para ser finalmente adquiridas, almacenadas y proyectadas en un ordenador mediante el software para procesamiento de datos y visualización Felix ND™. Las señales registradas se muestran en el software mediante gráficos bidimensionales representando los impulsos eléctricos generados por la emisión de fluorescencia en función del tiempo.

La medición se llevó a cabo depositando las células cargadas sobre el pozo de la cámara de registro, siendo bañadas constantemente en solución externa mediante un equipo de perfusión controlado por gravedad. La cámara de registro fue colocada sobre la platina de un microscopio invertido Nikon Eclipse - TiU equipado con un objetivo de imersión en aceite y conectado al sistema de medición de calcio DeltaRam 814 PTI- Photon Technology. A ambos lados de la cámara de perfusión se colocaron electrodos de platino conectados a un estimulador (Grass Medical Instruments® SD9G), el cual generaba pulsos cuadrados de voltaje de intensidad, frecuencia y duración modulable que eran transmitidos hacia las placas. Tras cada pulso se invertía la polaridad de los electrodos para evitar su polarización y mantener el estímulo constante sobre las células que se encontraban en el campo eléctrico generado por las placas. En el software Felix-ND™ se reguló la frecuencia de captura, el tiempo de captura y el espectro de la longitud de onda a registrar.

Para este protocolo experimental, consideramos que la mayoría de los trabajos reportados estudian los mecanismos de regulación de Ca2+ a bajas frecuencias de estimulación (0.5 Hz a 2 Hz)(Bode, Briston, Overend, O'Neill, et al., 2011; Díaz, Trafford, O'Neill, & Eisner, 1997; Hattori et al., 2000) y nuestro interés por identificar los cambios sobre este proceso a la frecuencia fisiológica ordinaria de nuestro modelo animal (5 Hz), por ello establecimos la aplicación de trenes de estimulación a diferentes frecuencias; 1, 2, 3, 4 y 5 Hz. El voltaje de estimulación fue el doble del valor mínimo necesario para inducir la contracción de cada miocito y la duración del tren dependió de la frecuencia de estimulación para alcanzar el estado estable en la amplitud de los transitorios.

Los cambios detectados en la fluorescencia serían acordes a las variaciones en la concentración de calcio en el citosol con respecto al tiempo, esperando que el estímulo eléctrico generado induzca el acoplamiento excitación-contracción en el cardiomiocito y conforme se contrae la célula, la unión del Fluo 4 con el Ca^{2+} liberado en el citosol, provocará un aumento en la fluorescencia registrada.

Tras la obtención de todos los registros a las frecuencias de estimulación requeridas en la misma célula, se hizo un último registro para obtener los valores de fluorescencia máxima y mínima. La fluorescencia máxima se obtuvo al lisar el miocito con ayuda de una micropipeta de borosilicato mientras que la fluorescencia mínima correspondió con la fluorescencia de fondo de la cámara de registro, es decir, la obtuvimos al remover la célula del campo de registro (Takahashi, Camacho, Lechleiter, & Herman, 1999). Dichas señales de referencia máxima y mínima sirvieron posteriormente como coeficientes para ser evaluados con las demás señales de estimulación obtenidas y así establecer la concentración intracelular de Ca^{2+} mediante la siguiente fórmula:

$$[Ca^{2+}]_i = Kd*(F-Fmín)/(Fmáx-F)$$

Dónde: $[Ca^{2+}]_I$ = concentración intracelular de calcio, Kd = constante de disociación del fluorocromo, F = fluorescencia de registro a la frecuencia de estimulación solicitada, F mín = fluorescencia mínima registrada en la señal de referencia, F = fluorescencia máxima registrada en la señal de referencia. (Grynkiewicz, Poenie, & Tsien, 1985)

Todos los registros obtenidos en el programa Felix fueron exportados para ser posteriormente analizados con ayuda del software ClampFit 10.02 (Molecular Devices).

Los parámetros a utilizados para cada uno de los registros fueron los siguientes:

# Protocolo de estimulación	Frecuencia de estimulación Hz	Impulsos	Tiempo total de registro seg.	Periodo basal inicial seg.	Periodo de estimulación seg.	Periodo basal final seg.	Tiempo total de apertura y cierre del obturador seg.
1	1	30	60	10	30	20	60
2	2	30	45	10	15	20	45
3	3	30	40	10	10	20	40
4	4	30	38	10	8	20	38
5	5	225	75	10	45	20	75

El análisis que se hizo sobre las señales registradas, consistió en obtener los valores de los parámetros que permitan dilucidar los cambios en la cinética de la liberación y recaptura del calcio intracelular y asociar dichos cambios con la participación específica de los componentes del complejo de la unidad liberadora de calcio (CRU) y su implicación en dichos cambios. Los parámetros a cuantificar y su objetivo de estudio se colocan en la siguiente tabla:

PARÁMETRO	OBJETIVO
Derivada de incremento de la señal	Velocidad de liberación de Ca^{2+}
Tau de decaimiento	Capacidad de recaptura y disponibilidad de Ca^{2+} para la siguiente contracción
Pico de la señal	Incremento de Ca^{2+} citosólico
Estado basal de la señal	Concentración de Ca^{2+} durante relajación
Integral del transitorio	Concentración citosólica total de Ca^{2+} durante el transitorio
Promedio de la señal	Concentración media de Ca^{2+} citosólico durante el transitorio

Medición in situ de la actividad de RyR, disponibilidad de Ca2+ en RS y extrusión del NCX.

De igual forma que para la obtención de los transitorios globales, se obtuvieron células aisladas de endocardio de ventrículo derecho y de ventrículo izquierdo de L.E., Lean y ZDF, también cargadas con Fluo 4-AM a 5µM y perfundidas con solución externa fisiológica a flujo constante. Los experimentos se iniciaron con un periodo de registro basal sin estimulación de 10 segundos seguido de un tren de estimulación de campo a 1 Hz durante 30 segundos para alcanzar el estado estable de los mecanismos regulación de Ca2+ en los transitorios (Díaz, et al., 1997), a

continuación ceso la estimulación durante un periodo de reposo de 20 segundos para permitir alcanzar a la célula su estado basal y enseguida se aplicó un pulso sostenido de cafeína 10 mM durante 60 segundos, posteriormente se continuó el registro durante 60 segundos más.

Para la actividad del NCX, se realizó el protocolo descrito previamente con cafeína, después se dejó un intervalo de reposo sin registro de 5 minutos y manteniendo la perfusión constante de solución externa para remover la cafeína y lograr la recuperación de la célula. Una vez que se restableció el estado estable de los transitorios, igual al previo del pulso de cafeína, enseguida se repitió el mismo protocolo, pero en este caso el pulso de cafeína se suplemento con $NiCl_2$ 10Mm. Solo se usaron los cardiomiocitos que se recuperaron completamente en sus transitorios tras la estimulación de campo lo cual fue comprobado después estadísticamente p>.05.

En el caso del primer protocolo solo con cafeína, se logra disminuir el umbral de apertura del RyR dependiente principalmente del Ca2+ luminal del RS (Kong et al., 2008) permitiendo la salida de Ca2+ desde el retículo de forma constante, por lo tanto en esta fase medimos la amplitud de la liberación de Ca2+ y su velocidad, siendo un pulso sostenido se evita la acumulación de Ca2+ en el retículo (Wold, et al., 2002) por lo que al calcular la integral del transitorio (A_T) evocado por cafeína nos permite estimar la disponibilidad de Ca2+ en el organelo. En ésta condición la disminución del transitorio de calcio inducido por cafeína se debe principalmente al intercambiador NCX y en menor medida por procesos más lentos como la captura de Ca^{2+} mitocondrial y la bomba de Ca^{2+} del sarcolema activada por ATPasa PMCA (Díaz, et al., 1997), por lo cual podemos considerar calcular la fase de decaimiento de Ca2+ a una cinética de 2 exponenciales.

En el segundo protocolo la exposición de cafeína + Ni^{2+} bloquea al NCX (Díaz, et al., 1997) y por lo tanto, el decline del transitorio es dependiente ahora de la remoción de Ca^{2+} efectuada por los procesos de menor rapidez antes mencionados. Para cuantificar el curso temporal de la remoción de Ca^{2+} citosólico durante este protocolo, se mide el área bajo el transitorio (A_T) desde la fase de incremento hasta el cese de la aplicación de $NiCl_2$. La diferencia entre la A_T antes, solo con cafeína, y después de la aplicación de Ni^{2+} representa la salida de Ca^{2+} dependiente del NCX (Figura 5).

Todos los datos mencionados fueron capturados en el software Felix ND y posteriormente exportados para ser analizados en Clampfit 10.2.

Medición de la contracción en los cardiomiocitos de L.E., Lean y ZDF

La literatura es basta señalando la relación proporcional que existe entre la concentración de calcio intracelular y la intensidad de la contracción muscular del corazón. (Winslow, Walker, & Greenstein, 2016) Por lo tanto para tener una interpretación más completa de los datos obtenidos sobre los transitorios de calcio y asociarlos con su función, se midió la longitud total de acortamiento de las células aisladas de ventrículo derecho e izquierdo para las 3 condiciones durante su contracción usando estimulación de campo, a las mismas frecuencias de 1 a 5 Hz y con los mismos dispositivos empleados para la obtención de los transitorios. El protocolo de registro se realizó en un microscopio confocal Nikon C2+ grabando secuencias de video de la contracción de los miocitos aislados a las frecuencias de estimulación mencionadas, entre cada frecuencia se respetó un intervalo de recuperación de 60 segundos y durante todo el periodo de registro las células se mantuvieron con una perfusión a flujo constante de solución externa fisiológica. Los videos se exportaron y analizaron usando el software Image-J, ajustando una escala de 6.25 pixels/µm y una resolución de 18 cuadros por segundo para cada video. La medición se efectuó con la herramienta MTrackJ y consistió en el trazo del desplazamiento de los extremos de cada célula desde su posición inicial en reposo hasta alcanzar la máxima contracción. De igual forma que con los transitorios, para el análisis estadístico, se obtuvo la longitud de desplazamiento correspondiente a las últimas 5 a 10 contracciones, generadas por el tren de estimulación a bajas y altas frecuencias respectivamente, de cada célula. Finalmente los datos obtenidos para las células de cada ventrículo provenientes de las 3 cepas animales fueron sometidos a una estadística ANOVA de 1 vía y se determinó una diferencia significativa a partir de $p < .05$.

Medición del tamaño de las células

Con la finalidad de descartar o considerar la influencia del tamaño de las células en nuestro estudio, mediante un microscopio de campo claro LeicaDM1000 con objetivo 40X de inmersión en agua y adaptado a una cámara ProgRes C10plus Jenoptik se tomaron fotografías de cardiomiocitos aislados, suspendidas en solución KB, de ventrículo derecho y de izquierdo provenientes de las 3 cepas: L.E., Lean y ZDF, para medir su área, longitud, diámetro y circunferencia. Las mediciones sobre las imágenes fueron realizadas con el programa Capture Pro 2.1 ajustando una escala de conversión de 807px/100 µm.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se expresan como la media aritmética $\pm$ el error estándar asociado a la media (SEM). Tanto en los gráficos como en las tablas de resultados expuestos, se indica el número de animales en N y el número de células en n, empleadas para cada condición. Para las comparaciones simultáneas, tanto en parámetros morfométricos y glucosa como posteriormente para los transitorios globales de $[Ca^{2+}]_i$, entre los 3 grupos: L.E., Lean y ZDF, se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de una vía para cada frecuencia por separado, complementados con el test de Tukey para determinar las diferencias significativas entre pares individuales de medias. Para las comparaciones realizadas dentro de la misma cepa entre cardiomiocitos de ventrículo derecho e izquierdo se realizaron pruebas de *t* de *Student* no pareadas. Se determinó que las diferencias son significativas cuando el valor de $p < 0.05$. En los gráficos las diferencias significativas obtenidas de las comparaciones hechas entre las distintas cepas, mediante las pruebas ANOVA y Tukey, para los miocitos ventriculares del mismo lado se representan con el símbolo (*), mientras que la diferencias significativas obtenidas de las comparaciones entre miocitos ventriculares derechos e izquierdos de una misma cepa, mediante *t* de Student, se representan con el símbolo (+).

RESULTADOS

Establecimiento del modelo animal de DM2

La rata homocigota Zucker Diabetic Fatty (*fa/fa)* ha sido usada en diversos trabajos sobre la DM2, ya que al presentar una mutación recesiva del gen codificante para el receptor de leptina (Ob-R), expresa isoformas no funcionales de este, lo cual estaría suprimiendo los efectos de señalización llevados a cabo por dicha adipocina, entre ellos la percepción de saciedad. Como resultado la rata ZDF tiene predisposición a una alta ingesta calórica, por ende tiende a desarrollar hiperfagia, poliuria y polidipsia, a partir de la 7ª semana. El desarrollo de diabetes en este modelo replica con estrecha similitud la progresión de la enfermedad monitoreada en humanos, avanzando de un estado de hiperinsulinema y euglucemia hacia un estado de hiperglucemia con deficiencia de insulina. Dicha hiperglucemia la desarrollan a partir de la décima semana después de su nacimiento y es precedida por el desarrollo de intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina (Leonard, Watson, Loomes, Phillips, & Cooper, 2005). Mientras el fenotipo delgado (Lean; heterocigoto para la mutación) de esta rata no presenta hiperglucemia.

Para corroborar este punto y con base a los criterios estándares para diagnosticar la diabetes en humanos, hemos realizado pruebas de medición de glucosa basal (Fig. 3-A), además de tolerancia a la glucosa y posteriormente trazado las curvas para las 3 condiciones analizadas. Para los niveles de glucosa plasmática basal sin ayuno, en el caso de las ratas ZDF (*fa/fa*) (**Fig.**3-A) se comprobó un incremento significativo, con respecto a los otros dos grupos, Lean y L.E. (control -), mientras que en las pruebas de tolerancia (Fig. 3–B), también las ZDF presentaron niveles mayores de glucosa plasmática, con respecto a las otras dos cepas, desde los 30 hasta los 120 minutos después de la administración intraperitoneal; alcanzando un pico de 457 $\pm$ 31.91 mg/dL a los 30 minutos y en la medición final dicho grupo todavía se mantuvo con una media significativamente alta, siendo de un 199 % hasta un 242 % mayor (ANOVA unilateral P <.01, n=16) en comparación a las medias finales de los grupos Lean (n=27) y L.E. (n=15), respectivamente.

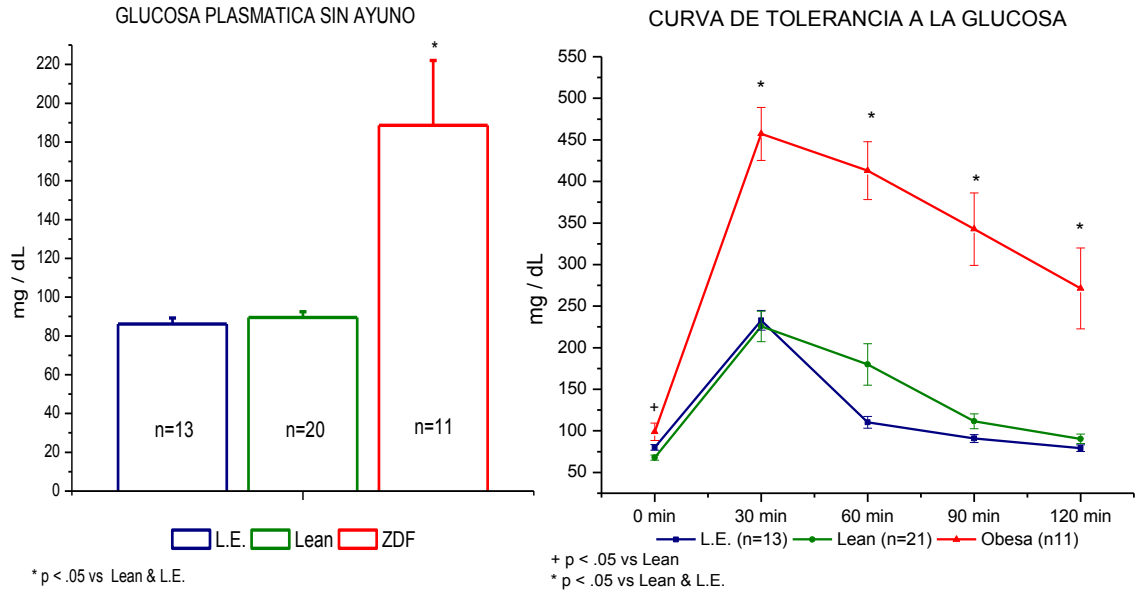


Figura 3. **Glucosa basal sin ayuno** y **curvas de tolerancia a la glucosa tras 6 horas de ayuno**. La condición ZDF presentó mayores niveles de glucosa plasmática basal, y, en las curvas de tolerancia a partir de los 30 minutos de administración se observa un aumento significativo en la glucosa plasmática de las ZDF, que se preserva hasta las 2 horas.

Aislamiento de cardiomiocitos y estandarización de la técnica de medición de $[Ca^{2+}]_i$

Para la obtención de los transitorios globales de calcio por microfluorometría, fue necesario poder adaptar la disposición de los electrodos montados sobre la cámara de registro, necesarios para replicar el acople excitación-contracción, de tal forma que siempre se procurase que la célula estimulada se mantuviese en la región central entre ambas placas de estimulación. El voltaje al cual se replicó el acople fue ajustado al doble del mínimo necesario para apreciar la contracción del miocito, el voltaje medio de estimulación para todas las célula fue de 70.56±1.07 V.

La calibración molar de $[Ca^{2+}]_i$, acorde a la fórmula de Grynkiewikz et al., 1985, mencionada en la metodología, requirió la obtención de los valores de referencia *Fmáx* y *Fmín* (Grynkiewicz, et al., 1985). Para cumplir este propósito se realizó un protocolo, basado en los propuestos por Trafford, Díaz y Bode, en el cual tras el registro de los transitorios mediante la aplicación de los trenes de estimulación a todas las frecuencias establecidas, siempre y cuando la célula aun presentara la misma capacidad contráctil y no tuviese cambios de la fluorescencia basal, se provocó una lesión estructural de la membrana del miocito, mediante el descenso abrupto de una micropipeta de borosilicato con ayuda de un macromanipulador. Se pretende que con la perforación de la membrana se genere la entrada de la mayor cantidad de calcio posible al citosol y con ello

aumente de forma drástica la fluorescencia registrada tras su unión al fluoroforo; el valor obtenido al pico de esta señal se determinó como *Fmáx*. Es importante considerar que la velocidad de la entrada de calcio fuese superior a la velocidad con la cual el fluoroforo pudiera salir de la célula, de lo contrario se estaría subestimando el valor de *Fmáx* y considerando el cociente de la fórmula (*f-Fmín/Fmáx-f*) se estaría calculando una mayor concentración de la real. Para disminuir este margen de error, acorde a lo reportado por Trafford & Díaz y Bode, solamente se consideraron como valores de referencia máxima aquellos en que los valores de *Fmáx* fuesen como mínimo 20% mayores a los de la fluorescencia registrada durante la estimulación de campo al miocito. Después de la obtención de *Fmáx* se retiró al miocito del campo visual de registro, y la fluorescencia capturada en dicha área sin la célula se determinó como valor de *Fmín* (Bode, Briston, Overend, O'Neill, et al., 2011; Díaz, et al., 1997).

Para efectuar el análisis de la mayoría de los parámetros mencionados en la metodología, exceptuando $[Ca^{2+}]_i$ basal, solamente se tomaron en cuenta los últimos transitorios evocados por el tren de estimulación, los cuales tienen una morfología homogénea que nos garantiza que todos los mecanismos de regulación de calcio han alcanzado un estado estable en su actividad y cinética. A bajas frecuencias, denominado así de 1 a 3 Hz, el estado estable de los transitorios se alcanzó tras los primeros 10 a 15 estímulos aplicando trenes de estimulación de 30 segundos de duración. Sin embargo a la frecuencia fisiológica de la rata, denominando así a 5 Hz, la transición hacia el estado estable, en todas las condiciones, fue más prolongada y por ende se tuvo que ampliar el tiempo de estimulación y registro aplicando trenes de 45 segundos. Los parámetros analizados a bajas y altas frecuencias, siguieron comportamientos diferentes, por ello cabe hacer la distinción entre estas dos denominaciones. (**Fig.** 4).

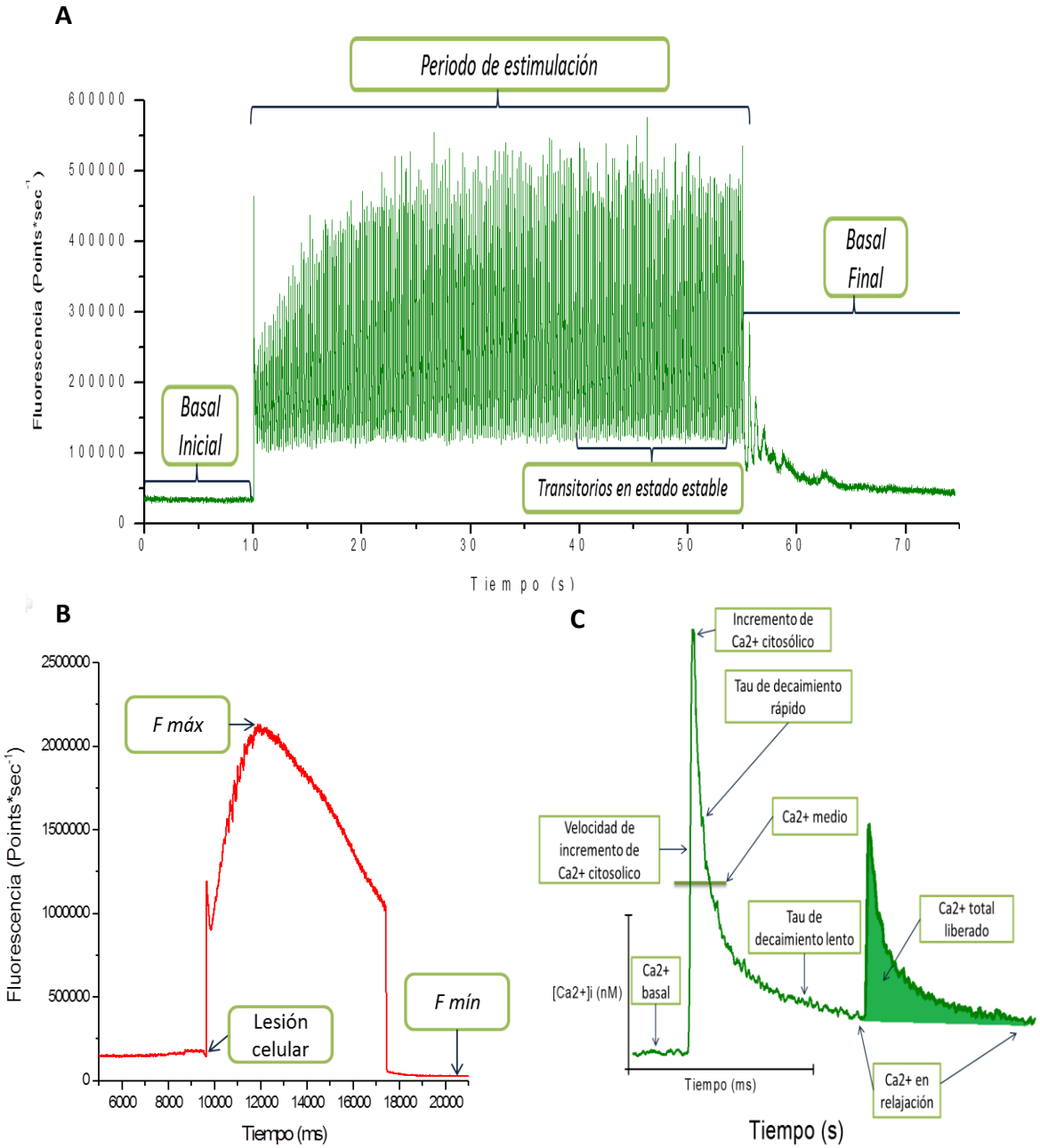


Figura 4. **Protocolo de registro de $[Ca^{2+}]_i$ mediante microfluorometría.** A) La estimulación de campo permite la obtención de trenes de transitorios globales de calcio intracelular, en todas las frecuencias se registran 10 segundos basales previos a la estimulación y 20 posteriores. Los transitorios observados en el basal final corresponderían a oscilaciones espontáneas. Para el análisis de los parámetros, exceptuando calcio basal, solo se toman en cuenta los transitorios en estado estable. B) Protocolo para la calibración de $[Ca^{2+}]_i$ en nM, se provoca la lesión de la membrana permitiendo la entrada abrupta de Ca^{2+} hasta la máxima concentración en citosol (*Fmáx*), posteriormente se retira la célula de la ventana de registro (*Fmin*). C) Una vez convertida la señal fluorescente en $[Ca^{2+}]_i$ (nM) se muestran todos los parámetros analizados en los transitorios estables. La integral del transitorio cubierta en verde correspondería al total de Ca^{2+} (nM) disponible en el citosol durante la contracción.

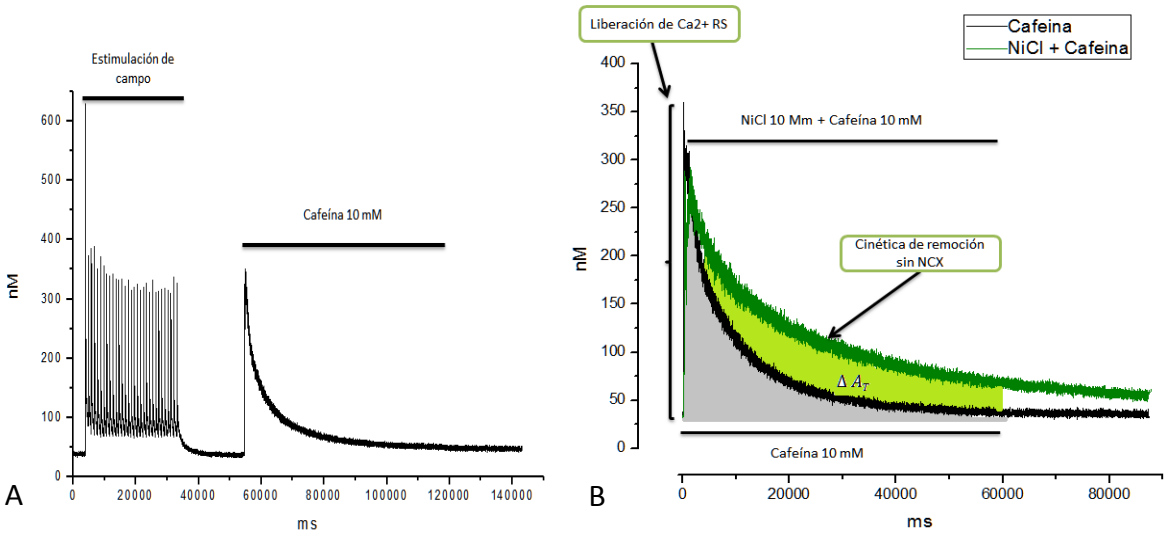


Figura 5. Trazos representativos de los protocolos de Cafeína (A) y Cafeína + $NiCl_2$ (B). En ambos protocolos se inicia un periodo de registro sin estimulación de 10 segundos y a continuación se aplica estimulación de campo a 1Hz durante 30 segundos, tiempo suficiente para alcanzar el estado estable de los transitorios, después cesa la estimulación durante 20 segundos de recuperación y enseguida se aplica un pulso sostenido del fármaco señalado durante 60 segundos, posteriormente se continua el registro durante 60 más. Entre los dos protocolos se deja un intervalo de recuperación sin registro de 5 minutos mientras se mantiene a las células en baño a flujo constante de S.E.N. para lavar el fármaco. En el protocolo de cafeína (A) se mide la liberación de Ca^{2+} como amplitud al pico, la velocidad de liberación como derivada máxima de incremento, el Ca^{2+} total como la integral del transitorio, la cinética de decaimiento con la obtención de las constantes de tiempo mediante ajuste exponencial y el Ca^{2+} remanente en citosol con la concentración nM al final de la aplicación del fármaco. La fase de decaimiento del transitorio con $NiCl_2$ (B), al bloquearse el NCX, corresponde principalmente a mecanismos lentos como la PMCA y el uniporte de Ca^{2+} mitocondrial. Al calcular la integral de este transitorio (verde) y restarle la del transitorio solo con cafeína (gris), se obtiene la cantidad de Ca^{2+} removida por el NCX (ΔA_T).

Análisis de los transitorios globales de $[Ca^{2+}]_i$ durante el acople excitación – contracción

El $[Ca^{2+}]_i$ basal no es significativamente diferente entre L.E., Lean y ZDF a distintas frecuencias

Con el fin de evaluar los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ en condiciones quiescentes, es decir en ausencia de contracción, se inició el registro 10 segundos previos a la estimulación de campo, considerando que en todos los trazos evaluados no se presentaran liberaciones espontaneas durante dicho periodo ni tampoco cambios o pendientes en el estado estable de la emisión fluorescente, ya que asumimos que durante este periodo todos los mecanismos que regulan la entrada, liberación, recaptura y extrusión de calcio citosólico, en ausencia de estímulo para el acople, se encuentran en reposo. Realizando la comparación no se hallaron diferencias significativas entre las 3 condiciones, L.E., Lean y ZDF en ventrículo derecho (ANOVA unilateral P > .05 L.E. n=13, Lean n=8, Diabética n=6), ni en ventrículo izquierdo (P > .05 L.E. n=10, Lean n=10, Diabética n=5). Tampoco se observaron diferencias en los niveles con respecto a la frecuencia de estimulación para ambos ventrículos entre los 3 grupos. Sin embargo se aprecia que la disponibilidad citosólica de calcio basal, en ambos ventrículos, tiende a ser menor en los grupos Lean y ZDF, en comparación con las células de L.E. Estos valores muestran que las células que analizamos mantuvieron su estado funcional, ya que la concentración basal de Ca^{2+} perduró estable a lo largo de todo el experimento durante los registros a distintas frecuencias. (**Fig.** 6)

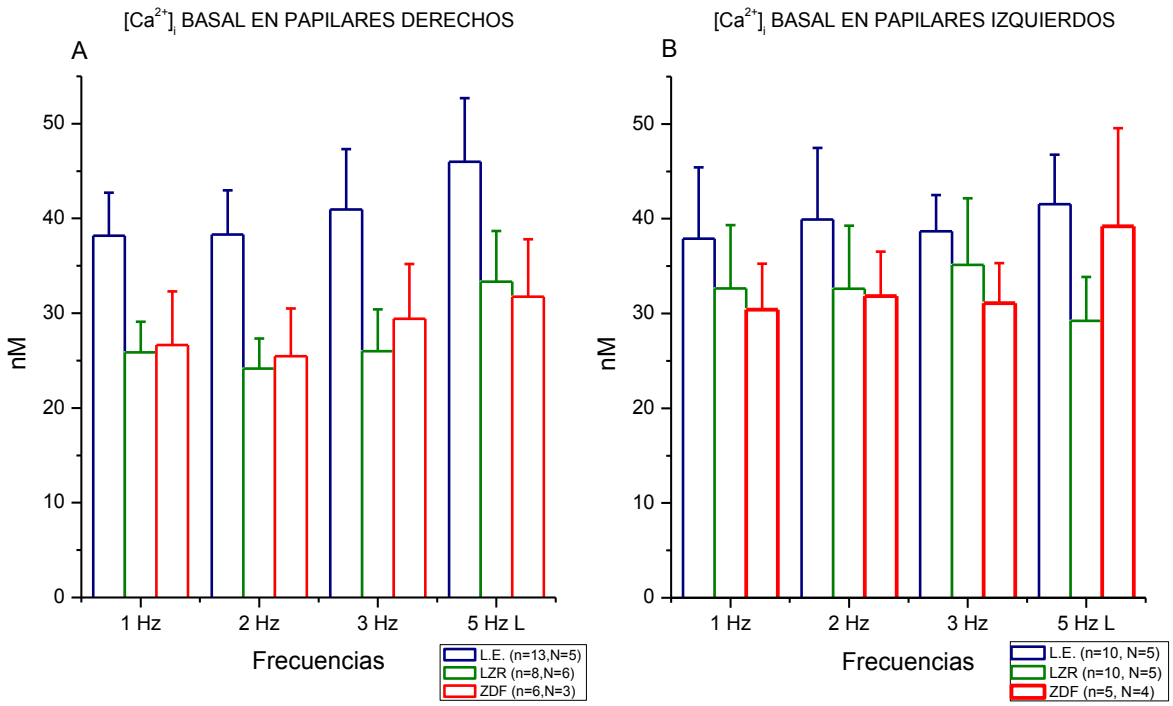


Figura 6. **$[Ca^{2+}]_i$ en condiciones basales**. Tanto en miocitos derechos (A) como izquierdos (B) de todas las condiciones, a todas las frecuencias de registro, no se obtuvieron diferencias significativas en la concentración basal de calcio intracelular.

En los papilares derechos de las ratas Lean y ZDF el incremento citosólico de $[Ca^{2+}]_i$ y su concentración durante la relajación es menor que en las ratas Long Evans. En los papilares izquierdos la $[Ca^{2+}]_i$ durante la relajación es mayor en ZDF mientras que el incremento citosólico solo es mayor a bajas frecuencias, en ambos casos con respecto a LE. y Lean.

Sístole es el periodo en el cual el músculo cardiaco lleva a cabo su contracción, para ello requiere del incremento de la disponibilidad de Ca^{2+} en el citosol que conlleve a la liberación de calcio inducida por calcio (CICR) y a la interacción del ión con la troponina-C. Este incremento precede a la contracción y, específicamente en el ventrículo, se puede atribuir a la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular a través de los canales de calcio voltaje dependientes tipo-L (Cav1.2), activados tras la propagación del potencial de acción a través del sarcolema, y a la liberación de calcio desde el RS a través de la apertura principalmente de los receptores RyR2; en la morfología del transitorio este evento se representa en la fase de ascenso (Stokke, et al., 2012). En los miocitos de los papilares derechos el incremento de $[Ca^{2+}]_i$ en esta fase, estimulando a las células a todas las frecuencias, disminuyó drásticamente en las condiciones Lean y ZDF, en comparación con las L.E. ($P < .001$); ver la figura 7-A.

Posterior a la sístole, la relajación del músculo cardiaco, denominada diástole, conlleva la separación de los puentes cruzados entre actina y miosina para que la sarcómera recupere su longitud original para la siguiente contracción, este proceso requiere previamente de la disociación del complejo troponina-calcio y que subsecuentemente la $[Ca^{2+}]_i$ disminuya en el citosol. Los principales mecanismos que llevan a cabo este proceso son la extrusión de calcio fuera de la célula a través del NCX, y en menor magnitud por la $PMCa^{2+}$-ATPasa, su recaptura hacia el RS mediante el complejo $SRCa^{2+}$-ATPasa, y en mucha menor cantidad (aproximadamente 1%) por el bombeo uniporte hacia la mitocondria. La $[Ca^{2+}]_i$ durante la relajación en el transitorio corresponde al nivel medio mínimo registrado entre cada transitorio de calcio. De igual modo que en la sístole, los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ durante la relajación en los miocitos de los papilares derechos de la rata Lean y ZDF, en comparación a los de L.E., se hallaron significativamente disminuidos (*P* <.001 vs L.E.), a todas las frecuencias de estimulación (Fig.7-B).

En los cardiomiocitos izquierdos de ZDF el incremento citosólico de $[Ca^{2+}]_i$ (Fig. 7-C), de 1 a 3 Hz, fue significativamente mayor con respecto a L.E. y Lean del mismo lado, pero, al estimular a la frecuencia fisiológica su amplitud disminuyó drásticamente siendo significativamente menor en comparación con los izquierdos de Lean e incluso se observa una tendencia similar con respecto a los izquierdos de L.E. Mientras que la $[Ca^{2+}]_i$ durante la relajación de los miocitos izquierdos de ZDF conforme aumentó la frecuencia de estimulación se acumuló de forma más acentuada con respecto a las otras dos condiciones, siendo significativamente mayor con respecto a L.E. y Lean a frecuencia fisiológica (Fig. 7-D)

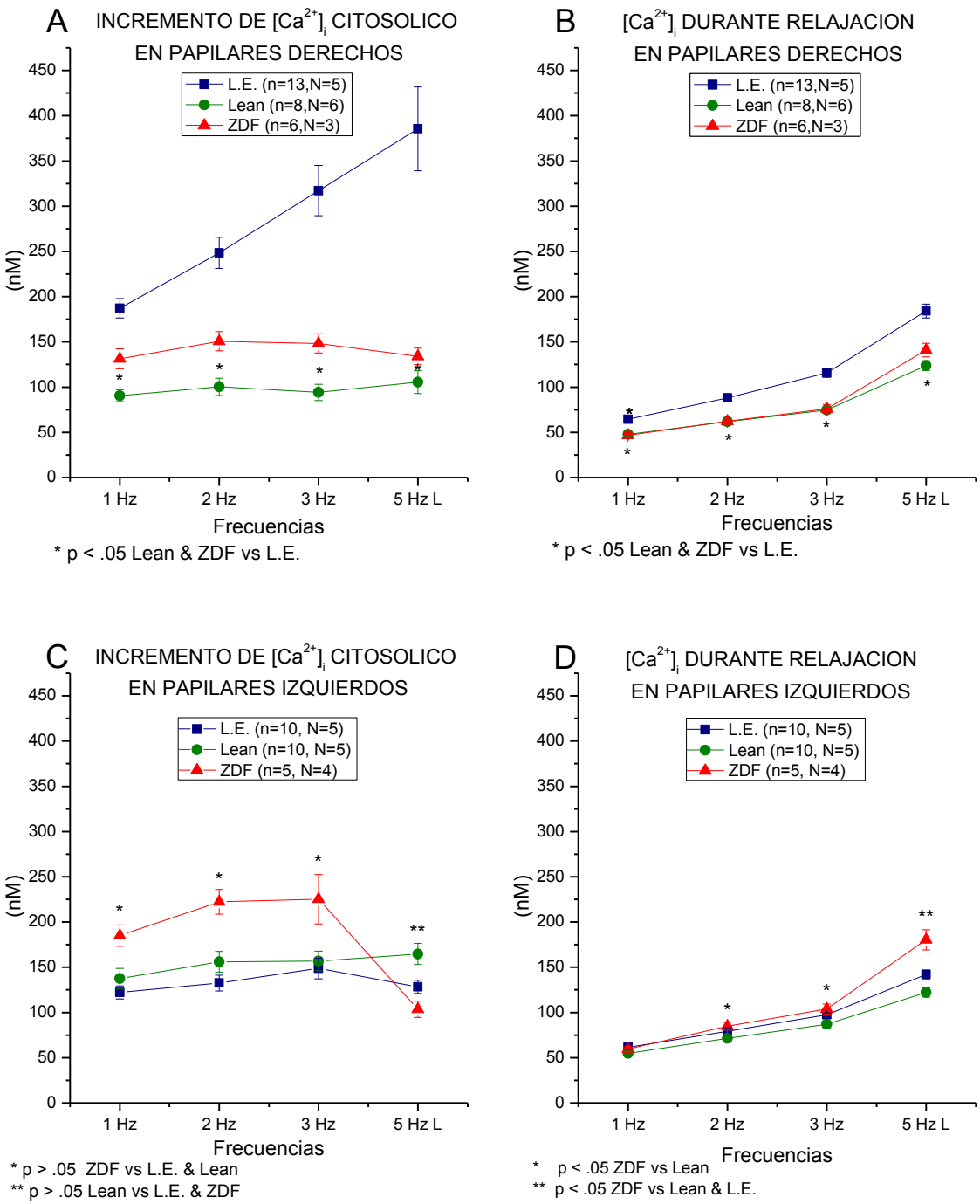


Figura 7. **$[Ca^{2+}]_i$ sistólica y diastólica en cardiomiocitos derechos e izquierdos**. En la condición L.E. derecha, se observa un incremento en la concentración sistólica (A) y diastólica (B) de calcio conforme aumenta la frecuencia. En los miocitos derechos de las ratas Lean y ZDF, la concentración de calcio siempre fue menor que en la condición control (L.E). En los miocitos izquierdos de ZDF, a bajas frecuencias, la concentración sistólica (C) fue significativamente mayor con respecto a los izquierdos de L.E. y Lean, pero a 5 Hz la acumulación de calcio en diástole (D) aumentó con respecto a las otras dos cepas, en cambio la sistólica resulto menor.

El incremento citosólico de $[Ca^{2+}]_i$ – y su concentración en relajación en L.E. tiende a ser mayor en los miocitos de papilares derechos en comparación a los izquierdos de la misma condición; esta relación se invierte a bajas frecuencias en la condición ZDF

En diversos trabajos, en mamíferos, se ha reportado que el ventrículo izquierdo, en condiciones normales o sanas, desarrolla una mayor fuerza contráctil que el derecho, y por ende tiende a presentar una mayor disponibilidad de $[Ca^{2+}]_i$ durante el incremento, en forma concomitante se espera que durante la relajación los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ disminuyan de manera proporcional al incremento (Kondo, et al., 2006). Analizando este aspecto hemos hallado que la disponibilidad de $[Ca^{2+}]_i$ durante la contracción en la condición L.E. fue significativamente mayor en los miocitos de ventrículo derecho, en comparación a los de su misma condición en el ventrículo izquierdo, para todas las frecuencias de estimulación (P <.01), y que además este incremento tiende a aumentar con respecto a la frecuencia de estimulación (Figura 8-A, Barras azules lisas vs barras azules rayadas). En cambio en las ratas ZDF (Barras rojas lisa y rayadas), estimulando de 1 a 3 Hz, el incremento sistólico fue mayor (P <.01) en los miocitos de ventrículo izquierdo, comparándolos con los de ventrículo derecho en su misma condición, y también es significativamente mayor a la concentración disponible para los miocitos de ventrículo izquierdo en la condición L.E. No obstante, como se observa en la Figura 8-A, a 5 Hz esta relación se invierte en los mismos miocitos de ventrículo izquierdo de ZDF, tendiendo ahora a ser menor en comparación con L.E.

De igual forma que en la sístole, realizando las comparaciones entre miocitos ventriculares izquierdos y derechos para cada condición, la $[Ca^{2+}]_i$ durante la relajación en los miocitos de ventrículo derecho de L.E. (azul liso), tiende a incrementarse con respecto a la frecuencia de estimulación, siendo significativamente mayor a partir de 3 Hz comparados contra los izquierdos de la misma condición (rayas azules) (P <.01). Y a su vez de nuevo en los miocitos de ventrículo izquierdo de ZDF (rayas rojas), la concentración en diástole se incrementa en comparación con las derechas de la misma condición (rojo liso), pero a diferencia de lo observado en sístole, este incremento se mantiene en todas las frecuencias. Cabe destacar que a 5 Hz de estimulación, al hacer la comparación ahora entre las 3 condiciones, este aumento en diástole de los miocitos de ZDF incluso supera la concentración en los miocitos izquierdos de L.E. (**Fig.**8).

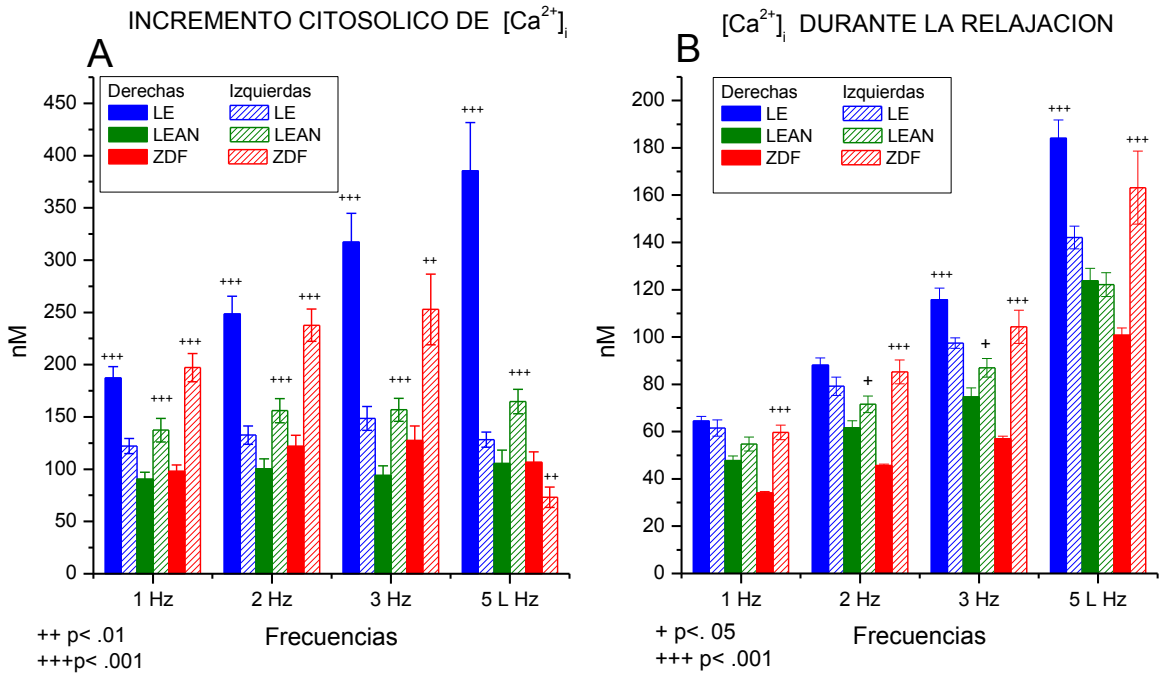


Figura 8. **Comparación de incremento de $[Ca^{2+}]_i$ citosólico y durante la relajación entre miocitos derechos e izquierdos.** El número de ratas (N) y de células (n) es el mismo que en las gráficas de la Figura 4. Se observa que en los miocitos izquierdos de ZDF es mayor la amplitud del transitorio a bajas frecuencias, contrario a la relación en L.E. Sin embargo a 5 Hz la amplitud sistólica de calcio en los miocitos izquierdos de ZDF ahora tiende a ser menor en comparación a L.E. a expensas de un aumento progresivo de la acumulación de calcio en diástole. Para estos gráficos la significancia mostrada (+ P < .05, ++ P < .01, +++ P < .001) es la obtenida únicamente respecto a las comparaciones hechas de ventrículo derecho contra izquierdo para cada condición por separado mediante *t* de Student, sin comparar entre cepas de un mismo ventrículo.

Las velocidades de incremento y decaimiento de $[Ca^{2+}]_i$ en el citosol de los miocitos de ventrículo derecho son mayores en L.E. en comparación con Lean y ZDF, pero en ventrículo izquierdo son mayores en ZDF

La velocidad con la que aumenta el $[Ca^{2+}]_i$, nos permite especular sobre la proporción y/o la probabilidad de apertura de los RyR activos para la liberación de Ca^{2+}, mientras que con la velocidad de decaimiento inferimos la capacidad de recaptura y extrusión de calcio principalmente por la SERCA y el NCX, respectivamente. Para cuantificar éstos parámetros calculamos la derivada máxima de incremento y la derivada máxima de decaimiento del transitorio. En la figura 9-A se puede observar que en los miocitos derechos de L.E., identificados con los cuadrados azules rellenos (inciso A), ambas velocidades aumentan progresivamente con respecto a la frecuencia de estimulación, pasando de 13.77±0.96 a 1 Hz hasta 29.46±4.24 nM/ms a 5 Hz, y en el decaimiento de 6.91±0.52 a 1 Hz hasta 27.85±4.83 nM/ms a 5 Hz. Mientras que en las condiciones Lean, mostrados en verde (inciso B), y ZDF (inciso C), mostrados en rojo, en los miocitos del mismo ventrículo, correspondientes a los cuadrados rellenos, ambas velocidades son menores que en L.E. y se mantienen prácticamente constantes sin importar la frecuencia de estimulación.

Además al hacer las comparaciones entre las 3 condiciones para cada ventrículo por separado, resultó que para miocitos de ventrículo izquierdo (rombos claros), la velocidad de incremento a bajas frecuencias fue significativamente mayor ($P < .05$) en ZDF (rojos), en comparación con Lean (verdes) y L.E. (azules). De igual forma la velocidad de decaimiento, en los miocitos izquierdos, fue significativamente mayor en ZDF, a todas las frecuencias en comparación con Lean y L.E. Aunque ninguno de estos dos aumentos se equipara en magnitud a lo observado en los miocitos derechos de L.E.

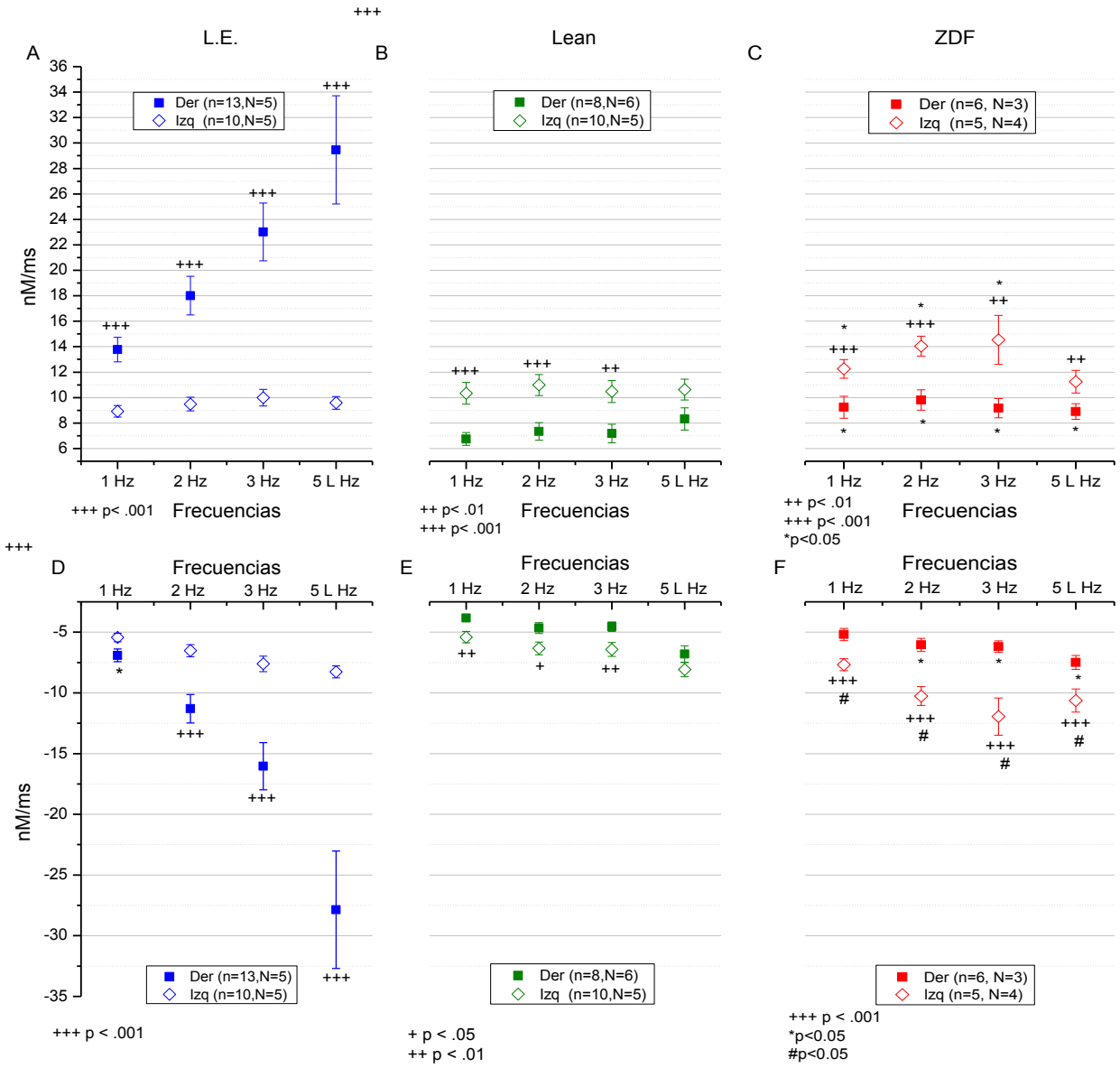


Figura 9. **Velocidades de incremento y decaimiento citosólico comparadas entre miocitos de ventrículo derecho e izquierdo para condición por separado.** En los miocitos derechos de L.E. (A y D) las velocidades se incrementan conforme aumenta la frecuencia. En los miocitos derechos de Lean (B y E) y ZDF (C y F) ambas son menores en comparación a sus respectivos miocitos izquierdos y prácticamente no se modifican con los cambios de estimulación, en esta última condición las velocidades en los miocitos izquierdos se

incrementan ligeramente. + denota diferencias entre papilar derecho e izquierdo de la misma rata; * entre papilares del mismo ventrículo pero de ZDF y L.E; # denota diferencias entre ZDF y L.E. o Lean pero de papilares del mismo lado.

La cinética de decaimiento se hace más rápida para las 3 condiciones y en ambos ventrículos, conforme aumenta la frecuencia de estimulación

Independientemente de las velocidades máximas de incremento y decaimiento, la duración del transitorio puede modificarse a distintos porcentajes en función de la cantidad de Ca^{2+} total movilizado y del mecanismo de transporte preponderante en tal fase del transitorio. Elegimos calcular la fase de decaimiento, desde el pico de la señal cuando el $[Ca^{2+}]_i$ comienza a ser removido desde el citosol, usamos un ajuste exponencial de 2 términos, considerando los principales mecanismos que participan en dicha fase: la recaptura hacia el retículo por parte de SERCA y la extrusión por parte de NCX.

Al hacer los ajustes para las constantes de tiempo, hallamos que al efectuarlo a dos exponenciales aunque a todas las frecuencias se mantiene una correlación por arriba del 90% con la fase de decaimiento de los transitorios de todas las condiciones, dicha correlación es mayor a frecuencias bajas, siendo evidente a 1 y 2 Hz la distinción de los dos componentes que participan en la disminución de Ca^{2+} citosólico, uno lento ($\tau 1$) y otro rápido (τ 2) (Figura 10). En la figura 8 observamos que tanto en los transitorios del papilar derecho como del izquierdo, conforme aumenta la frecuencia de estimulación, aumentan la velocidad de decaimiento, es decir $\tau 1$ y τ 2 disminuyen. En el papilar derecho, la $\tau 1$ y τ 2 es más lenta en las ratas Lean que en el grupo de LE y ZDF. Mientras que la $\tau 1$ de las ratas ZDF no cambia significativamente con respecto a la L.E., la Tau2 de ZDF es significativamente menor, es decir más rápida, que en los otros grupos a bajas frecuencias (Figura 8A y 8C). En los papilares izquierdos, solo a las frecuencias de 1 y 2 Hz encontramos diferencias en la $\tau 1$ y τ 2 de los transitorios de las ratas ZDF con respecto a grupo de L.E y Lean, mientras que $\tau 1$ resultó más rápida, τ 2 fue más lenta (Figura 8B y 8D).

En las ratas ZDF el calcio global disponible durante la contracción disminuye en los cardiomiocitos del ventrículo derecho y aumenta en los de izquierdo

Para obtener la cantidad global total de Ca^{2+} disponible durante el proceso de acople excitación contracción, calculamos la integral de los transitorios. En los miocitos derechos de L.E. obtuvimos una media desde 28784 $\pm$ 1603.64 nM a 1 Hz, hasta 31565 $\pm$ 3060.32 nM a 5 Hz, comparando estos valores con los obtenidos en los miocitos derechos de Lean y ZDF, hallamos una disminución significativa en ambas condiciones ($P < 0.001$) pero de distinta magnitud: en Lean la disponibilidad de Ca^{2+} en citosol disminuyó de 45.99% a 1 Hz hasta 72.75% a 5 Hz, mientras que en ZDF la disminución fue de 33.91% a 1 Hz hasta de 60.52% a 5 Hz , en ambos casos con respecto a L.E. (Figura 9-A)

En los miocitos izquierdos de ZDF, de 1 a 3 Hz, el comportamiento fue opuesto al encontrado en los papilares derechos, presentando una concentración global significativamente mayor con respecto a los miocitos izquierdos de L.E. ($P < 0.05$), de 56.01% a 1 Hz hasta 43.56% a 5 Hz. También con respecto a los transitorios de calcio izquierdos de Lean los valores fueron significativamente mayores. Sin embargo, como se puede apreciar en la Figura 9-B, aunque la concentración global de calcio, a bajas frecuencias, sea mayor en los miocitos izquierdos de ZDF, ésta disminuye conforme aumenta la frecuencia de estimulación, tal que a 5 Hz la disponibilidad total de calcio en ZDF ahora es significativamente menor ($P < 0.05$) con respecto a Lean y también tiende a ser menor con respecto a L.E.

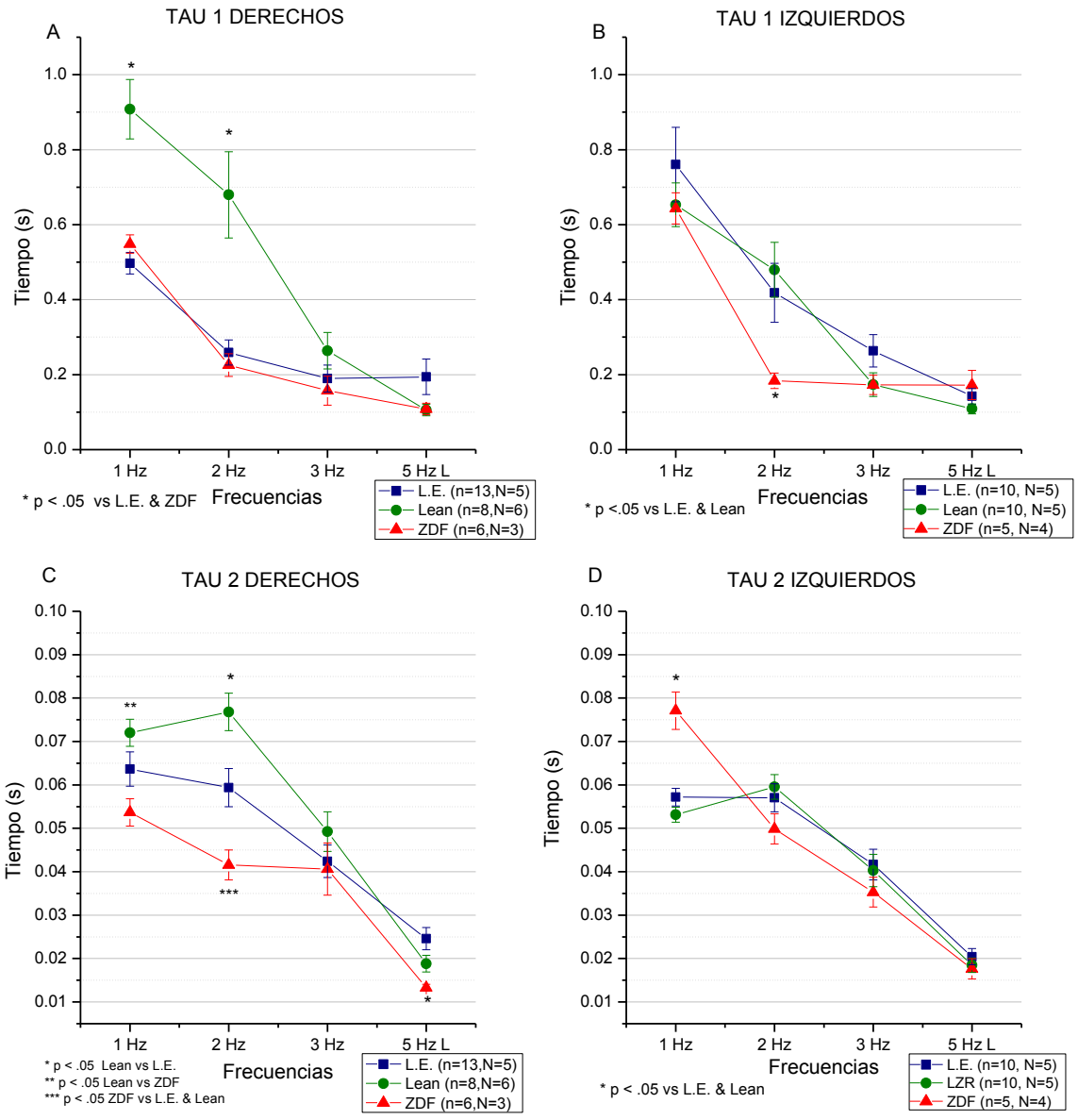


Figura 8. Constantes de tiempo rápidas y lentas de la fase de decaimiento del transitorio. Conforme aumenta la frecuencia de estimulación, tanto el componente rápido (A y B) como el componente lento (C y D), de todas las condiciones disminuyen y se aproximan a valores semejantes.

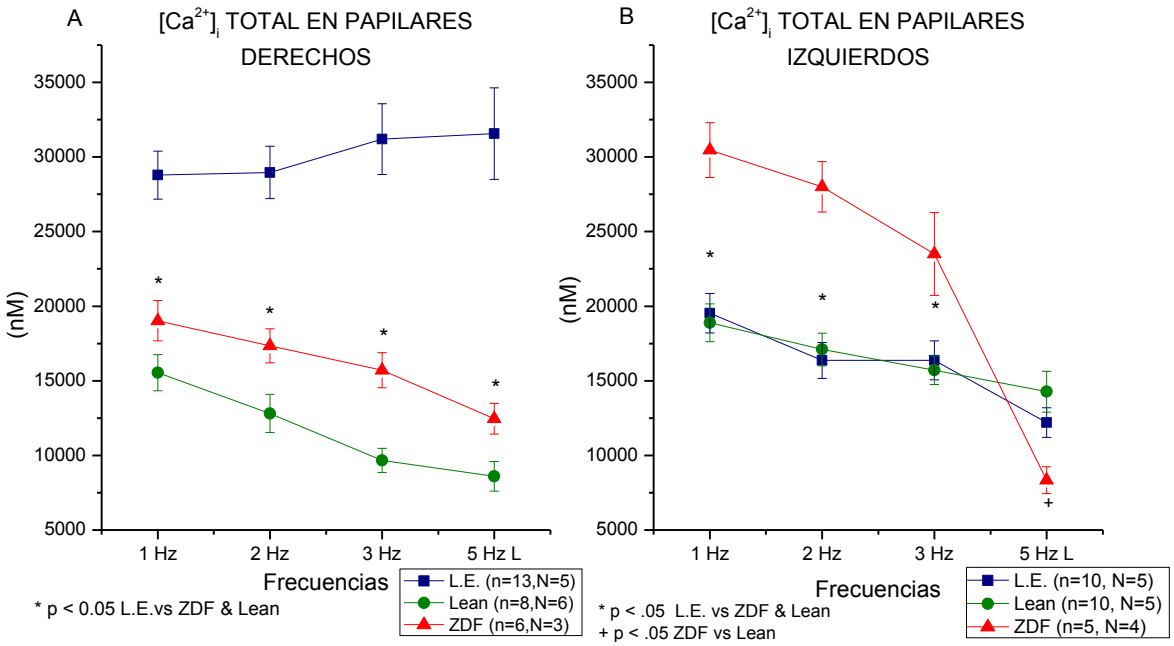


Figura 9. **$[Ca^{2+}]_i$ global durante el transitorio.** En los miocitos derechos (A) de Lean y ZDF la concentración de calcio disminuye conforme aumenta la frecuencia de estimulación. Para todas las frecuencias estudiadas, la concentración de calcio fue mayor en los miocitos de LE. En los miocitos izquierdos (B) de la rata ZDF, la concentración de calcio fue mayor a 1hz con respecto al grupo LE y LEAN, aunque conforme aumento la frecuencia de estimulación, la concentración total de calcio disminuyo, llegando a ser menor que la de los miocitos de la rata LEAN y LE (5 Hz).

La media de $[Ca^{2+}]_i$ se incrementa gradualmente en las 3 condiciones para ambos ventrículos conforme aumenta la frecuencia de estimulación

La media de $[Ca^{2+}]_i$ representa el promedio de la concentración del ión mantenida en el citosol durante toda la oscilación evocada por el acople E-C, este valor nos da una aproximación del balance sostenido entre los mecanismos de incremento y decaimiento, ya que si dicho parámetro cambia respecto a la frecuencia, esto implicaría predominancia de alguno de los dos mecanismos. Cabe destacar que tanto en ventrículo derecho como en ventrículo izquierdo de las 3 cepas, la concentración media de Ca^{2+} tendió a aumentar conforme incrementamos la estimulación.

En los cardiomiocitos derechos de Lean y ZDF (Figura 10-A) este incremento fue drásticamente menor ($P < .001$), de 69% a 1Hz hasta 63% a 5 Hz respecto de la media de L.E. del mismo lado a todas las frecuencias de estimulación. Mientras que en el ventrículo izquierdo (Figura 10-B) el comportamiento de dicho parámetro fue más semejante entre condiciones, sin hallarse diferencias a frecuencia fisiológica, no obstante que a bajas frecuencias de 1 a 3 Hz, la media de ZDF fue significativamente mayor respecto a Lean del mismo lado y también contra L.E. izquierdo solo de 2 a 3 Hz.

Haciendo comparaciones entre ventrículo derecho e izquierdo para cada condición por separado, la concentración media de $[Ca^{2+}]_i$ del ventrículo izquierdo de ZDF y Lean resultó mayor (*t-Student P*

< .05) que la de su respectiva frecuencia en el ventrículo derecho de 1 a 3 Hz, sin embargo al alcanzar la frecuencia fisiológica, dichos valores se aproximaron si encontrarse diferencias. En el caso de L.E. el ventrículo derecho presentó una concentración media mayor a todas las frecuencias de estimulación, desde 12% a 1 Hz hasta 62% a 5 Hz respecto al ventrículo izquierdo.

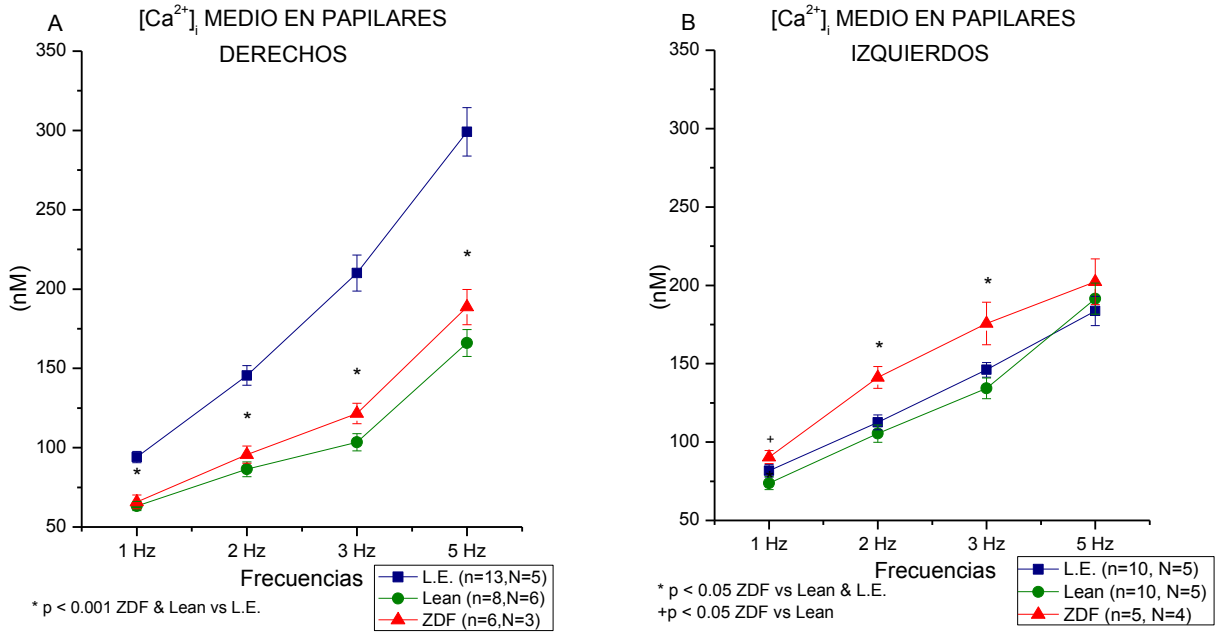


Figura 10. **Media de $[Ca^{2+}]_i$ durante el transitorio.** En todas las condiciones la concentración media se incrementó progresivamente, pero en los miocitos derechos (A) de Lean y ZDF fue drásticamente menor respecto a L.E., como se puede observar esta diferencia se agranda conforme aumenta la frecuencia. En los miocitos izquierdos de ZDF (B) aunque en inicio de 2 a 3 Hz la media se incrementa en mayor magnitud respecto a Lean y L.E., al alcanzar la frecuencia fisiológica de 5Hz, se igualan los valores entre las tres cepas.

Análisis de la liberación y disponibilidad de Ca2+ desde retículo, y actividad del NCX.

La liberación de Ca2+ desde retículo y su velocidad tienden a ser mayores en Lean y ZDF con respecto a L.E. en ambos ventrículos

Con los resultados obtenidos anteriormente en los transitorios, en los que la condición ZDF presentó una disminución en la amplitud de los transitorios de cada ventrículo, aunque por mecanismos distintos, sobre todo a frecuencia fisiológica de 5 Hz, sospechamos que estas alteraciones pudieran deberse a desordenes en los mecanismos que componen la diada cardiaca y que son necesarios para llevar a cabo el proceso CIRC y por ende el acople excitación-contracción. Específicamente nos enfocamos en estudiar la disponibilidad de Ca2+ en el retículo sarcoplásmico, su liberación por parte de los RyR2 y la capacidad de extrusión llevada a cabo por el NCX. Al evocar la respuesta con cafeína, la amplitud al pico de los transitorios correspondiente

a la liberación de Ca2+ desde retículo fue semejante en ventrículo derecho e izquierdo de las 3 condiciones, se apreció que en ambos casos, derechos (Figura 11-A) e izquierdos, Lean y ZDF tienden a liberar más Ca2+ en presencia del mismo estímulo en comparación a los respectivos de L.E., siendo más marcada y significativa esta diferencia en el miocitos izquierdos de Lean (Figura 11-B).

Con respecto a la velocidad de liberación, calculando la derivada máxima de ascenso se obtuvo que los miocitos derechos de Lean también tuvieron una liberación significativamente más rápida respecto a los derechos de L.E., no obstante al observar los gráficos se puede notar que en el ventrículo izquierdo también la cinética de liberación tiende a ser mayor en Lean. En estos dos casos, izquierdo y derecho, la diferencia entre ZDF y L.E. fue más estrecha sin ser significativa (Figura 11 C y D).

El Ca2+ total es mayor en ZDF con respecto a L.E. para ambos ventrículos y la cinética de remoción es más rápida en los miocitos izquierdos de Lean respecto a los homólogos de L.E. y ZDF

El área bajo la curva de los transitorios evocados por cafeína fue significativamente mayor, tanto en los miocitos derechos como en los izquierdos de ZDF en comparación a los miocitos, de su respectivo ventrículo, de L.E. y, aunque mediante la estadística realizada no se obtiene una diferencia significativa, también el área total de los transitorios de Lean, derechos e izquierdos, tiende a ser mayor respecto a los de L.E. para cada lado. Mientras que realizando comparaciones entre miocitos derechos e izquierdos, para condición por separado, la disponibilidad de Ca2+ es parecida (Figura 12).

En compaginación con estos datos también se midió la cantidad de Ca2+ que permaneció en el citoplasma sin ser removido al final del estímulo, lo cual arrojo que en los miocitos izquierdos de ZDF se mantuvo más Ca2+ remanente con respecto a los izquierdos de L.E., y aunque no resulto significativo en el ventrículo derecho se observó una diferencia semejante entre ambas condiciones. Además al comparar entre ventrículos de cada condición por separado, los miocitos izquierdos de Lean removieron más Ca2+ respecto a su contraparte derecha (Figura 13).

Analizando la cinética de decaimiento del transitorio mediante un ajuste exponencial a 2 términos, considerando una fase de remoción inicial rápida y breve seguida de una fase más lenta y prolongada, obtuvimos que en el ventrículo izquierdo de Lean ambas fases fueron más rápidas respecto a las izquierdas de L.E y también se aprecia que tienden a ser más rápidas que las de ZDF. Mientras que entre los miocitos derechos de las 3 condiciones no se aprecian diferencias en ninguno de los dos componentes (Figura 14).

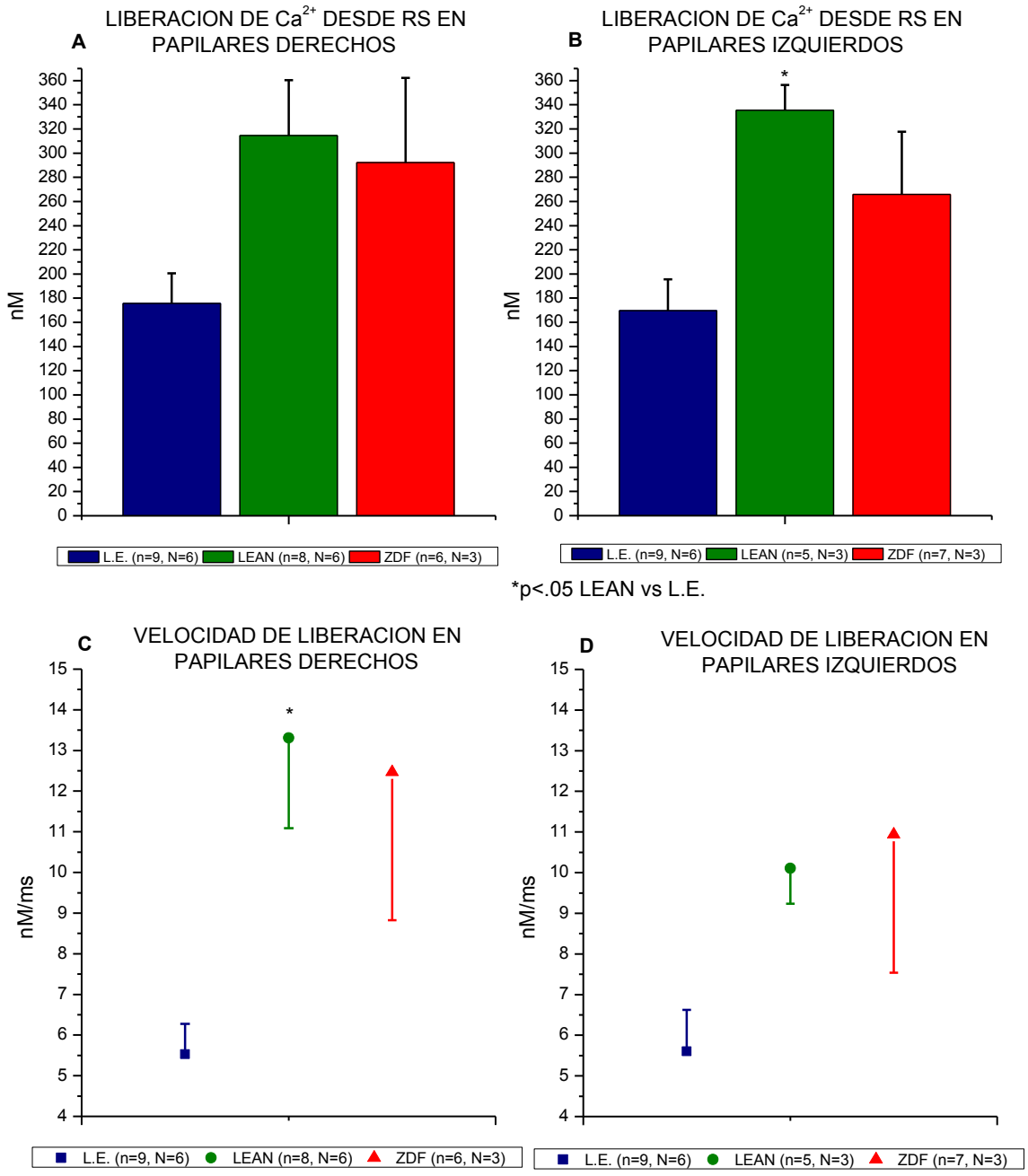


Figura 11. Amplitud de liberación y velocidad de liberación de Ca2+ desde retículo sarcoplásmico. La cantidad de Ca^{2+} liberado es semejante entre ventrículo derecho (A) e izquierdo (B) para cada condición, tendiendo a ser mayores en Lean y ZDF respecto a L.E. De igual forma la velocidad con la que lo liberan desde el organelo también tiende a ser mayor en Lean y ZDF, tanto derecho (C) como izquierdo (D).

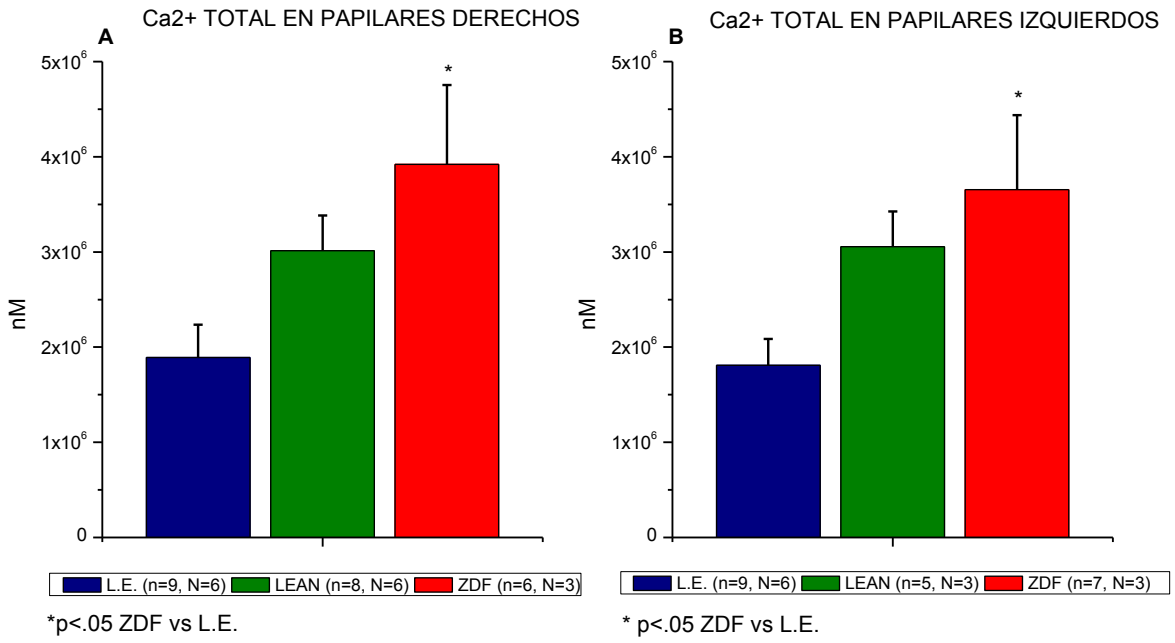


Figura 12. Ca2+ total en citosol en papilares derechos (A) e izquierdos (B). En ambos casos se observa que ZDF presenta integrales más grandes respecto a L.E., aunque también Lean tiende a ser mayor a L.E. Los niveles entre ventrículo derecho e izquierdo para cada condición son similares.

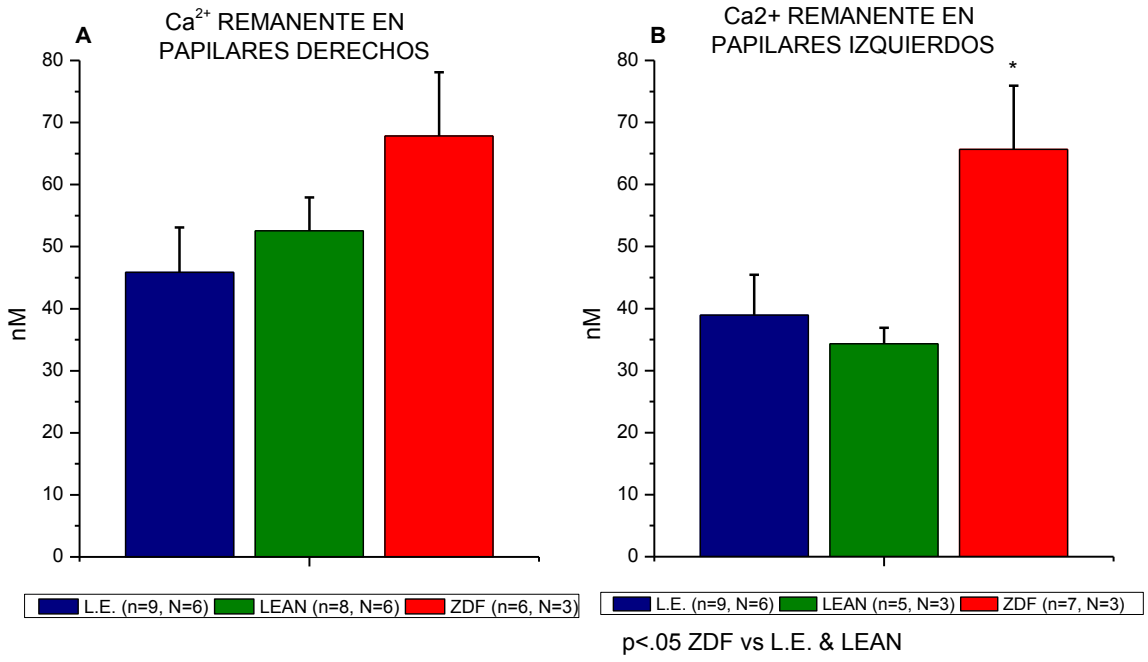


Figura 13. Ca2+ remanente. Representa la $[Ca^{2+}]_i$ que permanece sin ser removida al finalizar el estímulo en papilares derechos (A) e izquierdos (B). Se aprecia que ZDF en ambos casos tiende a acumular más Ca^{2+} en el citosol. Mientras que L.E. presenta niveles similares en los cardiomiocitos de ambos ventrículos, los cardiomiocitos izquierdos de Lean (B) remueven una mayor cantidad que los del ventrículo derecho de la misma condición (A).

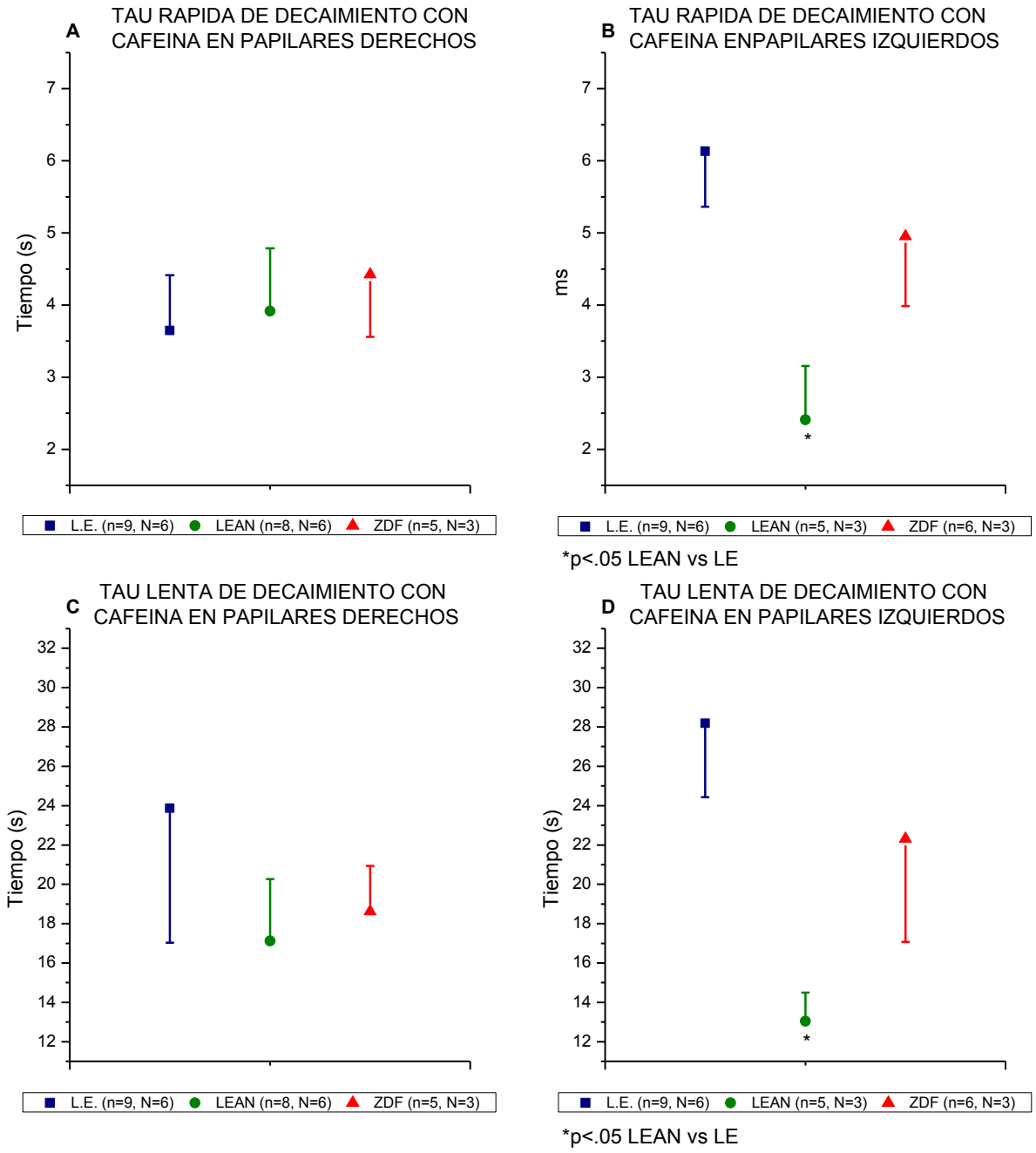


Figura 14. Constantes de tiempo de la fase de remoción de Ca2+. La fase rápida (A) y lenta (C) de decaimiento en los cardiomiocitos de ventrículo derecho no es distinta entre condiciones. No obstante la fase rápida (B) y lenta (D) de remoción de los cardiomiocitos de ventrículo izquierdo de Lean es más rápida respecto a L.E. izquierdo y también tiende a serlo respecto a ZDF del mismo lado.

La participación del NCX tiende a ser mayor en los miocitos derechos e izquierdos de ZDF respecto a L.E. y mínima en los miocitos izquierdos de Lean.

Midiendo la diferencia entre las integrales (ΔA_T) desde la fase de incremento del transitorio evocado por cafeína respecto al transitorio con $NiCl_2$, en el cual está bloqueado el NCX (Figura 11b), se aprecia que la cantidad de Ca2+ removido por éste último mecanismo tendió a ser mayor en ZDF, principalmente respecto a L.E. de cada ventrículo, y que su participación se mantienen a un nivel muy similar entre los miocitos derechos e izquierdo tanto de ZDF como de L.E. No obstante en las ratas Lean, a diferencia de los anteriores parámetros estudiados donde el comportamiento de éstos entre ventrículos es casi homologo, la cantidad de Ca2+ removida por el NCX en los miocitos izquierdos de esta cepa es significativamente menor a la participación que tiene en los miocitos derechos de la misma condición (Figura 17).

Además al calcular la constante de tiempo de la fase de decaimiento cuando permanece bloqueado el NCX resultó que la cinética de remoción de Ca2+ desde el citosol fue significativamente más lenta en los miocitos derechos de ZDF respecto a los derechos de Lean y L.E. (Figura 18a); aunque en los miocitos izquierdos también se observó un comportamiento semejante donde ZDF de nuevo parece ser más lenta, la diferencia no fue significativa (Figura 18b).

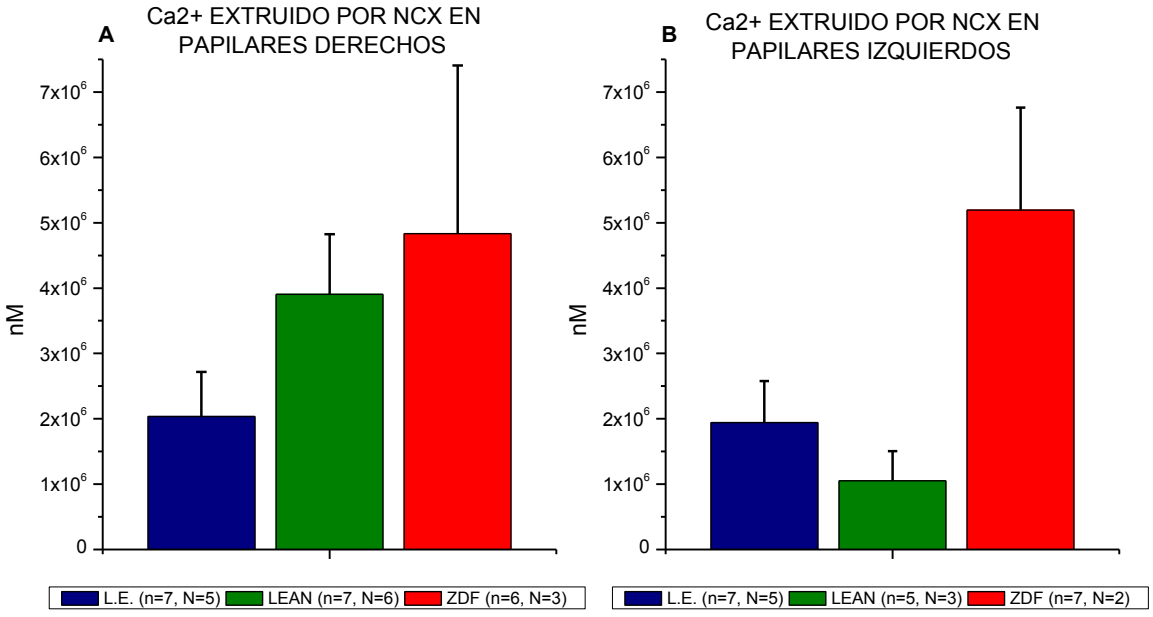


Figura 15. Ca2+ extruido por NCX. Calculada como la diferencia de la integral del transitorio con bloqueo del NCX y sin bloqueo. Los cardiomiocitos de ventrículo izquierdo de ZDF (B) tienden a remover una mayor cantidad de Ca^{2+} por parte del NCX respecto a L.E. y Lean del mismo lado. Mientras que los niveles de L.E. son similares en ambos ventrículos, los cardiomiocitos de ventrículo derecho de Lean (A) tienen una mayor participación del NCX respecto a los de ventrículo izquierdo de la misma condición.

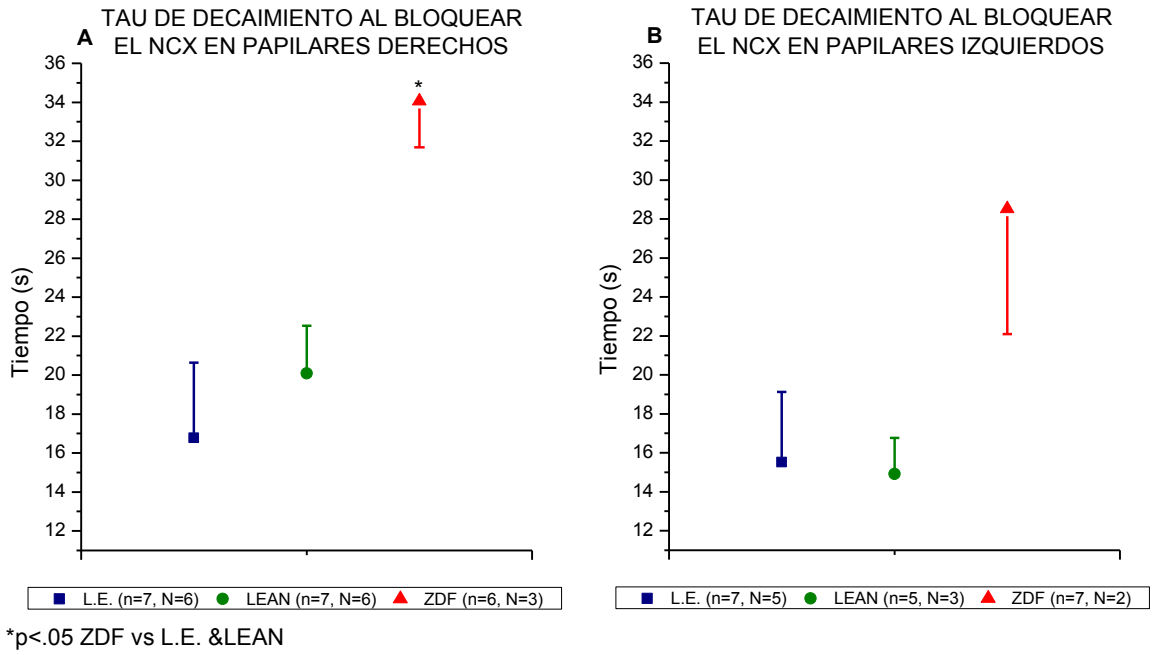


Figura 16. Constante de tiempo de la remoción de Ca2+ sin NCX. En los cardiomiocitos de ventrículo derecho de ZDF (A), al bloquearse el NCX, se remueve Ca^{2+} a una velocidad más lenta respecto a Lean y L.E. del mismo lado. Aunque se puede observar que en el ventrículo izquierdo (B) se presenta una tendencia similar entre las 3 condiciones.

Análisis de la contracción de los cardiomiocitos de ventrículo derecho y de izquierdo de L.E., Lean y ZDF.

La contracción en los cardiomiocitos de ventrículo izquierdo de Lean y ZDF es menor respecto a L.E. del mismo lado, en el ventrículo derecho la contracción de ZDF es menor a Lean.

En el ventrículo derecho y en el izquierdo, en los casos de L.E. y de Lean, tal como la amplitud de los transitorios tendió a aumentar conforme se incrementó la frecuencia de estimulación, se observa que la intensidad de la contracción también se amplió de 1 a 5 Hz, no así en ZDF y esto se hizo más evidente en los cardiomiocitos derechos donde prácticamente no hubo cambios (Figura 17-A).

Analizando con respecto a cada ventrículo, los cardiomiocitos izquierdos de Lean y ZDF desarrollaron una menor contracción con respecto a los izquierdos de L.E. a prácticamente todas las frecuencias de estimulación, y se aprecia que el comportamiento entre Lean y ZDF izquierdas fue semejante (Figura 17-B). Mientras que en el ventrículo derecho la contracción de los miocitos de Lean resultó significativamente mayor respecto a ZDF a todas las frecuencias; y aunque solo fue significativo a frecuencia fisiológica de 5 Hz, se observó que también los miocitos L.E. tienden a contraerse más respecto a la misma condición derecha de ZDF. En este caso la contracción entre miocitos derechos de Lean y L.E., excepto a 2 Hz, fue similar sin hallarse diferencia estadística (Figura 17-A).

Otro aspecto a resaltar es que realizando comparaciones entre ventrículos pero de la misma cepa mediante *t* de Student, la contracción de los miocitos izquierdos tanto de L.E. y ZDF fue mayor que sus respectivos derechos, sin embargo no hubo diferencia alguna en la intensidad de contracción entre los izquierdos y derechos de Lean, y si se sobreponen los gráficos se puede observar que su comportamiento es parecido.

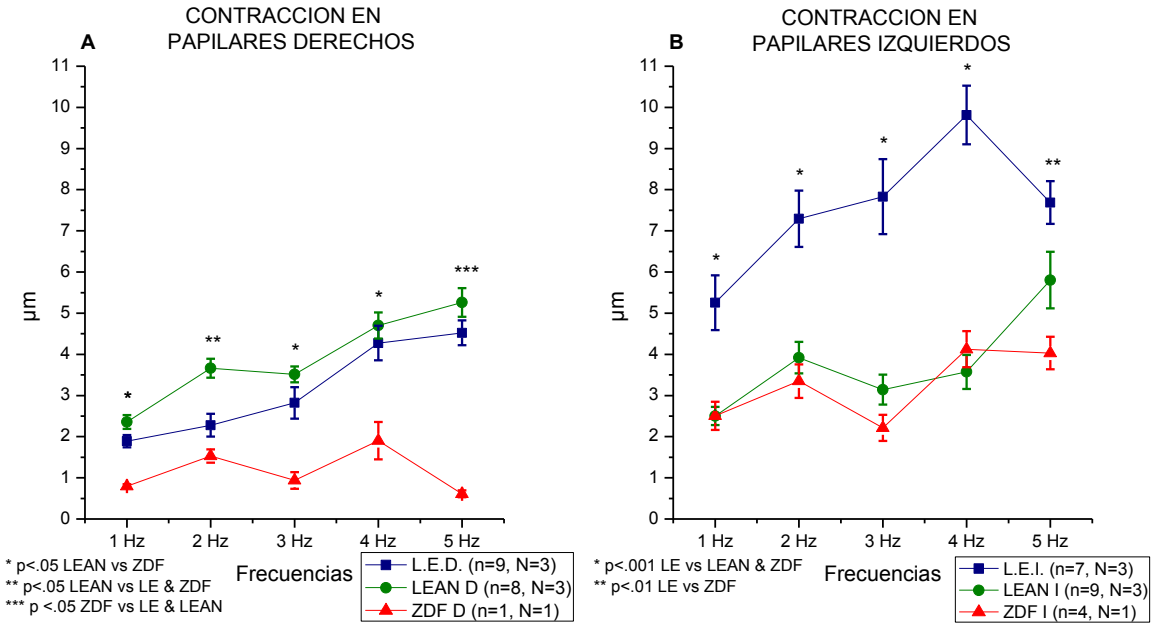


Figura 17. Longitud de acortamiento durante máxima contracción. Las mediciones representan la media de las 5 mayores contracciones en estado estable, por cada frecuencia, obtenidas de los extremos de las células durante el acople E-C para cada condición. En los cardiomiocitos de ventrículo derecho (A) se observa que Lean y L.E. aumentan la longitud de acortamiento progresivamente al aumentar la estimulación sin hallarse mayores diferencias entre ambas, caso contrario a ZDF del mismo lado que no presenta dicha tendencia y es la que menor intensidad contráctil desarrolla. La contracción en los cardiomiocitos de ventrículo izquierdo de L.E. (B) fue la más intensa respecto a todas las demás condiciones, incluyendo Lean y ZDF del mismo lado, sin presentar diferencias entre estas últimas dos.

Análisis del tamaño de las células

Los miocitos izquierdos de ZDF son más grandes que los izquierdos de L.E. y Lean

La morfología de los cardiomiocitos rige su función, siendo de particular importancia para el acople E-C la arquitectura y organización del couplon DHPR-RyR en su citoesqueleto. Por lo tanto modificaciones en el tamaño de los cardiomiocitos podrían causar un desarreglo estructural en el couplon, afectando la distribución y el aprovechamiento del Ca^{2+} entrante para llevar a cabo el proceso CICR y subsecuentemente alterando el acople E-C. Para considerar si las alteraciones halladas en los transitorio de Ca^{2+} durante el acople E-C pudieran estar relacionadas con modificaciones en el tamaño de las células, medimos la longitud transversal, perímetro y área de

los cardiomiocitos. Los tres parámetros fueron significativamente mayores en los miocitos izquierdos de ZDF con respecto a los de L.E. En el caso de los miocitos derechos no hubo diferencias significativas.

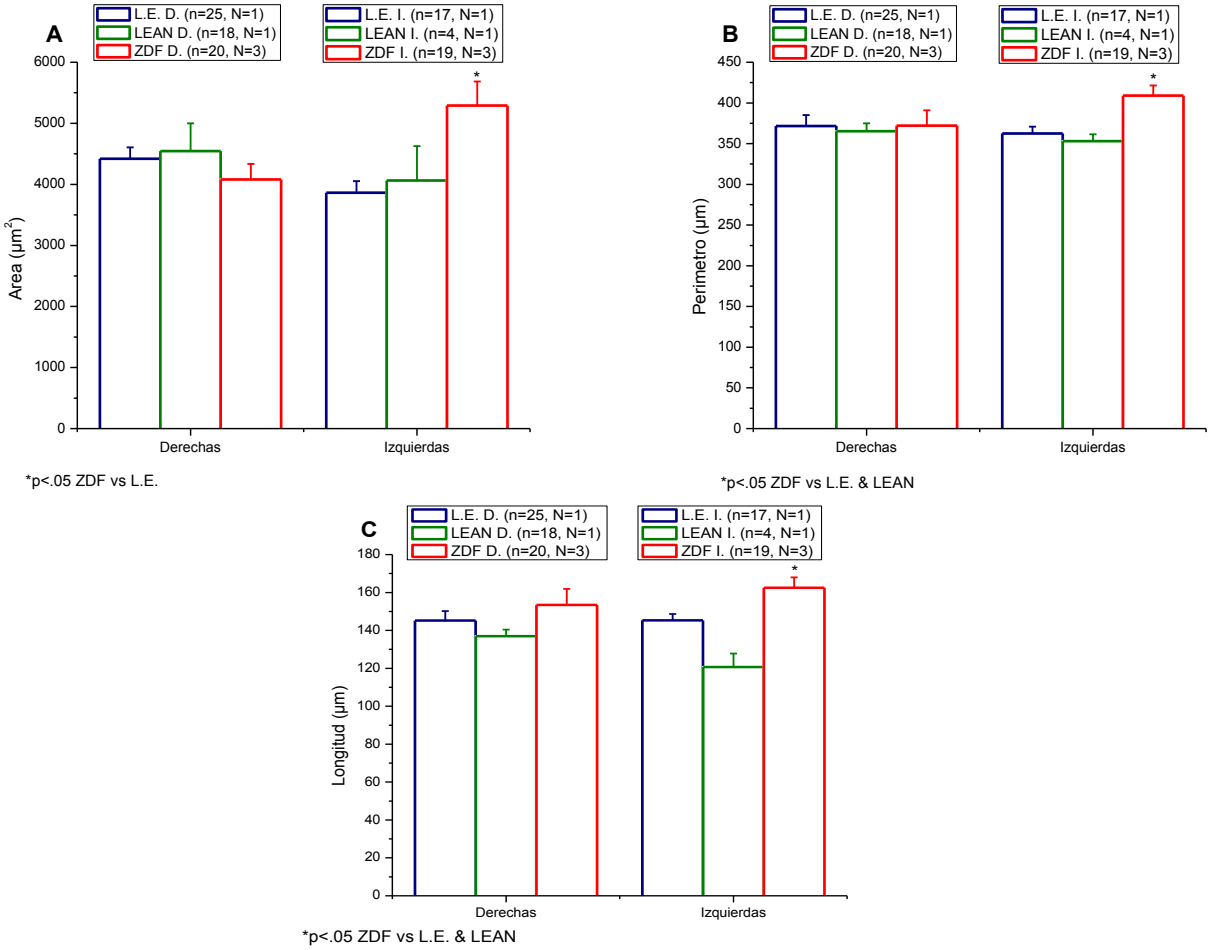


Figura 18. Parámetros medidos respecto al tamaño de las células. (A) Área, (B) Circunferencia y (C) Longitud. Se observa que los cardiomiocitos de ventrículo derecho de las 3 condiciones no presentan diferencias entre estos respecto a los parámetros mostrados. Mientras que los cardiomiocitos de ventrículo izquierdo de ZDF son más grandes respecto a L.E. y tienen una tendencia similar respecto a Lean del mismo lado.

Resumen de resultados

Como se puede observar en las tablas 2 Y 3 al final de este apartado, con los resultados obtenidos hasta ahora, podemos describir que:

- **Los cardiomiocitos ventriculares derechos** de las condiciones Lean y ZDF, en comparación a los de L.E., presentan una disminución significativa tanto de la disponibilidad de Ca^{2+} intracelular en sístole como en diástole, al igual que en las velocidades de incremento y decaimiento y, la $[Ca^{2+}]_i$ total durante el transitorio. Esto se ve reflejado en transitorios de menor amplitud a todas las frecuencias de estimulación, tales como los mostrados en la Figura 19-A y B.

Por lo que respecta a la duración del transitorio, la Tau lenta de decaimiento de los miocitos derechos de Lean fue mayor significativamente a 1 y 2 Hz en comparación con las otras dos condiciones. En los miocitos de ZDF se presentó una disminución significativa de la tau rápida a 2 Hz y 5, con respecto a L.E. y Lean. Cabe mencionar también que los miocitos derechos de L.E. presentaron una relación directamente proporcional entre la amplitud del transitorio y la frecuencia de estimulación aplicada.

En relación a la actividad del retículo, como se puede observar en la figura 20 las células de Lean y ZDF tienden a presentar una mayor liberación y disponibilidad de Ca2+ y con mayor velocidad que L.E. De igual forma en Lean y ZDF la actividad del NCX tiende a ser mayor que en L.E., pero a diferencia de ésta y también de Lean, en ZDF la remoción de Ca2+ cuando se bloquea el NCX se hace más lenta.

El tamaño de las células no es diferente entre las 3 condiciones, sin embargo la intensidad de la contracción es significativamente mayor en Lean con respecto a ZDF a todas las frecuencias de estimulación, mientras que L.E. también tiende a ser mayor que ZDF.

- En los cardiomiocitos ventriculares izquierdos de ZDF, en comparación con L.E. y Lean, la amplitud de los transitorios fue mayor a bajas frecuencias, pero, conforme aumento la frecuencia de estimulación, la mayoría de los valores de los parámetros analizados, tendió a disminuir. Por lo tanto de 1 a 3 Hz, los miocitos izquierdos de ZDF presentan una mayor concentración intracelular de calcio sistólico y diastólico, al igual que mayores velocidades de incremento y decaimiento citosólico, así como una mayor cantidad de $[Ca^{2+}]_i$ global durante la sístole, en contraste a los miocitos izquierdos de L.E. y de Lean (Figura 19-C).

Comparando ZDF contra L.E. y Lean, la duración del transitorio a 1 y 2 Hz fue mayor, y a esta frecuencia también le acompañó una disminución significativa de la tau lenta y un aumento de la tau rápida. En cambio a 5 Hz (Figura 19-D) la amplitud del transitorio en los miocitos izquierdos de ZDF disminuye, ya que en este caso prevalece un aumento significativo de la concentración intracelular de Ca^{2+} durante la diástole. Además, la duración del transitorio respecto a L.E. izquierdo, es menor.

Al evaluar la actividad del retículo, (Figura 20) las células de Lean y ZDF tienen un comportamiento semejante al de su contraparte derecha, con tendencias a una mayor liberación y disponibilidad de Ca2+ y con mayor velocidad que L.E. Pero en este caso ZDF remueve menos Ca2+ desde el citosol en comparación a las otras 2 y de igual forma que en ZDF derecha, al bloquear el NCX su decaimiento tiende a hacerse más lento. Otra diferencia es que en Lean izquierda la actividad del NCX es mínima mientras que su cinética de remoción es más rápida con respecto a las otras dos condiciones siendo la que menos Ca2+ acumula en el citosol tras la remoción.

En este caso el tamaño de los miocitos de ZDF es mayor que los de Lean y L.E. preponderantemente en sentido longitudinal, y la intensidad de contracción de L.E es mayor respecto a las otras dos cepas, mientras que en Lean su contracción es similar a las derechas y en ZDF pese a ser menor a L.E del mismo lado, termina siendo mayor a las de ZDF derechas.

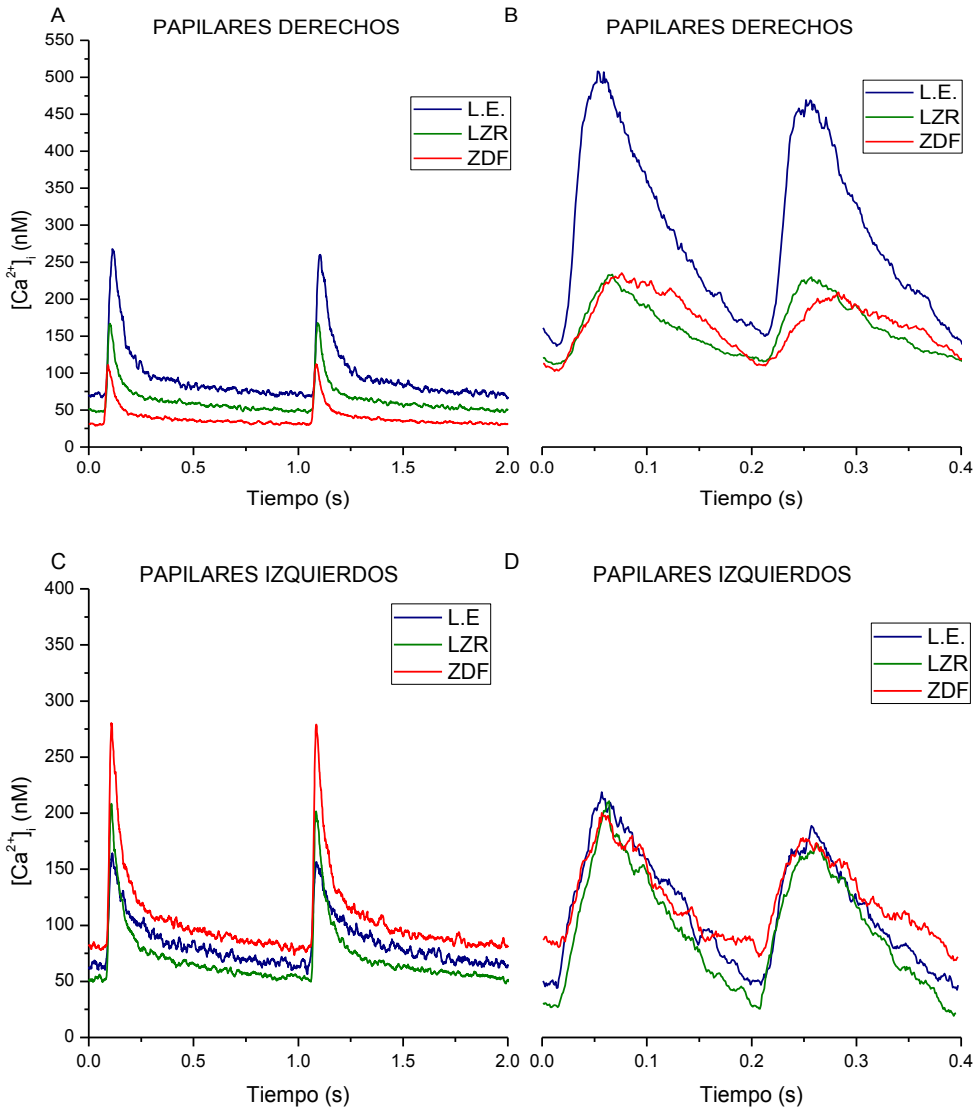


Figura 19. Transitorios en estado estable. Transitorios de calcio registrados en cardiomiocitos derechos estimulados a 1 Hz (A) y 5 Hz (B) o en cardiomiocitos izquierdos estimulados a 1 Hz (C) y 5 Hz (D).

Tabla 2 Parámetros $[Ca]^{2+}_i$ vs L.E. 2 Hz				
	Derechos		Izquierdos	
	Lean	ZDF	Lean	ZDF
Basal	↓ 36.92 %	↓ 33.57 %	↓ 18.27 %	↓ 20.25 %
Amplitud sistólica	↓ 59.60 %	↓ 39.29 %	↑ 17.65 %	↑ 67.62 %
Velocidad de incremento	↓ 59.24 %	↓ 45.48 %	↑ 15.82 %	↑ 48.02 %
Velocidad de decremento	↓ 58.77 %	↓ 46.50 %	↓ 3.00 %	↑ 57.27 %
Diastólico	↓ 29.96 %	↓ 29.37 %	↓ 9.62 %	↑ 7.25 %
Duración al 63%	↓ 16.57 %	↓ 11.28 %	↑ 0.40 %	↑ 16.48 %
Tau 1 (lenta)	↑ 162.49 %	↓ 12.88 %	↑ 14.70 %	↓ 56.01 %
Tau 2 (rápida)	↑ 29.33 %	↓ 30.02 %	↑ 4.41 %	↓ 12.56 %
Total liberado	↓ 55.75 %	↓ 40.11 %	↑ 4.52 %	↑ 71.09 %

Tabla 3 Parámetros $[Ca]^{2+}_i$ vs L.E. 5 Hz				
	Derechos		Izquierdos	
	Lean	ZDF	Lean	ZDF
Basal	↓ 27.49 %	↓ 30.94 %	↓ 29.66 %	↓ 5.66 %
Amplitud sistólica	↓ 72.62 %	↓ 65.27 %	↑ 28.33 %	↓ 19.26 %
Velocidad de incremento	↓ 71.77 %	↓ 69.77 %	↑ 10.85 %	↑ 17.33 %
Velocidad de decremento	↓ 75.58 %	↓ 73.11 %	↓ 2.35 %	↑ 28.59 %
Diastólico	↓ 32.77 %	↓ 23.45 %	↓ 14.04 %	↑ 26.93 %
Duración al 63%	↓ 13.07 %	↓ 0.46 %	↓ 1.60 %	↓ 17.93 %
Tau 1 (lenta)	↓ 45.51 %	↓ 44.08 %	↓ 23.64 %	↑ 21.07 %
Tau 2 (rápida)	↓ 23.55 %	↓ 45.93 %	↓ 9.57 %	↓ 13.67 %
Total liberado	↓ 72.75 %	↓ 60.51 %	↑ 16.93 %	↑ 31.65 %

Tablas 2 y 3. Resumen de los cambios significativos, tanto aumentos significativos (flechas ascendentes verdes) como disminuciones significativas (flechas descendentes rojas) hallados sobre los parámetros analizados en los transitorios globales de Ca^{2+} intracelular, haciendo la comparación por separado de las condiciones ZDF y Lean vs L.E., tanto a bajas frecuencias (Tabla 2), como a frecuencia fisiológica (Tabla 3).

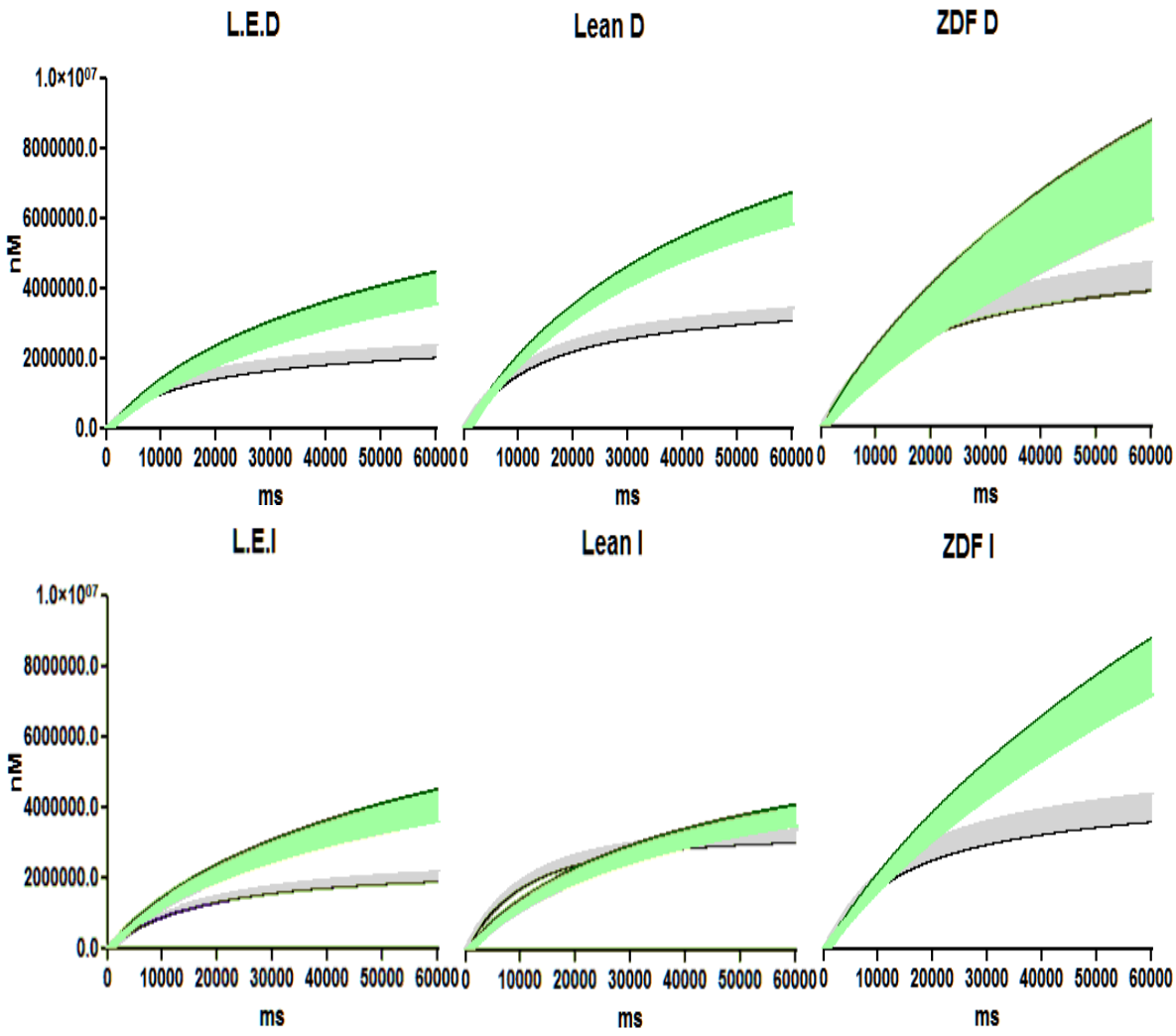


Figura 20. Promedio del curso temporal de las integrales de los transitorios evocados por cafeína y cafeína+$NiCl_2$, de las 3 condiciones para cada ventrículo. La inicial D-I en el título después de la condición indica el ventrículo de procedencia de las células. Se aprecia que en la mayoría de los casos salvo en los cardiomiocitos del ventrículo izquierdo de Lean el bloqueo del NCX (verde) disminuye la velocidad de remoción del Ca^{2+} liberado desde el RS. También se observa que tanto ZDF derecho e izquierdo, como Lean derecho e izquierdo presentan una mayor cantidad de Ca^{2+} desde el retículo (gris) con respecto a L.E. Además los cardiomiocitos izquierdos de ZDF tienden a depender en mayor medida del NCX respecto a las demás condiciones.

DISCUSIÓN

La rata Zucker Diabetic Fatty (ZDF*lepr-^{fa}*), es una subcepa de la rata Zucker obesa (ZFR), de crianza selectivamente endogámica para el desarrollo de hiperglucemia, por lo cual se considera ideal para la investigación de los mecanismos fisiopatológicos de la DM2 (Srinivasan & Ramarao, 2007). A diferencia de la ZFR, los machos ZDF progresan hacia la DM2 debido a una falla en la compensación adecuada de resistencia a la insulina, siendo más insulino-resistentes que las ZFR. En concordancia con esto al realizar las curvas de tolerancia a la glucosa observamos un marcado incremento, mayor al 100 %, de la glucosa plasmática para la condición ZDF en comparación con las otras dos cepas. Además, al hacer el análisis de parámetros morfométricos tales como el peso y la cantidad de tejido adiposo, corroboramos que esta cepa presentó aumentos significativos en ambos parámetros con respecto a Lean y L.E., siendo estos aspectos semejantes a las descritos para el fenotipo de las ZDF. Por ende podemos establecer que la expresión de hiperglucemia y obesidad constatadas en nuestro modelo, coinciden con las características descritas para el establecimiento de diabetes mellitus tipo 2 en otros trabajos, en donde se consideran estas alteraciones como trastornos propios de la progresión de la enfermedad tanto en humanos como en modelos animales semejantes o con la misma cepa (Leonard, et al., 2005).

El análisis de los transitorios globales nos ha permitido distinguir cambios específicos para los cardiomiocitos de ventrículo derecho e izquierdo, denotando una alteración compleja sobre los mecanismos de regulación de calcio, tanto para la condición ZDF, diabética, como para la condición Lean en comparación contra la L.E., que no afecta de igual forma al músculo cardiaco en conjunto. Pese a que en nuestro planteamiento inicial nos habíamos enfocado en hallar los cambios provocados por la DM2 en la regulación del acople excitación-contracción, hemos encontrado que tales afecciones no son únicas de la condición ZDF. Por ende, podríamos estipular que la condición Lean a menudo empleada como control de las ratas ZDF, a pesar de ser heterocigota para la mutación del gen Fa y no presentar los efectos hiperlipidémicos e hiperglucémicos de la cepa ZDF, podría también presentar trastornos distintivos en la función cardiaca, independiente de una adecuada regulación de leptina (Oana et al., 2005), como se asume en esta cepa.

Comparando los procesos de regulación de $[Ca^{2+}]_i$ en los miocitos de Lean y ZDF con respecto a los de L.E., las diferencias que hallamos entre ambos corresponderían principalmente a los procesos de liberación de calcio desde el RS, su recaptura y extrusión, ya que en condiciones basales como se mostró no se hallaron diferencias significativas entre condiciones.

Empezando con los miocitos derechos de ZDF la disminución en la amplitud de los transitorios que replican el acople E-C a todas las frecuencias de estimulación condicionaría de manera proporcional y directa la contractibilidad de los miocitos derechos de ZDF puesto que para los dos parámetros se observa el mismo comportamiento ya que no presentan adaptación alguna a la frecuencia de estimulación.

No obstante que, tal como se comprobó con la estimulación con cafeína, en los mismos miocitos derechos de ZDF parece haber una mayor liberación y disponibilidad de Ca2+ desde retículo, de nuevo en comparación a L.E. derecho, si bien la velocidad con la que lo liberan ambas cepas no difirió, entonces el aumento en las ZDF puede reflejar un mayor reclutamiento de receptores RyR disponibles a ser abiertos.

A diferencia de la estimulación con cafeína donde la apertura del RyR depende casi de forma única de la presencia de Ca^{2+} luminal en retículo, la amplitud del transitorio evocado por estimulación de campo depende crucialmente del arreglo estructural de la diada, respecto a la superposición cercana de los canales LTCC en sarcolema y los RyR del retículo para permitir el mayor aprovechamiento del flujo de Ca^{2+} entrante para llevar a cabo el proceso CIRC, por lo tanto ante las mismas condiciones de estimulación al apreciar una menor amplitud del transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ durante el acople E-C pese a una mayor disponibilidad de Ca2+ en retículo, aunado a que no hay diferencias en el tamaño entre las células provenientes de las 3 condiciones experimentales para ventrículo derecho, pudiera considerarse en ZDF derechas la existencia de un desacople estructural de la diada como responsable de dichas alteraciones y/o a cambios sobre los canales Cav 1.2 responsables de la corriente entrante de Ca^{2+} que generen un menor flujo entrante (Laetitia Pereira, et al., 2006; Trafford, et al., 2001).

Con respecto a los cardiomiocitos izquierdos de ZDF, en este caso tuvimos transitorios de calcio más grandes en comparación a los de L.E. izquierdos durante el acople excitación-contracción a bajas frecuencias de estimulación, y conforme aumento la frecuencia del estímulo, disminuyendo así el tiempo de recuperación para los mecanismos participantes, entonces observamos una disminución de la amplitud de los transitorios a expensas de un incremento en la acumulación de calcio en el citosol. La actividad de los RyR es fuertemente modulada por la cantidad de calcio presente en el lumen del RS por lo que al disminuir la concentración de Ca2+ dentro del retículo se disminuye también la probabilidad de apertura de los RyR (Gyorke et al., 2002; Kong, et al., 2008; Walker et al., 2014), por lo tanto el incremento de la acumulación citoplasmática de Ca+ podría vincularse consecuentemente a un déficit en la captación y/o en la retención del ion por parte del retículo dependiente de la frecuencia de estimulación, condicionando una menor cantidad liberada a través de los RyR.

Cuando medimos la actividad del retículo en los miocitos izquierdos de ZDF observamos que su respuesta es muy parecida a la del lado derecho de la misma condición, con una liberación y disponibilidad de Ca2+ mayores a los L.E. izquierdos, lo cual podría influir sobre la mayor amplitud de los transitorios observados en el acople a bajas frecuencias, además la concentración de calcio que permanece en el citosol sin ser removido con la aplicación constante de cafeína en los cardiomiocitos izquierdos de ZDF, al igual de lo que sucedió con los transitorios por estimulación de campo fue significativamente mayor contra los miocitos izquierdos de L.E. Si consideramos que en este proceso la permanencia de cafeína evita la acumulación de calcio dentro del retículo, este resultado nos indicaría que posiblemente la atenuación de la amplitud en los transitorios, a frecuencia fisiológica de 5 Hz, durante el acople excitación-contracción no solo se debiera a un

trastorno en la recaptura llevada a cabo por el retículo sino que también podría involucrar modificaciones sobre otros mecanismos de remoción desde el citosol.

Esto último coincide con la tendencia observada en el aumento de la tau de la fase de decaimiento del transitorio cuando se bloqueó el NCX, de nuevo en comparación con las otras dos condiciones Lean y L.E. izquierdas, ya que sin estar presente la actividad del NCX y al impedir la acumulación de calcio en el retículo, dicha fase de remoción se debería principalmente a la participación de mecanismos como la PMCA y el uniporte mitocondrial de Ca2+ (Díaz, et al., 1997; Wold, et al., 2002), entonces, el aumento de la Tau de decaimiento nos sugiere una disminución en expresión o en la actividad, de estos mecanismos en los cardiomiocitos de las ratas ZDF. También en este punto cabe recordar que en los transitorios evocados solo con cafeína no obtuvimos diferencias en la cinética de decaimiento entre L.E. y ZDF izquierdas, sin embargo al comparar el área residual entre los transitorios evocados con cafeína de los obtenidos con el bloqueo del NCX, se aprecia que la cantidad de Ca2+ removida por el NCX tiende a ser mayor en las ZDF, por lo tanto nos podría indicar que los cardiomiocitos de ZDF, con respecto a las otras dos condiciones, dependen del NCX en mayor medida para remover Ca^{2+} citosólico.

Volviendo al punto de los transitorios evocados por el acople excitación contracción, en condiciones normales se ha descrito que la actividad del NCX respecto a la de SERCA es mínima en algunos mamíferos como en la rata, con tasas de remoción de 10 y 90%, respectivamente, del total de la amplitud del transitorio, y que ante aumentos en la frecuencia de trabajo o estimulación se genera una sobrecarga de Na^{+} que es incapaz de solventarse por la actividad de la Na/K+ ATPasa, esto a su vez reduce la extrusión de Ca2+ a través del NCX, lo cual resulta en un incremento del Ca2+ diastólico y favorecería el incremento en la captura de Ca2+ hacia el retículo. Por otra parte en ciertos trabajos (Louch, Stokke, Sjaastad, Christensen, & Sejersted, 2012; Laetitia Pereira, et al., 2006), tanto en modelos de DM2 como de insuficiencia cardiaca, ya se ha discutido la posibilidad de un incremento en la actividad o en una sobreexpresión del NCX, que en ambos casos pudiera llevar a un aumento de la función de extrusión y competir por el $[Ca^{2+}]_I$ en contra del bombeo de la SERCA hacia el retículo y también en algunos trabajos más con modelos patológicos semejantes (Belke, Swanson, & Dillmann, 2004; Li et al., 2011; Russ, Reinauer, & Eckel, 1991; Stokke et al., 2010) se ha reportado una disminución en la actividad de la SERCA.

Conjuntando estos dos factores podríamos considerar un escenario para los resultados obtenidos en los miocitos izquierdos de ZDF, donde a bajas frecuencias una mayor actividad del NCX pueda compensar, al menos de forma parcial, un posible detrimento en la función de la SERCA, removiendo más calcio del citosol y evitando así grandes acumulaciones en el mismo, tal como los resultados que obtuvimos donde no hay diferencias en el calcio entre estímulos para las 3 condiciones. Esto lo haría a expensas también de disminuir la disponibilidad de Ca2+ hacia el retículo, lo cual podría ser compatible con la disminución gradual del calcio global durante los transitorios al estimular de bajas a altas frecuencia, tal y como lo observamos en los resultados para los miocitos izquierdos de ZDF, y conforme se avanza a frecuencias más altas entonces disminuiría la participación del NCX, debido a la acumulación de Na+ intracelular y entonces,

aunado al posible déficit de la SERCA, esto tendería a aumentar la concentración de Ca2+ en el citosol atenuando de forma subsecuente la amplitud de los transitorios.

Un hallazgo importante en el trabajo de (Louch et al., 2010) es que al aumentar la actividad del NCX no cambiaron las constantes de tiempo de la fase de decaimiento respecto a condiciones donde no se da este aumento de la actividad, lo cual coincide con nuestros resultados en los transitorios con cafeína y esto es explicado en dicho trabajo porque el incremento de la extrusión por NCX previene cualquier estimulación sobre la SERCA debido a efectos directos del Ca2+ acumulado o de la fosforilación del PLB dependiente de CaMKII. Esto último es relevante ya que también se expone que el incremento de $[Ca^{2+}]_i$ diastólico tiende a activar la CaMKII la cual incrementa la actividad de la SERCA por la fosforilación del PLB y por lo tanto a mayores frecuencias se acelera la fase de decaimiento de los transitorios, lo cual es compatible con los datos que encontramos sobre las constantes de tiempo para todas las condiciones donde al incrementar la frecuencia del estímulo dicho parámetro se acorta. Aunado a esto al aproximarnos a la frecuencia fisiológica, indistintamente de la cepa, la morfología del descenso de $[Ca^{2+}]_i$ se aproximaba con mayor similitud a un decaimiento monoexponencial. Al hacer el traslape de esta fase a distintas frecuencias y comparar los valores de la constante de tiempo, nos percatamos que la fase lenta de decaimiento $\tau 1$ no llega a desarrollarse a frecuencia fisiológica y solo prevalece la fase rápida, lo cual entonces pudiera deberse al incremento de la actividad de la SERCA.

Es importante recordar que la tau de la fase rápida $\tau 2$ de decaimiento solo a 1 Hz fue más lenta en las ZDF izquierdas respecto a las otras dos condiciones, y a frecuencias más altas se normaliza respecto a las mismas condiciones disminuyendo todas a valores semejantes. Quizá a baja frecuencia aunque haya un aumento en la actividad del NCX, si se presenta un déficit en la función de la SERCA, la gran cantidad de Ca^{2+} que tendría que movilizar de forma compensatoria el NCX, conllevaría a una prolongación de la constante de tiempo rápida del periodo de decaimiento, sin embargo al aumentar la frecuencia de estimulación, con la disminución en la actividad del NCX y un aumento en la fosforilación de la SERCA pudiera compensar su déficit inicial y acortar la duración de dicha fase del transitorio de calcio, aunque con una reducción en la cantidad de Ca^{2+} que bombea y por ende generando acumulación de calcio en el citosol. (Bode, Briston, Overend, O'Neill, et al., 2011; Louch, et al., 2010)

A diferencia de las cardiomiocitos derechos de las 3 condiciones, el tamaño de los cardiomiocitos izquierdos resulto mayor respecto a L.E. y Lean izquierdos, esto coincide con otros trabajos donde se ha reportado el desarrollo de hipertrofia patológica asociada a diabetes en el ventrículo izquierdo (Boudina & Abel, 2007; Boudina & Abel, 2010; Poornima, Parikh, & Shannon, 2006). Dicho fenómeno se considera puede desarrollarse de dos formas: 1) hipertrófica concéntrica, cuando hay adición de nuevos miofilamentos y sarcomeras en paralelo, asociada a un incremento en la presión sistólica por aumento en la postcarga y provocando un aumento en el grosor de las paredes, y 2) excéntrica cuando hay adición de nuevas sarcomeras en serie en los miofilamentos ya existentes, esto asociado a un incremento de la presión diastólica por aumento de la precarga y provocando un agrandamiento en el volumen interno de la cámara. De acuerdo a nuestras

mediciones las células de ZDF izquierdas presentaron un tamaño mayor preponderantemente en sentido longitudinal, sin encontrar diferencias en el diámetro transversal entre condiciones, lo cual entonces podría asociarse a una sobrecarga de volumen en el ventrículo izquierdo y al desarrollo de hipertrofia excéntrica. Podríamos considerar también que el mayor tamaño de las ZDF izquierdas pudiera influir sobre el aumento en la amplitud de los transitorios observada para la misma condición, lo cual pudiera asociarse con un aumento en el tamaño de los organelos reservorios de Ca^{2+} (Calderone, 2007).

Tomando en cuenta que la intensidad de contracción de las ZDF izquierdas fue menor respecto a las otras dos condiciones izquierdas a todas las frecuencias de estimulación, pese a la mayor amplitud de sus transitorios de Ca^{2+} a bajas frecuencias, podríamos considerar que existe una alteración o modificación sobre el aprovechamiento y la afinidad de Ca^{2+} por parte de la maquinaria contráctil en este caso. No obstante a que la amplitud e integral de los transitorios en estas células disminuyo conforme aumento la frecuencia, la contracción parece al menos mantenerse para no decaer respecto al aumento de la frecuencia, siendo su comportamiento equiparable a la concentración media de Ca^{2+} sostenida durante todo el ciclo, lo cual podría indicarnos que la contracción depende principalmente de esta variable más que de la amplitud y el Ca^{2+} total en cada transitorio y esto a su vez también podría ser un factor importante que determinase el aumento en la acumulación de Ca^{2+} entre ciclos ante el incremento de la frecuencia.

Por lo tanto, en conjunto en las ZDF izquierdas tenemos células más grandes que tienen una mayor disponibilidad de Ca^{2+} reflejada en la amplitud de sus transitorios, cuyo proceso de remoción es menos efectivo y que se contraen menos. El hecho de que la intensidad de la contracción sea más baja o menos efectiva respecto a la longitud de las células y su disponibilidad de Ca^{2+}, en comparación a las otras 2 condiciones izquierdas, quizá sea compatible con modelos propuestos sobre insuficiencia cardiaca por aumento en la precarga (Haizlip, Bupha-Intr, Biesiadecki, & Janssen, 2012), condicionando células más largas lo cual podría afectar su curva longitud-tensión, disminuyendo su L_{max} y por ende una menor capacidad contráctil y de bombeo pese a una concentración más elevada de Ca2+ citosólico, aunque no podemos determinar de forma hipotética si esto último fuese desarrollado como consecuencia de dicha alteración para tratar de mantener una contracción lo más intensa posible o como un evento independiente y previo.

Antes de continuar con las otras dos cepas es importante considerar que la rata ZDF presenta DM2 de forma secundaria precedida por el desarrollo de obesidad e hiperlipidemia, y aun cuando corroboramos que todas las ratas de la condición problema ZDF utilizadas para este estudio desarrollaron DM2, fue importante poder establecer si las alteraciones observadas o los cambios presenciados en esta condición podían ser atribuibles solo a la DM2 y no a otros factores adjuntos a este modelo como la obesidad. Por ello realizamos otra serie experimental con una rata también de la cepa ZDF pero de 8 semanas de edad, ya que se ha reportado que en esta etapa solo presentan obesidad y no diabetes, mediante la medición de la glucosa basal sin ayuno, con ayuno y la curva de tolerancia a la glucosa en esta rata corroboramos que no presentaba diabetes. La

serie consistió en la medición de los transitorios de calcio globales evocados por estimulación de campo sobre células aisladas de ventrículo derecho y de izquierdo, de igual manera que lo realizado para las otras condiciones experimentales. Los datos obtenidos de cada ventrículo de la ZDF obesa fueron comparados contra los resultados de los respectivos ventrículos de las ZDF diabéticas, ya expuestos en el apartado de resultados, mediante *t* de Student y asignando el mismo parámetro de significancia que para el resto de la estadística *p<.05.* De acuerdo al comportamiento observado para cada parámetro analizado pudimos constatar que la respuesta en la regulación de $[Ca^{2+}]_i$ entre ventrículos derechos de ZDF obesa y diabética es distinta, e incluso traslapando los gráficos, colocados al final de la discusión en el apartado de anexos, con los parámetros correspondientes a las otras cepas, el comportamiento de las derechas de ZDF obesa es muy parecido al de las L.E. derechas. Sin embargo al hacer la comparación estadística entre izquierdas de obesa y diabéticas a todas las frecuencias de estimulación, su comportamiento en todos los parámetros analizados es prácticamente el mismo, traslapando casi todos sus valores en cada gráfico. Recordando que el comportamiento de las variables medidas, respecto a la regulación de $[Ca^{2+}]_i$ durante el acople excitación-contracción en el ventrículo derecho de las ZDF es estadísticamente similar al de las Lean derechas y más esta consideración no podemos descartar que las alteraciones en la regulación de $[Ca^{2+}]_i$ presenciadas en la ZDF sean solo atribuibles a la DM2, aunque tampoco descartarla como responsable, dado que los datos obtenidos para hacer la comparación estadística provinieron de una sola rata obesa. Por consiguiente las conclusiones obtenidas de este trabajo respecto a dicha regulación serian atribuibles de forma más justa y específica a las características propias del modelo animal trabajado, que generalizables a la entidad clínica de la DM2.

Las ratas Lean generalmente se han empleado como la única cepa control en los estudios realizados con ZDF, asumiendo entonces todos los valores obtenidos en los parámetros medidos en esta condición como fisiológicamente normales o estándares. Sin embargo como se ha mencionado al inicio de la discusión al ser comparada con la cepa L.E., que no comparte el origen y trasfondo genético en común de la rama Zucker, también presenta diferencias en ambos ventrículos, lo cual reforzaría la idea del párrafo anterior, no pudiendo estipular en este caso que los mecanismos de regulación de $[Ca^{2+}]_i$ en esta cepa puedan tomarse como referencia clínica de salud o normalidad.

Para el caso de los cardiomiocitos derechos de las ratas Lean, su comportamiento en los mecanismos de regulación de $[Ca^{2+}]_i$ durante el acople excitación contracción fue muy similar al de las ZDF derechas, con valores menores en casi todos los parámetros medidos: amplitud, Ca2+ entre estímulos, Ca2+ medio, Ca2+ total, así como cinética de incremento y de remoción, todo esto al compararse contra L.E. derechas. De igual forma al medir la actividad del retículo con los transitorios evocados por cafeína, su comportamiento continuo semejante al de las ZDF derechas, sin encontrar diferencias entre estas dos cepas en la liberación, la velocidad de liberación, el Ca2+ total, el Ca2+ remanente en citosol, en la cinética de remoción ni en la participación del NCX, y en todos estos parámetros al igual que en las ZDF derechas fueron significativamente mayores o tendieron a serlo en comparación con L.E. derechas, salvo en la remoción. Pero en discordancia con

esto la contracción de los cardiomiocitos derechos de la Lean fue significativamente mayor a las derechas de ZDF, asemejándose estadísticamente al comportamiento de las L.E. derechas a todas las frecuencias de estimulación.

Es decir, por los aspectos señalados en común podríamos asumir que los cardiomiocitos derechos de Lean presentan las mismas implicaciones señaladas anteriormente para los cardiomiocitos derechos de ZDF, en donde se tiene un retículo capaz de liberar más Ca2+ junto con una mayor capacidad para removerlo por el NCX, pero con la posible existencia de un desajuste estructural en la diada que involucre la organización de los couplones DHPR-RyR. Sin embargo en los miocitos derecho de la ZDF, si existe atenuación en la intensidad de la contracción y en Lean derecho no a pesar de que pudieran presentar la misma discrepancia entre el bajo incremento de calcio durante el acople E-C y una mayor disponibilidad en retículo.

Otro parámetro distinto entre ZDF y Lean derechas que pudiera contribuir, al menos de forma parcial en una mayor contracción de Lean, fue la tau de decaimiento cuando se bloqueó el NCX, siendo significativamente más lenta en ZDF derechas contra Lean y LE. derechas, lo cual indicaría que si bien en ambos casos Lean y ZDF derechas la participación del NCX es prácticamente igual entre ambas cepas y mayor respecto a L.E. derechas, en el caso de Lean y L.E. derechas habría una mayor participación de los llamados mecanismos de remoción menores como PMCA y el transporte de Ca2+ hacia la mitocondria en comparación a las ZDF derechas. Aunque hasta la fecha no se ha dilucidado del todo un modelo que pueda explicar el complejo mecanismo de transporte de Ca2+ mitocondria mCU y su regulación, se sabe y asume la gran importancia que tiene en la producción energética de la célula, específicamente en la modulación del ciclo de los ácidos tricarboxiliicos y por ende en la producción de ATP (Williams, Boyman, Chikando, Khairallah, & Lederer, 2013; Winslow, et al., 2016). Considerando que este nucleótido es esencial para los procesos de fosforilación como el llevado a cabo por la cabeza de la cadena pesada de la miosina (MHCII) para el deslizamiento de los filamentos delgados durante la contracción, entonces una disminución en el transporte mCU podría disminuir subsecuentemente la disponibilidad energética de la célula para llevar a cabo los procesos de fosforilación necesarios en la contracción y así atenuarla.

En la condición de Lean izquierdas, el comportamiento de los transitorios durante el acople E-C a bajas frecuencias es similar con L.E. del mismo ventrículo, en ambos casos con una amplitud de los transitorios menor a ZDF del mismo lado, sin embargo particularmente en ese caso conforme aumento la estimulación a frecuencia fisiológica la amplitud del transitorio termino siendo mayor a las otras dos condiciones con un ligero aumento en la fase de incremento de Ca^{2+} y siendo la que menos Ca2+ acumulo en citosol (Figura 7-C y D), lo cual podría implicar un incremento en el reclutamiento funcional de los mecanismos reguladores dependiente de la frecuencia de estimulación. Al estudiar la respuesta del retículo esta es muy parecida a Lean derechas, y al comparar la amplitud del transitorio por cafeína es equiparable a la de los transitorios en estado estable a 5 Hz, por lo que el aumento de la estimulación podría evocar prácticamente la máxima respuesta de liberación del retículo. Es interesante además que con la aplicación constante de cafeína, estas células removieron más Ca2+ que su contraparte derecha y con una cinética más rápida que L.E. del mismo lado e incluso se aprecia que también tendió a ser más rápida que ZDF

izquierdas, pero aún más llamativo es que al bloquear el NCX es mínimo el efecto que tiene sobre la remoción de Ca2+ por lo cual estas células prácticamente prescinden de dicho mecanismo (Figura 20).

En contraste con las diferencias observadas en la regulación de los transitorios en el acople E-C y la dependencia del NCX entre ventrículo derecho e izquierdo de Lean, no tenemos diferencias en la intensidad de la contracción para ambos tipos de células, por lo cual quizá de nuevo la respuesta dependería más de la regulación en los mecanismos menores de remoción como el mCU, la PMCA, e incluso otros apenas considerados como la SPCA, sin que hasta el momento podamos dar una respuesta concreta a ello. Sin embargo como implicación funcional podríamos inferir que a diferencia de ZDF y L.E., donde las células izquierdas desarrollan una mayor contracción que su contraparte derecha, en el caso de las Lean no habría diferencias en la presión de eyección generada entre ventrículo derecho e izquierdo.

Finalmente los resultados obtenidos en la cepa L.E. también fueron diferentes para cada ventrículo, lo cual demuestra que a pesar de no presentar una entidad considerada como patológica, la regulación intrínseca de calcio es ampliamente heterogénea en el corazón, por cual las modificaciones anteriormente descritas pueden ser resultado de procesos totalmente independientes y distintivos de cada región. Comenzando con las L.E. derechas la amplitud de sus transitorios a bajas frecuencias es prácticamente igual a la amplitud conseguida con el pulso de cafeína, la cual de hecho tiende a ser menor a las otras dos condiciones derechas y, como se expuso en los resultados, no obstante la respuesta de los transitorios durante el acople E-C para todos sus parámetros tiende a incrementarse de manera proporcional a la frecuencia del estímulo, siendo cada vez más grande respecto a ZDF y Lean del mismo lado. Sin embargo sin importar que la amplitud de sus transitorios vaya creciendo de forma exponencial, su contractibilidad, aunque también va aumentando, es igual a la de las Lean derechas, tendiendo a ser mayor que ZDF del mismo ventrículo a todas las frecuencias. En conjunto todo esto nos podría decir que independientemente que la rata L.E. no posea una entidad fisiopatológica reconocida, el aprovechamiento de Ca2+ que presenta en ventrículo derecho es bajo, aunque no podemos determinar si esto sea debido a un trastorno no identificado o a la regulación propia de este fenotipo. Prácticamente no hay estudios que verifiquen si existen diferencias en la regulación de Ca2+ en el corazón entre modelos animales utilizados como controles y solo algunos trabajos consideran variaciones en la expresión de distintas isoformas de las proteínas participantes del acople E-C afines a Ca2+ (Stelzer, Norman, Chen, Patel, & Moss, 2008; Su et al., 2015), lo cual podría explicar que la expresión de isoformas con una menor afinidad al ion forzasen una mayor disponibilidad de Ca2+ en el citosol durante el acople.

Por último, de todas las condiciones estudiadas, los cardiomiocitos del ventrículo izquierdo de L.E. son los que parecen mostrar la mejor relación entre la regulación de $[Ca^{2+}]_i$ y su función contráctil. Si consideramos la amplitud de sus transitorios durante el acople, menores a los de L.E. derechos, Lean y ZDF izquierdos, y equiparables a los de Lean y ZDF derechos, así como la capacidad para liberar Ca2+ desde retículo y posteriormente removerlo, que es similar a la misma cepa del lado derecho, entonces podríamos considerar que estas células poseen una maquinaria contráctil que

aprovecha de manera más efectiva el Ca2+ disponible en el citosol. Puesto que al compararlas contra todas las condiciones tanto de ventrículo derecho e izquierdo, son estas las que desarrollaron una mayor contracción, lo cual es coherente con las descripciones de la literatura respecto a que el ventrículo izquierdo, en condiciones normales, requiere desarrollar una mayor presión de eyección para bombear la sangre hacia todo el sistema.

Como perspectivas a futuro para tener una visión más integral del efecto global de la modificación en la participación de algún mecanismo sobre la regulación del $[Ca^{2+}]_i$ y la funcionalidad de los cardiomiocitos, se pueden considerar el estudio de otros mecanismos y fenómenos complementarios al proceso de regulación, como pueden ser la fuga de Ca2+ durante el reposo desde el retículo, la actividad de otros mecanismos de transporte y la cuantificación de su expresión. Aunque independiente del mecanismo estudiado, dado que el número de elementos y la sincronía con que participan lo vuelve un proceso demasiado complejo, sería necesario y muy útil, para obtener información con una mejor interpretación el diseño de un modelo dinámico en el que se incorporaran como variables, los mecanismos deseados, teniendo en cuenta sus interacciones entre ellos. Un modelo así nos permitiría entender de mejor forma como pueden modificarse en tiempo y espacio varias variables a la vez con la alteración a su vez de una o varias variables más y por ende identificar de manera más precisa los fenómenos que tienen una mayor repercusión en la homeostasis de Ca2+ y funcionalidad de la células, así como las variables regulables y las reguladas.

CONCLUSIONES

1. Cada una de las 3 cepas analizadas: L.E., Lean y ZDF, presentan un balance entre la regulación de $[Ca^{2+}]_i$ y contracción, distinto para los cardiomiocitos de cada ventrículo, generando así 6 condiciones distintas que podrían considerarse alteraciones, incluso aún en las ratas Lean y L.E. que son tomadas en muchos estudios como controles.

2. En las ratas L.E., el ventrículo izquierdo desarrolla el mejor balance $[Ca^{2+}]_i$ – contracción durante el acople E-C entre todas las condiciones, mientras que la contracción del ventrículo derecho, pese a tener la misma disponibilidad de Ca^{2+} en retículo que su contraparte izquierda, requiere una $[Ca^{2+}]_i$ mas alta.

3. En las ratas ZDF y Lean, los miocitos de ventrículo derecho presentan una mayor disponibilidad de Ca^{2+} del retículo y, sin embargo, una menor amplitud en los transitorios de $[Ca^{2+}]_i$ durante el acople E-C contra L.E. No obstante este desacople parece tener un efecto más atenuante sobre la contracción de los de ZDF derechos, siendo la más débil entre todas las condiciones y presentando, por lo tanto, el peor balance de regulación de $[Ca^{2+}]_i$-contracción.

4. En las ratas Lean, los miocitos de ventrículo izquierdo, a frecuencia fisiológica, la amplitud de los transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ durante el acople E-C es coherente con la mayor disponibilidad de Ca^{2+} en retículo que presentan, contra L.E. izquierdo, pero esto no parece tener mayor efecto sobre su contracción que es igual a los derechos de la misma cepa y menor a L.E izquierdo, quizá debido a la menor participación del NCX en esta condición.

5. En las ratas ZDF, ambos ventrículos tienen una mayor dependencia en la remoción llevada a cabo por el NCX.

6. En las ratas ZDF, los miocitos de ventrículo izquierdo, a bajas frecuencias, presentan un balance proporcional entre la amplitud de los transitorios de $[Ca^{2+}]_i$ durante el acople E-C y la disponibilidad de Ca^{2+} en retículo, pero este balance se pierde a frecuencia fisiológica, donde disminuye la amplitud en el acople a expensas de una mayor acumulación $Ca2^{+}$ en el citoplasma.

7. Los resultados en los miocitos del ventrículo izquierdo de ZDF son compatibles con otros estudios sobre modelos de DM2, donde han hallado una sobreexpresión y mayor actividad de NCX así como una menor actividad de SERCA, ya que el NCX al actuar principalmente a bajas frecuencias permite una mayor remoción de Ca^{2+} evitando su acumulación, pero conforme aumenta la estimulación disminuye su participación y aumenta la de SERCA, y esta al presentar una menor capacidad, propiciaría la acumulación.

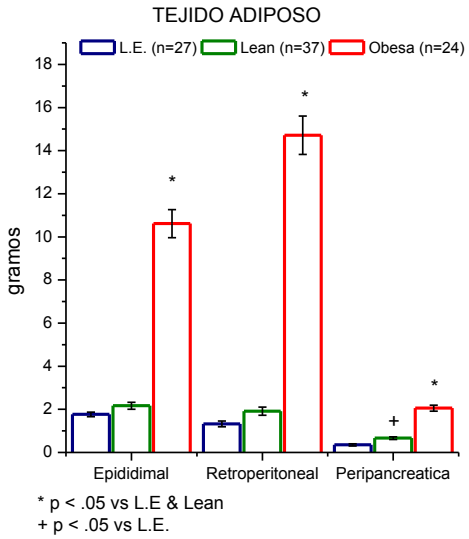
8. En las ratas ZDF, los miocitos de ventrículo izquierdo presentan hipertrofia preponderantemente en sentido longitudinal y una menor capacidad contráctil respecto a L.E. del mismo lado, lo cual aunado a los datos anteriores podría ser coherente con el desarrollo de

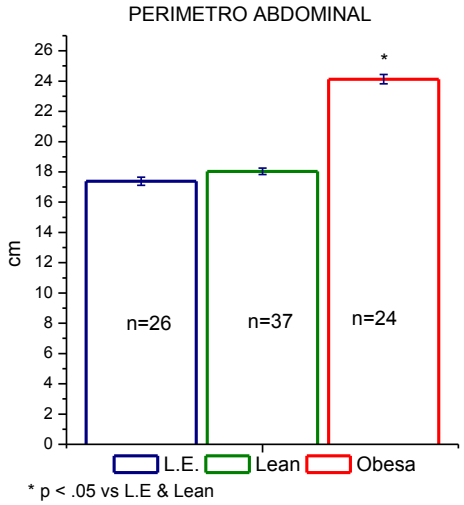
insuficiencia sistólica, con un ventrículo izquierdo agrandado en volumen pero que no desarrolla la fuerza suficiente para la postcarga.

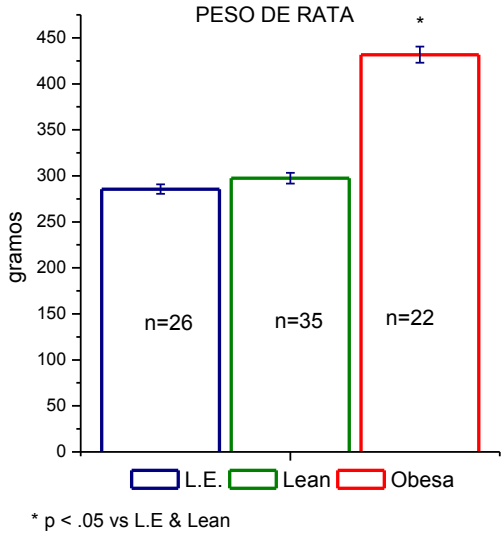
ANEXOS

Tabla y gráficos de parámetros morfométricos y bioquímicos

Parámetros Morfométricos y Bioquímicos											Valor *p*	
Parámetro	Long Evans (Fa/Fa)			Lean Zucker (Fa/fa)			Zucker Diabetic (fa/fa)			LE vs LZR	LE vs ZDF	LZR vs ZDF
	n	Media	± SEM	n	Media	± SEM	n	Media	± SEM			
Perímetro abdominal	26	17.38	0.27	37	18.04	0.21	24	24.13	0.309	0.16671	0	0
Peso	26	285.6	5.08	35	297.5	5.92	22	431.7	8.769	0.37999	0	0
Grasa Epididimal	27	1.764	0.1	37	2.165	0.16	24	10.61	0.65	0.65285	0	0
Grasa Retroperitoneal	27	1.322	0.14	37	1.917	0.19	24	14.71	0.889	0.59762	0	0
Grasa Peripancreática	27	0.354	0.05	37	0.667	0.06	24	2.058	0.138	0.01948	0	0
Glucosa plasmática basal sin ayuno	16	87.44	2.41	28	88.04	2.76	12	182.5	26.03	0.9989	9.70E-07	9.00E-08
Tolerancia a la glucosa 0 min	15	78	2.55	27	68.78	2.56	16	92	11.17	0.48367	2.62E-01	1.58E-02
Tolerancia a la glucosa 30 min	15	225.3	11.6	27	218	13.5	16	362.9	29.43	0.95896	4.24E-05	1.76E-06
Tolerancia a la glucosa 60 min	15	111.9	6.39	27	170.9	20.9	16	314.9	24	0.10914	7.13E-08	1.18E-05
Tolerancia a la glucosa 90 min	15	92	3.77	27	124.3	19.6	16	247.8	19.47	0.44222	4.51E-06	2.75E-05
Tolerancia a la glucosa 120 min	15	79.69	4.05	27	107.2	19.5	16	170.3	18.12	0.51519	5.52E-03	3.70E-02







Tablas de resultados de los transitorios durante el acople E-C

Papilar Derecho 1 Hz														Valor *p*		
Parámetro	Long Evans (Fa/Fa)					Lean Zucker (Fa/fa)					Zucker Diabetic (fa/fa)					LE vs LZR	LE vs ZDF	LZR vs ZDF
	N	n	Media	±	SEM	N	n	Media	±	SEM	N	n	Media	±	SEM			
$[Ca^{2+}]_i$ basal (nM)	5	18	38.17		4.54	6	13	25.88		3.21	3	6	26.65		5.647	0.10714	0.29803	0.99488
Incremento de Ca^{2+} citsólico (nM)	5	18	187.3		10.7	6	13	90.56		6.63	3	6	131.4		11.04	0	0.00381	0.0626
Velocidad de incremento (nM/ms)	5	18	13.78		0.96	6	13	6.747		0.5	3	6	9.242		0.863	0	0.00757	0.25006
Velocidad de decremento (nM/ms)	5	18	-6.911		0.53	6	13	-3.837		0.25	3	6	-5.19		0.506	5.787E-06	0.09039	0.25106
$[Ca^{2+}]_i$ durante relajación (nM)	5	18	64.42		2	6	13	47.7		1.97	3	6	46.61		3.159	4.452E-08	9.407E-06	0.95766
Cinética de decaimiento τ1-fase lenta (ms)	5	18	497		28.9	6	13	907.8		79.2	3	6	548.3		24.57	7.031E-08	0.82586	0.000288
Cinética de decaimiento τ2-fase rápida (ms)	5	18	63.65		3.96	6	13	72.01		3.14	3	6	53.68		3.153	0.19312	0.2252	0.00865
$[Ca^{2+}]_i$ medio (nM)	5	18	94.12		3.6	6	13	63.3		2.88	3	6	65.84		4.268	0	1.918E-05	0.91653
Total de Ca^{2+} liberado (nM)	5	18	28784		1604	6	13	15546		1216	3	6	19022		1352	0	0.0006548	0.41069

Papilar Izquierdo 1 Hz														Valor *p*		
Parámetro	Long Evans (Fa/Fa)					Lean Zucker (Fa/fa)					Zucker Diabetic (fa/fa)					LE vs LZR	LE vs ZDF	LZR vs ZDF
	N	n	Media	±	SEM	N	n	Media	±	SEM	N	n	Media	±	SEM			
$[Ca^{2+}]_i$ basal (nM)	5	13	37.91		7.51	5	13	32.63		6.7	5	13	30.42		4.85	0.83211	0.69218	0.9681
Incremento de Ca^{2+} citsólico (nM)	5	13	122.3		7.21	5	13	137.4		11.3	5	13	185		11.9	0.55669	6.889E-05	0.00368
Velocidad de incremento (nM/ms)	5	13	8.921		0.46	5	13	10.34		0.86	5	13	12.26		0.73	0.32677	0.00239	0.13161
Velocidad de decremento (nM/ms)	5	13	-5.437		0.35	5	13	-5.409		0.46	5	13	-7.68		0.5	0.99887	0.00117	0.00108
$[Ca^{2+}]_i$ durante relajación (nM)	5	13	61.54		3.44	5	13	54.75		3	5	13	59.63		2.66	0.26018	0.89611	0.49786
Cinética de decaimiento τ1-fase lenta (ms)	5	13	760.6		99.3	5	13	653		58.3	5	13	643.2		41.6	0.5804	0.55344	0.99631
Cinética de decaimiento τ2-fase rápida (ms)	5	13	57.18		2.02	5	13	53.13		1.72	5	13	77.11		4.3	0.56664	2.424E-06	7.369E-08
$[Ca^{2+}]_i$ medio (nM)	5	13	81.65		3.94	5	13	73.81		4.11	5	13	90.4		4.12	0.36342	0.27901	0.01174
Total de Ca^{2+} liberado (nM)	5	13	19527		1323	5	13	18894		1270	5	13	30465		1837	0.95247	1.506E-06	4.031E-07

Papilar Derecho 2 Hz														Valor *p*		
Parámetro	Long Evans (Fa/Fa)					Lean Zucker (Fa/fa)					Zucker Diabetic (fa/fa)					LE vs LZR	LE vs ZDF	LZR vs ZDF
	N	n	Media	±	SEM	N	n	Media	±	SEM	N	n	Media	±	SEM			
$[Ca^{2+}]_i$ basal (nM)	5	18	38.31		4.66	6	12	24.17		3.15	3	6	25.45		5.037	0.06449	0.2278	0.98635
Incremento de Ca^{2+} citsólico (nM)	5	18	248.4		17.2	6	12	100.3		9.54	3	6	150.8		10.53	0	0.0008369	0.17443
Velocidad de incremento (nM/ms)	5	18	18.01		1.51	6	12	7.339		0.69	3	6	9.817		0.796	2.506E-08	0.00112	0.56122
Velocidad de decremento (nM/ms)	5	18	-11.3		1.17	6	12	-4.66		0.45	3	6	-6.05		0.54	7.614E-06	0.00755	0.73164
$[Ca^{2+}]_i$ durante relajación (nM)	5	18	88.09		3.06	6	12	61.69		2.86	3	6	62.21		4.11	5.743E-10	1.115E-05	0.99551
Cinética de decaimiento τ1-fase lenta (ms)	5	18	258.9		33.6	6	12	679.5		115	3	6	225.5		30.16	0.0001226	0.96018	0.00152
Cinética de decaimiento τ2-fase rápida (ms)	5	18	59.39		4.39	6	12	76.81		4.31	3	6	41.56		3.47	0.00846	0.03558	1.026E-05
$[Ca^{2+}]_i$ medio (nM)	5	18	145.5		6.19	6	12	86.43		4.69	3	6	95.64		5.454	0	4.849E-06	0.66661
Total de Ca^{2+} liberado (nM)	5	18	28962		1758	6	12	12814		1276	3	6	17345		1132	0	0.0001297	0.27953

Papilar Izquierdo 2 Hz														Valor *p*		
Parámetro	Long Evans (Fa/Fa)					Lean Zucker (Fa/fa)					Zucker Diabetic (fa/fa)					LE vs LZR	LE vs ZDF	LZR vs ZDF
	N	n	Media	±	SEM	N	n	Media	±	SEM	N	n	Media	±	SEM			
$[Ca^{2+}]_i$ basal (nM)	5	14	39.91		7.56	5	13	32.62		6.66	5	13	31.83		4.7	0.70572	0.65256	0.99604
Incremento de Ca^{2+} citsólico (nM)	5	14	132.6		8.73	5	13	156		11.6	5	13	222.3		13.6	0.31039	1.621E-07	0.0001905
Velocidad de incremento (nM/ms)	5	14	9.49		0.53	5	13	10.99		0.82	5	13	14.05		0.79	0.29885	2.963E-05	0.00909
Velocidad de decremento (nM/ms)	5	14	-6.525		0.51	5	13	-6.329		0.53	5	13	-10.3		0.77	0.97154	5.517E-05	2.955E-05
$[Ca^{2+}]_i$ durante relajación (nM)	5	14	79.17		3.89	5	13	71.56		3.48	5	13	84.91		4.28	0.34841	0.54823	0.04604
Cinética de decaimiento τ1-fase lenta (ms)	5	14	418		78.5	5	13	479.5		73.2	5	13	183.9		20.7	0.77312	0.02701	0.0041
Cinética de decaimiento τ2-fase rápida (ms)	5	14	57.04		3.22	5	13	59.56		2.84	5	13	49.88		3.5	0.84264	0.2497	0.10472
$[Ca^{2+}]_i$ medio (nM)	5	14	112.6		4.77	5	13	105.4		5.5	5	13	141.2		6.92	0.65438	0.00141	6.059E-05
Total de Ca^{2+} liberado (nM)	5	14	16366		1198	5	13	17106		1092	5	13	28001		1694	0.91936	5.486E-10	1.3E-07

Papilar Derecho 3 Hz														Valor *p*		
Parámetro	Long Evans (Fa/Fa)					Lean Zucker (Fa/fa)					Zucker Diabetic (fa/fa)					LE vs LZR	LE vs ZDF	LZR vs ZDF
	N	n	Media	±	SEM	N	n	Media	±	SEM	N	n	Media	±	SEM			
$[Ca^{2+}]_i$ basal (nM)	5	14	40.96		6.36	6	9	26.01		4.39	3	6	29.42		5.767	0.18706	0.45177	0.94032
Incremento de Ca^{2+} citsólico (nM)	5	14	317.2		27.7	6	9	94.15		8.99	3	6	148.3		10.6	0	1.814E-05	0.35023
Velocidad de incremento (nM/ms)	5	14	23.01		2.27	6	9	7.178		0.73	3	6	9.168		0.761	0	1.786E-05	0.80772
Velocidad de decremento (nM/ms)	5	14	-16.04		1.94	6	9	-4.544		0.39	3	6	-6.19		0.474	1.183E-06	0.0003261	0.81253
$[Ca^{2+}]_i$ durante relajación (nM)	5	14	115.8		4.87	6	9	74.64		3.88	3	6	76.08		4.739	0	6.958E-07	0.98213
Cinética de decaimiento τ1-fase lenta (ms)	5	14	189.4		36.2	6	9	263.7		48.5	3	6	157.2		38.41	0.38408	0.87179	0.27797
Cinética de decaimiento τ2-fase rápida (ms)	5	14	42.42		3.76	6	9	49.24		4.58	3	6	40.6		6.009	0.50252	0.96111	0.4437
$[Ca^{2+}]_i$ medio (nM)	5	14	210.1		11.4	6	9	103.4		5.41	3	6	121.6		6.442	0	1.014E-07	0.51624
Total de Ca^{2+} liberado (nM)	5	14	31199		2372	6	9	9667		814	3	6	15715		1175	0	4.269E-06	0.17022

Papilar Izquierdo 3 Hz														Valor *p*		
Parámetro	Long Evans (Fa/Fa)					Lean Zucker (Fa/fa)					Zucker Diabetic (fa/fa)					LE vs LZR	LE vs ZDF	LZR vs ZDF
	N	n	Media	±	SEM	N	n	Media	±	SEM	N	n	Media	±	SEM			
$[Ca^{2+}]_i$ basal (nM)	5	11	38.66		3.84	5	13	35.13		7.01	5	9	31.08		4.24	0.89106	0.64552	0.87277
Incremento de Ca^{2+} citsólico (nM)	5	11	148.7		11.4	5	13	156.8		10.9	5	9	225.2		27.3	0.92932	0.00579	0.01072
Velocidad de incremento (nM/ms)	5	11	9.993		0.65	5	13	10.48		0.86	5	9	14.54		1.92	0.94815	0.02487	0.03922
Velocidad de decremento (nM/ms)	5	11	-7.604		0.64	5	13	-6.42		0.57	5	9	-12		1.54	0.60755	0.00463	9.487E-05
$[Ca^{2+}]_i$ durante relajación (nM)	5	11	97.48		2.22	5	13	86.93		3.96	5	9	103.8		5.5	0.1332	0.54184	0.00984
Cinética de decaimiento τ1-fase lenta (ms)	5	11	263.6		43	5	13	173.2		31.6	5	9	172.8		25.9	0.16329	0.22544	0.99998
Cinética de decaimiento τ2-fase rápida (ms)	5	11	41.66		3.54	5	13	40.27		3.73	5	9	35.3		3.43	0.95635	0.46159	0.62908
$[Ca^{2+}]_i$ medio (nM)	5	11	146.1		4.63	5	13	134.2		6.62	5	9	175.6		13.6	0.65438	0.00141	6.059E-05
Total de Ca^{2+} liberado (nM)	5	11	16368		1308	5	13	15711		958	5	9	23500		2773	0.95449	0.01221	0.00333

Papilar Derecho 4 Hz														Valor *p*		
Parámetro	Long Evans (Fa/Fa)					Lean Zucker (Fa/fa)					Zucker Diabetic (fa/fa)					LE vs LZR	LE vs ZDF	LZR vs ZDF
	N	n	Media	±	SEM	N	n	Media	±	SEM	N	n	Media	±	SEM			
$[Ca^{2+}]_i$ basal (nM)	5	13	44.22		6.08	6	7	29.48		5.41	3	6	31.2		5.219	0.0877403	0.8235383	0.1241274
Incremento de Ca^{2+} citsólico (nM)	5	13	278.9		24	6	7	84.38		11.4	3	6	120		9.194	5.093E-11	0.0171849	1.531E-08
Velocidad de incremento (nM/ms)	5	13	20.37		2.04	6	7	6.552		0.91	3	6	7.439		0.569	1.233E-08	0.413413	2.557E-08
Velocidad de decremento (nM/ms)	5	13	-15.93		1.92	6	7	-4.54		0.5	3	6	-5.57		0.395	1.391E-07	0.1106453	1.012E-06
$[Ca^{2+}]_i$ durante relajación (nM)	5	13	137.6		6.03	6	7	88.59		4.67	3	6	89.79		5.11	2.908E-09	0.8629516	2.18E-08
Cinética de decaimiento τ1-fase lenta (ms)	5	13	188.4		42.1	6	7	174.6		35.9	3	6	109		15.98	0.8035322	0.1015654	0.0829204
Cinética de decaimiento τ2-fase rápida (ms)	5	13	29.84		3.5	6	7	29.07		4.09	3	6	22.71		3.74	0.8868579	0.2549599	0.1678186
$[Ca^{2+}]_i$ medio (nM)	5	13	235.5		12.9	6	7	117.7		7.56	3	6	133.2		6.54	0	6.63E-08	0.71061
Total de Ca^{2+} liberado (nM)	5	13	24688		1917	6	7	7379		953	3	6	11553		951.3	1.006E-12	0.0027058	1.481E-08

Papilar Izquierdo 4 Hz														Valor *p*		
Parámetro	Long Evans (Fa/Fa)					Lean Zucker (Fa/fa)					Zucker Diabetic (fa/fa)					LE vs LZR	LE vs ZDF	LZR vs ZDF
	N	n	Media	±	SEM	N	n	Media	±	SEM	N	n	Media	±	SEM			
$[Ca^{2+}]_i$ basal (nM)	5	9	37.91		4.96	5	13	36.82		7.37	5	8	33.16		4.53	0.9035	0.6769625	0.4897665
Incremento de Ca^{2+} citsólico (nM)	5	9	115.1		10.5	5	13	130.9		10.6	5	8	115.7		9.49	0.29058	0.2858468	0.9681706
Velocidad de incremento (nM/ms)	5	9	8.397		0.64	5	13	8.568		0.93	5	8	8.951		0.78	0.87988	0.7521076	0.5838385
Velocidad de decremento (nM/ms)	5	9	-6.741		0.59	5	13	-5.815		0.61	5	8	-8.47		0.91	0.27568	0.0177481	0.1164437
$[Ca^{2+}]_i$ durante relajación (nM)	5	9	109.4		2.36	5	13	103.3		4.66	5	8	122.3		8.66	0.24006	0.0573567	0.1591156
Cinética de decaimiento τ1-fase lenta (ms)	5	9	186.7		43.6	5	13	151.4		35	5	8	142.8		23.1	0.5288	0.8379763	0.3763372
Cinética de decaimiento τ2-fase rápida (ms)	5	9	31.63		3.74	5	13	23.06		2.63	5	8	23.91		2.7	0.06329	0.8213569	0.0972302
$[Ca^{2+}]_i$ medio (nM)	5	9	154.5		5.31	5	13	150.4		7.46	5	8	171.2		12.9	0.93638	0.41732	0.2079
Total de Ca^{2+} liberado (nM)	5	9	11530		1100	5	13	11798		824	5	8	11708		1161	0.84614	0.9498875	0.9117737

Papilar Derecho 5L Hz														Valor *p*		
Parámetro	Long Evans (Fa/Fa)					Lean Zucker (Fa/fa)					Zucker Diabetic (fa/fa)					LE vs LZR	LE vs ZDF	LZR vs ZDF
	N	n	Media	±	SEM	N	n	Media	±	SEM	N	n	Media	±	SEM			
$[Ca^{2+}]_i$ basal (nM)	5	13	45.97		6.72	6	8	33.33		5.35	3	6	31.74		6.05	0.35927	0.34212	0.98837
Incremento de Ca^{2+} citsólico (nM)	5	13	385.5		46.2	6	8	105.6		12.6	3	6	133.9		9.102	1.197E-06	0.0002808	0.91032
Velocidad de incremento (nM/ms)	5	13	29.46		4.24	6	8	8.319		0.87	3	6	8.906		0.624	6.873E-05	0.00131	0.99516
Velocidad de decremento (nM/ms)	5	13	-27.86		4.84	6	8	-6.802		0.69	3	6	-7.49		0.564	0.0005686	0.00604	0.99484
$[Ca^{2+}]_i$ durante relajación (nM)	5	13	184.1		7.69	6	8	123.8		5.33	3	6	140.9		7.533	6.87E-09	0.00104	0.37899
Cinética de decaimiento τ1-fase lenta (ms)	5	13	194.1		47.2	6	8	105.8		15.5	3	6	108.6		15.39	0.19817	0.35441	0.99899
Cinética de decaimiento τ2-fase rápida (ms)	5	13	24.61		2.55	6	8	18.81		1.92	3	6	13.31		0.781	0.11228	0.00304	0.24785
$[Ca^{2+}]_i$ medio (nM)	5	13	299.2		15.3	6	8	166		8.47	3	6	188.7		11.11	0	1.426E-06	0.54763
Total de Ca^{2+} liberado (nM)	5	13	31565		3060	6	8	8601		995	3	6	12464		1028	0	2.536E-05	0.6669

Papilar Izquierdo 5L Hz														Valor *p*		
Parámetro	Long Evans (Fa/Fa)					Lean Zucker (Fa/fa)					Zucker Diabetic (fa/fa)					LE vs LZR	LE vs ZDF	LZR vs ZDF
	N	n	Media	±	SEM	N	n	Media	±	SEM	N	n	Media	±	SEM			
$[Ca^{2+}]_i$ basal (nM)	5	10	41.55		5.19	5	10	29.23		4.63	4	5	39.2		10.4	0.26576	0.96628	0.54895
Incremento de Ca^{2+} citsólico (nM)	5	10	128.3		7.26	5	10	164.7		11.7	4	5	103.6		8.97	0.0172	0.27374	0.000423
Velocidad de incremento (nM/ms)	5	10	9.587		0.49	5	10	10.63		0.82	4	5	11.25		0.89	0.5261	0.33203	0.85255
Velocidad de decremento (nM/ms)	5	10	-8.268		0.5	5	10	-8.074		0.59	4	5	-10.6		0.95	0.9698	0.04981	0.02737
$[Ca^{2+}]_i$ durante relajación (nM)	5	10	142.1		4.81	5	10	122.2		5.08	4	5	180.4		11.1	0.03874	0.0003978	1.454E-08
Cinética de decaimiento τ1-fase lenta (ms)	5	10	142.2		20.8	5	10	108.6		13.1	4	5	172.2		39	0.46824	0.6805	0.20744
Cinética de decaimiento τ2-fase rápida (ms)	5	10	20.43		1.87	5	10	18.48		1.67	4	5	17.64		2.34	0.71524	0.64819	0.96397
$[Ca^{2+}]_i$ medio (nM)	5	10	183.6		9.39	5	10	191.5		9.92	4	5	202.2		14.6	0.86419	0.57205	0.79345
Total de Ca^{2+} liberado (nM)	5	10	12204		985	5	10	14269		1365	4	5	8342		903	0.3922	0.1119	0.00556

Tablas de resultados de los transitorios evocados por cafeína y $NiCl_2$

Papilar Derecho														Valor *p*		
Parámetro		Long Evans (Fa/Fa)				Lean Zucker (Fa/fa)				Zucker Diabetic (fa/fa)				LE vs LZR	LE vs ZDF	LZR vs ZDF
		N	n	Media	± SEM	N	n	Media	± SEM	N	n	Media	± SEM			
Liberación de Ca^{2+} desde RS (nM)		6	9	175.8	24.7	6	8	314.5	45.95	3	6	292.2	69.98	0.07948	0.20277	0.94112
Velocidad de liberación desde RS (nM/ms)		6	9	5.528	0.747	6	8	13.31	2.222	3	6	12.47	3.643	0.0368	0.09511	0.96333
$[Ca^{2+}]_i$ remanente (nM)		6	9	45.87	7.242	6	8	52.53	5.41	3	6	67.82	10.29	0.78798	0.13589	0.37732
Cinética de decaimiento con cafeína	τ1-fase lenta (ms)	6	9	23874	6846	6	8	17116	3146	3	5	18627	2312	0.6137	0.79716	0.98195
	τ2-fase rápida (ms)	6	9	3646	767.8	6	8	3915	870.3	3	5	4425	864.1	0.96841	0.81681	0.91981
[Ca2+]i total (nM)		6	9	2E+06	3E+05	6	8	3E+06	4E+05	3	6	4E+06	8E+05	0.23185	0.0268	0.4462
Ca^{2+} extruido por NCX (nM)		6	7	2E+06	7E+05	6	7	4E+06	9E+05	3	6	5E+06	3E+06	0.64481	0.41413	0.90316
Cinética de decaimiento con cafeína + Ni^{2+} τ (ms)		6	7	16776	3855	6	7	20090	2435	3	6	34070	2378	0.71313	0.00271	0.01355

Papilar Izquierdo														Valor *p*		
Parámetro		Long Evans (Fa/Fa)				Lean Zucker (Fa/fa)				Zucker Diabetic (fa/fa)				LE vs LZR	LE vs ZDF	LZR vs ZDF
		N	n	Media	± SEM	N	n	Media	± SEM	N	n	Media	± SEM			
Liberación de Ca^{2+} desde RS (nM)		6	9	169.5	25.99	3	5	335.5	20.86	3	7	265.9	51.74	0.01747	0.14881	0.45446
Velocidad de liberación desde RS (nM/ms)		6	9	5.605	1.017	3	5	10.11	0.868	3	7	10.94	3.397	0.34776	0.175	0.96574
$[Ca^{2+}]_i$ remanente (nM)		6	9	38.95	6.502	3	5	34.31	2.604	3	7	65.67	10.27	0.91433	0.04735	0.045
Cinética de decaimiento con cafeína	τ1-fase lenta (ms)	6	9	28186	3758	3	5	13044	1452	3	6	22312	5247	0.04877	0.5516	0.33719
	τ2-fase rápida (ms)	6	9	6132	770.2	3	5	2408	748	3	6	4952	964.4	0.01907	0.57394	0.16494
[Ca2+]i total (nM)		6	9	2E+06	3E+05	3	5	3E+06	4E+05	3	7	4E+06	8E+05	0.2606	0.03993	0.74086
Ca^{2+} extruido por NCX (nM)		5	7	2E+06	6E+05	3	5	1E+06	5E+05	2	7	5E+06	2E+06	0.8501	0.19856	0.10455
Cinética de decaimiento con cafeína + Ni^{2+} τ (ms)		5	7	17095	3669	3	5	14917	1853	2	7	28523	6428	0.94807	0.19942	0.17068

Tablas de resultados de tamaño de las células

Papilar Derecho														Valor *p*		
Parámetro	Long Evans (Fa/Fa)				Lean Zucker (Fa/fa)				Zucker Diabetic (fa/fa)				LE vs LZR	LE vs ZDF	LZR vs ZDF
	N	n	Media	± SEM	N	n	Media	± SEM	N	n	Media	± SEM			
Longitud	1	25	145.2	5.04	1	18	136.9	3.53	3	20	153.5	8.45	0.61796	0.58523	0.1726
Diámetro	1	25	28.33	1.13	1	18	33.96	1.52	3	20	31.21	2.33	0.06834	0.42483	0.54271
Perímetro	1	25	371.7	13.4	1	18	365.3	9.69	3	20	372.2	18.8	0.95474	0.99968	0.95194
Área	1	25	4420	185	1	18	4543	455	3	20	4082	252	0.96726	0.75994	0.55209

Papilar Izquierdo														Valor *p*		
Parámetro	Long Evans (Fa/Fa)				Lean Zucker (Fa/fa)				Zucker Diabetic (fa/fa)				LE vs LZR	LE vs ZDF	LZR vs ZDF
	N	n	Media	± SEM	N	n	Media	± SEM	N	n	Media	± SEM			
Longitud	1	17	145.3	3.43	1	4	120.7	7.11	3	19	162.5	5.46	0.06916	0.0257	0.00107
Diámetro	1	17	29.47	1.78	1	4	36.73	6.77	3	19	35.47	2.41	0.35536	0.14606	0.96863
Perímetro	1	17	362.5	8.51	1	4	353	8.39	3	19	409	12.4	0.8062	0.00439	0.0015
Área	1	17	3864	188	1	4	4065	563	3	19	5291	393	0.95915	0.00553	0.22587

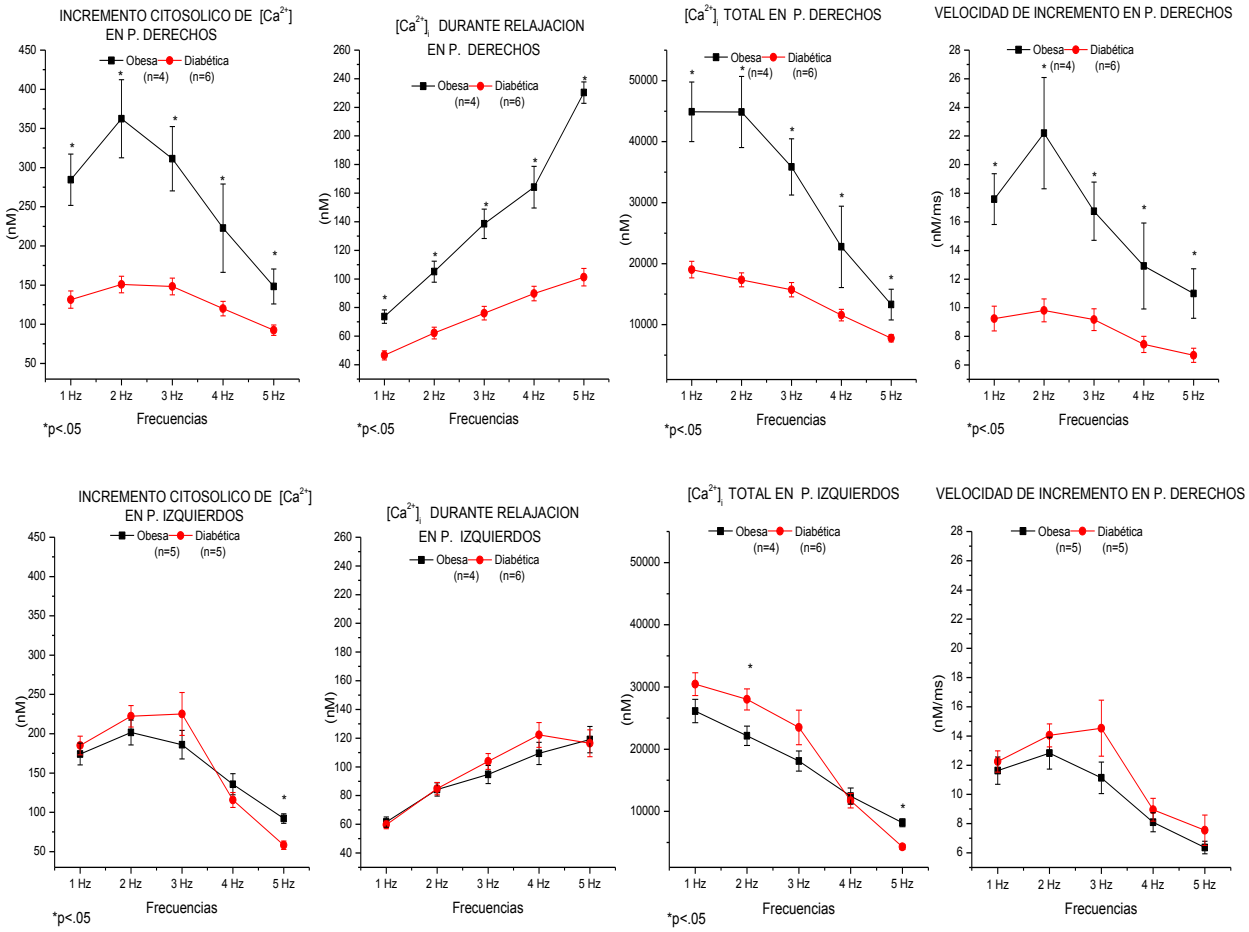
Tabla de resultados de contracción de las células

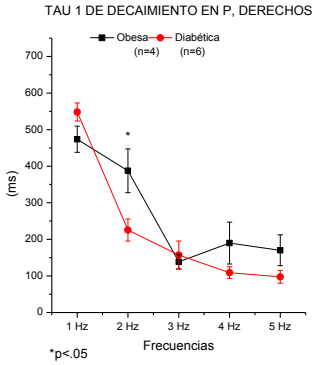
Papilar Derecho													Valor *p*		
Frecuencia de estímulación	Long Evans (Fa/Fa)					Lean Zucker (Fa/fa)					Zucker Diabetic (fa/fa)					LE vs LZR	LE vs ZDF	LZR vs ZDF
	N	n	Media	±	SEM	N	n	Media	±	SEM	N	n	Media	±	SEM			
1 Hz	3	9	1.888		0.15	3	8	2.255		0.16	1	1	0.798		0.05	0.20119	0.09314	0.01676
2 Hz	3	9	2.279		0.28	3	8	3.544		0.21	1	1	1.528		0.16	0.00156	0.60228	0.03256
3 Hz	3	9	2.821		0.38	3	8	3.61		0.17	1	1	0.937		0.2	0.13638	0.10437	0.01211
4 Hz	3	9	4.273		0.42	3	8	4.678		0.28	1	1	1.902		0.46	0.70557	0.10654	0.04949
5 Hz	3	9	4.523		0.3	3	8	5.423		0.31	1	1	0.612		0.09	0.10695	0.0005163	2.424E-05

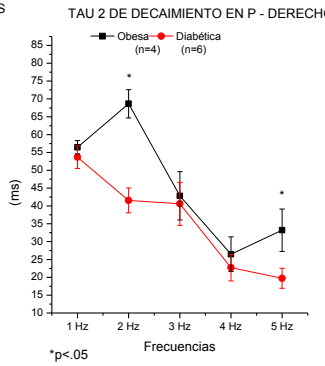
Papilar Izquierdo													Valor *p*		
Frecuencia de estímulación	Long Evans (Fa/Fa)					Lean Zucker (Fa/fa)					Zucker Diabetic (fa/fa)					LE vs LZR	LE vs ZDF	LZR vs ZDF
	N	n	Media	±	SEM	N	n	Media	±	SEM	N	n	Media	±	SEM			
1 Hz	3	7	5.254		0.66	3	9	2.501		0.22	1	4	2.506		0.34	6.753E-05	0.00188	0.99997
2 Hz	3	7	7.293		0.69	3	9	3.918		0.38	1	4	3.35		0.41	3.197E-05	0.0001437	0.81512
3 Hz	3	7	7.831		0.91	3	9	3.142		0.36	1	4	2.215		0.32	2.607E-06	9.921E-06	0.6978
4 Hz	3	7	9.815		0.71	3	9	3.575		0.41	1	4	4.125		0.44	0	0	0.80288
5 Hz	3	7	7.687		0.52	3	9	5.804		0.69	1	4	4.032		0.4	0.06193	0.00352	0.2306

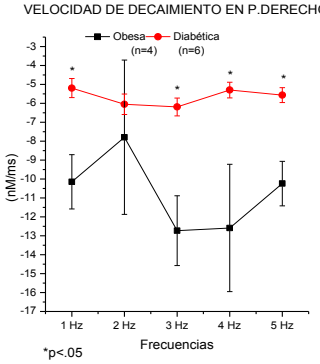
Gráficas de las comparaciones hechas entre parámetros de ZDF diabéticas (13 semanas) y ZDF obesa (8 semanas).

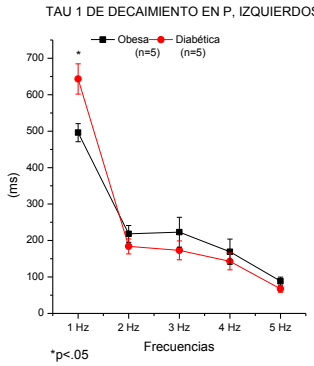
Todas las variables mostradas corresponden a los valores que se registraron de los transitorios de $[Ca^{2+}]_i$ obtenidos por estimulación de campo replicando el acople E-C. Los valores de ZDF diabética (círculos rojos) son los mostrados anteriormente para las comparaciones contra Lean y L.E. La significancia asignada ($P < .05$) es respecto a las comparaciones hechas contra la condición ZDF obesa no diabética (cuadros negros) mediante *t* de Student de distribución de 2 colas y no pareada. Se observa que en el ventrículo derecho la mayoría de estos parámetros difieren entre ambas condiciones, no así en el ventrículo izquierdo donde la respuesta a prácticamente todas las variables es la misma entre la condición diabética y la obesa.

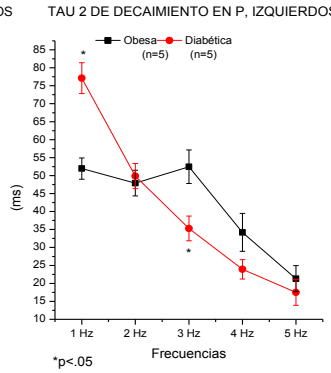


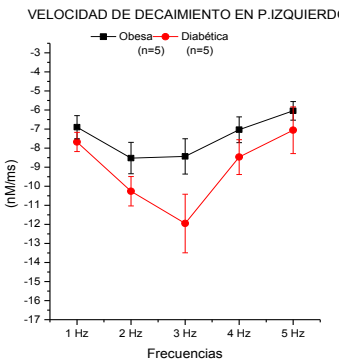

TAU 1 DE DECAIMIENTO EN P, DERECHOS
Obesa (n=4)
Diabética (n=6)
(ms)
Frecuencias
1 Hz
2 Hz
3 Hz
4 Hz
5 Hz
*p<.05


TAU 2 DE DECAIMIENTO EN P - DERECHOS
Obesa (n=4)
Diabética (n=6)
(ms)
Frecuencias
1 Hz
2 Hz
3 Hz
4 Hz
5 Hz
*p<.05


VELOCIDAD DE DECAIMIENTO EN P.DERECHOS
Obesa (n=4)
Diabética (n=6)
(nM/ms)
Frecuencias
1 Hz
2 Hz
3 Hz
4 Hz
5 Hz
*p<.05


TAU 1 DE DECAIMIENTO EN P, IZQUIERDOS
Obesa (n=5)
Diabética (n=5)
(ms)
Frecuencias
1 Hz
2 Hz
3 Hz
4 Hz
5 Hz
*p<.05


TAU 2 DE DECAIMIENTO EN P, IZQUIERDOS
Obesa (n=5)
Diabética (n=5)
(ms)
Frecuencias
1 Hz
2 Hz
3 Hz
4 Hz
5 Hz
*p<.05


VELOCIDAD DE DECAIMIENTO EN P.IZQUIERDOS
Obesa (n=5)
Diabética (n=5)
(nM/ms)
Frecuencias
1 Hz
2 Hz
3 Hz
4 Hz
5 Hz

Referencias:

Alberti, K. G. M. M., & Zimmet, P. Z. (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO Consultation. *Diabetic Medicine, 15*(7), 539-553. doi: 10.1002/(sici)1096-9136(199807)15:7<539::aid-dia668>3.0.co;2-s

Asbun, J., & Villarreal, F. J. (2006). The Pathogenesis of Myocardial Fibrosis in the Setting of Diabetic Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology, 47*(4), 693-700. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2005.09.050

Association, A. A. H. (2006). Contemporary Definitions and Classification of the Cardiomyopathies: An American Heart Association Scientific Statement From the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation, 113*(14), 1807-1816. doi: 10.1161/circulationaha.106.174287

Association, A. D. (2014). Standards of Medical Care in Diabetes—2014. *Diabetes Care, 37*(Supplement 1), S14-S80. doi: 10.2337/dc14-S014

Belke, D. D., Swanson, E. A., & Dillmann, W. H. (2004). Decreased Sarcoplasmic Reticulum Activity and Contractility in Diabetic db/db Mouse Heart. *Diabetes, 53*(12), 3201-3208. doi: 10.2337/diabetes.53.12.3201

Berridge, M. J., Bootman, M. D., & Roderick, H. L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol, 4*(7), 517-529. doi: 10.1038/nrm1155

Bers, D. M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. [10.1038/415198a]. *Nature, 415*(6868), 198-205.

Bers, D. M. (2006). Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. *Physiology (Bethesda), 21*, 380-387. doi: 10.1152/physiol.00019.2006

Bers, D. M. (2008). Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol, 70*, 23-49. doi: 10.1146/annurev.physiol.70.113006.100455

Bode, E. F., Briston, S. J., Overend, C. L., O'Neill, S. C., Trafford, A. W., & Eisner, D. A. (2011). Changes of SERCA activity have only modest effects on sarcoplasmic reticulum Ca2+ content in rat ventricular myocytes. *J Physiol, 589*(Pt 19), 4723-4729.

Bode, E. F., Briston, S. J., Overend, C. L., O'Neill, S. C., Trafford, A. W., & Eisner, D. A. (2011). Changes of SERCA activity have only modest effects on sarcoplasmic reticulum Ca2+ content in rat ventricular myocytes. *The Journal of Physiology, 589*(19), 4723-4729. doi: 10.1113/jphysiol.2011.211052

Bootman, M. D., Smyrnias, I., Thul, R., Coombes, S., & Roderick, H. L. (2011). Atrial cardiomyocyte calcium signalling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 1813*(5), 922-934. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.01.030

Boudina, S., & Abel, E. D. (2007). Diabetic Cardiomyopathy Revisited. *Circulation, 115*(25), 3213-3223. doi: 10.1161/circulationaha.106.679597

Boudina, S., & Abel, E. D. (2010). Diabetic cardiomyopathy, causes and effects. *Reviews in endocrine & metabolic disorders, 11*(1), 31-39. doi: 10.1007/s11154-010-9131-7

Calderone, A. (2007). The Therapeutic Effect of Natriuretic Peptides in Heart Failure; Differential Regulation of Endothelial and Inducible Nitric Oxide Synthases. In B. I. Jugdutt (Ed.), *The role of nitric oxide in heart faiulre* (2004 ed.). New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Academic Publishers.

Clark, J. B., Palmer, C. J., & Shaw, W. N. (1983). The diabetic Zucker fatty rat. *Proc Soc Exp Biol Med, 173*(1), 68-75.

Chu, S. H., Sutherland, K., Beck, J., Kowalski, J., Goldspink, P., & Schwertz, D. (2005). Sex differences in expression of calcium-handling proteins and beta-adrenergic receptors in rat heart ventricle. *Life Sciences, 76*(23), 2735-2749. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2004.12.013

Danaei, G., Finucane, M. M., Lu, Y., Singh, G. M., Cowan, M. J., Paciorek, C. J., . . . Ezzati, M. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2·7 million participants. *The Lancet, 378*(9785), 31-40. doi: http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60679-X

Díaz, M. E., Trafford, A. W., O'Neill, S. C., & Eisner, D. A. (1997). Measurement of sarcoplasmic reticulum Ca2+ content and sarcolemmal Ca2+ fluxes in isolated rat ventricular myocytes during spontaneous Ca2+ release. *J Physiol, 501*(Pt 1), 3-16.

Dvorkin, C., Dvorkin, M. A., & Cardinali, D. P. . (2010). *Best & Taylor. Bases Fisiológicas de la Práctica Médica*.

Fill, M., & Copello, J. A. (2002). Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev, 82*(4), 893-922. doi: 10.1152/physrev.00013.2002

Fox, C. S. (2010). Cardiovascular Disease Risk Factors, Type 2 Diabetes Mellitus, and the Framingham Heart Study. *Trends in Cardiovascular Medicine, 20*(3), 90-95. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.tcm.2010.08.001

Fox, C. S., Coady, S., Sorlie, P. D., D'Agostino, R. B., Pencina, M. J., Vasan, R. S., . . . Savage, P. J. (2007). Increasing Cardiovascular Disease Burden Due to Diabetes Mellitus: The Framingham Heart Study. *Circulation, 115*(12), 1544-1550. doi: 10.1161/circulationaha.106.658948

Grundy, S. M., Benjamin, I. J., Burke, G. L., Chait, A., Eckel, R. H., Howard, B. V., . . . Sowers, J. R. (1999). Diabetes and Cardiovascular Disease: A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association. *Circulation, 100*(10), 1134-1146. doi: 10.1161/01.cir.100.10.1134

Grynkiewicz, G., Poenie, M., & Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca2+ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem, 260*(6), 3440-3450.

Guariguata, L., Whiting, D. R., Hambleton, I., Beagley, J., Linnenkamp, U., & Shaw, J. E. (2014). Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Research and Clinical Practice, 103*(2), 137-149. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2013.11.002

The Zuccker Diabetic Fatty (ZDF) Rat - Technical Sheet, (2010).

Gyorke, S., Gyorke, I., Lukyanenko, V., Terentyev, D., Viatchenko-Karpinski, S., & Wiesner, T. F. (2002). Regulation of sarcoplasmic reticulum calcium release by luminal calcium in cardiac muscle. *Front Biosci, 7*, d1454-1463.

Haizlip, K. M., Bupha-Intr, T., Biesiadecki, B. J., & Janssen, P. M. (2012). Effects of increased preload on the force-frequency response and contractile kinetics in early stages of cardiac muscle hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol, 302*(12), H2509-2517. doi: 10.1152/ajpheart.00660.2011

Hattori, Y., Matsuda, N., Kimura, J., Ishitani, T., Tamada, A., Gando, S., . . . Kanno, M. (2000). Diminished function and expression of the cardiac Na(+)-Ca(2+) exchanger in diabetic rats: implication in Ca(2+) overload. *The Journal of Physiology, 527*(Pt 1), 85-94. doi: 10.1111/j.1469-7793.2000.00085.x

Heo, Y. R., Claycombe, K., Jones, B. H., Wright, P., Truett, G. E., Zemel, M., . . . Moustaid-Moussa, N. (2002). Effects of fatty (fa) allele and high-fat diet on adipose tissue leptin and lipid metabolism. *Horm Metab Res, 34*(11-12), 686-690. doi: 10.1055/s-2002-38264

Hsueh, W., Abel, E. D., Breslow, J. L., Maeda, N., Davis, R. C., Fisher, E. A., . . . Goldberg, I. J. (2007). Recipes for creating animal models of diabetic cardiovascular disease. *Circ Res, 100*(10), 1415-1427. doi: 10.1161/01.RES.0000266449.37396.1f

Kengne, A. P., Turnbull, F., & MacMahon, S. (2010). The Framingham Study, Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease: Turning Back the Clock. *Progress in Cardiovascular Diseases, 53*(1), 45-51. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.pcad.2010.02.010

Kondo, R. P., Dederko, D. A., Teutsch, C., Chrast, J., Catalucci, D., Chien, K. R., & Giles, W. R. (2006). Comparison of contraction and calcium handling between right and left ventricular myocytes from adult mouse heart: a role for repolarization waveform. *J Physiol, 571*(Pt 1), 131-146. doi: 10.1113/jphysiol.2005.101428

Kong, H., Jones, P. P., Koop, A., Zhang, L., Duff, H. J., & Chen, S. R. (2008). Caffeine induces Ca2+ release by reducing the threshold for luminal Ca2+ activation of the ryanodine receptor. *Biochem J, 414*(3), 441-452. doi: 10.1042/bj20080489

Leonard, B. L., Watson, R. N., Loomes, K. M., Phillips, A. R., & Cooper, G. J. (2005). Insulin resistance in the Zucker diabetic fatty rat: a metabolic characterisation of obese and lean phenotypes. *Acta Diabetol, 42*(4), 162-170. doi: 10.1007/s00592-005-0197-8

Li, L., Louch, W. E., Niederer, S. A., Andersson, K. B., Christensen, G., Sejersted, O. M., & Smith, N. P. (2011). Calcium dynamics in the ventricular myocytes of SERCA2 knockout mice: A modeling study. *Biophys J, 100*(2), 322-331. doi: 10.1016/j.bpj.2010.11.048

Louch, W. E., Hougen, K., Mork, H. K., Swift, F., Aronsen, J. M., Sjaastad, I., . . . Sejersted, O. M. (2010). Sodium accumulation promotes diastolic dysfunction in end-stage heart failure following Serca2 knockout. *J Physiol, 588*(Pt 3), 465-478. doi: 10.1113/jphysiol.2009.183517

Louch, W. E., Stokke, M. K., Sjaastad, I., Christensen, G., & Sejersted, O. M. (2012). No rest for the weary: diastolic calcium homeostasis in the normal and failing myocardium. *Physiology (Bethesda), 27*(5), 308-323. doi: 10.1152/physiol.00021.2012

Maack, C., & O'Rourke, B. (2007). Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics. *Basic Res Cardiol, 102*(5), 369-392. doi: 10.1007/s00395-007-0666-z

Oana, F., Takeda, H., Hayakawa, K., Matsuzawa, A., Akahane, S., Isaji, M., & Akahane, M. (2005). Physiological difference between obese (fa/fa) Zucker rats and lean Zucker rats concerning adiponectin. *Metabolism, 54*(8), 995-1001. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2005.02.016

World Health Statistics (2014).

Pereira, L., Matthes, J., Schuster, I., Valdivia, H. H., Herzig, S., Richard, S., & Gómez, A. M. (2006). Mechanisms of [Ca2+]i Transient Decrease in Cardiomyopathy of db/db Type 2 Diabetic Mice. *Diabetes, 55*(3), 608-615. doi: 10.2337/diabetes.55.03.06.db05-1284

Pereira, L., Ruiz-Hurtado, G., Rueda, A., Mercadier, J. J., Benitah, J. P., & Gomez, A. M. (2014). Calcium signaling in diabetic cardiomyocytes. *Cell Calcium, 56*(5), 372-380. doi: 10.1016/j.ceca.2014.08.004

Periasamy, M., & Kalyanasundaram, A. (2007). SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle Nerve, 35*(4), 430-442. doi: 10.1002/mus.20745

Peterson, R. G., Shaw, W. N., Neel, M.-A., Little, L. A., & Eichberg, J. (1990). Zucker Diabetic Fatty Rat as a Model for Non-insulin-dependent Diabetes Mellitus. *ILAR Journal, 32*(3), 16-19. doi: 10.1093/ilar.32.3.16

Poornima, I. G., Parikh, P., & Shannon, R. P. (2006). Diabetic Cardiomyopathy: The Search for a Unifying Hypothesis. *Circulation Research, 98*(5), 596-605. doi: 10.1161/01.RES.0000207406.94146.c2

Rossi, A. E., & Dirksen, R. T. (2006). Sarcoplasmic reticulum: the dynamic calcium governor of muscle. *Muscle Nerve, 33*(6), 715-731. doi: 10.1002/mus.20512

Russ, M., Reinauer, H., & Eckel, J. (1991). Diabetes-induced decrease in the mRNA coding for sarcoplasmic reticulum Ca2+-ATPase in adult rat cardiomyocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications, 178*(3), 906-912. doi: http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X(91)90977-F

Russell, J. C., & Proctor, S. D. (2006). Small animal models of cardiovascular disease: tools for the study of the roles of metabolic syndrome, dyslipidemia, and atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol, 15*(6), 318-330. doi: 10.1016/j.carpath.2006.09.001

Scriven, D. R., Asghari, P., & Moore, E. D. (2013). Microarchitecture of the dyad. *Cardiovasc Res, 98*(2), 169-176. doi: 10.1093/cvr/cvt025

Scheuermann-Freestone, M., Madsen, P. L., Manners, D., Blamire, A. M., Buckingham, R. E., Styles, P., . . . Clarke, K. (2003). Abnormal cardiac and skeletal muscle energy metabolism in

patients with type 2 diabetes. *Circulation, 107*(24), 3040-3046. doi: 10.1161/01.cir.0000072789.89096.10

Sharma, V., & McNeill, J. H. (2006). Diabetic cardiomyopathy: Where are we 40 years later? *The Canadian Journal of Cardiology, 22*(4), 305-308.

Shaw, J. E., Sicree, R. A., & Zimmet, P. Z. (2010). Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice, 87*(1), 4-14. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2009.10.007

Shibukawa, Y., Chilton, E. L., MacCannell, K. A., Clark, R. B., & Giles, W. R. (2005). K(+) Currents Activated by Depolarization in Cardiac Fibroblasts. *Biophysical Journal, 88*(6), 3924-3935. doi: 10.1529/biophysj.104.054429

Srinivasan, K., & Ramarao, P. (2007). Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *Indian J Med Res, 125*(3), 451-472.

Stelzer, J. E., Norman, H. S., Chen, P. P., Patel, J. R., & Moss, R. L. (2008). Transmural variation in myosin heavy chain isoform expression modulates the timing of myocardial force generation in porcine left ventricle. *J Physiol, 586*(21), 5203-5214. doi: 10.1113/jphysiol.2008.160390

Stokke, M. K., Hougen, K., Sjaastad, I., Louch, W. E., Briston, S. J., Enger, U. H., . . . Trafford, A. W. (2010). Reduced SERCA2 abundance decreases the propensity for Ca2+ wave development in ventricular myocytes. *Cardiovasc Res, 86*(1), 63-71. doi: 10.1093/cvr/cvp401

Stokke, M. K., Rivelsrud, F., Sjaastad, I., Sejersted, O. M., & Swift, F. (2012). From global to local: a new understanding of cardiac electromechanical coupling. *Tidsskr Nor Laegeforen, 132*(12-13), 1457-1460. doi: 10.4045/tidsskr.11.1353

Su, Y. R., Chiusa, M., Brittain, E., Hemnes, A. R., Absi, T. S., Lim, C. C., & Di Salvo, T. G. (2015). Right ventricular protein expression profile in end-stage heart failure. *Pulmonary Circulation, 5*(3), 481-497. doi: 10.1086/682219

Takahashi, A., Camacho, P., Lechleiter, J. D., & Herman, B. (1999). Measurement of intracellular calcium. *Physiol Rev, 79*(4), 1089-1125.

Takaya, K., Ogawa, Y., Isse, N., Okazaki, T., Satoh, N., Masuzaki, H., . . . Nakao, K. (1996). Molecular cloning of rat leptin receptor isoform complementary DNAs--identification of a missense mutation in Zucker fatty (fa/fa) rats. *Biochem Biophys Res Commun, 225*(1), 75-83. doi: 10.1006/bbrc.1996.1133

Toyoshima, C., & Inesi, G. (2004). Structural basis of ion pumping by Ca2+-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem, 73*, 269-292. doi: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.073700

Trafford, A. W., Díaz, M. E., & Eisner, D. A. (2001). Coordinated Control of Cell Ca2+ Loading and Triggered Release From the Sarcoplasmic Reticulum Underlies the Rapid Inotropic Response to Increased L-Type Ca2+ Current. *Circulation Research, 88*(2), 195-201. doi: 10.1161/01.res.88.2.195

Walker, M. A., Williams, G. S., Kohl, T., Lehnart, S. E., Jafri, M. S., Greenstein, J. L., . . . Winslow, R. L. (2014). Superresolution modeling of calcium release in the heart. *Biophys J, 107*(12), 3018-3029. doi: 10.1016/j.bpj.2014.11.003

Williams, G. S., Boyman, L., Chikando, A. C., Khairallah, R. J., & Lederer, W. J. (2013). Mitochondrial calcium uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A, 110*(26), 10479-10486. doi: 10.1073/pnas.1300410110

Winslow, R. L., Walker, M. A., & Greenstein, J. L. (2016). Modeling calcium regulation of contraction, energetics, signaling, and transcription in the cardiac myocyte. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine, 8*(1), 37-67. doi: 10.1002/wsbm.1322

Wold, L. E., Relling, D. P., Duan, J., Norby, F. L., & Ren, J. (2002). Abrogated leptin-induced cardiac contractile response in ventricular myocytes under spontaneous hypertension: role of Jak/STAT pathway. *Hypertension, 39*(1), 69-74.