



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
PUEBLA**

FACULTAD DE MEDICINA

TESIS DE INVESTIGACIÓN

ALTERACIONES EN EL ACOUPLE EXCITACIÓN –
CONTRACCIÓN EN CARDIOMIOCITOS VENTRICULARES
DURANTE EL DESARROLLO DEL SÍNDROME
METABÓLICO EN UN MODELO ANIMAL

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

Licenciada en Biomedicina

PRESENTA:

Angélica Ramírez González

DIRECTOR EXPERTO:

D. en C. José Everardo Avelino Cruz

DIRECTOR METODOLÓGICO:

D. en C. Samuel Treviño Mora

Puebla, Puebla. Febrero, 2019

ÍNDICE

1. RESUMEN	7
2. INTRODUCCIÓN.	9
2.1 El corazón.	9
2.2. Síndrome metabólico.....	9
3. ANTECEDENTES	11
3.1 Antecedentes Generales	11
3.1.1 Los cardiomiocitos	11
3.1.2 Síndrome metabólico: criterios de diagnóstico.....	13
3.2 Antecedentes específicos	20
3.2.1 Acople excitación-contracción	20
3.2.2 Síndrome metabólico y problemas cardíacos.....	21
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
5. OBJETIVOS.....	23
5.1 Objetivos Generales.....	23
5.2 Objetivos Particulares	23
6. MATERIAL Y MÉTODOS	24
6.1 Modelo Animal.....	24
6.2 Aislamiento de los cardiomiocitos.....	27
6.3 Registro de calcio intracelular	28
6.4 Medición de tamaño de las células y porcentaje de contracción.	29
6.5 Soluciones	30
6.6 Análisis de datos.....	30
7. RESULTADOS	32
7.1 Modelo Animal.....	32
7.2 Cardiomiocitos	33
7.3 Transitorios de Calcio.....	34

7.4 Análisis de los transitorios de Calcio durante el acople excitación-contracción	36
7.4.1 Niveles basales de calcio intracelular	36
7.4.2 Incremento de $[Ca^{2+}]_i$ en sístole	37
7.4.3 $[Ca^{2+}]_i$ durante la relajación	39
7.4.4 Velocidad de incremento y decaimiento de $[Ca^{2+}]$ en el citosol	40
7.4.5 $[Ca^{2+}]_i$ total en el citosol durante la contracción	44
7.4.6 Calcio Promedio	45
7.4.7 Tau de Decaimiento	47
7.5 Tamaño de las células	48
7.6 Porcentaje de Contracción	50
7.7 Tabla de resumen de resultados	51
8. DISCUSIÓN	52
9. CONCLUSIONES	57
10. ANEXOS	58
11. BIBLIOGRAFÍA	68

ABREVIATURAS

[Ca ²⁺] _i :	concentración de calcio intracelular
ATP:	adenosin trifosfato
CA:	circunferencia abdominal
Ca ²⁺ :	ión calcio
CICR:	liberación de calcio inducida por calcio
DHPR:	receptor de dihidropiridina
DM2:	diabetes mellitus tipo 2
EAC:	enfermedad arterial coronaria
ECAM:	eventos cardiovasculares adversos mayores
ECNTs:	enfermedades crónicas no transmisibles
E-C:	acople excitación-contracción
GLUT4:	transportador de glucosa tipo 4
HDL:	lipoproteínas de alta densidad
IDF:	Federación Internacional de la Diabetes
IMC:	índice de masa corporal
IP3r:	receptor de inositol trifosfato
LDL:	lipoproteínas de baja densidad
LTCC-Cav1.2:	canal de calcio voltaje dependiente tipo L
LRT:	lipoproteínas ricas en triglicéridos
mCU:	uniporter de calcio mitocondrial
NCX:	intercambiador sodio-calcio
NCEP-ATP III:	National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III

PMCA: ATPasa de calcio de la membrana plasmática

RS, SR: retículo sarcoplásmico

RyR, RyR2: receptor de rianodina isoforma 2

SERCA: ATPasa de calcio del retículo sarco/endoplásmico

SM: Síndrome metabólico

VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad

WHO/OMS: Organización Mundial de la Salud

1. RESUMEN

El síndrome metabólico (SM) es un conjunto de factores que aumentan el riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular o diabetes mellitus tipo 2, debido a su alta prevalencia, se le considera un problema de salud pública; fue descrito por primera vez en 1988 por Reaven, y a partir de entonces se han publicado diversas definiciones que establecen los criterios fisiológicos que deben presentarse para su diagnóstico. Entre las definiciones más aceptadas se encuentra la del National Cholesterol Education Program que define la condición como aquella en la que se encuentran presentes tres de los siguientes criterios: obesidad central, hipertensión arterial, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e hiperinsulinemia.

En México, el SM se encuentra entre las enfermedades crónicas no transmisibles con una alta prevalencia en el país, con una tasa de 41%, donde también se ubican la obesidad y la diabetes, éstas últimas con una mayor prevalencia que el SM. El interés por el estudio de los factores de riesgo del SM ha crecido en los últimos años. Numerosas investigaciones plantean los efectos que tienen los factores como la hipertrigliceridemia, la obesidad o la hipertensión sobre el corazón.

La función del corazón como una bomba está principalmente determinada por la capacidad del cardiomiocito de producir fuerza contráctil y acortarse. La contracción del cardiomiocito es consecuencia del proceso de acople excitación-contracción en donde el ion calcio tiene un papel fundamental.

El presente trabajo evaluamos los cambios en el transitorio de calcio y en el acortamiento de los miocitos cardíacos provenientes de un modelo animal de síndrome metabólico. Se usaron ratas Wistar macho y, a las cuales se les indujo el síndrome metabólico mediante una dieta hipercalórica. La evaluación se realizó a los 3 y 5 meses después de iniciar dicha dieta y, para ello se aislaron los cardiomiocitos de los músculos papilares, haciendo distinción entre los provenientes de ventrículo derecho y los de ventrículo izquierdo. Los cardiomiocitos obtenidos se cargaron con Fluo 4-AM y se registró mediante microfluorometría los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ durante el acople excitación-contracción iniciado por la estimulación de

campo a frecuencias de 1 a 5hz. También se midió el tamaño de los cardiomiocitos y se evaluó su porcentaje de contracción con respecto a la longitud de la célula.

Los resultados obtenidos muestran que en ambos ventrículos del modelo de 3 meses encontramos una disminución significativa en casi todos los parámetros a frecuencias bajas en la condición tratada con respecto al control, sin embargo, estas diferencias ya no se presentan cuando se estimula a frecuencia fisiológica, además, el porcentaje de contracción sólo disminuye significativamente a frecuencias bajas en papilar izquierdo en el modelo de SM respecto al control. Esto no ocurre así en el modelo de 5 meses, las diferencias encontradas a frecuencias bajas siguen siendo significativas a frecuencia fisiológica, nuevamente vemos una disminución significativa en casi todos los parámetros analizados en la condición tratada con respecto al control y en el porcentaje de contracción encontramos ahora que en papilar izquierdo es menor en el modelo de SM con respecto al control en todas las frecuencias registradas. Esto podría ser un indicativo del efecto que tiene el tiempo de dieta en el modelo, si bien a los 3 meses las ratas ya padecen síndrome metabólico, los cambios en los mecanismos de regulación de calcio podrían ser mínimos, pero se estarían acentuando después de pasar 2 meses más de un consumo alimenticio altamente calórico.

2. INTRODUCCIÓN.

2.1 El corazón.

El corazón es el órgano central del aparato circulatorio. Es una bomba que recibe sangre de los vasos venosos a una baja presión, la almacena y luego mediante la contracción de las cámaras cardiacas la expulsa hacia los vasos sanguíneos arteriales (Klabunde, 2005).

El corazón está compuesto por dos mitades diferenciadas que se encuentran separadas por un tabique. En cada una de estas mitades hay dos cavidades: una aurícula y un ventrículo, cada una de las aurículas comunica con el ventrículo correspondiente por un orificio provisto de válvulas que aseguran, en cada mitad del corazón, una circulación sanguínea en sentido único. A las aurículas llegan las venas, de los ventrículos parten las arterias (Latarjet & Ruiz Liard, 2011). Las acciones sincrónicas de bombeo de las dos bombas auriculoventriculares constituyen el ciclo cardíaco. El ciclo empieza con un período de elongación y llenado ventricular (diástole) y finaliza con un período de acortamiento y vaciado ventricular (sístole) (Moore, Dalley, & Agur, 2013).

Dada su función contráctil, la constitución principal del corazón es de tejido muscular y está formado por 3 tipos principales de músculo cardíaco: el auricular, ventricular y fibras musculares especializadas de excitación y conducción. Su consistencia es variable, en las aurículas es más blando y delgado que en los ventrículos que son más elásticos y resistentes, especialmente del lado izquierdo (Hall & Guyton, 2016; Latarjet & Ruiz Liard, 2011).

2.2. Síndrome metabólico.

El síndrome metabólico consiste en la asociación de un conjunto de indicadores antropométricos y bioquímicos que indican mayor riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, debido a su alta prevalencia, se le considera un problema de salud pública (Burguete-García, Valdés-Villalpando, & Cruz, 2014); fue descrito por primera vez en 1988 por Reaven, y a partir de entonces se han

publicado diversas definiciones que establecen los criterios fisiológicos que deben presentarse para su diagnóstico.

Entre las definiciones más aceptadas se encuentra la del National Cholesterol Education Program que define la condición como aquella en la que se encuentran presentes tres de los siguientes criterios: obesidad central, hipertensión arterial, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e hiperinsulinemia (NCEP, 2001). Posteriormente se presentarán otras definiciones aceptadas y se realizará una descripción de los criterios que se consideran para su diagnóstico.

Las enfermedades cardiovasculares suponen un problema de salud pública de primer orden, son una importante causa no sólo de mortalidad, sino también de morbilidad, tanto en los países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo. El síndrome metabólico es un factor de riesgo independiente para la enfermedad cardiovascular. Su presencia aumenta no sólo la prevalencia, sino que también influye en su severidad y pronóstico, por lo general triplica el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular, aunque esto depende de los factores que estén presentes. También se asocia a un incremento global de la mortalidad por cualquier causa y multiplica en cinco veces el riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 (Fernandez Travieso, 2016).

3. ANTECEDENTES

3.1 Antecedentes Generales

3.1.1 Los cardiomiocitos

El miocardio es un tejido altamente organizado, compuesto por diferentes tipos celulares que incluyen células de músculo liso, fibroblastos y miocitos cardíacos. Los cardiomiocitos proveen la fuerza contráctil al corazón, por lo que la función de bomba de éste está principalmente determinada por las dos propiedades para las que el miocito se encuentra especialmente diseñado: producir fuerza y acortarse (Mattiuzzi & Vila Petrof, 2013).

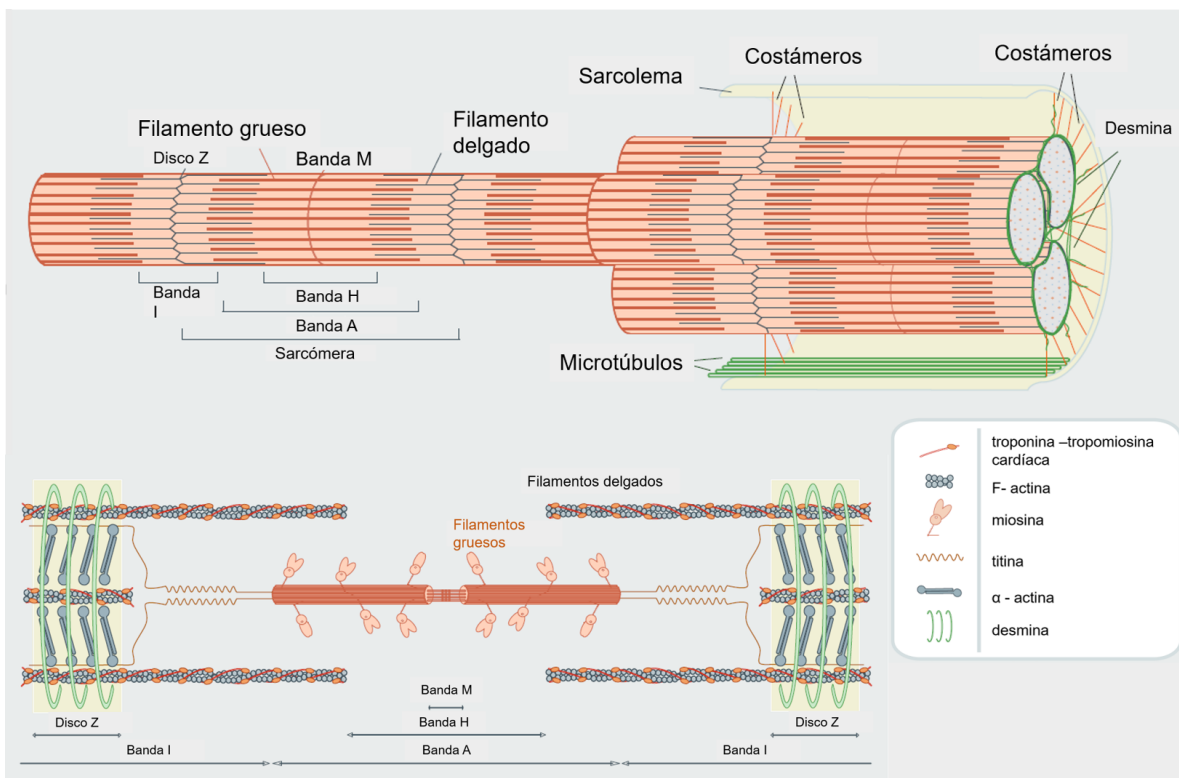


Figura 1. Esquema de la anatomía del músculo cardíaco. Imagen superior: Ilustración de un grupo de miofibrillas y la separación de cada sarcómera entre discos Z. Imagen inferior: Ilustración de una sarcómera individual. (Modificado de Sequeira y Van der Velden, 2013)

Los miocitos cardíacos representan un tipo de músculo estriado y sus elementos contráctiles esenciales están organizados en manojos de miofibrillas que contienen miofilamentos que, cuando son observados en el microscopio, se observan distintas y repetidas líneas y bandas cada una de las cuales representa diferentes componentes del miofilamento. El segmento entre dos líneas Z representa la unidad contráctil del miocito, la sarcómera, que presenta bandas oscuras y claras alternadas, llamadas Bandas A y Bandas I, respectivamente. En la banda I (isotrópico) se distinguen los filamentos delgados de actina, cada banda I es bisectada por una línea Z. La Banda A (anisotrópico) está formada principalmente por filamentos gruesos de miosina ubicados en el centro de la sarcómera, y porciones de filamentos delgados de actina, tiene 3 subdivisiones: La línea M (del alemán “Mittelscheibe”, disco central), que corresponde a la porción central de cada filamento grueso y es crítica para la organización de los filamentos gruesos en la sarcómera ya que en este punto cada filamento se conecta con el filamento adyacente. La banda H (del alemán “Heller”, brillante) corresponde a la porción de la banda A donde sólo se observan filamentos gruesos. Y la zona de sobreposición, en la que los filamentos delgados están situados entre los filamentos gruesos, cada filamento delgado está rodeado por tres filamentos gruesos y cada filamento grueso por seis filamentos delgados (Sequeira & van der Velden, 2015).

En el corazón humano, la longitud de la sarcómera bajo condiciones fisiológicas es de $1.6\mu\text{m}$ a $2.2\mu\text{m}$ (Klabunde, 2005). Los miocitos ventriculares de mamífero tienen entre 100 y $150\mu\text{m}$ de largo, 10 - $20\mu\text{m}$ de ancho y alrededor de $10\mu\text{m}$ de alto. Las estriaciones se observan normalmente a lo largo del eje de la célula cada $1.8 - 2.0 \mu\text{m}$. Los túbulos transversales (túbulos T) se encuentran aproximadamente cada $1.5\mu\text{m}$ a lo largo de la línea Z y penetran en la célula cardíaca como los radios de una rueda. Los discos intercalares se encuentran en los extremos de la célula y en otras de sus coyunturas, las invaginaciones de los túbulos T son contiguas con la membrana del sarcolema y contienen fluido extracelular (Guatimosim et al., 2002). A lo largo del lado intracelular de los túbulos T se encuentran las terminales del retículo sarcoplásmico (RS) con grupos (racimos o clusters) de RyRs (receptores de rianodina) abarcando el espacio entre $10 - 20$

nm entre los TT y la membrada del RS (Jayasinghe, Cannell, & Soeller, 2009). Cada hendidura puede contener un máximo de 385 RyRs, en promedio contienen entre 15 y 25 RyRs dependiendo de la forma en que se encuentran empacados, lado a lado o similar a un tablero de ajedrez (Scriven, Asghari, & Moore, 2013).

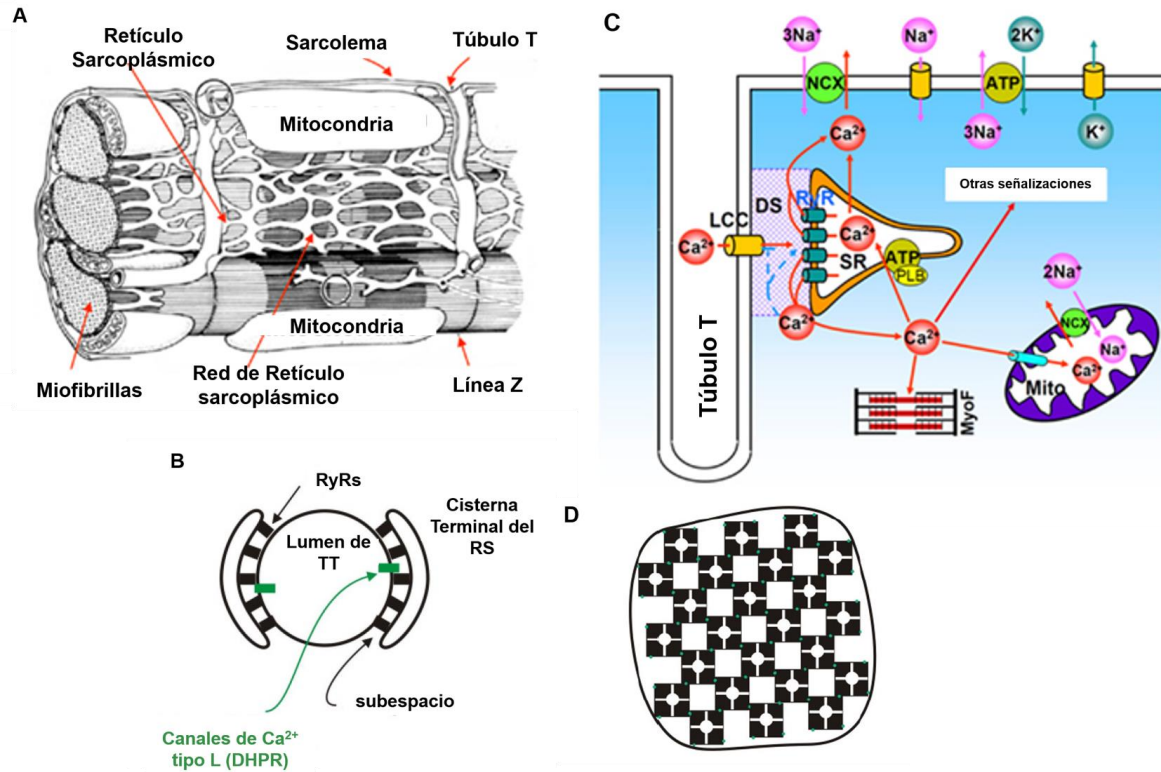


Figura 2. Organización de los elementos del acople excitación-contracción en cardiomiocitos de mamífero. A) Estructura intracelular detallada en un miocito cardíaco (Modificado de Katz, 2011) B) Ilustración del sistema de excitación-contracción cardíaca (Bers, 2002) C) Diagrama de la sección transversal de un túbulo T a nivel de la unión de RS y TT (Modificado de Guatimosim et al., 2002). D) Diagrama de un racimo de 24 RyRs desplegados de su contacto con los TT (Tomado de Guatimosin et al. 2002)

3.1.2 Síndrome metabólico: criterios de diagnóstico.

El síndrome metabólico es un desorden complejo con un alto costo socioeconómico, debido a su alta prevalencia, se le considera un problema de salud pública.

El síndrome metabólico se considera un estado fisiopatológico crónico y progresivo, factor de riesgo para desarrollar diabetes, enfermedades cardiovasculares y otros

desórdenes relacionados. Fue descrito por primera vez en 1988 por Reaven et al, quien lo describió como un conjunto de factores de riesgo múltiple (dislipidemia, hipertensión, hiperglicemia) para la enfermedad cardiovascular y lo nombró síndrome X, dado que consideró que la resistencia a la insulina es la base del síndrome, también se le ha llamado síndrome de resistencia a la insulina (Reaven, 1988). A partir de entonces se han publicado diversas definiciones, las más aceptadas corresponden al National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III (NCEP-ATP III), la International Diabetes Federation y la Organización Mundial de la Salud. En la Tabla 1 se presenta un comparativo entre los criterios que establecen dichas definiciones para el diagnóstico del síndrome metabólico y se incluyen además los criterios establecidos en la Norma oficial mexicana para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus, que son los que se utilizan en nuestro país.

Descripción de cada criterio.

Obesidad. Es un exceso de grasa en el cuerpo que puede ser perjudicial para la salud. La prevalencia de la obesidad está alcanzando niveles epidémicos. En 2016, la OMS estimó que el 39% de los adultos de 18 años o más, tenían sobrepeso y el 13% de la población adulta mundial eran obesos. Entre 1975 y 2016 la prevalencia mundial de la obesidad se triplicó (World Health Organization, 2018). La "obesidad epidémica" está originada principalmente por un incremento en el consumo de comida alta en calorías y una reducción en la actividad física (Kaur, 2014). Se mide con el IMC o con la CA (circunferencia abdominal). Un IMC $\geq 25\text{kg.m}^2$ y una CA $\geq 94\text{cm}$ en hombres y $\geq 80\text{cm}$ en mujeres se considera sobrepeso, mientras en un IMC $\geq 30\text{kg.m}^2$ y una CA $\geq 102\text{cm}$ en el caso de los hombres y $\geq 88\text{cm}$ en las mujeres se considera obesidad (NCEP, 2001; World Health Organization, 1999).

La obesidad aumenta sustancialmente no sólo el riesgo de diabetes y de padecimientos cardiovasculares sino también ciertos tipos de cáncer (Calle, Rodriguez, Walker-Thurmond, & Thun, 2003).

TABLA 1. CRITERIOS DE DIAGNÓSTICOS DE SÍNDROME METABÓLICO			
OMS	NCEP ATP III	IDF	NOM-015-SSA2-2010
Alto nivel de insulina + 2 de los siguientes: 1. Obesidad Abdominal IMC > 30 kg.m ² CA > 94cm 2. Triglicéridos > 150 mg/ dL Colesterol - HDL < 35 mg/dL (hombres) < 39 mg/dL (mujeres) 3. PA ≥ 140 / 90 mmHg 4. Microalbuminuria > 30 mg/g	3 de los siguientes: 1. CA > 102 cm (hombre) > 88 cm (mujer) 2. Triglicéridos ≥ 150 mg/dL 3. Colesterol - HDL < 40 mg/dL (hombres) < 50mg/dL (mujeres) 4. PA ≥ 130 / 85 mm Hg 5. Glucosa plasmática en ayuno ≥ 110 mg/dL	Obesidad central = CA Según etnia y género + 2 de los siguientes: 1. Triglicéridos ≥ 150 mg dL -1 Colesterol - HDL < 40 mg/dL (hombres) < 50 mg/dL (mujeres) 2. PA ≥ 130/85 mm Hg 3. Glucosa plasmática en ayuno: ≥ 5.6 mmol / L ó DMT2	3 de los 5 criterios siguientes: Presión arterial (mmHg) ≥ 130/85 Triglicéridos > 150 mg/ dl Colesterol HDL < 40 mg/ dl (hombres) < 50 mg/dl (mujeres) Circunferencia abdominal > 90 cm (hombres) > 80 cm (mujeres) Glucosa plasmática en ayuno > 100 mg / dl

Tabla 1. Criterios establecidos para el diagnóstico de Síndrome Metabólico de acuerdo con las asociaciones con mayor influencia.

OMS, Organización Mundial de la Salud; NCEP: ATP III, National Cholesterol Education Program - Third Adult Treatment Panel; IDF, International Diabetes Federation; NOM-015-SSA2-2010, Norma oficial mexicana para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus. CA, circunferencia abdominal; PA, presión arterial; IMC, índice de masa corporal; DMT2, diabetes mellitus tipo 2. (International Diabetes Federation, 2006; NCEP, 2001; Secretaría de salud, 2010; World Health Organization, 1999)

Dislipidemia. La mayoría de las personas con síndrome metabólico presentan dislipidemia aterogénica, cuyo componente principal es la elevación de las lipoproteínas ricas en triglicéridos (LRT) y la disminución de colesterol HDL. El aumento en los triglicéridos se debe a una sobreproducción hepática de VLDL grandes ricas en triglicéridos (VLDL1), lo cual se acompaña de un aumento en las LDL pequeñas y densas, escasas en colesterol y que en asociación con la resistencia a la insulina resultan altamente aterogénicas, además de una reducción de HDL (Kwiterovich, 2000; Sarmiento Ortega et al., 2017).

En el proceso de evolución de la aterosclerosis, las lipoproteínas ricas en triglicéridos contribuyen directa e indirectamente (Toth, 2016). Los quilomicrones y las VLDL1 no penetran la pared arterial debido a su tamaño, pero sus remanentes sí pueden hacerlo, estos remanentes son retenidos por la matriz extracelular y posteriormente captados por los macrófagos hasta convertirse en células espumosas, características del ateroma. La lipólisis de las LRT ocasiona una alta producción de productos lipolíticos a lo largo del endotelio vascular, como ácidos grasos oxidados y no oxidados, los cuales, junto con las LRT activan vías proinflamatorias, procoagulantes y proapoptóticas necesarias en la patogénesis de la aterosclerosis, causando un daño local e inflamación en las células del endotelio dando lugar a sitios de disfunción endotelial preferenciales para la penetración y acumulación de lipoproteínas y sus remanentes para la formación de la placa de ateroma (Wang et al., 2009). Por otro lado, las LDL pequeñas y densas sí pueden atravesar la pared endotelial donde se asocian a proteoglucanos originando LDL modificadas las cuales son captadas con mayor facilidad por los macrófagos de la pared arterial originando las células espumosas (Carvajal, 2014). El desarrollo y evolución de la placa aterosclerótica están estrechamente ligados a la presencia de numerosas moléculas liberadas por las células que participan en el proceso aterogénico, sobre todo factores proagregantes, protrombóticos, y proinflamatorio que contribuyen al crecimiento y complicación de la placa que hace que la arteria se vuelva más angosta y se endurezca (Rojas Mangas, R, Santi Cano, & Barba Chacón, 2005). En las regiones donde la cubierta fibrosa de la placa es delgada y

está enriquecida con macrófagos, la placa se vuelve inestable, es decir, tiene más probabilidades de desgarrarse y precipitar una trombosis. Cuando se produce la ruptura de la placa, el paciente con frecuencia sufre un evento cardiovascular agudo, por ejemplo, infarto de miocardio o accidente cerebrovascular. Otros factores de riesgo del síndrome metabólico aceleran este proceso (Grundy, 2016).

Resistencia a la insulina. La resistencia a la insulina (RI) se define como un estado en el que se requiere una mayor cantidad de insulina para obtener los efectos biológicos que en un estado normal se obtendrían con una menor cantidad de insulina (Park, Park, & Sweeney, 2015). La resistencia a la insulina contribuye de forma importante al desarrollo de otras condiciones, como dislipidemia, hipertensión y aterosclerosis (Gutiérrez Rodelo, Roura-guiberna, & Olivares-Reyes, 2017).

De manera general, la RI se manifiesta por una disminución en el transporte de glucosa inducido por la insulina en adipocitos y músculo esquelético, un aumento de la producción de glucosa hepática y alteraciones en el metabolismo de lípidos en tejido adiposo y hepático. A nivel molecular, la resistencia a la insulina es la consecuencia de las alteraciones en la señalización de esta hormona, debido a mutaciones o modificaciones postraduccionales de su receptor o de proteínas efectoras localizadas río abajo del mismo (Olivares-Reyes & Arellano Plancarte, 2008). Estas alteraciones se han dividido para su estudio en tres grupos: 1) Las relacionadas con la actividad del receptor (tirosincinasa y proteincinasa). 2) Las involucradas en la cascada de fosforilación y desfosforilación intracelular de la serina, conocidas como MAPcinasa. 3) Las responsables del efecto biológico final de la insulina, que involucra las moléculas transportadoras de glucosa (González Chávez et al., 1999)

Entre las alteraciones más comunes se encuentran la disminución en el número de receptores y de su actividad de cinasa; un aumento en el estado de fosforilación en residuos de Ser/Th de proteínas clave como el receptor y su sustrato; la disminución de la actividad de las cinasas PI3K y Akt, y defectos en la expresión y función del transportador GLUT4 (15) (Gutiérrez Rodelo et al., 2017).

La descripción inicial del SM consideraba a la resistencia a la insulina como el factor de riesgo central, llamándole incluso síndrome de resistencia a la insulina. Sin embargo, entre las definiciones más aceptadas sobre el SM, la resistencia a la insulina no es un factor utilizado comúnmente. La OMS pone énfasis en la resistencia a la insulina como el factor central del síndrome metabólico, la IDF confiere a la obesidad abdominal un papel fundamental, mientras que el NCEP ATP III otorga la misma importancia a todos los componentes no considerando necesaria la demostración directa de RI.

Hipertensión. La hipertensión es uno de los componentes más comunes en el SM y se presenta tanto hipertensión esencial como hipertensión asociada a la obesidad. La hipertensión esencial es un rasgo complejo, multifactorial y cuantitativo bajo control poligénico. El aumento de la resistencia periférica debido principalmente a cambios en la estructura y función vascular parece ser la anomalía hemodinámica fundamental en la hipertensión. Estos cambios incluyen engrosamiento de la pared arterial y, tono vascular anormal y se deben a alteraciones en los componentes celulares y no celulares de la pared arterial (Vykyoukal & Davies, 2012). Respecto a la hipertensión asociada a la obesidad, los mecanismos subyacentes no son del todo claros, hay varios mecanismos hipotéticos por los cuales la obesidad es capaz de causar hipertensión, tales como: alteraciones en el sistema renina angiotensina aldosterona (RAAS), en el sistema nervioso simpático, desregulaciones metabólicas (como hiperinsulinemia, desequilibrio de adipocinas y aumento de citocinas inflamatorias) (Kang, 2013).

3.1.3 Epidemiología del Síndrome metabólico en México y a nivel mundial.

La prevalencia mundial del SM va desde un 10% a un 84% dependiendo de la región, si es urbana o rural, la composición de la población estudiada (sexo, edad, etnia) y de la definición de síndrome que se utilice (Desroches & Lamarche, 2007; Kolovou, Anagnostopoulou, Salpea, & Mikhailidis, 2007). En general, la IDF estima

que un cuarto de la población mundial adulta tiene SM (International Diabetes Federation, 2006).

En los últimos años los resultados de diversas encuestas han permitido caracterizar la magnitud del problema del SM en México. Datos obtenidos en la Encuesta Nacional de Salud de Medio Camino 2016 (ENSANUT-MC 2016) dan una estimación sobre la prevalencia de los factores de riesgo que conforman el SM. Según la ENSANUT-MC 2016, en México la prevalencia actual de hipertensión arterial es de 25.5% en adultos. Con respecto a la obesidad, en adultos de 20 o más años de edad la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad es de 72.5%, siendo mayor en las mujeres que en los hombres. Con respecto a la localidad, la prevalencia de sobrepeso es más alta en las áreas rurales que urbanas, mientras que la prevalencia de obesidad es mayor en las áreas urbanas que en las rurales. Sobre la prevalencia de la dislipidemia, la ENSANUT MC-2016 reporta que el 28% de los adultos que se han realizado medición de lípidos en sangre han recibido un diagnóstico de hipercolesterolemia (Secretaría de Salud, 2016). Escobedo-de la Peña et al. realizaron un estudio para estimar la prevalencia de dislipidemias en adultos de la Ciudad de México encontrando que 29.6% presentaron valores de triglicéridos ≥ 200 mg/dl y un 2.6% rebasó los 500 mg/dL, la prevalencia de hipertrigliceridemia fue mayor en hombres (43%) que en mujeres (23%). Respecto de los niveles de colesterol HDL, 22.1% presentaron niveles por debajo de 40mg/dL (Escobedo-de la Peña, De Jesús-Pérez, Schargrotsky, & Champagne, 2014).

Existen diversos estudios que buscan determinar la prevalencia del síndrome metabólico en determinados sectores de la población mexicana. Salas y colaboradores determinaron una prevalencia del 68.7% de SM (según definición del IDF) entre la población adulta de zonas urbanas de México. Por otro lado, Echavarría et al. estudiaron la prevalencia entre adultos de una zona rural encontrando que 42.5% tenían SM según la definición del NCEP-ATP III (Echavarría-Pinto, Hernández-Lomelí, Alcocer-Gamba, Morales-Flores, & Vázquez-Mellado, 2006; Isordia-Salas & Santiago-Germán, 2006). Otras publicaciones se han enfocado en rangos de edad, Alemán et al. estimaron que la prevalencia de SM

en adultos mayores (≥ 60 años) es de entre 36% y 52% dependiendo del criterio aplicado. Mientras que Nájera et al. identificaron la prevalencia en niños con riesgo de sobrepeso de escuelas primarias, 22.6% de estos niños exhibieron SM (según criterios del NCEP-ATP III para adolescentes) y 24.8% mostraron al menos uno de los componentes (Alemán-Mateo, 2018; Nájera et al., 2015). Considerando la profesión, en Monterrey, se realizó un estudio entre los trabajadores de un hospital de segundo nivel, la prevalencia de SM fue de 38.1%, además la prevalencia de sobrepeso y obesidad alcanzó el 78%, concluyendo que los resultados son preocupantes (Mathiew-Quiros, Salinas-Martinez, Hernandez-Herrera, & Gallardo-Vela, 2014).

La magnitud y complejidad del problema de sobrepeso, obesidad y diabetes en México ha llevado a implementar la Estrategia Nacional para la Prevención y Control del Sobrepeso, la Obesidad y la Diabetes para promover la construcción de una política pública nacional que genere hábitos de consumo alimenticio saludables y la realización de actividad física en la población (Secretaría de salud, 2013).

3.2 Antecedentes específicos

3.2.1 Acople excitación-contracción

La contracción de cada miocito es consecuencia de un conjunto de fenómenos que comienzan con la despolarización de la membrana celular y culmina a nivel de los miofilamentos con la contracción. A este proceso se le conoce como acople excitación – contracción y el ion Ca^{2+} juega un papel fundamental en éste (Bers, 2008).

Conforme el potencial de acción se extiende sobre el corazón, la membrana de cada cardiomiocito se despolariza provocando la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L, lo que permite el flujo de calcio en el estrecho espacio entre el sarcolema y el retículo sarcoplásmico subyacente. Este flujo de calcio es elemental para inducir la apertura de los receptores de rianodina y la liberación del calcio almacenado en el retículo sarcoplásmico, proceso conocido como “liberación de calcio inducido por calcio”. La activación de un grupo de RyR2s

y la consecuente liberación de calcio del retículo produce una señal de calcio conocida como “chispa de calcio” (Cheng & Lederer, 2008). La magnitud de esta señal es variable y es un indicativo del número de RyRs que la generan, (Bers & Guo, 2005), la liberación de varios miles de chispas de calcio a través de los RyR2s, sincronizada por la Ica, se suma temporal y espacialmente, dando lugar a un aumento transitorio y global de calcio citosólico (Guatimosim et al., 2002). El aumento en la concentración de calcio activa la maquinaria contráctil. El calcio se une a la Troponina C, un componente de los filamentos contráctiles, lo que permite que la Troponina C se una con más fuerza a la Troponina I, alejándola de su sitio de unión a actina, permitiendo la interacción entre las cabezas de miosina y la actina formando puentes cruzados. La formación y eliminación cíclica de los puentes cruzados conduce a la contracción muscular (Bers, 2008). Al término de un potencial de acción los transitorios de calcio finalizan rápidamente y la célula regresa a sus niveles diastólicos en reposo preparándose para la siguiente despolarización. Los eventos de acople excitación-contracción son de corta duración, los cardiomiocitos alcanzan la concentración máxima de calcio en unas decenas de milisegundo después de iniciado el potencial de acción en el nodo sinoauricular. Después de que el calcio citosólico ha activado las unidades contráctiles se extruye rápidamente del citosol preparándose para el siguiente potencial de acción (Sato, Shannon, & Bers, 2016).

3.2.2 Síndrome metabólico y problemas cardíacos.

Diversos estudios realizados tanto en pacientes con síndrome metabólico como en modelos animales con esta condición muestran que hay alteraciones en la función cardíaca.

Un estudio comparó la prevalencia, la gravedad y el pronóstico de la enfermedad arterial coronaria (EAC) así como el riesgo de sufrir eventos cardiovasculares adversos mayores (ECAM) entre los pacientes con síndrome metabólico, en comparación con pacientes que sólo presentan un componente del

síndrome, siendo ambas significativamente mayores en pacientes con SM. Los pacientes con síndrome metabólico experimentaron una mayor tasa de ECAM y una prevalencia y gravedad significativamente mayor de EAC que aquellos pacientes que sólo presentaron un único factor del síndrome (Ahmadi et al., 2015).

En un estudio realizado por Lakka et al. se examinó la relación entre síndrome metabólico y enfermedad cardiovascular en varones de mediana edad, a los que se les dio seguimiento durante 11 años. Se utilizaron los criterios de la NCEP ATP III y de la OMS para el diagnóstico de SM, encontrando que incluso en ausencia de diabetes mellitus o enfermedad cardiovascular previa, la mortalidad coronaria fue 3 veces mayor en los pacientes con SM, el aumento en la mortalidad se detectó desde fases precoces previas al desarrollo de la diabetes (Lakka et al., 2002).

En modelos animales, se ha demostrado que el síndrome metabólico induce una reestructuración eléctrica y morfológica del nodo sinoauricular, provocando arritmias cardiacas y observando a la vez un aumento en la cantidad del tejido graso presente en esta zona (Albarado-Ibañez, Avelino-Cruz, Velasco, Torres-Jácome, & Hiriart, 2013).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El síndrome metabólico se entiende como un conjunto de factores de riesgo para el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 y enfermedades cardiovasculares. Ambas condiciones han mostrado un incremento preocupante en nuestro país, los fallecimientos por complicaciones asociadas a la diabetes y a enfermedades cardíacas las ubican entre las primeras causas de muerte en México.

La función del corazón como una bomba está principalmente determinada por la capacidad del cardiomiocito de producir fuerza contráctil y acortarse. La contracción del cardiomiocito es consecuencia del proceso de acople excitación-contracción en donde el ion calcio tiene un papel fundamental. Conocer los cambios que se observan en la concentración de calcio intracelular durante la contracción de los miocitos cardíacos provenientes de un modelo con síndrome metabólico, nos ayudará a entender los procesos fisiopatológicos cardíacos que derivan del síndrome metabólico.

Por lo que nos planteamos la siguiente pregunta de investigación: ¿Durante el desarrollo del síndrome metabólico se presentan alteraciones en la concentración de calcio intracelular durante el acople excitación-contracción en los miocitos cardíacos ventriculares?

HIPÓTESIS CIENTÍFICA

El síndrome metabólico altera los mecanismos de regulación del calcio intracelular durante el acople excitación-contracción en los miocitos ventriculares.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivos Generales

Determinar si durante el desarrollo del síndrome metabólico se altera el acople excitación-contracción en los miocitos cardíacos.

5.2 Objetivos Particulares

1. Evaluar si existen cambios en los mecanismos de regulación del calcio intracelular en los miocitos cardíacos provenientes del ventrículo derecho e

izquierdo después de 3 y 5 meses de iniciado el tratamiento para inducir el síndrome metabólico.

2. Medir y evaluar el tamaño y la contracción de los miocitos cardíacos provenientes de ambos ventrículos después de 3 y 5 meses de iniciado el tratamiento para inducir el síndrome metabólico.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Modelo Animal

Utilizamos como modelo animal de síndrome metabólico a la rata Wistar alimentada con una dieta hipercalórica. Este modelo ha sido desarrollado por Treviño et al. en la Facultad de Cs. Químicas de la BUAP, quienes diseñaron una dieta alta en calorías que reproduce las principales características del síndrome metabólico (Treviño et al., 2015).

La dieta hipercalórica (con patente: MX/E/2013/047377) está compuesta en un 74% por carbohidratos (de los cuales un 80% corresponde a glucosa y un 20% a fructuosa), 7.3% de contenido proteico (ovoalbúmina), 5.8% de grasa (incluyendo principalmente ácidos grasos saturados y monoinsaturados, además de poliinsaturados como el omega 3) (Treviño et al., 2015). Se ha demostrado que los carbohidratos están presentes en grandes proporciones dentro de la dieta alta en calorías que se consume actualmente en muchas regiones del mundo y que este tipo de dieta induce la aparición del fenotipo característico del síndrome metabólico.

Las alteraciones propias del SM son claras a los 90 días del consumo de la dieta hipercalórica en ratas Wistar. Se observa un incremento del peso corporal, así como un aumento del IMC y del porcentaje de grasa corporal localizada principalmente en el área abdominal. Además, pasado este tiempo se observa hiperglicemia, resistencia a la insulina, altos niveles de VLDL y LDL, así como una disminución significativa de los niveles de HDL con respecto a las ratas que siguen una dieta normocalórica. Todos estos factores en conjunto son característicos de la presencia de síndrome metabólico (Treviño et al., 2015).

Para este estudio se utilizaron 30 ratas macho de la cepa Wistar de 1 mes de edad, con un peso inicial entre 70 y 100g. Se formaron 4 grupos, 2 problemas y 2 controles, de la siguiente manera:

1er Grupo Tratado: Formado por 8 ratas que siguieron la dieta hipercalórica descrita anteriormente por 90 días.

2do Grupo Tratado: Formado por 8 ratas que siguieron la dieta hipercalórica descrita anteriormente durante 150 días

1er Grupo Control: Formado por 7 ratas que siguieron una dieta normocalórica LabDiet 5001 durante 90 días.

2do Grupo Control: Formado por 7 ratas que siguieron una dieta normocalórica LabDiet 5001 durante 150 días.

Todas las ratas fueron proporcionadas por el Bioterio Claude Bernard de la BUAP y se mantuvieron con un ciclo de 12:12 hrs de luz-oscuridad, con libre acceso al agua y al alimento, el cuidado y manejo de los animales se realizó acorde a la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-199. Al término del tiempo de dieta, los animales fueron sacrificados para la obtención del corazón y el aislamiento de los cardiomiocitos.

Para garantizar que los animales fueran utilizados de acuerdo a la edad programada, el grupo control y de síndrome metabólico iniciaron su tratamiento de manera escalonada, consiguiendo así que, los experimentos se realizaran cuando el animal cumpliera el tiempo establecido \pm 2 días. Ver tabla 2

6.2 Aislamiento de los cardiomiocitos.

Al término del tiempo de dieta se sacrificaron a los modelos animales para el aislamiento de los cardiomiocitos. El proceso inició con la anestesia del animal utilizando Sevofluorano (5%) para proceder a la administración de heparina por vía intraperitoneal (1000UI/kg). Se permitió que el animal se recuperara de la anestesia durante 8 min para asegurar la circulación de la heparina administrada, pasado este tiempo se volvió a anestésiar a los animales con Sevofluorano (5%); una vez comprobado que la rata careciera de reflejos palpebrales y patelares, se procedió a realizar una toracotomía anterior y a extraer el corazón.

Inmediatamente después de extraído el corazón se sumergió en una solución tirode a una temperatura de $14\pm 1^{\circ}\text{C}$ y se procedió a retirar los pulmones y el tejido adiposo que rodea al corazón, se realizó un corte transversal en la aorta ascendente para separarla del resto del vaso y poder suspender el corazón en un sistema Langendorff introduciendo una cánula en la aorta y sujetándolo a ésta. Con este sistema, se perfundió todo el corazón con diversas soluciones que se mantuvieron a una temperatura de $36.5\pm^{\circ}\text{C}$. En primer lugar, con una solución tirode durante 10 min; en seguida se hizo pasar una solución tirode libre de calcio durante 2-4 minutos. Después de dichas soluciones, se perfundió el corazón con 30mg de Colagenasa tipo II disueltos en 60ml de solución tirode sin calcio durante 6-7 min, posteriormente a esta solución de colagenasa se le agregaron 1.5 mg de proteasa continuando la perfusión por 2-3 min más. Finalmente, se perfundió el corazón con solución "Kraftbrühe" o KB durante 3-4 min para detener la acción de las enzimas y proceder con la disección del corazón para obtener solo los músculos papilares de cada ventrículo. Esta última parte la realizamos con el corazón sumergido en solución KB y se procuró que no durara más de 5 minutos. Una vez obtenidos los músculos papilares procedimos a realizar la disociación mecánica mediante la agitación constante del tejido en 3 ml de solución KB. El tiempo de agitación fue variable dependiendo de la presencia o no de células viables.

6.3 Registro de calcio intracelular

Una vez obtenidos los cardiomiocitos se procedió al registro de Calcio intracelular con el siguiente proceso. Se incubaron los cardiomiocitos con el fluoroforo Fluo 4AM a una concentración de 5 μ M durante 8 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se retiró el colorante y se lavaron las células durante 20 minutos.

La medición se llevó a cabo en un microscopio invertido de epifluorescencia acoplado al sistema de medición de calcio Delta RAM 514. Las células se colocaron en una cámara de registro donde eran bañadas de manera constante con solución externa normal a temperatura ambiente a una velocidad de 12 gotas/minuto. Para el registro se consideró solo a los cardiomiocitos estriados y con forma de bastón, capaces de contraerse en respuesta a la estimulación eléctrica de campo (pulso cuadrados de 80V DC de 10ms de duración liberados a una frecuencia de 1 Hz). Los protocolos de estimulación que se siguieron comprendieron las siguientes frecuencias y periodos de tiempo:

Frecuencia de estimulación	Periodo basal inicial (s)	Periodo de estimulación (s)	Periodo basal final (s)	Tiempo total de registro (s)
1hz	10	30	20	60
2hz	10	15	20	45
3hz	10	10	20	40
4hz	10	45	20	75
5hz	10	45	20	75

El sistema ilumina a las células con una luz de 485 nm de longitud de onda. La luz incide en las células y excita al colorante Fluo4AM; solo el colorante unido al calcio intracelular puede ser excitado y emite luz a una longitud de onda de 510 nm. La luz emitida se captura y transmite por un fotomultiplicador a una computadora personal. Con ayuda del programa de computadora Felix ND™, la señal es graficada on-line y exportada para su posterior análisis en el programa Clampfit 10.5. Ya que los cambios en la fluorescencia son proporcionales a la cantidad de

calcio intracelular, para conocer la concentración real de calcio se utilizó la siguiente formula:

$$[Ca^{2+}]_i = Kd * (F - F_{\text{mín}}) / (F_{\text{máx}} - F)$$

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.

6.4 Medición de tamaño de las células y porcentaje de contracción.

Para la medición de la contracción de los cardiomiocitos, se realizó el registro en un microscopio confocal Nikon C2+, tomando primero una imagen del cardiomiocito a registrar en condiciones basales, posteriormente se grabó un video del mismo cardiomiocito mientras se realizaba el protocolo de estimulación a cada una de las frecuencias, de la siguiente manera:

Frecuencia de estimulación	Periodo basal inicial (s)	Período de estimulación (s)	Período basal final (s)	Tiempo total de registro (s)
1hz	10	30	10	50
2hz	10	15	10	35
3hz	10	10	10	30
4hz	10	45	10	65
5hz	10	45	10	65

Entre el registro de cada una de las distintas frecuencias se permitió un periodo de recuperación para la célula de 60 segundos. A lo largo de todo el registro las células se mantuvieron con una perfusión a flujo constante de solución externa fisiológica a una velocidad de 12 gotas por minuto.

Las imágenes y videos obtenidos se analizaron utilizando el software Image J. Para cada imagen se hizo el ajuste correspondiente de la escala pixeles/ μm y se midió la longitud, el ancho y el área del cardiomiocito. Para los videos se realizó el ajuste de la escala a 6.25 pixeles/ μm y a una resolución de 18 cuadros/seg. y se realizó la medición del desplazamiento de un punto de la membrana en las últimas 5 contracciones generadas por la estimulación, esto con ayuda de la herramienta MTrackJ. Para obtener el porcentaje de contracción se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Contracción} = \frac{\text{Longitud del desplazamiento}}{\text{Longitud del cardiomiocito}} * 100$$

6.5 Soluciones

Tabla 3. Composición de las soluciones*							
Solución Tirode		Solución Tirode sin calcio		Solución KB (Kraftbrühe)		Solución Extracelular normal	
Reactivo	[mM]	Reactivo	[mM]	Reactivo	[mM]	Reactivo	[mM]
NaCl	140	NaCl	140	Glutamato de K	100	NaCl	136
KCl	5.4	KCl	5.4	Aspartato de K	10	KCl	4
MgCl ₂	1	MgCl ₂	1	KCl	25	MgCl ₂	1
Na ₂ HPO ₄	1	Na ₂ HPO ₄	1	KH ₂ PO ₄	10	HEPES	10
HEPES	10	HEPES	10	MgSO ₄	2	CaCl ₂	1.8
Glucosa	10	Glucosa	10	Taurine	20	Glucosa	11
CaCl ₂	1			Creatina	5		
				EGTA	0.5		
				Glucose	20		
				Hepes	5		

* Tomadas de Shibukawa, Chilton et al. 2005

6.6 Análisis de datos.

Una vez que los datos obtenidos se encontraban en términos de concentración, se realizó el análisis de los registros que consistió en la obtención de los parámetros que se detallan a continuación, a partir de los cuales se

observaron los cambios en la concentración de calcio a lo largo del registro, esto se realizó con el programa Clampfit 10.5.

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

Con excepción del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal, para el análisis del resto de los parámetros se tomaron en cuenta los últimos 5 transitorios evocados durante la estimulación; se ha observado que estos últimos transitorios presentan una morfología homogénea que indica que los mecanismos de regulación de calcio han alcanzado un estado estable.

Los datos obtenidos se expresan como la media aritmética \pm el error estándar asociado a la media (SEM). Para comparar los datos se realizaron pruebas T de Student para muestras no empataadas.

7. RESULTADOS

7.1 Modelo Animal

Como se mencionó en el apartado de material y métodos, el modelo animal que se utilizó es un modelo establecido por Treviño et. al. de la Facultad de Cs. Químicas siguiendo la misma metodología y dieta establecidos en el artículo A High Calorie Diet Causes Memory Loss, Metabolic Syndrome and Oxidative Stress Into Hippocampus and Temporal Cortex, por lo que no realizamos una caracterización del modelo animal, únicamente se corroboró que existieran diferencias similares en peso y perímetro abdominal a los encontrados por Treviño et. al, quienes obtuvieron un aumento de 19.4% en peso y de 5.97% en perímetro abdominal, ambos de las ratas alimentadas con dieta hipercalórica respecto de las alimentadas con dieta normocalórica (Treviño, 2015). En el caso de los animales utilizados para este trabajo, el grupo alimentado durante 90 días con dieta hipercalórica se registró un aumento de peso de 17.92% con respecto a las alimentadas con dieta normocalórica, y un perímetro abdominal 9.74% mayor. En el grupo alimentado con dieta hipercalórica durante 150 días, el peso aumentó 18.38% con respecto al grupo control, y en este caso, el aumento el perímetro abdominal fue de 12.34%.

Parámetro	3 meses				p
	Control		Tratado		
	Media	SEM	Media	SEM	
Perímetro abdominal	16.63 ± 0.38		18.25 ± 0.43		0.0297 *
Peso	306.8 ± 9.35		361.8 ± 12.66		0.0129 *
Grasa Epididimal	3.069 ± 0.53		4.707 ± 0.73		0.1209
Grasa Retroperitoneal	4.091 ± 0.89		3.252 ± 0.87		0.5252
Grasa Peripancreática	0.5509 ± 0.17		2.945 ± 2.06		0.2917
Suma de las grasas	7.711 ± 1.46		10.9 ± 2.26		0.2801

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Parámetro	5 meses				p
	Control		Tratado		
	Media	SEM	Media	SEM	
Perímetro abdominal	17.25 ± 0.32		19.38 ± 0.31		0.0037 **
Peso	338.3 ± 5.74		400.5 ± 9.88		0.0016 **
Grasa Epididimal	3.151 ± 0.36		6.152 ± 0.62		0.0057 **
Grasa Retroperitoneal	2.46 ± 0.90		5.771 ± 0.96		0.0460 *
Grasa Peripancreática	0.8143 ± 0.14		1.216 ± 0.30		0.2648
Suma de las grasas	6.425 ± 1.36		13.14 ± 1.85		0.0265 *

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

7.2 Cardiomiocitos

Los cardiomiocitos que se estudiaron provenían de los músculos papilares de cada ventrículo cardiaco, esto nos garantizaba una mayor homogeneidad en las respuestas ya que existen diferencias funcionales marcadas entre el endocardio, miocardio y epicardio. Los cardiomiocitos que usamos para los registros tenían forma de bastón o rectangular, una membrana refringente, bordes bien marcados y con estriaciones transversales a lo largo de la célula. Adicionalmente, todos los cardiomiocitos registrados se contraían al aplicar pulsos de voltaje mediante estimulación de campo, lo cual aseguraba la integridad funcional del sistema acople excitación-contracción.

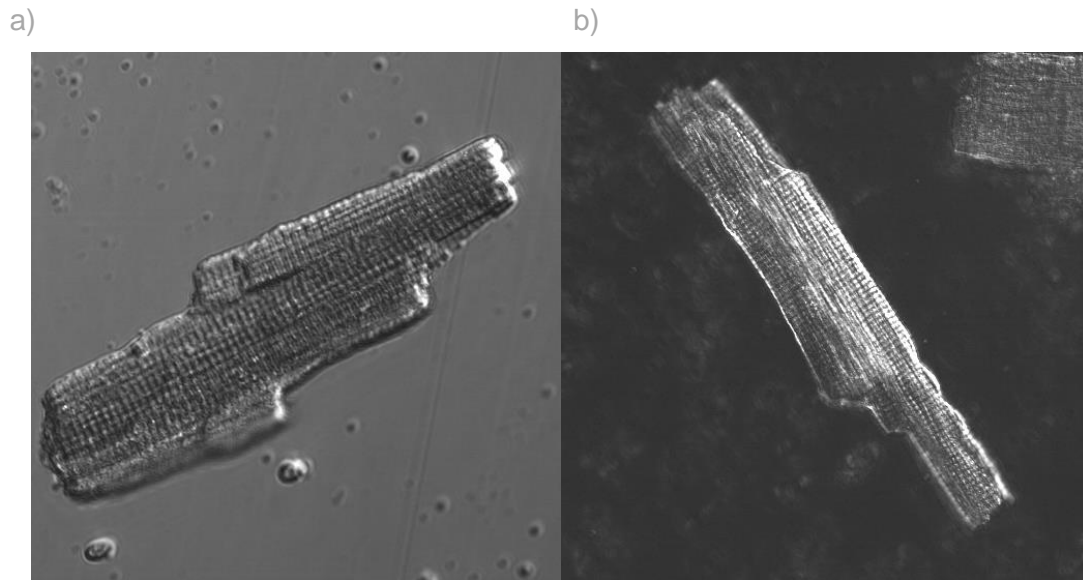


FIGURA 3. Cardiomiocitos de la condición tratada del modelo de 3 meses. a) Cardiomiocito de ventrículo izquierdo. b) Cardiomiocito de ventrículo derecho.

7.3 Transitorios de Calcio

Para estudiar los mecanismos de regulación de calcio intracelular, los cardiomiocitos fueron estimulados a frecuencias de 1 a 5 Hz. Esto nos permitió conocer de manera general las características de los transitorios en cada condición experimental y posteriormente, al hacer el análisis de cada transitorio, que mecanismos resultan alterados en el grupo problema. (Figura 4)

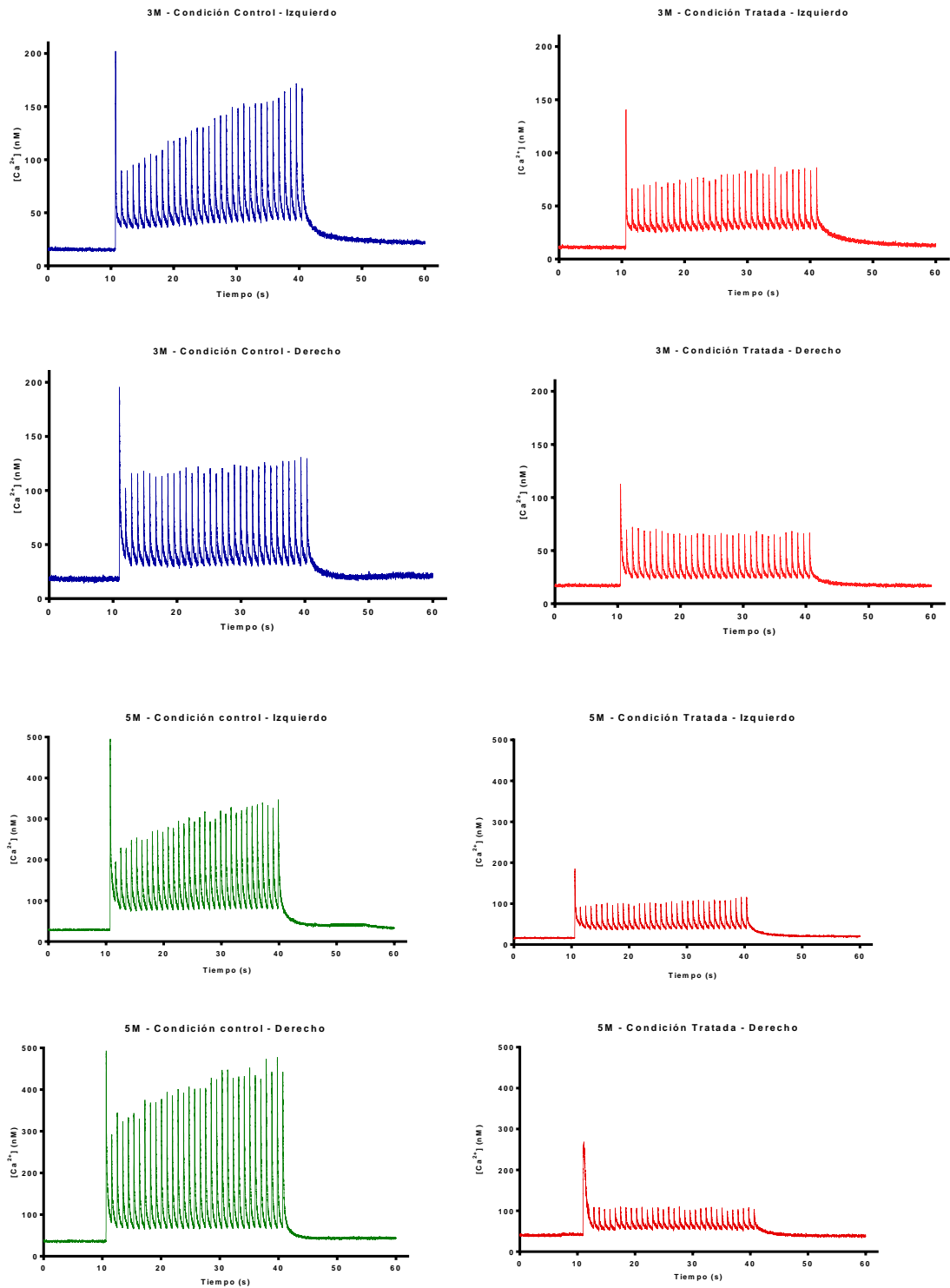


Figura 4. Transitorios de calcio durante la estimulación a 1hz en los modelos de 3 y 5 meses de tratamiento.

7.4 Análisis de los transitorios de Calcio durante el acople excitación-contracción

7.4.1 Niveles basales de calcio intracelular

Para evaluar los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ en condiciones basales, se registró la fluorescencia durante 10 segundos, en ausencia de estimulación de campo, cuidando que en este período no se presentaran liberaciones espontáneas de calcio ni cambios en la señal registrada. Durante este periodo se asume que los mecanismos de regulación de calcio se encuentran en reposo y la presencia de contracción o liberaciones espontáneas de calcio indicarían que se ha perdido la homeostasis del calcio.

En el modelo con 3 meses de dieta, los niveles basales de calcio oscilaron entre 25 y 40 nmoles/L, sin encontrar diferencias significativas entre el grupo tratado y el control, en ambos papilares. Los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ no cambiaron después de estimular las células a diferentes frecuencias. (Ver figura 5)

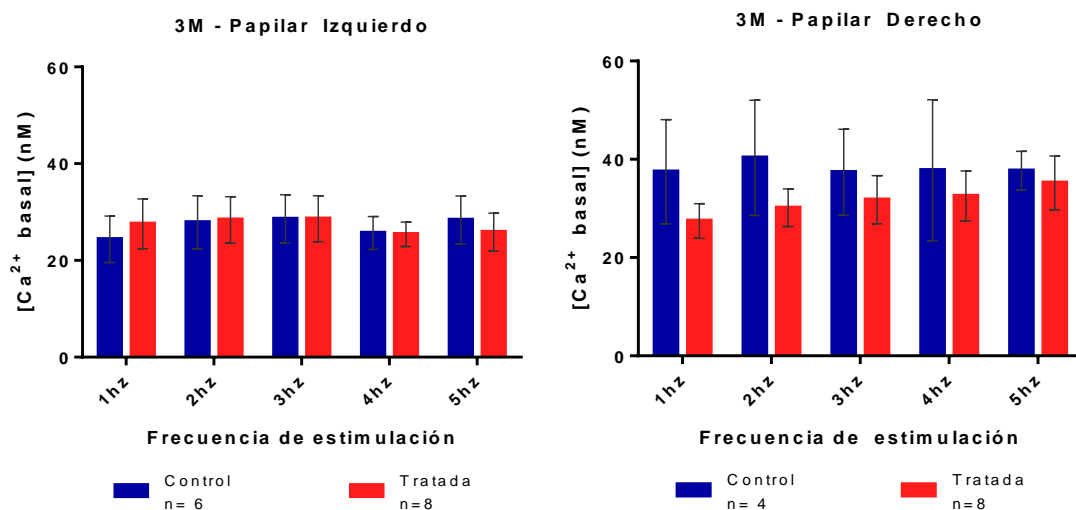


Figura 5. Niveles basales de calcio intracelular a los 3 meses de tratamiento.

En el modelo de 5 meses, se observa una tendencia a incrementar las concentraciones de calcio intracelular conforme aumenta la frecuencia de estimulación, en ambas condiciones, sin embargo, no fueron significativas. En el papilar derecho, los niveles basales de calcio en la condición control son similares

a los encontrados a los 3 meses de tratamiento, sin embargo, en el grupo tratado, los niveles de calcio se duplican, encontrando cambios significativos en las frecuencias 2hz, 3hz y 5hz. (Ver figura 6)

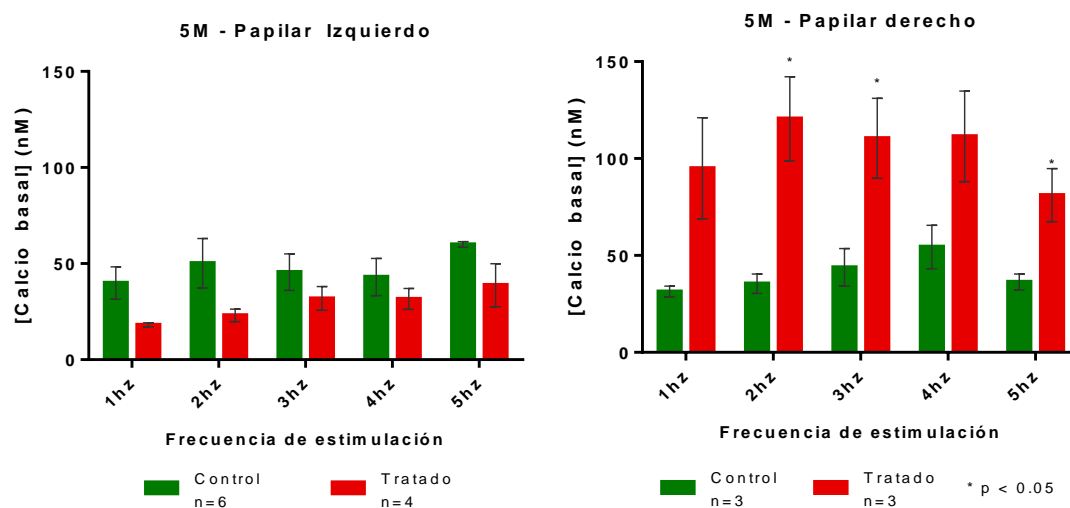


Figura 6. Niveles basales de calcio a los 5 meses de tratamiento.

7.4.2 Incremento de [Ca²⁺]_i en sístole

Llamamos [Ca²⁺]_i sistólico al incremento de [Ca²⁺] en el citosol previo a la contracción y que en ventrículo se atribuye a la entrada de Ca²⁺ a la célula desde el medio extracelular a través de los canales de calcio voltaje dependientes tipo-L (Cav 1.2) y a la liberación de calcio desde el RS a través de los RyR2, este incremento se observa en la fase de ascenso en la morfología del transitorio.

En el modelo de 3 meses, se observa un comportamiento diferente entre la condición control y la tratada. En el grupo control, la concentración sistólica máxima de calcio se mantuvo relativamente estable conforme aumentó la frecuencia de estimulación y, por el contrario, en la condición tratada, se observa que, al aumentar la frecuencia de estimulación, la concentración sistólica también aumenta de manera constante en ambos papilares. Adicionalmente, se observa que, en la condición de síndrome metabólico, los niveles sistólicos de calcio son menores que en la condición control a bajas frecuencias, igualándose ambas condiciones a la frecuencia de 5 Hz. (Ver figura 7)

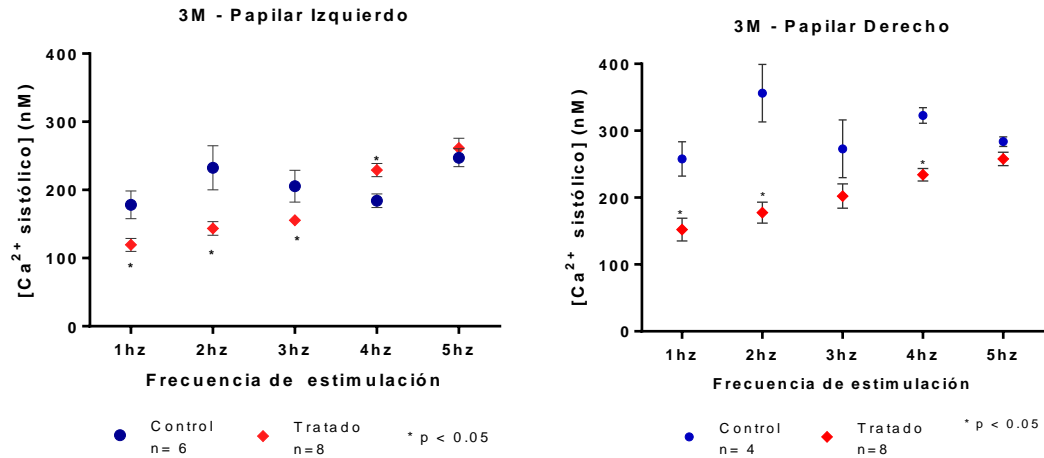


Figura 7. Concentración sistólica de calcio en el modelo animal de 3 meses.

A los 5 meses de tratamiento, también se observó en la condición tratada aumento en la concentración sistólica de calcio dependiente de las frecuencias y con respecto a los grupos controles, una menor amplitud de los transitorios de calcio. En el grupo control, hay una tendencia a aumentar la concentración de calcio sistólico conforma aumenta la frecuencia. Estos cambios se observaron en ambos papilares. Ver figura 8.

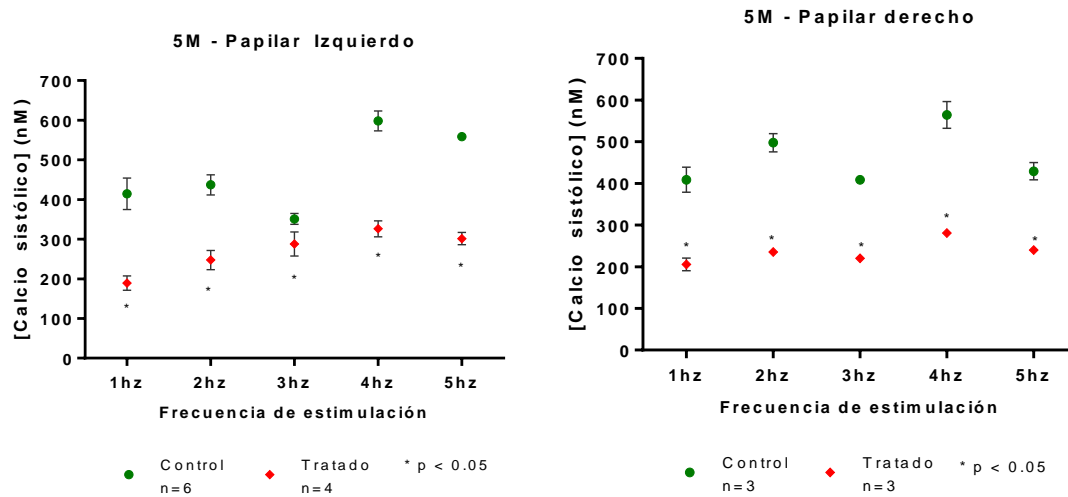


Figura 8. Concentración sistólica de calcio en el modelo animal a los 5 meses de tratamiento.

7.4.3 $[Ca^{2+}]_i$ durante la relajación

Durante la diástole, la relajación del músculo cardíaco implica la disminución de $[Ca^{2+}]_i$ en el citosol, lo cual se logra por la extrusión de calcio de la célula por medio del NCX y en menor medida por la $PMCa^{2+}$ -ATPasa y por la recaptura de Ca^{2+} hacia el RS por medio de la $SRCa^{2+}$ -ATPasa y, en mucho menor medida, por el bombeo de Ca^{2+} hacia la mitocondria por el uniportador de calcio. En la morfología del transitorio de Ca^{2+} , el calcio diastólico corresponde al nivel mínimo registrado entre cada transitorio de calcio.

En el modelo con 3 meses de tratamiento, los niveles diastólicos de calcio aumentaron en ambos papilares y en ambas condiciones de manera paralela al aumentar la frecuencia de estimulación, sin embargo, en la condición tratada, el nivel diastólico de calcio fue menor a frecuencias de 1 a 4 Hz (ver imagen 9), siendo estadísticamente significativo solo a 2 y 4 Hz en el papilar izquierdo y de 1 a 4 en el derecho.

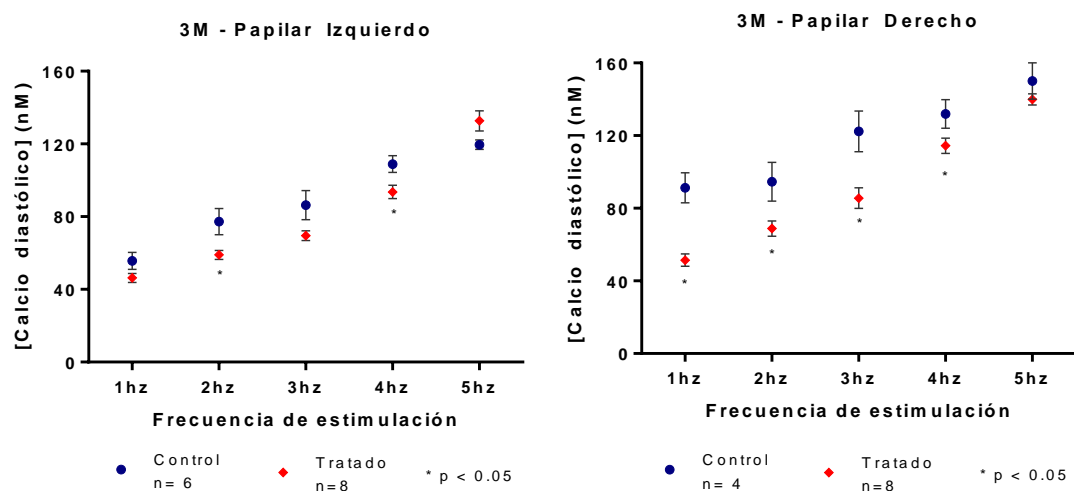


Figura 9. Niveles diastólicos de calcio a los 3 meses de tratamiento.

Para el modelo con 5 meses de dieta, en los papilares izquierdos la $[Ca^{2+}]_i$ diastólico es significativamente menor para todas las frecuencias en la condición tratada y se observa un efecto dependiente de la frecuencia de estimulación. En papilares

derechos, en la condición control hay un incremento en la concentración diastólica dependiente de la estimulación, pero en la condición tratada, este efecto desaparece y los valores diastólicos de calcio permanecen constante en todas las frecuencias de estimulación, provocando que a 1 y 2 Hz, los valores sean mayores que en la condición control y a 4 y 5 menores. Ver figura 10

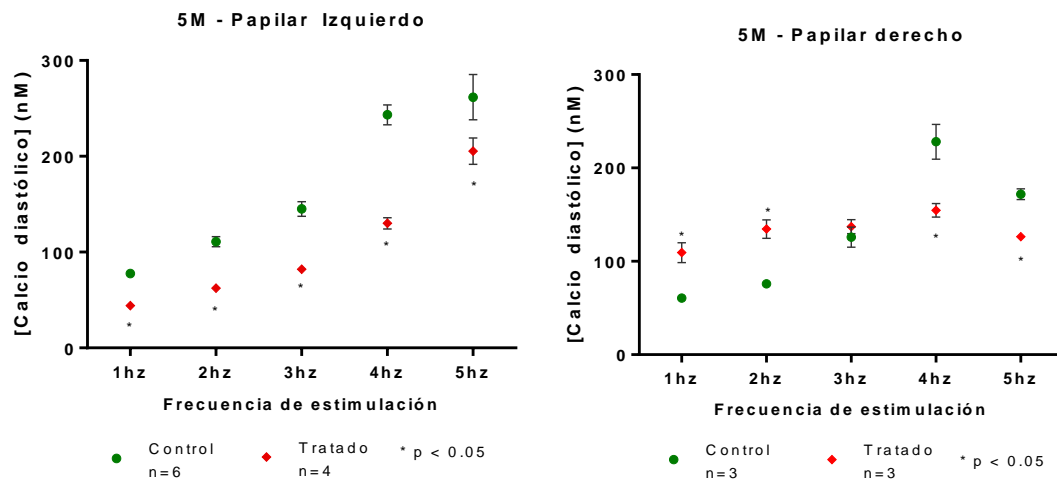


Figura 10. Niveles diastólicos de calcio a los 5 meses de tratamiento.

7.4.4 Velocidad de incremento y decaimiento de $[Ca^{2+}]$ en el citosol

El aumento y disminución del calcio intracelular que forma el transitorio de calcio se debe principalmente al proceso de liberación del calcio del retículo sarcoplasmático a través de los RyR2 y su recaptura por medio de la ATPasa de calcio del RS. Una manera de cuantificar estos dos fenómenos es calculando la velocidad de incremento y decaimiento de $[Ca^{2+}]$ en el citosol mediante la derivada máxima.

En el modelo con 3 meses de dieta, observamos que en el papilar izquierdo, la velocidad de incremento en ambos grupos oscila entre 5 y 10 nM/ms, con una disminución significativa en el grupo tratado cuando las células se estimularon a frecuencias de 1 a 3 Hz. Esta relación se invierte a frecuencias de 4 y 5 Hz. En los papilares derechos, la velocidad de liberación de calcio fue siempre menor en el

grupo tratado con respecto al control y además, no presentó cambios dependientes de la frecuencia de estimulación. Ver figura 11.

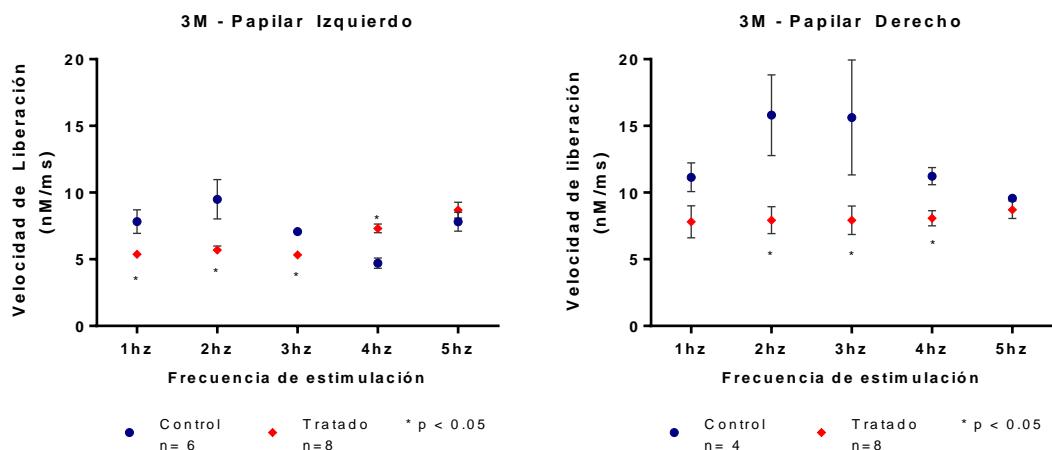


Figura 11. Velocidad de liberación del calcio del RS en los animales de 3 meses de tratamiento.

Para el modelo con 5 meses de dieta, la velocidad de incremento en papilares izquierdos es significativamente menor para 1, 4 y 5hz, esta diferencia no se observa a 2 y 3hz debido a los cambios en la velocidad del grupo control que va en descenso de 1 a 3hz, donde los valores llegan a ser semejantes entre ambos grupos, para después ir en ascenso de 3 a 5hz. En papilares derechos, la velocidad de incremento es significativamente menor en todas las frecuencias.

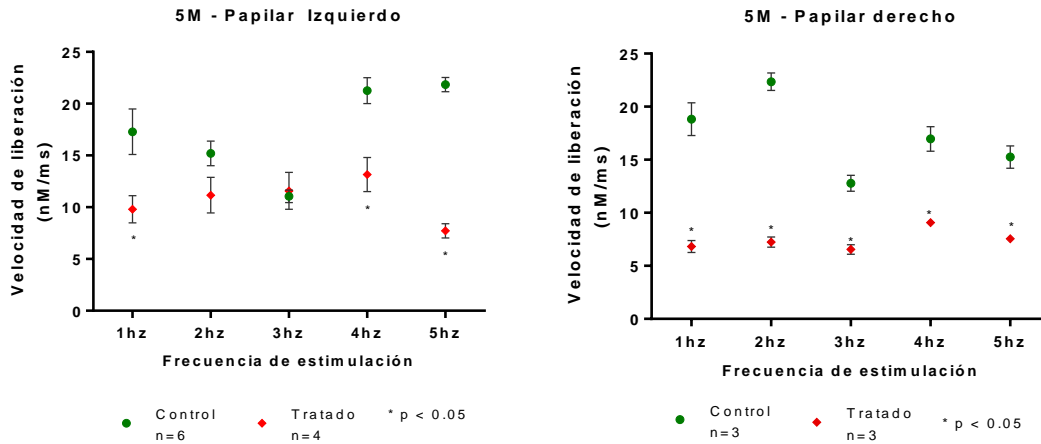


Figura 12. Velocidad de liberación del calcio del RS en los animales sometidos a 5 meses de tratamiento.

La velocidad de decaimiento se calculó con la derivada máxima de decaimiento de los transitorios. Ésta nos permite hacer inferencias sobre la capacidad de recaptura y extrusión de Ca^{2+} por la SERCA y el NCX, respectivamente.

En el caso de 3 meses, para ambos papilares en la condición control, las velocidades de decaimiento son mayores a frecuencias de 2 Hz que en el resto de las frecuencias de estimulación, mientras que, en la condición tratada, se observa un incremento en la velocidad directamente proporcional al incremento de la frecuencia de estimulación. Específicamente, en el papilar izquierdo, a frecuencias de 1 a 3 Hz, la velocidad es menor que en el grupo control, invirtiéndose esta relación a 4 y 5 Hz. En el papilar derecho, los valores fueron menores a frecuencias de 1 a 4 Hz. Ver figura 13.

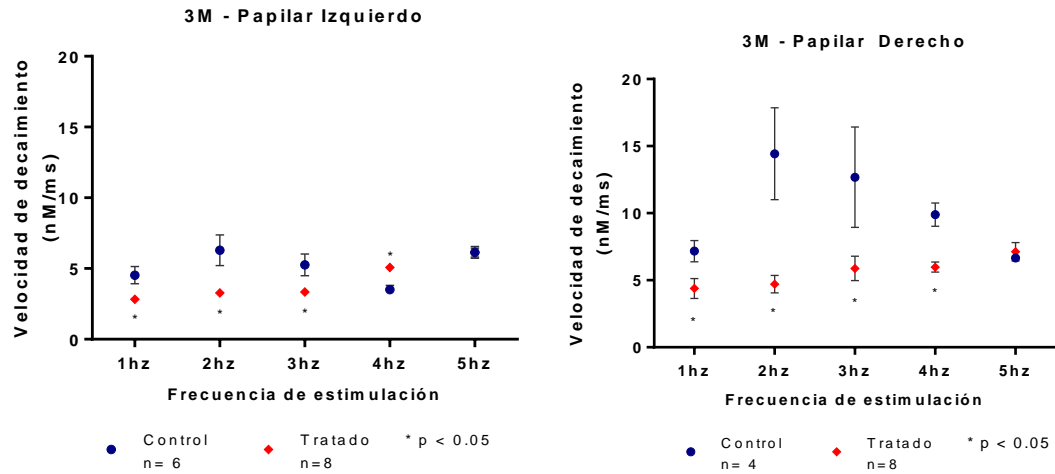


Figura 13. Velocidad de decaimiento del calcio en el modelo animal de 3 meses.

En el modelo con 5 meses de dieta, la velocidad de decaimiento es significativamente menor en la condición tratada respecto al control en todas las frecuencias excepto a 3hz en el papilar izquierdo, esto debido a las variaciones que presenta la velocidad de decaimiento en la condición control. Ver figura 14.

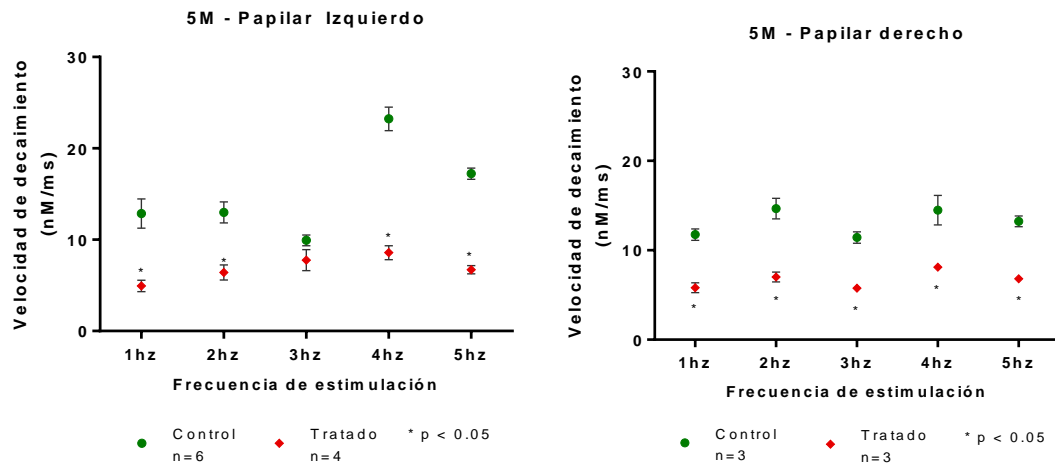


Figura 14. Velocidad de decaimiento del calcio intracelular en el modelo animal de 5 meses.

7.4.5 $[Ca^{2+}]_i$ total en el citosol durante la contracción.

Para obtener la cantidad total de calcio en el citosol durante el proceso de contracción, se integró el área de los transitorios de calcio. En el caso de los papilares izquierdos en el modelo de 3 meses de tratamiento, en el grupo control, se observa a frecuencias de 1 y 2 Hz los valores más altos, los cuales disminuyen a frecuencias de 3 a 5 Hz. Cuando comparamos los valores encontrados en la condición tratada, encontramos que la relación es inversa, con valores significativamente menores que el control a frecuencias de 1 a 3 Hz y mayores a 4 y 5 Hz. En el papilar derecho, el Ca^{2+} total en el grupo control es mayor que en el grupo tratado en todas las frecuencias; la diferencia es significativa entre 2 y 5 Hz. Ver figura 15.

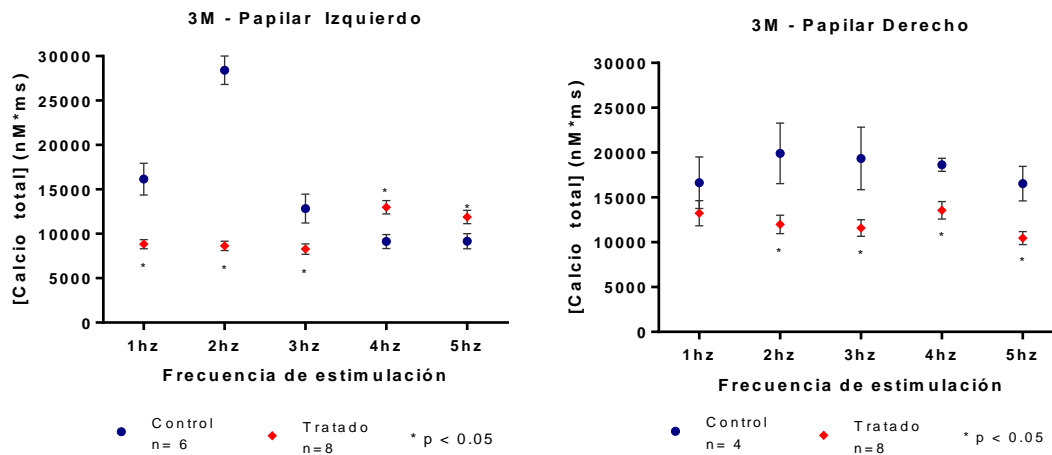


Figura 15. Calcio total durante el proceso de contracción en el modelo de 3 meses

Para el caso de 5 meses, la $[Ca^{2+}]_i$ total en papilares izquierdos es significativamente menor en todas las frecuencias y va mostrando una disminución constante de 1 a 5 Hz en el grupo control, esta disminución no se observa en la condición tratada, donde los valores a frecuencias bajas son similares, pero disminuyen a frecuencias altas. En los papilares derechos, el $[Ca^{2+}]_i$ total para la condición tratada es siempre menor que para el grupo control con diferencias significativas en todas las

frecuencias, además de que los valores se mantienen relativamente constantes entre todas las frecuencias. Ver figura 16.

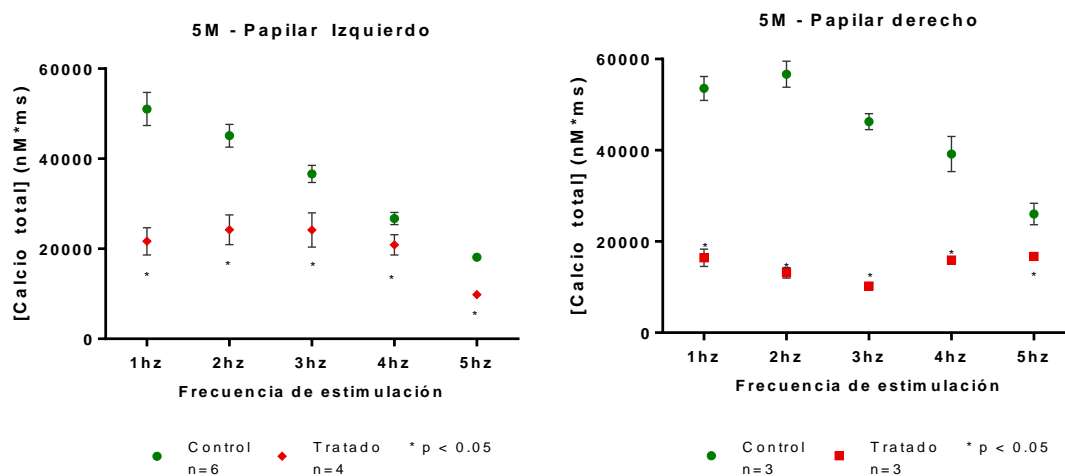


Figura 16. Calcio total durante el proceso de contracción en el modelo animal de 5 meses.

7.4.6 Calcio Promedio

Representa la media de la concentración de Ca^{2+} en el citosol durante todo el transitorio, es decir, un punto de equilibrio entre los procesos que hacen que incremente el calcio intracelular y aquellos que generan su disminución. En ambos tiempos de dieta, tanto en papilares izquierdos como derechos se observa incremento conforme aumenta la frecuencia de estimulación.

En papilares izquierdos a 3 meses de dieta, el grupo tratado es significativamente menor a frecuencias bajas, pero a 4hz y 5hz los valores se aproximan y la diferencia deja de ser significativa. Algo similar ocurre en papilares derechos, sólo que en este caso hay significancia de 1 a 4hz. Ver figura 17.

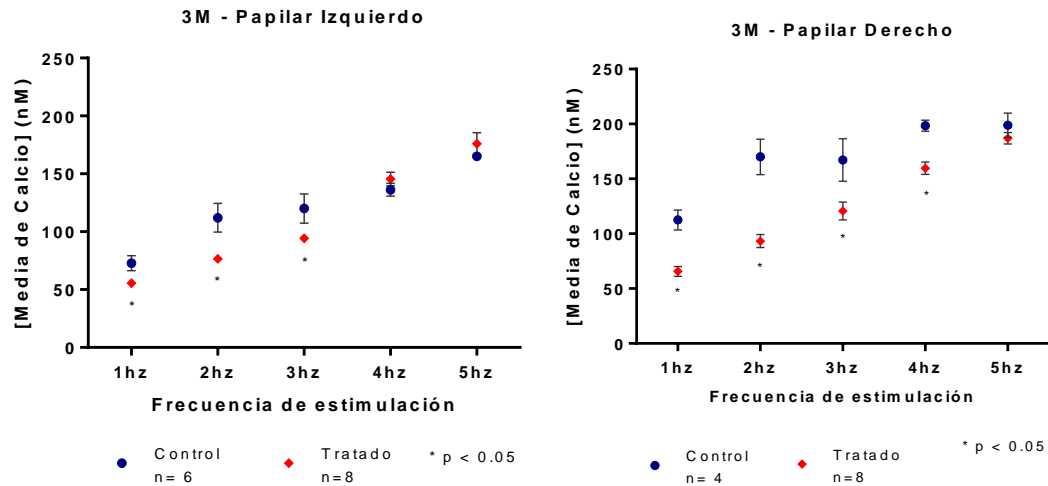


Figura 17. Cambios en la concentración media de calcio en los papilares cardiacos del modelo de SM a los 3 meses de tratamiento.

En el modelo de 5 meses de dieta, la $[Ca^{2+}]_i$ promedio en la condición tratada es significativamente menor en todas las frecuencias en papilares izquierdos, en papilares derechos sólo lo es para 3 a 5hz. Ver figura 17.

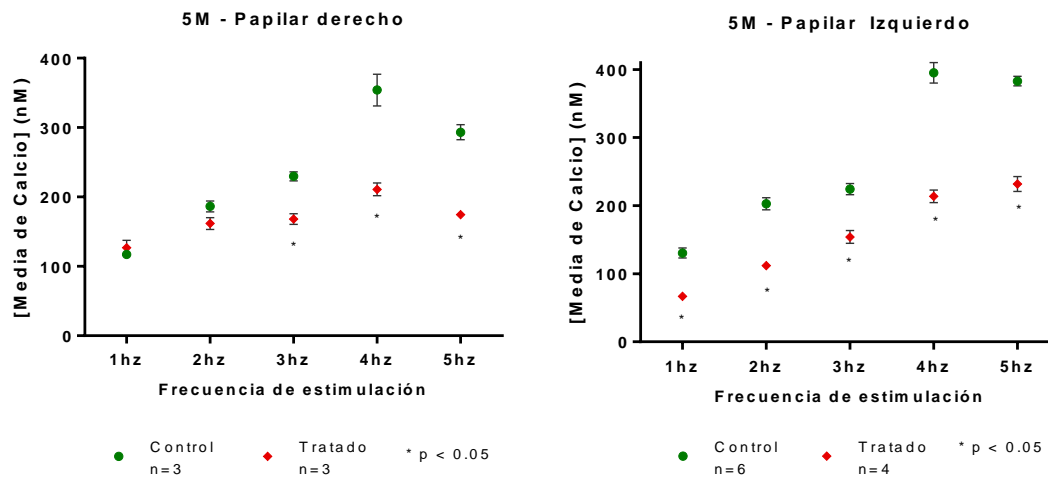


Figura 18. Cambio en los valores media de calcio intracelular durante el proceso de contracción en el modelo animal de 5 meses.

7.4.7 Tau de Decaimiento

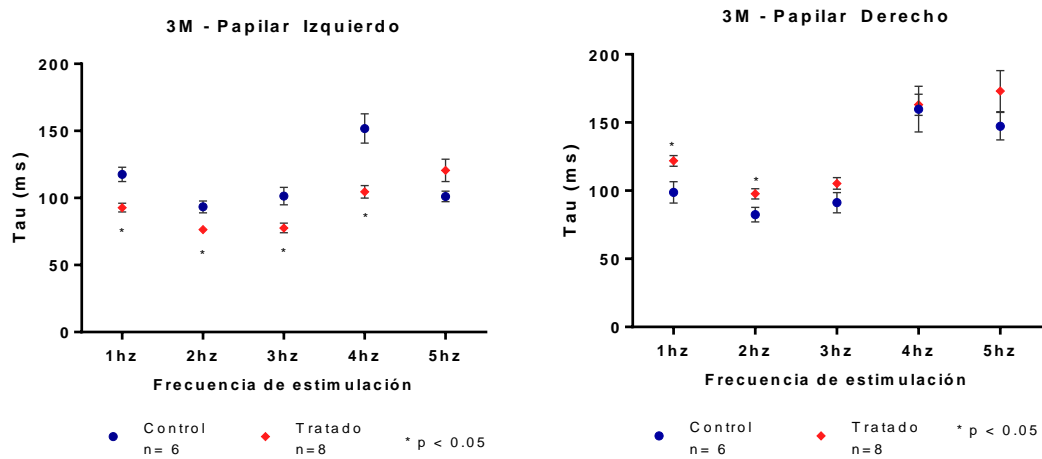


Figura 19. Cambio en los valores de tau de decaimiento durante el proceso de contracción en el modelo animal de 3 meses

En el modelo de 3 meses de tratamiento, en papilar izquierdo, la tau de decaimiento en la condición tratada es significativamente menor con respecto al control en las frecuencias de 1 a 4hz, y a frecuencia fisiológica, 5hz, los valores dejan de tener una diferencia significativa. En papilar derecho solo encontramos diferencias significativas en las frecuencias 1 y 2hz, donde la tau de decaimiento es mayor en la condición tratada con respecto al control. (Ver figura 19)

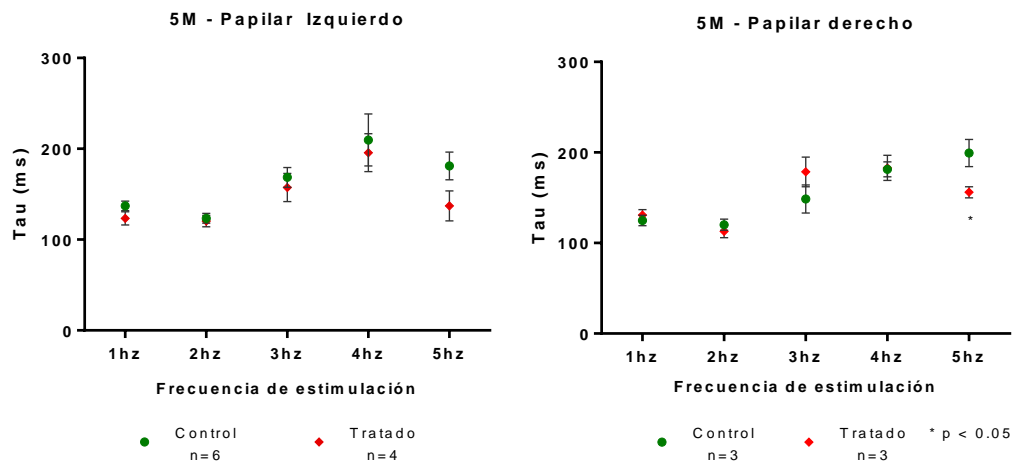
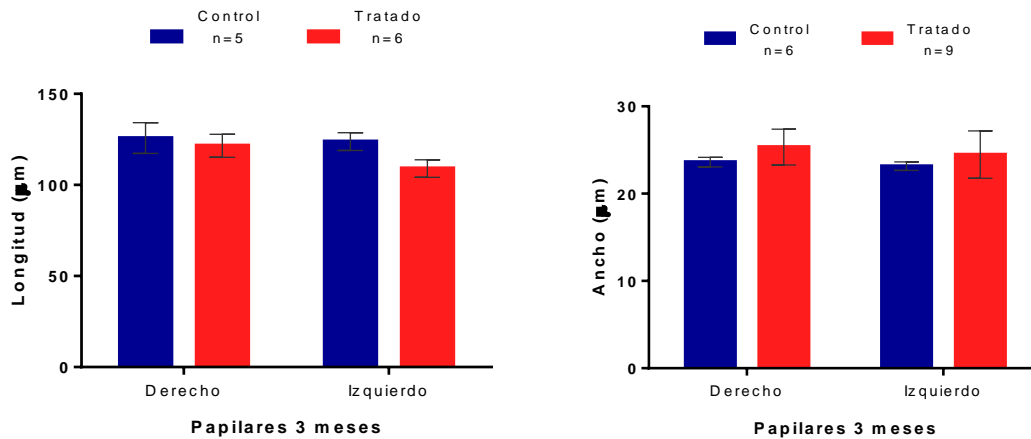


Figura 20. Cambio en la tau de decaimiento durante el proceso de contracción en el modelo animal de 5 meses

En el modelo de 5 meses de tratamiento, en papilar izquierdo no hay diferencias significativas en este parámetro entre ambas condiciones, mientras que, en papilar derecho, encontramos que sólo en 5hz la tau de decaimiento es significativamente menor en la condición tratada con respecto al control. (Figura 20)

7.5 Tamaño de las células

Considerando que el tamaño de las células guarda relación con la morfología de los cardiomiocitos, una variación en su tamaño podría generar un desarreglo estructural en la organización del couplón, lo que podría afectar el aprovechamiento de Ca^{2+} entrante y alterar el acople E-C. Para comprobar si existían cambios en el tamaño de las células entre ambas condiciones, medimos la longitud del eje mayor y menor del cardiomiocitos, así como el área. Estos tres parámetros no presentaron cambios significativos entre las condiciones tratada y control en ninguno de los dos ventrículos tanto en el modelo de 3 meses como en el modelo de 5 meses. (Ver figura 21 y 22.)



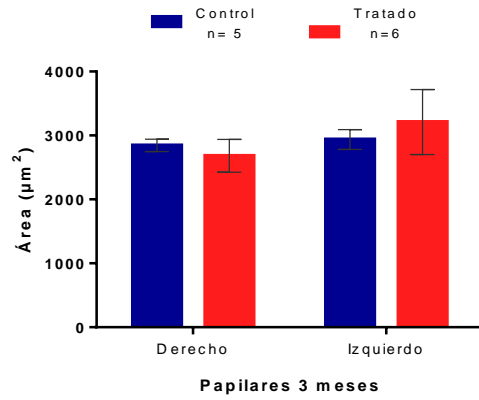


Figura 21. Tamaño de las células. Longitud, ancho y área de los cardiomiocitos provenientes del modelo de SM a los 3 meses de tratamiento.

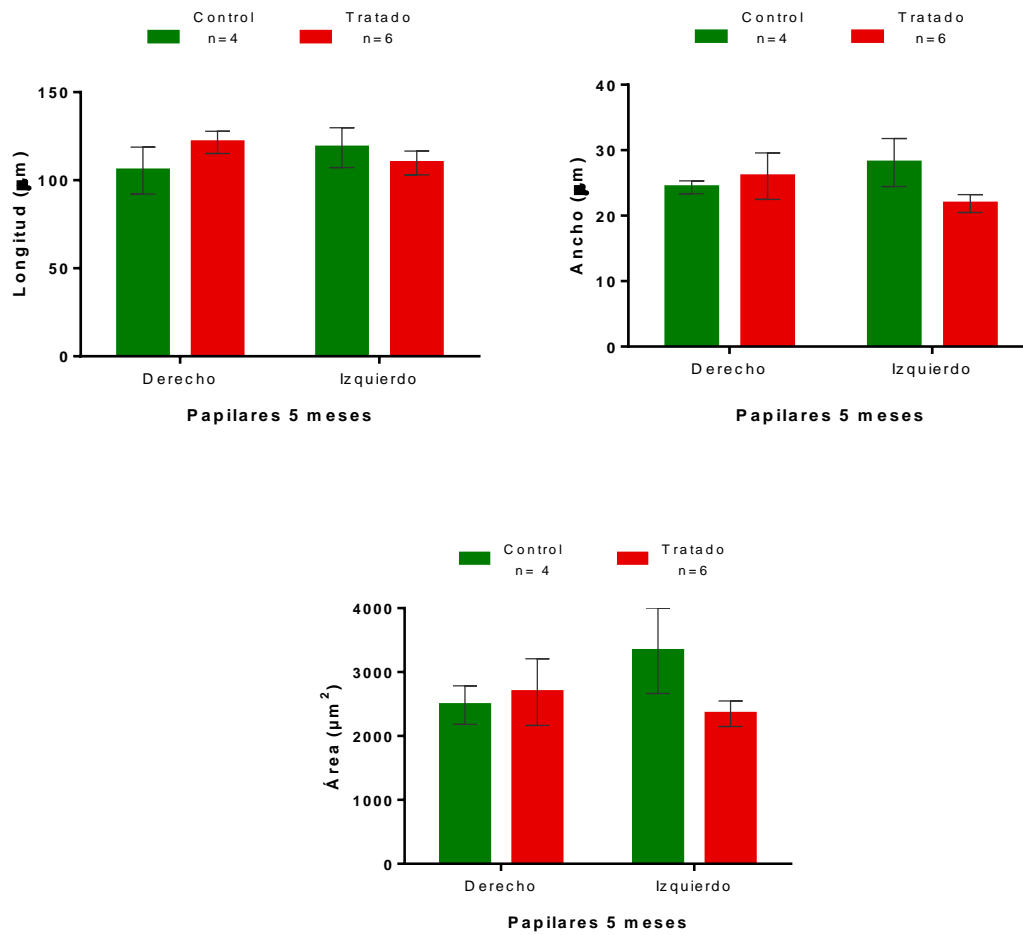


Figura 22. Tamaño de las células. Longitud, perímetro y área de los cardiomiocitos provenientes del modelo de SM a los 5 meses de tratamiento.

7.6 Porcentaje de Contracción

Para considerar la influencia del tamaño de la célula sobre la longitud del acortamiento, hemos comparado el porcentaje de contracción, que obtuvimos relacionando la longitud del acortamiento de la célula con respecto a la longitud total de ésta.

En el modelo de 3 meses, en ventrículo izquierdo el porcentaje de contracción resultó significativamente menor en la condición tratada respecto al control para las frecuencias 1 a 3hz, las frecuencias más altas no mostraron cambios significativos; en papilares derechos, no se encontraron diferencias significativas en este parámetro entre la condición tratada y la condición control. (Ver figura 23)

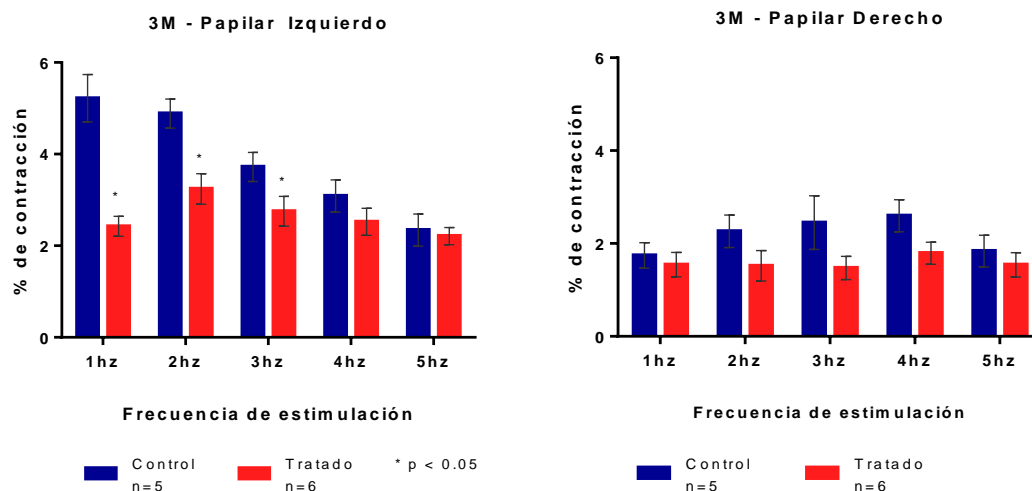


Figura 23. Cambios en el porcentaje de contracción en el modelo de SM a los 3 meses de tratamiento.

En el modelo de 5 meses, en ventrículo izquierdo obtuvimos un porcentaje de contracción significativamente menor en la condición tratada con respecto al control en todas las frecuencias de estimulación, mientras que en ventrículo derecho no encontramos diferencias entre ambas condiciones para ninguna de las frecuencias (Ver figura 24)

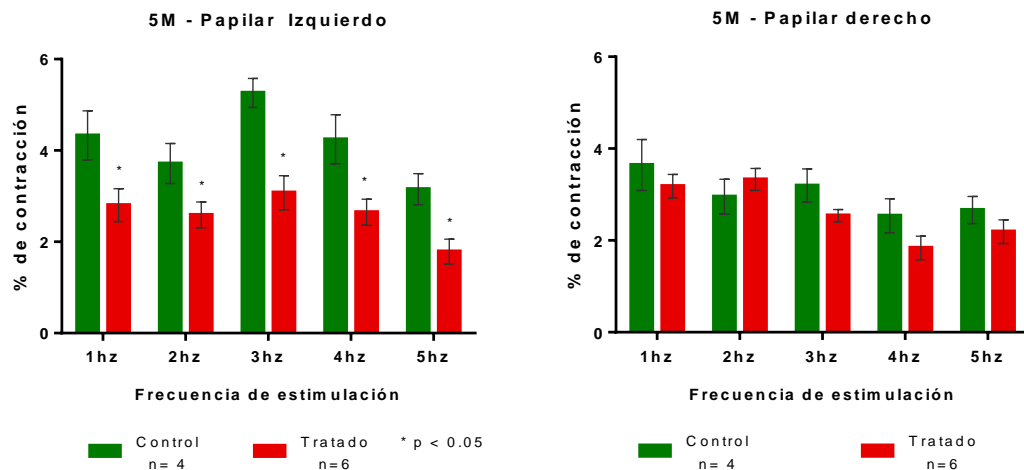


Figura 24. Cambios en el porcentaje de contracción en el modelo de SM a los 5 meses de tratamiento

7.7 Tabla de resumen de resultados

	Papilar Derecho				Papilar Izquierdo			
	3 meses		5 meses		3 meses		5 meses	
	Frecuencias bajas	Frecuencia fisiológica	Frecuencias Bajas	Frecuencia Fisiológica	Frecuencias Bajas	Frecuencia Fisiológica	Frecuencias Bajas	Frecuencia Fisiológica
Amplitud sistólica	↓	=	↓	↓	↓	=	↓	↓
Velocidad de incremento	↓	=	↓	↓	↓	=	↓	↓
Integral	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↓
Diástole	↓	=	↑	↓	↓	=	↓	↓
Tau de decaimiento	↑	=	=	↓	↓	=	=	=
Calcio medio	↓	=	↓	↓	↓	=	↓	↓
Tamaño de las células	=	=	=	=	=	=	=	=
Porcentaje de contracción	=	=	=	=	↓	=	↓	↓

↓ Disminución significativa en el parámetro en la condición tratada con respecto al control. p<0.05
 ↑ Aumento significativo en la condición tratada con respecto al control. P<0.05
 = No hay cambios significativos entre ambas condiciones
 Frecuencias bajas: Se considera de 1 a 3hz
 Frecuencias fisiológica: 5hz

8. DISCUSIÓN

El calcio juega un papel muy importante en el mantenimiento y regulación de la función cardíaca normal. Aunque sigue siendo objeto de extensa investigación, es evidente que la disfunción cardíaca está íntimamente asociada con anomalías en la utilización del calcio en la célula cardíaca (Luna Ortiz, Serrano Valdés, Fernández Rivera, & Rojas Pérez, 2003).

El análisis de los transitorios de calcio nos ha permitido distinguir cambios en los mecanismos de regulación de $[Ca^{2+}]_i$ en los cardiomiocitos provenientes de ratas Wistar que han consumido durante 3 y 5 meses una dieta hipercalórica y que, en consecuencia, han desarrollado síndrome metabólico.

Con respecto al $[Ca^{2+}]_i$ basal, asumimos que todos los mecanismos que regulan la concentración de calcio citosólico se encuentran en reposo dada la ausencia de estímulo para el acople. En este parámetro encontramos que los valores son semejantes en cada frecuencia de estimulación, es decir, una vez que se realizó un registro a determinada frecuencia, al iniciar el siguiente protocolo de estimulación la célula tiene una concentración basal de calcio muy similar a la registrada en un inicio, esto podría considerarse como un indicativo de que la célula está manteniendo sus características funcionales entre cada uno de los registros a diferentes frecuencias. En el modelo de 3 meses no se encontraron diferencias entre las condiciones control y tratada para este parámetro, se aprecia que hay una tendencia a encontrar una menor disponibilidad de $[Ca^{2+}]_i$ basal en los miocitos de ratas con síndrome metabólico. En el modelo de 5 meses se observa esta misma tendencia en los papilares izquierdos, pero no en los papilares derechos, donde el calcio basal es significativamente mayor en la condición tratada con respecto al control.

En la morfología del transitorio de calcio la fase de ascenso corresponde al incremento de calcio previo a la contracción, lo cual es consecuencia de la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular a través de los canales de calcio voltaje dependientes tipo L (Cav1.2) y la liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico (RS) a través de los receptores de rianodina (RyR2). Este último parámetro, la velocidad de liberación, está representado en la fase de ascenso del transitorio de calcio y depende de factores como la cantidad de RyR2 presentes y

la probabilidad de apertura de éstos, además de la organización del couplón (Rueda, Alba-aguayo, & Valdivia, 2014). Tanto en el modelo de 3 meses como en el de 5 meses, encontramos que la amplitud del transitorio y la velocidad de liberación se encuentran significativamente disminuidos a frecuencias bajas en la condición tratada respecto al control. A frecuencia fisiológica (5hz) observamos que a 3 meses los valores son iguales entre la condición tratada y el control, tanto para el ventrículo izquierdo como para el derecho. Sin embargo, en el modelo de 5 meses el incremento del Ca^{2+} durante la sístole a frecuencia fisiológica sigue siendo significativamente menor, ya que se reduce en más del 50% con respecto a las ratas control, es decir, en aquellas ratas que han pasado un mayor tiempo consumiendo la dieta hipercalórica, la afectación que observamos inicialmente a frecuencias bajas permanece a frecuencia fisiológica en ambos ventrículos. A este nivel, podemos considerar que existe una afectación en alguno de los factores implicados en la liberación de Ca^{2+} que podrían ser: una disminución en la actividad de los canales de calcio tipo L, una reducción en el número de RyRs presentes o en su sensibilidad al $[Ca^{2+}]_i$, o bien, un menor almacenamiento de Ca^{2+} dentro del RS. Con los experimentos realizados hasta ahora no podemos otorgar mayor probabilidad de afectación a un factor u otro y es necesario realizar otros protocolos como medir la actividad de los canales Cav1.2 con técnicas electrofisiológicas, o la medición de los transitorios de calcio aplicando pulsos de cafeína para observar la aportación de Ca^{2+} del RS.

Después de la sístole, para la relajación del músculo cardíaco se requiere que la $[Ca^{2+}]_i$ disminuya en el citosol, los mecanismos que realizan este proceso son: la recaptura de calcio hacia el RS por medio de la SERCA (90-95%); la extrusión de calcio al medio extracelular por el NCX (intercambiador sodio-calcio) y en menor medida por la PMCa²⁺ - ATPasa (5 – 8% en conjunto); y en una mínima magnitud por el uniportador de Ca^{2+} a la mitocondria (1% aproximadamente) (Bers, 2008). En el transitorio, la $[Ca^{2+}]_i$ durante la diástole corresponde al nivel mínimo entre cada transitorio. En el modelo de 3 meses de tratamiento encontramos que el $[Ca^{2+}]_i$ durante la diástole es significativamente menor a frecuencias bajas en la condición tratada con respecto al control en ambos ventrículos y, además, hay un

efecto de incremento conforme aumenta la frecuencia de estimulación. Nuevamente encontramos que a frecuencia fisiológica la diferencia entre la condición tratada y la control se pierde, esto ocurre tanto en ventrículo derecho como izquierdo. En el modelo de 5 meses, en ventrículo izquierdo el $[Ca^{2+}]_i$ en diástole es significativamente menor en la condición tratada con respecto a la control tanto a frecuencias bajas como a frecuencia fisiológica, y también se observa el efecto de incremento conforme aumenta la frecuencia de estimulación; en el ventrículo derecho no se observa este efecto, pero los valores de $[Ca^{2+}]_i$ a frecuencia fisiológica son significativamente menores, tanto en ventrículo izquierdo como en derecho, a diferencia de lo que observábamos a 3 meses en esta misma frecuencia, la $[Ca^{2+}]_i$ en diástole es aproximadamente 25% menor en las ratas con síndrome metabólico con respecto a las ratas control. Esta disminución no precisamente puede corresponderse a una mayor recaptura de Ca^{2+} hacia el RS o a una mayor extrusión hacia el medio extracelular, sino también al hecho de que, como mencionamos anteriormente, el incremento de Ca^{2+} en la sístole también ha sido menor en la condición tratada y, por lo tanto, la cantidad de calcio a remover también sería menor.

El Ca^{2+} global que se encuentra disponible para la contracción se obtuvo calculando la integral del transitorio. En este parámetro encontramos que en el modelo de 3 meses en ventrículo izquierdo a frecuencias bajas es significativamente menor en la condición tratada con respecto al control, pero a frecuencia fisiológica se vuelve significativamente mayor, mientras que en el papilar derecho permanece siendo significativamente menor en todas las frecuencias. Dado que estamos hablando de calcio disponible en el citosol para su unión con la troponina C y propiciar el deslizamiento de los filamentos delgados sobre los gruesos produciendo el acortamiento de la sarcómera, podemos relacionar este parámetro con los resultados obtenidos en el porcentaje de contracción, donde a los 3 meses encontramos que a frecuencias bajas en papilar derecho no hay una diferencia en el porcentaje de acortamiento entre la condición control y tratada, a pesar de que sí hay una menor disponibilidad de Ca^{2+} global en la condición tratada; con respecto a los papilares izquierdos, encontramos que a frecuencias bajas el porcentaje de

contracción es significativamente menor en la condición tratada en concordancia con la menor disponibilidad de Ca^{2+} total; como mencionábamos, en este lado del ventrículo, a frecuencia fisiológica los valores de Ca^{2+} total se vuelven significativamente mayores respecto al control, sin embargo, a esta misma frecuencia no se observan diferencias en el porcentaje de contracción entre ambas condiciones, lo que podría estar relacionado con una menor afinidad al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles o con el tiempo que el Ca^{2+} permanece en el citosol. Pasando ahora al modelo de 5 meses, el Ca^{2+} total es significativamente menor en los cardiomiocitos de ratas con síndrome metabólico no sólo a frecuencias bajas sino también a frecuencia fisiológica, y esto ocurre en ambos ventrículos. Analizando entonces el porcentaje de contracción en este modelo, encontramos que, en papilar derecho, a pesar de la diferencia encontrada en el Ca^{2+} total, tenemos el mismo porcentaje de contracción en ambas condiciones en todas las frecuencias. Mientras que en papilar izquierdo, donde también encontramos que el Ca^{2+} total es significativamente menor en todas las frecuencias, esto sí parece reflejarse en el porcentaje de contracción, que también resultó ser significativamente menor en todas las frecuencias. Esta diferencia entre papilar derecho e izquierdo en el modelo de 5 meses podría estar relacionado con la distinta función que cada ventrículo realiza, puesto que el ventrículo derecho no requiere desarrollar la misma fuerza contráctil que el izquierdo, podría estarse adaptando mejor a los cambios que ocurren en la regulación de la concentración de calcio, se requeriría conocer entonces, además del porcentaje de contracción, si en esta condición hay cambios en la fuerza de contracción en ambos ventrículos.

Con respecto al calcio medio, que representa un punto de equilibrio entre los diferentes procesos que producen al incremento de calcio y aquellos encargados de su remoción, los resultados coinciden con los parámetros que ya hemos descrito. En el modelo de 3 meses, en ambos ventrículos el Ca^{2+} medio es significativamente menor a frecuencias bajas en la condición tratada, mientras que a frecuencia fisiológica la diferencia entre control y tratado se pierde. En el modelo de 5 meses, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ promedio es significativamente menor a frecuencias bajas y esta diferencia permanece y se acentúa a frecuencia fisiológica en ambos ventrículos.

Comparando los resultados obtenidos en ambos modelos, podemos comentar que hay diferencias en el modelo de 5 meses con respecto al modelo de 3 meses. En ambos ventrículos del modelo de 3 meses de tratamiento encontramos una disminución significativa en casi todos los parámetros a frecuencias bajas en la condición tratada con respecto al control, pero de manera funcional estos cambios no se reflejaron en la capacidad contráctil del cardiomiocito, y al realizar la estimulación a frecuencia fisiológica dejamos de observar los cambios encontrados a frecuencias bajas. Esto no ocurre así en el modelo de 5 meses de tratamiento, las diferencias encontradas en el transitorio de calcio a frecuencias bajas siguen siendo significativas a frecuencia fisiológica y además en ventrículo izquierdo hay un reflejo de estos cambios en la regulación de calcio sobre la función contráctil de la célula, ya que el porcentaje de contracción resulta ser significativamente menor en la condición tratada con respecto a la control, una afectación que, como mencionamos anteriormente, no ocurrió en los primeros 3 meses de tratamiento. Esto podría ser un indicativo del efecto que tiene el tiempo de dieta en el modelo, si bien a los 3 meses las ratas ya padecen síndrome metabólico, los cambios en los mecanismos de regulación de calcio podrían apenas estarse iniciando, pero se estarían viendo acentuados después de pasar 2 meses más de un consumo alimenticio altamente calórico.

9. CONCLUSIONES.

1. El síndrome metabólico, consecuencia del consumo continuado de una dieta hipercalórica en ratas Wistar, induce cambios en la regulación del calcio intracelular en los miocitos cardíacos.
2. Las alteraciones en la regulación del calcio intracelular de los cardiomiocitos son graduales, evidenciándose cambios primero a los tres meses de tratamiento solo a bajas frecuencias de estimulación, mismos que se hacen evidentes a frecuencias fisiológicas después de 5 meses de tratamiento. Esto supondría que, a los 5 meses de tratamiento, los mecanismos compensatorios de regulación de calcio no serían suficientes y, por lo tanto, se verían alteraciones en los transitorios de calcio evocados a frecuencias fisiológicas además de alteraciones en la función contráctil.

10. ANEXOS

Tabla de resultados de los transitorios de calcio en el modelo de 3 meses

3M - PAPILAR IZQUIERDO					
1hz	Control 3 meses n=6		Tratado 3 meses n=8		p
	Media	E.E	Media	E.E	
[Calcio basal] (nM)	24.37 ± 4.78		27.56 ± 5.15		0.6685
[Calcio sistólico] (nM)	178.10 ± 20.29		119.40 ± 4.47		0.0020 **
[Calcio diastólico] (nM)	55.64 ± 4.65		46.28 ± 2.25		0.0514
[Media de Calcio] (nM)	72.86 ± 6.46		55.50 ± 2.24		0.0060 **
[Calcio total] (nM * ms)	16157 ± 1784		8830 ± 520		0.0213 *
Velocidad de liberación (nM/ms)	7.83 ± 0.88		5.38 ± 0.28		0.0042 **
Velocidad de decaimiento (nM/ms)	4.53 ± 0.61		2.82 ± 0.12		0.0025 **
Tau de decaimiento (ms)	117.60 ± 5.30		92.80 ± 3.23		<0.0001 ***
* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$					

3M - PAPILAR IZQUIERDO					
2Hz	Control 3 meses n=6		Tratado 3 meses n=8		p
	Media	E.E	Media	E.E	
[Calcio basal] (nM)	27.88 ± 5.49		28.41 ± 4.79		0.9426
[Calcio sistólico] (nM)	232.48 ± 32.25		143.50 ± 5.09		0.0020 **
[Calcio diastólico] (nM)	77.31 ± 7.20		58.94 ± 2.47		0.0090 **
[Media de Calcio] (nM)	112.06 ± 12.32		76.57 ± 2.43		0.0020 **
[Calcio total] (nM * ms)	28416 ± 1638		8628 ± 526		<0.0001 ***
Velocidad de liberación (nM/ms)	9.50 ± 1.48		5.70 ± 0.29		0.0055 **
Velocidad de decaimiento (nM/ms)	6.29 ± 1.08		3.27 ± 0.12		0.0020 **
Tau de decaimiento (ms)	9335.00 ± 4.44		76.37 ± 2.48		0.0007 ***
* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$					

3M - PAPILAR IZQUIERDO					
3Hz	Control 3 meses n=6		Tratado 3 meses n=8		p
	Media	E.E	Media	E.E	
[Calcio basal] (nM)	28.58 ± 5.02		28.64 ± 4.74		0.9933
[Calcio sistólico] (nM)	205.50 ± 23.46		155.60 ± 5.61		0.0300 *
[Calcio diastólico] (nM)	86.33 ± 8.02		69.55 ± 2.64		0.1219
[Media de Calcio] (nM)	120.00 ± 12.70		94.32 ± 2.79		0.0281 *
[Calcio total] (nM * ms)	12845 ± 1628		8278 ± 588		0.0047 **
Velocidad de liberación (nM/ms)	7.07 ± 0.09		5.33 ± 0.27		0.0374 *
Velocidad de decaimiento (nM/ms)	5.26 ± 0.76		3.35 ± 0.13		0.0057 **
Tau de decaimiento (ms)	101.40 ± 6.45		77.66 ± 3.54		0.0010 **
* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$					

3M - PAPILAR IZQUIERDO					
4Hz	Control 3 meses n=6		Tratado 3 meses n=8		p
	Media	E.E	Media	E.E	
[Calcio basal] (nM)	25.67 ± 3.38		25.41 ± 2.54		0.9500
[Calcio sistólico] (nM)	184.10 ± 10.10		229.20 ± 9.71		0.0020 **
[Calcio diastólico] (nM)	108.90 ± 4.58		93.59 ± 3.67		0.0098 **
[Media de Calcio] (nM)	136.20 ± 5.52		145.50 ± 5.79		0.2649
[Calcio total] (nM * ms)	9126 ± 789		12984 ± 745		0.0014 **
Velocidad de liberación (nM/ms)	4.71 ± 0.38		7.32 ± 0.33		<0.001 ***
Velocidad de decaimiento (nM/ms)	3.51 ± 0.29		5.07 ± 0.23		<0.001 ***
Tau de decaimiento (ms)	151.80 ± 10.96		104.60 ± 4.65		<0.0001 ***

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

3M - PAPILAR IZQUIERDO					
5Hz	Control 3 meses n=6		Tratado 3 meses n=8		p
	Media	E.E	Media	E.E	
[Calcio basal] (nM)	28.37 ± 4.97		25.85 ± 3.90		0.6970
[Calcio sistólico] (nM)	247.30 ± 13.11		261.60 ± 14.39		0.4932
[Calcio diastólico] (nM)	119.60 ± 2.54		132.70 ± 5.52		0.0731
[Media de Calcio] (nM)	165.00 ± 3.46		175.90 ± 9.59		0.3834
[Calcio total] (nM * ms)	9166 ± 846		11876 ± 750		0.0213 *
Velocidad de liberación (nM/ms)	7.81 ± 0.71		8.69 ± 0.59		0.3484
Velocidad de decaimiento (nM/ms)	6.14 ± 0.42		6.13 ± 0.32		0.9338
Tau de decaimiento (ms)	101.10 ± 3.92		120.60 ± 8.39		0.0767

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

3M - PAPILAR DERECHO					
1Hz	Control 3 meses n=4		Tratado 3 meses n=8		p
	Media	E.E	Media	E.E	
[Calcio basal] (nM)	37.47 ± 10.58		27.46 ± 3.53		0.2793
[Calcio sistólico] (nM)	257.80 ± 25.65		152.17 ± 17.02		0.0009 ***
[Calcio diastólico] (nM)	91.31 ± 8.25		51.46 ± 3.35		<0.001 ***
[Media de Calcio] (nM)	112.50 ± 9.03		65.66 ± 4.49		<0.001 ***
[Calcio total] (nM * ms)	16637 ± 2871		13239 ± 1392		0.2332
Velocidad de liberación (nM/ms)	11.15 ± 1.07		7.81 ± 1.20		0.0804
Velocidad de decaimiento (nM/ms)	7.17 ± 0.79		4.39 ± 0.74		0.0239 *
Tau de decaimiento (ms)	98.74 ± 7.78		121.90 ± 3.93		0.0080 ***

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

3M - PAPILAR DERECHO

2Hz	Control 3 meses n=4		Tratado 3 meses n=8		p
	Media	E.E	Media	E.E	
[Calcio basal] (nM)	40.31 ± 11.72		30.15 ± 3.81		0.3150
[Calcio sistólico] (nM)	356.10 ± 42.90		177.50 ± 15.59		<0.001 ***
[Calcio diastólico] (nM)	94.62 ± 10.65		68.80 ± 4.24		<0.001 ***
[Media de Calcio] (nM)	170.00 ± 16.23		93.30 ± 5.98		<0.001 ***
[Calcio total] (nM * ms)	19904 ± 4377		11996 ± 1024		0.0234 *
Velocidad de liberación (nM/ms)	15.80 ± 3.03		7.93 ± 1.01		0.0032 **
Velocidad de decaimiento (nM/ms)	14.43 ± 3.43		4.70 ± 0.65		0.0004 ***
Tau de decaimiento (ms)	82.42 ± 5.28		97.67 ± 3.78		0.0229 *

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

3M - PAPILAR DERECHO

3Hz	Control 3 meses n=4		Tratado 3 meses n=8		p
	Media	E.E	Media	E.E	
[Calcio basal] (nM)	37.37 ± 8.77		31.79 ± 4.90		0.5585
[Calcio sistólico] (nM)	272.90 ± 43.10		202.30 ± 18.29		0.8680
[Calcio diastólico] (nM)	122.30 ± 11.17		85.60 ± 5.63		0.0019 **
[Media de Calcio] (nM)	167.20 ± 19.40		120.70 ± 8.14		0.0132 *
[Calcio total] (nM * ms)	19341 ± 4491		11589 ± 922		0.0352 *
Velocidad de liberación (nM/ms)	15.63 ± 4.31		7.93 ± 1.07		0.0336 *
Velocidad de decaimiento (nM/ms)	12.68 ± 3.75		5.88 ± 0.91		0.0306 *
Tau de decaimiento (ms)	91.19 ± 7.37		105.30 ± 4.29		0.0811

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

3M - PAPILAR DERECHO

4Hz	Control 3 meses n=4		Tratado 3 meses n=8		p
	Media	E.E	Media	E.E	
[Calcio basal] (nM)	37.78 ± 14.34		32.52 ± 5.10		0.6661
[Calcio sistólico] (nM)	322.90 ± 11.72		234.10 ± 9.36		0.0010 ***
[Calcio diastólico] (nM)	131.90 ± 7.83		114.40 ± 4.19		0.0360 *
[Media de Calcio] (nM)	198.40 ± 4.97		159.70 ± 5.62		<0.001 ***
[Calcio total] (nM * ms)	18632 ± 328		13565 ± 969		0.0014 **
Velocidad de liberación (nM/ms)	11.23 ± 0.64		8.08 ± 0.57		0.0017 **
Velocidad de decaimiento (nM/ms)	9.90 ± 0.87		5.98 ± 0.37		<0.001 ***
Tau de decaimiento (ms)	159.80 ± 16.79		163.00 ± 7.75		0.8447

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

3M - PAPILAR DERECHO						
5Hz	Control 3 meses n=4		Tratado 3 meses n=8		p	
	Media	E.E	Media	E.E		
[Calcio basal] (nM)	37.68 ± 3.96		35.21 ± 5.48		0.4006	
[Calcio sistólico] (nM)	283.70 ± 7.19		257.80 ± 9.97		0.0920	
[Calcio diastólico] (nM)	150.70 ± 10.30		139.90 ± 3.06		0.2199	
[Media de Calcio] (nM)	198.90 ± 11.09		187.00 ± 5.23		0.2757	
[Calcio total] (nM * ms)	16539 ± 1927		10471 ± 724		0.0006	***
Velocidad de liberación (nM/ms)	9.57 ± 0.27		8.72 ± 0.66		0.3765	
Velocidad de decaimiento (nM/ms)	-6.66 ± 0.23		-7.13 ± 0.69		0.6416	
Tau de decaimiento (ms)	147.30 ± 10.11		173.00 ± 15.09		0.2551	

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Tablas de resultados de los transitorios de calcio en el modelo de 5 meses

5M - PAPILAR IZQUIERDO					
1Hz	Control 5 meses n=6, N=2		Tratado 5 meses n=4, N=3		p
	Media	E.E	Media	E.E	
[Calcio basal] (nM)	39.93 ± 8.44		18.12 ± 1.05		0.0734
[Calcio sistólico] (nM)	414.70 ± 39.64		189.40 ± 18.14		<0.0001 ***
[Calcio diastólico] (nM)	77.71 ± 4.25		44.18 ± 1.48		<0.0001 ***
[Media de Calcio] (nM)	130.50 ± 7.39		66.81 ± 2.33		<0.0001 ***
[Calcio total] (nM * ms)	51048 ± 3662		21651 ± 3007		<0.0001 ***
Velocidad de liberación (nM/ms)	17.29 ± 2.20		9.81 ± 1.31		0.0152 *
Velocidad de decaimiento (nM/ms)	12.86 ± 1.61		4.94 ± 0.64		0.0005 ***
Tau de decaimiento (ms)	137.10 ± 5.26		123.40 ± 7.17		0.1230

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

5M - PAPILAR IZQUIERDO					
2Hz	Control 5 meses n=6, N=2		Tratado 5 meses n=4, N=3		p
	Media	E.E	Media	E.E	
[Calcio basal] (nM)	50.17 ± 12.91		23.03 ± 3.25		0.1353
[Calcio sistólico] (nM)	437.00 ± 25.28		247.60 ± 24.19		<0.0001 ***
[Calcio diastólico] (nM)	110.80 ± 5.21		62.29 ± 2.75		<0.0001 ***
[Media de Calcio] (nM)	202.80 ± 8.93		112.00 ± 5.58		<0.0001 ***
[Calcio total] (nM * ms)	45113 ± 2534		24217 ± 3295		<0.0001 ***
Velocidad de liberación (nM/ms)	15.20 ± 1.18		11.16 ± 1.72		0.0540
Velocidad de decaimiento (nM/ms)	12.98 ± 1.15		6.41 ± 0.83		<0.0001 ***
Tau de decaimiento (ms)	123.40 ± 5.36		120.40 ± 6.32		0.7250

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

5M - PAPILAR IZQUIERDO					
3Hz	Control 5 meses n=6, N=2		Tratado 5 meses n=4, N=3		p
	Media	E.E	Media	E.E	
[Calcio basal] (nM)	45.55 ± 9.51		31.87 ± 6.21		0.2951
[Calcio sistólico] (nM)	351.00 ± 13.59		288.00 ± 30.19		0.0438 *
[Calcio diastólico] (nM)	145.02 ± 7.53		82.13 ± 3.84		<0.0001 ***
[Media de Calcio] (nM)	224.40 ± 8.20		154.00 ± 9.38		<0.0001 ***
[Calcio total] (nM * ms)	36630 ± 1918		24175 ± 3808		0.0060 **
Velocidad de liberación (nM/ms)	11.05 ± 0.60		11.58 ± 1.78		0.7543
Velocidad de decaimiento (nM/ms)	9.93 ± 0.58		7.76 ± 1.14		0.0759
Tau de decaimiento (ms)	168.50 ± 10.77		157.40 ± 15.58		0.5475

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

5M - PAPILAR IZQUIERDO

4Hz	Control 5 meses n=6, N=2		Tratado 5 meses n=4, N=3		p
	Media	E.E	Media	E.E	
[Calcio basal] (nM)	43.02 ± 9.69		31.59 ± 5.46		0.3441
[Calcio sistólico] (nM)	598.10 ± 24.99		326.10 ± 20.31		<0.0001 ***
[Calcio diastólico] (nM)	243.30 ± 10.44		130.00 ± 5.94		<0.0001 ***
[Media de Calcio] (nM)	395.10 ± 15.80		213.70 ± 9.24		<0.0001 ***
[Calcio total] (nM * ms)	26714 ± 1341		20862 ± 2250		0.0160 *
Velocidad de liberación (nM/ms)	21.25 ± 1.25		13.15 ± 1.65		0.0002 ***
Velocidad de decaimiento (nM/ms)	23.23 ± 1.28		8.58 ± 0.73		<0.0001 ***
Tau de decaimiento (ms)	209.70 ± 28.58		195.70 ± 20.88		0.6931

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

5M - PAPILAR IZQUIERDO

5Hz	Control 5 meses n=6, N=2		Tratado 5 meses n=4, N=3		p
	Media	E.E	Media	E.E	
[Calcio basal] (nM)	59.95 ± 1.45		38.77 ± 11.20		0.2016
[Calcio sistólico] (nM)	558.70 ± 3.26		301.40 ± 15.43		<0.0001
[Calcio diastólico] (nM)	261.70 ± 23.55		205.30 ± 13.73		0.0456 *
[Media de Calcio] (nM)	382.90 ± 7.06		231.80 ± 10.92		<0.0001 ***
[Calcio total] (nM * ms)	18111 ± 700		9827 ± 861		<0.0001 ***
Velocidad de liberación (nM/ms)	21.85 ± 0.69		7.71 ± 0.69		<0.0001 ***
Velocidad de decaimiento (nM/ms)	17.23 ± 0.61		6.71 ± 0.44		<0.0001 ***
Tau de decaimiento (ms)	181.20 ± 15.26		137.10 ± 16.47		0.0566

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

5M - PAPILAR DERECHO

1Hz	Control 5 meses n=3, N=2		Tratado 5 meses n=3, N=2		p
	Media	E.E	Media	E.E	
[Calcio basal] (nM)	31.36 ± 2.81		94.99 ± 26.06		0.0947
[Calcio sistólico] (nM)	408.70 ± 30.02		205.6 ± 15.16		<0.0001 ***
[Calcio diastólico] (nM)	60.68 ± 2.00		109.3 ± 10.68		0.0005 ***
[Media de Calcio] (nM)	117 ± 3.76		126.8 ± 10.80		0.4525
[Calcio total] (nM * ms)	53562 ± 2615		16412 ± 1911		<0.001 ***
Velocidad de liberación (nM/ms)	18.82 ± 1.54		6.828 ± 0.56		<0.0001 ***
Velocidad de decaimiento (nM/ms)	11.75 ± 0.63		5.812 ± 0.56		<0.0001 ***
Tau de decaimiento (ms)	124.80 ± 5.76		130.8 ± 6.13		0.4951

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

5M - PAPILAR DERECHO

2Hz	Control 5 meses n=3, N=2		Tratado 5 meses n=3, N=2		p
	Media	E.E	Media	E.E	
[Calcio basal] (nM)	35.42 ± 4.99		120.5 ± 21.72		0.0188 *
[Calcio sistólico] (nM)	497.7 ± 21.72		235.4 ± 8.58		<0.001 ***
[Calcio diastólico] (nM)	75.81 ± 2.74		134.5 ± 9.97		<0.0001 ***
[Media de Calcio] (nM)	186.34 ± 7.78		161.7 ± 8.51		0.0411 *
[Calcio total] (nM * ms)	56674 ± 2867		13126 ± 1133		<0.0001 ***
Velocidad de liberación (nM/ms)	22.35 ± 0.82		7.24 ± 0.47		<0.0001 ***
Velocidad de decaimiento (nM/ms)	14.66 ± 1.14		7.001 ± 0.55		<0.0001 ***
Tau de decaimiento (ms)	120.2 ± 6.20		112.8 ± 7.02		0.4373

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

5M - PAPILAR DERECHO

3Hz	Control 5 meses n=3, N=2		Tratado 5 meses n=3, N=2		p
	Media	E.E	Media	E.E	
[Calcio basal] (nM)	43.87 ± 9.74		110.4 ± 20.61		0.0433 *
[Calcio sistólico] (nM)	408.7 ± 9.57		220 ± 9.41		<0.0001 ***
[Calcio diastólico] (nM)	125.9 ± 10.69		137.1 ± 7.60		0.4004
[Media de Calcio] (nM)	229.8 ± 6.47		168.3 ± 7.64		<0.0001 ***
[Calcio total] (nM * ms)	46293 ± 1752		10230 ± 588		<0.0001 ***
Velocidad de liberación (nM/ms)	12.78 ± 0.75		6.545 ± 0.45		<0.0001 ***
Velocidad de decaimiento (nM/ms)	11.43 ± 0.64		5.756 ± 0.36		<0.0001 ***
Tau de decaimiento (ms)	148.5 ± 15.46		178.5 ± 16.38		0.1928

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

5M - PAPILAR DERECHO

4Hz	Control 5 meses n=3, N=2		Tratado 5 meses n=3, N=2		p
	Media	E.E	Media	E.E	
[Calcio basal] (nM)	54.41 ± 11.20		111.40 ± 23.36		0.0928
[Calcio sistólico] (nM)	564.60 ± 32.12		280.90 ± 9.85		<0.0001 ***
[Calcio diastólico] (nM)	228.00 ± 18.72		154.60 ± 7.32		0.0006 ***
[Media de Calcio] (nM)	354.00 ± 22.80		210.90 ± 9.17		<0.0001 ***
[Calcio total] (nM * ms)	39161 ± 3849		15921 ± 417		<0.0001 ***
Velocidad de liberación (nM/ms)	16.96 ± 1.17		9.07 ± 0.36		<0.0001 ***
Velocidad de decaimiento (nM/ms)	14.49 ± 1.64		8.12 ± 0.42		0.0004 ***
Tau de decaimiento (ms)	181.40 ± 8.25		182.90 ± 13.90		0.9232

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

5M - PAPILAR DERECHO						
5Hz	Control 5 meses n=3, N=2		Tratado 5 meses n=3, N=2		p	
	Media	E.E.	Media	E.E.		
[Calcio basal] (nM)	36.32 ± 4.11		81.11 ± 13.7		0.0301	*
[Calcio sistólico] (nM)	429.30 ± 20.81		240.30 ± 4.38		<0.0001	***
[Calcio diastólico] (nM)	171.80 ± 5.80		126.40 ± 1.92		<0.0001	***
[Media de Calcio] (nM)	293.30 ± 10.91		174.60 ± 2.79		<0.0001	***
[Calcio total] (nM * ms)	26036 ± 2347		16736 ± 522		0.0020	**
Velocidad de liberación (nM/ms)	15.25 ± 1.06		7.55 ± 0.32		<0.0001	***
Velocidad de decaimiento (nM/ms)	13.23 ± 0.93		6.80 ± 0.31		<0.0001	***
Tau de decaimiento (ms)	199.40 ± 15.04		156.00 ± 6.10		0.0210	*

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Tablas de resultados de tamaño de las células en el modelo de 3 meses

3M - PAPILAR IZQUIERDO						
	Control n=5		Tratado n=6		p	
	Media	E.E.	Media	E.E.		
Longitud	123.80 ± 4.91		109.00 ± 4.75		0.6930	
Ancho	23.15 ± 0.49		24.47 ± 2.71		0.0993	
Área	2937.00 ± 155.00		3210.00 ± 508.90		0.6487	

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

3M - PAPILAR DERECHO						
	Control n=5		Tratado n=6		p	
	Media	E.E.	Media	E.E.		
Longitud	125.70 ± 8.42		121.50 ± 6.37		0.0583	
Ancho	23.62 ± 0.55		25.34 ± 2.06		0.5175	
Área	2845.00 ± 97.10		2681.00 ± 257.00		0.6269	

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Tablas de resultados del tamaño de las células en el modelo de 5 meses

3M - PAPILAR IZQUIERDO					
	Control 5 meses n=5		Tratado 5 meses n=6		P
	Media	E.E.	Media	E.E.	
Longitud	118.5 ± 11.32		109.8 ± 6.71		0.4827
Ancho	28.11 ± 3.67		21.85 ± 1.36		0.3953
Área	3332 ± 668		2347 ± 200.2		0.1705

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

3M - PAPILAR DERECHO					
	Control 5 meses n=4		Tratado 5 meses n=6		P
	Media	E.E.	Media	E.E.	
Longitud	105.5 ± 13.35		121.5 ± 6.37		0.9132
Ancho	24.34 ± 0.98		26.03 ± 3.56		0.711
Área	2484 ± 300.9		2687 ± 521.2		0.7724

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Tablas de resultados del porcentaje de contracción en el modelo de 3 meses

3M - PAPILAR IZQUIERDO					
PORCENTAJE DE CONTRACCIÓN (%)					
Frecuencia de Estimulación	Control n=5		Tratado n=6		p
	Media	E.E.	Media	E.E.	
1hz	5.220 ± 0.516		2.425 ± 0.216		<0.0001 ***
2hz	4.885 ± 0.315		3.241 ± 0.333		0.0008 ***
3hz	3.720 ± 0.317		2.753 ± 0.326		0.0403 *
4hz	3.085 ± 0.351		2.523 ± 0.294		0.2279
5hz	2.342 ± 0.349		2.210 ± 0.187		0.7182

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Tablas de resultados del porcentaje de contracción en el modelo de 5 meses

3M - PAPILAR IZQUIERDO

PORCENTAJE DE CONTRACCIÓN (%)

Frecuencia de Estimulación	Control 5 meses n=5		Tratado 5 meses n=6		P
	Media	E.E.	Media	E.E.	
1hz	1.742 ± 0.2736		1.545 ± 0.2617		0.0304 *
2hz	2.264 ± 0.3496		1.52 ± 0.3289		0.0287 *
3hz	2.448 ± 0.5772		1.472 ± 0.2515		<0.0001 ***
4hz	2.598 ± 0.3461		1.791 ± 0.2369		0.0092 **
5hz	1.837 ± 0.3424		1.541 ± 0.2619		0.0028 **

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

3M - PAPILAR DERECHO

PORCENTAJE DE CONTRACCIÓN (%)

Frecuencia de Estimulación	Control 5 meses n=4		Tratado 5 meses n=6		P
	Media	E.E.	Media	E.E.	
1hz	1.742 ± 0.2736		1.545 ± 0.2617		0.4622
2hz	2.264 ± 0.3496		1.52 ± 0.3289		0.3944
3hz	2.448 ± 0.5772		1.472 ± 0.2515		0.054
4hz	2.598 ± 0.3461		1.791 ± 0.2369		0.1473
5hz	1.837 ± 0.3424		1.541 ± 0.2619		0.2541

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

11. BIBLIOGRAFÍA.

- Ahmadi, A., Leipsic, J., Feuchtner, G., Gransar, H., Kalra, D., Heo, R., ... Min, J. K. (2015). Is metabolic syndrome predictive of prevalence, extent, and risk of coronary artery disease beyond its components? results from the multinational coronary ct angiography evaluation for clinical outcome: An international multicenter registry (confirm). *PLoS ONE*, *10*(3), 1–9.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118998>
- Albarado-Ibañez, A., Avelino-Cruz, J. E., Velasco, M., Torres-Jácome, J., & Hiriart, M. (2013). Metabolic syndrome remodels electrical activity of the sinoatrial node and produces arrhythmias in rats. *PLoS ONE*, *8*(11).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076534>
- Alemán-Mateo, H. (2018). Prevalence of metabolic syndrome and its determinants in older mexican non-diabetic adults, *34*, 0–1.
- Bers, D. M. (2008). Calcium Cycling and Signaling in Cardiac Myocytes. *Annual Review of Physiology*, *70*(1), 23–49.
<https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100455>
- Bers, D. M., & Guo, T. (2005). Calcium signaling in cardiac ventricular myocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1047*, 86–98.
<https://doi.org/10.1196/annals.1341.008>
- Burguete-García, A. I., Valdés-Villalpando, Y. N., & Cruz, M. (2014). Definiciones para el diagnóstico de síndrome metabólico en población infantil. *Gaceta Médica de Mexico*, *150*, 79–87. <https://doi.org/10.1002/per>
- Calle, E. E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K., & Thun, M. J. (2003). Overweight, Obesity, and Mortality from Cancer in a Prospectively Studied Cohort of U.S. Adults. *New England Journal of Medicine*, *348*(17), 1625–1638.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa021423>
- Carvajal, C. (2014). Lipoproteínas: metabolismo y lipoproteínas aterogénicas. *Medicina Legal de Costa Rica*, *31*(2), 88–94. Retrieved from http://www.scielo.sa.cr/pdf/mlcr/v31n2/art10v31n2.pdf%0Ahttp://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152014000200010
- Cheng, H., & Lederer, W. J. (2008). Calcium sparks. *Physiological Reviews*, *88*(4),

- 1491–1545. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2007>
- Desroches, S., & Lamarche, B. (2007). ` SE REVIEW / SYNTHE The evolving definitions and increasing prevalence of the metabolic syndrome, *32*, 23–32. <https://doi.org/10.1139/H06-095>
- Echavarría-Pinto, M., Hernández-Lomelí, A., Alcocer-Gamba, M. A., Morales-Flores, H., & Vázquez-Mellado, A. (2006). Síndrome metabólico en adultos de 20 a 40 años en una comunidad rural mexicana. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, *44*(4), 329–335.
- Escobedo-de la Peña, J., De Jesús-Pérez, R., Schargrotsky, H., & Champagne, B. (2014). Prevalencia de dislipidemias en la ciudad de México y su asociación con otros factores de riesgo cardiovascular . Resultados del estudio CARMELA. *Gaceta Médica de México*, *150*, 128–136.
- Fernandez Travieso, J. C. (2016). Síndrome Metabólico y Riesgo Cardiovascular . *CENIC. Ciencias Biológicas*, *47*, 106–119.
- González Chávez, A., Alexánder Rosas, E., Alvarado Ruiz, R., Ayub Ayala, M., Camacho Aguilera, J., Cardona Muñoz, E., & Cobo Abreu, C. (1999). Consenso Mexicano de Resistencia a la Insulina y Síndrome Metabólico. *Revista Mexicana de Cardiología*, *10*, 3–19.
- Grundy, S. M. (2016). Metabolic syndrome update. *Trends in Cardiovascular Medicine*, *26*(4), 364–373. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2015.10.004>
- Guatimosim, S., Dilly, K., Ferno Santana, L., Saleet Jafri, M., Sobie, E. A., & Lederer, W. J. (2002). Local Ca²⁺-signaling and EC coupling in heart: Ca²⁺-sparks and the regulation of the [Ca²⁺]_i-transient. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *34*(8), 941–950. <https://doi.org/10.1006/jmcc.2002.2032>
- Gutiérrez Rodelo, C., Roura-guiberna, A., & Olivares-Reyes, A. (2017). Mecanismos Moleculares de la Resistencia a la Insulina : Una Actualización. *Gaceta Médica de México*, *153*, 214–228.
- Hall, J. E., & Guyton, A. C. (2016). *Tratado de fisiología médica*. (Elsevier, Ed.) (13a. Edici). Barcelona, España.
- International Diabetes Federation. (2006). *The IDF consensus worldwide definition*

- of the metabolic syndrome. IDF. Brussels. Belgium.*
- Isordia-Salas, I., & Santiago-Germán, D. (2006). prevalence of metabolic syndrome components in an urban mexican sample. *Archivos Espanoles de Urologia*, 59(10), 989–1000. <https://doi.org/10.1155/2012/202540>
- Jayasinghe, I. D., Cannell, M. B., & Soeller, C. (2009). Organization of ryanodine receptors, transverse tubules, and sodium-calcium exchanger in rat myocytes. *Biophysical Journal*, 97(10), 2664–2673. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.08.036>
- Kang, Y. S. (2013). Obesity associated hypertension: new insights into mechanism. *Electrolyte & Blood Pressure : E & BP*, 11(2), 46–52. <https://doi.org/10.5049/EBP.2013.11.2.46>
- Kaur, J. (2014). A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiology Research and Practice*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/943162>
- Klabunde, R. E. (2005). *Cardiovascular Physiology Concepts*. (Lippincott Williams & Wilkins, Ed.) (2nd editio). Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Kolovou, G. D., Anagnostopoulou, K. K., Salpea, K. D., & Mikhailidis, D. P. (2007). The Prevalence of Metabolic Syndrome in Various Populations, 333(6). <https://doi.org/10.1097/MAJ.0b013e318065c3a1>
- Kwiterovich, P. O. (2000). The Metabolic Pathways of High-Density and Triglycerides : A Current Review. *American Journal of Cardiology*, 86, 5–10.
- Lakka, H., Laaksonen, D., Lakka, T. A., Niskanen, L., Kumpusalo, E., Tuomilehto, J., & Salonen, J. (2002). The Metabolic Syndrome and Total and Cardiovascular Disease Mortality in Middle-aged Men. *Journal of American Medical Association*, 288(21), 2709–2716.
- Latarjet, M., & Ruiz Liard, A. (2011). *Anatomía Humana. Tomo II*. (Lippincott Williams & Wilkins, Ed.) (4a. Edició). Buenos Aires, Argentina.
- Luna Ortiz, P., Serrano Valdés, X., Fernández Rivera, B., & Rojas Pérez, E. (2003). Homeostasis de Calcio y Función Cardioyascular: Implicaciones Anestésicas. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 26(2), 87–100.
- Mathiew-Quiros, A., Salinas-Martinez, A. M., Hernandez-Herrera, R. J., & Gallardo-Vela, J. A. (2014). [Metabolic syndrome in workers of a second level hospital].

- Revista Medica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*, 52(5), 580–587.
Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2014/im145u.pdf>
- Mattiazzi, A., & Vila Petrof, M. (2013). Fisiología del miocito cardíaco. In Sociedad Argentina de Hipertensión Arterial (Ed.), *Hipertensión Arterial, Epidemiología, Fisiología, Fisiopatología, Diagnóstico y Terapéutica*. (pp. 176–182).
- Moore, K. L., Dalley, A. F., & Agur, A. M. R. (2013). *Anatomía con orientación clínica*. (L. W. & Wilkins, Ed.) (7a.). Barcelona, España: Lippincott Williams & Wilkins.
- Nájera, O., Villanueva, R., Figueroa, L., Paulina, C., López, R., Muñozcano, O., ... García, S. (2015). Prevalence of metabolic syndrome in overweight and obese schoolchildren, *16*(1), 18–25.
- NCEP. (2001). *Third Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel. Adult Treatment Panel III. National Cholesterol Education Program*.
<https://doi.org/10.1001/jama.285.19.2486>
- Olivares-Reyes, A., & Arellano Plancarte, A. (2008). Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(1), 9–18.
- Park, S. E., Park, C., & Sweeney, G. (2015). Biomarkers of insulin sensitivity and insulin resistance : Past , present and future. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 1–11. <https://doi.org/10.3109/10408363.2015.1023429>
- Reaven, G. M. (1988). Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, (26).
- Rojas Mangas, A., R, T. C., Santi Cano, M., & Barba Chacón, A. (2005). Arteriosclerosis . Patogenia de la arteriosclerosis . Mecanismos celulares y moleculares implicados en la aterogénesis. *Medicine*, 9(38), 2495–2505.
[https://doi.org/10.1016/S0211-3449\(05\)73752-8](https://doi.org/10.1016/S0211-3449(05)73752-8)
- Rueda, A., Alba-aguayo, D. R. De, & Valdivia, H. (2014). Receptor de rianodina , fuga de calcio y arritmias, *84*(3).
- Sarmiento Ortega, V. E., Treviño, S., Flores Hernández, J. Á., Aguilar Alonso, P., Moroni González, D., Aburto Luna, V., ... Brambila, E. (2017). Changes on serum and hepatic lipidome after a chronic cadmium exposure in Wistar rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 635(September), 52–59.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.10.003>

- Sato, D., Shannon, T. R., & Bers, D. M. (2016). Sarcoplasmic Reticulum Structure and Functional Properties that Promote Long-Lasting Calcium Sparks. *Biophysical Journal*, *110*(2), 382–390.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.12.009>
- Scriven, D. R. L., Asghari, P., & Moore, E. D. W. (2013). Microarchitecture of the dyad. *Cardiovascular Research*, *98*(2), 169–176.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvt025>
- Secretaría de salud. (2010, November 23). NORMA Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus. *Diario Oficial de La Federación*.
- Secretaría de salud. (2013). Estrategia Nacional Para La Prevención Y El Control Del Sobrepeso, La Obesidad Y La Diabetes., 105. Retrieved from http://promocion.salud.gob.mx/dgps/descargas1/estrategia/Estrategia_con_portada.pdf
- Secretaría de Salud. (2016). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. *Instituto Nacional de Salud Pública*, 2016, 151.
<https://doi.org/10.21149/8593>
- Sequeira, V., & van der Velden, J. (2015). Historical perspective on heart function: the Frank–Starling Law. *Biophysical Reviews*, *7*(4), 421–447.
<https://doi.org/10.1007/s12551-015-0184-4>
- Toth, P. P. (2016). Triglyceride-rich lipoproteins as a causal factor for cardiovascular disease. *Vascular Health and Risk Management*., *12*, 171–183.
- Treviño, S., Aguilar-Alonso, P., Flores Hernandez, J. A., Brambila, E., Guevara, J., Flores, G., ... Diaz, A. (2015). A high calorie diet causes memory loss, metabolic syndrome and oxidative stress into hippocampus and temporal cortex of rats. *Synapse*, *69*(9), 421–433. <https://doi.org/10.1002/syn.21832>
- Vykoukal, D., & Davies, M. G. (2012). Vascular Biology of metabolic syndrome. *National Institute of Health*, *54*(3), 819–831.
<https://doi.org/10.1016/j.jvs.2011.01.003.VASCULAR>
- Wang, L., Gill, R., Pedersen, T. L., Higgins, L. J., Newman, J. W., Rutledge, J. C., ... Triglyceride-rich, J. C. R. (2009). Triglyceride-rich lipoprotein lipolysis

releases neutral and oxidized FFAs that induce endothelial cell inflammation. *Journal of Lipid Research*, 50, 204–213. <https://doi.org/10.1194/jlr.M700505-JLR200>

World Health Organization. (1999). Definition, diagnosis and classification of Diabetes Mellitus and its complications. Geneva, Switzerland.

World Health Organization. (2018). Obesidad y sobrepeso. Retrieved from <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>