Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Medicina

Instituto de Fisiología

“Análisis morfológico de la red de túbulos t de cardiomiocitos ventriculares en un biomodelo de diabetes mellitus tipo 2”

Tesis de Investigación

Que para obtener el grado de

Licenciado en Biomedicina

Presenta:

Erick Enrique Rivas Oliver

Director de Tesis

D. en C. José Everardo Avelino Cruz

Junio 2021

1 Resumen **4**

1. Introducción **6**
1.1 Corazón 6
1.2 Diabetes 7

2. Antecedentes **10**
2.1 Antecedentes Generales 10
2.1.1 Cardiomiocito 10
2.1.2 Acople excitación-contracción 12
2.2 Antecedentes específicos 16
2.2.1 Red de Túbulos T 16
2.2.2 Regulación de los Túbulos T 18

3. Planteamiento del Problema **21**

4. Objetivos **22**
Objetivo General 22
Objetivos específicos 22

5. Material y métodos **23**
Modelo Animal 23
Aislamiento de Cardiomiocitos 24
Captura de imágenes 25
Registro de la red de túbulos t y sus componentes 26
Registro de direccionalidad de los componentes de la red de túbulos t 28
Análisis de datos 28

6. Resultados **29**
Número total de túbulos t 29
Número de ramificaciones en la red de túbulos t 30
Longitud promedio de las ramificaciones en la red de túbulos t 31
Número de uniones en la red de túbulos t 32
Número de puntas en la red de túbulos t 34
Longitud total de la red de túbulos t 35
Porcentaje del área total ocupada por la red de túbulos t 36
Área del cardiomiocito 37
Perímetro del cardiomiocito 39
Porcentaje de Túbulos t axiales en los cardiomiocitos 40
Porcentaje de Túbulos t transversales en los cardiomiocitos 41

7. Discusión **43**

8. Conclusiones **49**

9. Bibliografía **50**

1 Resumen

La diabetes es definida como un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia resultante de defectos en la secreción de insulina. Existen 2 tipos de diabetes tipo 1 y tipo 2; esta última se debe a una combinación de resistencia a la acción de la insulina y una inadecuada respuesta secretora compensatoria a la previa resistencia.

En México, la diabetes tipo 2 es una de las 10 causas principales de hospitalización en adultos y aumenta el riesgo de sufrir infarto al miocardio o cerebral pues esta se ha relacionado fuertemente con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. En procesos patológicos, el corazón es sometido a un proceso de remodelación induciendo cambios estructurales y funcionales como lo son aumento en el diámetro de las cavidades, masa, forma o fibrosis que, eventualmente llevan a la insuficiencia cardiaca.

La función principal del corazón es la de bombear sangre al cuerpo entero y dicha función se ve determinada por el acople excitación-contracción, del cual los túbulos t, invaginaciones del sarcolema en el cardiomiocito, son parte integral pues en ellos comienza el proceso de acople electromecánico.

En este trabajo evaluamos los cambios en el sistema de túbulos t y su conformación en forma de red. Se utilizaron imágenes de cardiomiocitos ventriculares derecho e izquierdo, provenientes de ratas, lean zucker diabetic fatty (LZDF) como controles y de zucker diabetic fatty (ZDF) como grupo problema o zucker diabetic fatty normoglicemicas (ZDF GN) como referencia.

Se aislaron cardiomiocitos a las 13 semanas de edad, se marcaron con un colorante fluorescentes que nos permite ver la membrana plasmática (Di-8-ANEPPS). Posteriormente, se capturaron imágenes de estas células en un microscopio confocal. Las imágenes fueron analizadas con un software de procesamiento y análisis de imágenes, con el cual se creó una reconstrucción

2d de la red de túbulos t, lo que nos permitió evaluar los componentes y características de esta.

Los resultados obtenidos mostraron cambios en el número de componentes estructurales correspondientes a la red de túbulos t en cardiomiocitos ventriculares de ratas LZDF, ZDF y ZDF GN. Se encontró un aumento en el número de túbulos t, ramificaciones, uniones y terminaciones en la estructura de la red así como un cambio en la direccionalidad de los túbulos t, los cambios se evaluaron tanto en el corazón completo de manera global como en ventrículo izquierdo y derecho; los cambios en ventrículo izquierdo contribuyen mayormente a las variaciones encontradas en corazón completo.

Proponemos que los cambios encontrados podrían tener una función compensatoria tratando de suplir alteraciones funcionales presentes en los modelos diabéticos y obesos, como lo son la falla en la homeostasis de calcio intracelular. Es necesario complementar este trabajo estudiando los procesos moleculares que causan la remodelación estructural que estamos reportando.

1. Introducción

1.1 Corazón

El corazón es un órgano hueco que se encarga de bombear sangre a todo el organismo, distribuyendo así, oxígeno y nutrientes y removiendo productos del metabolismo celular de todo el cuerpo (Barret, 2021)

El corazón está formado por 2 bombas separadas por un septum: una bomba derecha que bombea sangre a los pulmones y una bomba izquierda que bombea sangre hacia los órganos periféricos. A su vez, cada una de estas bombas se divide en una cámara superior o aurícula y una inferior o ventrículo. (Hall J. , 2011)

El corazón está formado por tres tipos principales de músculo cardíaco: auricular, ventricular y fibras musculares especializadas de excitación y conducción. Los músculos auriculares y ventriculares son muy similares al músculo esquelético con un par de diferencias morfológicas y en la duración de sus contracciones. El músculo especializado se contrae débilmente pues su principal función es la de conducir descargas eléctricas rítmicas en forma de potenciales de acción por todo el corazón, coordinando así la contracción de las cámaras cardiacas durante el ciclo cardiaco. (Hall J. , 2011)

El músculo cardíaco se comporta como un sincitio, es decir funciona como una sola unidad coordinada gracias a los discos intercalares, los cuales se forman por la unión de células musculares individuales entre sí. En cada uno de estos discos intercalares se encuentran uniones comunicantes o GAP junctions que conectan a dos células permitiendo una rápida propagación del potencial de acción a través de los discos intercalares. Por lo tanto, el músculo cardiaco es un sincitio funcional en el cual múltiples células musculares interconectadas entre sí facilitan la propagación del potencial de acción de célula a célula. Es importante este proceso para lograr una contracción síncrona y a su vez el bombeo y ciclos cardiacos adecuados. (Hall J. E., 2011)

Se le llama ciclo cardíaco a la serie de procesos que toman lugar al inicio de un latido y terminó al comienzo del siguiente. El ciclo cardiaco puede ser dividido en dos fases generales siendo estas la sístole, la cual se refiere a los eventos asociados con la contracción y eyección ventricular, y la diástole refiriéndose al resto del ciclo de relajación y llenado ventriculares. (Klabunde, 2005)

Cada ciclo es iniciado por la generación espontánea de un potencial de acción en el nódulo sinusal, el potencial de acción viaja desde aquí por ambas aurículas hacia los ventrículos pasando por el nodo auriculoventricular el cual retrasa el impulso cardiaco. Esto permite que las aurículas se contraigan antes de la contracción ventricular, bombeando de esta manera sangre hacia los ventrículos antes de que comience la contracción ventricular. (Hall J. , 2011)

1.2 Diabetes

La diabetes es definida como un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia resultante de defectos en la secreción de insulina, la acción de ésta o ambas. La hiperglucemia crónica asociada a la diabetes está asociada con daño y falla a largo plazo de distintos órganos, particularmente ojos, riñón y corazón. (Association, 2014)

Una gran parte de los casos de diabetes caen en una de dos categorías etiopatogénicas: diabetes tipo 1, cuya causa se debe a una deficiencia absoluta en la secreción de insulina diabetes tipo 2, cuya causa es una combinación de resistencia a la acción de la insulina y una inadecuada respuesta secretora compensatoria a la previa resistencia. (Association, 2014)

Existen múltiples vías para el diagnóstico efectivo de la diabetes basándose en la medición de glucosa en sangre. Ver tabla 1. (A.D.A. American Diabetes Association, 2021)

Prueba	Criterios diagnósticos
Hemoglobina glucosilada o A1C	Evalúa el promedio de la glucosa en sangre del individuo en los pasados 2 a 3 meses. La diabetes es diagnosticada dentro de los siguientes criterios: Normal ≤5.7%, Prediabetes 5.7% a 6.4%, Diabetes ≥ 6.5%.
Glucosa plasmática en ayuno	Evalúa los niveles de glucosa tras 8 horas de ayuno. Los criterios son los siguientes: Normal < 100 mg/dl, Prediabetes 100 mg/dl a 125 mg/dl, Diabetes >126 mg/dl.
Prueba de tolerancia oral a la glucosa	Evalúa los niveles de glucosa 2 horas después y antes de la ingesta de una bebida azucarada. Los criterios son los siguientes: Normal < 140 mg/dl, Prediabetes 140mg/dl a 199 mg/dl, Diabetes >200 mg/dl.
Prueba casual de glucosa en plasma	Al presentar síntomas severos de diabetes se evalúa a cualquier hora del día con o sin ayuno. La diabetes es diagnosticada al encontrar niveles de glucosa en plasma ≥200 md/dl.

Tabla 1. Pruebas y criterios de diagnóstico de Diabetes de la American Diabetes Association (A.D.A. American Diabetes Association , 2021, p.https://www.diabetes.org/a1c/diagnosis)

El incremento global en la incidencia de diabetes aumentó de 11.3 millones en 1990 a 22.9 millones en 2017, lo que representa un incremento del 102.9% y se pronostica un aumento de la incidencia de diabetes a 26.6 millones en el año 2025. (Lin, 2020)

La federación internacional de diabetes estima que en México, habrá nueve millones de personas con diabetes en el año 2025 (Levy, 2020). La prevalencia de diabetes en el 2012 era del 9.2% de la población, es decir,

aproximadamente 6.4 millones de personas. Esta incidencia aumentó un punto porcentual en 8 años, 10.3%(Levy,2020) y si la tendencia de crecimiento sigue proyecciones, previamente estimadas, se espera que en 2030 la prevalencia alcance entre el 12% y 18% de la población y 14% y 22% para el 2050. (ENSANUT, 2016; Fowlkes et al., 2013; Rojas et al., 2018)

La diabetes se ha relacionado fuertemente con enfermedades cardiovasculares; aumentando en dos y cinco veces el riesgo de sufrir insuficiencia cardiaca, en hombres y mujeres diabéticos, respectivamente. (Paneni, 2008; Russo & Frangogiannis, 2016)

El corazón se ve afectado por la diabetes siendo la enfermedad coronaria y eventos cardiovasculares los casos más documentados, sin embargo, también se han registrado múltiples cambios significativos en tanto la función como en la morfología cardiaca causados por procesos de remodelación desencadenados por la hiperglucemia. Distintas enfermedades y condiciones como el infarto al miocardio, la obesidad, cardiomiopatía dilatada y miocarditis, así como la diabetes someten al corazón a un proceso de remodelación funcional, induciendo cambios morfológicos que, como ya se mencionó previamente, llevan de manera tanto directa como indirectamente a la insuficiencia cardiaca. (Abel et al., 2008; Azevedo et al., Fowlkes et al., 20132016; Jugdutt, 2003; Koektuerk et al., 2016)

2. Antecedentes

2.1 Antecedentes Generales

2.1.1 Cardiomiocito

El miocardio es un tejido organizado en un complejo arreglo celular, los componentes principales son los cardiomiocitos, fibroblastos cardiacos, células endoteliales y células vasculares de músculo liso. En un corazón adulto los cardiomiocitos representan aproximadamente el 30% del total de células, sin embargo, ocupan la mayor parte del volumen celular. El 70% restante está compuesto por los otros tipos celulares, en su mayoría fibroblastos cardiacos. (Jugdutt, 2003)

Los miocitos cardíacos representan un tipo de músculo estriado, llamado así por las estrías, líneas y bandas, observadas microscópicamente y que corresponden con los miofilamentos musculares. La unidad contráctil básica del miocito, el sarcómero, se encuentra entre dos líneas Z las cuales desempeñan un rol en la organización proteica y soporte de la tensión en la estructura del sarcómero.

En un sarcómero se encuentran miofilamentos de dos tipos: filamentos gruesos compuestos por miosina y filamentos delgados compuestos por Actina, troponina y tropomiosina. Los filamentos gruesos se colocan entre los filamentos finos y se entrelazan parcialmente con ellos. Este entrelazamiento da pie a bandas oscuras y claras alternadas llamadas bandas A y bandas I, respectivamente. (Fig.1) En la banda I (isotrópico) se distinguen los filamentos delgados de actina interrumpidos en la parte media por la línea Z. La Banda A (anisotrópico) está formada principalmente por filamentos gruesos de miosina ubicados en el centro del sarcómero y porciones de filamentos delgados de actina. Esta banda tiene 3 secciones: la línea M que corresponde a la porción central de cada filamento grueso; la banda H que 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. (Boron & Boulpaep, 2012; Klabunde, 2005)

La longitud del sarcómero bajo condiciones fisiológicas es de 1.6µm a 2.2µm (Klabunde, 2005). Los miocitos ventriculares de mamífero tienen entre 100 y 150µm de largo, 10-20µm de ancho y alrededor de 10µm de alto. Las estriaciones se observan normalmente a lo largo del eje de la célula cada 1.8 – 2.0 µm. (Guatimosim et al., 2002)

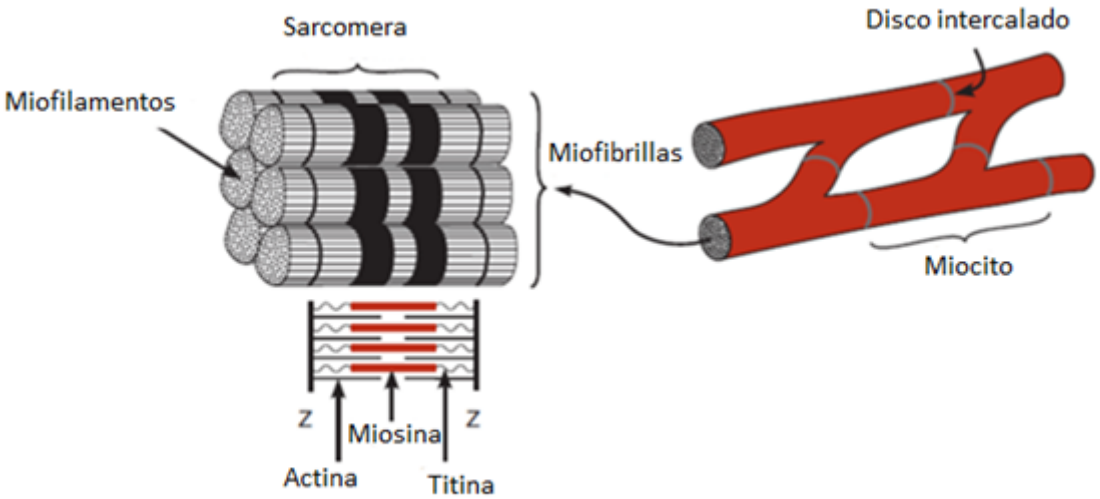

Figura 1. Estructura del cardiomiocito. Del lado derecho se muestra un grupo de cardiomiocitos interconectados entre sí mediante los discos intercalares. Del lado izquierdo, se muestra un acercamiento a la parte interna de los cardiomiocitos y las miofibrillas que se forman en su interior. Cada miofibrilla está formada de varios miofilamentos contráctiles que forman el sarcómero (imagen inferior) (Klabunde, 2005)

2.1.2 Acople excitación-contracción

El acople excitación-contracción es el proceso mediante el cual el potencial de acción genera la contracción del miocito cardiaco. Para entender este proceso es importante describir la estructura interna del cardiomiocito.

La membrana del miocito o sarcolema tiene invaginaciones profundas, que rodean a los grupos de miofibrillas a la altura de la línea z creando una extensa malla llamada Red de Túbulos T.

El acople excitación-contracción depende de la asociación entre el retículo sarcoplásmico y la membrana de los túbulos t, puesto que estos permiten la transmisión del potencial de acción al interior del miocito iniciando así el acople excitación-contracción de manera coordinada en toda la célula muscular. (Manfra et al., 2017)

Cuando un potencial de acción se genera sobre la membrana del músculo cardiaco, este se propaga a través de la red de túbulos t gracias a la activación secuencial de diferentes canales iónicos. La activación de canales de calcio dependientes de voltaje tipo L (LTCC por sus siglas en inglés) permite la entrada de Ca^{2+} y la apertura de la isoforma 2 del receptor de rianodina (RyR2). Ambas estructuras se encuentran localizadas en proximidad (15 nm) formando un sitio de acople funcional entre el túbulo t y la cisterna terminal del retículo sarcoplasmático llamado “couplón”. (Fig.2) El couplón consta de aproximadamente 100 RyR2 junto con 25 canales tipo L. (Fig.3) (Eisner et al., 2017)

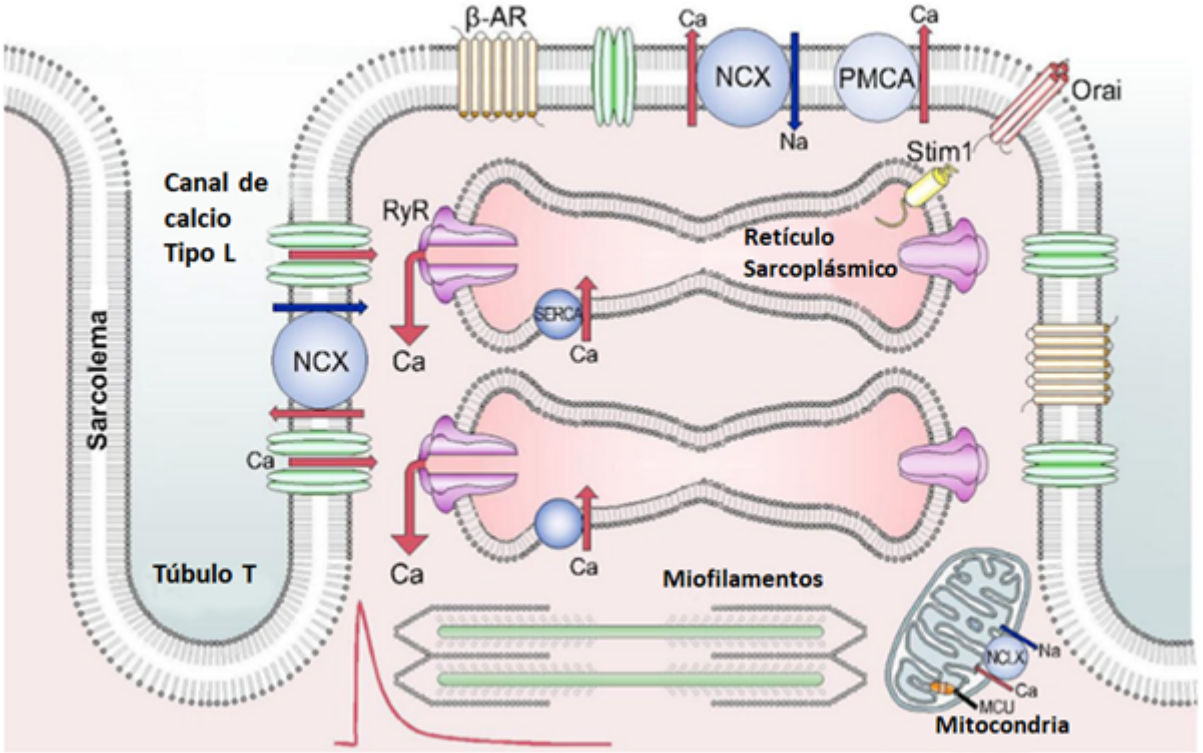

Figura 2. Estructuras involucradas en el acople excitación-contracción. La membrana de los cardiomiocitos presenta invaginaciones llamadas túbulos t, donde se concentran y organizan, junto con las cisternas terminales del retículo sarcoplásmico las proteínas que tienen un papel central en el proceso acople excitación-contracción. Imagen tomada y modificada de Eisner et al., 2017.

En los RyR2 se reúnen proteínas regulatorias (calmodulina, proteína de anclaje FK-506, PKA, sorcina, fosfatasas 1 y 2) que participan en el proceso de liberación de calcio del retículo sarcoplásmico, elevando así la [Ca2+]i, a este proceso se le conoce como liberación de calcio inducida por calcio o CICR, por sus siglas en inglés. (Bers, 2002; Boron & Boulpaep, 2012; Hall J. , 2011)

En la diada se encuentran estructuras adicionales a los canales RyR y LTCC que contribuyen en la regulación de calcio, tanto en la membrana de los túbulos T como en la del retículo sarcoplásmico.

La más estudiada de estas estructuras es el intercambiador Sodio Calcio (NCX), el cual contribuye en su modo reverso al flujo de calcio durante la etapa temprana del potencial de acción. Para su correcta función el canal de sodio

voltaje dependiente (INa) aumenta la concentración de sodio en el interior celular, durante la etapa temprana del potencial de acción, facilitando la acción del modo reverso del NCX. (Eisner et al., 2017)

La Serca2 es otro de los mecanismos involucrados en la regulación de calcio, estudios de imagen confocal sugieren que la SERCA2 se encuentra localizada en la línea Z al igual que alrededor de algunos miofilamentos. (Eisner et al., 2017)

En el retículo sarcoplásmico de encuentran proteínas reguladoras, como lo son la calmodulina que ejerce una modulación dependiente de Ca2+ de la función RyR, a proteína FK 506 que estabiliza la apertura de RyRs, PKA que altera la apertura de RyR y de la ICa, fosfatasas 1,2A y sorcina las cuales se anclan a los RyR y a los canales de calcio. (Bers, 2002)

Todas estas estructuras participan tanto en la regulación del calcio intra sarcoplásmico como en la liberación de este, y estas se encuentran en el complejo de unión o couplón entre el retículo sarcoplásmico y la membrana de los Túbulos T. Este arreglo es responsable de una gran parte de la funcionalidad del Complejo de liberación y modulación de calcio (Bers, 2002) y en consecuencia del acople excitación contracción.

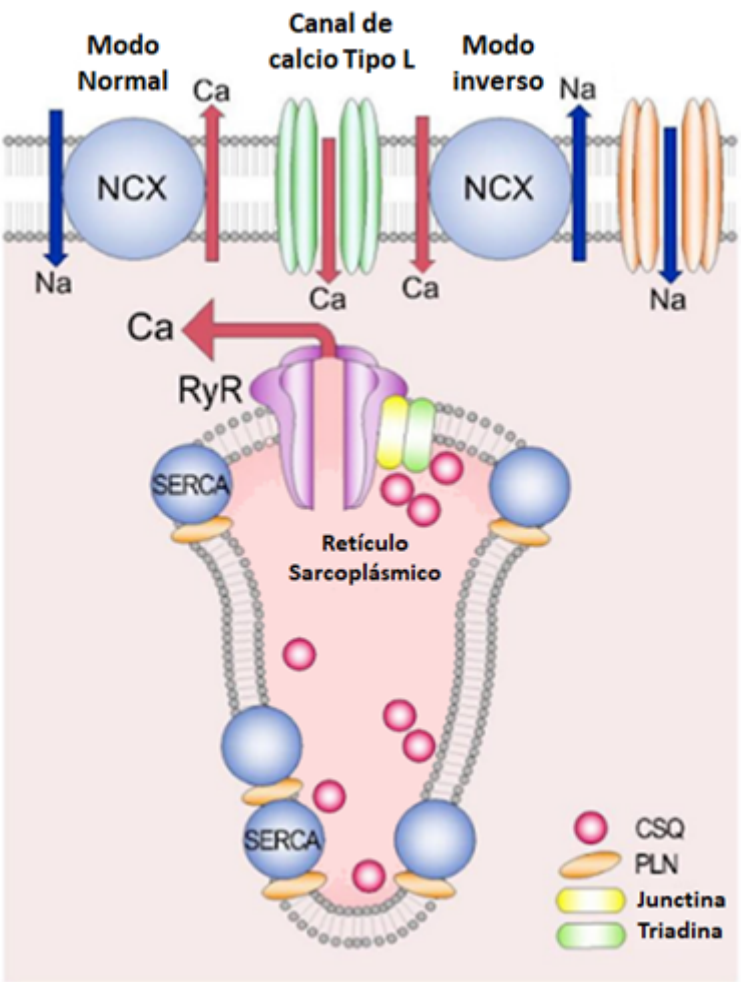

Figura 3. Couplón cardiaco. En regiones específicas de la diada, la membrana plasmática del túbulo t y del retículo sarcoplasmático se acercan a una distancia aproximada de 15nm y permiten que, los canales de calcio sensibles a voltajes y los receptores de rianodina tipo 2 queden en yuxtaposición formando una unidad funcional llamada couplón cardiaco. En las cercanía se encuentran otras proteínas que modulan la entrada, liberación, recaptura y extrusión de calcio como son el intercambiador sodio (NCX), la ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico (SERCA), triadina, juntina, fosfolambano (PLN) o calsecuestrína (CSQ). Imagen tomada y modificada de Eisner et al., 2017.

La combinación de la entrada de calcio extracelular y la liberación desde el RE permite un aumento en la concentración de calcio intracelular de 100 nM, en un estado en reposo a 1 µM. (Marks, 2003) Permiten que el ion se una a la proteína troponina C, la cual forma parte de la maquinaria contráctil, comenzando el proceso de contracción muscular. (Bers, 2002)

2.2 Antecedentes específicos

2.2.1 Red de Túbulos T

El sistema Tubular Transverso Axial o sistema de túbulos t se compone de invaginaciones del sarcolema, de 150 a 300 nm de ancho, perpendiculares al eje longitudinal del miocito, interconectadas en una extensa red por lo que también se le conoce como red de túbulos T. En los túbulos t se expresa una alta densidad de canales iónicos y proteínas reguladoras del calcio intracelular. (Hong & Shaw, 2017)

El interior de los túbulos t es una continuación del espacio extracelular. Su orientación indica que estos túbulos de la membrana son principalmente transversales y perpendiculares a los bordes longitudinales del miocito, con una porción axial que corre en paralelo entre los miofilamentos que conectan los túbulos transversales. En estudios recientes se ha identificado una proporción entre túbulos transversos y axiales de 60% y 40% respectivamente (Soeller & Cannell, 1999). Los túbulos t envuelven a las miofibrillas a la altura de la línea z y forman estructuras funcionales con los extremos planos del retículo sarcoplásmico a las que se les conoce como diadas cardiacas. (Fig.4) (Hong & Shaw, 2017)

Los túbulos t se presentan principalmente en cardiomiocitos ventriculares y varían en diámetro desde 20 a 450 nm constituyendo del 0.8 al 3.6% del total del volumen celular y del 21 al 64% del total del sarcolema. En cardiomiocitos auriculares la red de túbulos t se encuentra menos desarrollada y varía más entre célula y célula, por ejemplo, en ratas aproximadamente sólo una tercera parte de las células auriculares estaban tubuladas y los tubos que poseían era longitudinales, en otro estudio, se identificó que los túbulos axiales contienen al menos el 19% de los RyR de toda la célula sugiriendo que a pesar de ser menos prevalentes en la célula, estos juegan un rol importante en el acople excitación-contracción. (Jayasinghe et al., 2009; Manfra et al., 2017)

La estructura en red que poseen los túbulos t no es uniforme y consiste en múltiples variaciones de luz, diámetro, diferencias en la estructura de

membrana y múltiples tipos de subdominios (Fig.4) .Esta ultraestructura y subdominios son imperativos al brindar una base estructural y funcional a la red como lo son: dobleces mediados por amphiphisina o cBIN1, caveolas o invaginaciones pequeñas mediadas por caveolina 3 y los micro dominios de anquirina B, además, en una gran parte estos microdominios se concentran canales e intercambiadores iónicos para facilitar a los túbulos t realizar sus funciones. (Hong & Shaw, 2017)

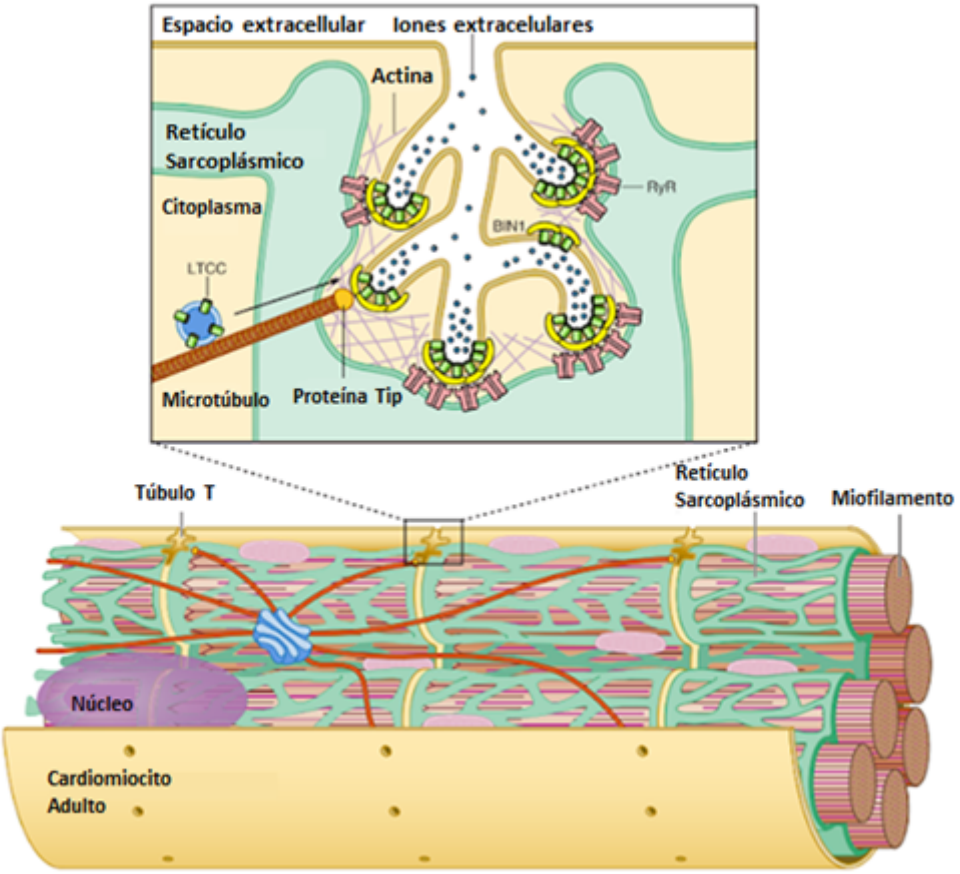

Figura 4. Ultraestructura de los túbulos t. En el panel superior se muestra una caricatura de los túbulos t, los microdominios cBin1(amarillo), el arreglo de couplón entre RYR2 (rosa) y canales de calcio tipo L (verde). Debajo, una caricatura de un cardiomiocito mostrando el acomodo espacial de los túbulos t, la formación de diadas y su alineamiento con las líneas z de la sarcómera. Imagen tomada de Hong & Shaw, 2017.

La función principal de los túbulos t es propagar el potencial de acción al interior del cardiomiocito iniciando el acople excitación contracción a través del

posicionamiento cercano de canales tipo L a canales RyR2 formando diadas y facilitando la liberación de calcio inducida por calcio en todas las sarcómeras sin importar que tan profundo estas se encuentren dentro de la célula. Sin embargo, tienen roles importantes en el mantenimiento del potencial de membrana, regulación de este y facilitamiento de la remoción de calcio en la relajación muscular. La asociación y estructura correctas de los túbulos t con el resto de la célula aseguran un flujo de calcio adecuado, desencadenando la CICR. (Hong & Shaw, 2017; Ibrahim et al., 2011; Manfra et al., 2017)

Los túbulos t concentran otras estructuras involucradas en la regulación de calcio, el NCX y la PMCA se encuentran expresados en cercanía a los túbulos t, dándole un acceso privilegiado a estas estructuras para favorecer la remoción de calcio, indicando que las vías principales de remoción de calcio se encuentran cerca de las vías de intrusión de calcio en los túbulos t implicando a estos en un rol importante en la homeostasis del calcio. (Greene et al., 2000; Ibrahim et al., 2011)

2.2.2 Regulación de los Túbulos T

La red de túbulos t es dinámica y esta se ve regulada por factores bioquímicos y biomecánicos que trabajan en conjunto para mantener la función y estructura de la red de túbulos t. (Ibrahim et al. , 2011) Entre los factores bioquímicos involucrados en la regulación de los túbulos t destacan 2 particulares los cuales son amphiphisina 2 (BIN1) y junctophilina 2 (JHP2).

Bin1 juega un rol importante en la formación de los túbulos t, su expresión en células no musculares resulta en la formación de estructuras tubulares similares a los túbulos t en la membrana. Esta proteína no solo se involucra en la formación de túbulos t, también existen evidencias de tener un rol en el acarreo de canales de calcio tipo L hacia los túbulos t. Mutaciones en Bin1 resultan en una desorganización en la red de túbulos T incluso de-tubulación. (Ibrahim et al., 2011; Louch et al., 2010)

La Junctophilina 2 (JPH2) es una proteína de membrana estructural cuyo rol es anclar los túbulos t con el retículo sarcoplásmico formando las diadas, particularmente se ha elucidado que la formación de las diadas, así como la expresión JPH2 se generan al mismo tiempo en la maduración de los túbulos t. (Louch et al., 2010; Manfra et al., 2017; Poulet et al., 2021) La JPH2 igual tiene un rol en el mantenimiento y conservación de diadas en cardiomiocitos maduros, pues su regulación negativa en insuficiencia cardiaca se ha relacionado con la remodelación de los túbulos t.(Manfra et al., 2017)

Otras moléculas y proteínas involucradas en la regulación de los túbulos t son:

Titin-cap (Tcap) la cual ha sido identificada como parte de un complejo sensible al estiramiento en el miocardio. La ausencia de Tcap se ha relacionado con una función anómala y la disrupción del desarrollo y formación de túbulos t, Tcap promueve la formación de túbulos t en respuesta a un estiramiento aumentado. Mutaciones de Tcap podrían causar cardiomiopatía dilatada, o cardiomiopatías hipertróficas las cuales podrían estar relacionadas con la respuesta del miocardio al estiramiento. (Ibrahim et al., 2011)

En menor medida caveolina 3 la cual forma caveolas, y aparentemente juega un rol al darle soporte a JPH2 para su correcta función permitiéndole anclarse a la membrana formando las diadas, así como tropomiosina, miotubularina, obscurina, traidina, y mitsugumina están involucradas en la regulación de los túbulos t en mayor o menor media. Pues se ha evidenciado que su ausencia o regulación negativa resulta en alteraciones en la estructura de los túbulos t y función. (Ibrahim et al., 2011; Louch et al., 2010; Manfra et al., 2017; Poulet et al., 2021)

La presencia de alteraciones en la red de túbulos t ha sido demostrada en humanos y biomodelos, principalmente en la insuficiencia cardiaca, en la cual existe una desorganización de la estructura de túbulos t causada por una serie de estresores al miocardio; estos cambios han sido identificados desde fases tempranas de la enfermedad y durante la hipertrofia en transición a insuficiencia cardiaca y están relacionados con alteraciones en los factores de regulación de la red de túbulos t. (Ibrahim et al., 2011)

Pacientes con isquemias cardiacas e hipertrofia han presentado un profundo daño a la estructura de túbulos t con una reducción en su densidad y regularidad. De igual modo, en modelos animales se han hallado cambios similares en la estructura y organización de los túbulos t. (Ibrahim et al., 2011)

3. Planteamiento del Problema

Los túbulos t juegan un rol funcional y estructural esencial en el cardiomiocito, particularmente en la formación de diadas y couplónes cardiacos los cuales son estructuras esenciales en el acople excitación-contracción. (Bers, 2002; Eisner et al., 2017; Hong & Shaw, 2017)

El mantenimiento de la estructura y función de la red de túbulos t es crítica para una correcta función cardiaca, y como se ha reportado, los cambios en los túbulos t en distintas cardiopatías altera el acople excitación contracción a través de la desorganización de los elementos que participan en el mismo, llevando al corazón eventualmente a un estado de insuficiencia mecánica y funcional (Ibrahim et al., 2011; Pinali et al., 2015)

La diabetes induce cambios morfológicos de manera directa e indirecta en el corazón, lo que nos lleva a plantear la siguiente pregunta ¿Cómo se altera la estructura de la red de túbulos t de los cardiomiocitos en condiciones hiperglucemicas (diabetes)?

4. Objetivos

Objetivo General

Determinar las características morfológicas de la red de túbulos t de células ventriculares en un modelo de diabetes mellitus tipo 2 y compararlas con un grupo control en busca de diferencias.

Objetivos específicos

- Evaluar las siguientes características de la red de túbulos t en cardiomiocitos obtenidos de ratas de la cepa Zucker Diabetic Fatty, un biomodelo de diabetes mellitus tipo 2.
  - Número de túbulos t totales en la red
  - Número de ramificaciones de la red de túbulos t
  - Número de uniones en la red de túbulos t
  - Número de terminaciones en la red de túbulos t
  - Largo promedio de la red de túbulos t
  - Porcentaje del área ocupado por la red de túbulos t en la célula
  - Evaluar el área y perímetro del cardiomiocito
  - Porcentaje de túbulos t axiales y transversales
- Realizar un análisis estadístico para determinar las diferencias entre las características de los túbulos t de las ratas ZDF diabéticas y ZDF normoglicémicas.

5. Material y métodos

Modelo Animal

Utilizamos como modelo animal de diabetes mellitus tipo 2 a la rata zucker diabetic fatty (ZDF) ,un modelo de rata desarrollado a partir de ratas Zucker Fatty (ZF), el cual contiene una mutación sin sentido (fatty/fa) en el gen receptor de leptina (Lepr) desarrollando obesidad sin diabetes (Yokoi et al., 2013).

Las ratas ZDF exhiben obesidad y diabetes y presentan la mutación puntual autosómica recesiva del gen codificante para el receptor de leptina (*fa/fa*). La mutación en el gen favorece el desarrollo de resistencia a la leptina y esta a su vez inhibe la percepción de saciedad del roedor, así como su capacidad para censar la ingesta calórica.

Se establece como control a las ratas Lean Zucker Diabetic Fatty (LZDF) las cuales son el fenotipo delgado y no diabético de camada de las ZDF, estas no expresan la mutación en el receptor de leptina sin embargo son portadoras del alelo recesivo (fa) (Heo et al., 2002) y como grupos problema a las ratas ZDF y ZDF GN, las cuales son ratas Zucker diabetic fatty normoglicemicas que solo desarrollan obesidad; este modelo ha sido descrito previamente en el laboratorio así como por Wang y colaboradores (Wang et al., 2014). Se utilizaron 16 ratas para este estudio: 3 correspondientes del grupo LZDF, 8 al grupo ZDF y 5 al grupo ZDF GN.

Las ratas usadas en este trabajo fueron obtenidas y criadas en el Bioterio de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, acorde a los criterios de calidad establecidos por la Norma Oficial Mexicana NOM 062-ZOO-1999, para el cuidado y manejo de animales de laboratorio. Las ratas, de los 3 grupos, fueron sometidas a una dieta alta en grasas (LabDiet 5008), durante un

periodo de 3 meses y ambos grupos tuvieron libre acceso a agua potable normal.

Tras la finalización del tratamiento se midió el peso del animal. la circunferencia abdominal, y longitud hocico ano, además de realizar mediciones de glucosa plasmática basal, glucosa plasmática en ayuno y curva de tolerancia a la glucosa.

Previo a la prueba de tolerancia, se registró la glucosa plasmática basal, mediante extracción de sangre, aproximadamente 50 µl, por punción en la vena caudal ventral de la cola de la rata y posteriormente se les retiró el alimento por un periodo de 6 horas, manteniendo libre acceso a agua potable normal. Se consideró que los periodos de ayuno fueran lo más aproximados o acordes a los periodos de descanso dentro de los ciclos circadianos de las ratas. A las 6 horas de ayuno se les administró una dosis intraperitoneal de glucosa a 2 g/kg (Guy B. Mulder, 2010) y se hizo el registro de glucosa plasmática, a los 30, 60, 90 y 120 minutos después de la administración. Todas las lecturas de glucosa plasmática se realizaron con el sistema Contour™ TS Bayer.

Aislamiento de Cardiomiocitos

Las ratas fueron sacrificadas al cumplir las 13 semanas de edad. Se anestesiaron con sevofluorano (5%) y se les administró heparina (200 UI/kg) vía intraperitoneal. Para comenzar el proceso de aislamiento, se comprobó la anestesia completa evaluando los reflejos palpebrales y patelares, posteriormente, se realizó una toracotomía anterior y se extrajo el corazón.

Una vez extraído el corazón se sumergió en solución tirode fría (-12 ± 1 ^{O}C), en la cual se retiraron los restos de tejido no deseados como pulmones y tejido adiposo, se realizó un corte ascendente transversal en la aorta para separarla

del resto del vaso y canularlo. Utilizamos el sistema de perfusión langendorff, sujetando el corazón a una cánula insertada en la aorta.

Una vez montado el corazón al sistema se procedió a una perfusión y lavado con soluciones a una temperatura de 36±1 ^{O}C. El orden y duración de la perfusión de detalla a continuación:

Primero se perfunde al corazón con solución tirode durante 10 minutos con el objetivo de eliminar restos de sangre del corazón, a continuación perfundió con tirode sin calcio durante 2 a 4 minutos para detener la contracción del tejido y facilitar la digestión enzimática, posteriormente se perfundió al corazón con colagenasa tipo II disuelta en solución tirode sin calcio durante 5 minutos, seguido de la adición de proteasa tipo XIV durante 2 a 3 minutos más. Finalmente se detuvo la digestión enzimática con un lavado de solución Kraft Bruhe (KB) durante 1 a 3 minutos.

Posteriormente se procedió a disecar el corazón para obtener los músculos ventriculares de la pared libre del ventrículo derecho e izquierdo, el corazón se encontraba sumergido en solución KB durante este proceso. Una vez obtenidos los tejidos se procedió a realizar una disociación mecánica mediante agitación constante en solución KB. El tiempo de agitación varió dependiendo la presencia de células viables para su estudio.

Captura de imágenes

Las células obtenidas fueron cargados en una solución de di-8-ANEPPS, un tinte fluorescente que tiñe la membrana plasmática y sirve para delinear la estructura de los túbulos t, durante 30 minutos a 36.5 °C

Una vez cargadas, las células se observaron en un microscopio confocal invertido con un objetivo 60x, y se tomaron capturas de cardiomiocitos ventriculares que exhibieron forma de bastón, con estrías claras en la imagen de campo claro, tratando de que el eje longitudinal de la célula se encontrara paralelo al eje x de la captura.

Se obtuvieron 197 imágenes de las cuales 43 corresponden a cardiomiocitos de ratas LZDF, 65 a ZDF y 89 a ZDF GN.

Registro de la red de túbulos t y sus componentes

Las imágenes obtenidas fueron sometidas al proceso de análisis previamente descrito por Wagner y colaboradores (Wagner et al., 2014):

1. La imagen se alineó de modo que el eje longitudinal de la célula se encontrara paralelo al eje x de la imagen.

2. Utilizando la herramienta “selección de polígono” se delimitó una región de interés o ROI que excluyera la membrana exterior del sarcolema e incluyera todas las porciones internas de la red de túbulos t.

3. Se seleccionaron los comandos “edit” + “clear outside” con lo que se generó un ROI listo para el análisis.

4. Los siguientes pasos se realizaron para asegurar una imagen de la red de túbulos t fidedigna a la red real.

4.1 Se dio clic en → Procesar → Restar fondo y establecer el “rolling ball point radius” de acuerdo con cada imagen, este fue establecido con base en el número de píxeles que corresponde aproximadamente a un radio físico de 500 nm.

4.2 Se dio clic en → Procesar → Mejorar el contraste local (CLAHE). Se estableció el tamaño del bloque en 49, los contenedores del histograma en 256, la pendiente máxima en 3 y la máscara en "ninguna".

4.3 Se dio clic en → Procesar → Suavizar.

4.4 Se dio clic en → Plug-Ins → Segmentación → Statistical Region Merging. Se establecieron los parámetros en Q100 → y se procedió a dar clic en Mostrar promedios.

4.5 Confirmó el procesamiento completo de la combinación de regiones estadísticas y se procedió a dar clic en → Imagen → Tipo → 8 bits.

4.6 Se dio clic en → Imagen → Ajustar → Umbral.

El umbral seleccionado fue lo suficientemente bajo para detectar la mayoría de las estructuras de la red de túbulos t, y lo suficientemente alto para evitar registrar “ruido” como estructuras. Se realizó una elección correcta del umbral asegurándose que se produjeran solo estructuras de la red de túbulos específicos, pero no señales falsas positivas debido al ruido de fondo.

4.7 Se aseguró la correcta superposición de los detalles de la imagen de la red de túbulos t, frente a los datos del esqueleto extraídos, comparando la imagen del umbral con la imagen original visualmente asegurándose que las estructuras fueran fieles a la original.

4.8 Se dio clic en → Aplicar: con lo cual los datos de la imagen se convirtieron en datos binarios.

4.9 Se dio clic en → Complementos → Skeleton→ Skeletonize (2D / 3D) y se guardó la imagen 2D esqueletizada haciendo clic en → Archivo → Guardar como → Tif.

4.10 Se dio clic en → Complementos → Analizar esqueleto (2D / 3D) con lo que se obtuvieron los datos cuantitativos.

4.11 Se dio clic en Prune cycle method: none. y confirmo la seleccion para generar una tabla de datos.

4.12 La tabla de datos previamente obtenida se guardó y analizó subsecuentemente.

Registro de direccionalidad de los componentes de la red de túbulos t

Se abrió la imagen esqueletizada obtenida previamente y siguieron lo pasos siguientes:

1. Se dio clic en → Analizar → Direccionalidad → especificar:

- Método: Componentes de Fourier
- N-bins 180
- Inicio del histograma -45
- Fin de histograma 140
- Mostrar tabla

2. Los datos fueron generados y guardados

Análisis de datos

Una vez obtenidas las gráficas de datos de la red de túbulos t, estas se transformaron en un archivo de Excel para su fácil manipulación y se ponderaron los datos con respecto a sus imágenes, posteriormente las unidades de píxel se convirtieron en las unidades correspondientes a la variable analizada: Largo promedio de las ramificaciones (µm), largo total de la red de túbulos t (µm), área (µm²), perímetro (µm).

A continuación, se procedió a analizar los datos en el programa PRISM 8 donde los datos obtenidos se expresaron como la media aritmética ± el error estándar asociado a la media (SEM). Finalmente a estos se les realizaron pruebas de normalidad Shapiro–Wilk, y se procedió a comparar los datos con una prueba Anova de 1 vía paramétrica (Brown- Forsythe y Welch) o no paramétrica (Kruskall Wallis) dependiendo los resultados de la prueba de normalidad.

6. Resultados

Utilizando el software de análisis y procesamiento de imágenes Fiji y el plug-in analyze skeleton se analizaron las variables previamente descritas de la red de túbulos t en los diferentes grupos LZDF control (n= 3 corazones, 43 células) y los grupos problema: ZDF (n=8 corazones, 65 células) y ZDF GN (n=5 corazones, 89 células).

Se separaron los datos en corazón completo, corazón izquierdo y derecho, con el objetivo de conocer la influencia que tienen las fuerzas contráctiles, a las cuales se ve más expuesto el corazón izquierdo, en las variables evaluadas.

Número total de túbulos t

En corazón completo las ratas LZDF registraron un promedio de 302 túbulos t por cardiomiocito, las ratas ZDF presentaron un aumento en el número de túbulos t presentes, 385, al igual que las ratas ZDF GN el cual fue de 419. Este aumento fue estadísticamente significativo comparando los grupos ZDF y ZDF GN con el control ($p < .05$) (Figura 5, A).

En el corazón derecho el número de túbulos t mostró una tendencia al aumento en ambos grupos ZDF (344), ZDF GN (407) con respecto al control (311), sin embargo, este aumento no fue estadísticamente significativo (Figura 5, B). En el corazón izquierdo hubo un incremento en el número de estructuras en las ratas ZDF (412) y ZDF GN (426) con respecto al control (289), siendo ambos estadísticamente significativos (Figura 5, C, $p <.05$).

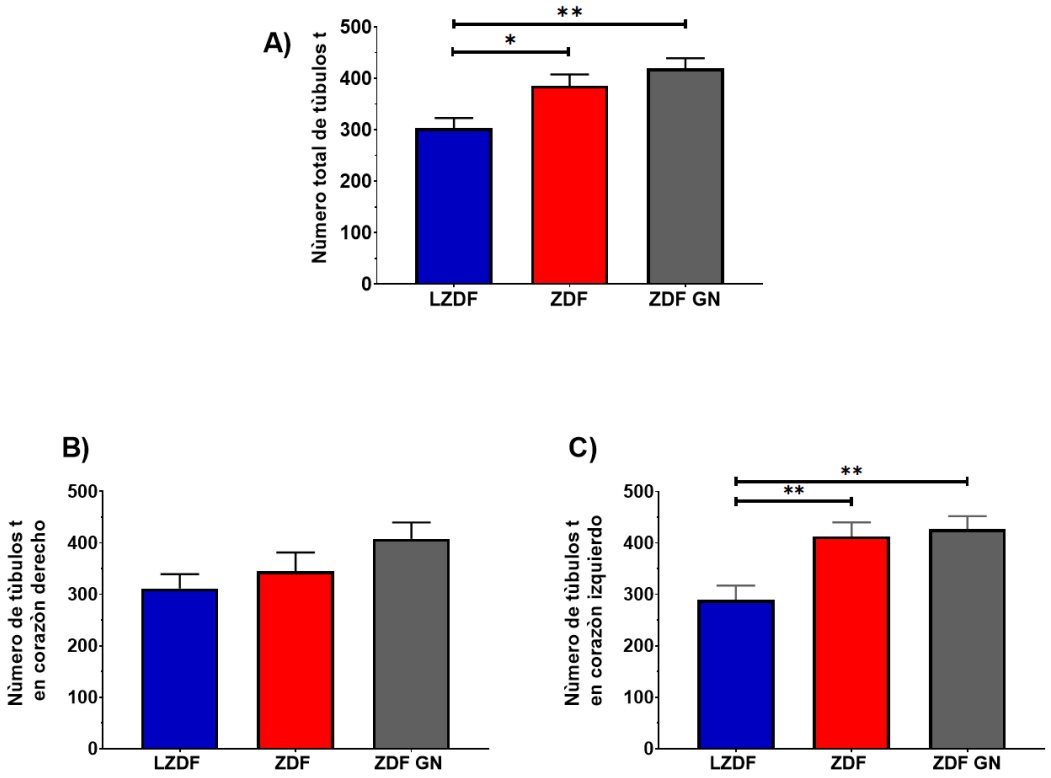

Figura 5. Número de túbulos t. Se evaluó el número total de túbulos t en los grupos LZDF (azul, n=43), ZDF (rojo, n=65) y ZDF GN (gris, n=89). En corazón completo (A) se registró un aumento significativo en los grupos ZDF y ZDF GN comparados con el control, siendo este significativo. En corazón derecho (B) se registró un aumento en el número de túbulos t presentes tanto en ZDF como ZDF GN con respecto al control y en corazón izquierdo (C) se registró un aumento en los grupos ZDF y ZDF GN contra el control, siendo estos aumentos estadísticamente significativos. (* $p < .05$, ** $p < .005$, prueba de KRUSKALL-WALLIS [A, B], prueba de BROWN-FORSYTHE and WELCH [C])

Número de ramificaciones en la red de túbulos t

Al evaluar el corazón completo, las ratas LZDF mostraron un promedio de 599 ramificaciones, un aumento en el grupo ZDF (660) y en el grupo ZDF GN (736), siendo este último estadísticamente significativo ($p <.05$) (Figura 6, A).

En el corazón derecho hubo un aumento en el número promedio de ramificaciones en ZDF (661) y ZDF GN (683) con respecto al grupo LZDF (627), esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 6, B). En corazón izquierdo, el número de ramificaciones aumento tanto en ZDF (659)

como en ZDF GN (769) con respecto a LZDF (581), el aumento de ZDF GN fue significativo con respecto a LZDF (p <.05, Figura 6, C).

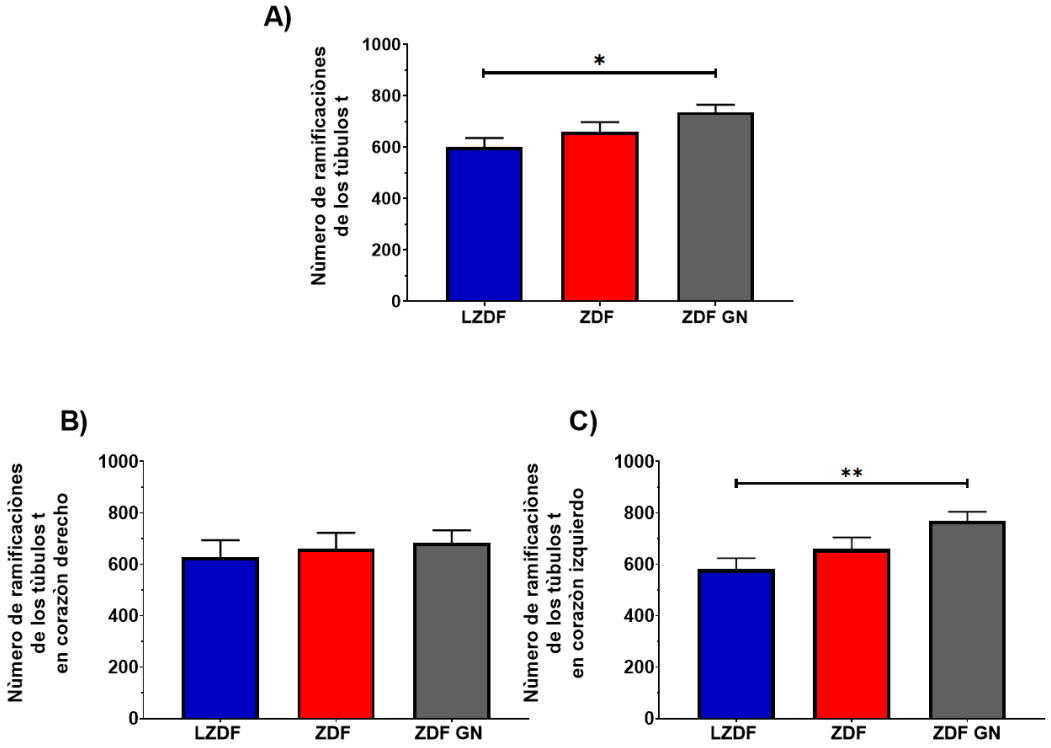

Figura 6. Número de ramificaciones en la red de túbulos t. Se evaluó el número total de ramificaciones presentes en la red de túbulos t en los grupos LZDF (azul, n=43), ZDF (rojo, n=65) Y ZDF GN (gris, n=89). En corazón completo (A) se observó un aumento significativo en el grupo ZDF GN comparados con el control, en el corazón derecho (B) se observó un aumento, más este no fue estadísticamente significativo y en el corazón izquierdo (C) se observó un aumento significativo en el número de ramificaciones de ZDF GN con respecto a LZDF, (* p < .05, ** p < .005, prueba de KRUSKALL-WALLIS [A,B], prueba de BROWN-FORSYTHE and WELCH [C])

Longitud promedio de las ramificaciones en la red de túbulos t

Al evaluar la longitud promedio de cada ramificación en la red de túbulos t en cardiomiocitos de ratas LZDF, ZDF y ZDF GN, en corazón completo se registró una reducción en el largo promedio de las ramificaciones en los grupos ZDF (.711 µm) y ZDF GN (.761 µm) con respecto a LZDF (.782 µm) (Figura 7, A). En el corazón derecho, la tendencia se repitió observándose una reducción en

el grupo ZDF (.758 µm) y ZDF GN (.785 µm) con respecto al LZDF (.842 µm) (Figura 7 ,B). Finalmente, en el corazón izquierdo se observó una reducción en ZDF(.680 µm) con respecto a LZDF(.742 µm) y ZDF GN (.746µm) (Figura 7, C). Ninguno de los cambios previamente descritos fue estadísticamente significativo (p < .05).

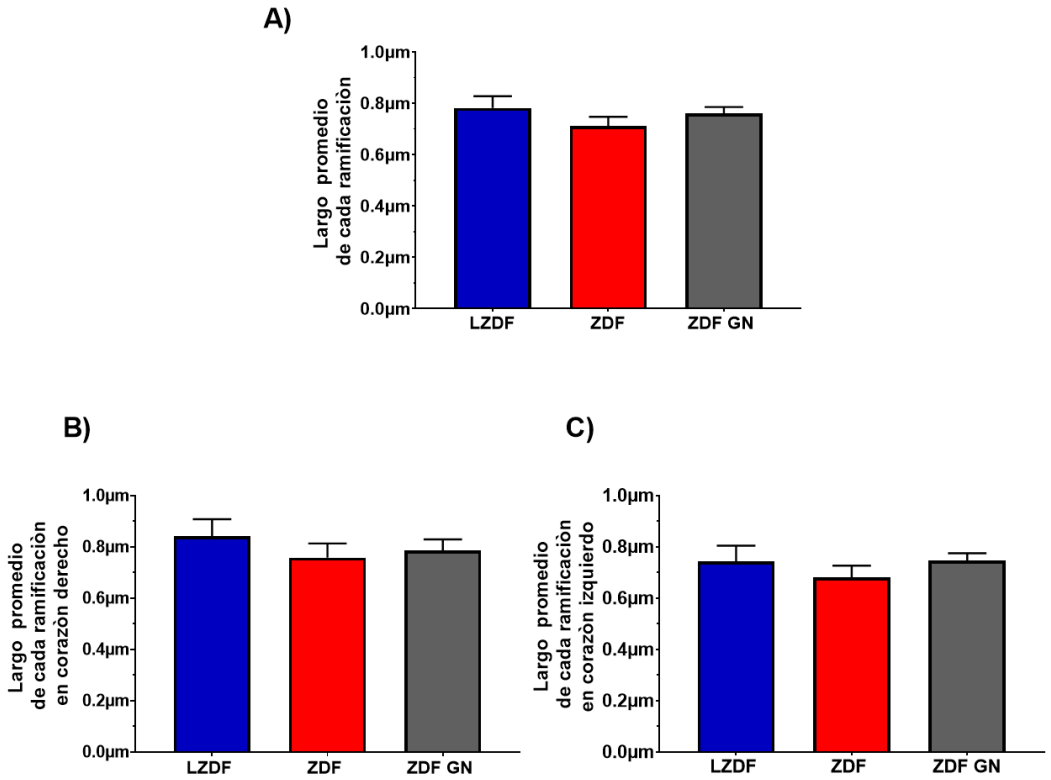

Figura 7. Largo promedio de las ramificaciones en la red de túbulos t. Se evaluó el largo promedio de la red de túbulos t en cardiomiocitos de ratas LZDF (azul, n=43), ZDF (rojo, n=65) Y ZDF GN (gris, n=89). En corazón completo y corazón derecho (A, B), se observó un decremento en la longitud promedio de las ramificaciones en los grupos ZDF Y ZDF GN con respecto a LZDF y,en el corazón izquierdo se observó una reducción en ZDF con respecto al LZDF Y ZDF GN. Los cambios no fueron estadísticamente significativos (* p < .05, Prueba de de KRUSKALL-WALLIS).

Número de uniones en la red de túbulos t

En el corazón completo, las ratas LZDF mostraron un promedio de 143 uniones, en las ratas ZDF el promedio de uniones disminuyó a 135, mientras

que en los corazones de ratas ZDF GN aumentó a 157 (Figura 8, A). En el corazón derecho, el número promedio de uniones aumentó en ZDF (156) con respecto a LZDF (149) y disminuyó en ZDF GN (138) (Figura 8, B). En el corazón izquierdo, el número promedio de ramificaciones disminuyó en ZDF (121) y aumento en ZDF GN (169) con respecto al LZDF (139); el aumento de ZDF GN fue significativo con respecto a ZDF (p <.05) (Figura 8, C).

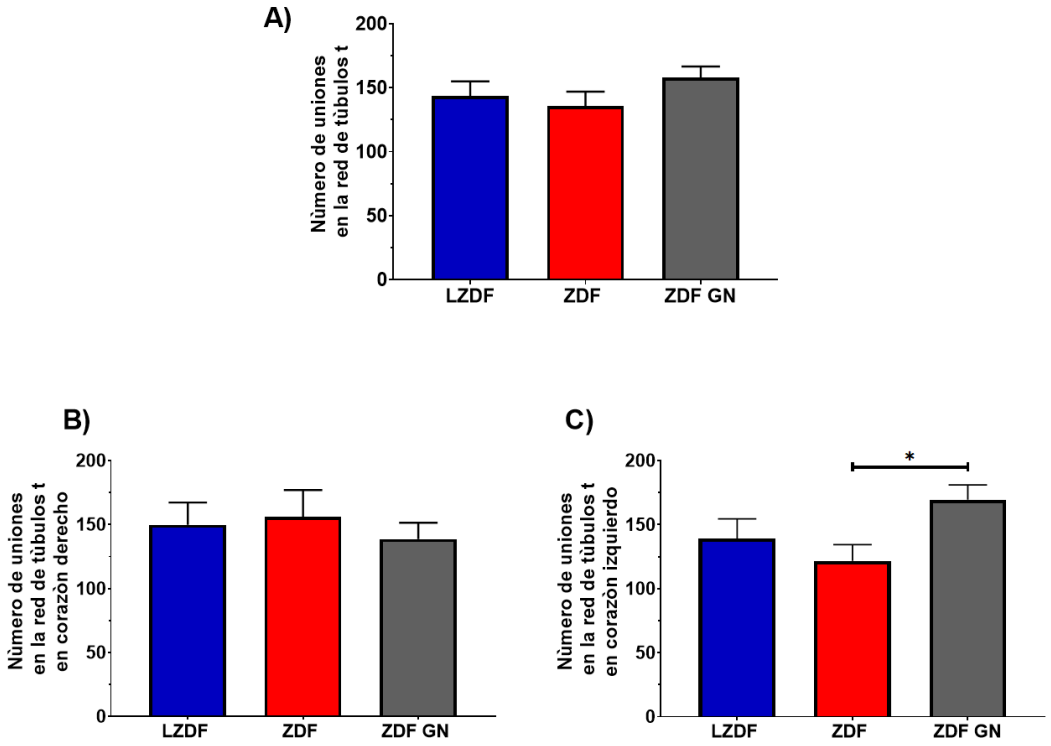

Figura 8. Número de uniones en la red de túbulos t. Se evaluó el número total de uniones presentes en la red de túbulos t en los grupos LZDF (azul, n=43), ZDF (rojo, n=65) y ZDF GN (gris, n=89). Corazón completo (A): se registró una disminución en el grupo ZDF y un aumento en el grupo ZDF GN comparados con el control. Corazón derecho (B): se observó un incremento en ZDF y un decremento en ZDF GN con respecto a LZDF. Corazón izquierdo (C): se observó un decremento en ZDF y un aumento en ZDF GN con respecto a LZDF. Además, se aprecia un aumento estadísticamente significativo entre el grupo ZDF GN y ZDF (* p < .05, prueba de KRUSKALL-WALLIS).

Número de puntas en la red de túbulos t

Se evaluó la variable puntas, la cual corresponde a las terminaciones presentes en la red de túbulos t. En corazón completo se registró un promedio de 768 terminaciones en los corazones de ratas LZDF, así como un aumento tanto en ZDF (931) como en ZDF GN (1021), siendo este último estadísticamente significativo (** $p < 0.005$) (Figura 9, A). En el corazón derecho hubo un aumento tanto del número de terminaciones en la red de túbulos t en el grupo ZDF (868) como ZDF GN (977) con respecto al LZDF (796) (Figura 9, B) y en el corazón izquierdo se observó un aumento estadísticamente significativo tanto en el grupo ZDF (974) como en el ZDF GN (1049) con respecto al LZDF (750) (** $p < .005$) (Figura 9, C)

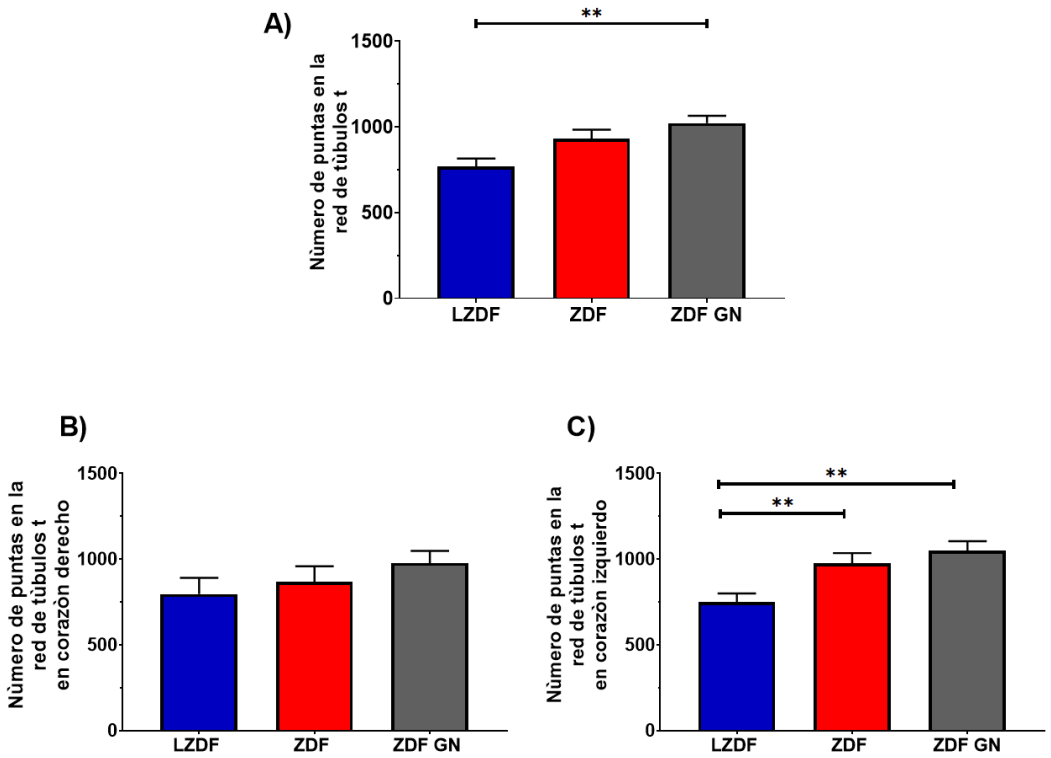

Figura 9.. Número de puntas en la red de túbulos t. Se evaluó el número total de terminaciones presentes en la red de túbulos t en los grupos LZDF (azul, n=43), ZDF (rojo, n=65) y ZDF GN (gris, n=89). Corazón completo (A): se registró un aumento en el número de terminaciones en el grupo ZDF y ZDF GN con respecto al LZDF siendo este último significativo. Corazón derecho (B): se observó un aumento en el número de terminaciones tanto en ZDF como en ZDF GN. Corazón izquierdo (C): se observó un incremento en ZDF y

ZDF GN con respecto a LZDF, ambos estadísticamente significativos (** p < .005, PRUEBA de KRUSKALL-WALLIS [A, B), prueba de BROWN-FORSYTHE and WELCH [C]).

Longitud total de la red de túbulos t

Se evaluó la longitud total en micrómetros (µm) de la red de túbulos t en cardiomiocitos de corazones de ratas LZDF, ZDF y ZDF GN. En el corazón completo de las ratas ZDF GN (538 µm) encontramos un aumento estadísticamente significativo en el promedio de la longitud de la red comparado con los grupos LZDF (433 µm) y ZDF (445 µm) (** p < .005) (Figura 10, A). En el corazón derecho la longitud aumentó en ZDF GN (521 µm) y disminuyó en ZDF (461 µm) con respecto a LZDF (482 µm) (Figura 10, B). En el corazón izquierdo la longitud aumentó tanto en ZDF (434 µm) como ZDF GN (549 µm) con respecto al grupo LZDF (400 µm). El aumento en ZDF GN fue significativo con respecto a LZDF y ZDF (** p < .005) (Figura 10, C).

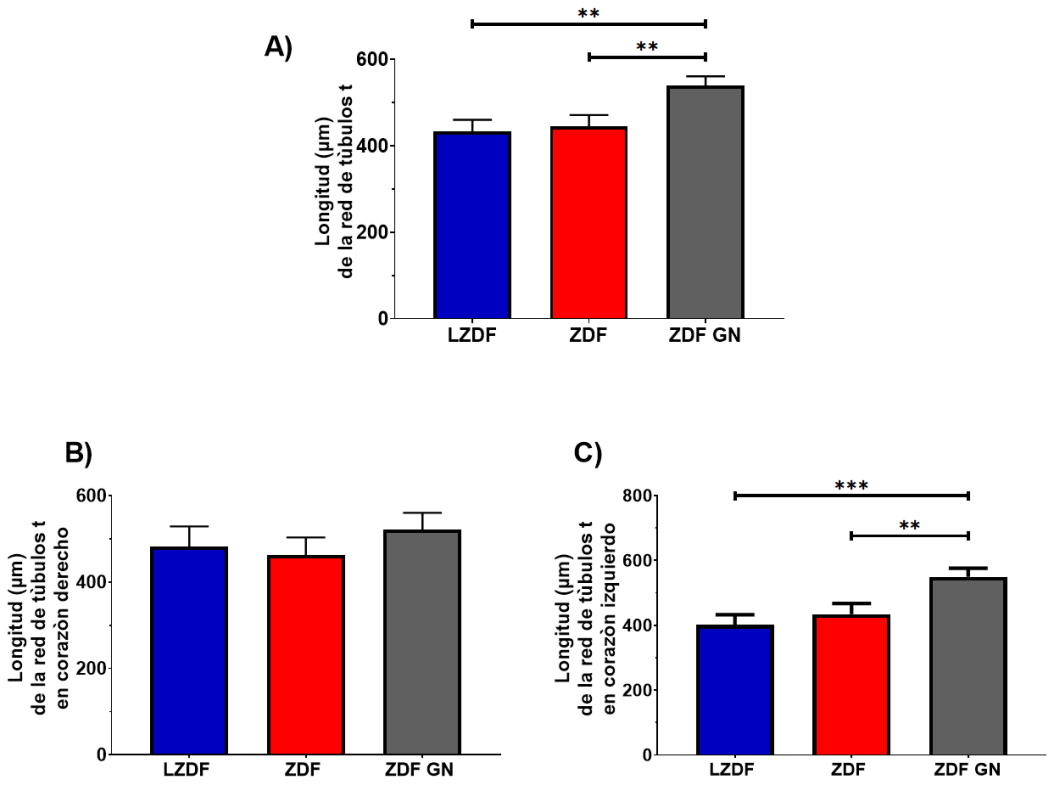

Figura 10. Longitud (µm) de la red de túbulos t. Se evaluó la longitud total en µm de la red de túbulos t en cardiomiocitos de rata de los grupos LZDF (azul, n=43), ZDF (rojo, n=65) y ZDF

GN (gris, n=89). Corazón completo (A): se registró un aumento en la longitud de la red de túbulos t en el grupo ZDF GN comparado con los grupos LZDF y ZDF, siendo este significativo. Corazón derecho (B): se observó un aumento en ZDF y una disminución en ZDF GN con respecto a LZDF. Corazón izquierdo (C): se registró un aumento tanto en ZDF y ZDF GN con respecto a LZDF, siendo este último estadísticamente significativo, así como el aumento de ZDF GN con respecto a ZDF (** $p < .05$, prueba de KRUSKALL-WALLIS).

Porcentaje del área total ocupada por la red de túbulos t

Se evaluó el área ocupada por la red de túbulos t en el cardiomiocito de ratas LZDF, ZDF y ZDF GN. Se registró en corazón completo una disminución en el promedio del área ocupada por la red de túbulos t en cardiomiocitos de ratas ZDF (4%) comparado con los de ratas LZDF (4.3%) y un aumento del área en los cardiomiocitos de ratas ZDF GN (4.6%). Además, se registró un aumento en el área ocupada por la red en cardiomiocitos ZDF GN comparado con ZDF, siendo este significativo (* $p < .05$) (Figura 11, A). En el corazón derecho se observó una disminución en el área ocupada en ZDF (4%) y ZDF GN (4.3%) con respecto a LZDF (4.4%) (Figura 11, B). En el corazón izquierdo se observó una reducción en el área de ZDF (4%) y un aumento en ZDF GN (4.7%) comparado con LZDF (4.3%), y un aumento significativo entre ZDF GN con respecto a ZDF(* $p < .05$) (Figura 11, C).

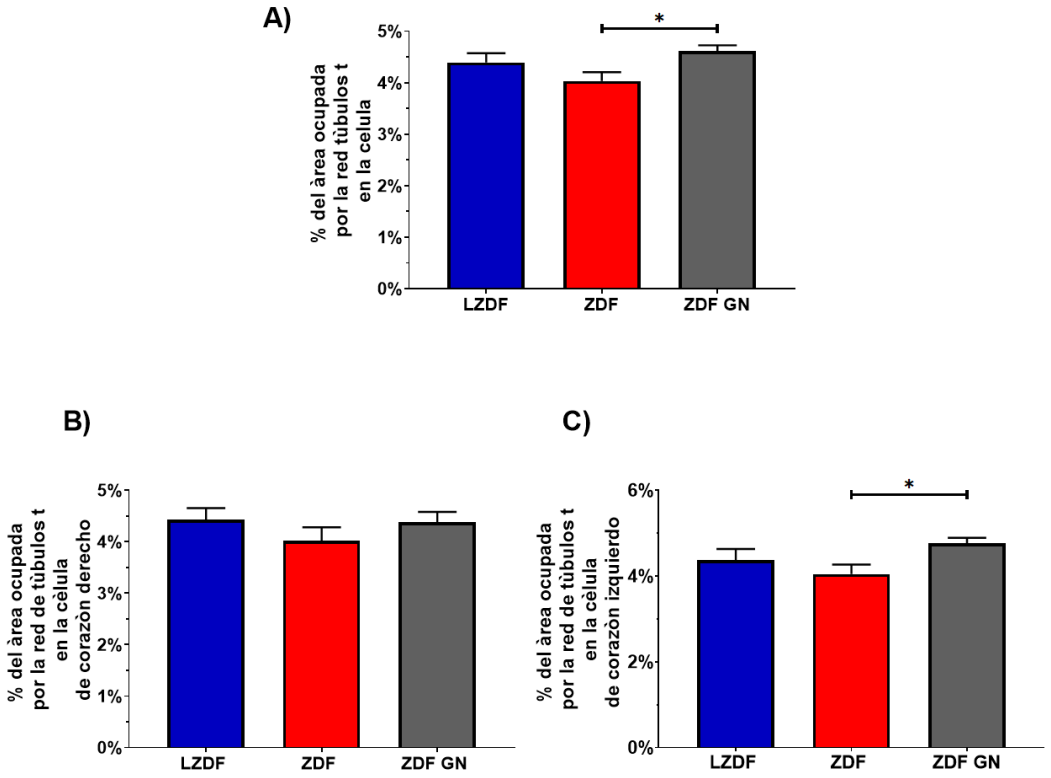

Figura 11. Porcentaje del área celular ocupada por la red de túbulos t. Se evaluó el área celular correspondiente a la red de túbulos t en cardiomiocitos de ratas LZDF (azul, n=43), ZDF (rojo, n=65) y ZDF GN (gris, n=89). Corazón completo e izquierdo (A, C): se registró una reducción del área ocupada en los cardiomiocitos de corazones de ratas ZDF y un aumento en los de ZDF GN comparados con LZDF. En el lado izquierdo, el grupo ZDF GN tuvo un aumento estadísticamente significativo comparado con el grupo ZDF. Corazón derecho (B) se observó una reducción en ZDF y ZDF GN con respecto a LZDF (* $p < .05$, prueba de KRUSKALL-WALLIS [A], prueba de BROWN-FORSYTHE and WELCH [B, C]).

Área del cardiomiocito

Al evaluar el área celular de los cardiomiocitos en corazones de ratas correspondientes a los grupos LZDF, ZDF y ZDF GN, se observó en corazón completo una tendencia al aumento en el área celular en el grupo ZDF (2674 μm^2) con respecto al LZDF (2494 μm^2) y un incremento significativo en el ZDF GN (3069 μm^2) con respecto al grupo LZDF (2494 μm^2) y al grupo ZDF. (Figura 12, A) En el corazón derecho se registró un aumento en el área de los cardiomiocitos del grupo ZDF GN (3120 μm^2) con respecto al LZDF (2735 μm^2)

y ZDF (2456 μm^2), siendo este último significativo, de igual modo se encontró una tendencia a la disminución en el área celular de ZDF con respecto al grupo LZDF (Figura 12, B), y por último, en corazón izquierdo se observó la misma tendencia al aumento que en corazón completo siendo ZDF (2733 μm^2) y ZDF GN (3037 μm^2) mayores que LZDF (2336 μm^2), (Figura 12, C).

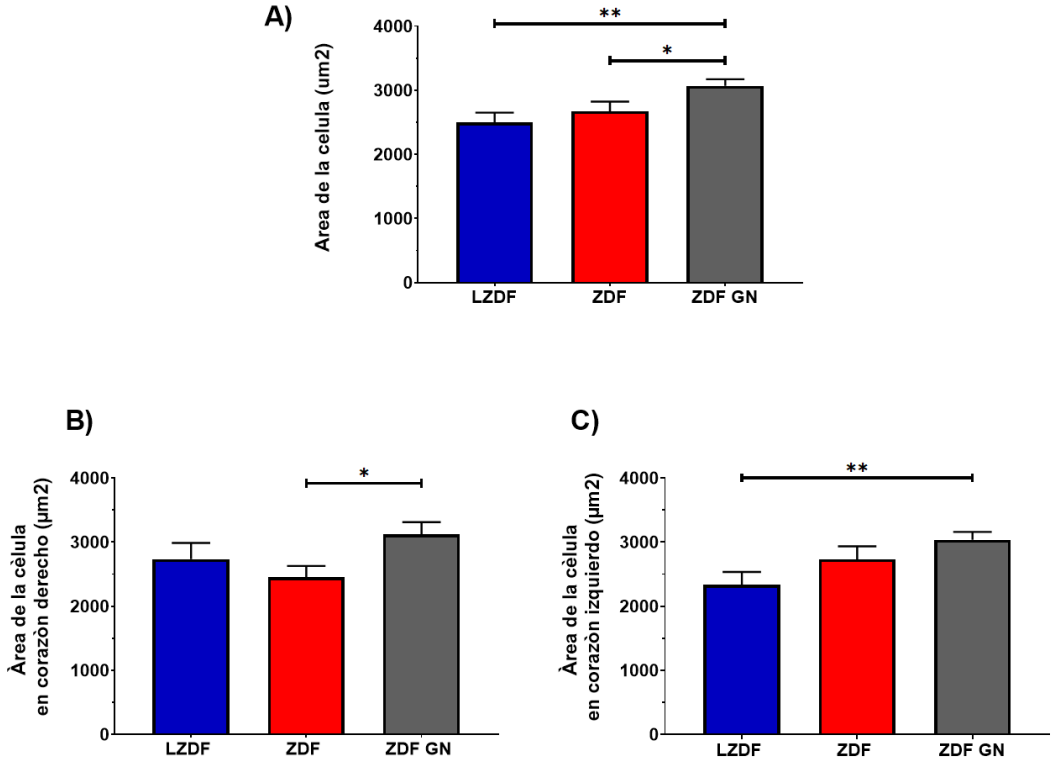

Figura 12. Área celular de los cardiomiocitos. Se evaluó el área de cardiomiocitos de corazones de ratas LZDF (azul, n=43), ZDF (rojo, n=65) y ZDF GN (gris, n=89). En corazón completo (A) se registró un aumento en el área de ZDF GN comparado con LZDF y ZDF, ambos aumentos fueron estadísticamente significativos. En el corazón derecho (B) se observó un aumento en el área celular de los cardiomiocitos de ZDF GN con respecto a los de LZDF y ZDF, siendo este último significativo y, una disminución del área de ZDF con respecto de LZDF. En el corazón izquierdo (C) se registró un aumento en el área de los cardiomiocitos de ZDF y ZDF GN con respecto a LZDF, siendo este último estadísticamente significativo (** $p < .005$, * $p < .05$, Prueba de KRUSKALL-WALLIS [A,C], prueba de BROWN-FORSYTHE and WELCH [B]).

Perímetro del cardiomiocito

Al registrar el perímetro celular de los cardiomiocitos en corazones de ratas correspondientes a los grupos LZDF ZDF y ZDF GN, se observó en corazón completo un aumento en perímetro celular de los grupos ZDF GN (238 µm) comparado contra LZDF (213 µm) y ZDF (218 µm). Ambos aumentos fueron estadísticamente significativos ($p < .05$) (Figura 13, A). En el corazón derecho se observó una reducción en el promedio del perímetro en ZDF (215 µm) y un aumento en ZDF GN (239 µm) comparado contra LZDF (224 µm) (Figura 13, B). En el corazón izquierdo hubo un incremento tanto en ZDF (220 µm) como en ZDF GN (238 µm) con respecto a LZDF (206 µm), siendo este último estadísticamente significativo ($p < .05$) (Figura 13, C).

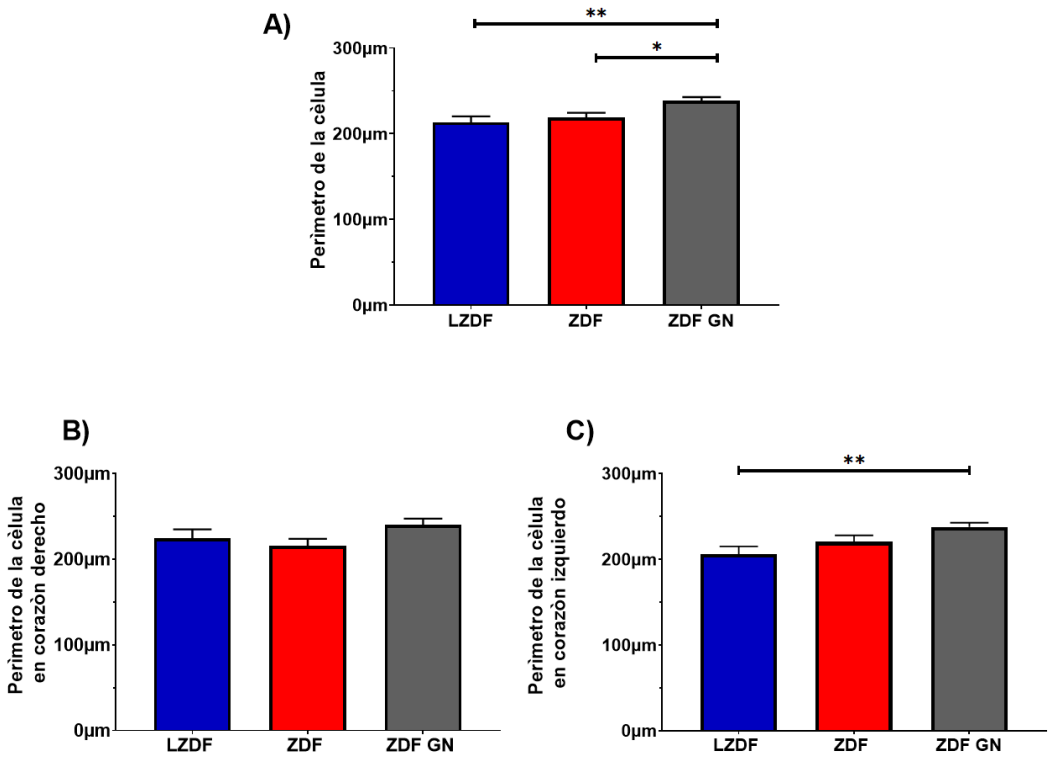

Figura 13. Perímetro celular de los cardiomiocitos. Se evaluó el perímetro de cardiomiocitos de corazones de ratas LZDF (azul, n=43), ZDF (rojo, n=65) y ZDF GN (gris, n=89). En corazón completo (A): se registró un aumento en el perímetro de ZDF GN comparado con ZDF y LZDF, siendo estos significativos. En el corazón derecho (B) se observó un aumento del perímetro celular en ZDF GN y una reducción en LZDF. En el corazón izquierdo (C) hubo un aumento tanto en ZDF como en ZDF GN con respecto a LZDF siendo el último significativo (* $p < .05$, ** $p < .005$, prueba de BROWN-FORSYTHE and WELCH).

Porcentaje de Túbulos t axiales en los cardiomiocitos

Se registró el porcentaje de túbulos t correspondientes al eje longitudinal, en cardiomiocitos de ratas LZDF, ZDF y ZDF GN. En el corazón completo, se observó un aumento en ZDF (51%) y ZDF GN (50%) con respecto de LZDF (47%) (Figura 14, A). En el corazón derecho se registró un aumento en los grupos ZDF (50%) y ZDF GN (50%) comparado con LZDF (43%) (Figura 14, B) y por último en corazón izquierdo, la tendencia se repitió observando un aumento en ZDF (51%) y ZDF GN (50%) contra LZDF (49%); ninguno de los cambios fueron estadísticamente significativos ($p < .05$) (Figura 14, C).

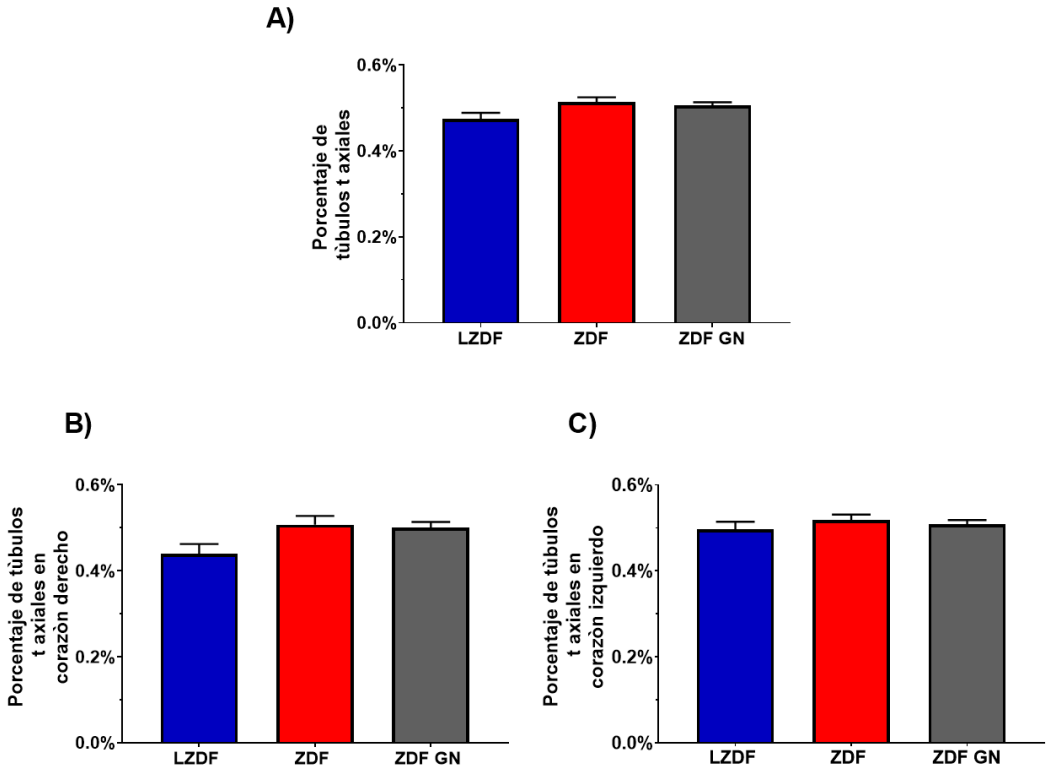

Figura 14. Porcentaje de túbulos t axiales. Se observa en las gráficas el porcentaje de túbulos t correspondientes al eje longitudinal en cardiomiocitos de ratas LZDF (azul, n=43), ZDF (rojo, n=65) y ZDF GN (gris, n=89). En el corazón completo, en derecho e izquierdo (A, B, C, respectivamente) se observa la misma tendencia, un aumento en el porcentaje de túbulos t axiales en ZDF y ZDF GN con respecto a LZDF. Este aumento no fue estadísticamente significativo ($p < .05$, Prueba de prueba de KRUSKALL-WALLIS).

Porcentaje de Túbulos t transversales en los cardiomiocitos

Se registró el porcentaje de túbulos t correspondientes al eje transversal de los cardiomiocitos de ratas LZDF, ZDF y ZDF GN. En el corazón completo, se observó una reducción en el porcentaje de túbulo t transversales en las ratas ZDF (48%) y ZDF GN (49%) con respecto a las LZDF (52%) (Figura 15, A). En el corazón derecho se registró un decremento en los grupos ZDF (49%) y ZDF GN (49%) comparado con LZDF (56%) (Figura 15, B) y, por último, en corazón izquierdo la tendencia se repitió observando una disminución en ZDF (48%) y ZDF GN (49%) contra LZDF (50%). Ninguno de los cambios fueron estadísticamente significativos ($p < .05$) (Figura 15, C).

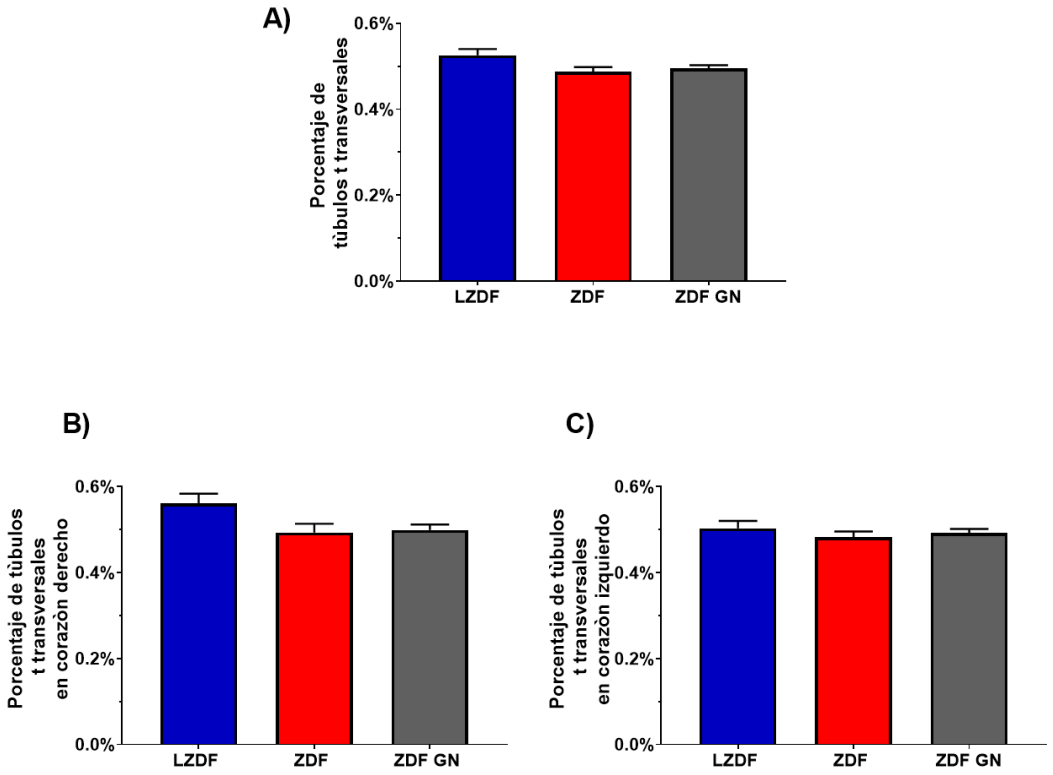

Figura 15. Porcentaje de túbulos t transversales. Se observa en las gráficas el porcentaje de túbulos t correspondientes al eje transversal de los cardiomiocitos de ratas LZDF (azul, n=43), ZDF (rojo, n=65) y ZDF GN (gris, n=89). En el corazón completo, en el lado derecho e izquierdo (A, B, C, respectivamente) se observa la misma tendencia; una disminución en el

porcentaje de túbulos t transversales en ZDF y ZDF GN con respecto a LZDF, que no fue estadísticamente significativa ($p < .05$, Prueba de prueba de KRUSKALL-WALLIS).

7. Discusión

La diabetes se conforma por un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia resultante de defectos en la secreción o acción de insulina, incluso ambas. La hiperglucemia crónica asociada a esta enfermedad se encuentra asociada a daño y falla a largo plazo de distintos órganos en el cuerpo, incluido el corazón. (Association, 2014)

Esta enfermedad afectaba a aproximadamente a 22.9 millones de personas a nivel mundial en el año 2017 y se espera afecte a 26.6 millones en el año 2025 (Lin, 2020). En México se estima que para 2025, 9 millones de personas padezcan esta enfermedad (Levy, 2020); particularmente la diabetes tipo 2, la cual es una de las 10 causas principales de hospitalización en adultos y aumenta el riesgo de sufrir infarto al miocardio o cerebral en ellos. (Rojas et al., 2018)

La diabetes ha sido relacionada fuertemente con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares; en hombres y mujeres aumenta en dos y cinco veces el riesgo de padecer insuficiencia cardiaca, respectivamente. (Paneni, 2008; Russo & Frangogiannis, 2016)

En distintas condiciones patológicas como son el infarto al miocardio, la obesidad, diabetes, cardiomiopatía dilatada o la miocarditis, el corazón se ve sometido a un proceso de remodelación funcional, induciendo cambios en el diámetro de las cavidades, masa, forma o fibrosis que, eventualmente llevan a la insuficiencia cardiaca. (Abel et al., 2008; Azevedo et al., 2016; Jugdutt, 2003)

El sistema tubular axial transverso también conocido como túbulos t y su composición en forma de red, juega un papel imperativo en la correcta distribución del potencial de acción en el cardiomiocito y por ende en el acople excitación-contracción. (Hong & Shaw, 2017)

El rol principal de los túbulos t es propagar el potencial de acción al interior del cardiomiocito y, mediante la formación de diadas y su unidad funcional, los couplónes, acercar los canales de tipo L y receptores RyR2 (Hong & Shaw,

2017; Ibrahim et al., 2011; Manfra et al., 2017); facilitando la liberación de calcio inducida por calcio en las sarcómeras, sin importar que tan profundo estas se encuentren en la célula. A su vez, también sirven como sitios de anclaje para concentrar las proteínas que se encargarán de la extrusión de calcio como son el NCX y la PMCA, cimentando a los túbulos t como estructuras cruciales en el mantenimiento de la homeostasis del calcio en los cardiomiocitos (Ibrahim et al., 2011).

La red de túbulos t no es ajena al proceso de remodelación pues se ha evidenciado que, en modelos de insuficiencia cardiaca, hipertrofia, infarto y diabetes, los túbulos t sufren cambios en su estructura y función. En modelos de insuficiencia cardiaca se presentó un aumento en la desorganización de la red de túbulos t que aumentó de manera progresiva conforme lo hacía la insuficiencia (Louch et al. 2006). Múltiples reportes en esta condición de igual manera evidenciaron desorganización en la red de túbulos t así como un aumento en la dilatación de estos (Louch et al., 2006).

La base fisiopatológica de la insuficiencia cardiaca podría residir, entre otras cosas, en los cambios en la organización y estructura del sistema de túbulos t, los cuales como ya se ha expuesto anteriormente, son esenciales en el proceso de acople excitación-contracción. (Frisk et al., 2018)

En modelos diabéticos algunos los cambios reportados difieren de acuerdo con el modelo estudiado. En ratones db/db un modelo de diabetes mellitus tipo 2, se reportó una pérdida en la densidad así como una desorganización de la red de túbulos t, sin embargo en ratas Goto-Kakizaki (GK/jcl) y spontaneously diabetic Torii (SDT/jcl) modelos de diabetes mellitus tipo 2 no obesos, no se observó pérdida de túbulos t más si, un aumento en la desorganización de estos (Louch et al., 2010).

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta tesis, el aumento en el número de túbulos t, ramificaciones, uniones y terminaciones presentes en el sistema tubular axial transversal en los corazones de ratas ZDF y ZDF GN con respecto al control LZDF, coincidiría con el aumento en la desorganización del sistema reportado en estudios previos (Ibrahim et al., 2011; Louch et al., 2006,

2010), y con resultados de experimentos realizados previamente en el laboratorio (González-Sandoval S, 2020) en los cuales se reportó un aumento en la desorganización de los túbulos t en ratas ZDF y ZDF GN con respecto a LZDF.

El aumento en el número de estas estructuras en los cardiomiocitos puede deberse a una respuesta compensatoria para mantener la homeostasis del calcio en la célula, puesto que, como se ha reportado en estudios previos, el corazón diabético muestra una disminución en la correcta regulación del calcio (Belke et al., 2004). En estudios realizados previamente en el laboratorio, se reportó un aumento en la fuga de calcio y en la velocidad de liberación de calcio del retículo sarcoplásmico en corazones diabéticos, así como un aumento en el calcio total disponible en la célula. Estos resultados se obtuvieron en músculo papilar de corazones en ratas LZDF Y ZDF (Espinosa-Corona A, 2016; tesis de maestría), a pesar de que es una región distinta a la que se estudió en esta tesis, concuerdan con los resultados obtenido por Belke en ventrículo de ratón diabetico (db/db), en los cuales se reportó una disminución en la contractilidad del corazón asociada a un aumento en la fuga de calcio del retículo sarcoplásmico, que a su vez reduce el contenido de calcio de este y la magnitud del transitorio de calcio, (Belke et al., 2004), lo que nos hace pensar que tras la pérdida de la homeostasis de este ion en los cardiomiocitos, se generan más túbulos t con el objetivo de acercar más canales y estructuras reguladoras de calcio al retículo sarcoplásmico. Este sería un mecanismo compensatorio que tendría como fin la formación de nuevas diadas y la recuperación de la homeostasis de calcio, sin embargo, la creación de estas nuevas estructuras no se da de manera organizada y terminan creando diadas que son ineficientes o no funcionales, lo cual explicaría, los cambios en los niveles de calcio intracelular y sus consecuencias funcionales como disminución en la contracción.

Evaluando los cambios en el número de las diferentes partes de los túbulos t en los cardiomiocitos ventriculares del corazón, observamos que las diferencias eran similares al evaluar el corazón completo entre diferentes grupos experimentales que al hacerlo solo con el lado izquierdo del corazón.

Es decir, los cambios globales que encontramos se deben, predominantemente, a la remodelación del ventrículo izquierdo. Una de las posibles explicaciones para la remodelación estructural temprana del ventrículo izquierdo es que el modelo de DM2 que estudiamos, presenta obesidad, lo cual podría someter de manera particular al lado izquierdo del corazón a un esfuerzo mayor, al aumentar la poscarga por el aumento en la resistencia periférica de los vasos. Este aumento en la exigencia mecánica de bombeo del lado izquierdo se puede manifestar como una hipertrofia celular que podría afectar la expresión de Tcap, una integrante del complejo proteico sensible al estiramiento en el miocardio (Ibrahim et al., 2011), y cuya expresión promueve la formación de túbulos t en respuesta a las fuerzas mecánicas estresoras presentes en el corazón.

Al tomar en cuenta los resultados que observamos al evaluar el largo promedio de las ramificaciones de los túbulos t en el corazón, la ausencia de diferencias significativas en el largo de las ramificaciones, podría ser un indicativo del esfuerzo del corazón por crear nuevos túbulos t así como sus componentes, en vez de la modificación de túbulos t existentes. El aumento en el número de estructuras podría elucidar los resultados observados en el aumento de la longitud total de la red de túbulos t, tanto en corazón completo como en el lado izquierdo, pues simplemente al incrementar el número de estructuras aumenta de manera proporcional el largo total y tamaño de la red de túbulos t.

Anteriormente se asumió que los túbulos t eran exclusivamente transversales, sin embargo, en 1971, se reportó la existencia de componentes axiales (Sperelakis & Rubio, 1971). Estudios subsecuentes establecieron la importancia de los túbulos t axiales y su rol en el acople excitación-contracción (Ibrahim et al. 2011). En estudios previos se encontró que los túbulos t axiales resisten más los procesos de remodelación, pues la proporción de 60% transversales y 40% axiales reportada previamente (Soeller & Cannell, 1999), se ve alterada en un amplio rango de patologías cardiacas a expensas de cambios en la expresión de los túbulos t transversales. Algunas de estas alteraciones son, tanto pérdida completa de túbulos t, como una pérdida de estructuras transversales y un aumento de estructuras longitudinales (Jayasinghe et al., 2014). En cuanto al análisis de direccionalidad de la red de

túbulos t, nuestros registros concuerdan con resultados previamente descritos; a pesar de no encontrar diferencias significativas encontramos una tendencia a la disminución de componentes transversales de la red de túbulos t y de manera inversamente proporcional encontramos un aumento en el número de componentes axiales. Hasta el momento se desconoce la causa de este fenómeno en la remodelación, sin embargo, podemos asumir que el corazón puede soportar la pérdida de estructuras transversales y no sufrir una insuficiencia cardiaca inmediata debido al aporte funcional de los túbulos t longitudinales en el acople excitación-contracción (Jayasinghe et al., 2009; Manfra et al., 2017).

Por último, la morfología de los cardiomiocitos rige su función por lo que analizamos el tamaño de los cardiomiocitos, pues alteraciones en este podrían causar un desarreglo estructural y funcional que podría afectar a los túbulos t,alterar la formación de diadas, afectando la distribución y el aprovechamiento del calcio y consecuentemente alterando el acople excitación contracción. Al analizar el área y el perímetro de los cardiomiocitos, encontramos un aumento en el perímetro celular en corazón completo en cardiomiocitos del grupo ZDF GN con respecto a LZDF y ZDF; en corazón izquierdo la tendencia al aumento se repitió, sin embargo, en corazón derecho observamos una disminución en el perímetro de ZDF con respecto a LZDF y un aumento de ZDF GN con respecto a LZDF y ZDF. Con respecto al análisis del área celular, se encontró un aumento significativo en el área de los cardiomiocitos de los modelos ZDF y ZDF GN con respecto al control, en el corazón izquierdo. Se encontró una tendencia similar a la encontrada en corazón completo, este desarrollo puede deberse a múltiples mecanismos que alteran el tamaño ventricular como: hipertensión, sobrecarga del volumen, un aumento en el IMC, así como anormalidades en el llenado ventricular. (Abel et al., 2008) En el corazon derecho encontramos una tendencia al aumento sin embargo, esta no fue significativa, entre el grupo LZDF y el grupo obeso normoglicemico ZDF GN, lo cual concuerda con reportes previos en los cuales se reporto un aumento moderado en el tamano del ventriculo derecho en humanos, aunado a esto encontramos un a disminucion en el area de los cardiomiocitos ZDF con respecto a LZDF (Abel et al., 2008; Wong et al., 2006)

Estos resultados sugieren un aumento en el tamaño de las células que corresponde con los resultados reportados por trabajos previos donde se reportó un aumento en el tamaño celular causado por hipertrofia asociada a diabetes en ventrículo izquierdo. (Boudina & Abel, 2007, 2010). En trabajos previos del laboratorio, se ha reportado también un aumento en la capacitancia celular, una medida indirecta pero precisa del área celular, lo que sugiere, una hipertrofia del cardiomiocito y un aumento en el área de la membrana celular, que podría estar siento subvalorada, debido a la formación de nuevos túbulos t. (González-Sandoval S. 2016; tesis de maestría)

Estos resultados solo nos confirman la existencia de alteraciones y la naturaleza de estas en la red de túbulos t sin embargo, es imperativo el proponer un seguimiento a estos para tratar de explicar con certeza los mecanismos que provocan estos cambios; desde la medición de la expresión de proteínas reguladoras como lo son Bin 1, Juntophilina y Tcap, así como el complementar los resultados aquí presentados con análisis de capacitancia de membrana, transitorios de calcio y expresión de estructuras reguladoras de calcio, con el fin de pintar un panorama más amplio de la regulación de la red de túbulos t, la respuesta compensatoria y remodelación del corazón y el rol de estos en el mantenimiento de la homeostasis de calcio.

8. Conclusiones

Tanto la diabetes como la obesidad son factores de riesgo que promueven estados patológicos en el corazón como la fibrosis, hipertensión e hipertrofia, los cuales derivan en un proceso de remodelación estructural que afecta de manera funcional al tejido.

Uno de los cambios funcionales que se presentan son alteraciones en la homeostasis de calcio intracelular, la cual se puede deber entre otras cosas a la remodelación de los túbulos t, los cuales son estructuras clave en el acople excitación contracción.

Con base en nuestros resultados suponemos que los cambios encontrados tratan de suplir carencias funcionales, aumentando el alcance de la red de túbulos t en el cardiomiocito a través de la creación de nuevas estructuras. Los cambios más frecuentemente encontrados fueron en el lado izquierdo del corazón y pueden deberse a múltiples factores mecánicos involucrados en el proceso de contracción, lo que nos ayuda a pintar un panorama integral y confirmar lo que estudios previos han encontrado, que no solo factores químicos están involucrados en el proceso de remodelación sino factores mecánicos como lo son presión y estiramiento, fuerzas a las cuales el ventrículo izquierdo se ve sometido más que el ventrículo derecho.

Finalmente, una vez encontrados cambios en la estructura de los túbulos t y conociendo algunas de las consecuencias que estos pueden tener funcionalmente en el corazón, es imperativo el estudiar las bases moleculares de dichos cambios, como lo serían los niveles de expresión de proteínas reguladoras de los túbulos t en condiciones de diabetes y obesidad.

9. Bibliografía

Abel, E. D., Litwin, S. E., & Sweeney, G. (2008). Cardiac remodeling in obesity. In *Physiological Reviews* (Vol. 88, Issue 2, pp. 389–419). Physiol Rev. https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2007

A.D.A. American Diabetes Association . (2021). *Diagnosis*. Obtenido de American Diabetes Association : https://www.diabetes.org/a1c/diagnosi

Association, A. D. (2014). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, *37*(Supplement 1), S81–S90. https://doi.org/10.2337/DC14-S081

Azevedo, P. S., Polegato, B. F., Minicucci, M. F., Paiva, S. A. R., & Zornoff, L. A. M. (2016). Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. In *Arquivos brasileiros de cardiologia* (Vol. 106, Issue 1, pp. 62–69). Arquivos Brasileiros de Cardiologia. https://doi.org/10.5935/abc.20160005

Barret, K. (s.f.). *Ganong Medical Physiology.* Mc-Graw Hill. Recuperado el 2 15, 2021

Bers, D. M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. In *Nature* (Vol. 415, Issue 6868, pp. 198–205). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/415198a

Boron, W., & Boulpaep, E. (2012). *Medical Physiology Boron.* Elsevier Health Sciences. Recuperado el 2 18, 2021

Boudina, S., & Abel, E. D. (2007). Diabetic cardiomyopathy revisited. In *Circulation* (Vol. 115, Issue 25, pp. 3213–3223). https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.679597

Boudina, S., & Abel, E. D. (2010). Diabetic cardiomyopathy, causes and effects. In *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* (Vol. 11, Issue 1, pp. 31–39). https://doi.org/10.1007/s11154-010-9131-7

Eisner, D. A., Caldwell, J. L., Kistamás, K., & Trafford, A. W. (2017). Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. In *Circulation Research* (Vol. 121, Issue 2, pp. 181–195). Lippincott Williams and Wilkins. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310230

ENSANUT. (2016). Ensanut 2016. *Instituto Nacional de Salud Pública*, *2016*(Ensanut), 200. http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf

Espinosa-Corona, A., (2016). Alteraciones de los mecanismos de regulación de calcio intracelular en cardiomiocitos del ventrículo derecho y del izquierdo en la rata zucker, un modelo animal de diabetes mellitus tipo 2, Tesis de maestría

Fowlkes, V., Clark, J., Fix, C., Law, B. A., Morales, M. O., Qiao, X., Ako-Asare, K., Goldsmith, J. G., Carver, W., Murray, D. B., & Goldsmith, E. C. (2013). Type II diabetes promotes a myofibroblast phenotype in cardiac fibroblasts. *Life Sciences*, *92*(11), 669–676. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.01.003

Frisk, M., Frisk, M., Le, C., Dahl, C. P., Lunde, I. G., Almaas, V. M., Gullestad, L., Aakhus, S., Sejersted, O. M., Tønnessen, T., & Louch, W. E. (2018). T-Tubule Loss is a Prominent Feature of HFrEF but not HFpEF. *Biophysical Journal*, *114*(3), 618a. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.11.3347

Greene, A. L., Lalli, M. J., Ji, Y., Babu, G. J., Grupp, I., Sussman, M., & Periasamy, M. (2000). Overexpression of SERCA2b in the heart leads to an increase in sarcoplasmic reticulum calcium transport function and increased cardiac contractility. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(32), 24722–24727. https://doi.org/10.1074/jbc.M001783200

González-Sandoval, S., (2016). Análisis del potencial de acción y corrientes repolarizantes Ito, Ik, e Ik1 en miocitos del ventrículo derecho del corazón en un modelo animal de diabetes mellitus tipo 2. Tesis de maestría 2016.

González Sandoval, S., Ramírez González, A., Galindo Ramírez, F., Avelino Cruz, J. E. (2020). Desorganización del sistema de túbulos T y desregulación del calcio intracelular en cardiomiocitos de rata ZDF-Gn, un subgrupo no diabético y obeso de las ratas ZDF. Bio Ciencias 7: (Suppl) Memorias de Congreso. LXIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, A. C. e1097. http://doi.org/10.15741/revbio.07Suppl.e1097

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. In *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* (Vol. 34, Issue 8, pp. 941–950). Academic Press. https://doi.org/10.1006/jmcc.2002.2032

Guy B, Mulder., Luo, Steve., Gramlich, Peggy. (2010). *Diet Evaluation Study for the Induction of Type 2 Diabetes in Obese Female ZDF Rats | Charles River | Enhanced Reader*. (n.d.). Retrieved April 27, 2021, from moz-extension://1e90a63b-98b7-4950-8fbb-d1da5aca668b/enhanced-reader.html?openApp&pdf=https%3A%2F%2Fwww.criver.com%2Fsites%2Fdefault%2Ffiles%2FTechnical%2520Resources%2FDiet%2520Evaluation%2520Study%2520for%2520the%2520Induction%2520of%2520Type%25202%2520Diabetes%2520in%2520Obese%2520Female%2520ZDF%2520Rats.pdf

Hall, J. (2011). *Guyton and Hall Medical Physiology.* Saunders. Recuperado el 2 15, 2021

Heo, Y. R., Claycombe, K., Jones, B. H., Wright, P., Truett, G. E., Zemel, M., Banz, W., Maher, M., & Moustaid-Moussa, N. (2002). Effects of

fatty (fa) allele and high-fat diet on adipose tissue leptin and lipid metabolism. *Hormone and Metabolic Research*, *34*(11–12), 686–690. https://doi.org/10.1055/s-2002-38264

Hong, T. T., & Shaw, R. M. (2017). Cardiac t-tubule microanatomy and function. *Physiological Reviews*, *97*(1), 227–252. https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2015

Ibrahim, M., Gorelik, J., Yacoub, M. H., & Terracciano, C. M. (2011). The structure and function of cardiac t-tubules in health and disease. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *278*(1719), 2714–2723. https://doi.org/10.1098/rspb.2011.0624

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

Jayasinghe, I. D., Clowsley, A. H., Munro, M., Hou, Y., Crossman, D. J., & Soeller, C. (2014). Revealing t-tubules in striated muscle with new optical super-resolution microscopy techniques. *European Journal of Translational Myology*, *25*(1), 15. https://doi.org/10.4081/ejtm.2015.4747

Jugdutt, B. I. (2003). Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: When is enough enough? In *Circulation* (Vol. 108, Issue 11, pp. 1395–1403). Circulation. https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000085658.98621.49

Klabunde, R. (2005). *Cardiovascular Physiology Concepts.* Lippincott Williams & Wilkins. Recuperado el 2 17, 2021

Koektuerk, B., Aksoy, M., Horlitz, M., Bozdag-Turan, I., & Turan, R. G. (2016). Role of diabetes in heart rhythm disorders. *World Journal of Diabetes*, *7*(3), 45. https://doi.org/10.4239/WJD.V7.I3.45

Levy, T., Vielma, E., Hernández O., Martínez M, Mojica J, Cuevas L, Santaella-l JA, Rivera J. (2020) Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19: Resultados Nacionales. Instituto Nacional de Salud Pública. https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_informe_final.pdf

Lin, X., Xu, Y., Pan, X. *et al.* Global, regional, and national burden and trend of diabetes in 195 countries and territories: an analysis from 1990 to 2025. *Sci Rep* **10,** 14790 (2020). https://doi.org/10.1038/s41598-020-71908-9

Louch, W. E., Mørk, H. K., Sexton, J., Strømme, T. A., Laake, P., Sjaastad, I., & Sejersted, O. M. (2006). T-tubule disorganization and reduced synchrony of Ca^{2+} release in murine cardiomyocytes following myocardial infarction. *The Journal of Physiology*, *574*(2), 519–533. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.107227

Louch, W. E., Sejersted, O. M., & Swift, F. (2010). There goes the neighborhood: Pathological alterations in T-tubule morphology and consequences for cardiomyocyte Ca2+ handling. In *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (Vol. 2010). https://doi.org/10.1155/2010/503906

Manfra, O., Frisk, M., & Louch, W. E. (2017). Regulation of Cardiomyocyte T-Tubular Structure: Opportunities for Therapy. In *Current Heart Failure Reports* (Vol. 14, Issue 3, pp. 167–178). Current Science Inc. https://doi.org/10.1007/s11897-017-0329-9

Marks, A. R. (2003). Calcium and the heart: A question of life and death. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 111, Issue 5, pp. 597–600). The American Society for Clinical Investigation. https://doi.org/10.1172/JCI18067

Paneni, F. (2008). The Pathophysiology of Cardiovascular Disease and Diabetes: Beyond Blood Pressure and Lipids. *Diabetes Spectrum*, *21*(3), 160–165. https://doi.org/10.2337/diaspect.21.3.160

Pinali, C., Holt, C. M., Bennett, H. J., Davenport, J. B., Walker, R., Murfitt, L., Allan, L. J., Malik, N., & Kitmitto, A. (2015). 166 T-tubule remodelling and formation of super-tubules in the border zone of cardiac myocytes in the infarcted pig heart. *Heart*, *101*(Suppl 4), A94.2-A94. https://doi.org/10.1136/heartjnl-2015-308066.166

Poulet, C., Sanchez-Alonso, J., Swiatlowska, P., Mouy, F., Lucarelli, C., Alvarez-Laviada, A., Gross, P., Terracciano, C., Houser, S., & Gorelik, J. (2021). Junctophilin-2 tethers T-tubules and recruits functional L-type calcium channels to lipid rafts in adult cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*, *117*(1), 149–161. https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa033

Rojas, R., Basto, A., Aguilar, C., Zárate, E., Villalpando, S., & Barrientos, T. (2018). Prevalencia de diabetes por diagnóstico médico previo en México. *Salud Pública de México*, *60*(3), 224–232. http://www.saludpublica.mx/index.php/spm/article/view/8566

Russo, I., & Frangogiannis, N. G. (2016). Diabetes-associated cardiac fibrosis: Cellular effectors, molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *90*, 84–93. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.12.011

Sperelakis, N., & Rubio, R. (1971). An orderly lattice of axial tubules which interconnect adjacent transverse tubules in guinea-pig ventricular myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *2*(3), 215–220. https://doi.org/10.1016/0022-2828(71)90054-X

Wang, X., Dubois, D. C., Sukumaran, S., Ayyar, V., Jusko, W. J., & Almon, R. R. (2014). Variability in zucker diabetic fatty rats: Differences in disease progression in hyperglycemic and normoglycemic animals.

Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy, *7*, 531–541. https://doi.org/10.2147/DMSO.S69891

Wagner, E., Brandenburg, S., Kohl, T., & Lehnart, S. E. (2014). Analysis of Tubular Membrane Networks in Cardiac Myocytes from Atria and Ventricles. *J. Vis. Exp*, *92*, 51823. https://doi.org/10.3791/51823

Wong, C. Y., O'Moore-Sullivan, T., Leano, R., Hukins, C., Jenkins, C., & Marwick, T. H. (2006). Association of subclinical right ventricular dysfunction with obesity. *Journal of the American College of Cardiology*, *47*(3), 611–616. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.11.015