



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA

LABORATORIO DE CARDIOLOGÍA MOLECULAR

*“ALTERACIONES EN LA CORRIENTE DE CALCIO TIPO L EN LOS MUSCULOS PAPILARES
DE UN MODELO ANIMAL CON SÍNDROME METABÓLICO.”*

TESIS PROFESIONAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOMEDICINA

PRESENTA

Saret Dávila Santacruz

DIRECTOR DE TESIS

D. en C. José Everardo Avelino Cruz

AGRADECIMIENTOS.

A mis padres Alina e Israel por todo el amor, cariño y apoyo incondicional que me han brindado en todas las etapas de mi vida, por todos esos grandes consejos y las enseñanzas que me han hecho ver que la vida tiene grandes retos pero con perseverancia y amor se logran cumplir todas las metas que me proponga.

A mis hermanos Ali e Isra por todos aquellos momentos tan maravillosos que me hemos pasado juntos, porque a pesar de las circunstancias en las que estuviera siempre me han sacado sonrisas animándome a seguir adelante.

A Joan Pablo que me ha enseñado lo que es el verdadero amor por compartir momentos y experiencias maravillosas durante estos años, por enseñarme a vivir la vida con pasión y que cada día siempre hay algo nuevo por descubrir, a fijarme en los pequeños detalles de la vida así como disfrutarlos o aprender de ellos, por todo el apoyo, amor y cariño incondicional que me has brindado siempre.

A mis abuelos Yolanda y Raciél por los grandes consejos y conocimientos que han compartido conmigo así como el amor y cariño que me han brindado siempre.

A mis amigos José, Octavio y Aldo por todos aquellos momentos inolvidables que quedaran guardados para siempre, por apoyarme en todo momento, porque mas que amigos fuimos como hermanos, gracias por contar siempre con ustedes.

A mis compañeros de Biomedicina 2009, gracias por compartir el mismo camino, las mismas experiencias, el apoyo reflejado en el compañerismo y porque descubrimos que siempre necesitaremos unos de otros.

A mis compañeros de trabajo Sosipater, Alfredo y Josué gracias por su apoyo, compañerismo, respeto, por enseñarme lo que es en realidad un buen equipo de trabajo y por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos.

Al Dr. Roberto Berra por todas las enseñanzas y grandes consejos en etapas tempranas de mi formación.

Al Dr. Julián Torres por compartir sus conocimientos y consejos en mi etapa de formación final, pero sobre todo agradezco la confianza que ha depositado en mí.

Al Dr. Everardo Avelino por sus todas sus enseñanzas, por destinar parte de su tiempo en enseñarme diversas técnicas que estoy segura me servirán en un futuro, pero sobre todo gracias por la paciencia que me ha brindado, la confianza y comprensión.

INDICE

RESUMEN	6
ABREVIATURAS.....	8
INTRODUCCIÓN	9
ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DEL CORAZÓN.....	9
Sistema de conducción del corazón.....	11
POTENCIAL DE ACCIÓN CARDIACO.	13
CORRIENTES INVOLUCRADAS EN EL POTENCIAL DE ACCIÓN.	14
EL ION CALCIO COMO MODULADOR	18
• La corriente de calcio. I_{Ca}	18
ACOPLE EXCITACIÓN CONTRACCIÓN.....	20
SÍNDROME METABÓLICO	25
PREVALENCIA EN MÉXICO	28
ANTECEDENTES	32
PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA	36
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	37
HIPÓTESIS	37
OBJETIVO GENERAL:.....	37
OBJETIVOS PARTICULARES.....	37
DIAGRAMA DE TRABAJO.....	38
MATERIAL Y METODOS.	39
MODELO ANIMAL DE SÍNDROME METABÓLICO.....	39
AISLAMIENTO DE MIOCITOS DE LOS MÚSCULOS PAPILARES	39
REGISTRO DE LA $I_{Ca^{2+}}$	41
REGISTRO DE CALCIO INTRACELULAR.	42
RESULTADOS EN EL MODELO ANIMAL DE 2 MESES DE TRATAMIENTO.	46
RESULTADOS	47
Resultados en el modelo animal de 2 meses.	47
Parámetros bioquímicos	47
Parámetros morfométricos.....	48
Registro de corrientes de calcio tipo L.	50
Regulación de calcio intracelular.....	59

RESULTADOS EN EL MODELO ANIMAL DE 6 MESES DE TRATAMIENTO.....	65
Resultados en el modelo animal de 6 meses.	66
Parámetros bioquímicos.	66
Parámetros morfométricos.....	67
Registro de la corriente de calcio tipo L.....	68
Regulación del calcio intracelular.....	76
DISCUSION	81
CONCLUSIONES	86
REFERENCIAS.....	87

RESUMEN

El síndrome metabólico es conjunto de alteraciones en el metabolismo el cual comprende 5 signos que son la hipertensión, hiperglucemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia y obesidad central, aunque solo se necesitan 3 de estos signos para diagnosticarlo en humano. En nuestro país, las patologías asociadas a este síndrome, como las alteraciones cardiovasculares y la diabetes mellitus tipo II, se han convertido en una de las principales causas de mortalidad. Estudios previos realizados por el grupo del Dr. Julian Torres Jácome, demostraron que el síndrome metabólico induce no solo una remodelación eléctrica y morfológica del nodo senoauricular si no también el desacople en el proceso de excitación contracción de los músculos papilares del corazón. El presente trabajo está enfocado al estudio de la alteraciones provocadas por el síndrome metabólico sobre el acople excitación contracción de las células cardiacas, más específicamente, nos interesa saber si el transitorio de calcio generado durante la contracción cardiaca y la corriente de calcio tipo L, la cual da inicio a proceso de contracción, resultan alteradas. Para ellos utilizaremos miocitos cardiacos aislados provenientes de los músculos papilares derecho e izquierdo del corazón de ratas sometidas durante dos y seis meses a una dieta rica en carbohidratos para inducir el síndrome metabólico. El registro de la corriente iónica lo realizamos con la técnica de Patch clamp mientras que para las mediciones del calcio intracelular usaremos un equipo de microfluorimetría. En el modelo animal de 2 meses de tratamiento encontramos una aumento en la corriente de Calcio tipo L solo en los miocitos de músculos papilares izquierdos mientras que en los miocitos de los papilares derechos encontramos un incremento en la amplitud de los transitorios de de calcio junto con una disminución de la velocidad de de decaimiento, es decir, con una disminución de la velocidad de recaptura del calcio. Estos resultados explican el aumento en la duración del potencial de acción en los papilares izquierdos y el aumento en la fuerza de contracción de los papilares derechos previamente reportados por Vázquez Pérez EM para este modelo animal. Por lo que respecta al modelo de síndrome metabólico de 6 meses, no encontramos cambios significativos en las corrientes de calcio pero si un aumento la concentración de calcio intracelular durante la contracción en los miocitos de ambos papilares y una disminución en el

tiempo en que el calcio intracelular torna a los valores diastólicos. Estos resultados sugieren que el proceso de remodelación eléctrica y del sistema de regulación de calcio durante el desarrollo del síndrome metabólico afecta en modo diferencial la función de ambos ventrículos y además, los cambios pueden ser temporales como en el caso de la corriente de calcio o bien, permanentes como lo fue la alteración en la liberación del calcio intracelular en los miocitos de los papilares derechos.

ABREVIATURAS

AHA.- Asociacion Americana del Corazón.

Nodo AV.- Nodo Auriculo Ventricular

Cav.- Canal de calcio dependiente de voltaje

DM2.- Diabetes Mellitus tipo II

ECG.- Electrocardiograma

ENSANUT.- Encuesta Nacional de Salud y Nutricion.

HDL.- Lipoproteinas de alta densidad.

HVA.- Canales activados por alto voltaje.

I_{Ca,L}.- Corriente de calcio tipo L

IKir.- Corriente de potasio rectificadora entrante.

IL-B.- Interleucina B.

IL-6.- Interleucina 6.

Ito.- Corriente transitoria de potasio.

Kv.- Canal de potasio dependiente de voltaje.

LVA.- Canales activados por bajo voltaje.

MCU.- Uniportador de calcio mitocondrial.

Nav.- Canal de sodio dependiente de voltaje.

NCEP-ATP III.- National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III

NCX.- Intercambiador de membrana de Na⁺/K⁺.

OMS.- Organización Mundial de la Salud.

PA.- Potencial de acción.

PEMCA.- Bomba de Ca²⁺ de la membrana plasmática.

PKA.- Protein quinasa A.

PLN.- Fosfolambdano.

RyR.- Receptor a rianodina.

Nodo SA.- Nodo senoauricular.

SERCA.- ATPasa de Ca²⁺ del retículo sarcoplasmico.

SM.- Síndrome metabólico.

SR.- Retículo sarcoplasmico.

TNFα.-Factor de necrosis tumoral alfa

INTRODUCCIÓN

ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL CORAZÓN

El corazón es un órgano hueco muscular que posee cuatro cavidades por medio de las cuales circula la sangre mediante un ciclo que comprende dos principales mecanismos, la diástole y la sístole. El corazón está localizado en la parte inferior del mediastino rodeado de una capa serosa llamada pericardio; el cual descansa sobre el diafragma y limita por arriba con el orificio torácico superior. Posee la forma de un cono o pirámide invertida en el cual se reconocen dos estructuras principales, la base que se encuentra dirigida hacia atrás y arriba y a la derecha, y un vértice o punta (ápex), situado adelante y a la izquierda. (Latarjet y Liard 2004).

El corazón está dividido en dos partes, la derecha e izquierda y cada lado posee dos cavidades, una aurícula y un ventrículo, separados respectivamente por un orificio auriculoventricular en el cual se encuentran las válvulas fibrosas que se abren en dirección de los ventrículos; la válvula tricúspide para el lado derecho y la válvula mitral para el lado izquierdo. Estas válvulas permiten el flujo de sangre unidireccional a través del corazón ya que poseen valvas o cúspides, que son láminas delgadas de tejido conectivo fibroso que se insertan en la pared del orificio valvular y cuyos bordes libres se adosan unos a otros durante el cierre. Ambas caras de las valvas están cubiertas por una capa similar al endocardio que impide la formación de coágulos. La válvula mitral que separa la aurícula izquierda del ventrículo izquierdo, tiene dos valvas, una anterior y otra posterior de menor tamaño. Por otro lado, la válvula tricúspide que separa la aurícula derecha del ventrículo derecho, tiene tres válvulas de tamaño semejante. Así pues, los ventrículos también tienen orificios de salida como el tronco pulmonar en el ventrículo derecho y el orificio de la aorta en el ventrículo izquierdo, los cuales también poseen válvulas de menor tamaño que las válvulas auriculoventriculares y son llamadas válvula pulmonar y aortica, respectivamente. Cada válvula está compuesta por tres valvas llamadas semilunares las cuales poseen forma de nido de golondrina con la cavidad orientada hacia la luz de arteria. (Fisiología, células, órganos y sistemas, Julio Muñoz y Xaviera García 1998).

La sangre fluye normalmente en forma continua desde las grandes venas hacia las aurícula derecha, posteriormente y gracias al aumento moderado de presión que se ha generado en

las aurículas por la llegada de sangre a través de las venas cava superior e inferior, se abre la válvula auriculo ventricular y permite que la sangre fluya rápidamente hacia el ventrículo derecho. En humano cuando en el ventrículo derecho aumenta la presión ligeramente por encima de 80 mmHg se abre la válvula semilunar pulmonar; cerca del 70% del vaciado ventricular se produce durante el primer tercio del periodo de eyección y el 30% restante del vaciado durante los dos tercios siguientes de eyección. Al llegar la sangre a los pulmones se lleva a cabo el proceso de intercambio gaseoso dando como resultado la oxigenación de la sangre, la cual pasa a través de las venas pulmonares y llega a la aurícula izquierda, generando una acumulación de sangre, un aumento en la presión dentro de la aurícula izquierda y posteriormente la apertura de la válvula mitral. Con la apertura de esta válvula la sangre fluye rápidamente al ventrículo izquierdo y cuando la presión excede los 80 mmHg la válvula semilunar aortica se abre permitiendo la eyección de la sangre hacia el nivel sistémico, por medio de las ramas de la aorta hasta llegar a los capilares en los tejidos periféricos donde se lleva a cabo el intercambio gaseoso con la difusión del oxígeno hacia los tejidos y al mismo tiempo la recolección de dióxido de carbono proveniente del metabolismo celular, de esta manera la sangre venosa retorna hacia la aurícula derecha del corazón por medio de la vena cava superior e inferior completando así de nuevo el ciclo. (Fisiología, células, órganos y sistemas, Julio Muñoz y Xaviera García 1998).

El corazón está constituido principalmente por 3 capas una externa denominada pericardio, una media muscular denominada miocardio y una interna denominada endocardio. El pericardio la capa más externa de la pared del corazón el cual es una lámina visceral serosa, compuesta por un epitelio escamoso simple conocido como mesotelio, una de las características principales del pericardio es el almacenamiento de grasa en la superficie del corazón, así mismo contiene vasos coronarios, nervios y ganglios. El pericardio visceral se continúa del pericardio parietal, estas dos capas envuelven al corazón y forman una cavidad pericárdica que contienen una pequeña cantidad de líquido seroso que sirve como lubricante entre ambas capas. El miocardio es la capa media y más gruesa del corazón y contiene a las células de musculo cardiaco, las cuales poseen diferentes funciones que van desde fijación al esqueleto cardiaco fibroso, secreción de

factores endocrinos y generación y conducción de impulsos eléctricos. Finalmente, la cara interna del miocardio es continuada con el endocardio, el cual está constituido por endotelio que consiste en un epitelio escamoso simple, una capa subyacente de tejido conjuntivo fibroelástico con fibroblastos dispersos y por una capa más profunda con fibras elásticas entremezcladas con células de musculo liso, además un tejido conjuntivo laxo que contiene pequeños vasos sanguíneos, nervios y fibras de Purkinje del sistema de conducción del corazón.(Texto y Atlas de Histología, Leslie P. Gartner).

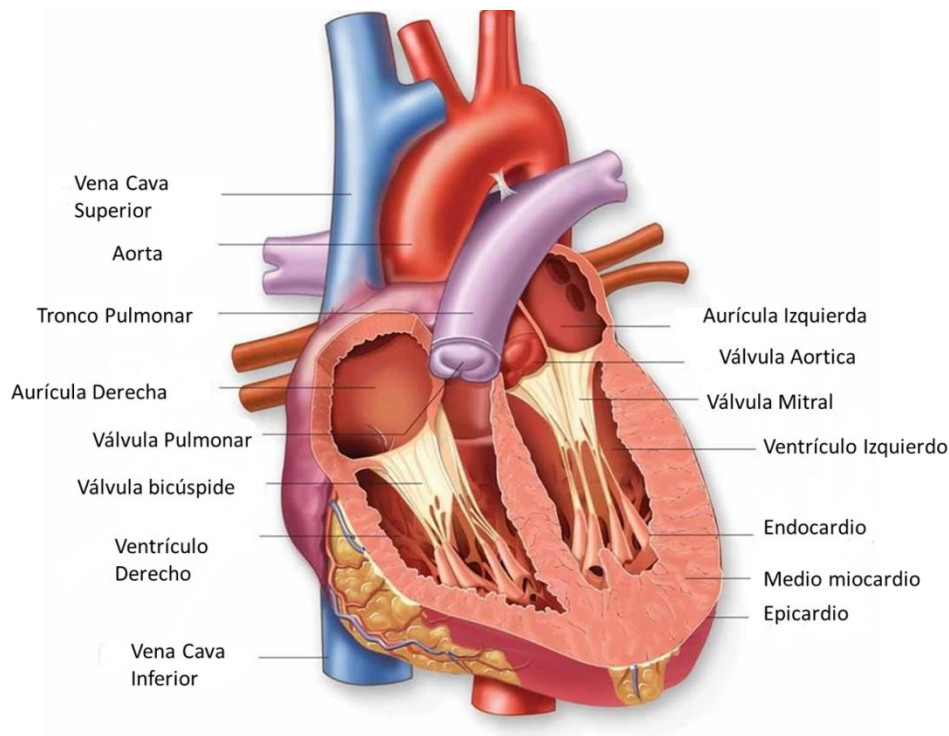


Figura 1. Anatomía del corazón. Representación de los puntos anatómicos importantes del corazón y grandes vasos.

Sistema de conducción del corazón.

El corazón está constituido por células especializadas que se comunican físicamente por uniones comunicantes, actuando así como un sincitio y permitiendo junto con la actividad coordinada de otros canales iónicos en la membrana plasmática, la conducción del potencial de acción. En condiciones normales los potenciales de acción cardiacos se generan en el nodo senoaricular, ubicado en la unión de la vena cava superior con la aurícula derecha, de ahí se desplazan por haces de fibras auriculares de tipo Purkinje, el

haz internodal anterior de Bachman, el haz internodal de Wenckebach y el haz internodal posterior de Thorel, hasta llegar al nodo auriculoventricular. Este último se encuentra entre el límite de las aurículas y los ventrículos, en el vértice del triángulo de Koch, ahí la señal será filtrada antes de continuar su camino a través del haz de His, transmitiéndose por el tabique interventricular hasta llegar a las fibras de Purkinje, las cuales se comunican con las células musculares de los ventrículos. (Ganong Fisiología Médica 2010)

La rápida conducción del impulso cardiaco requiere la presencia de conexiones de baja resistencia entre las células cardiacas. (Rohr S et al., 2004) La velocidad de propagación es inversamente proporcional a la resistencia interna, por lo tanto una resistencia baja interna favorece la rápida conducción; en el caso de los miocitos cardiacos, las uniones comunicantes o Gap Junctions son las responsables de formar las conexiones de baja resistencia en las células cardiacas. (Spach M et al 2004) La densidad de las uniones comunicantes es baja en el margen lateral de las células, particularmente en los miocitos encargados del sistema de conducción del corazón y es precisamente esta distribución no uniforme de las uniones comunicantes lo que le permite al corazón mantener la direccionalidad de la conducción eléctrica. La propagación del potencial de acción ocurre rápidamente a través del citoplasma celular y lentamente pasa a través de las uniones comunicantes, la conducción es rápida longitudinalmente. Estas uniones comunicantes tienen una composición molecular simple, se componen solo de una proteína integral de membrana llamada conexina, la cual se aglomera dentro de la membrana plasmática como un complejo de múltiples subunidades que forman un hemicanal denominado conexón. (Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos. Gerald Karp. Quinta edición)

Las conexinas están formadas por 6 conexones; en el corazón se expresan principalmente la conexina 40, 43 y 45, definidas así en función de su peso molecular expresado en KDa. Las diferencias regionales en el tipo y distribución de las conexinas son determinantes importantes en el proceso de excitación del tejido cardiaco, en especial en los límites del nodo SA y AV. (Augustus O. Grant et al., 2009)

POTENCIAL DE ACCIÓN CARDIACO.

La actividad eléctrica del miocardio inicia con los potenciales de acción que se originan en las células marcapaso y viajan hacia las células del miocardio generando la contracción cardiaca. Para la propagación de esta onda despolarizante y por consiguiente de la actividad mecánica, es necesario el acople entre los miocitos cardíacos mediante las gap junctions. (Kanno S et al., 2001) El potencial de acción refleja la activación e inactivación secuencial de los canales iónicos que conducen la despolarización mediante las corrientes entrantes de sodio (Na^+) y calcio (Ca^{2+}) y corrientes repolarizantes salientes como las de potasio (K^+). La morfología del potencial de acción es distinta en cada una de las regiones del corazón debido a las diferencias en la expresión y en las propiedades cinéticas que subyacen a cada uno de los canales iónicos involucrados en el potencial de acción (Figura 2). (Antzelevitch C et al., 2002; Nerbonne y Kass, 2005)

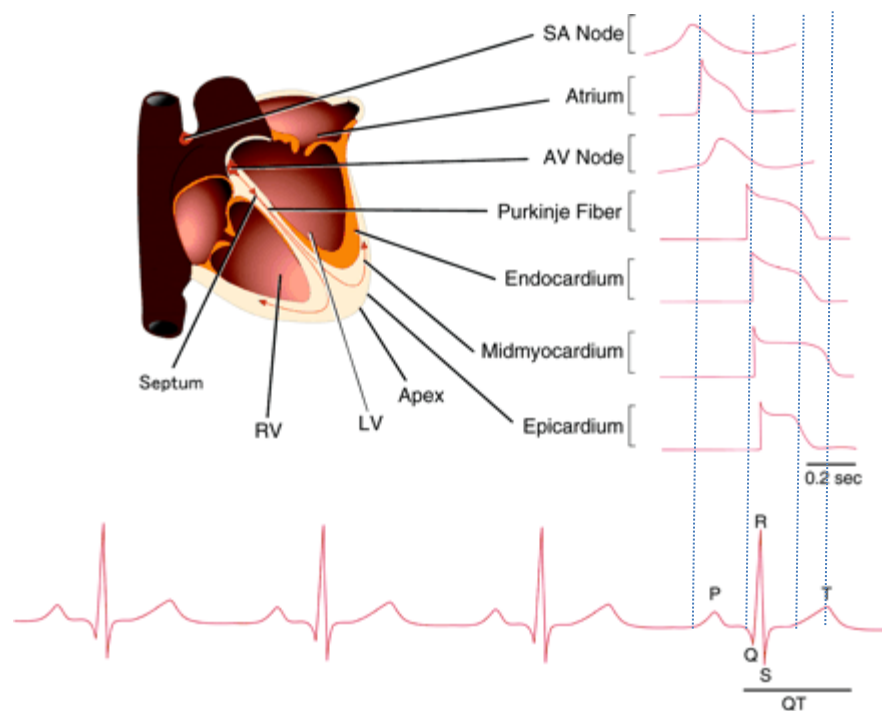


Figura 2. Actividad eléctrica en el miocardio. Ilustración esquemática de las formas de potenciales de acción presentes en las diferentes regiones del corazón humano. Panel inferior. Representación esquemática de un electrocardiograma de superficie. Las líneas azules punteadas indican la correspondencia de la actividad eléctrica de las diferentes regiones del corazón con el registro del ECG. Imagen tomada de Jeanne M. Nerbonne y Robert S. Kass; 2005.

CORRIENTES INVOLUCRADAS EN EL POTENCIAL DE ACCIÓN.

La generación del potencial de acción y sus diferencias entre las regiones del corazón resultan de la permeabilidad selectiva de los diferentes canales iónicos distribuidos en la membrana celular. Durante el potencial de acción la permeabilidad de los canales iónicos cambia y cada ion se mueve pasivamente a favor de sus gradientes tanto químicos como eléctricos. El gradiente electroquímico determina si un ion se mueve hacia dentro o hacia afuera de la célula, es decir si genera una corriente despolarizante o repolarizante en el caso de los cationes. (Hille B et al., 1984) El potencial de acción cardiaco consta de cuatro fases:

La fase 4 se caracteriza porque el voltaje de membrana es estable a aproximadamente -90 mV en células cardiacas de trabajo. La principal corriente responsable de esta fase en la corriente rectificadora entrante o I_{K1} .

La fase 0 es la fase de despolarización rápida generada por la rápida activación de los canales de sodio dependientes de voltaje ($Na_v 1.5$); aquí el potencial de membrana cambia hacia un rango de voltaje positivo (+ 20 mV) siendo esta fase central para la rápida propagación del impulso cardiaco.

La fase 1 es la fase de repolarización rápida dada por las corrientes repolarizantes de potasio (K^+) denominadas I_{to-f} , I_{to-s} , I_{Kr} e I_{KATP} .

La fase 2 o fase de meseta, es una fase larga, es única en células ventriculares y marca la fase de entrada de calcio a través de los canales de calcio voltaje dependientes tipo L (IC_{a-L}) hacia el interior de la célula. En esta fase además de la corriente de calcio tipo L participan corrientes repolarizantes de potasio (K^+) como son la I_{Ks} , I_{Kr} e I_{KATP} .

La fase 3 es la fase de repolarización que restaura el potencial de membrana en reposo generada por la salida de potasio a través de los canales de potasio (K^+) (Figura 3).

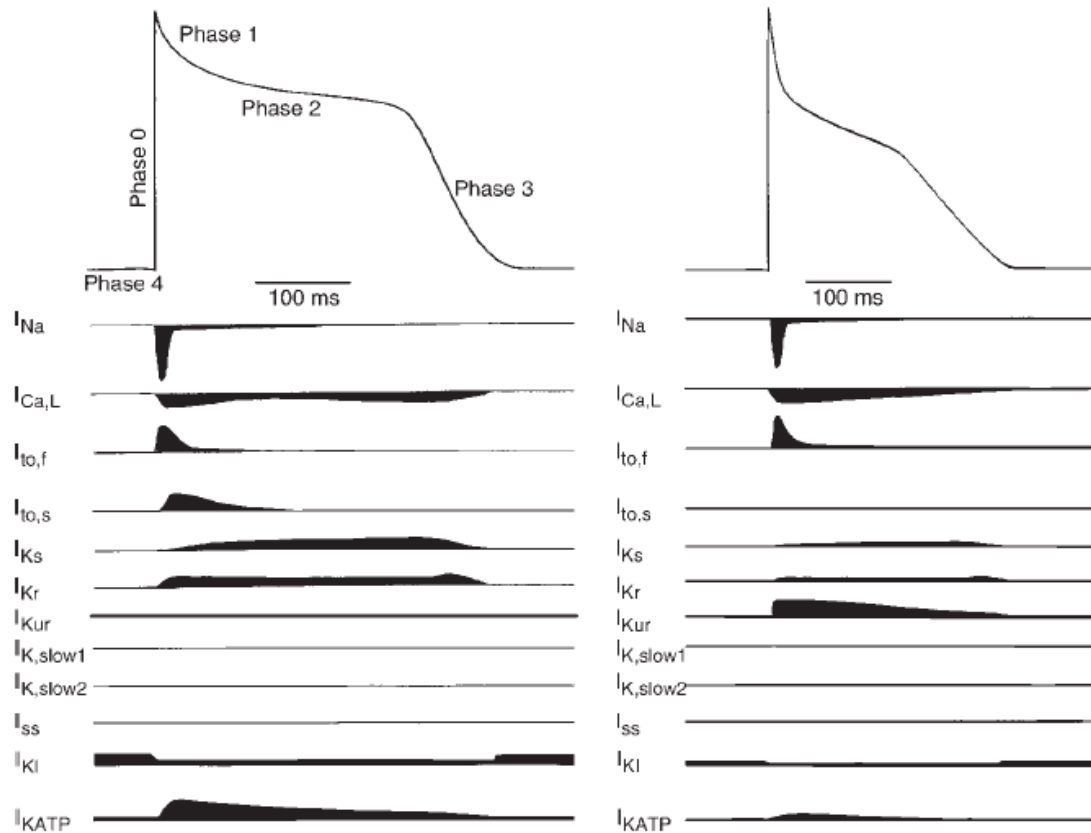


Figura 3. Formas de los potenciales de acción y las corrientes iónicas que subyacen en cada uno de ellos en el corazón adulto de humano. Panel superior: potencial de acción ventricular (lado izquierdo) y potencial de acción auricular (lado derecho). Las propiedades tiempo y voltaje-dependientes de los canales voltaje dependientes de Na^+ (Nav) y de Ca^{2+} (Cav) expresados en miocitos atriales y ventriculares son similares. En contraste existen múltiples tipos de corrientes de K^+ , particularmente las corrientes de Kv contribuyen a la repolarización del potencial de acción. Las propiedades de las corrientes de Kv son distintas y en contraste a las corrientes entrantes, hay múltiples corrientes Kv expresadas en miocitos individuales a través del miocardio. Imagen tomada de Jeanne M. Nerbonne y Robert S. Kass; 2005.

De manera más detallada tenemos que los canales de sodio voltaje dependientes (Nav) se abren rápido ante una despolarización de membrana y son los principales responsables de la fase de despolarización del potencial de acción. (Fozzard HA et al., 2002) La activación e inactivación de los canales de sodio (Na^+) es voltaje dependiente y su umbral de activación es de aproximadamente de -55mV . (Sheets MF et al 2010)

La corriente transiente saliente de potasio I_{to} es la mayor corriente repolarizante durante la fase de repolarización temprana en un potencial de acción y es la responsable de la forma de espiga o domo y de la fase 1 del potencial de acción. (Abbott GW et al., 2001;

Alseikhan BA et al., 2002; Aravamudan B et al., 2003; Aimond F et al., 2005) Modulando la fase inicial del potencial de acción, la I_{to} tiene una influencia importante sobre la forma general del potencial de acción a través de los efectos voltaje dependientes en otras corrientes iónicas como la corriente de calcio tipo L (I_{Ca-L}), la corriente del intercambiador NCX y las corrientes rectificadoras tardías (Bailly P et al., 1997). Numerosos estudios han mostrado que la inhibición de I_{to} marcadamente afecta el acople excitación-contracción por una alteración de la entrada de calcio tipo L a nivel transarcolema y el intercambiador NCX, con efectos secundarios en la recaptura de calcio del retículo sarcoplásmico (SR). (Abbott GW 2006; Abernethy DR y Soldatov NM., 2002; Ai T et al., 2002; Akar FG y Rosenbaum DS., 2003; Aravamudan B et al., 2003)

Durante la fase de meseta del potencial de acción aproximadamente el ~99% de los canales de sodio se encuentran en estado inactivado. (Wang DW et al., 1996; Rivolta I et al., 2002) Durante esta fase de meseta del potencial de acción el calcio proveniente del espacio extracelular entra a la célula mediante los canales de calcio voltaje dependientes ubicados en la membrana de los túbulos T, este calcio es el activador del proceso de acople excitación-contracción en el miocardio de los mamíferos. (Fabiato A and Fabiato F., 1979; Donald M Bers 2008; Bers DM et al., 2001;) La corriente de calcio fue primeramente estudiada en preparaciones multicelulares y posteriormente en células aisladas; (Beeler GW y Reuter H., 1970; Bers DM y Perez-Reyes E., 2002) en el año de 1975 se registraron 2 tipos de corrientes de calcio en huevos de estrellas de mar, sin embargo no fue sino hasta 1980 cuando se le dio mayor importancia a estas investigaciones, estos dos tipos de corrientes fueron observadas en neuronas sensoriales de pollos y ratas y su distinción se basó principalmente en sus umbrales de activación denominando canales activado por alto voltaje (HVA) y canales activados por bajo voltaje (LVA) a las dos poblaciones encontradas, posteriormente fueron descritos en células atriales de perro y los canales LVA fueron referidos como canales de calcio tipo T ya que se activan a potenciales de membrana de aproximadamente de -50 mV y su activación e inactivación son rápidas. (Bean BP et al., 1985; Carbone E et al., 1987; Maltsev VA et al., 1997; Nudler S et al., 2003) Los canales HVA se abren a potenciales de membrana más positivos que los LVA (-20 mV) y su inactivación tiene un curso temporal más lento que puede incluso durar hasta

segundos dependiendo de la preparación. (Carbone E et al., 1987; Marbán E y O'Rourke B., 1995) Así mismo los canales HVA exhiben una gran conductancia de 13-25 pS. (Bean BP., 1985; Marbán E y O'Rourke B., 1995; Bénitah JP et al., 2002) La apertura de los canales de calcio tipo L ante una despolarización de membrana es relativamente tardía en comparación de la activación de los canales de sodio (Na^+), la apertura de estos canales permite la entrada de calcio generando la segunda fase del potencial de acción, la cual es prominente en células ventriculares y de Purkinje. (Fabiato A and Fabiato F., 1979; Donald M Bers 2008; Bers DM et al., 2001)

En la fase 3 del potencial de acción los canales de potasio (K^+) voltaje dependientes son los principales determinantes de esta fase en el miocardio de mamíferos. Basados en las diferencias farmacológicas y de dependencia de voltaje existen dos clases de corrientes de potasio a) corrientes transitorias (I_{to}) y b) las corrientes rectificantes salientes de potasio (I_{k}). Las corrientes transitorias (I_{to}) se comienzan a activar e inactivar rápidamente a potenciales despolarizantes de membrana, aproximadamente a -30 mV, generando la fase 1 del potencial de acción. Los rectificantes tardíos (I_{k}) en cambio se activan a potenciales similares de membrana pero con una cinética mucho más lenta que determina su función predominante en la fase 3 del potencial de acción. Existen múltiples tipos de corrientes de potasio (K^+) siendo las más relevantes en esta fase la corriente rectificadora tardía lenta o I_{ks} y la corriente rectificadora tardía rápida o I_{kr} . Ambas corrientes se comienzan a activar a valores alrededor de -20 mV, en el caso de la I_{ks} , la corriente se comporta de manera óhmica a voltaje despolarizantes, es decir, el valor de la corriente aumenta conforme lo hace el voltaje de membrana. La I_{kr} en cambio, a voltajes por arriba de los 20mV comienza a rectificar, de tal modo que cuando se aumenta el voltaje de membrana la corriente de potasio disminuye. Las diferencias en las densidades y propiedades biofísicas de esos canales contribuyen a las variaciones en las formas de los potenciales de acción registradas en diferentes tipos de células cardiacas y en distintas especies. (Antzelevitch C y Dumaine R., 2002; Nerbonne JM et al., 2002; Nerbonne JM y Kass RS., 2003) Finalmente en los miocitos ventriculares, la fase 4 del potencial de acción se debe principalmente a otro tipo de canal de potasio, el rectificador entrante. La corriente rectificadora entrante o I_{kir} , es una corriente que se activa a voltajes de alrededor de -50 mV. A valores por debajo

de potencial de equilibrio del potasio genera una corriente entrante mientras que a valores más positivos una pequeña corriente saliente que desaparece por arriba de -50mV debido a las propiedades de rectificación del canal. (Antzelevitch C y Dumaine R., 2002; Nerbonne JM et al., 2002; Nerbonne JM y Kass RS., 2003)

EL ION CALCIO COMO MODULADOR

El calcio es un segundo mensajero intracelular que participa en la regulación de diversas funciones como la fertilización, la señalización eléctrica, la contracción muscular, la secreción celular, en el proceso de memoria, en la transcripción de genes y en la muerte celular. Es de gran importancia en las células cardíacas ya que a nivel electrofisiológico media la forma del potencial de acción por medio de las corrientes de iones e intercambiadores que participan en cada una de las fases del potencial de acción, participa en los mecanismos arritmogénicos y la comunicación celular. (Bers DM., 2008). El acople excitación-contracción está gobernado por los transitorios de calcio que dirigen la contracción, ya que en este mecanismo el calcio activa el “switch” de los miofilamentos contráctiles, siendo así un modulador de las propiedades contráctiles del músculo, participando también en el consumo de energía para la contracción, así como también en la producción de energía por medio de la vía de regulación de la producción de ATP mitocondrial y la muerte celular por necrosis, etc., siendo esto solo una fracción de sistemas dependientes del calcio en los miocitos cardíacos. (Bers DM., 2008). La fidelidad de la función contráctil cardíaca envuelve muchos procesos dependientes calcio y algunas alteraciones aunque, fueran mínimas, en esos sistemas podrían resultar en una disfunción tanto del mecanismo contráctil como eléctrico de las células cardíacas.

- La corriente de calcio. I_{Ca}

Existen dos clases de corrientes de calcio involucradas en el potencial de acción de los miocitos cardíacos, la corriente de calcio tipo L y la corriente de calcio tipo T, que contribuyen a la actividad marcapaso, a la despolarización y fase de meseta en los potenciales de acción. La corriente de calcio tipo T se activa a potenciales de membrana

más negativos que la corriente de calcio tipo L, y también inactiva más rápidamente que la corriente de calcio tipo L, independiente de la entrada de calcio a la célula. La corriente de calcio tipo T no está presente en la mayoría de los miocitos ventriculares pero es expresada principalmente en células marcapaso en el corazón y en miocitos ventriculares inmaduros, incluso en miocitos ventriculares que expresan corriente de calcio tipo T la densidad de corriente es muy pequeña en comparación con la corriente de calcio tipo L. (Chen X et al., 2007)

A pesar de que la entrada de calcio resulta ser muy pequeña es de suma importancia en el acople excitación-contracción ya que, el calcio que entra a través de los canales de calcio dependientes de voltaje ubicados en la membrana sarcoplasmática, en los túbulos T, se acopla a los receptores a rianodina ubicados en la membrana del retículo sarcoplásmico, generando la liberación de calcio del retículo, aumentando los niveles de calcio intracelular y favoreciendo el acople del calcio a la troponina C, lo cual da como resultado el proceso de contracción. (Bers DM., 2001.) Por lo tanto, en el corazón los canales de calcio tipo L tienen una función doble:

- 1) Contribuyen a la corriente entrante de calcio, corriente despolarizante que ayuda al mantenimiento de la fase de meseta del potencial de acción.
- 2) Median la apertura intracelular de canales de calcio para la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico, jugando así un papel importante en el proceso de acople excitación-contracción (Figura 4).

Estructuralmente los canales de calcio son un complejo de multiproteico que contiene múltiples subunidades, la subunidad principal y formadora del poro es la Alfa 1, la cual se co-ensambla con las subunidades auxiliares Beta, Alfa 2, Delta y Gamma, así como también con la calmodulina. La gran variedad de canales de calcio se debe a que en un gen existen diferentes sitios de corte y pegado (splicing) que los codifican (Catterall WA et al., 2000) Bajo condiciones normales los miocitos ventriculares expresan solo Cav 1.2 que corresponde a la isoforma Alfa 1C. La subunidad alfa 1C contiene 4 dominios homólogos (DI-DIV) cada uno con 6 segmentos transmembranales (S1-S6) conectados por unas asas intracelulares unidas del lado citosólico en la N terminal y la C terminal. El segmento S1-S4

de cada dominio conforman el sensor de voltaje mientras que los segmentos S5 y S6 forman el poro del canal que contiene un filtro selectividad (Catterall WA et al., 2000). El extremo C terminal de la subunidad alfa es importante para el tráfico del canal desde el Golgi hasta la superficie de la membrana (Fang K, Colecraft HM., 2011) y es un sitio crítico de interacción de proteínas de señalización que modulan tanto los canales de calcio tipo L o que decodifican las señales locales de calcio. (Dai S et al., 2009)

ACOPLE EXCITACIÓN CONTRACCIÓN.

El proceso de acople excitación contracción es el mecanismo mediante el cual un potencial de acción genera la contracción de una célula cardíaca. En este proceso el calcio juega un papel esencial no solo como un activador directo de los miofilamentos sino como un iniciador de la cascada intracelular que da inicio al proceso de contracción (Bers, DM., 2001) Figura 4. Durante el potencial de acción, el calcio entra a la célula a través de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L y promueve la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico, proceso denominado liberación de calcio inducida por calcio. (Donald M Bers., 2002; Shannon TR et al 2000) Los canales de calcio tipo L se localizan en los túbulos T en estrecha aposición de los canales a rianodina ubicados en el retículo sarcoplásmico. (Scriven, D. R. L et al., 2000) El aumento en la concentración intracelular de calcio así como del voltaje inactivan los canales de calcio de la membrana plasmática limitando la cantidad de calcio que entra durante el potencial de acción, de hecho, la entrada total de calcio a través de los canales de calcio es reducida cerca del 50% cuando se genera la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico, (Puglisi, JL. et al 2014) esta inactivación es dependiente de calcio y es un efecto local mediado por la unión de la calmodulina a la terminal carboxilo del canal de calcio. (Peterson, BZ et al., 1999; Zühlke, RD et al., 1999) La combinación de la entrada de calcio y la liberación del retículo sarcoplásmico eleva la concentración intracelular de calcio, permitiendo así la unión del calcio a la troponina C y la posterior interacción entre los filamentos de actina y miosina para generar la contracción muscular.

Por otro lado, el aumento en la concentración intracelular de calcio comprende 2 ciclos: el ciclo extracelular en el cual el calcio se mueve entre el espacio extracelular y el citosol, y el ciclo intracelular en el cual el flujo del calcio está relacionado con el retículo sarcoplásmico, el citosol y la unión de calcio con proteínas localizadas en los miofilamentos encargados de la contracción muscular. A continuación se describen las principales proteínas reguladoras de la concentración de calcio intracelular:

El receptor a rianodina es un miembro de la familia de canales liberadores de Ca^{2+} y que son codificados por 3 genes en tejidos de mamíferos.

- RyR1 es encontrado en mayor proporción en musculo esquelético y en edades tempranas también en el corazón.
- RyR2 predomina en corazón y también es expresado en cerebro y en otros tejidos pero en muy baja proporción.
- RyR3 expresado en bajas cantidades en varios tejidos incluyendo el musculo esquelético y cardiaco.

En los ventrículos de mamíferos los receptores a rianodina (RyR2s) son localizados principalmente en el retículo sarcoplásmico cerca de la superficie de los túbulos T, esta ubicación es esencial para que se lleve a cabo el proceso de acople excitación-contracción. Figura 4.

El retículo sarcoplásmico provee la mayor parte del Ca^{2+} que activa la contracción en cardiomiocitos en mamíferos, en estas células el rol principal del calcio extracelular es disparar la liberación de Ca^{2+} de las reservas intracelulares (Biofísica. Ramón Latorre). El retículo sarcoplásmico en mamíferos está dividido en 2 regiones principales que son la cisterna subsarcolemal y la red sarcotubular. La primera región posee extensiones dilatadas del retículo sarcoplásmico ubicadas en la proximidad del túbulo T y proteínas de unión a calcio denominadas receptores a rianodina (RyRs) formando así las estructuras denominadas diadas. A través de los receptores a rianodina (RyRs) el calcio es liberado hacia el citosol al final de la sístole. La segunda región del retículo sarcoplásmico es la más extensa ya que contiene la red sarcotubular que rodea las proteínas contráctiles en el centro de la sarcómera, esta red contiene bombas ATPasa las cuales usan la energía

obtenida por la hidrólisis de ATP para la relajación del corazón transportando el calcio fuera del citosol hacia el retículo sarcoplásmico. (Biofísica. Ramón Latorre)

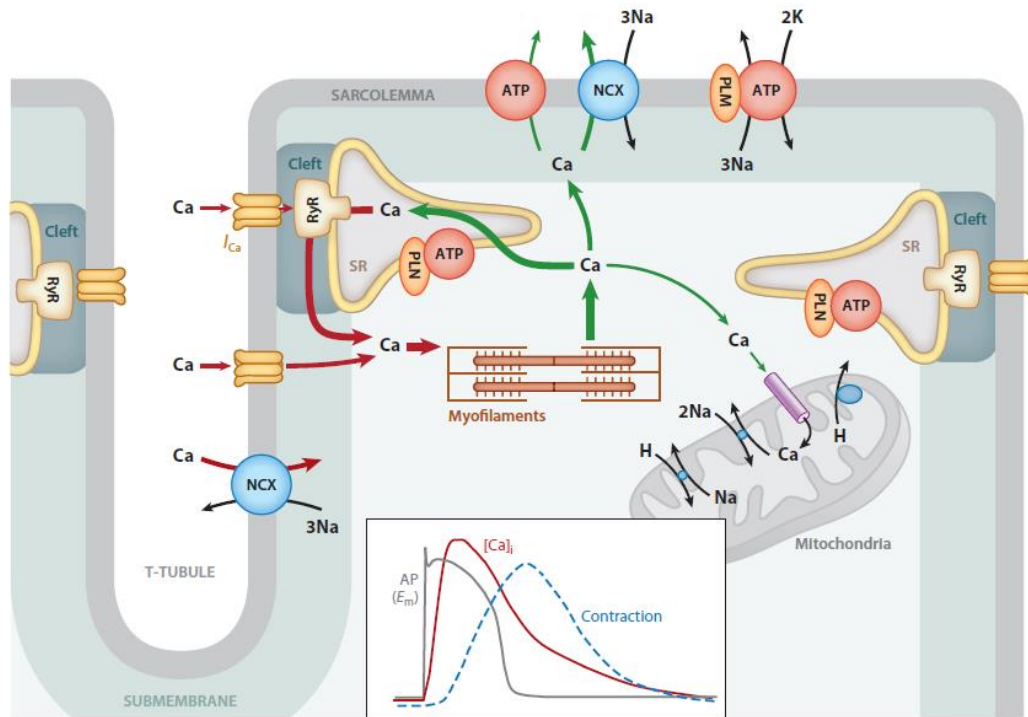


Figura 4. Movimiento del ion Ca^{2+} en los miocitos cardiacos. El calcio entra a la célula por medio de los canales de calcio voltaje dependientes ubicados en la membrana plasmática generando la I_{Ca} la cual activa la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico por medio del receptor a rianodina (RyR), resultando en la activación de los miofilamentos. La recaptura de calcio en el RS por medio de SR $Ca-ATPasa$ (modulada por fosfolambdan o PLN) y la extrusión de Ca^{2+} por medio del intercambiador NCX para el proceso de relajación. En la parte inferior se muestra en líneas de color negro el trazo típico de un potencial de acción ventricular, en el trazo de línea roja la concentración de calcio intracelular el cual el punto máximo coincide con la fase de meseta del potencial de acción y en líneas azules punteadas se muestra el proceso de contracción el cual tiene su punto mas alto cuando existe un aumento en la concentración de calcio intracelular. Imagen tomada de Cardiac Sarcoplasmic Reticulum Calcium Leak: Basis and roles in Cardiac Dysfunction. Donald M. Bers 2014.

El receptor a rianodina participa en la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico y al mismo tiempo que interactúa con diferentes proteínas regulatorias como la calmodulina, la cual modula la actividad del RyR , la FK-506 que estabiliza la función de apertura de RyR así como el acople entre de apertura entre RyR adyacentes, la PKA, la cual puede alterar la apertura del RyR y de los canales de Ca^{2+} HVA, fosfatasa 1 y 2A y la sorcina, la cual se

une tanto a RyR como al canal de calcio tipo L. (Meyers, MB. et al. 2003; Fruen, BR et al., 2000; Marx, SO et al., 2000; Marx, SO. et al., 2001) Los receptores a rianodina (RyR) también se acoplan a otras proteínas en la superficie luminal del retículo sarcoplásmico como son la triadina, la junctina y la calsecuestrina, estas proteínas participan en mantener el equilibrio del calcio intracelular del RS así como de modular la liberación de calcio. (Zhang L et al., 1997 Los receptores a rianodina (RyR) se encuentran en grupos organizados con más de 100 receptores a rianodina (RyR) ubicados entre las membranas del retículo sarcoplásmico y del túbulo T cerca de los canales a calcio, este arreglo constituye un funcional complejo liberador de calcio denominado couplón. (Franzini-Armstrong, C et al., 1999)

Para que ocurra el proceso de relajación la concentración intracelular de calcio debe de disminuir permitiendo así la disociación del calcio de la troponina C; esto se lleva a cabo por diferentes rutas y la importancia de cada una varía entre distintas especies, (Bers, DM., 1994) por ejemplo, en los miocitos ventriculares de conejo la SERCA remueve cerca del 70% del calcio liberado, un 28% lo remueve el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ y el 2% restante lo hace ATPasa de la membrana plasmática (PMCA) y la mitocondria. Por el contrario, en la rata el 92 % del calcio citosólico es removido por la SERCA, 7% por el intercambiador Na/Ca y el 1 % por la PMCA y la mitocondria. (Bassani RA et al., 2004; Bers MD., 2002) El balance de calcio en huron, perro, gato y cobayos son similares a los del humano (Figura 5). (Bers, DM., 2001)

El intercambiador Na/Ca es una proteína de membrana que consiste en 10 segmentos transmembranales que unen y transportan Na^+ y Ca^+ a través de la membrana. (Liao J et al., 2012; Ren X et al., 2013) Una gran asa citoplasmica entre los segmentos 5 y 6 contiene 2 dominios regulatorios para el Ca^{2+} . Así no solo este intercambiador mueve calcio a través de la membrana sino que también regula alostericamente la unión del calcio intracelular (Ottolia M et al., 2013). Estudios de inmunolocalización indican que el intercambiador Na/Ca se encuentra distribuido a través de la superficie de membrana incluyendo el sarcolema de los túbulos transversos. (Dan P et al., 2007) El intercambiador Na/Ca transporta 3 iones de Na a cambio de 1 ion calcio resultando en un transporte electrogénico que puede ser medido como una corriente iónica. El intercambiador Na/Ca

puede funcionar de manera bidireccional, es decir, sacando o metiendo calcio a la célula, sin embargo el modo en que trabaja es gobernado por los gradientes de Na y Ca a través de la membrana celular. (Blaustein MP et al., 1999)

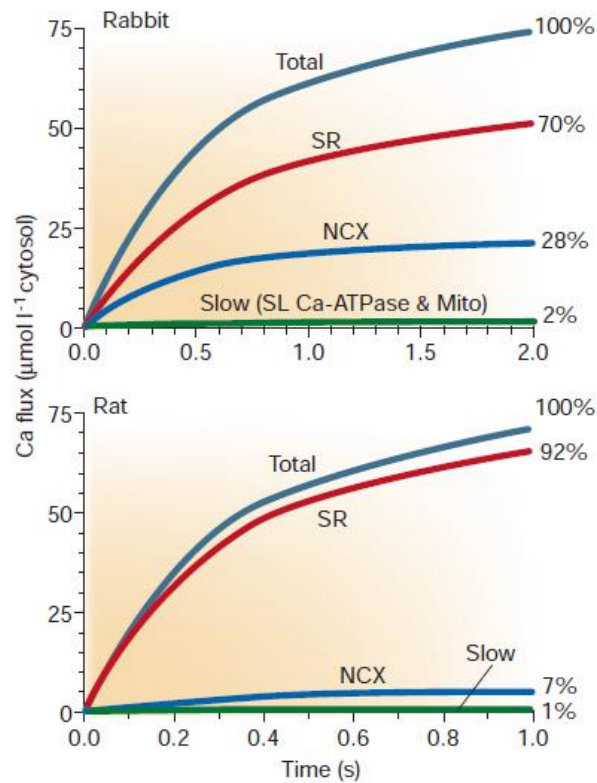


Figura 5. Flujo de calcio durante la relajación de los miocitos ventriculares de conejo y rata. Las curvas son basadas en la concentración intracelular de calcio, dependiendo de la velocidad de transporte medida en cada sistema. Imagen tomada de Cardiac excitation-contraction coupling, Donald M. Bers 2002.

La ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico denominada como SERCA posee un mecanismo regulado por medio de la actividad del fosfolambandano el cual es un inhibidor endógeno de esta ATPasa de calcio, la fosforilación del fosfolambadan por AMP cíclico o dependiente de proteínas cinasas dependientes de calmodulina (PKA y CaMKII) libera de esta inhibición a la bomba, permitiendo la rápida relajación y un descenso de los niveles intracelulares de calcio. (Brittsan, AG et al., 2000) Un ultimo mecanismo regulador de la disminución de calcio intracelular es el uniportador de calcio de la mitocondria. La mitocondria está equipada con una maquinaria eficiente para el transporte de calcio, así mismo es capaz de almacenar grandes cantidades de calcio durante la elevación de calcio

intracelular, (Huser J et al., 2000; Dedkova EN et al., 2008; Dedkova EN et al., 2012; O-Uchi J et al., 2012) sin embargo, la cinética del ciclo del calcio en la mitocondria y su amortiguamiento durante el acople excitación-contracción es altamente controversial. (O'Rourke B et al., 2009) En miocitos cardiacos la mitocondria ocupa aproximadamente un 35% del volumen celular reflejando la alta demanda de energía que necesitan estas células. (Barth E et al., 1992) (Bers DM., 2001) Se han descrito numerosos mecanismos de recaptura de calcio de la mitocondria, sin embargo siguen siendo controversiales y son materia de debate, hasta ahora el mecanismo mejor establecido ha sido el uniportador de calcio (MCU), (Baughman JM et al., 2011; De Stefani D et al., 2011; Gunter TE et al., 2004) el cual genera un gran gradiente electroquímico para la entrada de calcio a través de la membrana interna mitocondrial. El MCU es regulado por un número de moduladores (activadores e inhibidores) que incluyen diferentes cationes divalentes, lantanidos, adenil nucleotidos y componentes del rutenio. (Dedkova EN et al., 2008)

SÍNDROME METABÓLICO

El síndrome metabólico es un conjunto de signos que constan de hiperglucemia, hipercolesterolemia, hipertensión, hipertrigliceridemia y un aumento en el perímetro abdominal. Estos generalmente son resultado de la inactividad física y un aumento en la ingesta de calorías que no utilizadas en individuos genéticamente susceptibles. (Matthew V. Potenza et al., 2009)

En 1988 Reaven describió, con el nombre de síndrome X, la presencia de un conjunto de alteraciones metabólicas cuyo rasgo fisiopatológico era la resistencia a la insulina y otras alteraciones metabólicas relacionadas como la hipertensión, hipertrigliceridemia y disminución del colesterol HDL, destacando su asociación con la morbilidad y mortalidad cardiovascular. (Reaven y cols, 1988) Más adelante la Organización Mundial de la Salud (OMS) lo denominó como síndrome metabólico. Este síndrome se ha convertido en centro de atención por ser un factor predisponente para desarrollar diabetes mellitus tipo II y enfermedades cardiovasculares, siendo estas las principales causas de mortalidad en la actualidad a nivel nacional (Scott M. Grundy et al., 2004). La etiología del síndrome

metabólico esta dada por predisposición genética o por los factores medioambientales en los que está envuelto el individuo, tales como el sedentarismo, el estrés crónico, el tabaquismo y la inactividad física, las cuales pueden desencadenar el desarrollo de hipertensión arterial u obesidad y en otros en la alteración de la regulación de la glucosa o de lípidos. (Lakka HM et al., 2002)

Existen diversas definiciones acerca del síndrome metabólico entre las cuales destaca la del National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel III (NCEP-ATP-III) (Circulation. 2002 Dec 17;106(25):3143-421). La NCEP-ATP III propone como criterios de diagnóstico cinco signos determinantes del trastorno, aunque bastan solo tres, para diagnosticar en una persona el Síndrome metabólico (Wilson y Grundy, 2003). Estos signos son los siguientes:

- Perímetro abdominal: ≥ 88 cm en mujeres y ≥ 102 en hombres.
- Colesterol HDL ≤ 50 mg/dL en mujeres y ≤ 40 mg/dL en hombres.
- Triglicéridos en ayuno ≥ 150 mg/dL.
- Presión sanguínea $\geq 130/85$ mmHg.
- Glucosa en ayuno ≥ 110 mg/dL.

Además de estas alteraciones patológicas establecidas se han ido añadiendo otras como el incremento de ácido úrico, la elevación de concentraciones del factor de plasminógeno, el descenso de los niveles de adiponectina y recientemente se ha incluido a la obesidad como un factor predisponente para la aparición del síndrome metabólico (Bays HE et al., 2009). Otros de los factores que predisponen a los individuos a presentar síndrome metabólico son fármacos como los corticoides, los antihistamínicos o los antipsicóticos, los cuales pueden inducir obesidad y el desarrollo de intolerancia a la glucosa. (Martínez de Morentín BE et al., 2003)

La prevalencia del Síndrome Metabólico varía dependiendo del género, edad y etnia y en la población de origen hispano su incidencia se ubica entre 15% a 40%, prevaleciendo en mayor proporción en los hombres que en las mujeres y aumentando con la edad (ENSANUT 2012). La importancia del síndrome metabólico se relaciona con su potencial impacto en la morbilidad y mortalidad cardiovascular, principalmente en personas que

padecen diabetes tipo 2. De acuerdo a los criterios establecidos internacionalmente por la Organización Mundial de la Salud (OMS), se considera que los individuos que tienen hipertensión arterial $>130/85$ mmHg muestran una elevada prevalencia del síndrome metabólico aumentando así las complicaciones cardíacas y cerebrovasculares (ENSANUT 2012).

La aparición de la obesidad ha sido uno de los principales factores para desarrollar síndrome metabólico, de hecho, el tejido graso es un órgano activo que secreta una amplia variedad de sustancias conocidas como adipocinas u hormonas derivadas de adipocitos, las cuales actúan en una amplia variedad de procesos que afectan tanto en la ingesta de alimentos como la homeostasis de la energía. (Rondinone CM et al., 2006) Por lo tanto los ácidos grasos libres tienen doble función tanto como reserva energética y como moléculas de señalización. (Hirasawa A et al., 2005) Las principales moléculas secretadas por el tejido adiposo como la leptina, la adiponectina, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), la interleucina 6 (IL-6), y la resistina se ha encontrado elevadas en individuos obesos con una amplia concentración de ácidos grasos libres circulantes los cuales estimulan la gluconeogénesis, (Aronne LJ et al., 2009) (Bays H et al., 2004) además un elevado nivel de ácidos grasos libres ha sido relacionado con la disfunción y apoptosis en las células beta pancreáticas. (Hoppa MB et al., 2009) El tejido adiposo visceral secreta 3 veces más de IL-6 que el tejido adiposo subcutáneo lo cual explica la asociación entre la grasa abdominal y las enfermedades cardíacas vasculares. La disminución de los niveles de adiponectina asociada con la obesidad disminuye la vasodilatación endotelial, el óxido nítrico y la angiogénesis (Antuna-Puente B et al., 2008). En condiciones normales, el tejido adiposo contiene un gran número de macrófagos, alrededor de 10% en personas sanas y secretan mediadores anti-inflamatorios como IL-10, pero en los individuos obesos la cantidad de macrófagos aumenta hasta el 40% aumentando la secreción de citocinas inflamatorias como TNF α , IL-6 e ILB; estas citocinas generan activación de serin cinasas las cuales fosforilan los receptores a insulina haciendo que estos disminuyan su respuesta.(Bays H et al., 2004)

Altos niveles de ácidos grasos libres impiden la habilidad del hígado para metabolizarlos, las moléculas de los ácidos grasos pueden ser depositados intrahepaticamente y pueden

promover la resistencia a la insulina y la dislipidemia. (Bays H et al., 2010) Asimismo grandes cantidades de adipocitos liberan una mayor cantidad de mediadores proinflamatorios y adipocinas anti-inflamatorias.

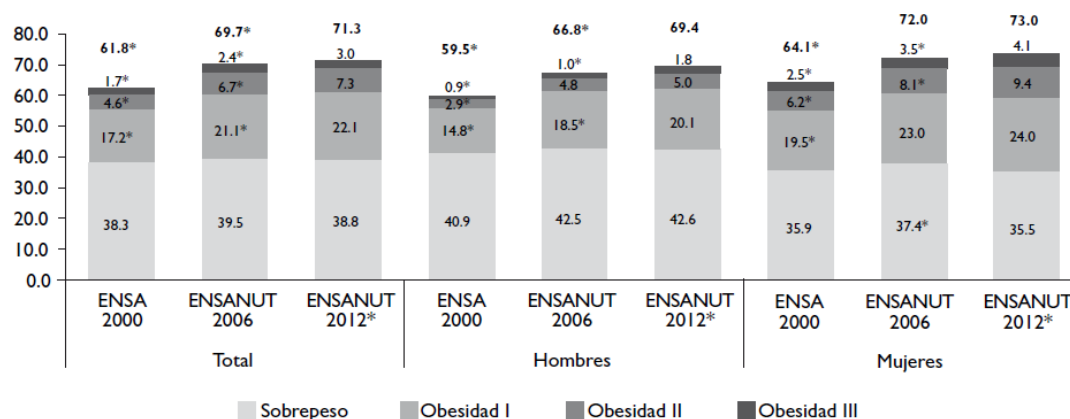
El síndrome metabólico aumenta la predisposición de padecer diabetes mellitus tipo II (DM2), la cual por sí misma es un factor que aumenta el riesgo cardiovascular, debido a alteraciones en el metabolismo lipídico, aumento de triglicéridos, disminución de HDL. (Rabinowitz D et al.) El tejido adiposo genera grandes cantidades de factor de necrosis tumoral (TNF α), interleucina 6 (IL-6) ambas secretadas por este tejido favoreciendo la resistencia a la insulina. (Aronne LJ et al., 2009) (Bays H et al 2004)

PREVALENCIA EN MÉXICO

El síndrome metabólico es un problema mayor de salud pública a nivel mundial debido al aumento en el gasto público para mantener a la gente con síndrome metabólico (Popkin and Gordon-Larsen, 2004), en todas las definiciones dadas del síndrome metabólico se ha incluido a la obesidad como un criterio de diagnóstico, la cual ha sido definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un exceso de acumulación de grasa que deteriora la salud, y la cual es reconocida como un factor predisponente para la muerte. (Ezzati et al., 2002) así también, aunado a esto existe evidencia tanto clínica como química de que los niveles de adiposidad abdominal juegan un rol importante en el desarrollo del síndrome metabólico (Donath MY y Shoelson SE, 2011)

La epidemia de obesidad que se experimenta en México ha sido documentada a través de las últimas encuestas nacionales. En el año 2006 se reportó que en adultos de 20 años o mayores la prevalencia de sobrepeso y obesidad fue de 69.7% ubicando así a México como uno de los países con mayor prevalencia en la región de América y a nivel global, esta prevalencia aumentó más del 12% en tan solo 6 años según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (ENSANUT 2012) posicionando a México como uno de los países con mayor tendencia al sobrepeso y obesidad en el mundo, con un porcentaje anualizado de

incremento de alrededor de 2%. Ya que la obesidad es uno de los factores principales de riesgo modificables para el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles como la diabetes mellitus y enfermedades cardiovasculares, siendo estas las principales causas de muerte en México incluyendo cierto tipo de cánceres, ha sido reconocida como uno de los problemas de salud pública más importantes del país desde 1998 hasta el año 2006. Con el análisis de las Encuestas Nacionales ha sido posible caracterizar el problema de la obesidad para comprender su magnitud, distribución, tendencias y asociación con otros factores de riesgo y enfermedades. En la actualidad 71.3% de los adultos mexicanos padece obesidad con una prevalencia ligeramente elevada en las mujeres. Por grupo de edad la obesidad es más frecuente en la cuarta y quinta década de la vida y cuando se evalúa la adiposidad abdominal por medio de la circunferencia de la cintura, tanto los hombres como las mujeres se encuentran en promedio por arriba del punto de corte de la IDF (≥ 80 cm para mujeres y ≥ 90 cm para hombres). El grupo con mayor circunferencia en la cintura es el de adultos de 50 a 59 años.



* Diferencias estadísticamente significativas en relación con la Encuesta Nacional de Salud 2012 (ENSANUT 2012), usando como punto de comparación la Encuesta Nacional de Salud 2000 (ENSA 2000) y la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 (ENSANUT 2006).

Figura 6. Tendencias en las prevalencias de sobrepeso y obesidad en hombres y mujeres de 20 años o más participantes en la ENSA 2000, ENSANUT 2006 Y ENSANUT 2012. *México.

El incremento en la prevalencia de sobrepeso y obesidad en el periodo 2000 a 2012 es mayor en los sujetos jóvenes, en el grupo de edad de 20 a 29 años se observa un incremento de 15,8% (ENSA 2000: 47.0% comparado con ENSANUT 2012: 54%), sin

embargo en el periodo comprendido entre 2006 y 2012 no se observó un incremento significativo entre grupos de edad.

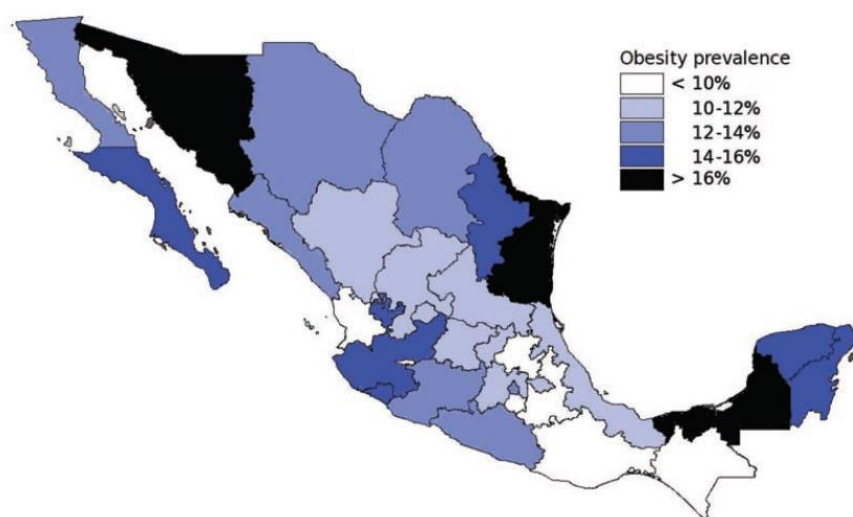


Figura 7. Distribución y prevalencia de la obesidad estimada en mexicanos jóvenes por estado. El valor de corte fue de un $IBM \geq 30$. Los estados con mayor número de personas con obesidad son Sonora, Tamaulipas, Tabasco y Campeche. Imagen tomada de Estimating the geographical distribution of the prevalence of the metabolic syndrome in young Mexicans. Miguel Murguía-Romero., 2012

De acuerdo a los datos obtenidos por el ENSANUT 2012 en la población joven de México se ha estimado que la prevalencia del síndrome metabólico está en función del grado de obesidad. En la figura 8 se muestra la prevalencia estimada del síndrome metabólico en cada estado de la República mexicana.

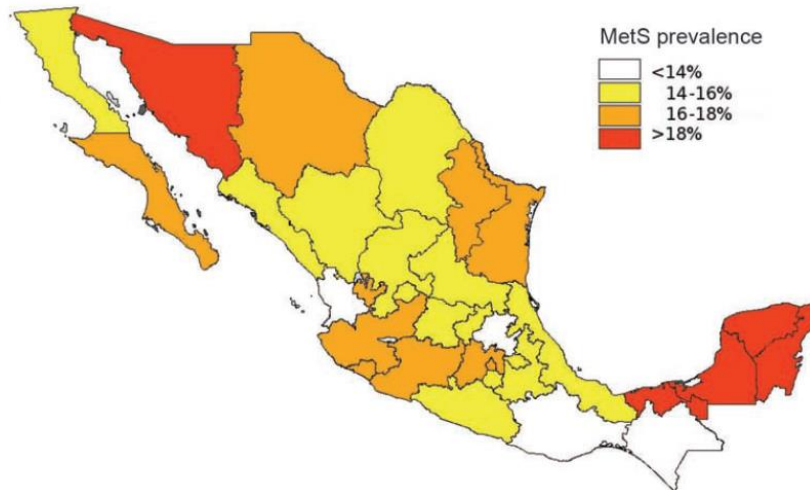


Figura 8. Prevalencia estimada del Síndrome Metabólico en cada estado de la República Mexicana en la población joven de México en un rango de 17-24 años de edad. Los estados con mayor incidencia del síndrome metabólico son Sonora, Tabasco, Campeche, Yucatan. Imagen tomada de Estimating the geographical distribution of the prevalence of the metabolic syndrome in young Mexicans. Miguel Murguía-Romero., 2012

ANTECEDENTES

Estudiar el síndrome metabólico y sus efectos en los humanos resultaría complicado, para ello, existen diferentes modelos animales que si bien no fueron creados para estudiar el síndrome metabólico, si cumplen con los criterios para que les sea diagnosticado; cada modelo es particular en cuanto a la etiología del síndrome y a las alteraciones patológicas que presenta (Ver tabla 1). En estudios previos realizados en el laboratorio de Fisiopatología cardiovascular del Instituto de fisiología, utilizaron el modelo de rata con síndrome metabólico desarrollado por el grupo de la doctora Marcia Hiriart del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. El estudio del síndrome metabólico en este modelo animal resulta relevante ya que el método de inducción del síndrome asemeja a la etiología del síndrome metabólico en la población Mexicana, es decir, por un aumento en la ingesta de carbohidratos (Albarado Ibañez 2013, Larqué C et al., 2011).

AUTORES	MODELO ANIMAL	RESULTADOS
AF Ceylan-Isk et al., 2013	Rata wistar macho, alimentación alta en grasas durante 15 y 45 semanas.	Aumento de grasa corporal (epididímal, visceral y retroperitoneal), hiperglucemia, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia.
AF Nascimiento et al., 2011	Ratón cepa C57 macho, alimentación alta en grasa durante 8 semanas.	Aumento en la grasa corporal resistencia a la insulina, hiperglucemia e hipertrigliceridemia.
K Mitsutomi et al., 2014	Rata wistar macho, alimentación rica en carbohidratos durante 60 días,	Aumento en el peso corporal, aumento de circunferencia abdominal y aumento de IMC
YS Diniz et al., 2008	Ratón cepa C57 macho, alimentación alta en grasa durante 16 semanas.	Aumento en el peso corporal, alteración en el almacenamiento de hierro hepático y aumento en los niveles de leptina.
JY Chung et al., 2011	Ratón cepa C57 macho, alimentación alta en grasa durante 90 días.	Aumento en el peso corporal, aumento en el índice de adiposidad, hipercolesterolemia, hiperglucemia e hipertrigliceridemia.
R Singh et al., 2011	Ratón cepa C57 macho, alimentación alta en grasa durante 22 semanas.	Aumento de tejido blanco adiposo, aumento de peso corporal, aumento de peso hepático e intolerancia a la

R Guo et al., 2013	Rata wistar macho, dieta hiperlipídica durante 12 semanas.	glucosa e hipertrigliceridemia. Aumento en el peso corporal, así como de la presión arterial y la actividad nerviosa renal simpática, hiperglucemia, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia.
D Estadella et al., 2004	Rata wistar macho, dieta rica en colesterol durante 8 semanas.	Aumento de peso corporal, así como aumento en el tejido graso epididímal y retroperitoneal.
RL Guerra et al., 2007	Rata wistar macho, dieta hipercalórica durante 8 semanas	Aumento de peso corporal hiperglucemia, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia.
C De Moraes et al., 2008	Rata wistar hembra, dieta hipercalórica durante 12 semanas.	Aumento del peso corporal, así como del tejido graso epididímal y peri renal.
EK Nederal et al., 2001	Rata wistar macho, dieta hipercalórica durante 3 semanas.	Aumento de peso corporal, hiperglucemia y aumento en los niveles de triglicéridos.

Tabla 1.- Modelos animales que cumplen con los criterios para diagnosticar síndrome metabólico.

De acuerdo a los resultados previos generados en el laboratorio Fisiopatología Cardiovascular que dirige el Dr. Julián Torres Jácome, el síndrome metabólico afecta el acople excitación-contracción en el corazón (Vázquez Pérez EM, 2012). En el estudio que realizarón, tomaron un grupo de ratas Wistar macho de aproximadamente 2 meses de edad, lo dividieron a su vez en un grupo control y en otro tratado. A los animales del grupo tratado se les dio de beber agua suplementada con 20% de sacarosa en vez de agua purificada como al grupo control. Después de nueve semanas los animales fueron sacrificados, se les extrajo el corazón y se aislaron los músculos papilares tanto del ventrículo derecho como del ventrículo izquierdo. Posteriormente, los músculos fueron colocados en una cámara de registro para estimularlos y medir de manera simultánea mediante la técnica de registro multicelular el potencial de acción generado y la fuerza de contracción. (Vázquez Pérez EM, 2012)

En los músculos papilares del ventrículo derecho extraído de los animales del grupo control reportaron la presencia de dos tipos de potencial de acción (Línea negra continua

en la figura 9A y 9B), de los cuales, el potencial de acción (PA) tipo II tenía una duración mayor que el tipo I. La fuerza máxima generada durante la contracción fue de $193 \pm 7 \mu\text{N}$. En los animales del grupo tratado encontraron que la duración de los potenciales de acción, tipo I y tipo II se reducían con respecto al grupo control (Línea roja continua, figura 9A Y 9 B) pero que la fuerza máxima de contracción aumentaba a $260 \pm 20 \mu\text{N}$ (Líneas rojas punteadas, figura 9A Y 9B).

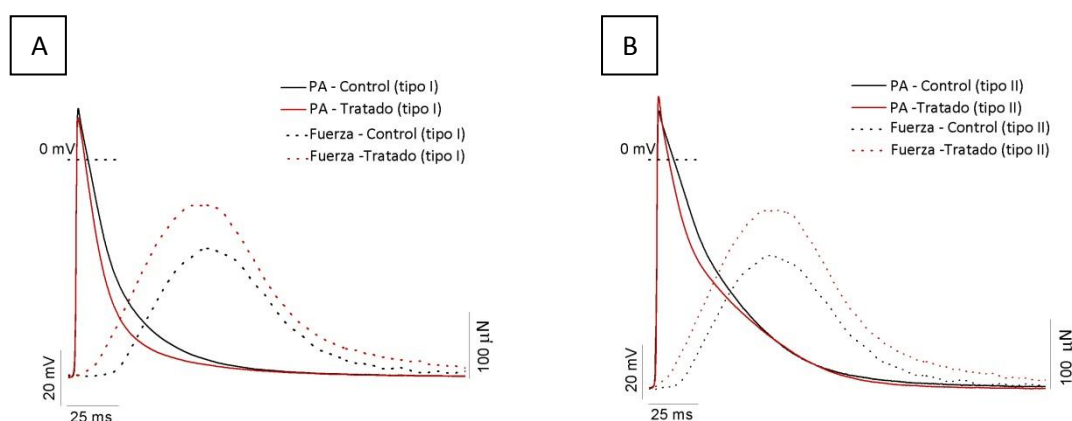


Figura 9. Potenciales de acción y fuerza registrados en los músculos papilares del ventrículo derecho. Los gráficos muestran la A) fuerza generada (línea punteada) durante la generación de un potencial de acción tipo I (Línea continua). En B) observamos la fuerza generada (Línea punteada) durante la generación de un potencial de acción tipo II (Línea continua). En color negro se muestran los registros de los animales controles y en rojo de los animales tratados.

En los papilares del ventrículo izquierdo de los animales controles también encontraron dos tipos de potencial de acción, PA tipo I y tipo II, siendo estos últimos los que tenían una duración mayor (Línea azul y negra, figura 11). La fuerza máxima de contracción desarrollada por los papilares fue de $312 \pm 27 \mu\text{N}$. En los animales del grupo tratado encontraron I) solo una población de potenciales de acción II) cuya duración fue mayor que la de los potenciales de acción tipo I pero menor que la de los del tipo II. III) La fuerza generada por los papilares de este ventrículo se redujo a $227 \pm 14 \mu\text{N}$ (Línea roja punteada, figura 10).

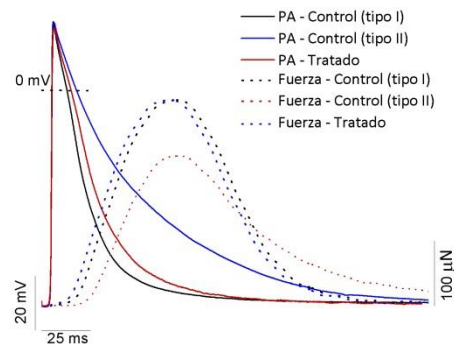


Figura 10. Potenciales de acción y fuerza registrados en los músculos papilares del ventrículo izquierdo. La imagen muestra la fuerza generada (líneas punteada) durante la generación de un potencial de acción (Líneas continuas) evocado en los músculos papilares del ventrículo izquierdo en los animales controles (líneas negras y azules) o en los tratados (líneas rojas).

Las alteraciones encontradas por el grupo del Dr. Julián Torres tanto en la actividad eléctrica como en la mecánica de los músculos papilares de los animales tratados apoya la idea de que el síndrome metabólico altera el acople excitación contracción.

Con el propósito de encontrar la base fisiológica de estos cambios decidimos estudiar las corrientes iónicas que pudieran afectar la duración de potencial de acción, en especial nos interesa medir la corriente de calcio, ya que esta puede regular la cantidad de calcio liberada del retículo sarcoplásmico al iniciar el proceso de excitación-contracción (Zhou y January, 1998); de igual manera la corriente de calcio puede modular la duración del potencial de acción cardíaco y el proceso de contracción.

PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

En la actualidad el síndrome metabólico es una de las causas principales de disfunción cardíaca, siendo esto uno de los factores principales de mortalidad (Scott M Grundy et al., 2004). La importancia del estudio del síndrome metabólico se relaciona con su potencial impacto en la morbilidad y mortalidad asociada a padecimientos cardiovasculares y al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2. En México, aproximadamente el 30% de la mortalidad está asociada enfermedades cardiovasculares secundarias a complicaciones de alguno de los trastornos presentes en el síndrome metabólico como son la obesidad, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, hipertensión, resistencia a la insulina o alteraciones en el metabolismo de la glucosa (Madrigal y Correa, 2008).

De acuerdo a datos obtenidos anteriormente en el laboratorio de fisiopatología cardiovascular por Vázquez Pérez en el 2012, ahora sabemos que el síndrome metabólico altera la actividad eléctrica y mecánica de los músculos papilares del corazón (Vázquez Pérez EM, 2012). Sin embargo, el proceso del acople excitación-contracción es un mecanismo que puede ser regulado a diferentes niveles, por ejemplo, durante la entrada de calcio a través de los canales de calcio voltaje dependientes, al momento de la liberación de calcio, durante la recaptura y extrusión de calcio, alterando la sensibilidad de la proteínas del complejo contráctil al calcio o modificando la microarquitectura de la célula cardíaca.

Con el objetivo de encontrar la base fisiológica de la alteraciones inducidas por el síndrome metabólico sobre la actividad eléctrica y mecánica del corazón, el siguiente trabajo está enfocado a determinar, en un modelo de rata con síndrome metabólico, los cambios inducidos sobre la corriente de calcio tipo L y sobre los transitorios intracelulares de calcio generados durante la contracción cardíaca. Ambos procesos pueden modificar la morfología del potencial de acción y el proceso de excitación contracción.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son los cambios, a nivel celular, responsables de la alteración en el acople excitación-contracción en los músculos papilares del modelo animal de síndrome metabólico?

HIPÓTESIS

En el modelo de rata con síndrome metabólico, las alteraciones en el acople excitación-contracción de los miocitos de los músculos papilares son debidas a cambios en los transitorios de calcio intracelular y en la corriente de calcio tipo L.

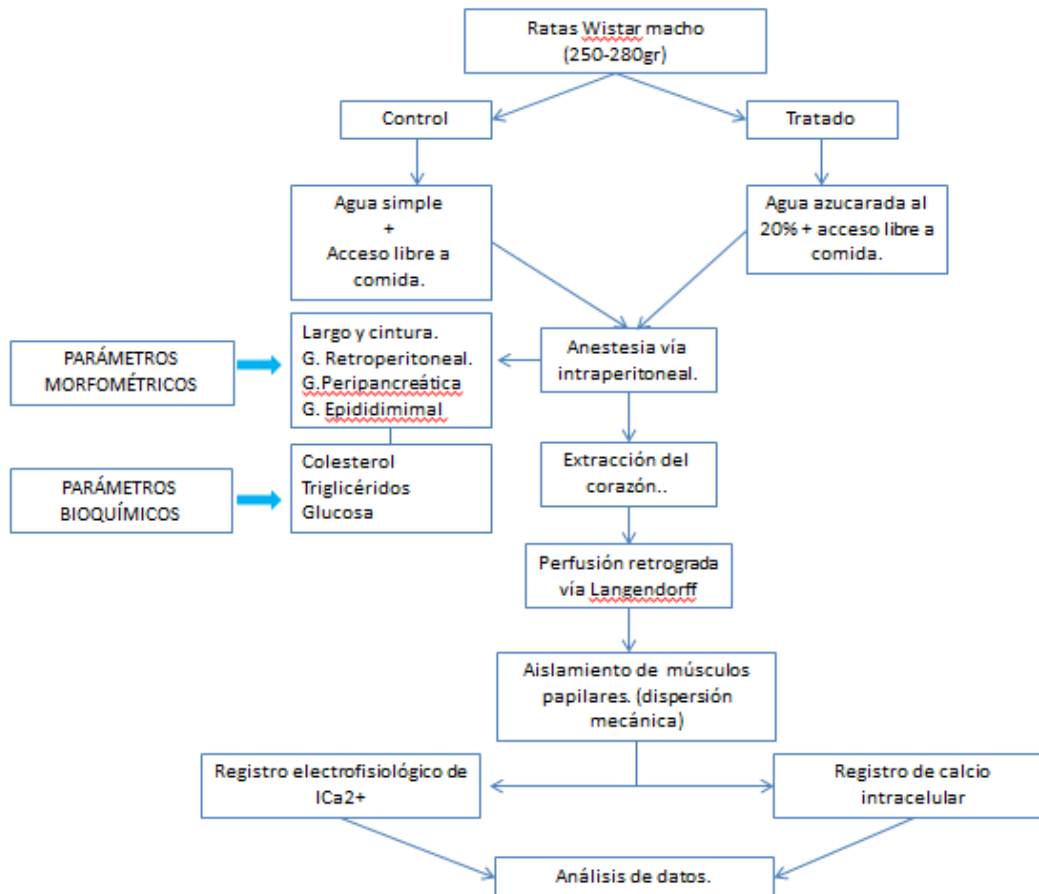
OBJETIVO GENERAL:

Determinar si se modifica la corriente de calcio tipo L y los transitorios intracelulares de calcio en un modelo de rata con síndrome metabólico

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Reproducir el modelo animal con síndrome metabólico en ratas Wistar a 2 y 6 meses de tratamiento.
 - Evaluar parámetros morfológicos
 - Evaluar parámetros bioquímicos
- Aprender la disección de los músculos papilares y obtener miocitos cardiacos viables para el registro electrofisiológico.
- Registrar las corrientes de Ca^{2+} en miocitos aislados de los músculos papilares de ratas con síndrome metabólico y controles.
- Analizar los resultados obtenidos y determinar si los cambios morfología del potencial de acción se deben a una alteración de la corriente de calcio. De no ser así proceder con el siguiente objetivo.
- Registrar el Ca^{2+} intracelular en los miocitos aislados de los músculos papilares de ratas con síndrome metabólico y controles.

DIAGRAMA DE TRABAJO.



MATERIAL Y METODOS.

MODELO ANIMAL DE SÍNDROME METABÓLICO.

Para el desarrollo del modelo animal de síndrome metabólico utilizamos ratas macho de la cepa Wistar de 2 meses de edad con pesos entre 250-280gr. Estos animales fueron obtenidos del bioterio del instituto de Fisiología Celular de la UNAM, el cual cumple con la Norma Oficial Mexicana NOM 062-ZOO-1999. Todos los animales fueron mantenidos a una temperatura de entre 21-25°C y en ciclos de luz-obscuridad de 12 por 12 horas y antes de iniciar la fase experimental, cada una de las ratas recién llegadas, fueron mantenidas en cuarentena durante una semana.

Los animales se dividieron en 2 grupos, uno control y uno tratado. Al grupo tratado se le dió de beber una solución de sacarosa al 20%, mientras que al grupo control agua simple; ambos grupos tenían acceso libre al alimento Lab Diet 5001. El tratamiento duró 2 y 6 meses.

Al cumplir con el tiempo del tratamiento se midió la distancia hocico- ano y la circunferencia abdominal, antes de realizar la extracción del corazón para el aislamiento de los miocitos de los músculos papilares. Además se extrajeron y pesaron la grasa epididímal, la grasa retroperitoneal y la peripancreática como indicadores de la obesidad abdominal. Al mismo tiempo se obtuvo una muestra de sangre para determinar posteriormente los niveles de glucosa, insulina, triglicéridos y colesterol.

AISLAMIENTO DE MIOCITOS DE LOS MÚSCULOS PAPILARES

Todas las ratas al término de su tratamiento fueron sacrificadas para la obtención del corazón. Previamente, los animales fueron anestesiados administrando una solución conjunta de pentobarbital sódico y heparina vía intraperitoneal. La dosis de anestésico variaba en función de la edad y grupo experimental del animal: de 20mg/kg a 25 mg/kg para el grupo de 2 meses de tratamiento y de 31.5 a 36 mg/kg para el grupo de 6 meses. La dosis de heparina será de 200 UI/kg.

Una vez que la rata estuvo completamente anestesiada procedimos a la extracción del corazón. Se colocó a la rata en posición supina e hicimos una toracotomía bilateral dejando expuesto el corazón, posteriormente, localizamos la aorta descendente, y la sujetamos con

ayuda de unas pinzas sin dientes, cortamos en dirección rostral conjuntamente con la vena cava inferior, los pulmones, timo y tráquea. Una vez extraídos, el corazón y los tejidos adyacentes fueron colocados en solución Tirode frío donde procedimos a limpiar el corazón y a canular a través de la aorta. Posteriormente empezamos a perfundir via Langendorff, primero durante 10 minutos con solución Tirode normal compuesta por (Mm) NaCl 118, KCl 5.4 NaHCO₃ 2.4, NaHCO₃ 2.4, MgCl₂ 1.05, Na₂HPO₄ 0.42, Dextrosa 11, Taurina 20, CaCl₂ 1.8, y luego con Tirode libre de Ca²⁺ durante 10 minutos. Para la disociación enzimática perfundimos de 6 a 7 minutos en Colagenasa 30 mg/kg resuspendida en Tirode libre de Ca²⁺ y posteriormente de 5 a 6 min en una mezcla de colágenasa y proteasa 1.5 mg/kg. Finalmente y para detener la acción enzimática, perfundimos el corazón con una solución rica en aminoácidos y EGTA, la solución de Kraft-Brüeh, durante 5 minutos. Posteriormente procedimos al aislamiento de los músculos papilares. Para ello, separamos las aurículas de los ventrículos a través del septum auriculo-ventricular teniendo cuidado de no dañar las válvulas auriculoventriculares localizadas en el límite de las aurículas con los ventrículos, posteriormente realizamos un corte adyacente al septum interventricular desde la base del ventrículo derecho hacia el ápex, separando así la pared libre del ventrículo derecho y dejando al descubierto los músculos papilares que están unidos al septum en su parte inferior y a las válvulas auriculoventriculares en su parte superior; para poder disecar los músculos papilares iniciamos separando las válvulas auriculoventriculares de las paredes del ventrículo y levantando en dirección de la base del musculo papilar, finalmente, separamos el musculo papilar cortando en la base del músculo y escindiendo una parte del septum junto con el papilar derecho. Para disecar los papilares del ventrículo izquierdo hicimos un corte a la mitad de la pared libre del ventrículo, separando ambas partes y localizamos los dos papilares, posteriormente hicimos un corte desde la válvula mitral, levantándolas y separando los músculos papilares de la pared del ventrículo. Una vez aislados los papilares del ventrículo derecho e izquierdo los colocamos en vasos de precipitados de 5ml en solución de Kraft Brueh cuya composición es la siguiente (en mM): Taurina 20, Acido glutámico 80, Creatinina 0.5, Acido succínico 10, Dextrosa 10, KH₂PO₄ 10, MgSO₄ 5, KCl 40, HEPES 10, EGTA 0.2, ajustando el pH con KOH. Los papilares fueron extraídos conjuntamente con las cuerdas tendinosas de las válvulas auriculoventriculares, para que

de este modo se pudieran tomar con las pinzas al momento de hacer la disociación celular sin dañar el tejido de los papilares. La disociación de los papilares la realizamos tomando con la pinza la cuerda tendinosa de los papilares y agitando de una manera constante durante cerca de 20 segundos (dispersión mecánica). Posteriormente, la suspensión celular se observó al microscopio en busca de miocitos cardiacos; en caso de no encontrar células se debe repetir la disociación mecánica o dejar incubar en colagenasa durante 30 segundos más. Una vez obtenidas las células fueron mantenidas en solución Kraft Brueh a 4°C hasta el momento del registro.

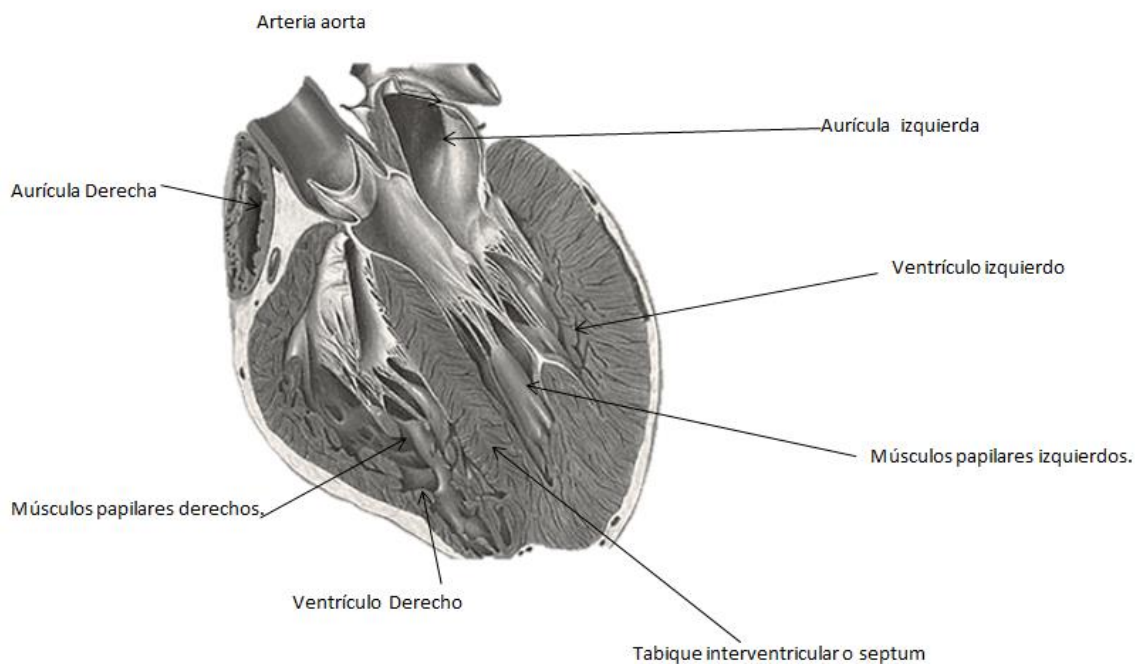


Figura 11. Ubicación de los músculos papilares en el corazón. Imagen tomada de Nociones básicas de anatomía, fisiología y patología cardíaca: Bradiarritmias y taquiarritmias. De los Nietos Miguel C, 2007.

REGISTRO DE LA $I_{Ca^{2+}}$

Después de haber aislado los miocitos de los músculos papilares procedimos a registrar las corrientes de Ca^{2+} por medio de la técnica de Patch clamp. Colocamos los miocitos aislados de los músculos papilares durante 10 minutos sobre una cámara de registro

acondicionada para perfusión constante montada sobre un microscopio invertido (Nikon Diaphot Inverted Microscope). Pasados esos 10 minutos se perfundió continuamente a 36°C con una solución externa que contiene en (mM) 126 NMDG, 5.4 CsCl, 1 MgCl₂, 1.8 CaCl₂, 3.3 NaH₂PO₄, 10 Glucosa, 10 HEPES y un pH de 7.4. Para el registro de la I_{Ca}²⁺ usamos electrodos de borosilicato con una resistencia entre 2 y 4 MΩ llenos de una solución interna que contiene en (mM) 130 CsCl, 1 MgCl₂, 5 HEPES, 10 EGTA y 5 Na₂ATP. Para el registro de las corrientes utilizamos un amplificador Axopatch 1C y la tarjeta digitalizadora TL1 interface (Axon Instruments). La señal fue filtrada a 5 KHz, digitalizada a 12.5KHz y posteriormente fue almacenada en una computadora para su análisis con el programa ClampFit versión 9.2. Los cardiomiocitos idóneos para el registro fueron aquellos que presentaron una membrana bien definida, estriaciones claras y que se encontraban de manera individual. Para inducir las corrientes de calcio usamos un protocolo de doble pulso; los pulsos condicionantes partieron de un voltaje de mantenimiento de -80mV, después fueron desde -60mV hasta +60 mV en pasos de voltaje de 5 mV con una duración de 1 segundo. El pulso de prueba duraba 250ms a +10 mV. Las corrientes generadas durante el primer pulso fueron utilizadas para obtener la curva corriente-voltaje y la curva de activación en estado estacionario, mientras que las corrientes generadas en el segundo pulso las usamos para graficar la inactivación en estado estacionario del canal de calcio.

REGISTRO DE CALCIO INTRACELULAR.

La medición de calcio intracelular se realizó por medio de la técnica de espectrofluorometría: las células fueron cargadas con el fluorocromo Fluo 4 AM a una concentración de 5 μM durante 10 minutos. El fluo 4, es un colorante derivado del fluo 3, es más fotoestable y tiene una alta afinidad al calcio; emite fluorescencia en color verde (510 nm) solo cuando está unido al calcio y es excitado a una longitud de onda de 494nm, muestra cambios rápidos en los niveles de fluorescencia acorde a los cambios de concentración de calcio gracias a su constante de disociación elevada (kd 345 nM), además

de distribuirse de manera homogénea en toda la célula y tener un bajo grado de compartimentalización. (Takahashi 2010)

La medición se llevó a cabo en un microscopio invertido (Nikon Eclipse-TiU) equipado con un objetivo 60X de inmersión en aceite para epifluorescencia y con un equipo para medición de Ca^{2+} (PTI DeltaRam 814– Photon Technology) compuesto por una lámpara de vapor de mercurio a alta presión, cuya luz es emitida a un set de prismas y espejos alineados para canalizarla a través de un obturador en una red de fibra óptica, de donde se transmite al bloque de filtros debajo del objetivo para ajustar el espectro de la luz a la longitud de onda adecuada para incidir sobre la muestra cargada con Fluo 4 AM y excitarla. la luz que incide sobre la muestra primero atraviesa un filtro de excitación que solamente permite el paso de las longitudes de onda del haz luminoso mayores a 465 nm y menores a 495nm (espectro azul). A continuación la luz filtrada se refleja en un espejo dicróico (500nm) angulado para dirigirla e incidir en la muestra, y una vez que ésta sea estimulada y emita su fluorescencia, el haz de luz generado regresa en dirección opuesta al de excitación y con una longitud de onda mayor, la cual atraviesa el espejo dicróico y se dirige a un filtro de emisión. El filtro de emisión solo permite el paso de las longitudes de onda mayores a 510 nm (espectro verde).

La luz verde filtrada es enviada a un fotomultiplicador, donde se aísla con ayuda de un set de laminillas la fluorescencia que corresponde solo al soma celular, y así convertir las señales luminosas en impulsos eléctricos que a su vez mediante un convertidor análogo digital integrado y una tarjeta de datos, permitirán convertir los impulsos eléctricos en señales digitales para ser finalmente adquiridas, almacenadas y procesadas en un ordenador mediante el software de análisis de datos y visualización Felix-NDTM. Las señales registradas se muestran en el software mediante gráficos bidimensionales representando los impulsos eléctricos generados por la emisión de fluorescencia en función del tiempo. La medición se llevará a cabo depositando las células cargadas sobre el pozo de la cámara de registro, siendo bañadas constantemente en solución externa mediante un equipo de perfusión controlado por gravedad. La cámara de registro fue colocada sobre la platina del microscopio invertido. A ambos lados de la cámara de perfusión se colocó un electrodo de platino conectado a un estimulador (Grass Medical

Instruments® SD9G), el cual generaba pulsos cuadrados de voltaje de intensidad, frecuencia y duración variable. En el software Felix se regulaba la frecuencia y tiempo de captura y el espectro de la longitud de onda a registrar.

El protocolo experimental consistirá en trenes de estimulación a 1Hz de frecuencia. El voltaje de estimulación fué el doble del valor mínimo necesario para inducir la contracción de cada miocito y la duración de cada tren fue de 30 segundos. Hay que considerar que se requieren al menos 20 pulsos consecutivos para lograr un estado estable en la liberación y recaptura de calcio.

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

Tras la obtención de todos los registros necesarios en un cardiomiocito, se hará un último protocolo experimental necesario para obtener los valores de fluorescencia máxima y mínima. La fluorescencia máxima se obtendrá al lisar el miocito con ayuda de un microelectrodo de borosilicato mientras que la fluorescencia mínima corresponderá con la fluorescencia de fondo de la cámara de registro, es decir, la obtendremos al remover la célula del campo de registro (Takahashi, 1999).

Las señales de referencia máxima y mínima servirán posteriormente como coeficientes para ser evaluados con las demás señales de estimulación obtenidas y así establecer la concentración intracelular de Ca^{2+} mediante la siguiente fórmula:

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

Dónde: $[\text{Ca}^{2+}]_i$ = concentración intracelular de calcio, K_d = constante de disociación del fluorocromo, F = fluorescencia de registro a la frecuencia de estimulación solicitada, $F_{\text{mín}}$ = fluorescencia mínima registrada en la señal de referencia, $F_{\text{máx}}$ = fluorescencia máxima registrada en la señal de referencia. (Takahashi et al., 2010)

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

RESULTADOS EN EL MODELO ANIMAL DE 2 MESES DE TRATAMIENTO.

RESULTADOS

Resultados en el modelo animal de 2 meses.

Para generar el modelo animal de síndrome metabólico utilizamos las mismas condiciones de mantenimiento de los animales reportadas por Albarado-Ibañez en 2013. Ese grupo de investigación encontró que, después de dos meses de someter a las ratas a una dieta donde se sustituyó el agua normal por agua con sacarosa al 20%, se alteraba el metabolismo de la glucosa, disminuían los niveles circulantes de HDL y además los animales presentaban obesidad central; es decir, las ratas exhibían los parámetros necesarios para ser diagnosticadas con síndrome metabólico.

Por nuestra parte, para asegurar la validez del modelo animal, realizamos algunas pruebas bioquímicas enfocadas a determinar alteraciones en el metabolismo de la glucosa, de los ácidos grasos y la presencia de obesidad.

Parámetros bioquímicos

A una parte de las ratas, ya sea del grupo control o de las que se sometieron al tratamiento con agua azucarada durante dos meses, se les tomó inmediatamente después de ser sacrificadas, una muestra de sangre para analizar los niveles plasmáticos de glucosa, colesterol y triglicéridos. En los animales del grupo tratado encontramos que había un aumento del 40% en los niveles de glucosa, del 52% en los de colesterol y del 28% en los de los triglicéridos (Figura 12). Es importante señalar que la gran variabilidad que se observa en los datos podría deberse al hecho de que, los animales no se sometieron a una restricción alimentaria antes de colectar la sangre y, al bajo número de pruebas realizadas en cada grupo experimental (Tabla 2).

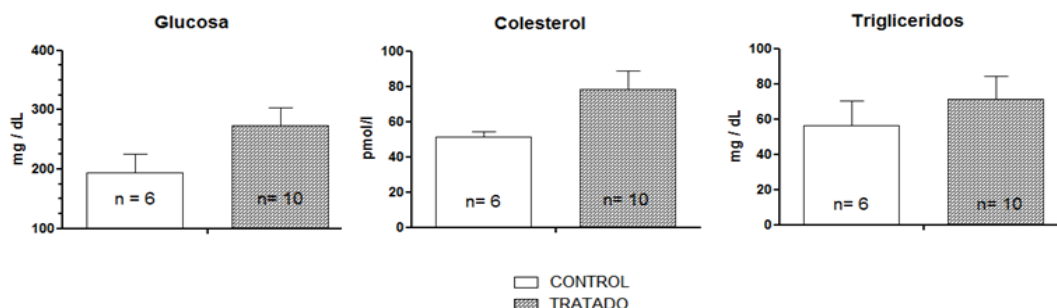


Figura 12. Parámetros bioquímicos. Niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos en animales controles y tratados, n=6 y n=10 respectivamente.

Parámetros morfométricos.

Uno de los parámetros asociados al síndrome metabólico y presente en este modelo animal es la obesidad, la cual de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, es un estado patológico caracterizado por el exceso o la acumulación excesiva de grasa en el cuerpo. En los humanos comúnmente se determina calculando el índice de masa corporal ($IMC = \text{peso} / \text{altura}^2$), el cual relaciona la cantidad de masa del individuo con su estatura; nosotros además de calcular el IMC, utilizamos el porcentaje de grasa corporal para determinar la obesidad en el modelo animal de síndrome metabólico.

En los animales sometidos a 2 meses de tratamiento, su peso aumento un 15% mientras que el perímetro abdominal incremento en 9% con respecto a las ratas del grupo control (Figura 13). Sorprendentemente, cuando cuantificamos el porcentaje de grasa corporal ($IGC = \text{Grasa (gr)} / \text{peso (gr)} * 100$) encontramos que este se había duplicado pasando de 2.57 en los animales controles a 4.77 en los tratados (Ver tabla 2). Este cambio drástico en la composición corporal se debe a un aumento en un 76% en la cantidad de grasa epididimal, de un 94% en la peripancreática y de un 148% en la retroperitoneal (Figura 14). El IMC incrementó un 10 por ciento, pasando de 7.86 kg/m^2 en los animales controles a 8.72 kg/m^2 en los animales tratados.

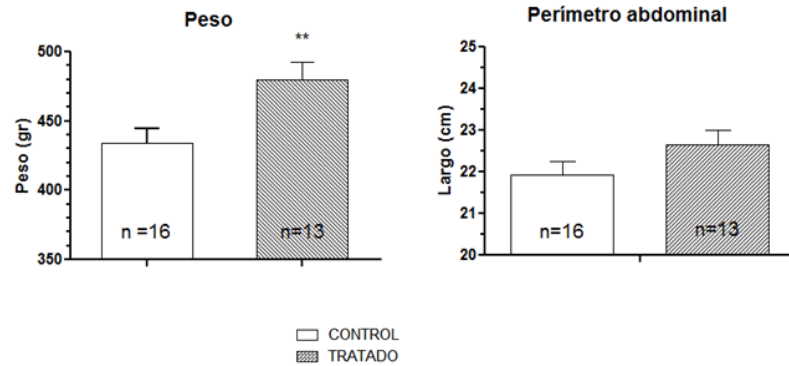


Figura 13. Parámetros morfométricos. Peso y perímetro abdominal de ratas controles, n=16, y ratas tratadas, n=13. **p<0.01.

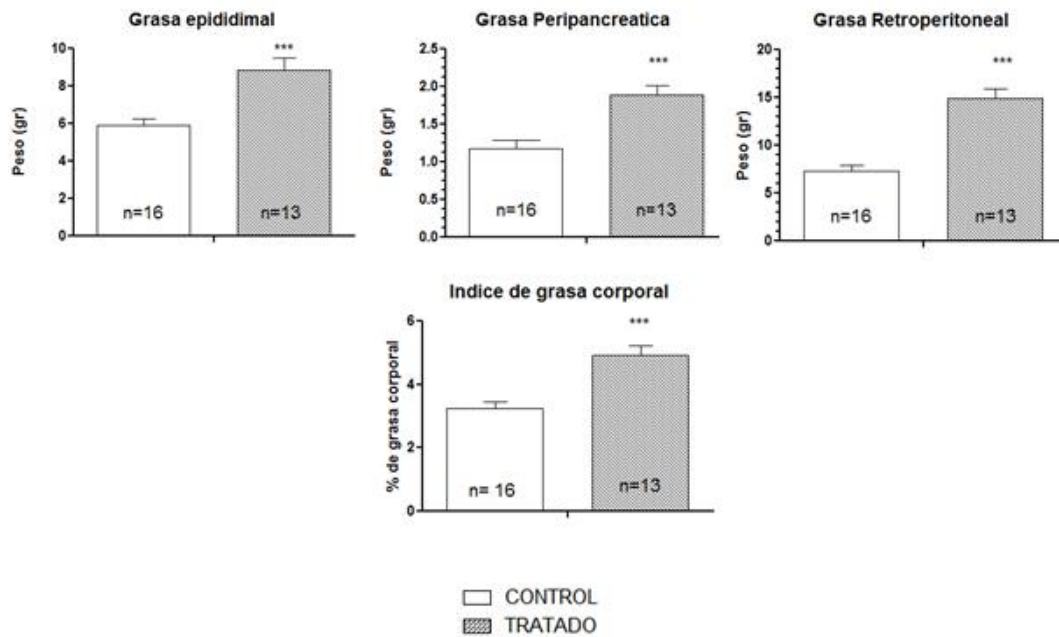


Figura 14 Composición del aumento de peso corporal en ratas tratadas. Los gráficos muestran el aumento en la cantidad de grasa epididimal, peripancreatica, retroperitoneal y en el índice de adiposidad (IGC=Grasa (gr) / peso (gr)*100). ***p<0.001. **p<0.01

	CONTROLES		TRATADOS		
	n	Media $\pm$ SEM	n	Media $\pm$ SEM	Valor de p
PARÁMETROS BIOQUÍMICOS					
GLUCOSA	6	194.67 $\pm$ 30.43	11	273.45 $\pm$ 30.78	0.119
COLESTEROL	6	51.33 $\pm$ 3.00	11	78.18 $\pm$ 10.51	0.086
TRIGLICERIDOS	6	56.50 $\pm$ 13.65	11	71.27 $\pm$ 12.96	0.479
PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS					
PESO	21	539.76 $\pm$ 10.06	26	622.88 $\pm$ 14.67	0.000
CINTURA	20	24.04 $\pm$ 0.37	23	26.30 $\pm$ 0.53	0.001
LARGO	20	26.19 $\pm$ 0.28	23	26.72 $\pm$ 0.18	0.108
G. EPIDIDIMAL	19	8.37 $\pm$ 0.43	22	14.77 $\pm$ 1.27	0.000
G. PERIPANCREATICA	19	1.78 $\pm$ 0.17	22	3.47 $\pm$ 0.31	0.000
G. RETROPERITONEAL	7	9.88 $\pm$ 0.89	9	22.61 $\pm$ 2.55	0.001
INDICE O PORCENTAJE DE GRASA CORPORAL	19	2.57 $\pm$ 0.26	22	4.47 $\pm$ 0.51	0.003

Tabla 2. Parámetros bioquímicos y morfométricos de 2 las ratas sometidas a 2 meses. La tabla muestra los valores medios $\pm$ error estándar de los diferentes parámetros bioquímicos y morfométricos obtenidos en las ratas del grupo control y tratado. La n denota el número de animales usados para cada una de las mediciones. Para comparar los valores de ambos grupos se usó una t de Student y los valores de significancia se muestran en la columna de la derecha (p).

Registro de corrientes de calcio tipo L.

Después de haber validado el modelo de rata con síndrome metabólico, procedimos con el registro de las corrientes de calcio en los miocitos de los músculos papilares del ventrículo derecho y del izquierdo. La corriente de calcio es de gran importancia ya que durante el proceso de excitación contracción es la que genera, de inicio, la entrada de calcio a través del sarcolema y posteriormente la liberación del calcio intracelular.

La corriente de Ca^{2+} , I_{Ca} , fue evocada con pulsos despolarizantes desde los -60mV hasta los + 60 mV, cada 5 mV y partiendo de un potencial de mantenimiento de -70mV (Figura 15 C). Los miocitos cardiacos adultos expresan predominantemente la subunidad alfa 1C del canal de calcio, la cual permite a su vez la formación de la corriente tipo L de calcio. Las corrientes de calcio registradas en los miocitos tanto del papilar derecho como izquierdo, presentan las características de este tipo de corrientes, es decir, la corriente de calcio registrada es de tipo transitoria, entrante e inicia a observarse a voltajes entre -30 y -20

A

B

Papilar derecho control.

C

D

Papilar izquierdo control.

En algunos casos los miocitos adultos pudieran presentar también la corriente de calcio tipo T o LVA, sin embargo, su presencia se haría evidente pues el voltaje de activación sería a voltajes más negativos de -40mV.

Se utilizo el mismo protocolo para evocar las corrientes de calcio tipo L (ICa_L) en miocitos aislados de músculos papilares de ratas con síndrome metabólico (Figura 16 C), las corrientes registradas en los miocitos tanto de papilares derechos como izquierdos presentan una corriente transitoria entrante que se empieza a observar a partir de los -30 a -20mV y que alcanza su corriente máxima a los 5 mV (Figura 16 B)

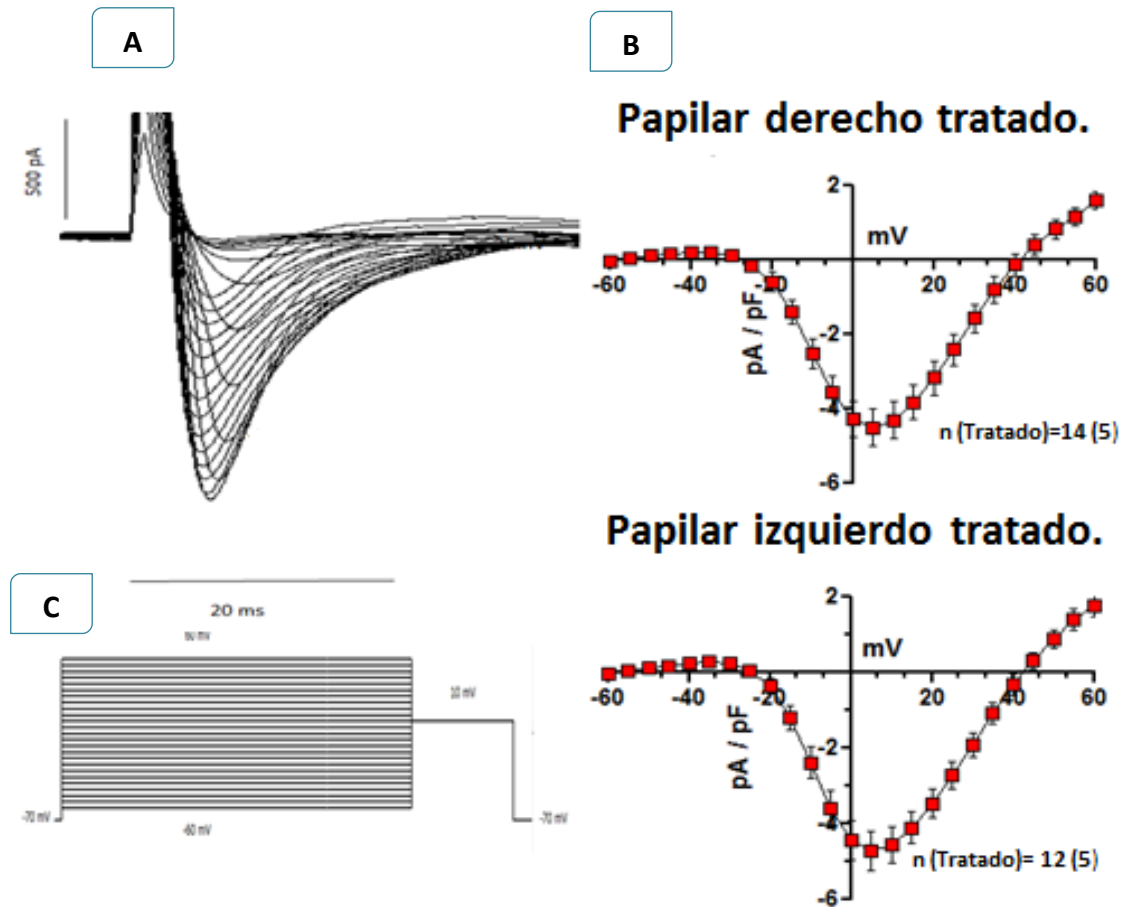


Figura 16. Registro de la corriente de calcio tipo L (ICa_L) en miocitos de los músculos papilares de ratas con síndrome metabólico. A) Ejemplo de una corriente de Ca²⁺ tipo L registrada en los miocitos cardiacos. B) Curvas corriente contra voltaje (IV) registradas en miocitos de músculos papilares derechos e izquierdos de animales controles. C) Protocolo de voltaje usado para evocar la corriente de calcio; notese que para la curva IV solo analizamos las corrientes generadas durante el primer pulso de voltaje. El número de animales usados para cada experimento se reporta entre paréntesis después del número de células registradas.

Con respecto a los animales a los cuales se les indujo el síndrome metabólico, en el papilar derecho encontramos que la corriente máxima de calcio tuvo una amplitud similar a la registrada en los papilares derechos de los animales controles (Control: 4.8 pA /pF vs Tratado: 4.8pA/pF) (Figura 17 C). Además, en el gráfico de densidad de corriente contra voltaje podemos observar que la amplitud de la corriente registrada en las células controles (color negro) y la de las células tratadas (rojo) se superponen a lo largo de todos los voltajes de prueba, indicándonos que no existen diferencias significativas entre ambas condiciones (Figura 17 B).

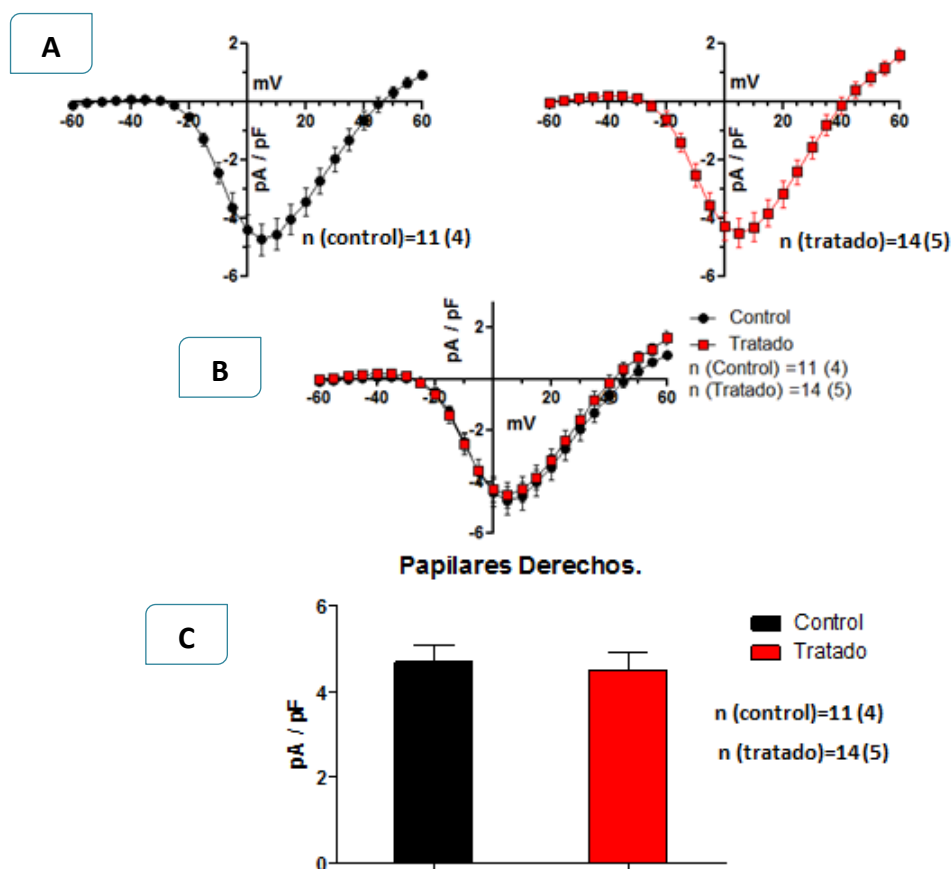


Figura 17. Curva corriente contra voltaje (IV) de calcio registrada en los músculos papilares derechos. A) Se muestra en color negro, la curva IV de calcio registrada en los miocitos de los papilares derechos del animal control y en color rojo, la del grupo tratado. B) Comparación de la curva corriente contra voltaje de Ca^{2+} registrada en los miocitos de los músculos papilares derechos de la rata control y la tratado. C) Gráfica de la amplitud al pico de la corriente medida en miocitos de los músculos papilares derechos en color negro el grupo control y en color rojo el grupo tratado. El número de animales usados para cada experimento se reporta entre paréntesis después del número de células registradas.

Es importante hacer notar que contrario a lo reportado por Kondo et al., en 2006, quien reportó que no existían diferencias regionales en la expresión de la corriente de Ca^{2+} entre el ventrículo derecho e izquierdo de ratón, en la rata, los papilares izquierdos resultaron tener una densidad de corriente de Ca^{2+} menor que la registrada en los papilares derechos, ambos de la condición control. (Figura 17 y 18).

El registro de la corriente de calcio se hizo de igual manera en los miocitos de los músculos papilares izquierdos tanto de animales tratados como control, y de acuerdo a los resultados obtenidos hubo un aumento en la corriente de calcio en los músculos papilares de los animales tratados respecto al grupo control de aproximadamente 66%, $p < 0.05$ (Figura 18 C). En la figura 18 A se muestra, en color negro, la curva corriente contra voltaje (IV) de los miocitos de los papilares izquierdos del grupo control, y en color rojo, la del grupo tratado. En ambos gráficos se observa que las corrientes empiezan a activarse a partir de los -35mV y que alcanzan su valor máximo a los +5 mV para después disminuir hasta llegar al voltaje de inversión en +42 mV. En estos gráficos podemos apreciar que, al contrario de lo que encontramos en el papilar derecho, en los papilares izquierdos de los animales tratados la densidad de corriente aumentó de manera significativa desde los -10 mV hasta los +25mV (Figura 18 B).

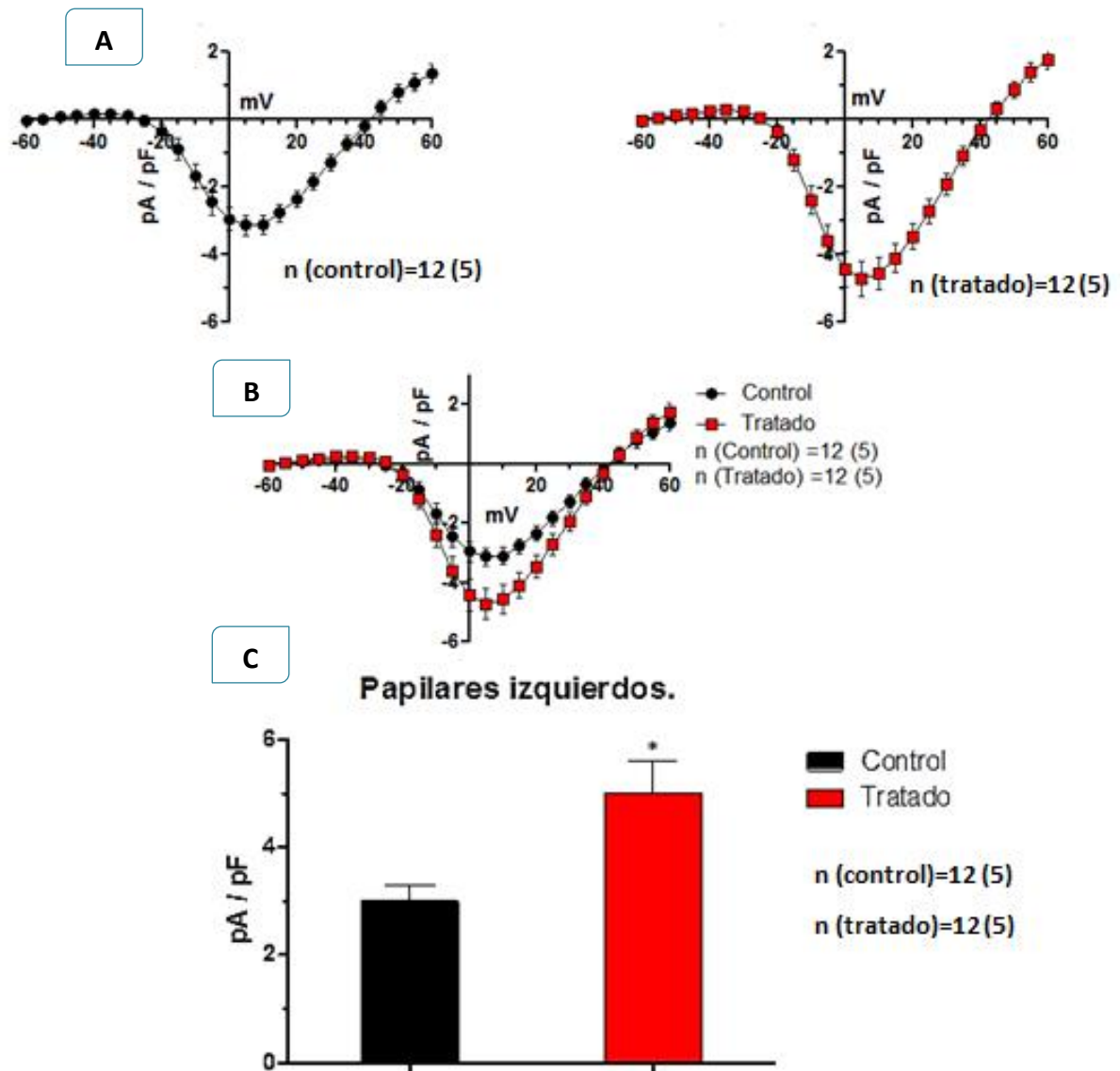


Figura 18. Curva corriente contra voltaje de la corriente de calcio tipo L (ICa_L) en los miocitos de los papilares izquierdos. A) curva corriente contra voltaje de miocitos de los músculos papilares izquierdos; en negro el grupo control y en rojo el grupo tratado. B) Comparación de la curva corriente contra voltaje (IV) de ambos grupos, en negro el grupo control y en rojo el grupo tratado. C) Gráfica de corriente al pico muestra que existe un aumento en la ICa_L de los animales tratados. El número de animales usados para cada experimento se reporta entre paréntesis después del número de células registradas. * $p < 0.05$.

Al observar las curvas I-V de las corrientes registradas, podemos suponer que en los animales con síndrome metabólico, no hay cambios en la dependencia de voltaje tanto del proceso de activación como de inactivación, pues eso se vería reflejado como un

corrimiento del grafico hacia valores positivos o negativos, con respecto al gráfico control. Sin embargo, para excluir esa posibilidad y con el afán de caracterizar la corriente de calcio en los músculos papilares de los animales tratados, decidimos realizar las curvas de activación e inactivación para la corriente de calcio.

Para generar las curvas de activación en estado estacionario utilizamos los datos de la curva IV de cada condición para obtener la conductancia, normalizarla con respecto a su valor máximo y después graficarla en función del voltaje aplicado. La conductancia la calculamos utilizando la siguiente formula:

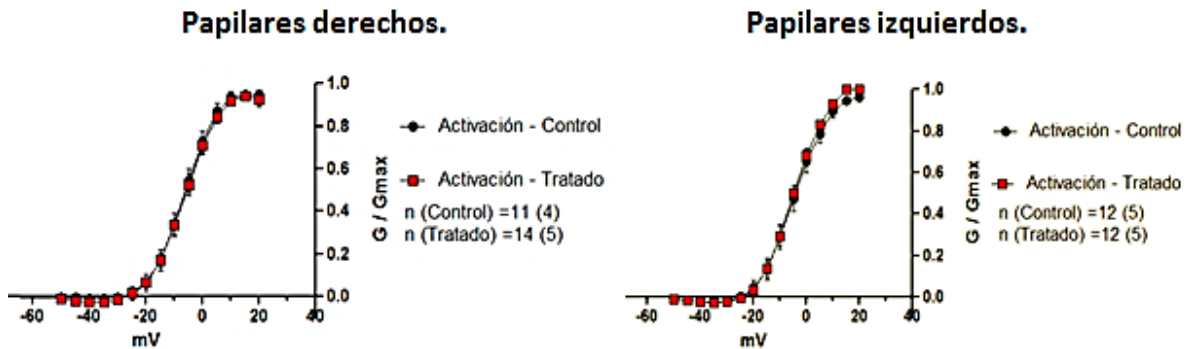
$g = I / (V_{Ca} - V_m)$, donde g =conductancia; I : es la corriente de calcio generada con cada pulso de voltaje; V_{Ca} : es el potencial de equilibrio del calcio y V_m : el voltaje de membrana. El grafico resultante se ajustó a una ecuación del Boltzman.

En el gráfico 19 A podemos observar que tanto en los papilares derechos como en los izquierdos, la curvas de activación en estado estacionario de la corriente de calcio no resultaron diferentes de las encontradas en los animales controles. De hecho, no hay diferencias estadísticas en el $V_{1/2}$ de activación de los canales ni en el factor K para cada una de las condiciones (Tabla 3)

Para realizar los gráficos de inactivación es estado estacionario, utilizamos el protocolo de doble pulso en el cual, un primer pulso despolarizante se utilizaba para llevar a los canales de calcio de un estado cerrado a uno activo y posteriormente inactivo y luego, con un segundo pulso denominado pulso de prueba, se llevaba a los canales a un estado activado. La corriente generada en este segundo pulso dependerá de la cantidad de canales que se encuentren disponibles a ser abiertos (canales no inactivados).

A

Curvas de activación en estado estable.



B

Curvas de inactivación en estado estable.

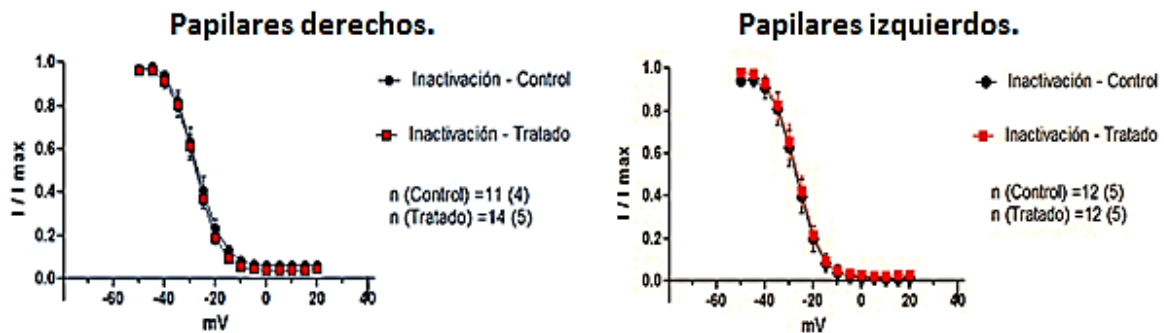


Figura 19. Curvas de activación e inactivación en estado estacionario de la corriente de calcio tipo L registrada en músculos papilares derechos e izquierdos. A) Curvas de activación en estado estacionario de la Ica registrada en los músculos papilares derechos e izquierdos. B) Curvas de inactivación en estado estacionario de la Ica registrada en los músculos papilares derechos e izquierdos. En color negro se muestra al grupo control y en color rojo al grupo tratado. El sobrelapamiento de los graficos nos indica que no hay diferencias en entre ambas condiciones.

Control				Tratado			
	n	media ± e.e.		n	media ± e.e.		p
V1/2	11	-5.94 ± 1.47		14	-6.18 ± 1.57		0.91
K	11	5.25 ± 0.20		14	5.60 ± 0.57		0.60

V1/2	12	-4.12 ± 1.90		12	-4.37 ± 1.22		0.91
K	12	5.92 ± 0.31		12	6.05 ± 0.24		0.73

Tabla 3. Valores de la activación en estado estacionario de la Ica. En el cuadro azul se muestran los valores de activación de la Ica registrada en los miocitos de los músculos papilares derechos y en amarillo los de los músculo papilares izquierdos. Los valores de p indica que no hay diferencia significativa entre ambas condiciones.

En la figura 19 B, observamos que al igual que con el proceso de activación, los gráficos de inactivación en estado estacionario de la corriente de calcio registrada en las ratas con síndrome metabólico, se sobreponen completamente con los de los animales controles, indicando que no hay diferencias tampoco en el proceso de inactivación. Esto los podemos comprobar al comparar los valores de V1/2 y de k en la tabla 4.

Control				Tratado			
	n	media ± e.e.		n	media ± e.e.		p
V1/2	11	-27.46 ± 1.42		14	-28.68 ± 1.48		0.57
K	11	3.92 ± 0.10		14	3.99 ± 0.10		0.64

V1/2	12	-27.08 ± 1.78		12	-27.18 ± 1.65		0.97
K	12	4.20 ± 0.42		12	3.71 ± 0.06		0.27

Tabla 4. Valores de la inactivación en estado estacionario de la Ica. En el cuadro azul se muestran los valores de inactivación de la Ica registrada en los miocitos de los músculos papilares derecho y en amarillo los de los músculos papilares izquierdos. Los valores de p indica que no hay diferencia significativa entre ambas condiciones.

El hecho de no encontrar diferencias en los parámetros de activación de inactivación de la corriente de calcio entre las ratas controles y a las que se les indujo el síndrome metabólico nos hace suponer que el aumento en la corriente de calcio encontrada en el papilar derecho es debida a un aumento en la expresión de canales iónicos y no a cambios en sus propiedades biofísicas. Por otro lado, y considerando los antecedentes reportados por Vazquez-Perez EM, el aumento en la corriente de calcio en el papilar izquierdo explicaría el aumento en la duración del potencial pero no el cambio en la fuerza de contracción. De igual modo, en el papilar derecho, no encontramos cambios en la corriente de calcio pero si hay un aumento en la fuerza de contracción. Por estas razones decidimos adentrarnos un poco más en el estudio del proceso de acople excitación contracción y explorar un paso posterior a la entrada de calcio a través de los canales de calcio voltaje dependientes, es decir el proceso de liberación y recaptura de calcio durante la contracción.

Regulación de calcio intracelular

En los miocitos de provenientes de los animales controles encontramos que tanto en el papilar derecho como en el izquierdo la concentración basal de calcio es de alrededor de los 25 nM y durante la contracción celular, la concentración citoplasmática aumenta hasta valores alrededor de 124 nM en los miocitos de los papilares derecho. En cambio, en los miocitos del papilar izquierdo la concentración sistólica de calcio es 36% más alta y decae a los valores diastólicos en menos tiempo, pues tiene una Tau de decaimiento menor que los miocitos del papilar derecho (Tau-derecho: 228 ms vs Tau-izquierdo: 163 ms) (Figura 20). Otra cosa importante de hacer notar es que en el papilar izquierdo, la concentración citoplasmática de calcio va aumentando gradualmente con cada estimulación hasta alcanzar un valor estable, mientras que en el papilar derecho, después del primer estímulo, la concentración intracelular de calcio comienza a disminuir hasta alcanzar el valor

sistólico final. Estos diferentes comportamientos se deben sobre todo a que en el papilar izquierdo el contenido de Ca^{2+} en el retículo sarcoplasmático va aumentando con el número de contracciones, gracias a la rápida velocidad de recaptura de calcio que presentan estos miocitos comparados con los del papilar derecho.

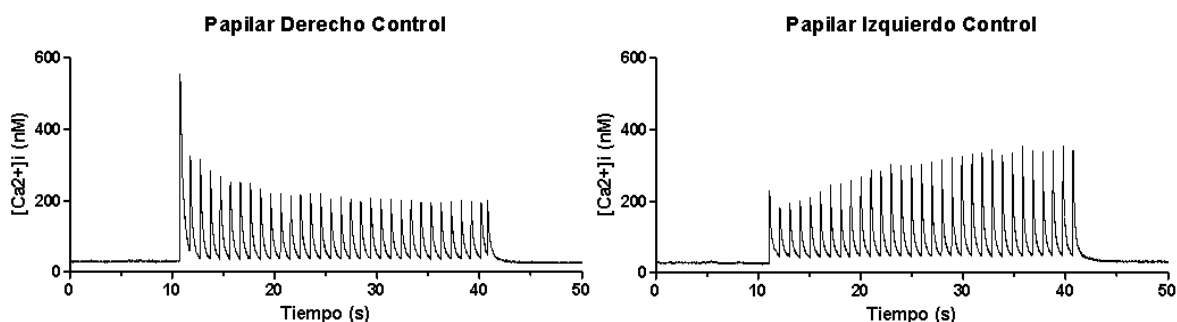


Figura 20 Transitorios globales de calcio intracelular. Los gráficos muestra dos ejemplos de los transitorios globales de calcio generados por estimulación de campo en células aisladas de músculos papilares derechos e izquierdos de animales control.

Cuando registramos los transitorios de calcio en los miocitos extraídos de las ratas con síndrome metabólico encontramos que, en los miocitos del papilar derecho, la concentración sistólica de calcio aumento en un 70% comparado con la concentración registrada en las células controles, de igual modo, encontramos un aumento en la velocidad de liberación de calcio y una disminución en el valor de la Tau de decaimiento (Figura 21). El cambio en estos dos últimos parámetros supondría que se está liberando más calcio del retículo sarcoplasmático y que la SERCA, la bomba encargada de recapturar el calcio al interior del retículo sarcoplasmático está metiendo más calcio por unidad de tiempo durante la contracción. Un reflejo de esto se observa en la disminución de los niveles de calcio diastólico y en un aumento en la cantidad de total de calcio liberado en cada estimulación (Tabla 5).

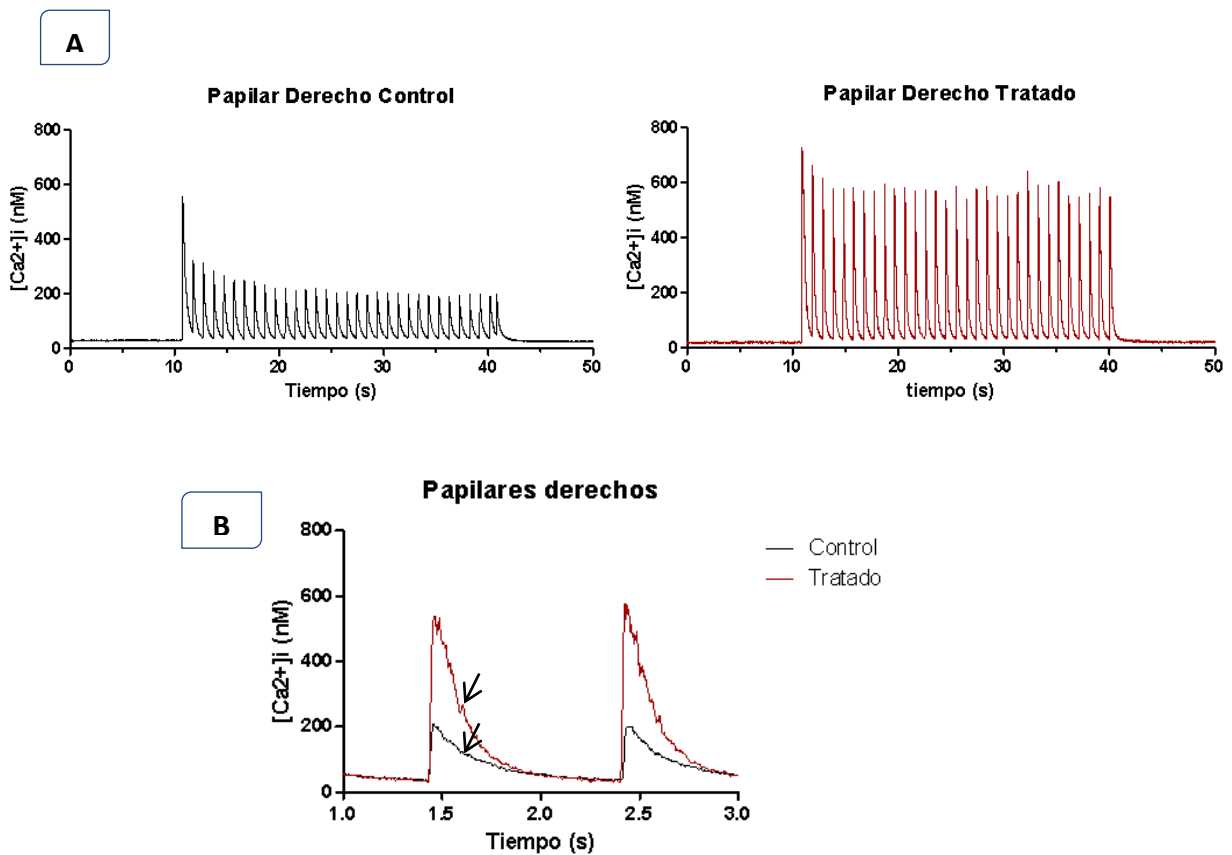


Figura 21 Transitorios intracelulares de calcio en miocitos de los papilares derechos. A). Registro de los transitorios de calcio registrados en miocitos de los papilares derechos provenientes de las ratas del grupo control, en color negro, o del grupo tratado, en rojo. **B)** Comparación entre los transitorios calcio de los músculos papilares derechos del grupo control y tratado. Los transitorios de Ca^{2+} fueron evocados con estimulación de campo a una frecuencia de 1 Hz; las flechas en color negro indican el valor de la Tau para cada uno de los trazos.

	CONTROL		SÍNDROME METABÓLICO		
PAPILAR DERECHO	n	Media $\pm$ SEM	n	Media $\pm$ SEM	Valor de p
[Ca^{2+}]i basal (nM)	3	25.96 $\pm$ 5.36	3 12	13.95 $\pm$ 2.07	0.032
[Ca^{2+}]i sistólico (nM)	3	124.13 $\pm$ 8.72	3 12	210.34 $\pm$ 20.99	0.001
Velocidad de liberación (nM/ms)	3	7.06 $\pm$ 0.72	3 12	12.93 $\pm$ 1.22	0.000

[Ca²⁺] Diastolico (nM)	3	42.41 ± 2.52	3	12	28.33 ± 1.81	0.000
Tau de decaimiento (ms)	3	228.04 ± 12.77	3	12	194.16 ± 7.32	0.017
Total de Ca²⁺ liberado	3	25348.00 ± 2081.67	3	12	39192.38 ± 3647.00	0.003

Tabla 5. Parametros de los transitorios globales de calcio de los miocitos de los papilares derechos en el modelo de SM de 2 meses s. Tabla que muestra la n, valor medio±error estándar y el valor de significancia de los parámetros medidos en los transitorios de calcio intracelulares, señalando que hubo un aumento significativo en los niveles de calcio sistólico, en la velocidad de liberación y el total de calcio liberado durante la contracción en los miocitos provenientes de los papilares derechos de animales tratados respecto al grupo control.

De igual manera se llevó a cabo la medición de calcio intracelular en miocitos provenientes de los papilares izquierdos de las ratas con síndrome metabólico. En la figura 22 se observa que la cinética con la cual los transitorios de calcio alcanzan el estado estable es muy similar y aunque, en el ejemplo mostrado, la concentración sistólica alcanzada es mayor en los miocitos de los animales tratados, cuando comparamos los valores medios de cada uno de los parámetros medidos, no encontramos cambios significativos entre el grupo control y el tratado (Figura 22 y Tabla 6)

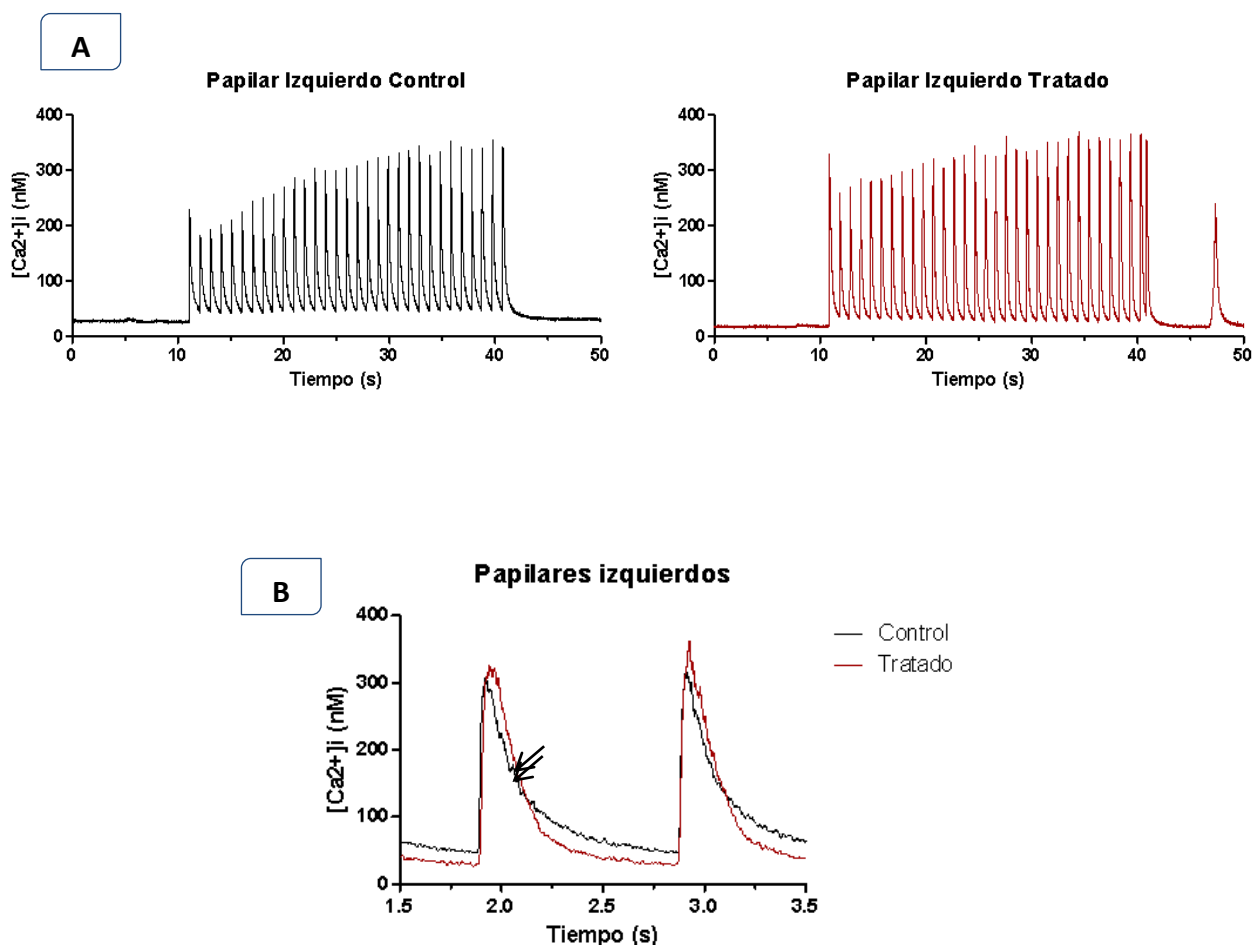


Figura 22. Transitorios intracelulares de calcio en miocitos de los músculos papilares izquierdos. A). Transitorios globales de calcio registrados en los miocitos de los músculos papilares izquierdos. B) Comparación de los transitorios de calcio entre el control y tratado. En color negro se muestran los registros del grupo control y en rojo los del tratado. Las flechas negras muestran el valor de Tau en cada uno de los ejemplos. Los transitorios fueron evocados por estimulación de campo a una frecuencia de 1 Hz.

	CONTROL		SÍNDROME METABÓLICO		
PAPILAR IZQUIERDO	n	Media $\pm$ SEM	n	Media $\pm$ SEM	Valor de p
[Ca ²⁺] _i basal (nM)	7	25.47 $\pm$ 2.71	9	18.63 $\pm$ 6.10	0.369
[Ca ²⁺] _i sistólico (nM)	7	169.20 $\pm$ 16.29	9	198.83 $\pm$ 13.70	0.165
Velocidad de liberación (nM/ms)	7	10.32 $\pm$ 0.87	9	10.71 $\pm$ 0.88	0.757

[Ca²⁺] Diastolico (nM)	7	41.94 ± 2.01	9	41.10 ± 3.68	0.854
Tau de decaimiento (ms)	7	163.05 ± 5.58	9	150.99 ± 9.00	0.291
Total de Ca²⁺ liberado	7	39196.59 ± 4807.40	9	3273.51 ± 2657.23	0.217

Tabla 6. Parametros de los transitorios globales de calcio de los miocitos de los papilares izquierdos en el modelo de SM de 2 meses. Tabla que muestra la n, valor medio±error estándar y el valor de significancia de los parámetros medidos en los transitorios de calcio intracelulares. Podemos observar que de acuerdo al valor de significancia (p), no hay diferencias entre ambos grupos en los parámetros medidos.

**RESULTADOS EN EL
MODELO ANIMAL DE 6
MESES DE
TRATAMIENTO.**

Resultados en el modelo animal de 6 meses.

Después de haber realizado el estudio de las alteraciones en el proceso de acople excitación-contracción en el modelo animal con 2 meses de tratamiento para la inducción del síndrome metabólico decidimos profundizar el estudio de estas alteraciones a largo plazo en el mismo modelo pero ahora con un tratamiento de 6 meses para inducir síndrome metabólico. Realizamos de igual manera la medición de la corriente de calcio tipo L y la medición de la regulación de calcio intracelular en células aisladas de miocitos provenientes de los músculos papilares derechos e izquierdos de ratas con síndrome metabólico.

Parámetros bioquímicos.

Cómo parte de la validación del modelo animal, se realizaron pruebas bioquímicas, por medio de la toma de sangre una vez sacrificadas las ratas, para medir alteraciones en los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos; además tomamos algunos parámetros morfométricos como indicadores de obesidad. El aumento en los medidos valores serían tomados en cuenta para el diagnóstico de síndrome metabólico y los resultados que obtuvimos fueron:

- Hubo un aumento significativo en los niveles de glucosa del 49%, del 43% en los de colesterol y del 29% en los triglicéridos en los animales tratados respecto al grupo control. (Figura 23).

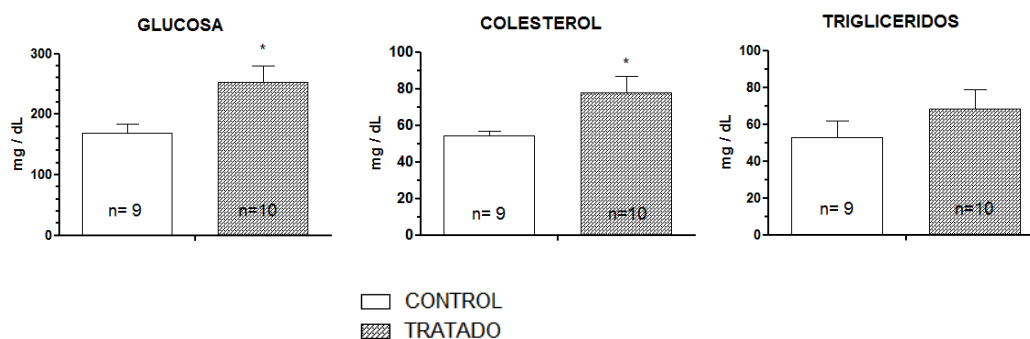


Figura 23. Parámetros bioquímicos. Niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos en animales controles y tratados con una n=9 y n=10, respectivamente. Tanto los niveles de glucosa como de colesterol aumentaron de manera estadísticamente significativa. *p<0.05

Parámetros morfométricos.

Las ratas de 6 meses con tratamiento tuvieron un aumento significativo de peso y en el perímetro abdominal respecto al grupo control. (Figura 27)

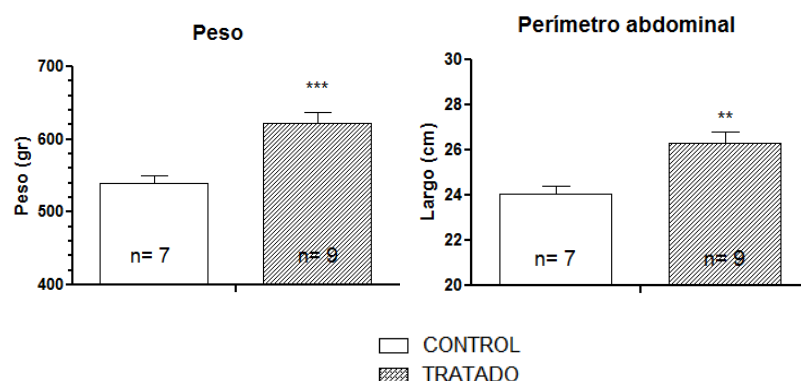


Figura 24. Parámetros morfométricos. Los gráficos muestran las mediciones del peso y del perímetro abdominal en las ratas controles y tratadas. El número de animales usados se muestra en el interior de cada gráfico. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.03$

El aumento de peso corporal en las ratas con síndrome metabólico se debió al aumento en la cantidad de grasa presente a nivel retroperitoneal, peripancreática y epididimal. (ver tabla 7)

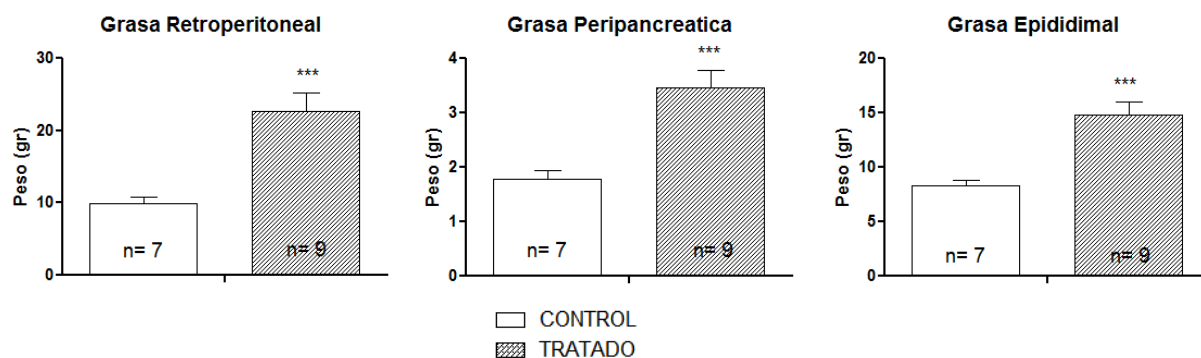


Figura 25. Composición corporal del aumento de peso en ratas. Los gráficos muestran un aumento en la grasa retroperitoneal, peripancreática y en la grasa epididimal. *** $p < 0.001$

CONTROLES			TRATADOS		
	N	Media $\pm$ SEM	n	Media $\pm$ SEM	
PARÁMETROS BIOQUÍMICOS					
GLUCOSA	6	168.57 $\pm$ 15.45	11	252.77 $\pm$ 27.81	0.048
COLESTEROL	6	54.18 $\pm$ 2.67	11	77.69 $\pm$ 8.95	0.036
TRIGLICERIDOS	6	52.73 $\pm$ 8.89	11	68.38 $\pm$ 10.43	0.479
PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS					
PESO	21	539.76 $\pm$ 10.06	26	622.88 $\pm$ 14.67	0.000
CINTURA	20	24.04 $\pm$ 0.37	23	26.30 $\pm$ 0.53	0.001
LARGO	20	26.19 $\pm$ 0.28	23	26.72 $\pm$ 0.18	0.108
G. EPIDIDIMAL	19	8.37 $\pm$ 0.43	22	14.77 $\pm$ 1.27	0.000
G. PERIPANCREATICA	19	1.78 $\pm$ 0.17	22	3.47 $\pm$ 0.31	0.000
G. RETROPERITONEAL	7	9.88 $\pm$ 0.89	9	22.61 $\pm$ 2.55	0.001
INDICE DE GRASA CORPORAL	19	2.57 $\pm$ 0.26	22	4.47 $\pm$ 0.51	0.003

Tabla 7. Parámetros bioquímicos y morfométricos de las ratas sometidas a 6 meses de tratamiento. La tabla muestra el valor medio $\pm$ error estándar de los diferentes parámetros bioquímicos y morfométricos obtenidos en las ratas del grupo control y tratado. La n denota el número de animales usados para cada una de las mediciones. Para comparar los valores de ambos grupos se usó una t de Student y los valores de significancia se muestran en la columna de la derecha (p).

Registro de la corriente de calcio tipo L

Después de haber caracterizado al modelo animal de 6 meses de tratamiento procedimos a registrar la corriente de calcio tipo L en células aisladas de los músculos papilares derecho e izquierdos tanto en las ratas con síndrome metabólico y del grupo control. Para ello utilizamos el mismo protocolo de registro usado en los animales de 2 meses para evocar las corrientes de calcio, es decir, pulsos despolarizantes desde los -60mV hasta los + 60 mV, cada 5 mV y partiendo de un potencial de mantenimiento de -70mV (Figura 26 C), al igual que a los dos meses, las corrientes son entrantes, transitorias, y se empiezan a activar alrededor de los -30mV, alcanzan su corriente máxima a los 5mV y luego esta disminuye para convertirse en una corriente saliente alrededor de los +45 mV. (Figura 26 A y B)

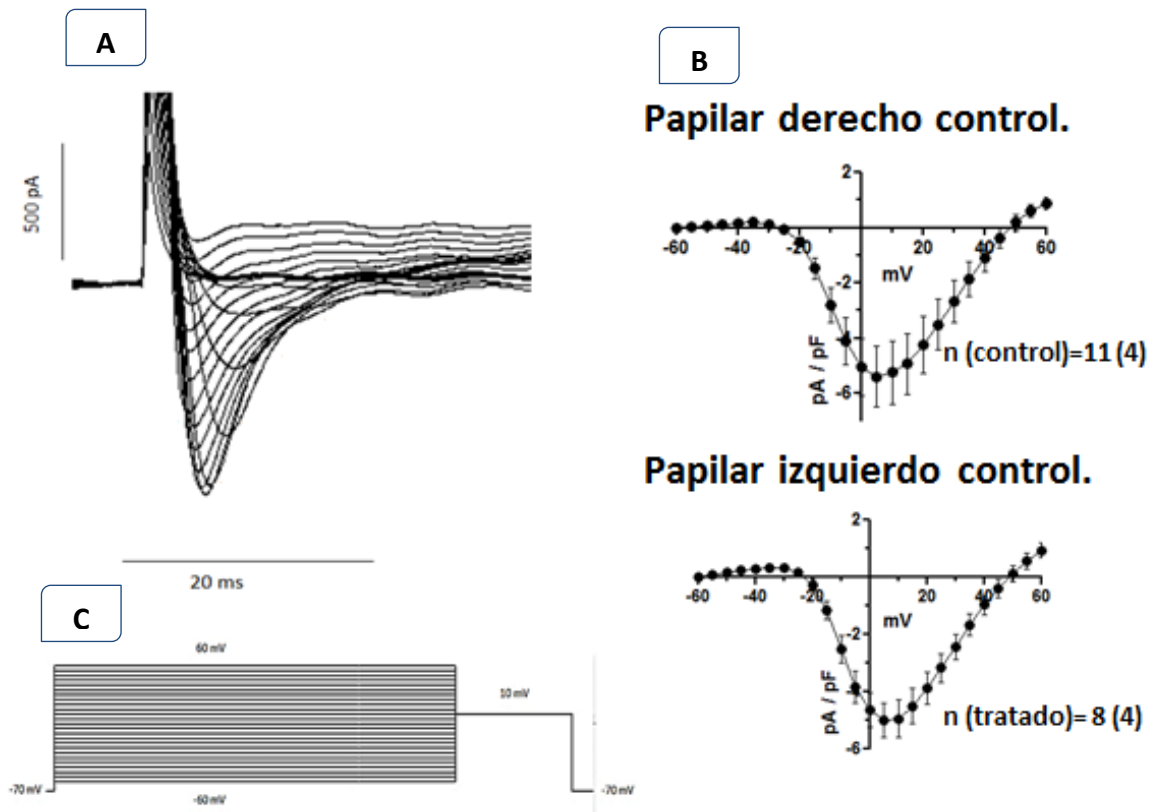


Figura 26. Corrientes de calcio tipo L (ICa_L) registradas en miocitos de los músculos papilares de las ratas del grupo control. A) Ejemplo de un registro de la corriente de Ca^{2+} tipo L (ICa_L) en los cardiomiocitos. B) Curvas corriente contra voltaje de la ICa_L registradas en los miocitos de músculos papilares derechos e izquierdos. C) Protocolo usado para evocar las corrientes de calcio tipo L. Note que para contruir la curva IV solo usamos la corrientes generas durante el primer pulso de voltaje. El número de animales usados se muentra entre paréntesis después del número de células (n).

Por otro lado en los animales con síndrome metabólico las corrientes de calcio tipo L registradas mostraron de igual manera las mismas características típicas de una corriente de calcio tipo L (Figura 27 A), es decir, eran corrientes entrantes transitorias, con una activación a voltajes de -30 y -20 mV que mostraban su corriente maxima a los 5mV disminuyendo con cada pulso despolarizante hasta convertirse en una corriente saliente aproximadamente a los +45mV. (Figura 27 B)

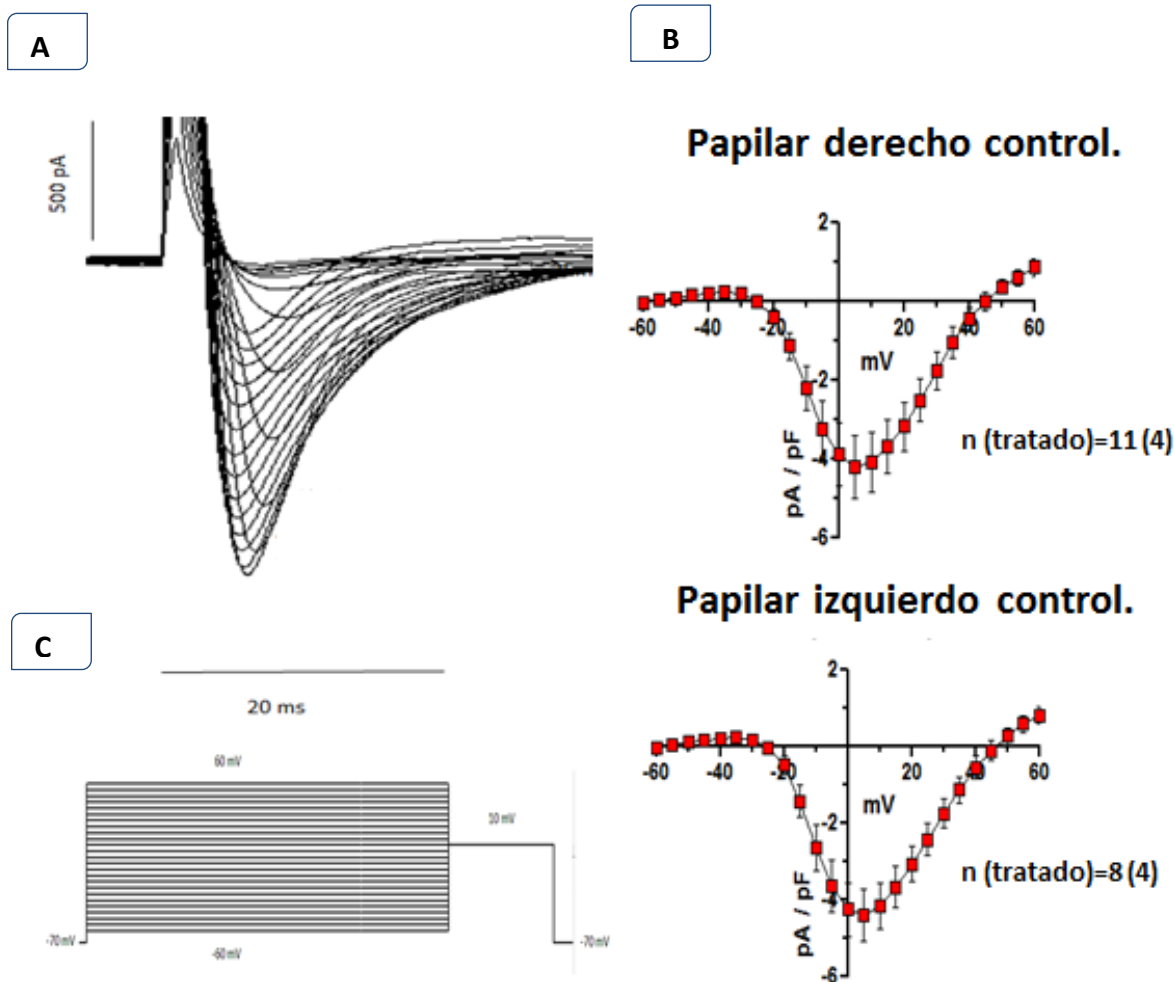


Figura 27. Corriente de calcio tipo L (ICa_L) en los miocitos de los músculos papilares de ratas con síndrome metabólico. A) Ejemplo del registro de una corriente de Ca²⁺ registrada en un cardiomiocito B) Curvas corriente contra voltaje de la I_{Ca} registradas en los miocitos de los músculos papilares derechos e izquierdos. C) Protocolo de voltaje para evocar la corriente de calcio tipo L. Para realizar la curva IV solo medimos la corriente máxima generada durante la primera serie de pasos de voltaje. El número de animales usados se muestra entre paréntesis después del número de células (n).

En la figura 28 se muestran las curvas de corriente contra voltaje de miocitos de los músculos papilares derechos, así como la comparación entre la curva IV de miocitos provenientes de ratas con síndrome metabólico con el grupo control (figura 28 B), también se muestra la gráfica de corriente al pico en donde observamos que no hay algún cambio significativo en la corriente registrada en ambos grupos. En los cuales se muestra que no existe algún cambio significativo en el registro de las corrientes de calcio tipo L respecto al grupo de ratas control.

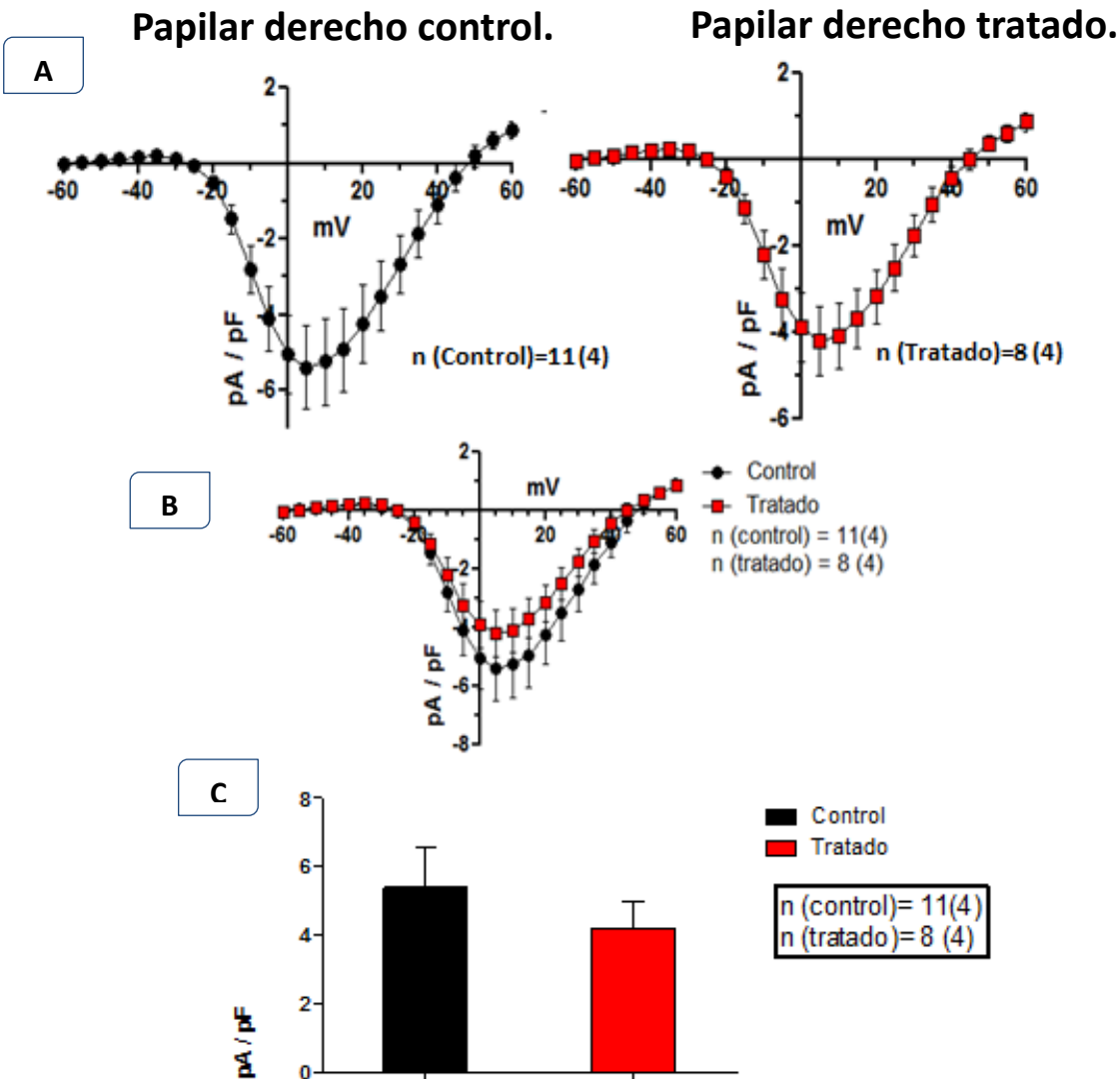


Figura 28.- Curvas corriente contra voltaje (IV) de la Ica de miocitos de los músculos papilares derechos. A) Curvas IV de calcio registradas en los miocitos de los músculos papilares derechos. B) Comparación, de la curva IV de calcio, entre la condición control y el grupo tratado. C) Grafica de la corriente al pico de miocitos de músculos papilares derechos. En negro se muestran las gráficas del grupo control y en rojo del grupo de ratas tratadas. El número de células registradas y de animales usados en cada condición se muestran en cada gráfico.

En el caso de los miocitos de los músculos papilares izquierdos, en las ratas del grupo tratado hubo una reducción del 10% de la corriente al pico, pero al realizar el análisis estadístico no encontramos diferencias significativas en la corriente la pico ni en ningún punto de la curva corriente contra voltaje (Figura 29). Posteriormente, al igual que con las

ratas tratadas durante 2 meses, procedimos a realizar las curvas de activación e inactivación en estado estacionario para descartar cambios en la dependencia de voltaje de la activación o de la inactivación. Como podemos observar en la figura 30, los gráficos obtenidos para los cardiomiocitos de los papilares derecho o izquierdos no presentan ninguna diferencia entre el grupo control y el tratado y al comparar los valores de $V_{1/2}$ y K encontramos que estadísticamente no son diferentes. (Tabla 8)

El hecho de no haber encontrado diferencias en la corriente de calcio, entre el grupo control y el tratado, nos hace suponer que no existen alteraciones en la primera fase del proceso de acople excitación-contracción como en el modelo animal de síndrome metabólico de dos meses. Sin embargo, al igual que en ese modelo, podría estar también alterado el proceso de liberación y recaptura de calcio del retículo sarcoplasmático o el acoplamiento de calcio en la maquinaria contráctil de los cardiomiocitos. Para explorar la primera posibilidad decidimos medir los cambios en la concentración de calcio intracelular durante el proceso de contracción en los cardiomiocitos.

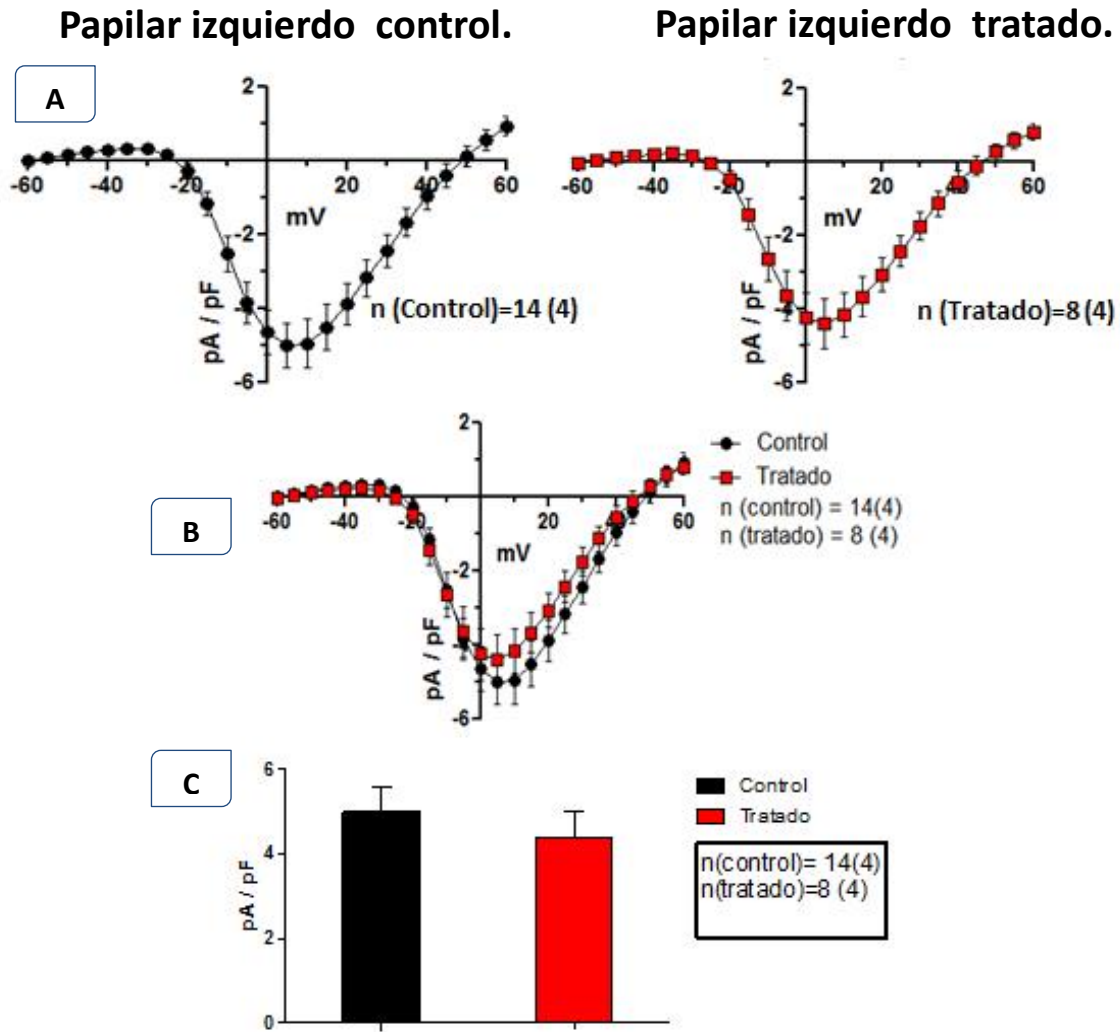


Figura 29. - Curva IV de calcio obtenida en los miocitos de los músculos papilares izquierdos de los animales controles y tratados. A) Grafica de corriente contra voltaje de miocitos de músculos papilares izquierdos B) Comparacion de la curva corriente contra voltaje de calcio entre la condición control y el grupo tratado C) Grafica de la corriente al pico de los miocitos de los músculos papilares izquierdos. En color negro se muestra al grupo control y en color rojo al grupo tratado. El número de animales usados en cada condición junto con el número de células registradas se muestran al interior de cada gráfico.

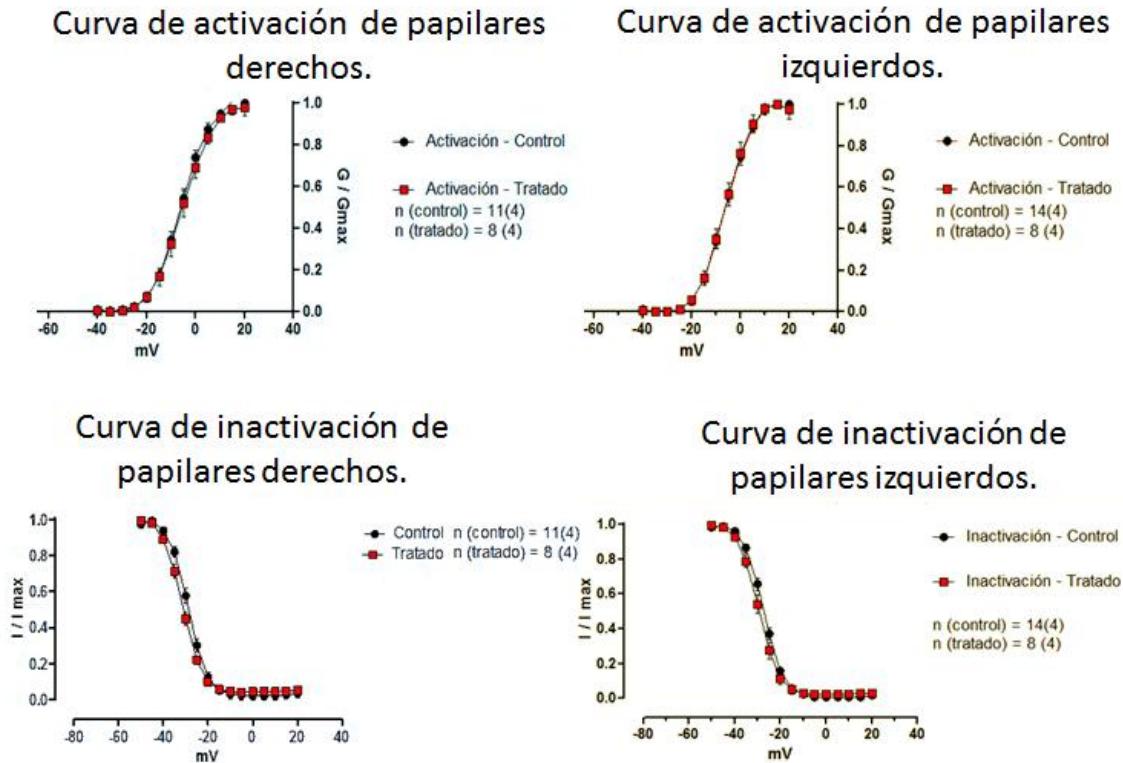


Figura 30. Curvas de activación e inactivación en estado estacionario. En la parte superior se muestran las curvas de activación en estado estacionario de los miocitos de los músculos papilares derechos (parte superior izquierda) y papilares izquierdos (parte superior derecha). En color rojo se muestran las curvas de activación de las ratas con síndrome metabólico y en color negro las del grupo control. En la parte inferior se muestran las curvas de inactivación en estado estacionario de los miocitos de los músculos papilares derechos (parte inferior izquierda) y de los músculos papilares izquierdos (parte inferior derecha). En color rojo se muestran las curvas de inactivación de las ratas con síndrome metabólico y en color negro el grupo de ratas control.

ACTIVACIÓN EN ESTADO ESTABLE.

PAPILAR DERECHO.

CONTROL			SÍNDROME METABÓLICO		
	n	Media ± SEM	n	Media± SEM	Valor de p
V1/2	11	-5.74 ± 1.27	8	-6.12 ± 1.47	0.81
K	11	5.15 ± 0.20	8	5.30 ± 0.37	0.62

PAPILAR IZQUIERDO.

CONTROL			SÍNDROME METABÓLICO		
	n	Media ± SEM	n	Media± SEM	Valor de p
V1/2	14	-4.31 ± 1.70	8	-4.25 ± 1.32	0.91
K	14	5.95 ± 0.25	8	6.03 ± 0.27	0.72

INACTIVACIÓN EN ESTADO ESTABLE.

PAPILAR DERECHO.

CONTROL			SÍNDROME METABÓLICO		
	n	Media ± SEM	n	Media± SEM	Valor de p
V1/2	11	-26.34 ± 1.51	8	-27.56 ± 1.44	0.62
K	11	3.87 ± 0.15	8	3.45 ± 0.13	0.72

PAPILAR IZQUIERDO.

CONTROL			SÍNDROME METABÓLICO		
	n	Media ± SEM	n	Media± SEM	Valor de p
V1/2	14	-26.56 ± 1.62	8	-27.78 ± 1.67	0.91
K	14	4.13 ± 0.32	8	3.79 ± 0.05	0.32

Tabla 8. Valores de activación e inactivación en estado estable. Tablas que muestran que no existe algún cambio significativo en los valores de $V_{1/2}$ y K .

Regulación del calcio intracelular

En los miocitos provenientes de los músculos papilares derechos e izquierdo de animales controles la concentración de calcio basal es de aproximadamente 15 nM y de 25nM respectivamente, durante el proceso de contracción muscular los niveles citoplásmicos de calcio aumentan llegando hasta 119 nM en miocitos de los papilares derechos y 142nM en miocitos de los papilares izquierdos.

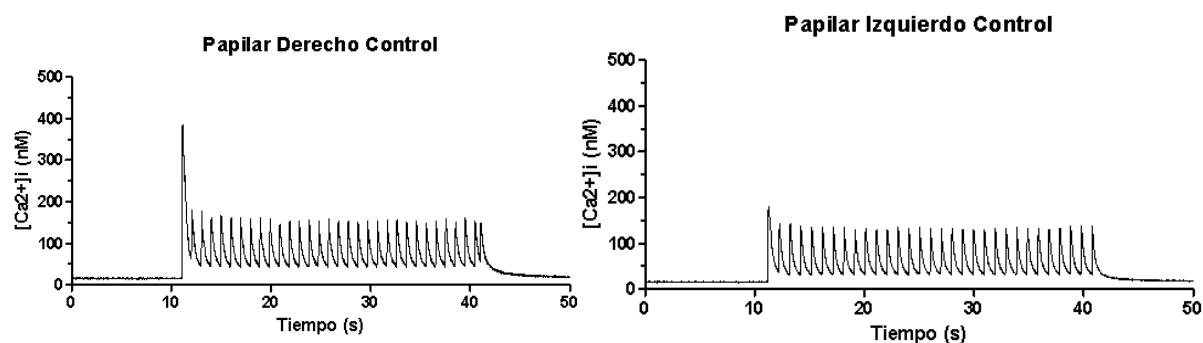


Figura 31. Concentración de calcio en miocitos de músculos papilares derecho e izquierdos de ratas control. Registro de los transitorios de calcio por medio de estimulación de campo a una frecuencia de 1 Hz.

En los miocitos de los músculos papilares derechos la concentración citoplasmica de calcio aumenta en el primer estimulo y posteriormente disminuye hasta alcanzar el nivel sistolico final; de igual modo, en los miocitos de los músculos papilares izquierdos el comportamiento es muy parecido pero a pesar de que el primer estímulo tiene una amplitud menor que el transitorio de calcio del lado derecho, la cantidad de calcio liberada durante los estímulos sucesivos es 85% mayor que la liberada por los

miocitos de los papilares derechos, esto gracias a que la tau de decaimiento de los transitorios del papilar izquierdo es mayor que la del lado derecho (Tau izq:147 ms vs Tau der: 133ms). Ver las tablas 9 y 10.

En los registros de los transitorios de calcio en miocitos proveniente de ratas con síndrome metabólico encontramos que en los miocitos de los músculos papilares derechos de ratas con síndrome metabólico la concentración sistólica de calcio aumento a más del doble comparado con la concentración registrada en las células de papilares derechos provenientes de animales controles, asimismo hubo un aumento en la velocidad de liberación de calcio y una disminución en el valor de Tau de decaimiento (Figura 32). Esto indicaría que hay un aumento en la liberación de calcio del retículo sarcoplasmico y que hay un aumento en la actividad de la bomba de Ca^{2+} ATP asa del retículo sarcoplasmico (SERCA).

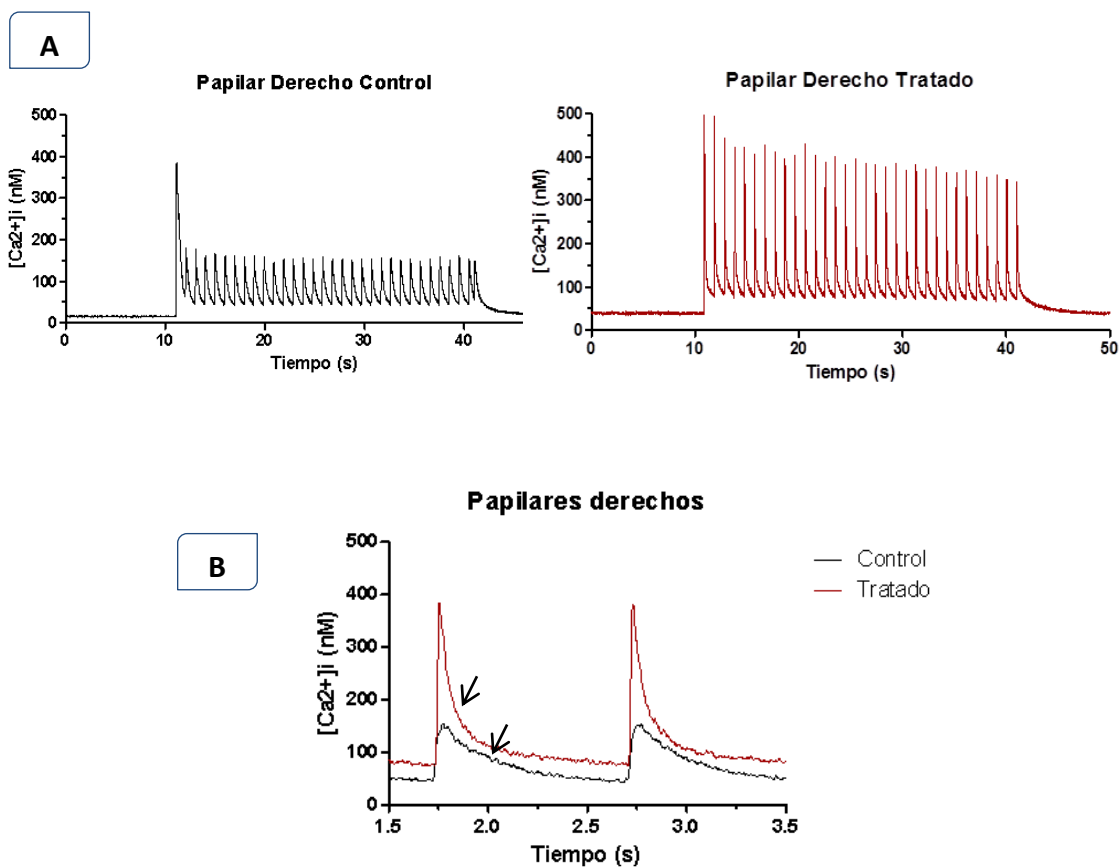


Figura 32. Transitorios intracelulares de calcio en miocitos de los músculos papilares derechos. A) Ejemplo de los transitorios globales de calcio registrados en los miocitos de los músculos papilares

derechos . B) Comparación, entre la condición control y tratada, de los transitorios de calcio registrado en los miocitos de los músculos papilares derechos. En negro se muestran los trazos del grupo control y en rojo los del grupo tratado.

CONTROL			SÍNDROME METABÓLICO		
Papilar Derecho	n	Media $\pm$ SEM	n	Media $\pm$ SEM	Valor de p
[Ca ²⁺] _i basal (nM)	7	14.57 $\pm$ 1.29	9	35.51 $\pm$ 5.30	0.009
[Ca ²⁺] _i sistólico (nM)	7	119.18 $\pm$ 17.69	9	268.09 $\pm$ 13.77	0.000
Velocidad de liberación (nM/ms)	7	5.22 $\pm$ 0.62	9	17.54 $\pm$ 1.34	0.000
[Ca ²⁺] Diastólico (nM)	7	41.46 $\pm$ 4.69	9	77.47 $\pm$ 4.95	0.000
Tau de decaimiento (ms)	7	133.46 $\pm$ 12.64	9	77.23 $\pm$ 4.91	0.000
Total de Ca ²⁺ liberado	7	14597.82 $\pm$ 3079.01	9	34035.94 $\pm$ 2680.99	0.000

Tabla 9. Parametros de los transitorios globales de calcio de los miocitos de los papilares derechos en el modelo de SM de 6 meses. La tabla muestra los valores medios $\pm$ error estándar de los diferentes parámetros medidos en los registros de los transitorios de calcio. La n denota el número de animales usados para cada una de las mediciones, los valores de significancia se muestran en la columna de la derecha.

En el registro de la concentración de calcio intracelular de los miocitos aislados provenientes de los músculos papilares izquierdos de ratas con síndrome metabólico se observó que hubo una elevación en la concentración citoplasmática de calcio durante la primera estimulación, posteriormente esta disminuye y comienza a aumentar gradualmente hasta llegar al estado estable. Este comportamiento asemeja mucho al de los transitorios de los miocitos del grupo control del modelo de dos meses tratamiento. Además comparado con el grupo control, los miocitos provenientes del animal tratado mostraron un aumento del 100% en la amplitud de los transitorios de calcio, un

disminución en el valor de la tau de decaimiento y un incremento en la cantidad total de calcio citoplasmático durante la contracción (Tabla 10).

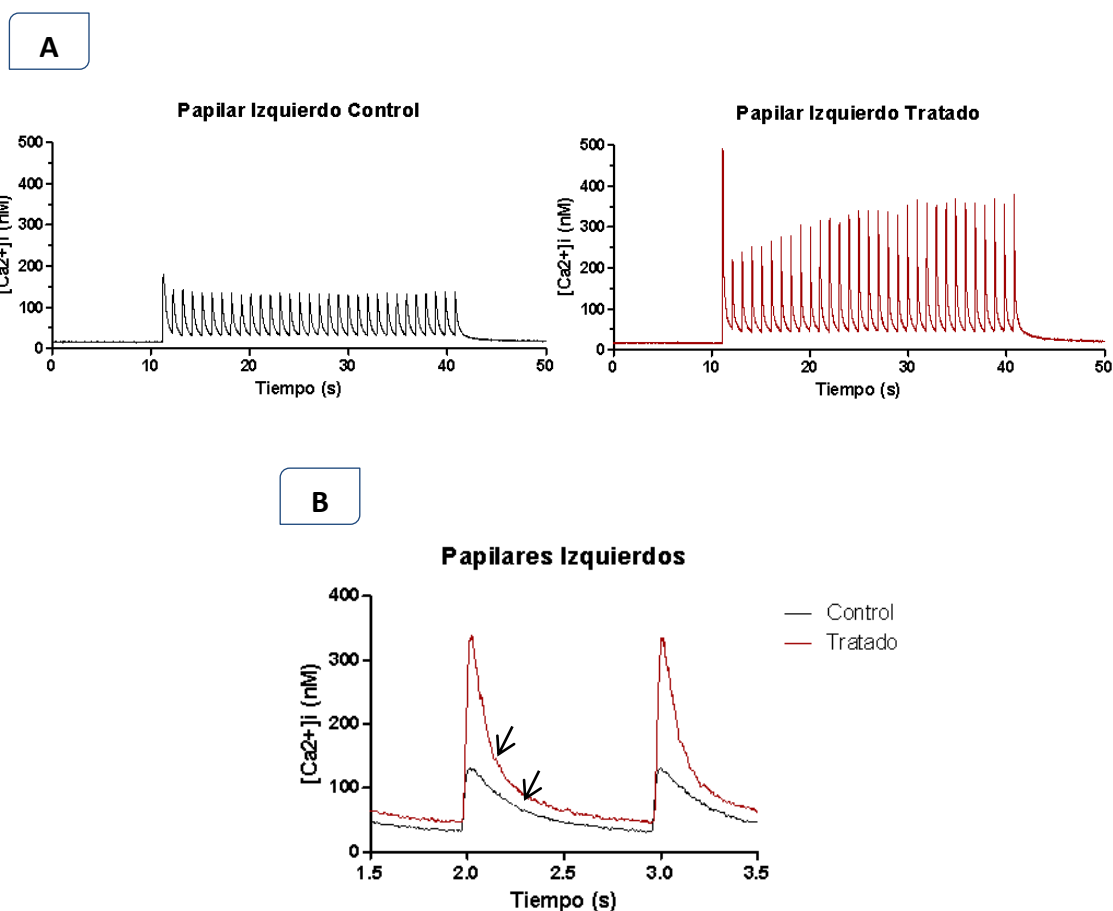


Figura 33. Transitorios intracelulares de calcio en miocitos de papilares izquierdos. A). Registro de los transitorios de calcio en miocitos de músculos papilares izquierdos, obtenidos por estimulación de campo a una frecuencia de 1Hz, en color negro el grupo control y en color rojo el grupo tratado. B) Comparación de los transitorios intracelulares de calcio en músculos papilares izquierdos en negro el grupo control y en rojo el grupo tratado, las flechas en color negro muestran el valor de Tau.

	CONTROL		SÍNDROME METABÓLICO		
PAPILAR IZQUIERDO	n	Media $\pm$ SEM	n	Media $\pm$ SEM	Valor de p
[Ca ²⁺] _i basal (nM)	10	25.59 $\pm$ 6.24	5	16.33 $\pm$ 2.58	0.331

[Ca²⁺]_i sistólico (nM)	10	142.71 ± 10.50	5	288.48 ± 50.96	0.000
Velocidad de liberación (nM/ms)	10	17.30 ± 3.54	5	15.03 ± 3.07	0.680
[Ca²⁺] Diastólico (nM)	10	47.95 ± 3.83	5	32.78 ± 2.48	0.010
Tau de decaimiento (ms)	10	147.47 ± 10.64	5	113.17 ± 6.20	0.032
Total de Ca²⁺ liberado	10	26582.05 ± 2713.00	5	36896.15 ± 4954.85	0.050

Tabla 10. Parametros de los transitorios globales de calcio de los miocitos de los papilares izquierdos en el modelo de SM de 6 meses. La tabla muestra los valores medios ± error estándar de los diferentes parámetros medidos en los transitorios de calcio. La n denota el número de animales usados para cada una de las mediciones y los valores de significancia se muestran en la columna de la derecha.

DISCUSION

El síndrome metabólico es un conjunto de signos que comprenden la hipertensión, hiperglucemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia y además el aumento en el perímetro abdominal, el cual fue más recientemente incluido por la OMS y NCEP ATP III en el cuadro de signos para diagnosticar el síndrome metabólico en humanos (Aguilar-Salinas et al., 2004); si bien se considera al tejido graso como un tejido de reserva de energía, también es un órgano endocrino activo que libera una amplia variedad de adipocinas y citocinas proinflamatorias (Ryan VH et al., 2008) y juega un papel importante en la etiología de otras enfermedades como la diabetes mellitus tipo 2 (IDF 2006).

Para el desarrollo del presente trabajo, utilizamos ratas macho wistar las cuales no presentan predisposición genética a desarrollar obesidad ni alteraciones cardíacas (Larqué C et al., 2011); de hecho el modelo animal del síndrome metabólico ya fue previamente caracterizado por el grupo de la doctora Marcia Hiriart, en el Instituto de Fisiología de la UNAM y por el del doctor Julián Torres en el Instituto de Fisiología de la BUAP (Albarado Ibañez 2013, Vázquez Pérez EM, 2012) y para inducirlo se aumentó la ingesta de carbohidratos en las ratas sustituyendo el agua que tomaban por agua azucarada al 20%. Es importante mencionar que el aumento en la ingesta de carbohidratos es un componente importante en la etiología del síndrome metabólico en los humanos, lo cual resalta la importancia de este modelo animal y su uso para esta investigación. Por otro lado, debemos mencionar que el uso exclusivo de ratas macho en la parte experimental de este trabajo fue para disminuir la variabilidad en los resultados que pudiera ser ocasionada por el cambio en la composición corporal del animal debido a su edad y a los cambios hormonales.

Trabajos realizados anteriormente en este modelo animal evidencian que el síndrome metabólico induce una remodelación eléctrica y morfológica en el nodo senoauricular (Albarado Ibañez 2013), lo cual aumenta la probabilidad de sufrir arritmias cardíacas. Además, en un trabajo de tesis realizado por el grupo del doctor Julian Torres encontraron que en las ratas a las cuales se les había inducido el síndrome metabólico presentaban

también alteraciones a nivel ventricular, específicamente, en la actividad eléctrica de los músculos papilares y en la fuerza de contracción generada por los mismos (Vázquez Pérez EM, 2012). En este último trabajo, Vázquez Pérez reportó que a nivel de los músculos papilares derechos había un aumento en la fuerza de contracción así como una disminución en la duración del potencial de acción, por otro lado en los músculos papilares izquierdos hubo una disminución en la fuerza de contracción y un aumento en la duración del potencial de acción (Vázquez Pérez EM, 2012).

Teniendo como referencia los trabajos anteriores en este modelo animal de rata con síndrome metabólico, decidimos profundizar el estudio enfocándonos en el proceso de acople excitación-contracción en los miocitos de los músculos papilares. En este trabajo decidimos estudiar a nivel de los cardiomiocitos aislados los cambios en la corriente de calcio y en la cantidad de calcio citoplasmático disponible durante el proceso de contracción. Ambos procesos son claves en el acople excitación-contracción de los miocitos y son mucho más fáciles de estudiar a nivel de célula aislada que del tejido íntegro.

El acople excitación-contracción es el proceso que se inicia con la excitación eléctrica y que termina con la contracción del cardiomiocito, generando en conjunto la contracción cardíaca. El ion que juega un papel importante en este proceso es el calcio (Ca^{2+}), el cual es esencial en la actividad eléctrica cardíaca y es el activador directo de los miofilamentos que generan la contracción a nivel intracelular (Bers D.M, 2001). Durante el potencial de acción cardíaco, el calcio entra a la célula a través de los canales de calcio dependientes de voltaje ubicados en la membrana del cardiomiocito, en especial en los tubulos T; la corriente de calcio generada contribuye a la fase de meseta del potencial de acción y a al unirse al receptor de rianodina, a su apertura, activando la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico, fenómeno conocido como liberación de calcio inducida por calcio. El calcio liberado se une a los miofilamentos contractiles generando la contracción cardíaca. (Bers D.M, 2001)

MODELO DE RATA CON SÍNDROME METABÓLICO – INDUCCIÓN DURANTE DOS MESES.

En los resultados que obtuvimos con el modelo animal de rata a la cual se le indujo síndrome metabólico durante 2 meses, encontramos dos grandes cambios con respecto al

grupo control: a) un aumento en la densidad de corriente registrada en los miocitos de los provenientes del papilar izquierdo y b) una aumento en la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} generados durante la contracción en los miocitos proveniente de los músculos papilares derechos.

Con respecto al aumento en la corriente de calcio, hay que mencionar que el acople excitación contracción puede ser regulado a diferentes niveles y el primero de ellos sería modulando la entrada de calcio a través de los canales de calcio voltaje dependientes. En efecto, una disminución en la corriente de calcio puede ir acompañada de una disminución en la cantidad total de calcio liberada del retículo sarcoplásmico y en consecuencia de una disminución en la cantidad de calcio disponible para unirse a la maquinaria contractil y de una disminución en la contracción (Solaro R. J y Rarick H.M., 1998). En el caso de las ratas con síndrome metabólico el aumento en la corriente de calcio podría explicar el aumento en la duración del potencial de acción previamente reportado para los músculos papilares izquierdos pero no la disminución en la fuerza de contracción del músculo reportado por Vazquez-Pérez. Esta discrepancia en los datos podría explicarse por un cambio en la sensibilidad de la troponina por el calcio (Fukuda N. et al., 2001) o bien por una remodelación estructural donde a pesar de que la maquinaria contráctil está intacta, se encuentra mal organizada y es poco eficiente para generar fuerza (Pogwizd, S. M et al., 2001). Como lo mencionamos anteriormente, en los miocitos del papilar derecho no encontramos cambios en la corriente de calcio pero sí en otro punto de regulación del proceso de acople excitación contracción; en la liberación y recaptura de calcio por el retículo sarcoplásmico. Este aumento se vio acompañado de una disminución en la τ de decaimiento del transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, lo que significaría un transitorio más grande pero con una duración menor. Si bien podría pensarse que al disminuir la duración del transitorio la cantidad total de calcio sería la misma que en la condición control, cuando realizamos la integral de los transitorios evocados en los miocitos de la condición control y tratada, encontramos que los miocitos provenientes del animal con síndrome metabólico mostraron un aumento de casi el 100% en la cantidad total de calcio intracelular. Esto significa que el proceso de liberación de calcio del retículo está aumentado y que el aumento en la tasa de recaptura de calcio por la SERCA le permite al retículo llenarse para

liberar suficiente calcio durante una contracción consecutiva (Ver tabla 5 de los resultados). Este segundo resultado concuerda con los reportados por Vázquez Pérez (Vázquez Pérez EM, 2012), en los cuales los músculo papilares derecho de las ratas con síndrome metabólico presentaron un aumento en la fuerza de contracción pero una disminución en la duración del potencial de acción.

Otro dato importante para resaltar es el hecho de que en la condición control, en ambos ventrículos los transitorios de $[Ca^{2+}]_i$ tuvieron una morfología diferente: en los miocitos de los papilares izquierdos la cantidad total de calcio durante la contracción fue prácticamente 60% mayor que en los miocitos del papilar derecho, además tanto la amplitud como velocidad de liberación de calcio fueron mayores y aún así, la concentración diatólico de calcio se mantuvo sin cambios entre el papilar derecho e izquierdo (Tabla 5 y 6). Estas diferencias entre el papilar izquierdo y derecho se perdieron en el modelo animal de síndrome metabólico. Respecto a las diferencias en los mecanismos de regulación del calcio entre el ventrículo derecho e izquierdo, nuestros resultados concuerdan parcialmente con los de Kondo y colaboradores, quienes reportaron que en el ratón la amplitud de los transitorios de calcio era mayor en el endocardio del ventrículo izquierdo que en los miocitos del ventrículo derecho y que por lo que respecta a la corriente de Calcio tipo L, esta era menor aunque no estadísticamente diferente en el endocardio del ventrículo izquierdo con respecto al ventrículo derecho, es importante hacer la aclaración, que los datos que Kondo reporto sobre el ventrículo derecho no se refieren a una capa en específico de la pared del ventrículo derecho, mientras que los datos que pertenecen al ventrículo izquierdo son del endocardio (Kondo et al., 2006).

MODELO DE RATA CON SÍNDROME METABÓLICO – INDUCCION DURANTE SEIS MESES.

Para profundizar el análisis sobre la alteraciones cardiacas inducidas por el síndrome metabólico decidimos estudiar en el mismo modelo animal, pero sometido a un periodo de tratamiento más prolongado, el efecto que tendría sobre las corrientes de calcio y los transitorios intracelulares de calcio. Los principales resultados que encontramos fueron que a) con respecto a la condición control no hay cambios en la densidad de corriente de calcio registrada en los miocitos provenientes del papilar izquierdo ni en los de los

papilares derechos y b) en los miocitos provenientes de ambos papilares, aumento la cantidad total de calcio citosólica durante la contracción del miocito.

En el caso de los transitorios globales de calcio en los miocitos del papilar derecho los resultados fueron muy parecidos a los obtenidos a los dos meses, pero las diferencias con respecto al control resultaron más exacerbadas, de hecho, la concentración sistólica de calcio aumento a mas de doble que en los miocitos del grupo control, de igual modo la velocidad de liberación de calcio del retículo sarcoplasmático paso de 5 a 17 nmol/l·ms y la Tau de decaimiento se acorto en un 42%. La cantidad total de calcio citosólico durante la contracción se duplicó pasando de 14597 a 34035 nM·ms , es decir aumentó 2.33 veces con respecto a los miocitos del grupo control. Por lo que respecta a los miocitos de los papilares izquierdos, en los miocitos del grupo tratado, la concentración sistólica de calcio aumento al doble que en los controles, incrementando también la cantidad total de calcio libre durante la contracción pero sin haber un cambio significativo en la velocidad de liberación del calcio de retículos sarcoplasmático. Un análisis más detallado de estos resultados pone en evidencia que las diferencias en los transitorios de calcio entre papilar izquierdo y derecho (Kondo et al., 2006) prácticamente desaparecen en los papilares de las ratas a la cuales se les indujo el síndrome metabólico (Tabla 8 y 9). Desafortunadamente, no sabemos que sucede con la fuerza de contracción de los músculos papilares de la ratas después de seis meses de inducción del síndrome metabólico; podríamos hipotetizar que habrá un aumento en la fuerza de contracción de ambos ventrículos pero como mencionamos anteriormente, el acople excitación contracción puede ser regulado en diferentes puntos del proceso y no basta conocer que sucede con uno solo de los puntos de regulación, mucho menos si es uno de los iniciales, para suponer que sucederá con la función muscular.

Finalmente, con los resultados obtenidos en el presente trabajo se demuestra que el modelo de síndrome metabólico es un modelo prometedor para seguir profundizando el estudio acerca de las alteraciones cardiacas generadas por el síndrome metabólico, ya que los resultados mostrados dan pauta a seguir buscando la base fisiológica del desacople en el proceso de excitación-contracción a niveles mas profundos como alteraciones en las proteínas contráctiles o en la microarquitectura celular.

CONCLUSIONES

Modelo animal de síndrome metabólico sometido a dos meses de tratamiento

- En el papilar derecho no encontramos cambios significativos en la corriente de calcio tipo L ni en las propiedades biofísicas del canal.
- En los miocitos del papilar izquierdo, aumenta en un 66% la densidad de corriente de calcio. Este cambio no es debido a alteraciones en las propiedades de activación o inactivación del canal.
- El análisis de los transitorios globales de calcio evidenció que solo en los miocitos del papilar derecho un aumento en la concentración sistólica de calcio y una disminución en el tiempo de recaptura de este ion.

Modelo animal de síndrome metabólico sometido a seis meses de tratamiento

- Tanto en los miocitos del papilar derecho como en los del papilar izquierdo, no encontramos cambios significativos en la corriente de calcio ni en las propiedades biofísicas del canal.
- En los miocitos del papilar derecho e izquierdo, la concentración sistólica de calcio aumentó más del 100% durante la contracción. En paralelo, el tiempo de recaptura de este ion, disminuyó significativamente entre un 25 y 40% en las dos poblaciones celulares con respecto al grupo control.

REFERENCIAS

A

Abbott GW, Butler MH, Bendahhou S, Dalakas MC, Ptacek LJ, and Goldstein SA. MiRP2 forms potassium channels in skeletal muscle with Kv3.4 and is associated with periodic paralysis. *Cell* 104: 217–231, 2001.

Abbott GW. Molecular mechanisms of cardiac voltage-gated potassium channelopathies, 2006

Abernethy DR and Soldatov NM. Structure functional diversity of human L-type Ca² channel: perspectives for new pharmacological targets. *J Pharmacol Exp Ther* 300: 724–728, 2002.

AF Ceylan-Isik, MR Kandadi, X Xu. Apelin administration ameliorates high fat diet-induced cardiac hyoertrophy and contractile dysfunction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiolology* 63 (2013) 4-13

AF Nascimento, RAM Luvizotto, AS Leopoldo. Long-term high-fat diet-induced obesity decreases the cardiac leptin receptor without apparent lipotoxicity. *Life Sciences* 88(2011) 1031-1038

Ai T, Fujiwara Y, Tsuji K, Otani H, Nakano S, Kubo Y, and Horie M. Novel KCNJ2 mutation in familial periodic paralysis with ventricular dysrhythmia. *Circulation* 105: 2592–2594, 2002.

Aimond F, Kwak SP, Rhodes KJ, and Nerbonne JM. The accessory Kv1 subunit differentially modulates the functional expression of voltage-gated K channels in adult rat ventricular myocytes. *Circ Res* 96: 451–458, 2005.

Akar FG and Rosenbaum DS. Transmural electrophysiological heterogeneities underlying arrhythmogenesis in heart failure. *Circ Res* 93: 638–645, 2003.

Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC Jr, 2009. International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; International Association for the Study of Obesity: Harmonizing the Metabolic Syndrome. A Joint Interim

Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 120, 1640–1645.

Alseikhan BA, DeMaria CD, Colecraft HM, and Yue DT. Engineered calmodulins reveal the unexpected eminence of Ca²⁺ channel inactivation in controlling heart excitation. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 17185–17190, 2002.

Antuna-Puente B, Feve B, Fellahi S, Bastard JP. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab.* 2008;34(1):2-11.

Antzelevitch C and Dumaine R. Electrical heterogeneity in the heart: physiological, pharmacological and clinical implications. In: *Handbook of Physiology. The Cardiovascular System. The Heart*. Bethesda, MD: Am. Physiol. Soc., 2002, sect. 2, vol. I, p. 654–692.

Aravamudan B, Volonte D, Ramani R, Gursoy E, Lisanti MP, London B, and Galbiati F. Transgenic overexpression of caveolin-3 in the heart induces a cardiomyopathic phenotype. *Hum Mol Genet* 12: 2777–2788, 2003.

Aronne LJ, Nelinson DS, Lillo JL. Obesity as a disease state: a new paradigm for diagnosis and treatment. *Clin Cornerstone*. 2009;9(4):9-25; discussion 26-29.

Augustus O. Grant., *Cardiac Ion Channels*. *Cir Arrhythm Electrophysiol*. 2009.

B

Bailly P, Benitah JP, Mouchoniere M, Vassort G, and Lorente P. Regional alteration of the transient outward current in human left ventricular septum during compensated hypertrophy. *Circulation* 96: 1266–1274, 1997.

Barth E, Stammeler G, Speiser B, Schaper J. Ultrastructural quantitation of mitochondria and myofilaments in cardiac muscle from 10 different animal species including man. *J Mol Cell Cardiol* 1992;24:669–81.

Bassani RA, Altamirano J, Puglisi JL, Bers DM. Action potential duration determines sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ reloading in mammalian ventricular myocytes. 2004.

Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, Plovanich M, Belcher-Timme CA, Sancak Y, et al. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 2011;476:341–5.

Bays H, Mandarino L, DeFronzo RA. Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(2):463-478.

Bays HE. “Sick fat,” metabolic disease, and atherosclerosis. *Am J Med.* 2009;122:S26-S37.

Beeler GW and Reuter H. The relation between membrane potential, membrane currents and activation of contraction in ventricular muscle fibers. *J Physiol* 207: 211–229, 1970.

Bean BP. Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology. *J Gen Physiol* 86: 1–30, 1985.

Bénitah JP, Gómez AM, Fauconnier J, Kerfant BG, Perrier E, Vassort G, and Richard S. Voltage-gated Ca²⁺ channels in the human pathophysiological heart: a review. *Basic Res Cardiol* 97 Suppl 1: 1/11–1/18, 2002.

Bers, D. M. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species dependent differences in cellular mechanisms. *J. Physiol.* 476, 279–293 (1994).

Bers DM and Perez-Reyes E. Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release. *Cardiovasc Res* 42: 339–360, 1999.

Bers DM. *Excitation-Contraction Coupling and Contractile Force*(2nd ed.). The Netherlands: Kluwer, 2001.

Biofísica. Ramón Latorre.

Blaustein MP, Lederer WJ. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev* 1999;79:763–854.

Brittsan, A. G. & Kranias, E. G. Phospholamban and cardiac contractile function. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 32, 2131–2139 (2000).

C

C De Moraes, EA Camargo, E Antunes Reactivity of mesenteric and aortic rings from trained rats fed with high caloric diet.. *Comp Biochem Physiol A Mol Intergr Physiol*. 2007;147(3):788-92

Calcium Cycling and Signaling in Cardiac Myocytes. Donald M. Bers. 2008.

Carbone E and Lux HD. Kinetics and selectivity of a low-voltage-activated calcium current in chick and rat sensory neurones. *J Physiol* 386: 547–570, 1987.

Catterall IWA. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000;16:521–555.

Chen X, Wilson RM, Kubo H, Berretta RM, Harris DM, et al. 2007. Adolescent feline heart contains a population of small, proliferative ventricular myocytes with immature physiological properties. *Circ. Res.* 100:536–44.

Circulation. 2002 Dec 17;106(25):3143-421.

D

D Estadella, LM Oyama, AR Damaso. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition* 2004;20(2):218-24

Dai S, Hall DD, Hell JW. Supramolecular assemblies and localized regulation of voltage-gated ion channels. *Physiol Rev* 2009;89:411–452.

Dale Dubín., 2000.

Dan P, Lin E, Huang J, Biln P, Tibbits GF. Three-dimensional distribution of cardiac Na^{+} – Ca^{2+} exchanger and ryanodine receptor during development. *Biophys J* 2007;93:2504–18.

Dedkova EN, Blatter LA. Mitochondrial Ca^{2+} and the heart. *Cell Calcium* 2008;44:77–91.

Dedkova EN, Blatter LA. Measuring mitochondrial function in intact cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2012;52:48–61.

De Stefani D, Raffaello A, Teardo E, Szabo I, Rizzuto R. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 2011;476: 336–40.

Donald M Bers. Cardiac excitation-contraction coupling. 2002

Donald M. Bers. Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes, 2008.

Donath MY, Shoelson SE, 2011. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* 11, 98-107.

E

EK Nederali, MJ Brown, LC Pickavance. Dietary obesity in the rat induces endothelial dysfunction without causing insulin resistance: a possible role for triacylglycerols *Clin Sci (Lond)* 2001;101(5):449-506

ENSANUT 2012.

Ezzati M, Lopez AD, Rodgers A, Vander Hoorn S, Murray CJ, 2002. Comparative risk assessment collaborating group: selected major risk factors and global and regional burden of disease. *Lancet* 360, 1347–1360.

F

Fabiato A and Fabiato F. Calcium and cardiac excitation-secretion coupling. *Annu Rev Physiol* 41: 473–484, 1979.

Fang K, Colecraft HM. Mechanism of auxiliary beta-subunit-mediated membrane targeting of L-type (Ca_v1.2) channels. *J Physiol* 2011;589:4437–4455.

Fisiología, células, órganos y sistemas, Julio Muñoz y Xaviera García 1998.

Lipkind GM, Fozzard HA. Molecular modeling of interactions of dihydropyridines and phenylalkylamines with the inner pore of the L-type Ca²⁺ channel, 2003.

Fozzard HA. Cardiac sodium and calcium channels: a history of excitatory currents. *Cardiovasc Res* 55: 1–8, 2002.

Franzini-Armstrong, C., Protasi, F. & Ramesh, V. Shape, size, and distribution of Ca^{2+} release units and couplons in skeletal and cardiac muscles. *Biophys. J.* 77, 1528–1539 (1999).

Fruen, B. R., Bardy, J. M., Byrem, T. M., Strasburg, G. M. & Louis, C. F. Differential Ca^{2+} sensitivity of skeletal and cardiac muscle ryanodine receptors in the presence of calmodulin. *Am. J. Physiol.* 279, C724–C733 (2000).

Fukuda, N., Sasaki, D., Ishiwata, S. & Kurihara, S. Length dependence of tension generation in rat skinned cardiac muscle. *Circ. Res.* 104, 1639–1645 (2001).

G

Ganong Fisiología Médica 2010.

Gunter TE, Yule DI, Gunter KK, Eliseev RA, Salter JD. Calcium and mitochondria, 2004.

Grundey SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC Jr, Spertus JA, Costa F, 2005. Diagnosis and management of the metabolic syndrome. An American heart association/national heart, lung, and blood institute scientific statement. *Circulation* 112, 2735-2752.

H

Hagiwara N, Ozawa S, and Sano O. Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. *J Gen Physiol* 65: 617–644, 1975.

Hille B. *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sunderland: Sinauer Associates Inc; 1984:249–271.

Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, et al. Free fatty acids regulate gut incretin glucagonlike peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med.* 2005;11(1):90-94.

Hoppa MB, Collins S, Ramracheya R, et al. Chronic palmitate exposure inhibits insulin secretion by dissociation of Ca^{2+} channels from secretory granules. *Cell Metab.* 2009;10(6):455-465.

Huser J, Blatter LA, Sheu SS. Mitochondrial calcium in heart cells: beat-to-beat oscillations or slow integration of cytosolic transients? *J Bioenerg Biomembr* 2000;32:27–33.

J

JY Chung, MS Kim, SN Han. Diet-induced obesity leads to decreased hepatic iron storage in mice. *Nutrition research* 31(2011) 915-921

K

K. Mitsutomi, T. Masaki, T. Shimasaki. Effects of a nonnutritive sweetener on body adiposity and energy metabolism in mice with diet-induced obesity. *Metabolism Clinical and Experimental* 63(2014) 69-78

Kanno S and Saffitz JE. The role of myocardial gap junctions in electrical conduction and arrhythmogenesis. *Cardiovasc Pathol* 10: 169–177, 2001.

L

Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilento V. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA* 2002; 288:1709-2716.

Latarjet y Liard 2004.

Liao J, Li H, Zeng W, Sauer DB, Belmares R, Jiang Y. Structural insight into the ion-exchange mechanism of the sodium/calcium exchanger. *Science* 2012;335: 686–90.

Lipkind GM, Fozzard HA. Molecular modeling of interactions of dihydropyridines and phenylalkylamines with the inner pore of the L1-type Ca^{2+} channel, 2003.

M

Maltsev VA and Undrovinas AI. Cytoskeleton modulates coupling between availability and activation of cardiac sodium channel. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 273: H1832–H1840, 1997.

Marbán E and O'Rourke B. Calcium channels: structure function and regulation. In: *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside*, edited by D. P. Zipes and J. Jalife. Philadelphia, PA: Saunders, 1995, p. 11–21.

Martínez de Morentín BE, Rodríguez MC, Martínez JA. Síndrome Metabólico, Resistencia a la insulina y metabolismo tisular. *Endocrinol Nutr.* 2003;50:324-33.

Matthew V. Potenza, Jeffrey I. Mechanick, (2009), *The metabolic syndrome: Definition, Global impact, and pathophysiology.*

Marx, S. O. et al. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* 101, 365–376 (2000).

Meyers MB, Fischer A, Sun YJ, Lopes CM, Rohacs T, Nakamura TY, Zhou YY, Lee PC, Altschuld RA, McCune SA, Coetzee WA, Fishman GI. Sorcin regulates excitation-contraction coupling in the heart. 2003.

N

Nerbonne JM. Molecular analysis of voltage-gated K channel diversity and functioning in the mammalian heart. In: *Handbook of Physiology. The Cardiovascular System. The Heart*. Bethesda, MD: Am. Physiol. Soc., 2002, sect. 2, vol. I, p. 568–594.

Nerbonne JM and Kass RS. Physiology and molecular biology of ion channels contributing to ventricular repolarization. In: *Contemporary Cardiology: Cardiac Repolarization: Bridging Basic and Clinical Science*, edited by I. Gussak and C. Antzelevitch. Totowa, NJ: Humana, 2003, chapt. 3, p. 25–62.

Nudler S, Piriz J, Urbano FJ, Rosato-Siri MD, Renteria ES, and Uchitel OD. Ca²⁺ channels and synaptic transmission at the adult, neonatal, and P/Q-type deficient neuromuscular junction. 2003.

O

O-Uchi J, Pan S, Sheu SS. Perspectives on: SGP symposium on mitochondrial physiology and medicine: molecular identities of mitochondrial Ca^{2+} influx mechanism: updated passwords for accessing mitochondrial Ca^{2+} -linked health and disease. *J Gen Physiol* 2012;139:435–43.

Ottolia M, Torres N, Bridge JH, Philipson KD, Goldhaber JL. Na/Ca exchange and contraction of the heart, 2013.

O'Rourke B, Blatter LA. Mitochondrial Ca^{2+} uptake: tortoise or hare? *J Mol Cell Cardiol* 2009;46:767–74.

P

Peterson, B. Z., DeMaria, C. D. & Yue, D. T. Calmodulin is the Ca^{2+} sensor for Ca^{2+} -dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron* 22, 549–558 (1999).

Pogwizd, S. M., Schlotthauer, K., Li, L., Yuan, W. & Bers, D.M. Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: roles of sodium–calcium exchange, inward rectifier potassium current and residual β -adrenergic responsiveness. *Circ. Res.* 88, 1159–1167 (2001).

Puglisi JL, Goldspink PH, Gomes AV, Utter MS, Bers DM, Solaro RJ. Influence of a constitutive increase in myofilament Ca^{2+} -sensitivity on Ca^{2+} -fluxes and contraction of mouse heart ventricular myocytes.

Popkin BM, Gordon Larsen P. The nutrition transition: worldwide obesity dynamics and their determinants. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2004 Nov;28 Suppl 3:S2-9.

R

RL Guerra, WL Prado, NC Cheik. Effects of 2 or 5 consecutive exercise days on adipocyte área and lipid parameters in Wistar rats *Lipids Health Dis.*2007;2:6-16

R Singh, AP Singh, M Singh . Impact of obesity on hypertension-induced cardiac remodeling stress and its modulation by gemfibrozil treatment in rats. *Free Radical Biology and Medicine* 50 (2011) 363-370

R Guo, Y Zhang, S Turdi Adiponectine knockout accentuates high fat diet-induced obesity and cardiac dysfunction: Role of autophagy. *Biochímica et Biophysica Acta* 1832(2013) 1136-1148

Rabinowitz D, Zierler KL. Forearm metabolism in obesity and its response to intra-arterial insulin. Evidence for adaptive hyperinsulinism. *Lancet* Reaven GM, 2005. The metabolic syndrome: requiescat in pace. *Clin Chem* 51, 931-938.

Ren X, Philipson KD. The topology of the cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger, NCX1. *J Mol Cell Cardiol* 2013;57:68–71. (Matsuoka S et al., 1992; Ottolia M et al., 2009).

Rivolta I, Clancy CE, Tateyama M, Liu H, Priori SG, and Kass RS. A novel SCN5A mutation associated with long QT-3: altered inactivation kinetics and channel dysfunction. *Physiol Gen* 10: 191–197, 2002.

Richard P. Kondo, Dorothy A. Dederko, Christine Teutsch, Jacqueline Chrast, Daniele Catalucci, Kenneth R. Chien and Wayne R. Giles³. Comparison of contraction and calcium handling between right and left ventricular myocytes from adult mouse heart: a role for repolarization waveform. 2005.

Rondinone CM. Adipocyte-derived hormones, cytokines, and mediators. *Endocrine*. 2006;29(1):81-90.

Rohr S. Role of gap junctions in the propagation of the cardiac action potential. *Cradiovas Res.* 2004.

S

Scott M. Grundy, MD, PhD; H. Bryan Brewer, Jr, MD; James I. Cleeman, MD; Sidney C. Smith, Jr, MD; Claude Lenfant, MD; for the Conference Participants*. Definition of Metabolic Syndrome Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition, 2004

Scriven, D. R. L., Dan, P. & Moore, E. D. W. Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Biophys. J.* 79, 2682–2691 (2000).

Shannon, T. R., Ginsburg, K. S. & Bers, D. M. Potentiation of fractional SR Ca release by total and free intra-SR Ca concentration. *Biophys. J.* 78, 334–343 (2000)

Sheets MF, Fozzard HA, Lipkind GM, Hanck DA. Sodium channel molecular conformations and antiarrhythmic drug affinity, 2010

Solaro, R. J. & Rarick, H. M. Troponin and tropomyosin—proteins that switch on and tune in the activity of cardiac myofilaments. *Circ. Res.* 83, 471–480 (1998).

Spach MS, Heidlage JF, Barr RC, Dolber PC. Cell size and communication: role in structural and electrical development and remodeling of the heart, 2004.

W

Wang DW, Yazawa K, George ALJ, and Bennett PB. Characterization of human cardiac Na channel mutations in the congenital long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 13200–13205, 1996.

Y

YS Diniz, RM Burneiko, FR Seiva. Diet compounds, glycemic index and obesity-related cardiac effects. *International Journal of Cardiology* 124(2008) 92-99

Z

Zhang, L., Kelley, J., Schmeisser, G., Kobayashi, Y. M. & Jones, L. R. Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* 272, 23389–23397 (1997).

Zühlke, R. D., Pitt, G. S., Deisseroth, K., Tsien, R. W. & Reuter, H. Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature* 399, 159–162 (1999).