



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Instituto de Fisiología

Laboratorio de Cardiología Molecular



“Cambios funcionales de la entrada de calcio operada por almacenes (SOCE) y en la expresión del complejo STIM1/Orai1 en tejido cardíaco de un biomodelo de obesidad e hiperglicemia”

**Tesis para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Fisiológicas**

Presenta

LFT. Daniela Sarahi Yang Bennett

Director de tesis

D. en C. José Everardo Avelino Cruz

Abril, 2024

Índice

Resumen	3
Abreviaturas	5
Introducción	6
Corazón	6
Obesidad	7
Diabetes	7
Antecedentes directos	8
Células cardíacas.....	8
Cardiomiocitos.....	8
Fibroblastos	8
Regulación de los niveles de Ca^{2+} en el acople excitación-contracción en los cardiomiocitos	11
Regulación de los niveles de Ca^{2+} en fibroblastos cardíacos	12
Regulación de Ca^{2+} en patologías cardíacas	13
Hipertrofia cardíaca	14
Insuficiencia cardíaca	14
Fibrosis cardíaca	15
SOCE: Entrada de Calcio Operada por Almacenes.....	15
Orai	16
STIM	18
Mecanismo de acción de SOCE	20
SOCE en cardiomiocitos	22
SOCE en fibroblastos	23
Diabetes y obesidad: repercusiones en el corazón.....	24
Justificación	26
Hipótesis	26
Objetivos	27
Objetivo General	27
Objetivos Específicos.....	27
Material y métodos	28
Diagrama de trabajo.....	28
Modelo experimental.....	29

Cultivo primario de fibroblastos cardíacos (FiCs).....	29
Tripsinización y sembrado de FiCs.....	30
Fluorometría de Ca ²⁺ intracelular.....	30
Capacidad de almacenamiento del RE y SOCE.....	31
Bloqueo de la SOCE con BTP2.....	32
Western Blot.....	32
Inmunohistoquímica enzimática.....	33
Inmunocitoquímica - Faloidina.....	34
Análisis estadístico.....	34
Resultados	35
Medición de Ca ²⁺ intracelular.....	35
Cuantificación de la expresión de STIM1 y Orai1 en tejido ventricular cardíaco.....	44
Inmunodetección de STIM1 y Orai1 en tejido ventricular cardíaco.....	46
Estado de activación de los fibroblastos cardíacos.....	56
Discusión	61
Conclusiones	68
Anexos	69
Gráficos de modelo experimental.....	69
Soluciones.....	71
Bibliografía	72

Resumen

Los fibroblastos son el tipo celular más abundante en el corazón y cumplen con la tarea de mantener la estructura y función de este órgano a través de la síntesis de matriz extracelular. Estas células, bajo condiciones de estrés, se activan y diferencian a miofibroblastos, los cuales, a diferencia de su estado quiescente, presentan fibras de actina y aumentan la producción de matriz extracelular, siendo esta una de las principales vías generadoras de fibrosis cardíaca.

El calcio es un importante segundo mensajero en el corazón, el cual regula diversos procesos incluidos la contracción muscular, regulación génica, respuesta inmune, proliferación, hipertrofia patológica, entre otras. Existen distintas vías por las cuales este ion puede ingresar a las células, siendo SOCE (entrada de calcio operada por almacenes intracelulares) la principal vía en células no excitables, como son los fibroblastos.

La obesidad es un factor de riesgo para desarrollar enfermedades cardiovasculares y resistencia a la insulina, provocando hiperglucemia y eventualmente diabetes tipo 2. En este trabajo estudiamos la principal vía de ingreso de calcio en los fibroblastos cardíacos y sus posibles alteraciones en un biomodelo de obesidad y diabetes.

Usamos a la rata Zucker Diabetic Fatty (ZDF) y formamos tres grupos: delgadas normoglicémicas (LZDF), obesas normoglicémicas (NG OZDF) y obesas hiperglicémicas (HG OZDF). En cada grupo medimos la capacidad de almacenamiento de calcio del retículo endoplásmico, así como la entrada de calcio operada por almacenes en fibroblastos cardíacos, También evaluamos el grado de activación de los fibroblastos mediante la cuantificación de fibras de actina y analizamos la expresión e inmunolocalización de las proteínas que hacen posible la SOCE, STIM1 y Orai1, en el tejido ventricular cardíaco de ratas ZDF.

De acuerdo con nuestros resultados, los fibroblastos cardíacos provenientes de los grupos obesos, en comparación con el grupo delgado, presentan un incremento en la entrada de calcio operada por almacenes intracelulares. Este incremento se correlaciona positivamente con un aumento significativo en la expresión de Orai1, en particular en el endocardio del ventrículo

izquierdo y una tendencia al aumento en la expresión de STIM1. Los resultados de medición de calcio fueron obtenidos en cultivo primario de fibroblastos activados.

Estos datos nos permiten suponer que la obesidad, al ser un estado inflamatorio crónico de bajo grado, induce un aumento en la expresión el complejo STIM1/Orai1 en fibroblastos cardíacos, aumentando la entrada de calcio y sus características profibróticas. Esto concuerda con lo observado en patologías como la obesidad y la cardiomiopatía diabética.

Abreviaturas

Ang II: angiotensina II

α -SMA: alfa actina de músculo liso

[Ca²⁺]_i: concentración intracelular de calcio

CaMKII: calcio calmodulina cinasa II

Ca_v 1.2: canales de calcio operados por voltaje tipo 1.2

CPA: ácido ciclopiazónico

CRAC: del inglés, calcium-release activated channels

FiCs: fibroblastos cardiacos

HG OZDF: rata ZDF obesa hiperglicémica

I_{CRAC}: corriente CRAC

IL-6: interleucina 6

IL1- β : interleucina 1 beta

LTCCs: canales de calcio tipo L

MAPK: proteína cinasa de mitogen-activado

MEC: matriz extracelular

NCX: intercambiador sodio/calcio

NFAT: factor nuclear de células T activadas

NF κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NG OZDF: rata ZDF obesa normoglicémica

RE: retículo endoplásmico

ROCE: entrada de calcio operada por receptores

RyRs: receptores de rianodina

SEN: solución extracelular normal

SERCA: ATPasa del retículo sarco/endoplásmico

SOCE: entrada de calcio operada por almacenes

SOCs: canales operados por almacenes

STIM: del inglés, stromal interaction molecule

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

TRP: canales de potencial de receptor transitorio

ZDF: zucker diabetic fatty

Introducción

Corazón

El corazón es un órgano muscular especializado que se contrae de manera rítmica y el cual bombea sangre a través de cuatro cavidades: (1) aurícula derecha, la cual recibe sangre de la circulación sistémica a través de la vena cava superior e inferior. La sangre fluye por medio de la válvula tricúspide hacia el (2) ventrículo derecho, y este se comunica con los pulmones mediante la válvula semilunar y la arteria pulmonar. La sangre regresa de los pulmones a (3) la aurícula izquierda por las venas pulmonares, y a través de la válvula mitral fluye hacia el (4) ventrículo izquierdo, donde su gruesa pared muscular permite generar altas presiones durante la contracción, por lo que eyecta la sangre hacia la circulación sistémica a través de la aorta. La principal función del corazón es generar la energía suficiente sobre la sangre, para mantener una presión arterial lo suficientemente adecuada para perfundir a los órganos del cuerpo. (Klabunde, 2005)

El tejido cardíaco se compone por tres tipos de músculo: (1) auricular, (2) ventricular y (3) fibras musculares especializadas de excitación y conducción. El músculo cardíaco es estriado y está compuesto de filamentos de actina y miosina, mismos que se deslizan entre sí durante el proceso de contracción. Las células cardíacas están separadas por regiones especializadas de la membrana celular llamadas discos intercalares; éstos forman uniones comunicantes permeables entre las membranas celulares y, además, conectan a las fibras musculares entre sí en serie y en paralelo. Estas características le confieren el trabajar como un sincitio, permitiendo que las células formen interconexiones y cuando una de ellas se excite, propague el potencial de acción a todas. (Guyton & Hall, 2011)

El corazón es conformado por células responsables de la contracción y relajación de este, llamadas cardiomiocitos, los cuales ocupan el 30% de las células totales de este órgano; mientras que el 70% restante, está constituido por células del epicardio; células endoteliales, células del sistema inmune, fibroblastos, células de músculo liso, entre otros. (Han & Zhou, 2022) En corazones de mamíferos adultos, los cardiomiocitos son rodeados por una red de matriz extracelular (MEC), la cual ayuda al mantenimiento de la estructura cardíaca, además de la transmisión de la fuerza contráctil generada por los cardiomiocitos. Esta matriz está compuesta principalmente por colágeno tipo I y II, siendo los fibroblastos las células productoras más importantes de estos componentes. (Frangogiannis, 2021)

Obesidad

La obesidad es un padecimiento crónico caracterizado por una acumulación anormal o excesiva de tejido adiposo, como resultado de un desequilibrio entre la ingesta y el gasto de energía. (Blancas-Flores et al., 2009; OMS, 2021) Generalmente es definida por el índice de masa corporal (IMC), donde se clasifica como sobrepeso de los 25 a los 29.9 kg/m², obesidad clase I de los 30 a los 34.9 kg/m², obesidad clase II de los 35 a los 39.9 kg/m² y obesidad clase III >40 kg/m². (Abel, Litwin & Sweeney, 2008) Aún cuando se pueda clasificar con base al IMC, este desequilibrio va más allá de la relación estatura/peso, y se ha convertido en una epidemia que afecta a niños y adultos, además de un factor de riesgo para desarrollar enfermedades cardiovasculares, resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, hígado graso, algunos tipos de cánceres, enfermedades del sistema inmune, entre otros. Además, las personas con obesidad presentan un estado de inflamación crónica de bajo grado, promovido por los receptores tipo Toll (TLRs), produciendo citocinas proinflamatorias como el TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa), IL-6 (interleucina 6) e IL1- β (interleucina 1 beta); además, las personas con obesidad presentan anormalidades metabólicas, un aumento del estrés oxidativo, disfunción inmune y mitocondrial. (Blancas-Flores et al., 2009; Kawai et al., 2021; OMS, 2021)

Diabetes

La diabetes es una enfermedad crónica degenerativa la cual presenta hiperglucemia en ausencia de tratamiento. Esta es inducida por mecanismos en las células pancreáticas, procesos epigenéticos, resistencia a la insulina, inflamación, procesos autoinmunes y factores ambientales. Existen principalmente dos tipos de diabetes: (a) la diabetes tipo 1, caracterizada por una dependencia en la administración de insulina, al haber una deficiencia en su producción; y (b) la diabetes tipo 2, debida a una mala utilización de la insulina por el organismo; existe una gran correlación entre personas que sufren de sobrepeso, obesidad o aumento en la grasa visceral, con este tipo de diabetes. (Colagiuri, 2021; OMS, 2022)

Antecedentes directos

Células cardíacas

Cardiomiocitos

Los cardiomiocitos son las células responsables de generar la fuerza contráctil en el corazón; se encargan de generar el impulso cardíaco y de conducir ese impulso de aurículas a ventrículos. Existen distintos tipos de cardiomiocitos, con base a su función y localización. Su buen funcionamiento es de importancia para proveer un bombeo efectivo de sangre, siendo esta la principal función del corazón. (Miyamoto et al., 2002; Woodcock & Matkovich, 2005)

Fibroblastos

Los fibroblastos son el tipo celular más abundante en el corazón. (Ross et al., 2017) La gran mayoría de ellos derivan del epicardio a través de la transición epitelio-mesénquima, aunque otra parte de ellos también derivan de células progenitoras endoteliales. (Han & Zhou, 2022) Estos son de suma importancia en el ambiente extracelular ya que son los encargados de sintetizar, degradar, organizar y remodelar la matriz extracelular (MEC), ayudando a mantener la estructura y función en este órgano, así como la comunicación con células vecinas. Además, cumplen un papel importante en los procesos de remodelación cardíaca, la cual es crucial para la prevención de ruptura de tejido y adaptación, después de haber sufrido un daño en su estructura. (Sorrell & Caplan, 2009; Ross et al., 2017; Turner & Blythe, 2019; Kurose, 2021)

Bajo condiciones de estrés, como lo es una lesión cardíaca o un proceso inflamatorio, los fibroblastos se activan y diferencian a miofibroblastos, los cuales aumentan la producción de colágeno y otras proteínas de la MEC con un fin reparativo, reforzando la integridad del tejido cardíaco al reemplazar cardiomiocitos necróticos por una cicatriz de colágeno; sin embargo, si esta producción se mantiene, puede convertirse en una fibrosis patológica y tener repercusiones en la función del corazón. Esta activación conlleva un aumento en la proliferación, producción de MEC, expresión de proteínas contráctiles, como lo es la α -SMA (alfa actina de músculo liso), y secreción de factores de

crecimiento como el TNF- α y el TGF- β , y citocinas proinflamatorias como la IL-1 e IL-6. (Figura 1) (Feng et al., 2019; Tallquist, 2020; Frangogiannis, 2021; Kurose, 2021)

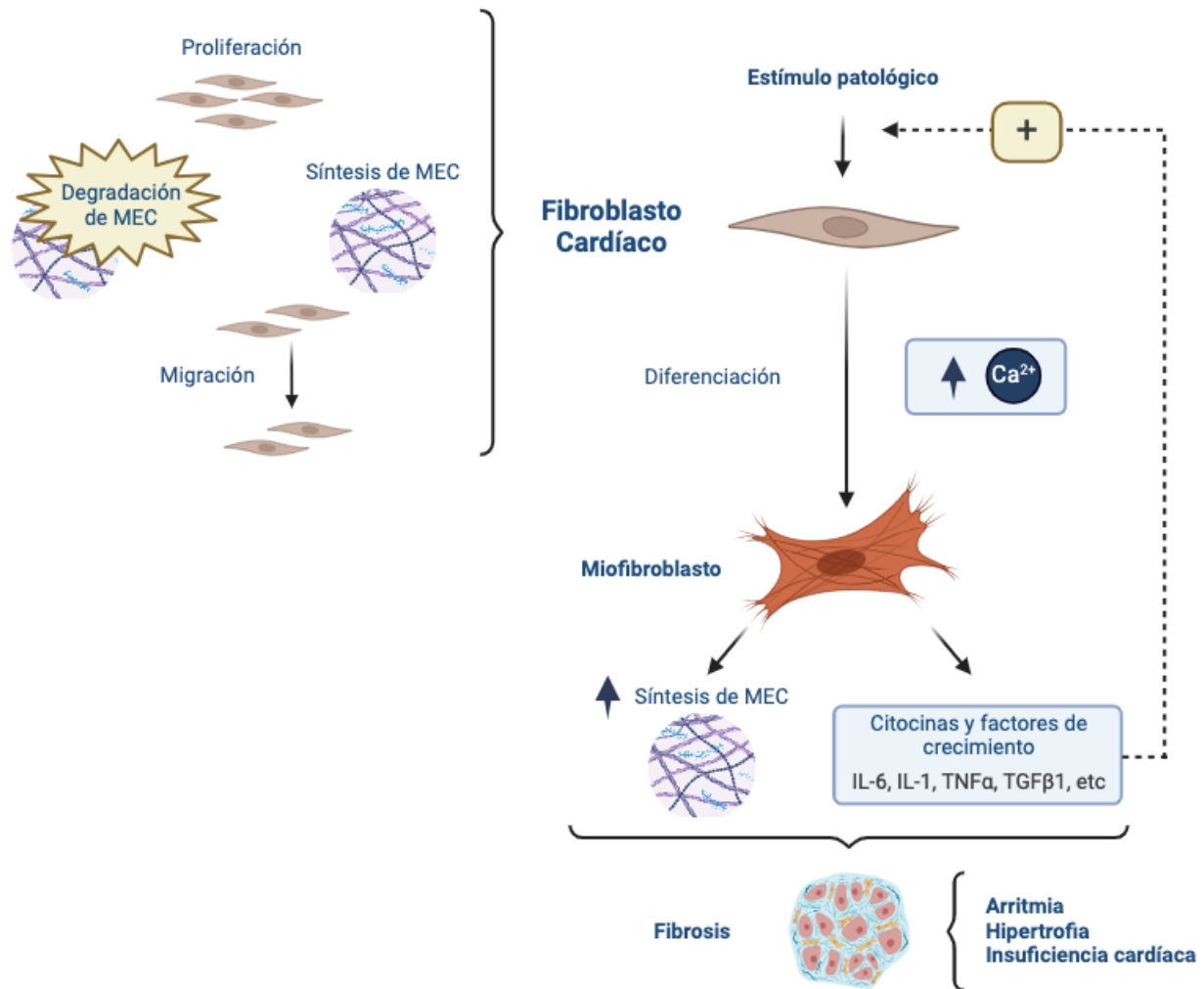


Figura 1. Esquema de función de los fibroblastos cardíacos, asociados a la diferenciación a miofibroblastos y la remodelación cardíaca. (Ca²⁺: calcio; IL-6: interleucina 6; IL-1: interleucina 1; MEC: matriz extracelular; TNF α : factor de necrosis tumoral alfa; TGF β 1: factor de crecimiento transformante beta) Modificado de Porter et al., 2009 y Feng et al., 2019. Creada en BioRender.

Existen distintas vías por las cuales se lleva a cabo la activación de los fibroblastos cardíacos, siendo una de las más relevantes la vía por el TGF- β . De este factor se activan dos cascadas de señalización: (1) la vía canónica TGF- β -Smad2/3 (del inglés, small mothers against decapentaplegic 2/3), la cual induce la diferenciación a miofibroblastos; y (2) la vía no canónica de las MAPK (del inglés, mitogen-activated protein kinase), la cual modula procesos fibróticos. (Kurose, 2021; Han & Zhou, 2022)

Otra vía de relevancia en la remodelación y fibrosis cardíaca es el eje Ang II/AT1 (angiotensina II/receptor de angiotensina tipo 1), ya que juega un papel fundamental en la activación de fibroblastos cardíacos. La Ang II estimula la proliferación y migración de estas células, inhibe la apoptosis y aumenta considerablemente la síntesis de proteínas de la MEC, a través del receptor AT1. (Frangogiannis, 2021)

Además de estas vías, hay distintos factores que pueden promover la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos como el estrés oxidativo, lesiones al miocardio, sobrecarga mecánica, estímulos inflamatorios, entre otros. (Feng et al., 2019)

Existen distintos estados en los que se presentan los fibroblastos cardíacos. Fu y colaboradores (2018), lograron describir cuatro estados, basados en un modelo murino de infarto al miocardio: (1) fibroblastos residentes, quienes mantienen un estado quiescente en tejido cardíaco sano; (2) fibroblastos activados, quienes se elongan y comienzan a expresar α -SMA durante los días 2 a 4 tras el inicio de la lesión; (3) miofibroblastos, los cuales alcanzan un estado de diferenciación máximo entre los días 4 y 7 post-lesión; y (4) matrifibrociitos, quienes pierden la capacidad de proliferación y expresión de α -SMA a partir del día 7 después de la lesión. (**Figura 2**) (Fu et al, 2018)

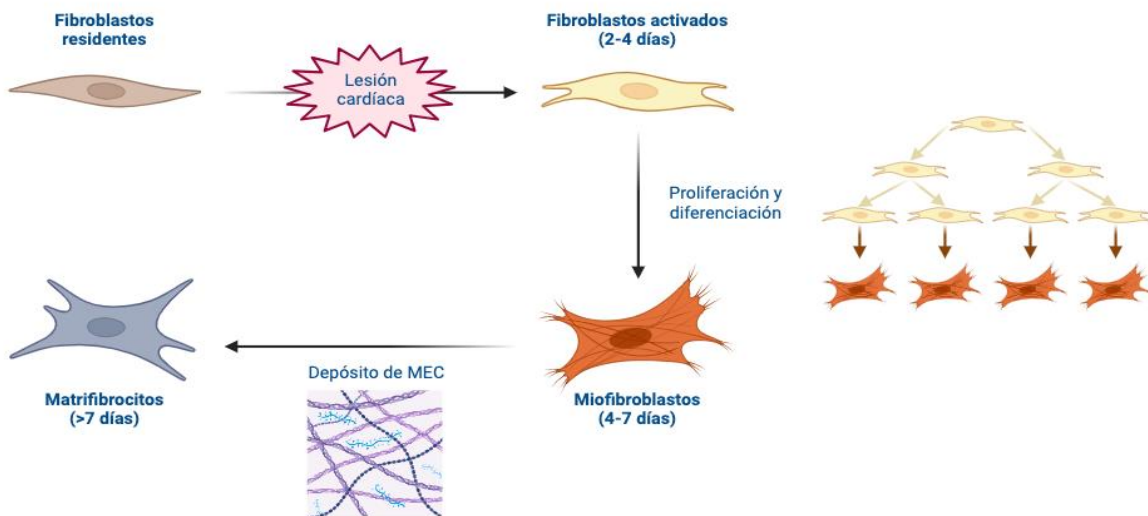


Figura 2. Estados de los fibroblastos cardíacos tras una lesión. (MEC: matriz extracelular) Modificado de Han & Zhou, 2022. Creada en BioRender.

Regulación de los niveles de Ca^{2+} en el acople excitación-contracción en los cardiomiocitos

El nivel de calcio intracelular es el principal regulador de la contracción muscular, el cual, en estado de reposo se mantiene en concentraciones cercanas a 100 nM. (Aronsen et al., 2016; Eisner et al., 2017)

La apertura de los canales de sodio (Na^+) activados por voltaje inicia el potencial de acción y al despolarizar la membrana produce la apertura de los canales de calcio tipo L (LTCCs), haciendo que el calcio ingrese a la célula. En los cardiomiocitos, este proceso se lleva a cabo en el cuplón, estructura conformada por los canales de calcio tipo L y receptores de rianodina (RyRs). Al abrirse los canales de calcio tras un potencial de acción, aumenta la concentración de este ion en el espacio intracelular submembranal activando a los RyRs; su apertura libera calcio desde el retículo sarcoplásmico y este ion difunde hacia el citosol para permitir el acople entre los miofilamentos e iniciando la contracción. Este aumento temporal en masa de calcio es conocido como “transitorio de calcio”. (Bers, 2008; Aronsen et al., 2016) Tras estos sucesos, la ATPasa de calcio del retículo sarco/endoplásmico (SERCA, por sus siglas en inglés), la cual es regulada por la proteína inhibitoria fosfolambano (PLB), recaptura calcio hacia el retículo sarcoplásmico y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) junto con la ATPasa de la membrana plasmática (PMCA) movilizan calcio hacia el exterior de la célula; juntos, disminuyen la concentración intracelular de calcio y dan lugar a la relajación muscular (**Figura 3**). La coordinación en la contracción entre las aurículas y los ventrículos da lugar a la eyección de sangre desde estas cámaras (Bers, 2008; Aronsen et al., 2016; Eisner et al., 2017; Falcón et al., 2019)

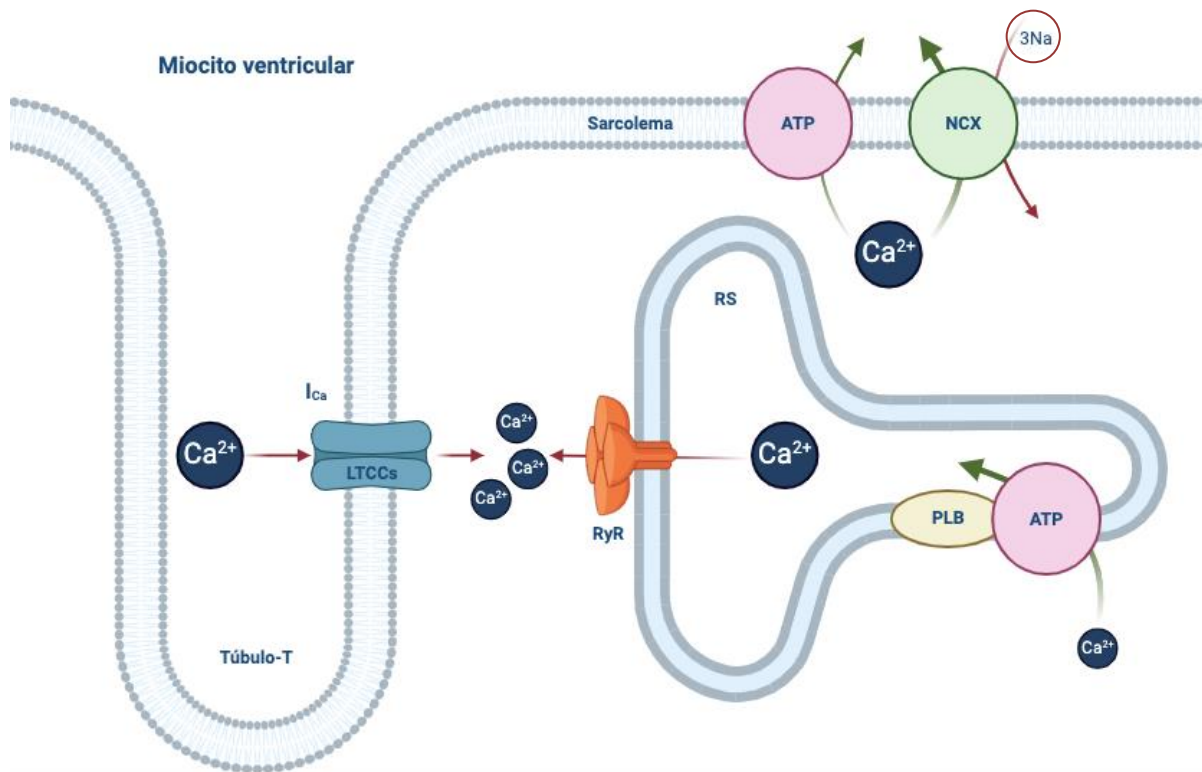


Figura 3. Estructuras que hacen posible el acople excitación-contracción en los cardiomiocitos. (Ca^{2+} : calcio; Na: sodio; LTCCs: canales de calcio tipo L; RyR: Receptor de rianodina tipo 2; RS: retículo sarcoplasmático; PLB: fosfolambano; ATP: bomba dependiente de adenosin trifosfato; NCX: intercambiador sodio calcio; I_{Ca} : corriente de calcio). Modificado de Bers, 2008. Creada en BioRender.

Regulación de los niveles de Ca^{2+} en fibroblastos cardíacos

La regulación de calcio en cardiomiocitos, es mejor descrita y comprendida que en los fibroblastos cardíacos. Existen distintos tipos de canales de calcio expresados en la membrana plasmática de los fibroblastos cardíacos, entre los que se incluyen a los canales de calcio operados por voltaje, los canales de calcio operados por almacenes (SOCs, del inglés store operated calcium channels) y los canales de potencial de receptor transitorio (TRP). Aún con esta variedad de canales expresados en la membrana plasmática, hay tres mecanismos principales de entrada de calcio desde el medio extracelular en estas células: (1) la entrada de calcio operada por almacenes (SOCE), mediada por los canales SOC, o también conocidos como canales CRAC (calcium

release activated channel); (2) la entrada de calcio operada por receptores (ROCE), mediada principalmente por los canales TRP; (Liao et al., 2009; Chen et al., 2010; Feng et al., 2019) y (3) la entrada de calcio mediada por los receptores P2X. (Roach & Branding, 2019)

La liberación de calcio desde los almacenes intracelulares en los fibroblastos cardíacos, es dada fundamentalmente a través de la activación de los receptores de IP_3 ubicados en el retículo endoplásmico (RE). (Liao et al., 2009; Chen et al., 2010; Feng et al., 2019; Roach & Branding, 2019)

La concentración de calcio intracelular en estado quiescente en fibroblastos, al igual que en los cardiomiocitos, es de alrededor de 100 nM, mientras que en el espacio extracelular y en los reservorios de calcio como el RE y la mitocondria, los niveles son mayores, en un rango de entre 1 a 2 mM. El mantenimiento de estas concentraciones es regulado por la salida y recaptura de calcio dependiente de ATP, y pequeños cambios en la concentración de este ion, son capaces de desencadenar respuestas celulares rápidas. (Roach & Branding, 2019; Tiffner & Derler, 2021)

Al igual que en los cardiomiocitos, la PMCA, el NCX y la SERCA, regulan la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$) en los fibroblastos. Aunque a diferencia de estos, los RyRs no figuran en la liberación de calcio intracelular en condiciones fisiológicas, ni patológicas. (Chen et al., 2010; Feng et al., 2019)

Regulación de Ca^{2+} en patologías cardíacas

La señalización de calcio en el corazón, así como en todas las células, es crítica para numerosas funciones celulares. Este ion es un segundo mensajero de gran importancia que regula funciones como la contracción muscular, procesos de señalización, regulación génica, respuesta inmune, proliferación, exocitosis, crecimiento celular, hipertrofia patológica, apoptosis, entre otros. (Soboloff et al., 2012; Saurav et al., 2021) Tanto la localización, como la magnitud y el tiempo en que se dan las señales de calcio, son críticas para obtener la respuesta o función celular requerida. (Aronsen et al; 2016)

La desregulación del calcio en el corazón es un proceso que influye en la patogénesis de las enfermedades cardíacas. Al ser este ión, el principal regulador del acople excitación-contracción, la alteración de su homeostasis se correlaciona con disfunción mecánica y con arritmias asociadas a hipertrofia e insuficiencia cardíaca. (Luo et al., 2012) De hecho, son necesarias señales sostenidas de calcio para inducir el crecimiento cardíaco tanto de manera fisiológica, como patológica. (Voelkers et al., 2010; Aronsen et al., 2016)

Hipertrofia cardíaca

La hipertrofia cardíaca es originada por estímulos mecánicos o neuro-humorales, activando vías de señalización de crecimiento celular, siendo las más relevantes la vía de la calcineurina-NFAT (factor nuclear de células T) y la CaMKII-HDAC (calcio calmodulina cinasa II- histona deacetilasa clase II). La primera inicia su activación en el momento en que el calcio se une a la calcineurina y esta permite la desfosforilación del NFAT el cual se transloca al núcleo, dando inicio a la transcripción de genes pro-hipertróficos; las fuentes desencadenantes que se han propuesto incluyen al aumento en la concentración de calcio intracelular por los LTCCs y RyRs, así como los TRPCs. La segunda vía, la cual es desencadenada por calcio liberado por receptores IP₃ tipo 2, también favorece señales hipertróficas tras la activación de la CaMKII, la cual estimula a la HDAC y esta a su vez permite la transcripción del ADN, de genes profibróticos al desinhibir al factor de transcripción MEF2 (del inglés, myocyte enhancer factor-2). (Voelkers et al., 2010; Aronsen et al., 2016)

Insuficiencia cardíaca

La insuficiencia cardíaca se manifiesta con un acoplamiento excitación-contracción disfuncional, en donde se encuentra un enlentecimiento y reducción de la generación máxima de fuerza. (Aronsen et al., 2016) Se han identificado cambios en la amplitud de los transitorios de calcio de cardiomiocitos afectados por insuficiencia cardíaca. Estos cambios se producen a la par de una disminución en las reservas de calcio en el retículo sarcoplásmico, teniendo como consecuencia fallas en la activación del complejo contráctil y, por lo tanto, reduciendo la fuerza de contracción. Al generalizarse este proceso, se presentan signos como la disminución de la función sistólica del ventrículo izquierdo o patologías como las arritmias. (Rosenberg et al., 2021). También se puede deber a una disrupción en las diadas provocada por una

desorganización o pérdida de los túbulos T, resultando en formación de RyRs sin LTCCs para parearse, disminuyendo la liberación de calcio inducida por calcio, así como su sincronización, obteniendo transitorios de calcio y contracciones más lentas. Además, en esta patología existen fallas en el proceso de relajación, las cuales se atribuyen a una disminución en la salida de calcio en el cardiomiocito por un mal funcionamiento de la SERCA y el NCX, así como al endurecimiento por acumulación de colágeno del tejido miocárdico (Aronsen et al., 2016)

Fibrosis cardíaca

La fibrosis se caracteriza por una acumulación excesiva de proteínas de la MEC, las cuales son sintetizadas por fibroblastos y miofibroblastos; generalmente refleja una activación desenfrenada de un proceso de reparación (Frangogiannis, 2021). Se involucra en procesos patológicos de remodelación cardíaca, donde fomenta la disminución de la propagación del potencial de acción, contribuyendo a la generación de arritmias; también causa engrosamiento de las paredes ventriculares y por consecuencia, una reducción en la contracción, dando pie a una disfunción generalizada en el corazón. La fibrosis es encontrada en la mayoría de las enfermedades cardíacas, incluidas las arritmias, la insuficiencia e hipertrofia cardíaca, entre otras. (Feng et al., 2019)

SOCE: Entrada de Calcio Operada por Almacenes

Las primeras características de SOCE fueron descritas en un trabajo realizado en glándulas salivales por Putney en 1986, donde concluyó que “la activación de la entrada de calcio era un proceso independiente a los cambios en la concentración de calcio citosólico y este a su vez era controlado por algún tipo de receptor” (Putney, 1986). Años después, se describe la corriente de liberación de calcio activada por calcio (I_{CRAC}), como una corriente no dependiente de voltaje, la cual se activa por la depleción intracelular de los almacenes de calcio y es altamente selectiva a este ion. (Hoth & Penner, 1992; 1993) Actualmente se conoce que SOCE es mediada por dos moléculas: (1) STIM (Stromal Interaction Molecule), proteína cuya función es detectar los niveles de calcio intracelular del retículo sarco/endoplásmico. (2) Orai, proteína formadora de poro altamente selectiva a calcio. (Luo et al., 2020) Existen distintas isoformas y homólogos de estas moléculas, siendo la combinación STIM1-Orai1 la más relevante de ellas. (Hoth & Niemeyer, 2013) Esta dupla es expresada de manera ubicua y desencadena la entrada de calcio

operada por almacenes “clásica” en distintos tipos celulares. (Tiffner & Derler, 2021) Se ha sugerido que la estequiometría entre estas dos proteínas podría ser de 1:1, si uno de los dos monómeros de Región Activadora de STIM-Orai (SOAR) de STIM, se une con Orai (**Figura 4A**); y 2:1, si ambos monómeros de SOAR se unen con los canales Orai (**Figura 4B**). Esta estequiometría depende del tamaño de los grupos que se formen, donde entre más grande sea el grupo, más cercana será la relación 1:1. Cabe destacar que es necesario sólo uno de los monómeros de SOAR para activar el canal Orai. (Zhou et al., 2017) Perni y colaboradores en 2015, evidenciaron la interacción de un canal Orai1 con un pequeño agrupamiento de STIM1 en células no excitables. (Perni et al, 2015)

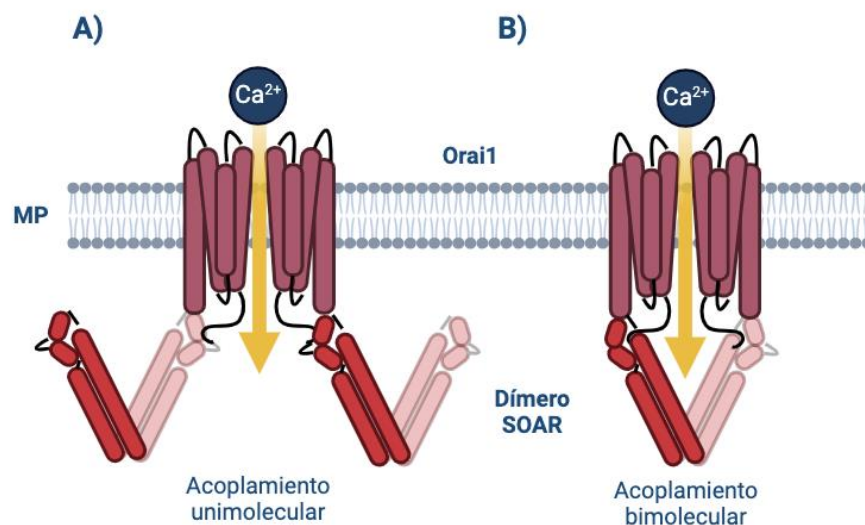


Figura 4. Interacción entre el dímero SOAR de STIM1 con el canal Orai1. A) Modelo de acoplamiento bimolecular de SOAR (en rojo y rosa) con Orai1 (en magenta). B) Modelo de acoplamiento unimolecular de SOAR con Orai1. (MP: membrana plasmática; Ca^{2+} : calcio; SOAR: del inglés STIM-Orai Activating Region). Modificado de Zhou et al., 2017. Creada en BioRender.

Orai

Este canal selectivo al calcio, ubicado en la membrana plasmática, forma un complejo hexamérico, en donde cada hexámero contiene cuatro dominios transmembranales (TM1-4). Los seis dominios TM1 están localizados en el centro y se encargan de la formación del poro; TM2 y TM3 se sitúan alrededor de este y; TM4 contiene la extensión por la cual interactúa con STIM (**Figura 5**). (Zhou et al., 2017; Grabmayr, Romanin & Fahrner, 2021; Tiffner & Derler, 2021)



Figura 5. Estructura hexamérica de los canales Orai1, con sus 4 segmentos transmembrana. Basada en la estructura cristalizada de Orai de *Drosophila*. Modificado de Zhou et al., 2017. Creada en BioRender.

Existen 3 isoformas de esta proteína: Orai1, la más estudiada en conjunto con STIM1 (Vig et al., 2006); Orai2, que a comparación de Orai1 tiene una velocidad mayor de inactivación (Hoth & Niemeyer, 2013); y Orai3, la cual sólo se expresa en mamíferos. (Gammons et al., 2021) Orai1 es indispensable para la entrada sostenida de calcio a la célula, mientras que Orai2 y Orai3 para la generación de oscilaciones de calcio. Las subunidades de Orai tienen la capacidad de formar complejos homo o heteroméricos, para la formación de los canales CRAC. (Tiffner & Derler, 2021)

La distribución de los canales Orai en la membrana plasmática de células excitables es de un canal cada 15 nm aproximadamente. (Soboloff et al., 2012; Bootman & Rietdorf, 2017; Zhou et al., 2017)

Los canales Orai, al modular la actividad de distintos factores de transcripción dependientes de calcio, tienen la capacidad de regular la expresión génica. El NFAT ha sido asociado a los canales Orai, por encima de otras familias de factores de transcripción, y la regulación de los NFATs ha sido relacionada con la patogénesis y progresión de enfermedades como la diabetes, enfermedades inflamatorias, aterosclerosis, cáncer, entre otras. Otro factor de transcripción que requiere la entrada de calcio a través de estos canales, específicamente con Orai1, además del aumento del

calcio intracelular vía IP_3R , es el $NF-\kappa B$, el cual se asocia a la mediación de la respuesta inflamatoria. (Nieto-Felipe et al., 2023)

Modificaciones en el ambiente en los canales Orai, juegan un papel importante en su desempeño funcional. En cuanto al pH, un ambiente alcalino promueve las corrientes de estos canales, mientras que un ambiente ácido los bloquea. Especies reactivas de oxígeno (ROS) como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), bloquean las corrientes STIM1-Orai1. (Tiffner & Derler, 2021)

STIM

Es una proteína transmembrana simple ubicada en el retículo sarco/endoplásmico (RS/E). En su porción C-terminal, localizada en el citosol, se encuentran distintos dominios y regiones como el dominio polibásico rico en lisina (PBD), que le permite interactuar con los fosfolípidos de la membrana plasmática; también se encuentra el dominio de inactivación (ID) y el dominio de unión final de microtúbulos (EB), además de la Región Activadora de STIM-Orai (SOAR) o también conocida como el dominio de activación CRAC (CAD), (Zhou et al., 2017; Grabmayr, Romanin & Fahrner, 2021) el cual es un dímero comprendido por dos pares de cuatro hélices; esta es la unidad funcional más pequeña de STIM: ayuda al mantenimiento estructural de la proteína durante su estado en reposo, y al activarse ayuda en el proceso de unión a Orai en la membrana plasmática. (Zhou et al., 2017) En la porción N-terminal, la cual se sitúa en el lumen del retículo sarco/endoplásmico, se encuentran los dominios EF-hand canónicos (cEF) y no canónicos (nEF) y sterile- α -motif (SAM) de manera agrupada, teniendo como tarea el registro de cambios en la concentración intraluminal de calcio, donde el dominio nEF le proporciona estabilidad, y el cEF se encarga de la unión con el calcio, agrupando de 10 a 12 iones de calcio al mismo tiempo en su estado inactivo (Soboloff et al., 2012; Grabmayr, Romanin & Fahrner, 2021)

Se ha identificado que STIM además de medir la disminución en la concentración de calcio del retículo sarco/endoplásmico, tiene la capacidad de registrar y activarse en respuesta al estrés oxidativo, el cambio de temperatura, la hipoxia y la acidificación. (Soboloff et al., 2012)

STIM puede acoplarse a otras proteínas distintas de Orai, como a la familia de los TRPCs (del inglés Transient Receptor Potential Channels), los cuales, al ser canales catiónicos no selectivos, cuentan con corrientes distintas a las I_{CRAC} . De igual manera STIM1 puede interactuar con los $Ca_v1.2$, atenuando su función a través de la interacción entre la región CAD/SOAR de STIM1 con la C-terminal de los $Ca_v1.2$, lo cual tiene como consecuencia una internalización de los canales, disminuyendo así la actividad de estos. (Park, Shcheglovitov & Dolmetsch, 2010; Soboloff et al., 2012)

Actualmente se conocen los siguientes homólogos de STIM:

- **STIM1:** Es el principal activador de SOCE. (Rosado et al., 2016) Su dominio EF-hand-SAM se une al calcio con una constante de disociación (K^d) de $\sim 200\mu M$. (Soboloff, et al., 2012; Lilliu et al., 2021; Grabmayr, Romanin & Fahrner, 2021) La porción 2 del dominio SOAR contiene un residuo de fenilalanina, el cual actúa como un fuerte agonista de Orai. (Zhou et al., 2017) Esta isoforma contiene variantes por splicing alternativo; hasta ahora se han encontrado 4: (1) STIM1-S, isoforma corta expresada en cardiomiocitos adultos y neonatales (Rosenberg et al., 2019); (2) STIM1-L, isoforma larga que activa rápidamente SOCE en miocitos durante condiciones de estrés (Luo et al., 2012; Rana et al., 2015; Rosado et al., 2016) y que es encontrada en cerebro y músculo esquelético y cardiaco (Lilliu et al., 2021); (3) STIM1-A, el cual desestabiliza la función de los canales Orai, regulando negativamente a SOCE y expresándose en astrocitos, corazón, riñón y testículos (Knapp et al., 2022); y por último (4) STIM1-B, el cual se encuentra en SNC, enlenteciendo la activación de SOCE. (Ramesh et al., 2021)
- **STIM2:** El dominio EF-hand-SAM de esta isoforma se une al calcio con una constante de disociación (K^d) de $\sim 400\mu M$ (dos veces mayor al de STIM1). (Soboloff, et al., 2012; Lilliu et al., 2021; Grabmayr, Romanin & Fahrner, 2021) Aún cuando STIM2 sea más sensible a la detección de cambios de concentración de calcio, en comparación con STIM1, la velocidad con la que se despliega durante el cambio conformacional tras su activación, hace que su cinética sea más lenta y tenga repercusiones en el tiempo de activación sobre los canales Orai, y por ende en la entrada de calcio por esta vía, (Soboloff et al., 2012; Rosado et al., 2016) además de que la porción 2 del dominio SOAR, contiene un residuo de leucina, el cual actúa como un agonista parcial de Orai, reduciendo su afinidad con esta proteína formadora de poro (Zhou et al., 2017). STIM2 cuenta con 3

variantes por splicing alternativo: (1) STIM2.1, el cual es incapaz de activar los canales Orai (Rana et al., 2015; Miederer et al., 2015); (2) STIM2.2, que es la variante mejor caracterizada de STIM2, cumpliendo las mismas funciones anteriormente mencionadas (Rosado et al., 2016); tanto STIM2.1 como la variante 2.2 se expresan en corazón, hígado, páncreas, timo, cerebro y cerebelo; (3) y de la variante STIM2.3, aún se desconoce sobre su función. (Miederer et al., 2015; Rosado et al., 2016)

Mecanismo de acción de SOCE

El mecanismo de activación se considera un proceso bifásico, donde la disminución en la concentración de calcio en el RE es asociada a la entrada del mismo ion desde el espacio extracelular. (Tiffner & Derler, 2021)

En condiciones de reposo, STIM, se encuentra en su forma plegada gracias a una concentración alta de calcio en el RS/E y a que se encuentra unido a la proteína EB1 (del inglés, end binding). (Lilliu et al., 2021)

La activación de SOCE es dada por la disminución de las reservas de calcio del retículo sarco/endoplásmico. Esta depleción se genera por una activación de la fosfolipasa C vía tirosin cinasa o proteínas G con el fin de hidrolizar al PIP₂ (fosfatidilinositol 4,5-bifosfato) y generar IP₃ (inositol 1,4,5-trifosfato) y diacilglicerol (DAG), el IP₃ se une a su receptor IP₃R en la membrana del RS/E y como consecuencia, sale calcio desde este reservorio hacia el citosol, disminuyendo su concentración rápidamente. El dominio localizado en la porción N-terminal de STIM, EF-hand-SAM, detecta la disminución en los niveles de calcio, haciendo que este ion se disocie del dominio cEF y que STIM se desprenda parcialmente de la proteína EB1, provocando un cambio conformacional de oligomerización y desplegamiento en forma de punta, trasladándose hacia la membrana plasmática (encontrada a 11-12 nm de distancia). Estos cambios estructurales se propagan desde la N-terminal ubicada en el lumen del RE, hasta el dominio TM en su C-terminal, localizado en el espacio intracelular. Dentro del dominio TM se encuentran tres regiones coiled-coil (CC1, CC2, CC3) y el segmento CC2-CC3, conocido como la región activadora de STIM-Orai (SOAR, del inglés STIM-Orai Activating Region) o dominio activado por calcio (CAD, del inglés Calcium Activated

Domain), en su estado activado se une con Orai, permitiendo la entrada de calcio operada por almacenes (SOCE); mientras que CC1 y CC3 estabilizan la conformación extendida al momento en que se oligomeriza STIM. (**Figura 6**) (Soboloff et al., 2012; Izquierdo et al., 2014; Cendula et al., 2019; Lilliu et al., 2021; Grabmayr, Romanin & Fahrner, 2021; Tiffner & Derler, 2021)

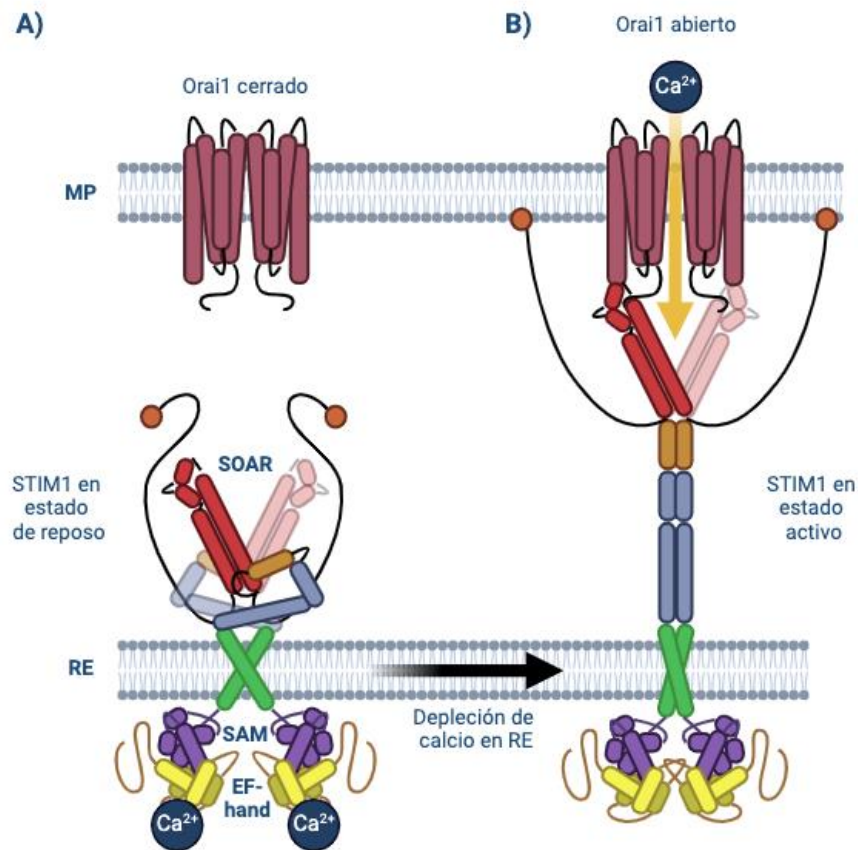


Figura 6. Mecanismo de activación de la SOCE. A) Complejo STIM y Orai en reposo. Plegamiento de STIM y canal Orai cerrado. B) Mecanismo de activación de SOCE. Cambio conformacional y oligomerización de STIM. Apertura del canal Orai. (MP: membrana plasmática; RE: retículo endoplásmico; Ca^{2+} : calcio; SAM: sterile- α motif; SOAR: del inglés STIM-Orai Activating Region). Modificado de Zhou et al., 2017. Creada en BioRender.

Existen dos procesos de inactivación dependientes de calcio para los canales Orai. Una inactivación rápida, la cual se da principalmente en los canales Orai2 y Orai3, y consiste en un mecanismo inhibitorio por un aumento en la concentración de calcio cerca del poro central, teniendo una duración de milisegundos. El segundo proceso, por

inactivación lenta, se encuentra principalmente en la isoforma Orai1, la cual se desarrolla en decenas de segundos y depende del aumento de la concentración citosólica de calcio. (Lis et al., 2007; Nieto-Felipe et al., 2023)

La entrada de calcio a través de esta vía, conduce a múltiples respuestas dependientes de calcio como lo son: la vía de la calmodulina-calcineurina-NFAT (Cendula et al., 2019), la vía de la cinasa dependiente de Ca^{2+} -CaMK, la vía del $\text{NF}\kappa\beta$ y la activación transcripcional. (Izquierdo et al., 2014; Zhou et al., 2017) Kar y colaboradores (2021) demostraron que la activación del factor nuclear de células T activadas (NFAT), es específico para la entrada de calcio vía Orai1, pero no en sus otras dos isoformas. (Kar et al., 2021)

SOCE en cardiomiocitos

La entrada de calcio operada por almacenes a través de STIM1-Orai1 puede ser detectada en prácticamente todos los cardiomiocitos en etapa neonatal (Luo et al., 2012), siendo esta vía necesaria para el desarrollo cardíaco durante esta etapa. SOCE va disminuyendo durante las primeras semanas postnatales, coincidiendo con el cese de la proliferación de los cardiomiocitos y con el aumento de expresión de los túbulos-T, canales de calcio dependientes de voltaje $\text{Ca}_v1.2$, SERCA y fosfolambano; estructuras de gran importancia para el proceso de acople excitación-contracción en el corazón bajo condiciones fisiológicas, excluyendo a SOCE como vía principal reguladora de este proceso (**Figura 7**). El complejo STIM1-Orai1 puede ser encontrado en aproximadamente el 10% de los cardiomiocitos adultos en condiciones fisiológicas, pero existe un aumento considerable de su expresión en procesos patológicos como las arritmias, insuficiencia e hipertrofia cardíaca. (Voelkers, 2010; Luo et al., 2012; Bartoli et al., 2020; Rosenberg et al., 2021)

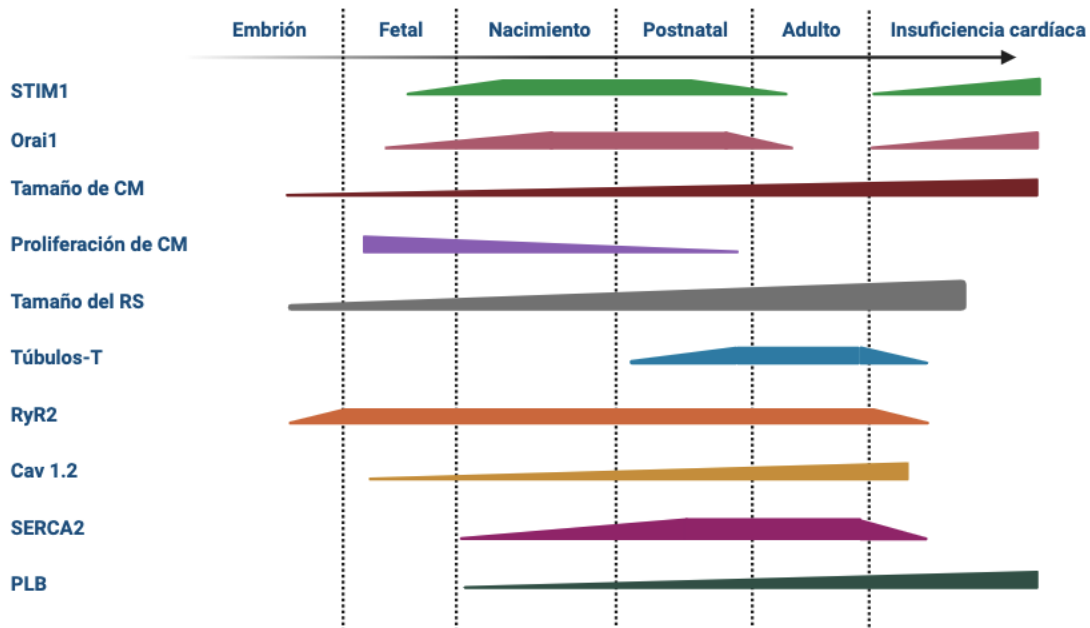


Figura 7. Línea del tiempo para la expresión de STIM1 y Orai1 durante el desarrollo cardíaco y la insuficiencia cardíaca. (CM: cardiomiocito; RS: retículo sarcoplásmico; RyR2: receptor de rianodina tipo 2; Cav 1.2: canales de calcio operados por voltaje 1.2; SERCA2: ATPasa del retículo sarco/endoplásmico 2; PLB: fosfolambano). Modificado de Rosenberg et al., 2021. Creada en BioRender.

SOCE en fibroblastos

Los fibroblastos son las células más abundantes en el corazón y se encargan de mantener la integridad estructural del mismo. Su forma activada, los miofibroblastos, se caracterizan por una excesiva secreción de proteínas de la matriz extracelular, que con el tiempo favorecen la rigidez y pérdida de función del miocardio, favoreciendo el desarrollo de fibrosis cardíaca. (Zhang et al., 2016; Cendula et al., 2021)

SOCE es la principal fuente de calcio intracelular en células no excitables, y este ion es el encargado de fungir como segundo mensajero en procesos como la proliferación y activación de fibroblastos, así como la secreción de MEC y citocinas; los cuales median el proceso fibrogénico. (Zhang et al., 2016; Ross et al., 2017)

Se ha evidenciado la relación de SOCE mediado por el complejo STIM1-Orai1 en la progresión de patologías cardiovasculares. Ross y colaboradores (2017) encontraron que, en fibroblastos cardiacos de humanos con insuficiencia cardíaca, existe un aumento en la secreción de colágeno y en el flujo de calcio vía SOCE, además de un incremento en la expresión de Orai1. (Ross et al., 2017) De igual manera, se ha encontrado un aumento en la expresión del colágeno tipo III en fibroblastos de humanos con insuficiencia cardiaca, el cual indica la transdiferenciación de fibroblastos a miofibroblastos. (Cendula et al., 2021) Zhang y colaboradores (2016) observaron un aumento en la expresión de STIM1 y Orai1 tanto in vivo como in vitro, en fibroblastos de rata adulta, tras su estimulación con angiotensina-II; además de que al disminuir la expresión de alguna de estas proteínas era suficiente para tener un efecto antifibrótico, lo cual indica que STIM1 como Orai1 son necesarias como complejo para la activación de SOCE en proceso fibróticos. (Zhang et al., 2016)

Diabetes y obesidad: repercusiones en el corazón

La obesidad es un factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares (OMS, 2021) al producir cambios hemodinámicos, alteraciones neurohormonales y metabólicas que desencadenan cambios en la morfología y fisiología del corazón, contribuyendo al desarrollo de insuficiencia cardiaca. (Alpert et al., 2018) Existen cambios en la MEC intersticial en pacientes obesos, distintivos de la insuficiencia cardiaca con fracción de eyección preservada que se asocia con un aumento en el volumen plasmático e hipertrofia muscular, así como dilatación ventricular derecha acentuada. (Frangogiannis, 2021) Además, el tejido adiposo produce citocinas proinflamatorias y hormonas como la leptina, adiponectina y resistina, las cuales tienen un impacto importante en la regulación del metabolismo de la glucosa y del peso corporal, incrementando el riesgo de disfunción en el miocardio y concluyendo en insuficiencia cardíaca. (Carbone et al., 2020)

En pacientes con obesidad, los ventrículos pueden entrar en un proceso de remodelación patológica desarrollando hipertrofia ventricular. La presencia de hipertensión arterial sistémica, la cual está presente en hasta el 60% de los pacientes obesos (Abel, Litwin & Sweeney, 2008), así como el grado y duración de la obesidad son algunos de los factores de riesgo que influyen en la posibilidad de desarrollar un incremento de masa de las paredes del ventrículo izquierdo. (Alpert et al., 2018)

Se ha evidenciado tanto en modelos animales como humanos, que la obesidad se asocia con cambios a nivel cardíaco de manera estructural, tales como la hipertrofia cardíaca, específicamente del ventrículo izquierdo, infiltración de ácidos grasos en el miocardio y fibrosis cardíaca; y funcionalmente se ha encontrado disminución de las funciones sistólica y diastólica del ventrículo izquierdo con la fracción de eyección preservada. Una contribución importante en los cambios de tamaño, estructura y función, son las alteraciones en la composición y estructura de la MEC (Abel, Litwin & Sweeney, 2008)

De igual manera, la obesidad es un factor de riesgo para desarrollar resistencia a la insulina (OMS, 2021) y esta a su vez, se correlaciona con la hiperglicemia y la diabetes tipo 2. (Alpert et al., 2018) De hecho, los corazones diabéticos al estar expuestos durante un tiempo prolongado a la hiperglucemia y concentraciones elevadas de citocinas y ácidos grasos tienden a presentar cambios en su función. (Dillmann, 2019) La cardiomiopatía diabética, es una alteración cardíaca que se encuentra en pacientes diabéticos en ausencia de alguna otra enfermedad cardiovascular. La resistencia a la insulina, la hiperinsulinemia compensatoria y la progresión de la hiperglucemia, son mecanismos que contribuyen a esta patología. Otro factor contribuyente a la cardiomiopatía diabética es el manejo del calcio citosólico en cardiomiocitos observado en modelos animales (Dillmann, 2019; Paolillo et al., 2019) Se ha encontrado que la hiperglucemia tiene efecto activador de fibroblastos mediante la vía de señalización del TGF- β , el cual transduce señales fibrogénicas dependientes de especies reactivas de oxígeno (ROS). También existen vías independientes de glucosa que estimulan la activación de fibroblastos, como lo son la señalización de endotelina-1 (ET-1), el efecto de las adipocinas y la inflamación microvascular. (Frangogiannis, 2021)

Justificación

A lo largo de las secciones anteriores, ha quedado evidenciada la relación entre individuos obesos y diabéticos, con enfermedades cardiovasculares. En estas patologías existen alteraciones cardíacas, las cuales son desencadenadas por distintas vías. El calcio es un ion de gran importancia para el funcionamiento del corazón, por lo que las irregularidades en su homeostasis influyen en la estructura y funcionamiento de este órgano. La entrada de calcio operada por almacenes ha sido relacionada con la proliferación y activación de fibroblastos, los cuales se encargan de secretar las proteínas de la MEC que contribuyen al establecimiento de la fibrosis cardíaca. A la par, en esta y otras patologías como en la insuficiencia cardíaca, han sido evidenciadas alteraciones en la expresión de STIM1 y Orai1, las principales proteínas de la SOCE.

La gran parte de las investigaciones orientadas a las patologías cardíacas se centran en la función de los cardiomiocitos, sin embargo, sería de gran interés conocer la implicación de los fibroblastos cardíacos en biomodelos de obesidad e hiperglicemia, tomando en cuenta que son el tipo celular más abundante en este órgano, que juegan un rol importante durante los procesos de remodelación cardíaca y que su principal fuente de calcio intracelular es vía SOCE.

Hasta ahora, se ha estudiado al complejo STIM1-Orai1 en humanos y biomodelos patológicos, pero aún no existe suficiente información en donde se correlacione la obesidad y la diabetes con los posibles cambios de expresión de estas proteínas, ni las posibles alteraciones funcionales en la SOCE a nivel cardíaco.

Hipótesis

En las ratas Zucker Diabetic Fatty, como biomodelos de obesidad e hiperglicemia, se presenta un incremento funcional de SOCE, así como un aumento en la expresión de las proteínas responsables del funcionamiento de esta vía, STIM1 y Orai1.

Objetivos

Objetivo General

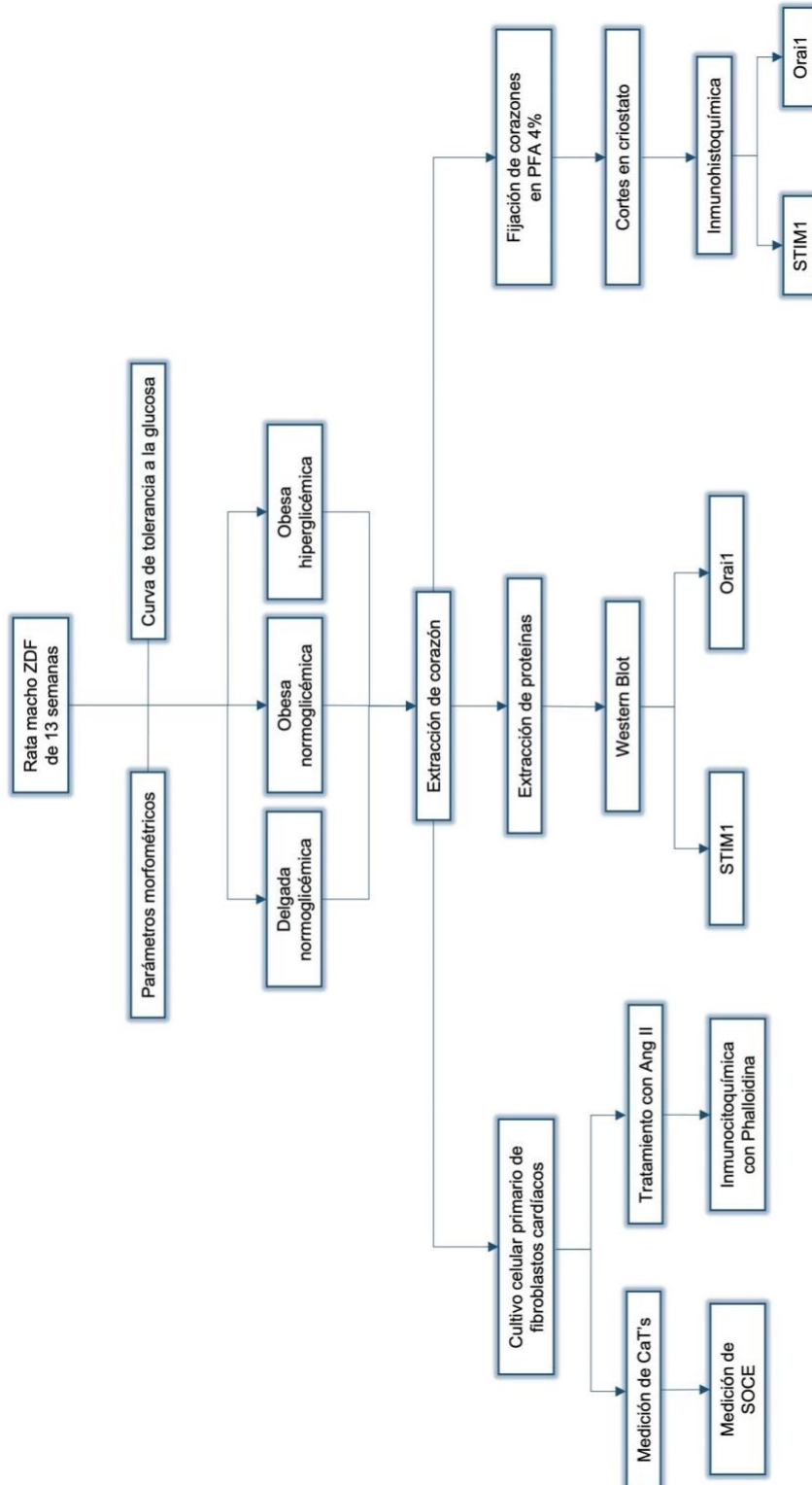
Analizar las diferencias en la regulación del calcio intracelular vía SOCE, así como la expresión de las proteínas STIM1 y Orai1 entre un biomodelo de obesidad e hiperglicemia y uno con obesidad, respecto a uno sano.

Objetivos Específicos

1. Comparar la magnitud de transitorios de calcio vía SOCE, así como la capacidad de almacenamiento del retículo endoplásmico en fibroblastos cardíacos de ratas delgadas normoglicémicas, obesas normoglicémicas y obesas hiperglicémicas.
2. Determinar la localización de las proteínas STIM1 y Orai1 en tejido ventricular cardíaco en cada grupo de estudio.
3. Cuantificar la expresión de las proteínas STIM1 y Orai1 en tejido cardíaco, analizando las diferencias entre los grupos experimentales y control.
4. Analizar el grado de activación de los fibroblastos cardíacos de cada grupo experimental.

Material y métodos

Diagrama de trabajo



Modelo experimental

Se utilizaron ratas machos de la cepa Zucker Diabetic Fatty (ZDF), de 13 semanas de edad. Estas ratas presentan una mutación en el receptor de leptina, lo cual las hace modelos para obesidad, resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa que se desarrolla como hiperglicemia conforme van envejeciendo. Las ratas fueron obtenidas del bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla donde fueron mantenidas en ciclos de luz-oscuridad de 12 horas con temperatura de entre 23°C y 25°C. El manejo de los animales se realizó con base en la NOM-062-ZOO-1999.

Con base a los parámetros morfométricos (circunferencia abdominal y longitud hocico-ano), peso y con el resultado de la curva de tolerancia a la glucosa (**Figura 41 y 42**), las ratas de esta cepa se categorizaron en 3 grupos: (1) delgada normoglicémica, (2) obesa normoglicémica y (3) obesa hiperglicémica.

La curva de tolerancia a la glucosa se realizó un día después de cumplidas las 13 semanas. La primera toma para medir la glucosa en sangre se realizó sin ayuno, para posteriormente mantener a las ratas sin alimento durante 6 horas y con libre acceso al agua. Pasado el tiempo, se midieron los niveles de glucosa en ayuno, tras la administración de 2 g de glucosa por Kg de peso por vía intraperitoneal. Los niveles de glucosa en sangre se midieron a los 30, 60, 90 y 120 minutos después de la administración de la glucosa. Para la medición de glucosa se obtuvieron muestras de sangre por punción de la vena caudal de las ratas y los niveles de glucemia se midieron usando tiras reactivas y el sistema ContourTS Bayer.

Cultivo primario de fibroblastos cardíacos (FiCs)

Las ratas fueron anestesiadas con isoflurano 5% (PISA) tras la administración de heparina (1000 UI/Kg), extrayendo posteriormente el corazón y perfundiéndolo en el sistema de Langendorff con solución Tyrode. Se realizaron lavados con solución Tyrode libre de calcio (0 Ca²⁺) en condiciones estériles. Después se realizó la digestión enzimática incubando el tejido en solución Tyrode en presencia de Colagenasa tipo II (10 mg) y Proteasa tipo XIV (1 mg) en agitación constante a 37°C durante 35 minutos. Se detuvo la digestión enzimática con solución Tyrode 0 Ca²⁺ suplementada FBS (del inglés, fetal bovine serum) al 20% y se procedió con la disgregación mecánica. Se filtró la suspensión celular en dos tubos cónicos de 15 mL y se

centrifugaron a 400 G durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se sembró la pastilla celular en cajas Petri (35mm) o T25 con DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)-FBS 10%. Después de 3 horas, se realizaron 3 lavados con PBS (del inglés, phosphate buffered saline) y se cambió el medio de cultivo. Las células se mantuvieron en incubadora húmeda a 37°C, CO₂ 5%, cambiando el medio de cultivo diario hasta el momento de su uso.

Tripsinización y sembrado de FiCs

Cuando las células llegaron a una confluencia del 90% aproximadamente, se eliminó el medio de cultivo añadiendo posteriormente PBS estéril para la realización de lavados; se agregó 1 mL de tripsina 0.25% durante 7 minutos y se resuspendió la suspensión celular. Para el mantenimiento del pasaje, las células se sembraron en una proporción 1:4 en medio DMEM-FBS 10%.

Fluorometría de Ca²⁺ intracelular

Los fibroblastos se sembraron en cubreobjetos estériles de vidrio con un área de 0.62 cm² y una densidad de 15,000 células/cm² 3 días antes del experimento. Esto nos permitió obtener un cultivo semiconfluente. El día del experimento, se retiró el medio de cultivo, se realizó un lavado con PBS estéril y se incubaron las células con Fluo 4AM 2 μM durante 2 horas a 37°C, CO₂ 5% y en oscuridad. Tras la incubación con el fluoróforo, se realizó un lavado de 30 min con Solución Extracelular Normal (SEN) antes de iniciar las mediciones. El registro de los cambios de fluorescencia se realizó en un microscopio invertido Nikon TiU adaptado con una cámara de perfusión y equipado con una lámpara de Xenón, un monocromador, una caja de filtros y una cámara de alta sensibilidad (PTI, IC-200). Para excitar el fluoróforo se utilizó una longitud de onda de 480 nm (azul) y mediante un espejo dicróico se eliminó la fluorescencia por debajo de los 510 nm y se capturó la luz en un espectro de onda entre 515 a 545 nm (verde). Las imágenes fueron digitalizadas cada 5 segundos mediante el software ImageMaster™. El análisis posterior se realizó mediante el programa de ImageJ y en Clampfit 10.7 se midieron las señales de calcio, para los cuales se utilizaron distintos parámetros como los son el área bajo la curva, la amplitud al pico, tiempo al pico y la tau descendiente al 37% (**Figura 8**); para las mediciones de calcio, los trazos se normalizaron con respecto a la fluorescencia basal (F/F₀) y para el análisis se consideraron las variaciones con respecto a los valores basales (cambio en la fluorescencia). Cada señal fue delimitada con el programa mediante el uso de cursores.

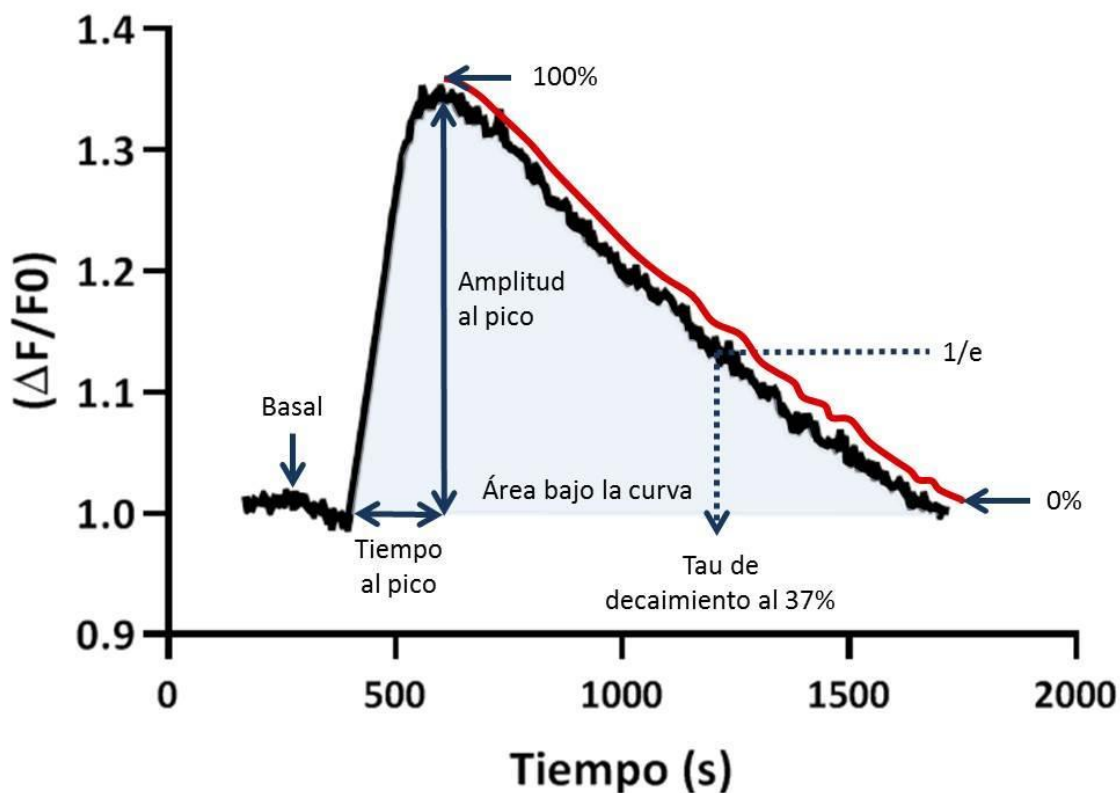


Figura 8. Representación de los parámetros analizados en los experimentos de fluorimetría de calcio intracelular.

Capacidad de almacenamiento del RE y SOCE

Se mantuvieron los FiCs durante 2 minutos en SEN. Se retiró el calcio extracelular cambiando la SEN por SEN libre de calcio durante 5 minutos. Posteriormente se aplicó ácido ciclopiazónico (CPA) (inhibidor de la SERCA) $10 \mu\text{M}$ en SEN libre de calcio, durante 30 minutos, en donde se midió la fluorescencia provocada por la liberación de calcio del retículo endoplásmico hacia el citosol; posteriormente se aplicó CPA $10 \mu\text{M}$ en presencia de calcio extracelular durante 30 minutos, y se registró la SOCE activada por el vaciamiento previo del retículo endoplásmico; finalizando el protocolo con la aplicación de SEN durante 5 minutos.

Bloqueo de la SOCE con BTP2

Se mantuvieron los FiCs durante 2 minutos en SEN. Se retiró el calcio extracelular cambiando la SEN por SEN libre de calcio durante 5 minutos. Posteriormente se aplicó ácido ciclopiazónico (CPA) (inhibidor de la SERCA) 10 μM y BTP2 (bloqueador de los canales CRAC) 10 μM en SEN libre de calcio durante 30 minutos, tal como en el protocolo de "Capacidad de almacenamiento del RE y SOCE" se midió la fluorescencia provocada por la liberación de calcio del retículo endoplásmico hacia el citosol; posteriormente se aplicó CPA 10 μM y BTP2 10 μM en presencia de calcio extracelular durante 30 minutos, y se registró el bloqueo de la SOCE por acción del BTP2; finalizando el protocolo con la aplicación de SEN durante 5 minutos.

Western Blot

Los corazones fueron obtenidos como se describe previamente en el cultivo primario de FiCs. Tras la perfusión con Tyrode en el sistema Langendorff, se retiraron aurículas y el tejido se congeló con nitrógeno líquido, para posteriormente extraer las proteínas con buffer de lisis RIPA (del inglés, radioimmunoprecipitation assay) suplementado con los inhibidores de proteasa y fosfatasa a una temperatura de 4°C. La cuantificación de proteínas se realizó con base al "Test tube protocol" del manual del kit de BCA Pierce y se utilizó el espectrofotómetro BioPhotometer de Eppendorf con cubetas desechables (Sarstedt 67.742).

Las muestras (50 μg) fueron cargadas en gel Bis-Tris 4-12% (NP0321 ThermoFisher Scientific), usando el buffer de corrida MOPS (NP0001 ThermoFisher Scientific) durante la electroforesis, y buffer de transferencia (NP0006 ThermoFisher Scientific). Las proteínas fueron transferidas a membrana PVDF y esta fue teñida con rojo de Ponceau al 0.01%. Se realizó el bloqueo de las membranas durante 1 hora con TBS-T suplementada con leche al 5%. Para la inmunodetección se usó el anticuerpo policlonal Orai1 (PA1-74181 de Invitrogen) y el anticuerpo policlonal anti-STIM1 (HPA012123 de Sigma-Aldrich), ambos a una dilución 1:1000 con leche al 2% durante 15 horas a 4°C en oscuridad; para posteriormente usar como anticuerpo secundario Goat Anti-Rabbit (ab6721 de abcam) a una dilución de 1:3000 durante 2 horas a temperatura ambiente. El revelado se realizó con TMB (T0565 Sigma) en oscuridad. La intensidad de las bandas fue analizada usando el software ImageJ. Los valores de la intensidad de cada banda fueron normalizados con respecto a la cantidad de proteínas totales y al grupo LZDF.

Inmunohistoquímica enzimática

En un criostato, se realizaron cortes de 14µm de la base de corazón. Los cortes se colocaron en laminillas tratadas con gelatina al 4% y se mantuvieron a -20°C hasta el momento de su uso. Para su rehidratación, se mantuvieron en PBS 1x durante 5 minutos, y se realizó la recuperación antigénica sumergiendo en buffer de citratos (10 mM, pH 6) a 70°C durante 3.5 minutos. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 10 minutos y se lavaron las muestras con PBS 1x durante 5 minutos. La inactivación de la peroxidasa endógena se realizó con H₂O₂ al 0.3% durante 10 minutos y 3 lavados posteriores de 2 minutos cada uno con PBS. La permeabilización del tejido se realizó con Tritón X-100 al 0.2% durante 10 minutos, y previo lavado con PBS (5 minutos) se realizó la inmersión en solución de bloqueo (BSA libre de IgG al 2%) durante 5 minutos. Posteriormente, se lavaron los tejidos 2 veces con PBS (3 minutos), para incubar con los anticuerpos primarios correspondientes: (1) policlonal para Orail (PA1-74181 de Invitrogen) y (2) policlonal anti-STIM1 (HPA012123 de Sigma-Aldrich) en concentración de 1:100; estos se incubaron durante 15 horas a 4°C en cámara húmeda cerrada. Después de la incubación, se realizaron dos lavados con PBS (5 minutos) y se incubaron con el anticuerpo secundario: Goat Anti-Rabbit IgG H&L (ab6721 de abcam) en una concentración de 1:250 durante 2 horas a temperatura ambiente. Antes de la contraincubación de los núcleos, la laminillas se lavaron con PBS durante 5 minutos, posteriormente: se sumergieron las muestras en la solución de hematoxilina de Mayer (51275 de Sigma Aldrich) por 3 minutos, seguido de un lavado con agua corriente al vire; posteriormente se trataron los tejidos con alcohol (sumergiendo 15 veces en cada dilución: al 70%, al 96%, al 96%, al 100% y al 100%), seguido de inmersión en solución xilol/alcohol absoluto 1:1 (15 veces), 15 veces en xilol al 100% (2 veces), para posteriormente ser montadas con resina sintética al 60%. A los controles negativos se les realizó el mismo procedimiento que el resto de las muestras, exceptuando la incubación con el anticuerpo primario. Las imágenes fueron captadas en un microscopio Leica DM I-Led equipado con un objetivo 40x y acoplado a una cámara Reflex Nikon D300. Las imágenes capturadas fueron analizadas a través del software ImageJ, utilizando la función de threshold y medición de porcentaje de área marcada, utilizando el valor del fondo, como punto de referencia para delimitar la marca positiva. El análisis se realizó por duplicado en al menos 3 ratas distintas por cada grupo.

Inmunocitoquímica - Faloidina

Los fibroblastos cardiacos se sembraron en cubreobjetos de 18 mm. Un día después de sembrarlos, se les trata con Ang II 100 nM y se mantuvieron así durante 48 horas. Se siguió protocolo de Abcam “ab176759-CytoPainter Phalloidin-iFluor 647 Reagent”: se lavaron células con PBS 1x, para posteriormente realizar el fijado con PFA 4% (pH 7.4) a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se realizaron dos lavados con PBS por 4 minutos cada uno y se permeabilizaron las células con Tritón X-100 (0.1%) en PBS durante 4 minutos. Se realizaron dos lavados con PBS por 4 minutos cada uno y se agregó la faloidina 1x con solución de trabajo (1 μ L de faloidina 1000x conjugada en 1 mL de PBS y BSA al 1%); se incubaron durante 45 minutos. Se realizaron 2 lavados con PBS por 4 minutos cada uno, para posteriormente montar los cubreobjetos en portaobjetos con medio de montaje adicionado con DAPI (Abcam 104139). Se dejaron secar 24 horas, para sellar las orillas del cubreobjetos sobre el portaobjetos con esmalte de uñas. Las imágenes fueron capturadas por el microscopio Nikon eclipse TiU, confocal C2+, usando longitudes de onda de 485 nm (azul) y 640 nm (rojo) y analizadas con el software ImageJ. Para medir la alineación de las fibras entre sí de cada célula se utilizó el plugin OrientationJ, el cual indica en forma de cociente la coherencia entre las fibras. Para la medición de la intensidad relativa de las fibras α -SMA por unidad de área, se usaron los parámetros de área y “mean gray value”, delimitando a cada célula y utilizando su previa calibración (realizada en NIS-Elements viewer).

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de datos se utilizaron las pruebas paramétricas ANOVA de 1 vía y de 2 vías, con el test de comparación múltiple de Tukey; también se usó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis con el test de comparación múltiple de Dunn. Se usó un valor de $p < 0.05$ para considerar diferencias significativas en los datos obtenidos, mismos que se presentan como la media \pm el valor del error estándar. N indica el número de ratas usadas por experimento, mientras que n se refiere al número de células analizadas. Los programas utilizados para los análisis fueron Fiji de ImageJ, para la cuantificación de fluorescencia e intensidad de marca de las imágenes, según correspondiera; Clampfit 10.7, para la obtención de trazos y, GraphPad Prism 8, para la realización de gráficos y análisis estadístico.

Resultados

Medición de Ca^{2+} intracelular

Se aplicó el protocolo descrito en “capacidad de almacenamiento del RE y SOCE” en la sección de Material y Métodos.

La **Figura 9** representa el trazo medio de las variaciones en la concentración del calcio intracelular en los FiCs obtenidos de cada grupo tras la aplicación del protocolo para evidenciar la liberación de calcio del retículo endoplásmico y la entrada de calcio a través del complejo STIM/Orai. El primer pico representa la salida de calcio del retículo endoplásmico, mientras que el segundo representa la entrada de calcio operada por almacenes intracelulares. De manera general, podemos apreciar que la liberación de calcio del RE es muy parecida en las tres condiciones y que la entrada de calcio (segunda parte del protocolo) es mayor en la cepa obesa normoglicémica (NG OZDF), seguida por la obesa hiperglicémica (HG OZDF), en comparación con el grupo delgado normoglicémico (LZDF).

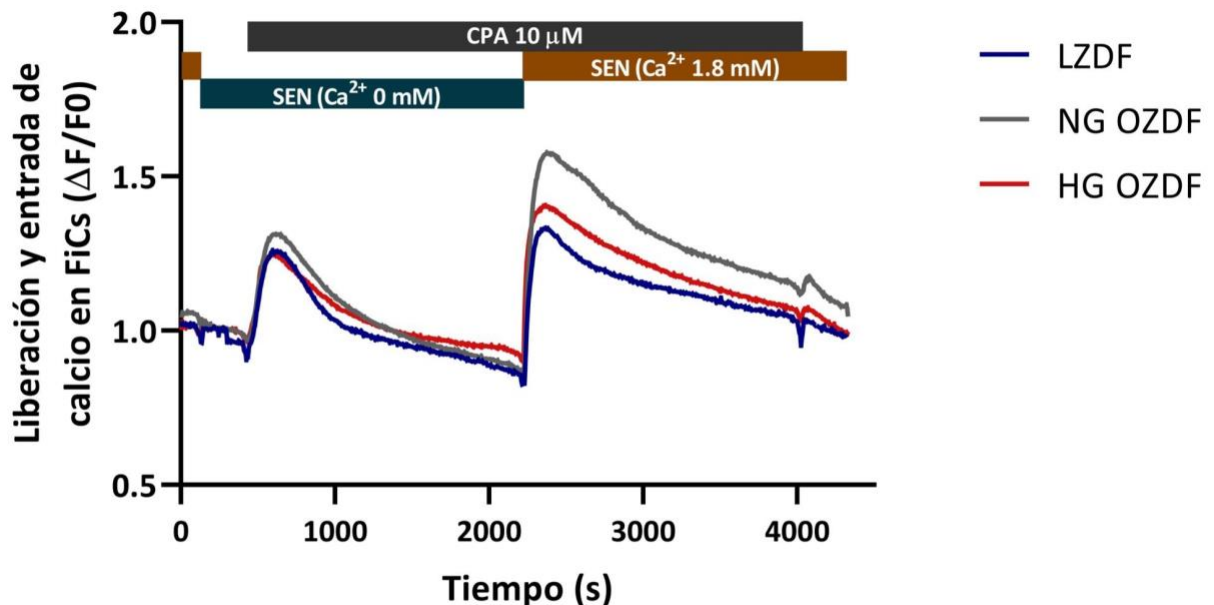


Figura 9. Liberación y entrada de calcio en fibroblastos cardíacos. Media de los transitorios de calcio en cultivo primario de fibroblastos cardíacos. (LZDF: N=3, n=50; NG OZDF: N=3, n=42; HG OZDF: N=3, n=29)

Para analizar en detalle las características de la liberación y entrada de calcio (**Figura 9**), se midió la concentración máxima de calcio intracelular alcanzada durante la liberación del ion desde el RE (Figura 10A), así como el área bajo la curva, la cual indica la cantidad total de calcio libre durante la liberación y recaptura del mismo (Figura 10B). Se utilizó una ANOVA de una vía para el análisis estadístico; no se encontraron cambios significativos ($p \geq 0.05$) en relación con el área bajo la curva ni en la amplitud, entre ninguno de los grupos estudiados.

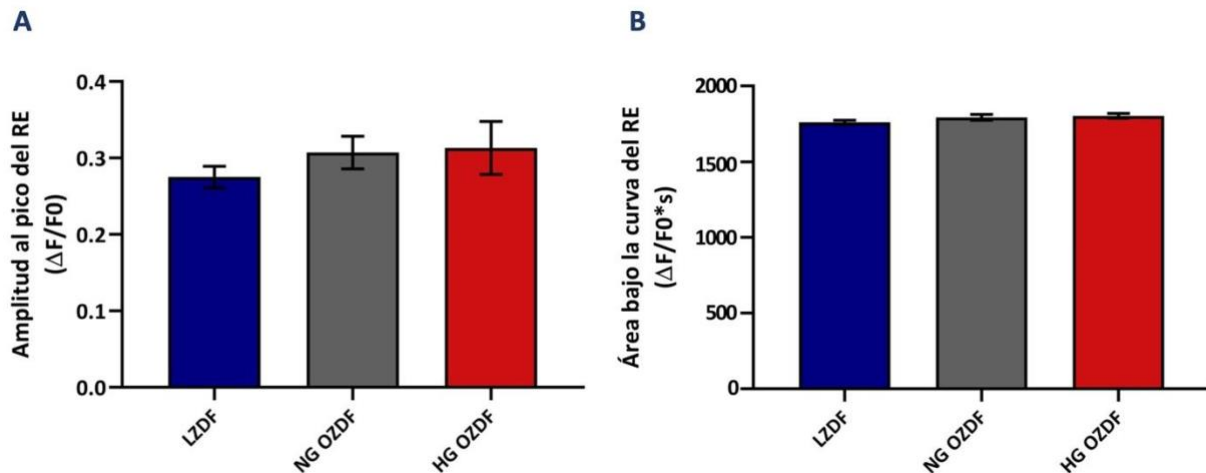


Figura 10. Características de la liberación de calcio del retículo endoplásmico. A) Amplitud al pico. Concentración máxima de calcio alcanzada por la salida de este ion desde el retículo endoplásmico. B) Área bajo la curva. Total de calcio liberado desde el retículo endoplásmico. En ninguno de estos parámetros se hallaron cambios estadísticamente significativos. ($p \geq 0.05$)

Si retomamos la primera parte de la **Figura 9** y contrastamos los trazos de liberación de calcio de cada uno de los grupos, podemos observar que hay una diferencia en la velocidad de liberación y aclaramiento del calcio. Por ejemplo, en los FiCs provenientes de las ratas HG OZDF, el tiempo de decaimiento de los niveles de calcio es menor que la observada en los grupos LZDF y NG OZDF (**Figura 11**), los cuales descienden casi de manera paralela, y ambos son cruzados por el trazo rojo correspondiente a la rata HG OZDF (**Figura 9**, trazo rojo, primera parte). Al medir el tiempo que tarda en decaer la señal al 37% de su valor máximo, observamos que en los FiCs de las ratas NG OZDF se requieren en promedio 577.66 segundos, seguido por los de la rata LZDF (543.38 s) y al final los de la rata HG OZDF (495.94 s) (**Figura 11**). Esta aparente discrepancia se debe a que en los FiCs de las ratas HG OZDF existe una diferencia menor entre el valor máximo de calcio liberado y mínimo de calcio extruido, con respecto a los otros grupos, donde la basal final es menor, y el valor al pico es mayor.

Es importante mencionar que a pesar de que la liberación de calcio fue más rápida en el grupo HG OZDF (HG OZDF: 152.24 s; NG OZDF: 179.76 s; LZDF: 189.58 s) (**Figura 12**), la concentración total de calcio no cambió durante la depleción del RE con CPA (**Figura 10B**), ya que hay que considerar los cambios en la cinética de liberación y recaptura del ion. En la **Figura 13**, al normalizar los cambios en la concentración de calcio durante el vaciamiento del RE, se aprecia que el tiempo para alcanzar la concentración máxima de calcio en los tres grupos es muy parecida, y que la velocidad de decaimiento de la salida de calcio desde el RE es similar entre los grupos HG OZDF y LZDF, siendo NG OZDF el grupo que tarda más en regresar a su concentración basal.

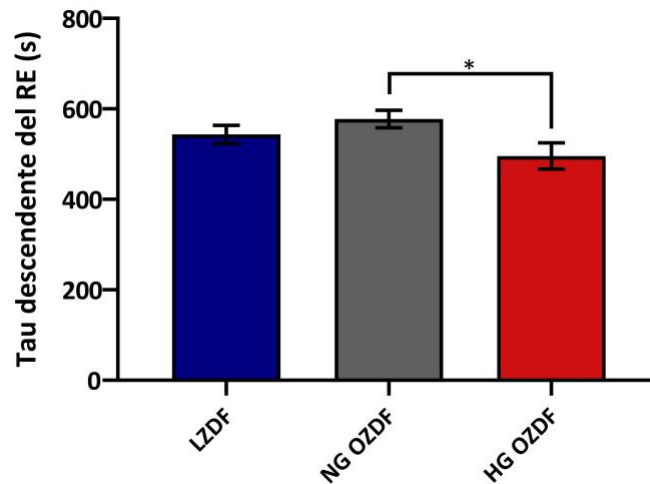


Figura 11. Tau descendente. Tiempo de decaimiento de la señal de calcio, después del vaciamiento del retículo endoplásmico. Se encuentran diferencias significativas entre el grupo NG OZDF y HG OZDF, donde al primero le toma 81.71 segundos más en llegar al 37% de decaimiento desde su valor máximo. (* $p = 0.0491$)

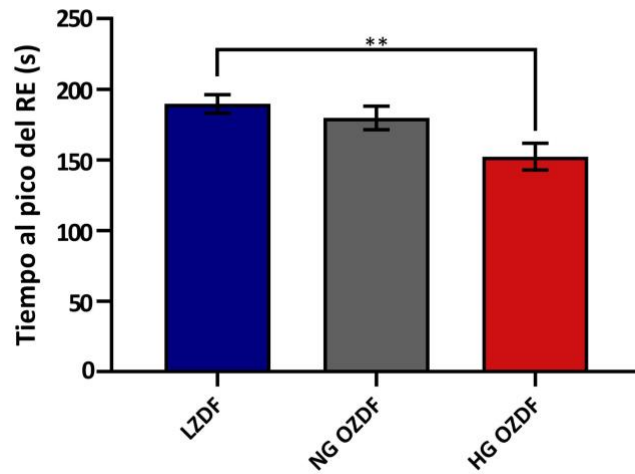


Figura 12. Tiempo al pico. Tiempo (s) en el que se alcanzó la concentración máxima de calcio liberado desde el retículo endoplásmico. Se encuentra una diferencia significativa entre el grupo LZDF y HG OZDF, donde el primero tarda 37.34 segundos más en llegar a su concentración máxima, en comparación con el segundo. (** $p = 0.0033$)

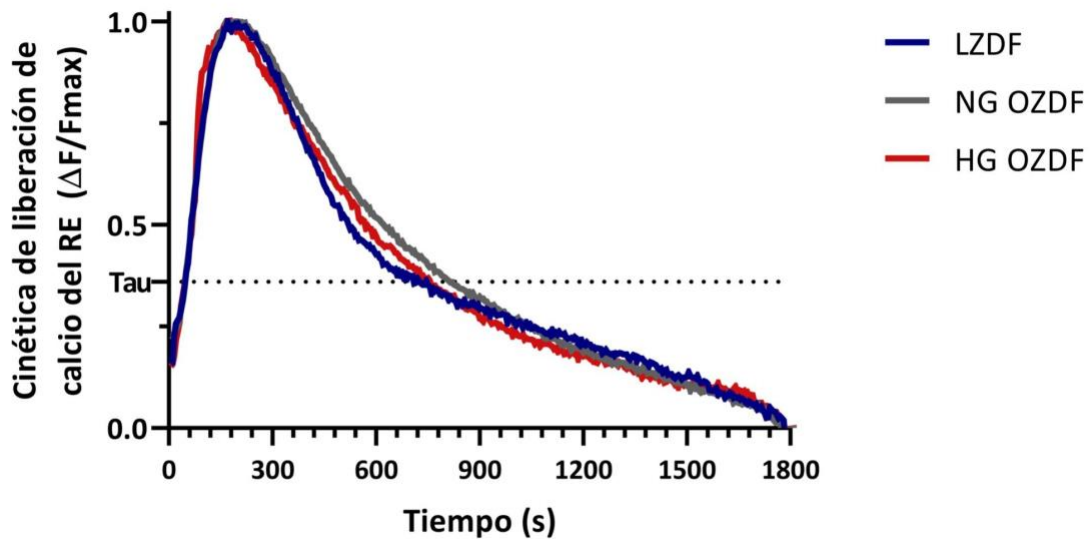


Figura 13. Trazo normalizado de la liberación de calcio del retículo endoplásmico. Normalización de la salida de calcio, en función del valor máximo y mínimo de cada grupo. Se puede observar que la diferencia en la velocidad de aclaramiento de calcio después del vaciamiento del RE, es sobre todo en la parte media del trazo donde NG OZDF es más lento en comparación con los otros dos grupos. La línea punteada representa el decaimiento de la señal al 37% en su valor máximo.

Con respecto a la entrada de calcio a través del complejo STIM/Orai, cuando analizamos en detalle la segunda parte de los experimentos mostrados en la **Figura 9**, podemos observar que la amplitud de la entrada de calcio es aproximadamente un 35% mayor en los FiCs de las ratas NG OZDF que en la LZDF; y que las ratas HG OZDF, presentan un valor intermedio (**Figura 9**). Cuando realizamos el análisis estadístico, encontramos que la amplitud al pico de los SOCs fue mayor en los FiCs provenientes de las ratas NG OZDF con respecto al grupo HG OZDF y LZDF (**Figura 14**). Además, al evaluar la velocidad de decaimiento de la señal, los FiCs de las ratas HG OZDF muestran una cinética más lenta que los de grupos NG OZDF y LZDF (**Figura 15**); y a pesar de que en las ratas NG OZDF, el tiempo de entrada de calcio fue casi el doble en comparación con los otros grupos (**Figura 16**, barra gris), cuando calculamos el área bajo la curva de cada gráfico, encontramos que la mayor entrada de calcio se presentó en los fibroblastos provenientes de las ratas HG OZDF, seguido por los FiCs de las ratas NG OZDF y por último por los del grupo LZDF (**Figura 17**). Al normalizar los trazos de la cinética de SOCE de los tres grupos, se corrobora que el grupo más lento corresponde al obeso hiperglicémico, en comparación con los otros dos estudiados (**Figura 18**).

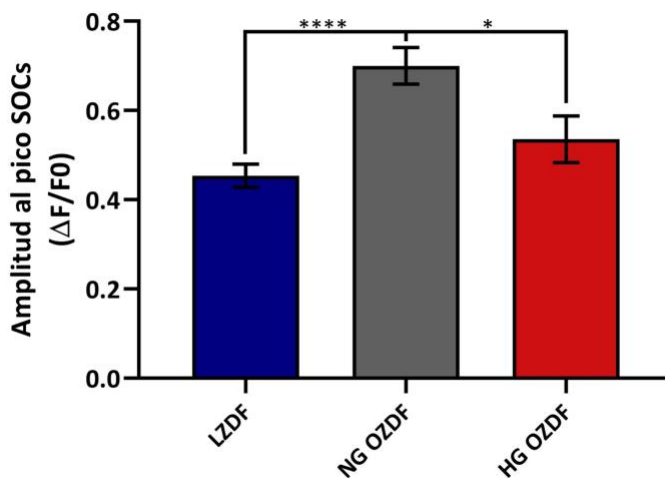


Figura 14. Amplitud al pico. Concentración máxima de calcio alcanzada por el ingreso de este ion a través de los SOCs. Esta concentración es mayor en el grupo NG OZDF, en un 23.48% más que el grupo HG OZDF; y en un 35.15% más que el grupo LZDF (* $p = 0.0137$; **** $p = <0.0001$)

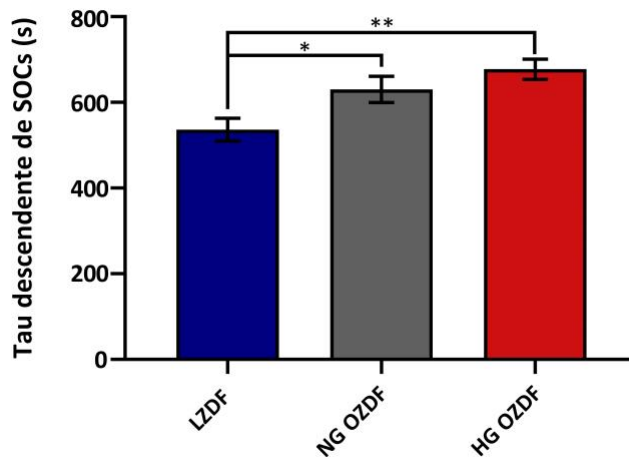


Figura 15. Tau descendente. Tiempo de decaimiento de la entrada de calcio a través de los SOCs. El grupo LZDF es 94.07 segundos más rápido en alcanzar el 37% de decaimiento en la señal, en comparación con el grupo NG OZDF y 141.11 segundos más rápido que el grupo HG OZDF. (* $p = 0.0378$; ** $p = 0.0016$)

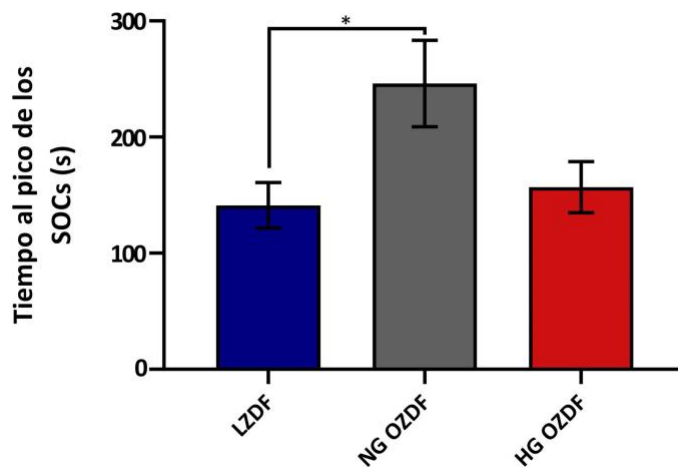


Figura 16. Tiempo al pico. Tiempo (s) en el que se alcanzó la concentración máxima de calcio en el espacio intracelular a través de los SOCs. Al grupo NG OZDF le toma 104.88 segundos más que el grupo LZDF, en llegar a la concentración máxima de calcio a través de esta vía. (* $p = 0.0130$)

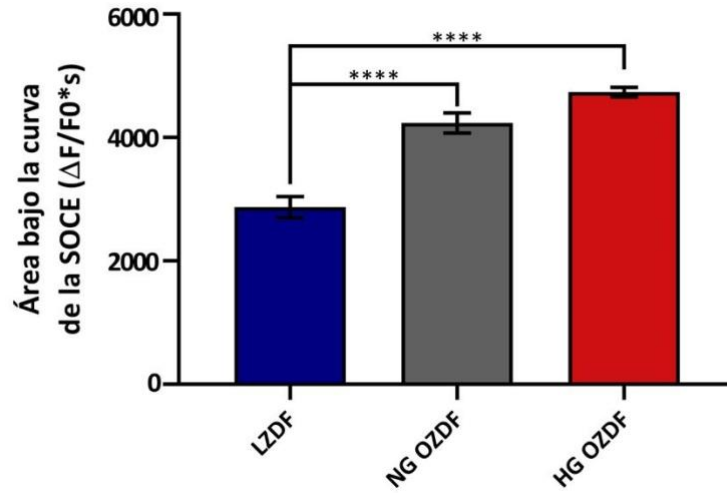


Figura 17. Área bajo la curva. Ingreso total de calcio desde el espacio extracelular hacia el citosol a través de los SOCs, tras el vaciamiento de los almacenes intracelulares. Los dos grupos obesos muestran una mayor cantidad de calcio ingresada vía SOCE; el grupo NG OZDF en un 32.24% y el HG OZDF en un 39.38%, en comparación con el grupo LZDF (**** $p < 0.0001$)

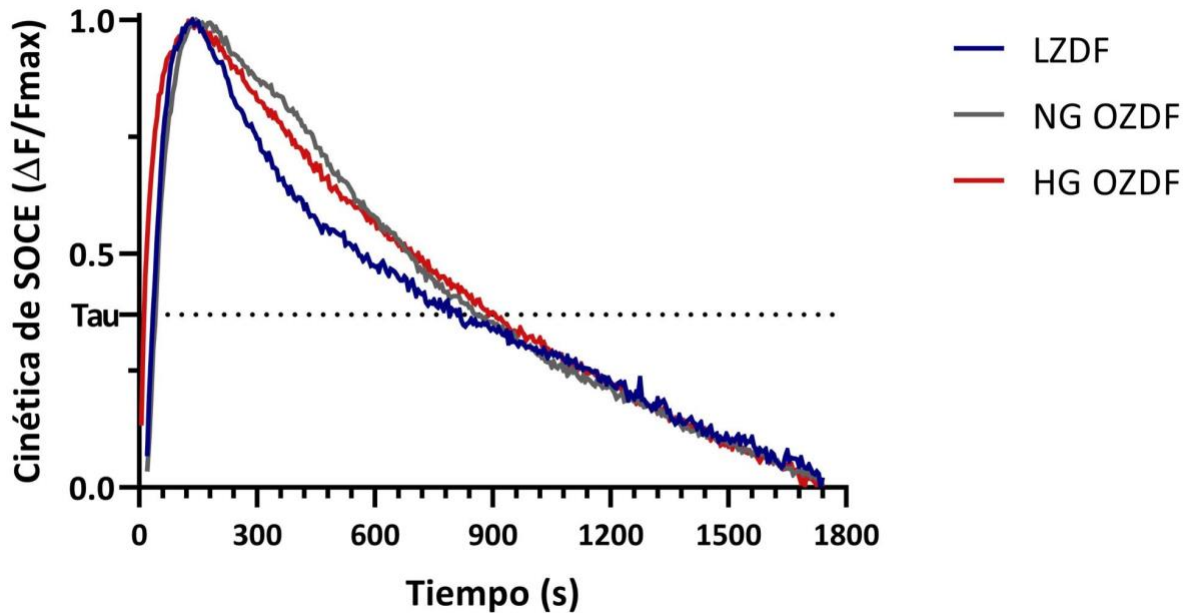


Figura 18. Trazo normalizado de la entrada de calcio a través de los SOCs. Normalización de la entrada de este ion, en función del valor pico de cada grupo.

Para corroborar que las mediciones realizadas sobre la entrada de calcio correspondieran a la entrada vía SOCs, utilizamos un bloqueador de dichos canales para evidenciar su presencia funcional. En la **Figura 19** se compara en cada grupo experimental, el protocolo de capacidad de almacenamiento del RE y SOCE contra el mismo protocolo, pero con presencia del bloqueador de los canales CRAC, BTP2. Es evidente la disminución en la entrada de calcio operada por almacenes en los grupos en presencia del BTP2, al haber un segundo pico mucho menos pronunciado que el grupo control en los grupos estudiados. En todos los casos, el bloqueo del ingreso de total de calcio fue superior al 97% de la condición sin bloqueador (**Figura 20**), independientemente de la magnitud de la entrada en cada grupo experimental (**Figura 21**). Esto confirma que el segundo pico observado del protocolo de capacidad de almacenamiento del RE y SOCE, se trata específicamente de la entrada de calcio operada por almacenes y no por el ingreso de este ion por otras vías, validando el protocolo aplicado.

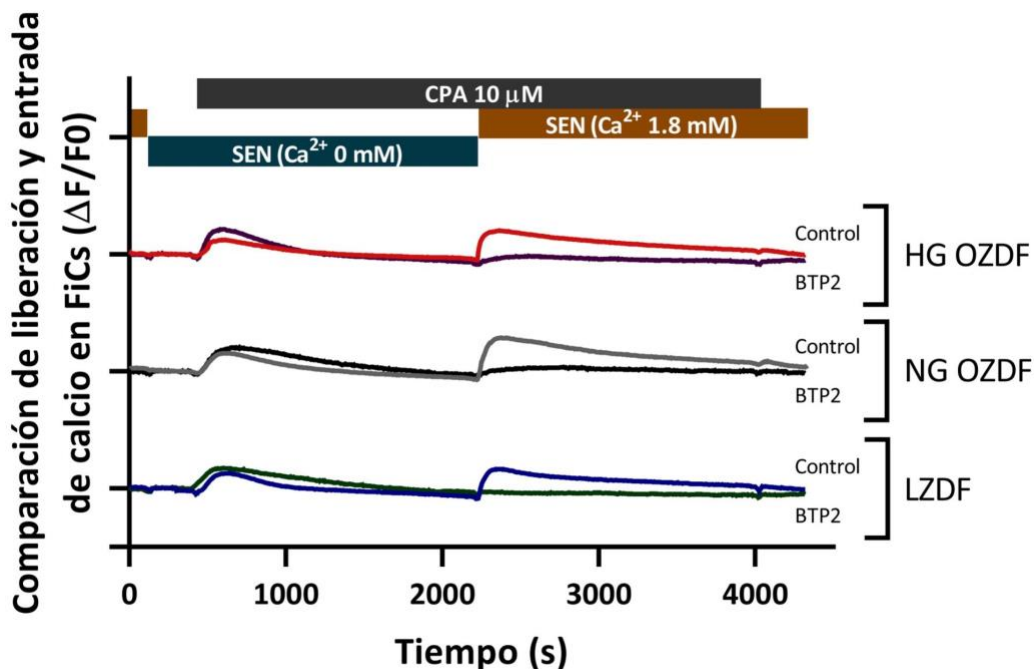


Figura 19. Comparación de la liberación y entrada de calcio en fibroblastos cardiacos control y en presencia de BTP2. Trazos de la media de los transitorios de calcio en cultivo primario de fibroblastos cardiacos, comparando en cada grupo el protocolo de capacidad de almacenamiento del RE y SOCE (control) y el protocolo con el bloqueador de los canales CRAC/SOCs (BTP2). (LZDF: N=1, n=14; NG OZDF: N=1, n=6; HG OZDF: N=1, n=16)

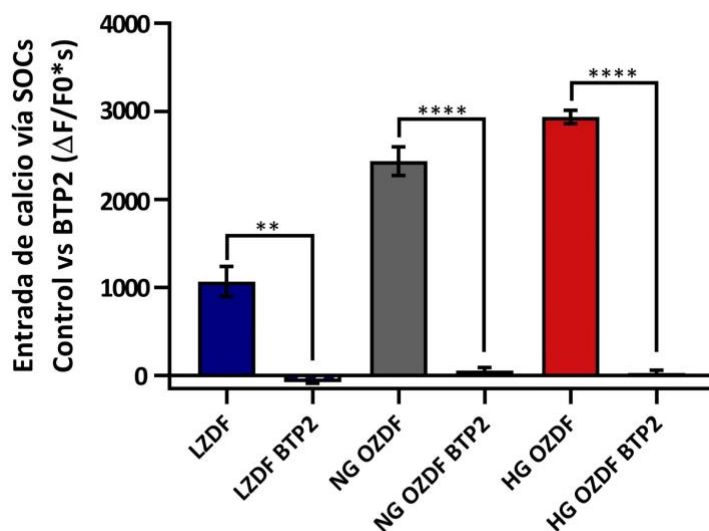


Figura 20. Área bajo la curva. Comparación del ingreso total de calcio desde el espacio extracelular hacia el citosol a través de los SOCs, tras el vaciamiento de los almacenes intracelulares, entre los grupos control contra los que se aplicó el bloqueador BTP2. Se evidencian cambios significativos entre los dos protocolos, habiendo un bloqueo de la SOCE en un 100% en el grupo LZDF, un 97.68% en el grupo NG OZDF y un 98.98% en el grupo HG OZDF. Se restó el valor de fluorescencia basal correspondiente a cada condición. (** $p = 0.0076$; **** $p = <0.0001$)

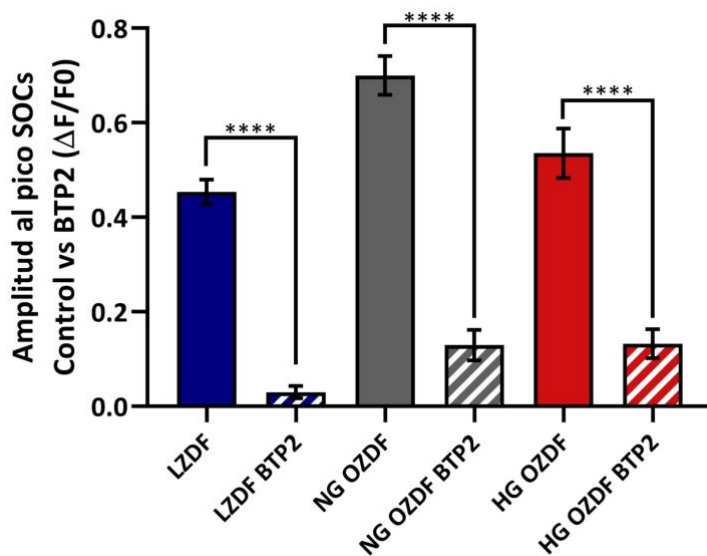


Figura 21. Amplitud al pico. Comparación de la concentración máxima de calcio alcanzada por el ingreso de este ion a través de los SOCs en FiCs controles contra FiCs tratados con BTP2. Existe una diferencia de un 93.40% entre el grupo LZDF y LZDF BTP2; una disminución del 81.49% en la concentración de calcio alcanzada por el grupo NG OZDF BT2 contra NG OZDF; y un decremento del 75.28% del grupo HG OZDF BT2 contra su respectivo grupo control. (**** $p = <0.0001$)

Cuantificación de la expresión de STIM1 y Orai1 en tejido ventricular cardíaco

Una vez corroborada la expresión funcional de los SOCs en los fibroblastos cardíacos, procedimos a investigar si los cambios observados en el ingreso de calcio, corresponden con un cambio en la expresión de las proteínas que integran al canal, STIM1 y Orai1. Utilizamos la técnica de Western Blot (ver material y métodos) para la cuantificación de la expresión de las proteínas en los ventrículos cardíacos provenientes de cada uno de los grupos experimentales.

En la **Figura 22 y 23**, observamos la expresión relativa de la proteína STIM1 y Orai1, respectivamente, en los ventrículos cardíacos. Se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis para la medición estadística de la expresión de ambas proteínas. Los resultados muestran una tendencia al aumento en la expresión de ambas proteínas en el grupo NG OZDF (**Figuras 22 y 23**), lo que se correlaciona con los datos obtenidos en la medición de transitorios de calcio, donde tanto la concentración máxima (**Figura 14**) como el tiempo al pico (**Figura 16**) en la entrada de calcio vía SOCE es mayor en el mismo grupo experimental. Sin embargo, el cambio no es estadísticamente significativo.

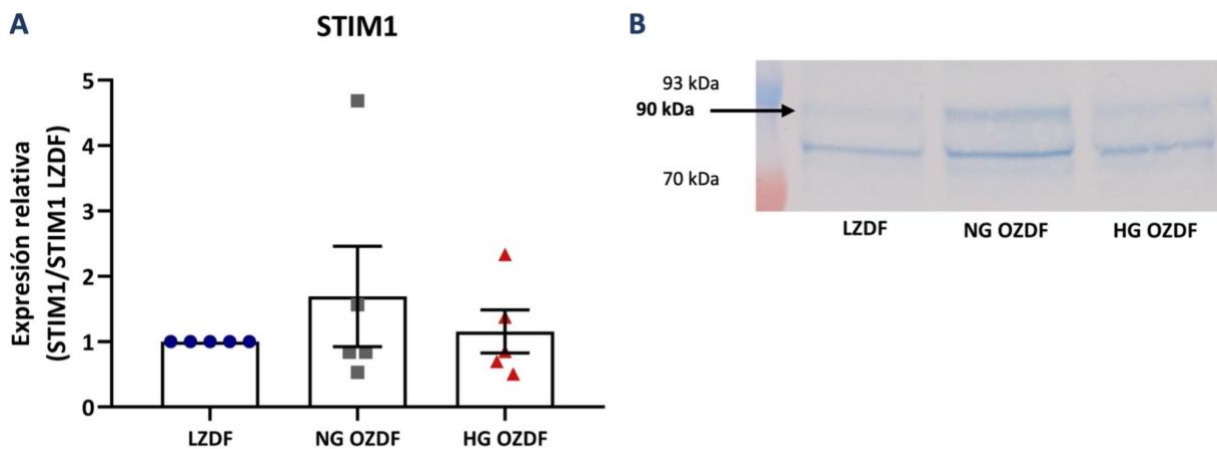


Figura 22. Cuantificación de expresión de proteína STIM1 en tejido cardíaco ventricular. A) Análisis densitométrico de la proteína STIM1. No se encontraron cambios significativos entre los grupos evaluados, sin embargo, se observa tendencia al incremento de esta proteína en el grupo NG OZDF. B) Membrana PVDF. Imagen representativa de una membrana PVDF tras el revelado para la proteína STIM1 en los tres grupos estudiados; en correlación con los datos obtenidos, se observa una banda más intensa en el grupo NG OZDF tras la inmunodetección a los 90 kDa (peso de la proteína). (LZDF: N=5; NG OZDF: N=5; HG OZDF: N=5). ($p \geq 0.05$)

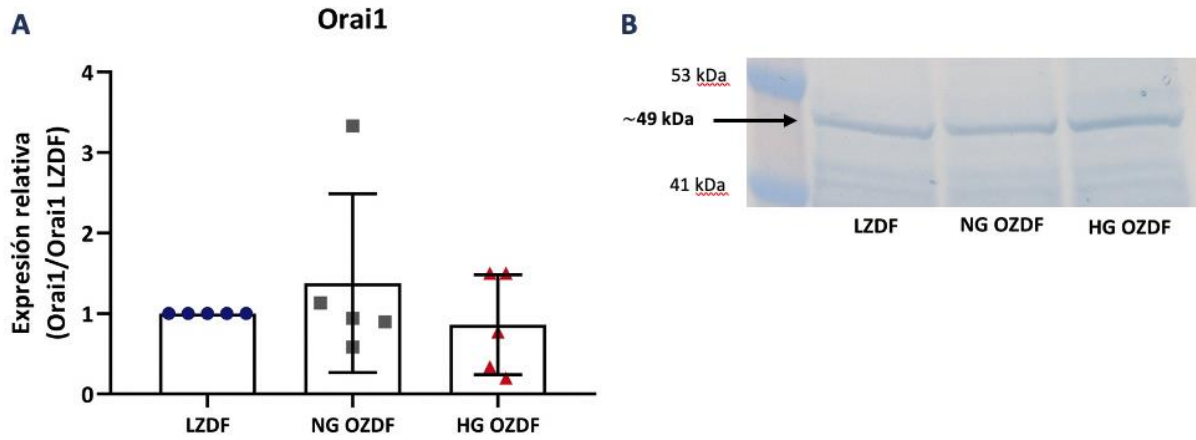


Figura 23. Cuantificación de expresión de proteína Orai1 en tejido cardíaco ventricular. A) Análisis densitométrico de la expresión de Orai1. No se encontraron cambios significativos entre los grupos evaluados, pero sí una tendencia al aumento en la expresión de Orai1 en el grupo NG OZDF. B) Membrana PVDF. Imagen representativa de una membrana de PVDF revelada, tras la inmunodetección para la proteína Orai1 en los tres grupos estudiados; se observa la banda correspondiente a la proteína en cada grupo, a los ~49 kDa. (LZDF: N=5; NG OZDF: N=5; HG OZDF: N=5). ($p \geq 0.05$)

Inmunodetección de STIM1 y Orai1 en tejido ventricular cardíaco

Si bien, no encontramos diferencia en la expresión de STIM y Orai en tejido cardíaco, hay que considerar que utilizamos un homogeneizado de ambos ventrículos y del septum cardíaco, lo cual pudiera, dada la gran heterogeneidad del corazón, provocar una subvaloración de la expresión de ambas proteínas. Considerando esto, decidimos realizar la inmunodetección de STIM1 y Orai1 por separado, en cada uno de los ventrículos del corazón. Para ello, seguimos el protocolo descrito en la sección de “Inmunohistoquímica enzimática” en el apartado de Material y Métodos.

En el caso de STIM1, podemos observar en las tinciones de las diferentes regiones del corazón, un claro aumento de la inmunoreactividad de la zona del epicardio hacia el endocardio en todos los grupos experimentales (**Figura 24 y 25**), con un claro incremento en la expresión en el tejido proveniente de las ratas HG OZDF (columna derecha en la **Figura 24**). Es importante mencionar que, cuando analizamos la expresión individual de las diferentes capas del tejido cardíaco ventricular, no hallamos diferencias significativas en la expresión al comparar entre regiones de un mismo grupo o de diferentes grupos experimentales (**Figura 25**), sin embargo, si consideramos la inmunoreactividad global de la pared libre del ventrículo izquierdo, se muestra una tendencia a incrementar la inmunoreactividad a STIM1 en el corazón de las ratas HG OZDF (**Figura 26**). Al realizar el mismo análisis en la pared libre del ventrículo derecho, encontramos una tendencia de aumento de la inmunoreactividad a STIM1 en las diferentes capas del ventrículo derecho del grupo NG OZDF (**Figura 27 y 28**), así como al comparar toda la pared libre ventricular contra el resto de los grupos (**Figura 29**), aunque sin cambios estadísticamente significativos.

Micrografía de STIM1 en ventrículo izquierdo

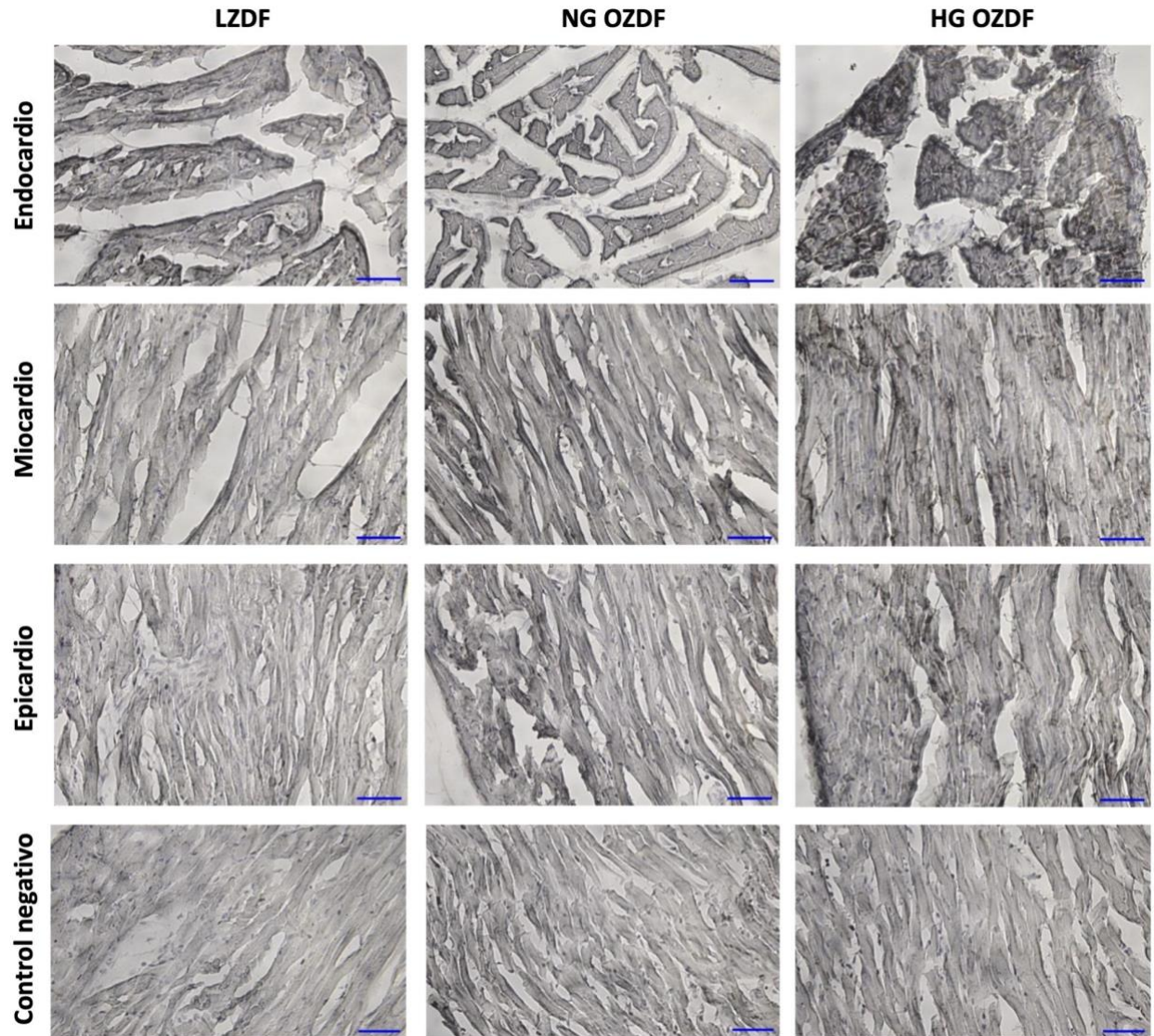


Figura 24. Imágenes de inmunodetección de la proteína STIM1 en epicardio, miocardio y endocardio de la pared libre del ventrículo izquierdo. Imágenes tomadas con un objetivo al 40x. La barra de escala corresponde a una medida de 50 μ m.

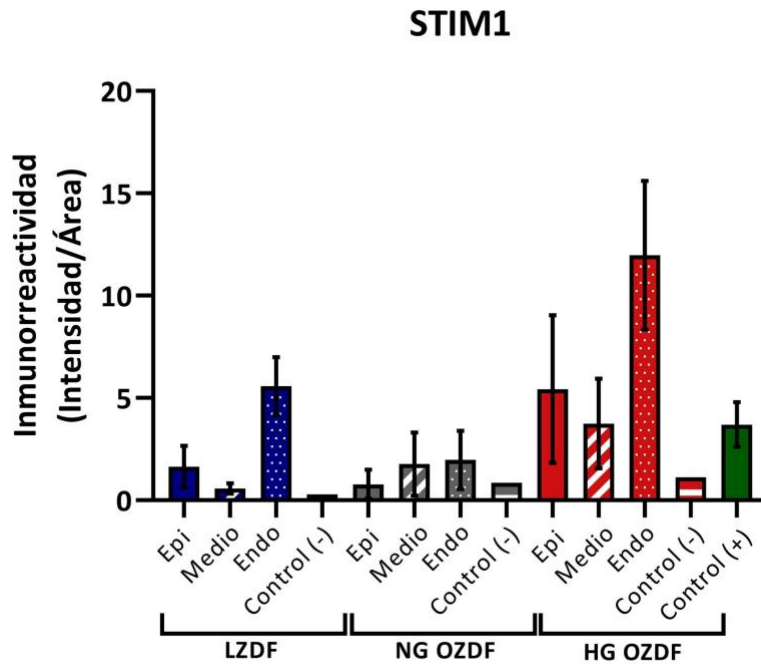


Figura 25. Inmunodetección de la proteína STIM1 en epicardio, miocardio y endocardio de la pared libre del ventrículo izquierdo. Se midió la expresión relativa de STIM1, mediante la inmunorreactividad para esta proteína en la pared libre del ventrículo izquierdo de cada grupo experimental. No se encuentran diferencias significativas, pero se observa una tendencia al alza en la localización de esta proteína en el endocardio de cada grupo estudiado. (LZDF: N=4; NG OZDF: N=4; HG OZDF: N=4; Cerebro: N=1). ($p \geq 0.05$)

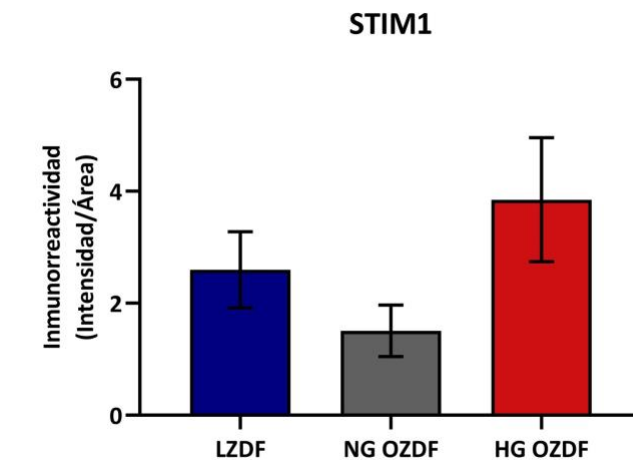


Figura 26. Inmunodetección de la proteína STIM1 en la pared libre del ventrículo izquierdo. Se analizó la inmunorreactividad global para STIM1 en las tres capas de la pared ventricular (endocardio, miocardio y epicardio) de cada grupo experimental. No se encuentran diferencias significativas, pero sí un aumento en la inmunorreactividad de STIM1 en el grupo HG OZDF, en comparación con los otros grupos estudiados. (NG OZDF vs HG OZDF: $p = 0.1758$)

Micrografía de STIM1 en ventrículo derecho

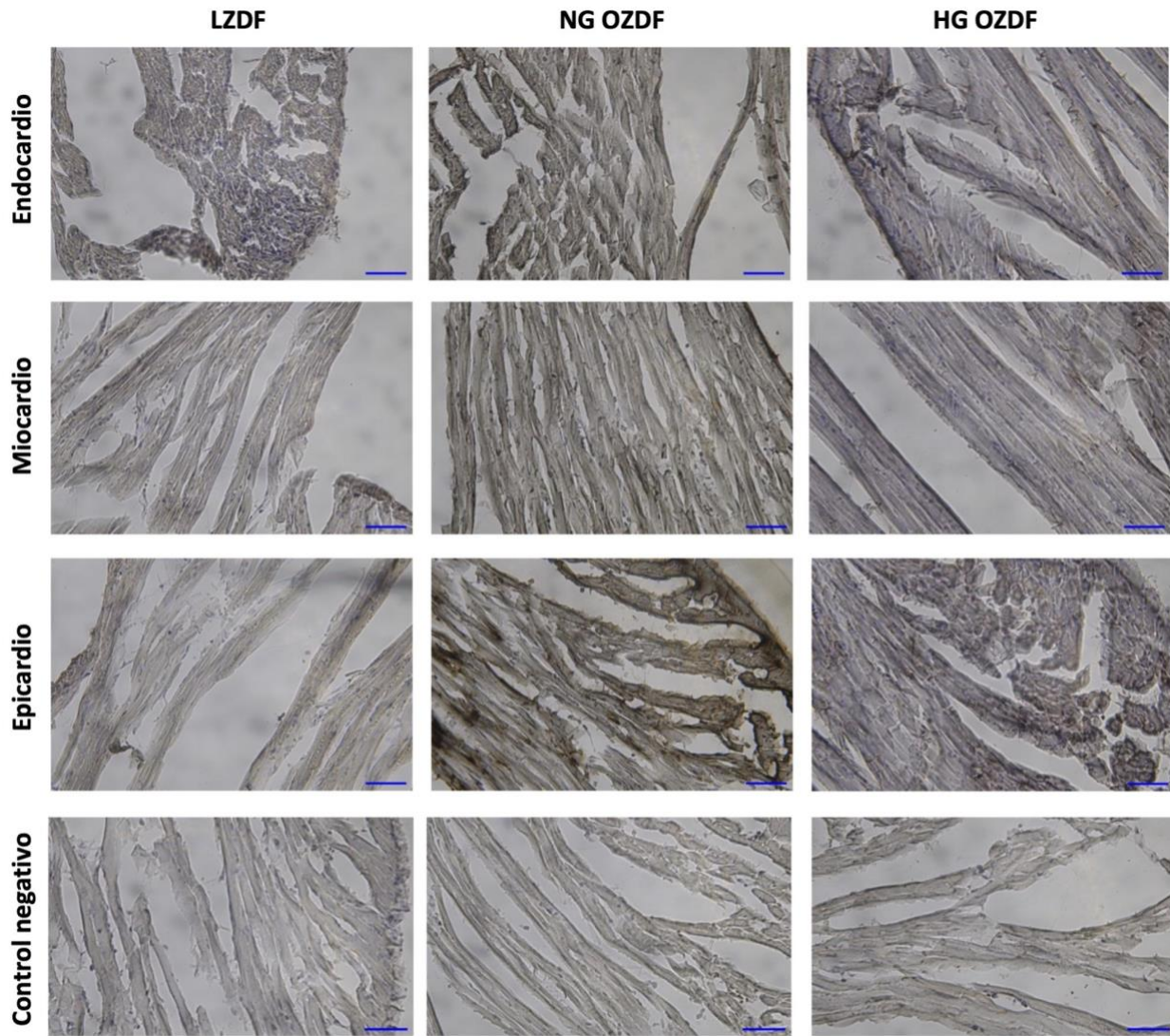


Figura 27. Imágenes de inmunodetección de la proteína STIM1 en epicardio, miocardio y endocardio de la pared libre del ventrículo derecho. Imágenes tomadas con un objetivo al 40x. La barra de escala corresponde a una medida de 50 μ m.

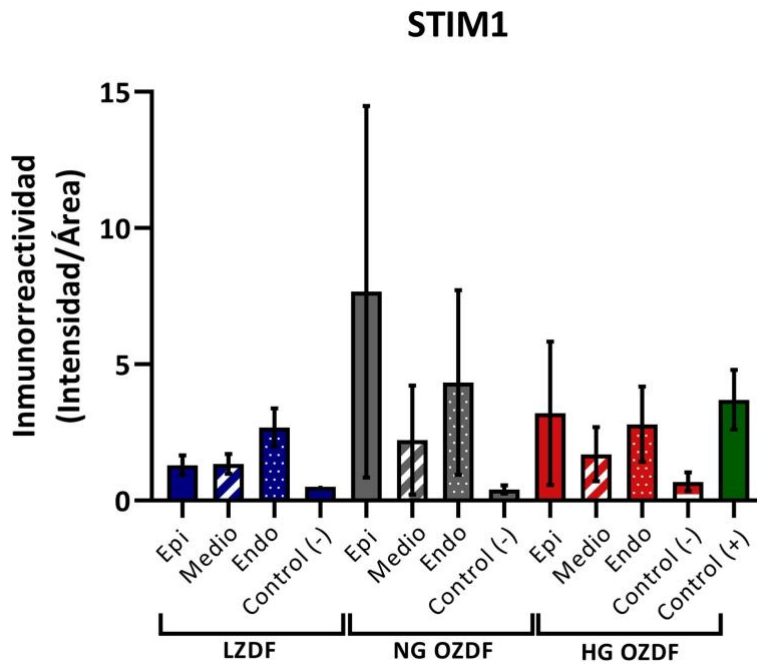


Figura 28. Inmunodetección de la proteína STIM1 en epicardio, miocardio y endocardio de la pared libre del ventrículo derecho. Se midió la expresión relativa de STIM1, mediante la inmunorreactividad para esta proteína en la pared libre del ventrículo derecho de cada grupo experimental. No se encuentran diferencias significativas, pero sí una tendencia al aumento de la expresión de esta proteína en el epicardio en los grupos NG OZDF y HG OZDF; con respecto al grupo LZDF. ($p \geq 0.05$)

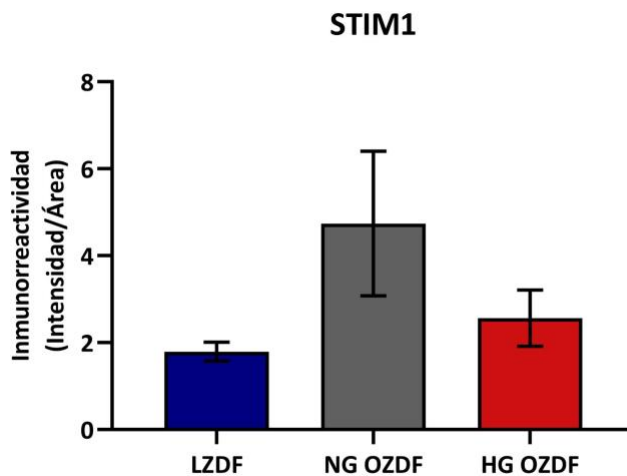


Figura 29. Inmunodetección de la proteína STIM1 en la pared libre del ventrículo derecho. Se realiza el análisis sumando las tres capas (endocardio, miocardio y epicardio) de cada grupo experimental. Se encuentra una tendencia al aumento de la expresión de esta proteína en el grupo NG OZDF, en comparación con los otros dos grupos. ($p \geq 0.05$)

Cuando analizamos la inmunorreactividad de la pared libre del ventrículo izquierdo a al anticuerpo dirigido contra Orai1, encontramos al igual que con STIM1, un patrón de incremento en la expresión de esta proteína desde el epicardio hacia el endocardio, en todos los grupos experimentales, lo cual se puede apreciar claramente en las fotografías (**Figura 30**), así como en las cuantificaciones de inmunoreactividad realizadas en cada región de la pared ventricular (**Figura 31**). Al cuantificar la inmunorreactividad global de la pared ventricular izquierda a Orai1, ésta fue mayor en el grupo HG OZDF, en prácticamente 3 veces en valor de los encontrado en el grupo LZDF (**Figura 32**). La inmunoreactividad de la rata NG OZDF, fue de un valor intermedio entre el grupo obeso hiperglicémico y el grupo delgado normoglicémico.

Micrografía de Orai1 en ventrículo izquierdo

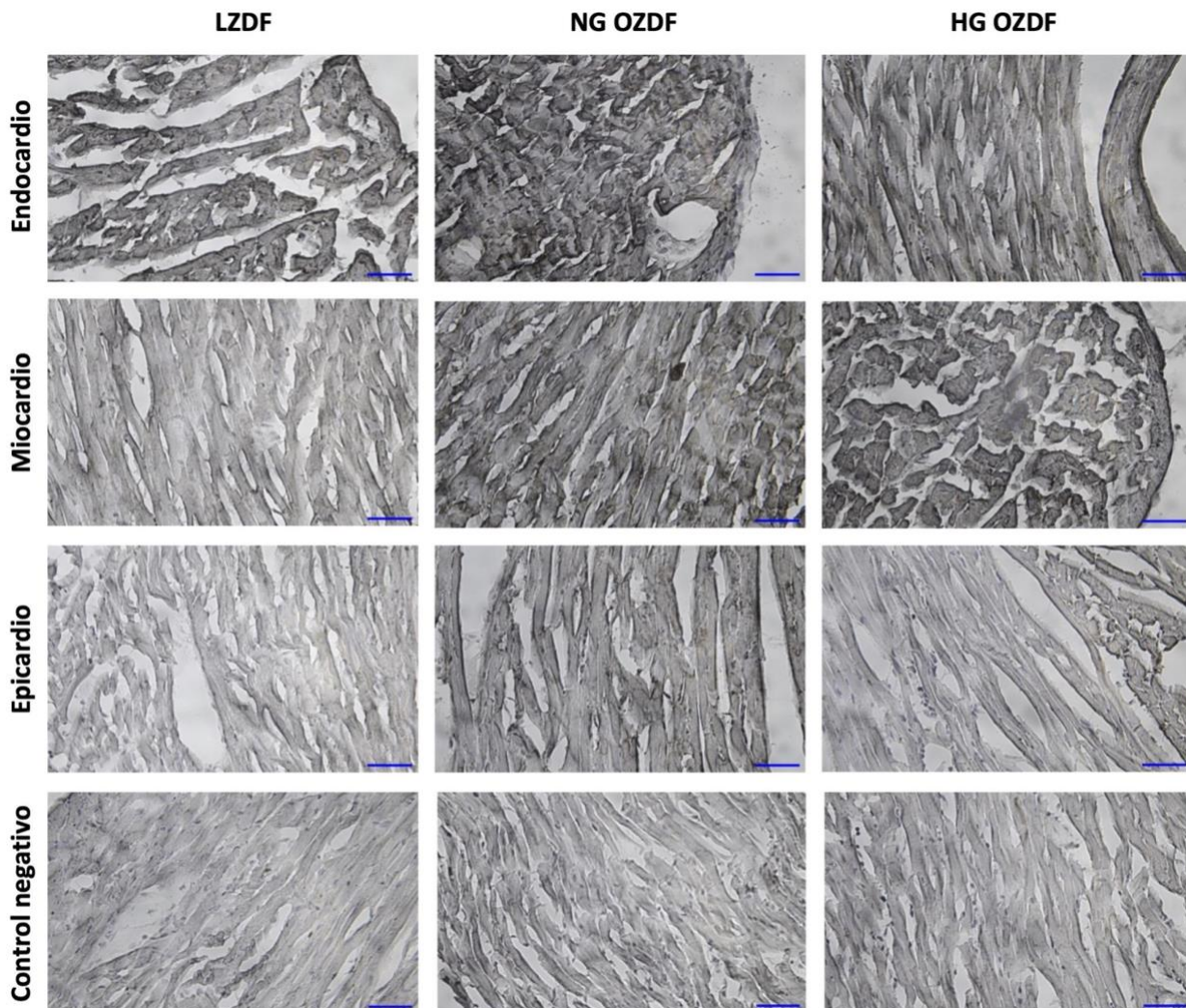


Figura 30. Imágenes de inmunodetección de la proteína Orai1 en epicardio, miocardio y endocardio de la pared libre del ventrículo izquierdo. Imágenes tomadas con un objetivo al 40x. La barra de escala corresponde a una medida de 50 μ m.

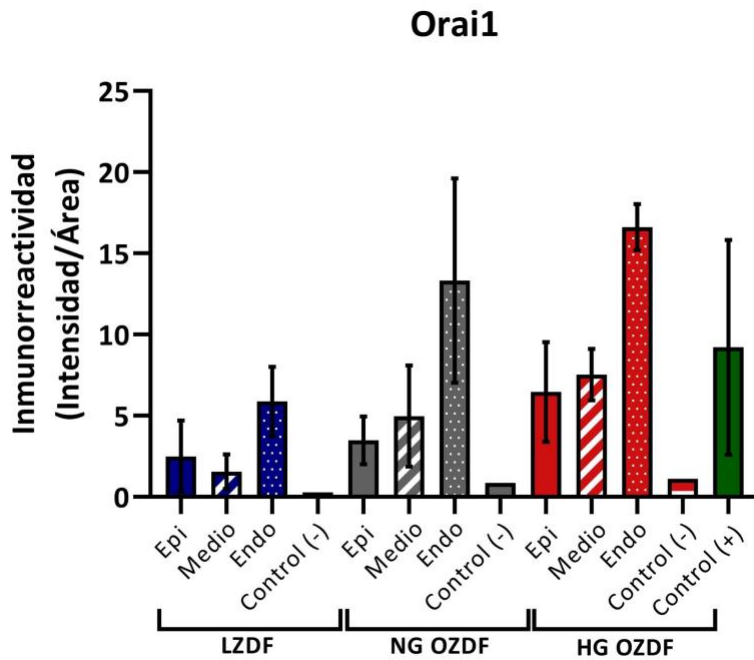


Figura 31. Inmunodetección de la proteína Orai1 en epicardio, miocardio y endocardio de la pared libre del ventrículo izquierdo. Se midió la expresión relativa de Orai1, mediante la inmunorreactividad para esta proteína en la pared libre del ventrículo izquierdo de cada grupo experimental. No se encuentran diferencias significativas, pero se observa una tendencia al alza en la localización de esta proteína en el endocardio de cada grupo estudiado. (LZDF: N=4; NG OZDF: N=4; HG OZDF: N=4; Cerebro: N=1). ($p \geq 0.05$)

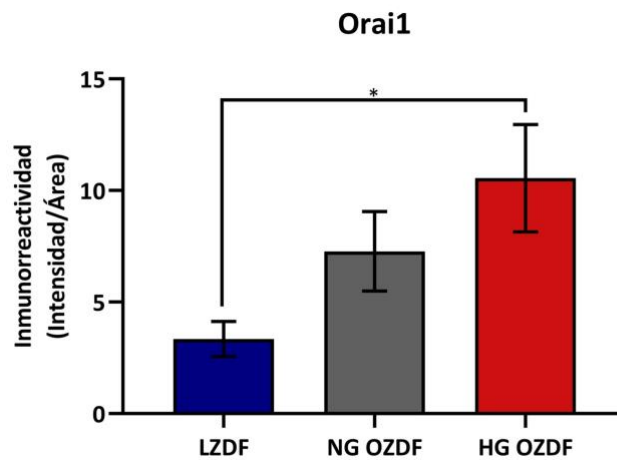


Figura 32. Inmunodetección de la proteína Orai1 en la pared libre del ventrículo izquierdo. Se realiza el análisis sumando las tres capas (endocardio, miocardio y epicardio) de cada grupo experimental. Se encontró un aumento significativo de la expresión de esta proteína en el grupo HG OZDF, en comparación con LZDF. (* $p = 0.0445$)

En el caso del ventrículo derecho, podemos observar en la **Figura 33**, que la inmunorreactividad es mucho más homogénea en las diferentes capas evaluadas, con una menor expresión en general en el grupo HG OZDF (**Figura 34**, barras rojas), lo cual se corrobora al cuantificar la expresión global del tejido en cada grupo experimental (**Figura 35**), donde se observa que la inmunorreactividad para Orai1 en el grupo HG OZDF, fue prácticamente la mitad de la encontrada en los grupos LZDF y NG OZDF.

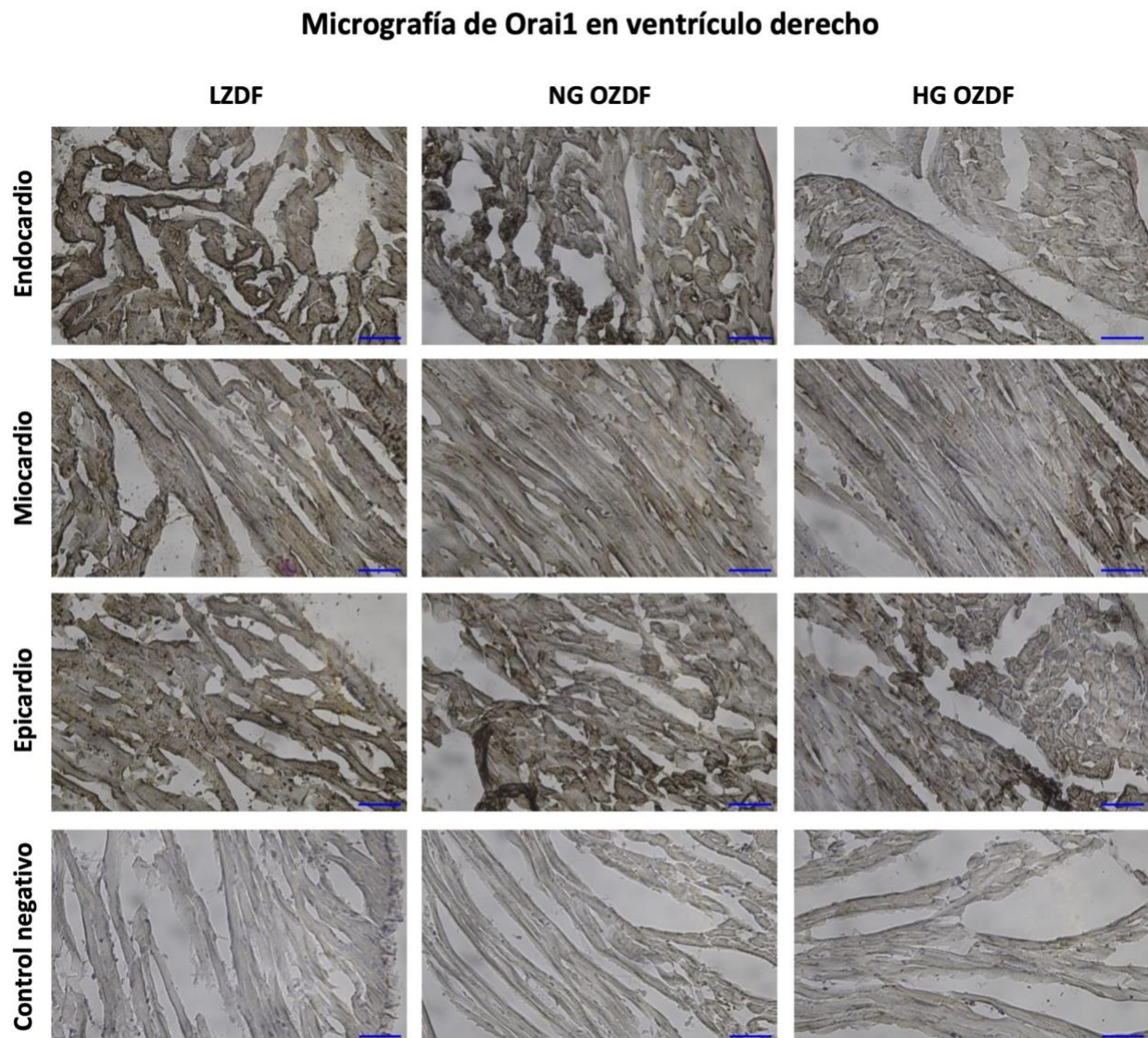


Figura 33. Imágenes de inmunodetección de la proteína Orai1 en epicardio, miocardio y endocardio de la pared libre del ventrículo derecho. Imágenes tomadas con un objetivo al 40x. La barra de escala corresponde a una medida de 50 μ m.

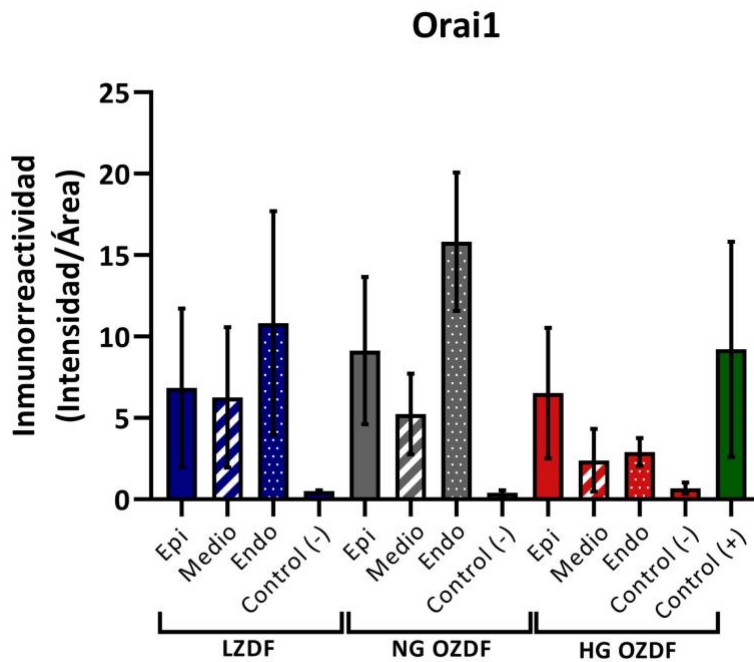


Figura 34. Inmunodetección de la proteína Orai1 en epicardio, miocardio y endocardio de la pared libre del ventrículo derecho. Se midió la expresión relativa de Orai1, mediante la inmunorreactividad para esta proteína en la pared libre del ventrículo derecho de cada grupo experimental. No se encuentran diferencias significativas, pero sí una tendencia al aumento en la expresión de Orai1 en el endocardio en los grupos LZDF y NG OZDF, en contraste con el grupo HG OZDF, donde el aumento se observa en el epicardio. ($p \geq 0.05$)

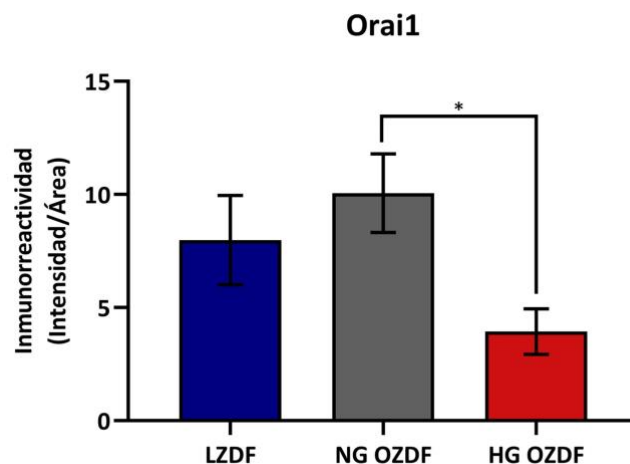


Figura 35. Inmunodetección de la proteína Orai1 en la pared libre del ventrículo derecho. Se realiza el análisis sumando las tres capas (endocardio, miocardio y epicardio) de cada grupo experimental. Se encuentran diferencias significativas entre el grupo NG OZDF y HG OZDF, siendo el segundo el que muestra menor inmunorreactividad hacia esta proteína. (* $p = 0.0171$)

Estado de activación de los fibroblastos cardíacos

Como mencionamos en la introducción de este trabajo, los fibroblastos cardíacos pueden presentar diferentes fenotipos en función de su estado de activación. En un esfuerzo por determinar con qué tipo de fibroblastos estuvimos trabajando, realizamos la tinción de los filamentos de actina para determinar la formación de las fibras de estrés en los FiCs provenientes de las ratas de cada grupo experimental. Para determinar si los fibroblastos se encontraban ya en un estado activado, incubamos los cultivos con Ang II, un agonista profibrótico. Posteriormente evaluamos el área de las células (tamaño), la intensidad de expresión (cantidad de fibras) y la coherencia (alineación) de las fibras de actina en los FiCs. En la **Figura 36**, podemos observar inicialmente, que los FiCs provenientes de la rata HG OZDF presentan una morfología mucho más regular y compacta que los de las ratas NG OZDF y LZDF.

Micrografía de filamentos de actina en fibroblastos cardíacos

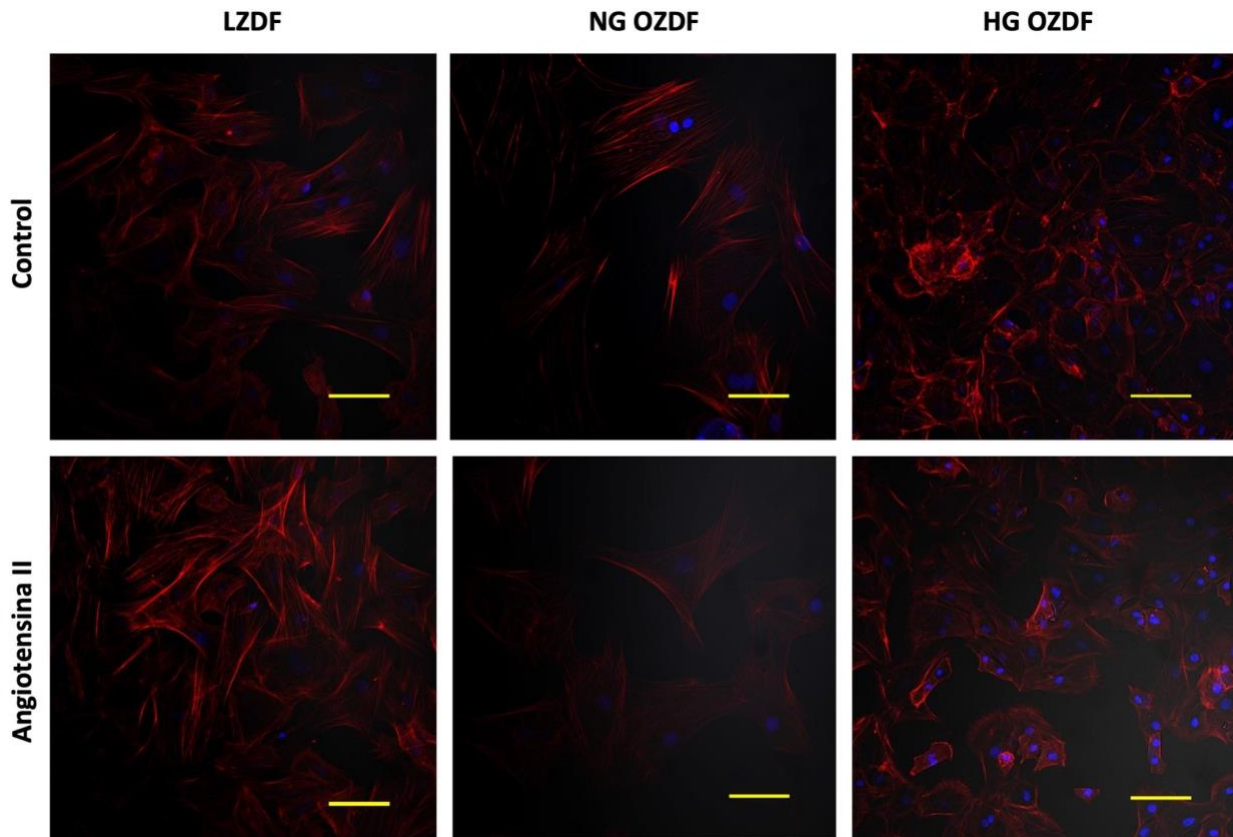


Figura 36. Imágenes de inmunocitoquímica de FiCs con faloidina. En color rojo se muestran las fibras de actina y en color azul los núcleos celulares. Imágenes tomadas con un objetivo al 20x. La barra de escala corresponde a una medida de 100 μm .

En la **Figura 36**, se observa que los FiCs de las ratas NG OZDF, son los que menos intensidad de marca presentan, seguidos por los de las ratas LZDF y terminando con los FiCs de las ratas HG OZDF. En la **Figura 37** se expone cuantitativamente la relación de tamaño (área) entre los FiCs de cada grupo estudiado, mismos que se correlacionan con las imágenes correspondientes a la **Figura 36**; el grupo HG OZDF es menor en tamaño en un 32% que el grupo LZDF, mientras que el grupo NG tiene un área en promedio un 48% más que el grupo control, y en un 118% más que el grupo HG OZDF, aproximadamente. Es importante mencionar, que el análisis estadístico no reveló diferencias entre los grupos con y sin tratamiento con Ang II, lo cual nos indica, que los fibroblastos con los que trabajamos son fibroblastos en estado activado. (Fu et al., 2018)

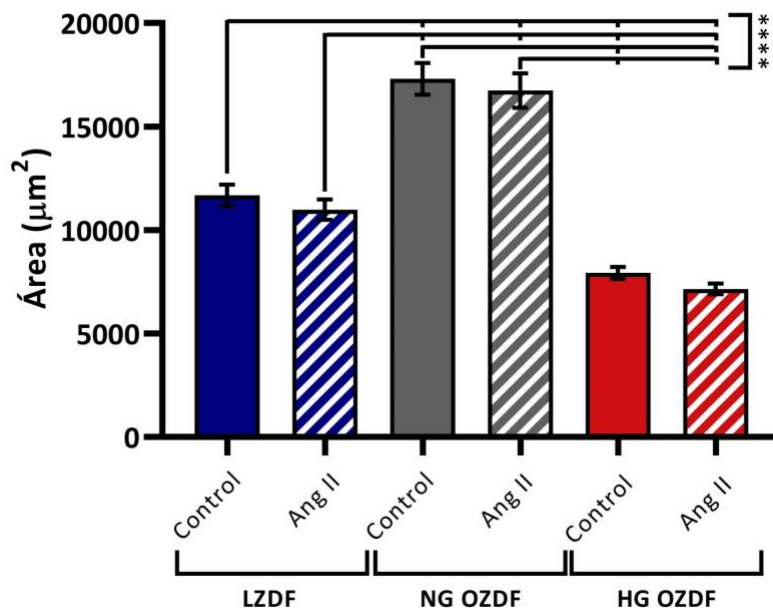


Figura 37. Tamaño de FiCs. Se encuentran cambios significativos entre cada condición con cualquiera de un grupo distinto. (**** $p = <0.0001$) (LZDF: N=3, n=672; NG OZDF: N=3, n=404; HG OZDF: N=3, n=534)

Para realizar un análisis cuantitativo de la expresión de fibras de estrés, medimos la intensidad de la tinción en cada área de estudio. Así, al analizar la intensidad de marcaje por unidad de área, encontramos que los FiCs de las ratas HG OZDF son los que mayor cantidad de fibras de estrés presentan, seguidos por el grupo LZDF y teniendo al grupo NG OZDF, como el que menos fibras expresan (**Figura 38**).

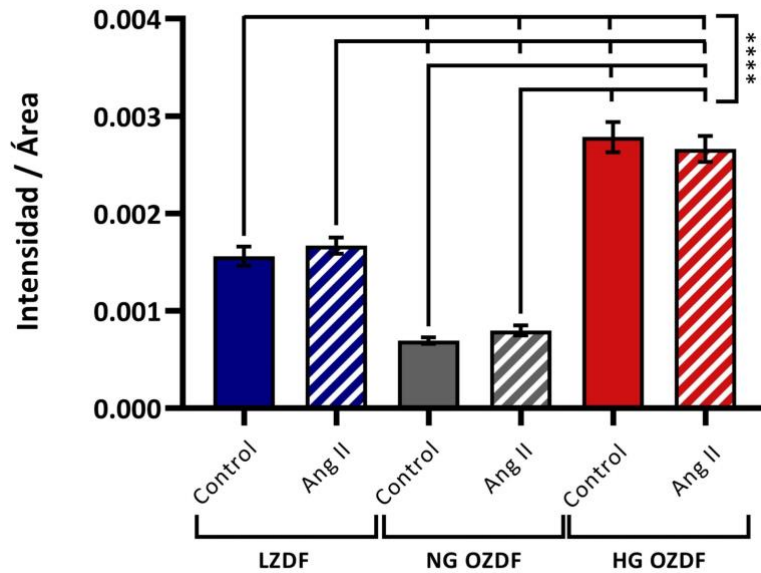


Figura 38. Intensidad de la señal de fibras de α -SMA por unidad de área en FICs control y tratados con angiotensina II. Se encuentran cambios significativos entre cada condición con cualquiera de un grupo distinto. (**** $p = <0.0001$)

De manera interesante, al evaluar qué tan alineadas se encontraban la fibras de α -SMA en cada uno de los fibroblastos provenientes de los grupos experimentales, encontramos que el tratamiento con Ang II, no modifica la tasa de alineamiento, y si bien, hay diferencias entre las condiciones controles de cada grupo experimental, en general, el cociente de alineación se encuentra alrededor del 0.5 (**Figura 39**), lo cual se podría explicar en función de la morfología de los fibroblastos cardíacos y al hecho de que no presenten un eje mayor preponderante.

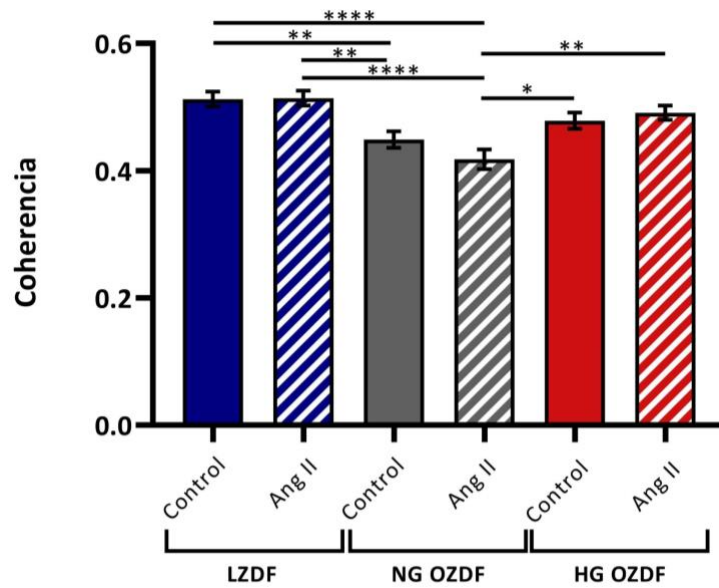


Figura 39. Tasa de alineación de fibras de α -SMA en FiCs. Existen cambios significativos entre los grupos LZDF y HG OZDF contra NG OZDF, siendo este último el que genera menor alineación en las fibras de sus células. (* $p=0.0326$; ** $p= <0.0042$; **** $p= <0.0001$)

Al correlacionar las 3 variables, encontramos que el rango de tamaño de los fibroblastos varía grandemente entre los 5000 y los 60000 μm^2 . Sin embargo, independientemente del tamaño, el grado de alineación entre fibras no cambia (coherencia) y en el caso del incremento en la intensidad de las fibras en los FiCs de HG OZDF y la disminución en el área de las NG OZDF, se deben al aumento o disminución en la dispersión de los datos (**Figura 40**).

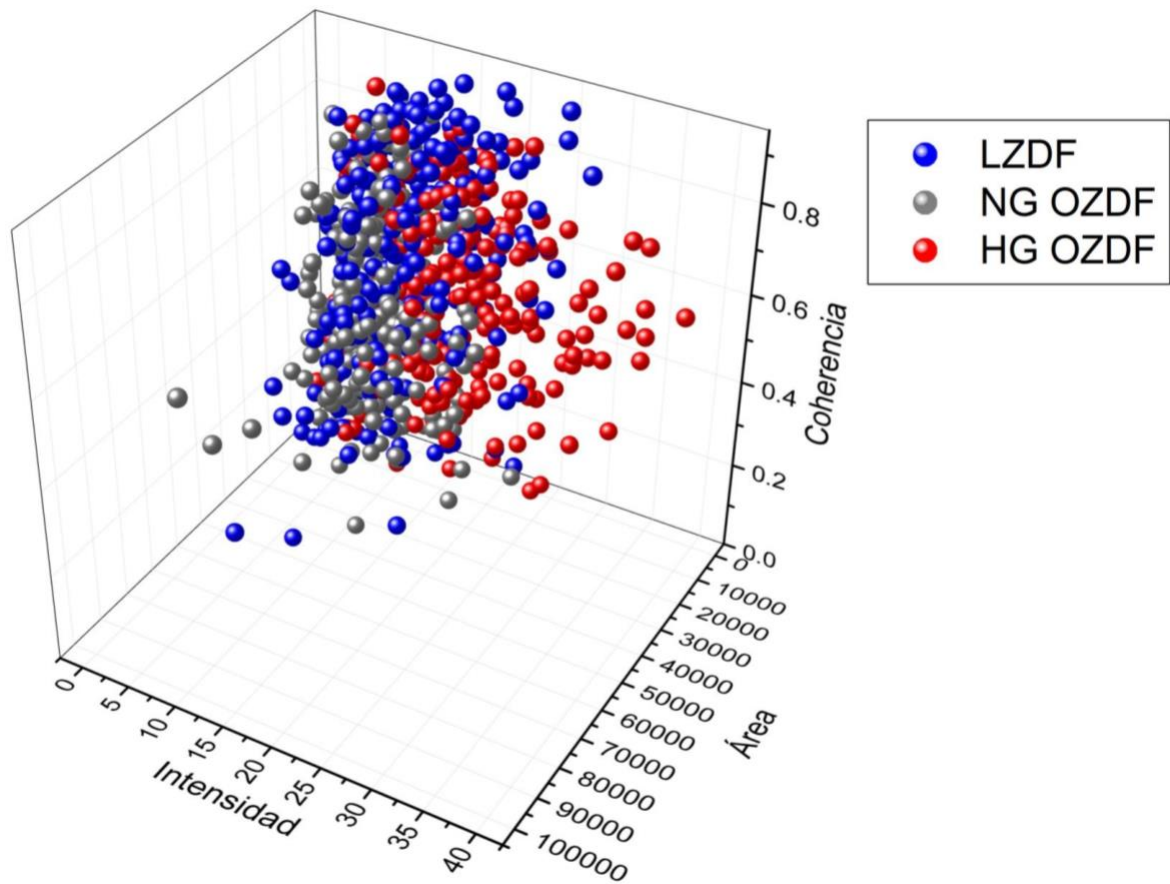


Figura 40. Correlación entre alineación, cantidad de fibras y tamaño celular de FiCs. En el gráfico se observa cómo el grupo NG OZDF presenta un gran tamaño, pero con poca cantidad y alineación de fibras α -SMA en comparación al grupo HG OZDF, el cual presenta un tamaño reducido, pero con gran cantidad y alineación de fibras de estrés.

Discusión

En este trabajo utilizamos un biomodelo de obesidad y diabetes, la rata ZDF. Esta presenta una etiología similar a la del humano para el desarrollo de diabetes. En edades tempranas, este biomodelo se caracteriza porque todas las ratas son delgadas, pero conforme se van desarrollando, las ratas homocigotas para la mutación del gen del receptor de leptina (fa/fa) comienzan a ganar peso, presentando obesidad a la quinta semana de nacimiento. Posteriormente, a la duodécima semana, algunas de las ratas que presentan obesidad, desarrollan resistencia a la insulina y eventualmente diabetes tipo II. (Schach et al., 2019) Por lo tanto, en nuestro trabajo subdividimos a las ratas obesas, en normoglicémicas e hiperglicémicas, en función a los resultados de la curva de tolerancia a la glucosa y sus características morfométricas (**Figuras 41 y 42 apartados A, B, C y D**); lo que nos permite comparar el efecto de la obesidad (NG OZDF) o el de la diabetes (HG OZDF) con respecto a uno de peso normal y normoglicémico (LZDF, heterocigoto (fa/+)) para la mutación del gen del receptor de leptina).

La obesidad, la resistencia a la insulina, hipertensión arterial y las dislipidemias, son un conjunto de distintas desregulaciones del metabolismo, las cuales pueden conformar a lo que conocemos como síndrome metabólico y este a su vez, se correlaciona con un alto riesgo de desarrollo de diabetes tipo 2 y patologías cardiovasculares. (Fahed et al., 2022) El síndrome metabólico puede estar presente en sujetos sin importar su peso, por lo que se pueden clasificar a los individuos en obesos o delgados (con base a su índice de masa corporal: IMC 30 kg/m^2 obesidad; IMC de $18.5\text{-}24.9 \text{ kg/m}^2$ se considera como un peso normal) (Ler et al., 2023), y metabólicamente sanos o no sanos, con base a estudios antropométricos como el porcentaje de grasa corporal, la circunferencia de cintura, el cociente cintura-cadera, entre otros; además de parámetros bioquímicos como la glucosa en sangre, hemoglobina glicosilada, colesterol total, lipoproteínas de muy baja, baja y alta densidad, triglicéridos, etc. (Treviño et al., 2022) Lo anterior cobra importancia ya que al trabajar con el modelo de ratas ZDF, y subdivididas en los tres grupos antes mencionados, puede hacer alusión a la población delgada u obesa, metabólicamente sana o no sana y correlacionar los hallazgos encontrados con patologías cardiovasculares en este tipo de población.

La obesidad es una patología donde existe un estado inflamatorio crónico de bajo grado, produciendo citocinas proinflamatorias a través del tejido adiposo; el aumento en la producción de estas, contribuye a que exista un proceso de remodelación patológica, el cual presenta un aumento en la síntesis de matriz extracelular, implicando a los fibroblastos cardíacos en este proceso y favoreciendo a la hipertrofia e insuficiencia cardíaca. (Abel, Litwin & Sweeney, 2008) La obesidad es un factor de riesgo para desarrollar resistencia a la insulina (OMS, 2021) y esta a su vez, para el desarrollo de diabetes tipo 2. (Alpert et al., 2018) La diabetes es un estado de hiperglicemia la cual tiene la capacidad de activar a fibroblastos cardíacos a través de la vía del TGF- β , la cual es dependiente del calcio. (Frangogiannis, 2021)

El corazón está conformado por distintos tipos celulares, siendo los cardiomiocitos los más estudiados, debido a su importante trabajo de generar la actividad eléctrica y mecánica del corazón (Ross et al., 2017; Cendula et al., 2021); sin embargo, los fibroblastos representan el 75% de las células totales del corazón (Xing et al., 2023), siendo el grupo celular más abundante en este órgano. Su función es distinta a la de los cardiomiocitos, lo cual no disminuye su importancia, al ser los encargados de sintetizar la matriz extracelular: un medio en el cual los cardiomiocitos se encuentran embebidos y por donde difunden distintos factores químicos que pueden alterar su funcionamiento, y que además ayuda a formar y mantener la estructura cardíaca. Como se ha mencionado anteriormente, los fibroblastos pueden sustituir a los cardiomiocitos dañados tras una condición de estrés, con fines reparativos, cambiando su fenotipo a miofibroblastos y suplir, parcialmente, la actividad contráctil de los miocitos cardíacos. (Sorrell & Caplan, 2009; Ross et al., 2017; Turner & Blythe, 2019; Kurose, 2021) Sin embargo, si este proceso continúa, se establece un estado patológico en donde la activación de los fibroblastos puede concluir en la diferenciación a miofibroblastos y posteriormente a matrifibroblastos, promoviendo la formación de cicatrices o procesos fibróticos. (Fu et al., 2018; Han & Zhou, 2022)

Para que se dé el proceso de diferenciación en los fibroblastos a través de las vías como la del TGF- β y la de la Ang II/AT1, es necesario un aumento en la concentración de calcio intracelular; esto permite no sólo la activación de los fibroblastos, sino también el incremento de la síntesis de MEC y la producción de citocinas y factores de crecimiento proinflamatorios.

(Frangogiannis, 2021; Kurose, 2021; Han & Zhou, 2022) Una de las principales vías de entrada de calcio en células no excitables, como lo son los fibroblastos cardíacos, es la entrada de calcio operada por almacenes (SOCE, por sus siglas en inglés) (Roach & Branding, 2019); por lo que decidimos estudiar esta vía en los fibroblastos cardíacos, teniendo como referencia las fluctuaciones de su expresión durante las etapas de desarrollo cardíaco, donde las proteínas STIM1 y Orai1 se expresan durante la etapa fetal, disminuyendo en la etapa postnatal y desapareciendo en la etapa adulta, hasta que vuelven a ser expresados en estados patológicos, como lo es la insuficiencia cardíaca. (Rosenberg et al., 2021)

Existen tres mecanismos principales para la evaluación de SOCE: la primera es monitoreando, mediante sondas fluorescentes, los niveles de calcio intracelular; la segunda es a través de estudios de electrofisiología, en las que se miden las corrientes de calcio, al igual que con la técnica de fluorescencia, después de vaciar el retículo endoplásmico; y la tercera es evaluando la translocación del factor de transcripción NFAT hacia el núcleo, como consecuencia de la activación de SOCE, vía calcineurina, la proteína de unión al calcio. (Sweeney et al., 2009)

Para este trabajo, decidimos utilizar la medición de calcio intracelular como técnica para la evaluación de SOCE, por la facilidad en la técnica e infraestructura disponible. Para lograrlo, implementamos el protocolo de “Capacidad de almacenamiento del RE y SOCE” (ver en Material y Métodos), por el cual se midió la capacidad de almacenamiento del retículo endoplásmico en cada uno de los grupos estudiados. No se encontró variación ni en el total, ni en la concentración máxima de calcio alcanzada por la salida de este ion desde el RE en ninguno de los grupos estudiados (**Figura 10**). Aun cuando no se mostraron diferencias en los resultados anteriores, sí hubo cambios significativos en la cinética de liberación y recaptura/extrusión de calcio, donde el grupo HG OZDF alcanza tanto la concentración máxima de calcio, como el 37% de decaimiento de su valor máximo en menos tiempo, con respecto a los otros dos grupos.

Al evaluar la entrada de calcio operada por almacenes, es evidente el aumento del ingreso de calcio por esta vía en los grupos obesos, en comparación con el delgado. Esto concuerda con lo expuesto por Ross y colaboradores (2017), donde encontraron un aumento en la entrada de calcio por esta vía en fibroblastos cardíacos humanos con insuficiencia cardíaca grado III y IV,

en comparación con fibroblastos cardíacos humanos sanos. En este trabajo, la comparación es entre grupos con un estado inflamatorio crónico de bajo grado y factores de riesgo para desarrollar enfermedades cardiovasculares (NG OZDF y HG OZDF), con uno sano (LZDF). Aunque cuando los dos grupos obesos tienen mayor entrada de calcio por esta vía, el grupo normoglicémico alcanza una concentración mayor, en comparación con el hiperglicémico, y además le toma más tiempo llegar a la concentración máxima de calcio vía SOCE. Mientras que el grupo hiperglicémico alcanza un 7.14% más calcio ingresado por esta vía, que el grupo normoglicémico. Asimismo, el trabajo demuestra que, durante la entrada de calcio operada por almacenes, el grupo LZDF, interpretándose como el grupo control, presenta menos entrada de calcio por esta vía, además de tener una cinética más rápida al alcanzar la concentración máxima de calcio vía SOCE y, el decaimiento de la misma, en comparación con los grupos obesos. Esto contrasta con lo encontrado por Schach y colaboradores (2020) donde observaron una disminución en la expresión de SOCE, relacionado con un decremento en la expresión de Orai1 en ratas HG OZDF en comparación con ratas LZDF en arterias mesentéricas pequeñas.

Por lo que respecta a la especificidad del bloqueador de la SOCE, existen diferentes moléculas que se han probado. Algunas de las que más se ha extendido su uso son el 2-APB y el BTP2. De estas moléculas, el BTP2 se ha probado que es altamente específico para el bloqueo de la I_{CRAC} , como también se le conoce a la SOCE cuando se evalúa por electrofisiología, con una IC_{50} para SOCE de $0.59\mu M$ (Zitt et al., 2004; Schleifer et al., 2012) En este trabajo se hizo uso del bloqueador BTP2, teniendo como resultado un bloqueo casi total de la SOCE (**Figuras 19-21**) en los grupos estudiados.

Al evaluar la expresión de STIM1 y Orai1 en tejido ventricular cardíaco, con la técnica de Western Blot, encontramos concordancia con lo hallado funcionalmente en los fibroblastos cardíacos, donde la expresión de estas proteínas tiende a ser mayor en el grupo obeso normoglicémico, aunque no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos. Esto pudiera deberse a que, aunque los fibroblastos son las células más abundantes en el corazón (Ross et al., 2017), los cardiomiocitos son quienes ocupan la mayor cantidad de volumen en este órgano (Han & Zhou, 2022); lo que da pie a que la correlación entre lo hallado funcionalmente en fibroblastos cardíacos, no se correlacione directamente con lo encontrado en la expresión de

proteínas en tejido ventricular cardíaco. De igual manera se debe considerar que el corazón, al ser un órgano altamente diferenciado, muestra gradientes de expresión de epicardio a endocardio y entre las distintas cámaras cardíacas; por ello, el efecto de cada cámara o capa del corazón podría ser diferente entre ellos y tener como resultado cambios no significativos, como en el análisis de expresión de Western Blot realizado con tejido homogeneizado de septum y paredes ventriculares del biomodelo antes descrito.

Sin embargo, a través de inmunohistoquímica en tejido ventricular, se encontró que Orai1 cuenta con mayor presencia en la pared ventricular derecha en el grupo obeso normoglicémico, y en la pared ventricular izquierda en el grupo obeso hiperglicémico. El aumento en la expresión de Orai1, ha sido relacionada con la familia de transcripción NFAT, y esta a su vez con la regulación de la patogénesis y progresión tanto de enfermedades inflamatorias, diabetes (Nieto-Felipe et al., 2023) y vías activadoras de la hipertrofia cardíaca (Aronsen et al., 2016). Nuestros hallazgos también concuerdan con lo expuesto por Ross y colaboradores (2017) donde se muestra un aumento evidente en la expresión de los canales Orai1 en ventrículos con insuficiencia cardíaca, sin cambios en la expresión de STIM1; concluyendo en que el aumento en la secreción de colágeno en los individuos con insuficiencia cardíaca puede deberse por regulación al alza de la SOCE, asociado a un aumento en la expresión de Orai1. De igual manera, en un estudio realizado en ratones deficientes de Orai1, se encontró que estos mostraron una pérdida de función y mayor dilatación ventricular en menor tiempo, en comparación con el grupo control, tras ser sometidos a una constricción aórtica transversa; lo que derivó en aquellos ratones deficientes de Orai1, en insuficiencia cardíaca y muerte temprana. (Horton et al., 2014) De igual manera, Zhang y colaboradores (2016) encontraron que el aumento en la expresión de STIM1 y Orai1 en ratas adultas tratadas con Ang II (profibrótico), tiene correlación con la participación de estas dos proteínas en el proceso fibrogénico. Los estudios anteriores contrastan con lo encontrado por Cendula y colaboradores (2019), quienes hallaron un aumento en la expresión de STIM1 y una disminución en la expresión de Orai1 en tejido de ventrículo izquierdo de corazones humanos con insuficiencia cardíaca, en comparación con tejidos sanos. (Cendula et al., 2019).

También es importante destacar que STIM1 es una molécula que tiene la capacidad de

desencadenar distintas vías, al unirse con diferentes canales y moléculas (TRPCs, PLB, EB1, etc) además de Orai (Rosenberg et al., 2021), por lo que un aumento en la expresión de esta molécula, no necesariamente se relaciona de manera directa con la entrada de calcio operada por almacenes intracelulares. Por otro lado, el papel de Orai es únicamente la formación del poro altamente selectivo a calcio, encontrando así una relación directa entre la expresión y funcionalidad de esta proteína, con la SOCE.

En una serie de experimentos, utilizamos faloidina para teñir los filamentos de α -SMA en fibroblastos cardíacos, con el fin de determinar el estado de activación de estas células. Encontramos al medir el área de los fibroblastos, que, aunque presentan un mayor tamaño, las ratas NG OZDF tienen menor intensidad y alineación entre fibras; contrario al grupo HG OZDF, los cuales presentan el menor tamaño de los tres grupos estudiados, pero la mayor intensidad y alineación entre sus fibras y por último las LZDF, tienen tamaño e intensidad intermedia, en comparación con los grupos obesos, pero exhiben mayor alineación entre sus fibras.

La α -SMA es uno de los marcadores de mayor relevancia para la diferenciación de fibroblastos a su estado activado, los miofibroblastos (Fu et al., 2018); de hecho, los fibroblastos inactivos o residentes, no expresan α -SMA, ni secretan MEC a gran escala (Xing et al., 2023); y la expresión de fibras de estrés aumentan durante la etapa aguda de un proceso patológico o de lesión. (Cendula et al., 2021)

Con base a los resultados obtenidos, donde no hubo cambios entre los fibroblastos tratados con Ang II (agonista profibrótico) y los controles, comprendimos que trabajamos con miofibroblastos, al haber expresión de α -SMA en los dos casos de los tres grupos estudiados. Las razones pueden ser multifactoriales, sin embargo, Santiago y colaboradores (2010) realizaron un estudio donde evaluaron la expresión de marcadores de diferenciación en cultivo de fibroblastos cardíacos, así como proteínas del complejo de unión (adhesiones focales), desde el pasaje 0 al pasaje 3; teniendo como resultado un aumento en la expresión de α -SMA y Smem, así como del colágeno tipo I, receptores para TGF- β y de las proteínas de unión focal: paxalina, vinculina, tensina y ED-A fibronectina. Estos cambios fueron claros desde el pasaje 1 y aumentaban conforme seguían los pasajes posteriores. Al haber trabajado con pasaje 1, este

estudio puede sustentar una de las razones por las cuales se presentaron fibras de estrés (α -SMA) en los grupos controles.

Es importante mencionar que una de las limitaciones en este estudio es que trabajamos con un cultivo primario de fibroblastos cardíacos, obtenidos de una misma cepa de ratas con distintas características genotípicas y fenotípicas; y aunque se ha demostrado que el cultivo de fibroblastos provenientes de corazones con diferentes patologías, muestran distintas características fenotípicas (Zhang et al., 2022), el cultivo celular sigue siendo una técnica en donde las células se desarrollan en un ambiente sin sus principales factores de regulación y sin la interacción con otras células presentes en el ambiente in-vivo, como en este caso los fibroblastos lo tendrían con cardiomiocitos y células endoteliales. Como se describió previamente, trabajamos con fibroblastos activados y, por lo tanto, estaríamos subvalorando el efecto proinflamatorio que podría suponer la obesidad y la hiperglicemia; esto queda claro en los experimentos donde se detectaron fibras de estrés en presencia y ausencia de Ang II como factor profibrótico.

Finalmente, con la evidencia mostrada en este trabajo se expone el aumento en la entrada de calcio operada por almacenes intracelulares en fibroblastos cardíacos y este aumento se asocia con una mayor expresión de la proteína formadora de poro, Orai1, en tejido ventricular de los grupos NG y HG OZDF. La regulación al alza de la SOCE encontrada en este trabajo, se correlaciona con la mediación de procesos fibrogénicos precedentes a patologías como la hipertrofia, insuficiencia y fibrosis cardíaca, en individuos con obesidad y diabetes tipo 2.

Conclusiones

- No existe variación significativa en la capacidad de almacenamiento del retículo endoplásmico de fibroblastos cardíacos, ni en la concentración máxima de calcio alcanzada por la salida de este ion desde el retículo endoplásmico entre los tres grupos estudiados, a pesar de que existen cambios en la cinética de liberación y recaptura del ion en las ratas HG OZDF, en comparación con los otros dos grupos estudiados.
- La entrada de calcio operada por almacenes intracelulares aumenta en los grupos obesos, aunque la cinética de los canales SOCs es más lenta en el grupo normoglicémico en comparación con el hiperglicémico y el grupo control.
- La expresión de Orai1 incrementó en el tejido ventricular de las ratas obesas (normo e hiperglicémicas), lo que corresponde con la tendencia al aumento en la expresión STIM1 en el mismo tejido, y el aumento funcional de la SOCE.

Anexos

Gráficos de modelo experimental

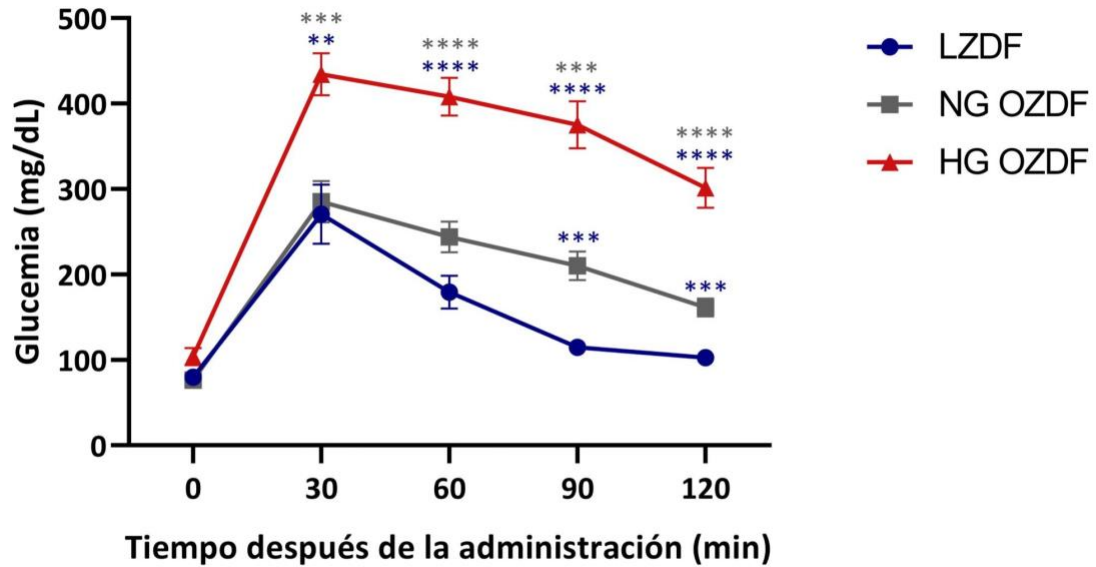


Figura 41. Curva de tolerancia a la glucosa. Curva promedio de tolerancia a la glucosa de los tres grupos estudiados, donde se observa un aumento pronunciado en el grupo obeso hiperglicémico, terminando la prueba a los 120 minutos con valores superiores a los 200 mg/dL de glucosa en sangre, confirmando su estado hiperglicémico. (** $p = 0.0021$; *** $p = <0.0006$; **** $p = <0.0001$) (LZDF: N=15; NG OZDF: N=15; HG OZDF: N=15)

Se usó ANOVA de dos vías y el test de comparación múltiple de Tukey para el análisis estadístico de la curva de tolerancia a la glucosa. A los 120 minutos, el grupo HG OZDF tuvo un promedio de 297.92 mg/dl de glucosa en sangre, lo que es 139.7 mg/dl más que el grupo NG OZDF y 198.5 mg/dl más que LZDF.

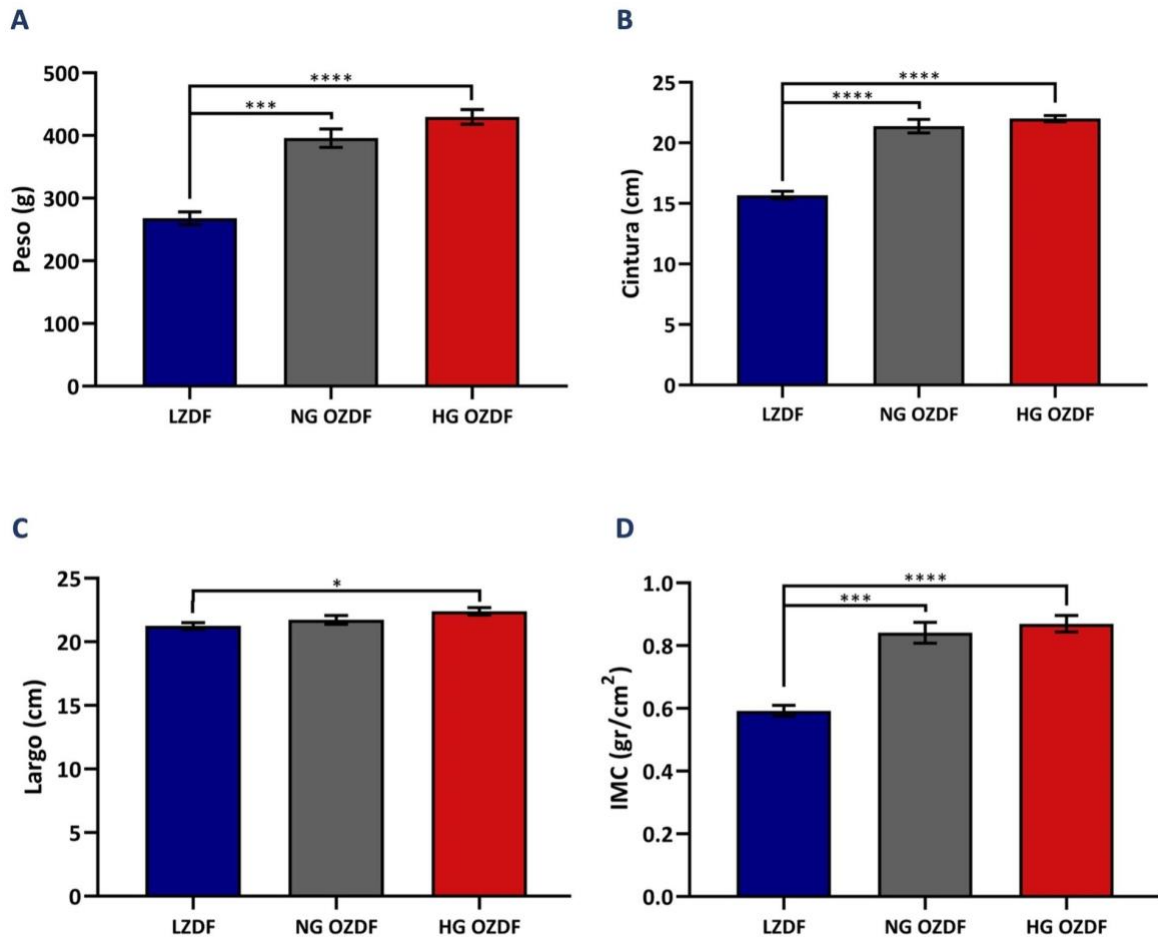


Figura 42. A) **Peso**. Se observan cambios significativos entre los grupos obesos y el delgado, donde grupo NG OZDF es mayor en un 32.33%, lo que se traduce en 128.03 gramos de diferencia con el grupo LZDF, mientras que el grupo HG OZDF presenta un aumento del 38.15% o en promedio 165.31 gramos contra el grupo delgado. (** $p = 0.0003$; **** $p < 0.0001$) B) **Medición de cintura**. Existe una diferencia promedio de 5.71 cm entre el grupo NG OZDF con respecto al LZDF, y de 6.4 cm del grupo HG OZDF respecto al LZDF. (**** $p < 0.0001$) C) **Medición de largo hocico-ano**. Hubo una variación significativa de 1.1 cm de diferencia entre el grupo obeso hiperglicémico y el delgado. (* $p = 0.0102$). (LZDF: N=15; NG OZDF: N=15; HG OZDF: N=15). D) **Índice de Masa Corporal (IMC)**. Relación peso (gr)/largo (cm²), donde se observa una clara diferencia entre los grupos delgados y obesos. (** $p = 0.0001$; **** $p < 0.0001$)

Para el análisis estadístico se usó la prueba de Kruskal Wallis con el test de comparación múltiple de Dunn.

Soluciones

Solución Tyrode (pH 7.38)		
	[mM]	PM (g/mol)
NaCl	140	58.44
KCl	5.4	74.55
MgCl ₂	1	1M
Na ₂ HPO ₄	1	141.96
HEPES	10	238.3
Glucosa	10	180.16
CaCl ₂	1	1M
Para solución Tyrode libre de calcio, no se agrega CaCl ₂ .		

SEN: Solución Extracelular Normal (pH 7.4)		
	[mM]	PM (g/mol)
NaCl	136	58.44
KCl	4	74.55
MgCl ₂	1	1M
HEPES	10	238.3
CaCl ₂	1.8	1M
Glucosa	11	180.16

SEN 0 Ca ²⁺ : Solución Extracelular Normal libre de calcio (pH 7.4)		
	[mM]	PM (g/mol)
NaCl	136	58.44
KCl	4	74.55
MgCl ₂	1	1M
HEPES	10	238.3
Glucosa	11	180.16
EGTA	0.5	380.35

PBS: buffer de fosfatos (pH 7.4)		
	[mM]	PM (g/mol)
NaCl	137	58.44
KCl	2.7	74.55
Na ₂ HPO ₄	10	141.96
KH ₂ PO ₄	1.8	136.086

Bibliografía

- Abel, E. D., Litwin, S. E., & Sweeney, G. (2008). Cardiac Remodeling in Obesity. *Physiol Rev.* 88(2), 389-419. DOI: 10.1152/physrev.00017.2007.
- Alpert, M. A., Karthikeyan, K., Abdullah, O., & Ghadban, R. (2018). Obesity and Cardiac Remodeling in Adults: Mechanisms and Clinical Implications. *Progress in Cardiovascular Diseases.* 61(2), 114-123. DOI: 10.1016/j.pcad.2018.07.012.
- Aronsen, J. M., Louch, W. E., & Sjaastad, I. (2016). Cardiomyocyte Ca²⁺ dynamics: clinical perspectives. *Scandinavian Cardiovascular Journal;* 50(2), 65-77. DOI: 10.3109/14017431.2015.1136079.
- Bers, D. M. (2008) Calcium Cycling and Signaling in Cardiac Myocytes. *Rev. Physiol.* 70:23-49. DOI: 10.1146/annurev.physiol.70.113006.100455.
- Blancas-Flores, G., Almanza-Pérez J. C., López-Roa, R. I., Alarcón-Aguilar, F. J., García-Macedo, R., & Cruz, M. (2009). La obesidad como un proceso inflamatorio. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 67; 88-97.
- Bootman, M. D., & Rietdorf, K. (2017). Tissue Specificity: Store-Operated Ca²⁺ Entry in Cardiac Myocytes. Groschner, K., Graier, W. F., & Romanin, C (Eds.), *Store-Operated Ca²⁺ Entry (SOCE) Pathways* (pp. 363-388). Springer.
- Carbone, S., Lavie, C. J., Elagizi, A., Arena, R., & Ventura, H. O. (2020). The Impact of Obesity in Heart Failure. *Heart Failure Clin.* 16, 71-80. DOI: 10.1016/j.hfc.2019.08.008.
- Cendula, R., Dragún, M., Gazová, A., Kyselovic, J., Hulman, M., & Mátus, M. (2019). Changes in STIM Isoforms Expression and Gender-Specific Alterations in Orai Expression in Human Heart Failure. *Physiological Research*, 68, S165-S172. DOI: 10.33549/physiolres.934300.
- Cendula, R., Chomanicova, N., Adamickova, A., Gazova, A., Kyselovic, J., & Matus, M. (2021). Altered Expression of ORAI1 and STIM1 Isoforms in Activated Human Cardiac Fibroblasts. *Physiol. Res. (Suppl. 1)*, S21-S30. DOI: 10.33549/physiolres.934771.
- Chen, J., Tao, R., Sun, H., Tse, H., Lau, C., & Li, G. (2010). Multiple Ca²⁺ Signaling Pathways Regulate Intracellular Ca²⁺ Activity in Human Cardiac Fibroblasts. *Journal of Cellular Physiology.* 223, 68-75.

- Colagiuri, S. (2021). Definition and Classification of Diabetes and Prediabetes and Emerging Data on Phenotypes. *Endocrinology and Metabolism Clinics*. 50 (3), 319-336. DOI: 10.1016/j.ecl.2021.06.004.
- Dillmann, W. H. (2019). Diabetic Cardiomyopathy: What is it and can it be fixed?. *Circ. Res.* 124(8), 1160-1162. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.118.314665.
- Eisner, D A., Caldwell, J L., Kistamás, K., & Trafford, A. (2017). Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. *American Heart Association*. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310230.
- Fahed, G., Aoun, L., Zerdan, M.B., Allam, S., Zerdan, M.B., Bouferraa, Y., & Assi, H. I. (2022). Metabolic Syndrome: Updates on Pathophysiology and Management in 2021. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 786. DOI: 10.3390/ijms23020786.
- Falcón, D., Galeano-Otero, I., Calderón-Sánchez, E., Del Toro, R., Martín-Bórnez, M., Rosado, J A., Hmadcha, A., & Smani, T. (2019). TRP Channels: Current Perspectives in the Adverse Cardiac Remodeling. *Front. Physiol.* 10:159. DOI: 10.3389/fphys.2019.00159.
- Feng, J., Armillei, M. K., Yu, A. S., Liang, B. T., Runnels, L. W., & Yue, L. (2019). Ca²⁺ Signaling in Cardiac Fibroblasts and Fibrosis-Associated Heart Diseases. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* 6(34), 1-26. DOI: 10.3390/jcdd6040034.
- Frangogiannis, N. G. (2021). Cardiac fibrosis. *Cardiovascular Research*. 117; 1450-1488. DOI: 10.1093/cvr/cvaa324.
- Fu, X., Khalil, H., Kanisicak, O., Boyer, J. G., Vagnozzi, R. J., Maliken, B. D., Sargent, M. A., Prasad, V., Valiente-Alandi, I., Blaxall, B. C., & Molkentin, J. D. (2018). Specialized fibroblast differentiated states underlie scar formation in the infarcted mouse heart. *J Clin Invest.* 128(5), 2127-2143. DOI: 10.1172/JCI98215.
- Gammons, J., Trebak, M., Mancarella, S. (2021). Cardiac-specific deletion of Orai3 leads to severe dilated cardiomyopathy and heart failure in mice. *Journal of the American Heart Association*, 10(8), 1-22. DOI: 10.1161/JAHA.120.019486.
- Grabmayr, H., Romain, C., & Fahmer, M. (2021). STIM Proteins: An Ever-Expanding Family. *Int J Mol Sci.* 22(378), 1-18. DOI: 10.3390/ijms22010378.
- Guyton, A., & Hall, J. (2011). *Tratado de Fisiología Médica*. Barcelona, España: Editorial Elsevier.

- Han, M., & Zhou, B. (2022). Role of Cardiac Fibroblasts in Cardiac Injury and Repair. *Current Cardiology Reports*. 24; 295-304. DOI: 10.1007/s11886-022-01647-y
- Hoth, M., & Niemeyer, B. (2013). The neglected CRAC proteins: Orai2, Orai3, and STIM2. *Current Topics in Membranes*, 71, 237-271. DOI: 10.1016/B978-0-12-407870-3.00010-X.
- Hoth, M., & Penner, R. (1992). Depletion of intracellular stores activates a calcium current in mast cells. *Nature*. 355, 353-356. DOI:10.1038/355353a0.
- Hoth, M., & Penner, R. (1993). Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *The Journal of Physiology*. 465, 359-386. DOI: 10.1113/jphysiol.1993.sp019681
- Horton, J. S., Buckley, C. L., Alvarez, E. M., Schorlemmer, A., & Stokes, A. J. (2014). The calcium release-activated calcium channel Orai1 represents a crucial component in hypertrophic compensation and the development of dilated cardiomyopathy. *Channels*. 8(1): 35-48. DOI: 10.4161/chan.26581.
- Kar, P., Lin, Y-P., Bhardwaj, R., Tucker, C.J., Bird, G.S., Hediger, M.A., Monaco, C., Amin, N., & Parekh, A.B. (2021). The N terminus of Orai1 couples to the AKAP79 signaling complex to drive NFAT1 activation by local Ca²⁺ entry. *PNAS*. 118(19), 1-11. DOI: 10.1073/pnas.2012908118.
- Kawai, T., Autieri, M. V., & Scalia, R. (2021). Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *Am J Physiol Cell Physiol*. 320 (3), C-375-C391. DOI: 10.1152/ajpcell.00379.2020.
- Klabunde, R. (2012). *Cardiovascular Physiology Concepts*. Philadelphia, PA: Editorial Wolters Kluwer | Lippincott Williams & Wilkins.
- Knapp, M., Alansary, D., Poth, V., Förderer, K., Sommer, F., Zimmer, D., Schwarz, Y., Künzel, N., Kless, A., Machaca, K., Helms, V., Mühlhaus, T., Schroda, M., Lis, A., & Niemeyer, B. (2022). A longer isoform of STIM1 is a negative SOCE regulator but increases cAMP-modulate NFAT signaling. *EMBO reports*. 23(3), 1-20. DOI: 10.15252/embr.202153135.
- Kurose, H. (2021). Cardiac Fibrosis and Fibroblasts. *Cells*; 10, 1716. DOI: 10.3390/cells10071716.
- Ler, P., Ojalehto, E., Zhan, Y., Finkel, D., Aslan, A. K. D., & Karlsson, I. K. (2023). Conversions between metabolically unhealthy and healthy obesity from midlife to

late-life. *International Journal of Obesity*. 48: 433-436. DOI: 10.1038/s41366-023-01425-y.

- Liao, Y., Plummer, N. W., George, M. D., Abramowitz, J., Xi Zhu, M., & Birnbaumer, L. (2009). A role for Orai in TRPC-mediated Ca^{2+} entry suggests that TRPC: Orai complex may mediate store and receptor operated Ca^{2+} entry. *PNAS*. 9(106), 3202-3206. DOI: 10.1073/pnas.0813346106.
- Lilliu, E., Koenig, S., Koenig, X., & Frieden, M. (2021). Store-Operated Calcium Entry in Skeletal Muscle: What Makes It Different?. *Cells*. 10, 1-31. DOI: 10.3390/cells10092356.
- Luo, X., Hojayevev, B., Jiang, N., Wang, Z., Tandan, S., Rakalin, A., Rothermel, B., Gillette, T., & Hill, J. (2012). STIM1-dependent store-operated Ca^{2+} entry is required for pathological cardiac hypertrophy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 52(1), 136-147. DOI: 10.1038/s41569-020-0413-9.
- Luo, R., Gomez, A., Benitah, J., & Sabourin, J. (2020) Targeting Orai1-Mediated Store-Operated Ca^{2+} Entry in Heart Failure. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 1-10. DOI: 10.3389/fcell.2020.5861093.
- Miederer, A., Alansary, D., Schwär, G., Lee, P., Jung, M., Helms, V., & Niemeyer, B. (2015). A STIM2 splice variant negatively regulates store-operated calcium entry. *Nature Communications*, 6, 1-12. DOI: 10.1038/ncomms7899.
- Miyamoto, T., Zhang, L., Sekiguchi, A., Hadama, T., & Shimada, T. (2002) Structural differences in the cytoarchitecture and intercalated discs between the working myocardium and conduction system in the human heart. *Heart Vessels*. 16, 232-240. DOI: 10.1007/s003800200030.
- Nieto-Felipe, J., Macias-Diaz, A., Sanchez-Collado, J., Berna-Erro, A., Jardin, I., Salido, G. M., Lopez, J. J., & Rosado, J. A. (2023). Role of Orai-family channels in the activation and regulation of transcriptional activity. *J Cell Physiol*. 238, 714-726. DOI: 10.1002/jcp.30971.
- OMS. (2021). *Obesidad y sobrepeso*. Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
- OMS. (2022) *Diabetes*. Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>.
- Paolillo, S., Marsico, F., Prastaro, M., Renga, F., Esposito, L., De Martino, F., Di Napoli, P., Esposito, I., Ambrosio, A., Ianniruberto, M., Mannella, R., Paolillo, R.,

- & Gargiulo, P. (2019). Diabetic Cardiomyopathy. Definition, Diagnosis, and Therapeutic Implications. *Heart Failure Clin.* DOI: 10.1016/j.hfc.2019.02.003.
- Park, C. Y., Shcheglovitov, A., & Dolmetsch, R. (2010). The CRAC Channel Activator STIM1 Binds and Inhibits L-Type Voltage-Gated Calcium Channels. *Science.* 330, 101-105.
 - Perni, S., Dynes, J. D., Yeromin, A. V., Cahalan, M. D., & Franzini-Armstrong, C. (2015). Nanoscale patterning of STIM1 and Orai1 during store-operated Ca²⁺ entry. *PNAS.* E5, 533-542. DOI: 10.1073/pnas.1515606112.
 - Porter, K.E., & Turner, N.A. (2009) Cardiac fibroblasts: At the heart of myocardial remodeling. *Pharmacology & Therapeutics.* 123: 255-278. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2009.05.002.
 - Putney, J W Jr. (1986). Identification of cellular activation mechanisms associated with salivary secretion. *Annu Rev Physiol.* 48, 75-88. DOI: 10.1146/annurev.ph.48.030186.000451
 - Ramesh, G., Jarzembowshki, L., Schwarz, Y., Poth, V., Konrad, M., Knapp, M., Schwär, G., Lauer, A., Grimm, M., Alansary, D., Bruns, D., & Niemeyer, B. (2021). A short isoform of STIM1 confers frequency-dependent synaptic enhancement. *Cell Reports,* 34(11), 1-19. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.108844.
 - Rana, A., Yen, M., Sadaghiani, A., Malmersjö, S., Park, C., Dolmetsch, R., & Lewis, R. (2015). Alternative splicing converts STIM2 from an activator to an inhibitor of store-operated calcium channels. *Journal of Cell Biology,* 209(5), 653-670. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112518>.
 - Roach, K.M., & Bradding, P. (2019). Ca²⁺ signalling in fibroblasts and the therapeutic potential of K_{Ca}3.1 channel blockers in fibrotic diseases. *Br J Pharmacol;* 177, 1003-1024. DOI: 10.1111/bph.14939.
 - Rosado, J., Diez, R., Smani, T., & Jardin, I. (2016). STIM and Orai1 variants in Store-Operated Calcium Entry. *Frontiers in Pharmacology.* 6, 1-9. DOI: 10.3389/fphar.2015.00325.
 - Rosenberg, P., Katz, D., & Bryson, V. (2019). SOCE and STIM1 signaling in the heart: Timing and location matter. *Cell Calcium,* 77, 20-28. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2018.11.008>.
 - Rosenberg, P., Zhang, H., Graham Bryson, V., & Wang, C. (2021). Soce in the cardiomyocyte: the secret is in the chambers. *European Journal of Physiology,* 473, 17-424. DOI: 10.1007/s00424-021-02540-3.

- Ross, G. R., Bajwa, T. J., Edwards, S., Emelyanova, L., Rizvi, F., Holmuhamedov, E. L., Werner, P., Downey, F. X., Jamil Tajik, A., & Jahangir, A. (2017). Enhanced store-operated Ca^{2+} influx and ORAI1 expression in ventricular fibroblasts from human failing heart. *Biology Open*. 6, 326-332. DOI: 10.1242/bio.022632.
- Santiago, J., Dangerfield, E.L., Rattan, S.G., Bathe, K.L., Cunnington, R.H., Raizman, J.E., Bedosky, K.M., Freed, D.H., Kardami, E., & Dixon, I.M.C. (2010) Cardiac fibroblast to myofibroblast differentiation in vivo and in vitro: Expression of focal adhesion components in neonatal and adult rat ventricular myofibroblasts. *Developmental Dynamics*. 239(6): 1573-1584. DOI: 10.1002/dvdy.22280.
- Saurav, S., Tanwar, J., Ahuja, K., & Motiani, R. (2021). Dysregulation of host cell calcium signaling during viral infections: Emerging paradigm with high clinical relevance. *Molecular Aspects of Medicine*, 81, 1-16. DOI: 10.1016/j.mam.2021.101004.
- Schach, C., Wester, M., Leibl, F., Redel, A., Gruber, M., Maier, L. S., Endemann, D., & Wagner, S. (2020). Reduced store-operated Ca^{2+} entry impairs mesenteric artery function in response to high external glucose in type 2 diabetic ZDF rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 47: 1145-1157.
- Schleifer, H., Doleschal, B., Lichtenegger, M., Oppenrieder, R., Derler, I., Frischauf, I, Glasnov, TN., Kappe, CO., Romanin, C., & Groshner, K. (2012). Novel pyrazole compounds for pharmacological discrimination between receptor-operated and store-operated Ca^{2+} entry pathways. *British Journal of Pharmacology*. 167: 1712-1722. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2012.02126.x
- Soboloff, J., Rothberg, B S., Muniswamy, M., & Gill, D L. (2012). STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 13(9): 549-565. DOI: 10.1038/nrm3414.
- Sorrell, J. M., & Caplan, A., I. (2009). Fibroblasts – A diverse population at the center of it all. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 276, 161-214. DOI: 10.1016/S1937-6448(09)76004-6.
- Sweeney, Z. K., Minatti, A., Button, D. C., & Patrick, S. (2009). Small-Molecule Inhibitors of Store-Operated Calcium Entry. *ChemMedChem*. 4: 706-718. DOI: 10.1002/cmdc.200800452.rom.
- Tallquist, M. D. (2020) Cardiac Fibroblast Diversity. *Annu. Rev. Physiol*; 82, 63-78. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021119-034527.

- Tiffner, A. & Derler, I. (2021). Isoform-Specific Properties of Orai Homologues in Activation, Downstream Signaling, Physiology and Pathophysiology. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 8020. DOI: 10.3390/ijms22158020.
- Treviño, S., Cortesano-Esteban, S., Hernández-Fragoso, H., Díaz, A., Vázquez-Roque, R., Sarmiento-Ortega, V. E., Moroni-González, D., Pelayo, R., & Brambila, E. (2022). Clinical monitored in subjects metabolically healthy and unhealthy before and during a SARS-CoV-2 infection- A cross-sectional study in Mexican population. *Cytokine*. 15(3). DOI: 10.1016/j.cyto.2022.155868.
- Turner, N. A., & Blythe, N. M. (2019). Cardiac Fibroblast p38 MAPK: A Critical regulator of Myocardial Remodeling. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*. 6 (27), 1-18. DOI: 10.3390/jcdd6030027.
- Vig, M., Peinelt, C., Beck, A., Koomoa, D., Rabah, D., Koblan-Huberson, M., Kraft, S., Turner, H., Fleig, A., Penner, R., & Kinet, J. (2006) CRACM1 is plasma membrane protein essential for store-operated Ca²⁺ entry. *Science*. 312(5777), 1220-1223. DOI: 10.1126/science.1127883.
- Voelkers, M., Salz, M., Herzog, N., Frank, D., Dolatabadi, N., Frey, N., Gude, N., Friedrich, O., Koch, W., Katus, H., Sussman, M., & Most, P. (2010) Orai1 and STIM1 Regulates Normal and Hypertrophic Growth in Cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 46(6), 1329-1334. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2010.01.020.
- Woodcock, E. A., & Matkovich, S. J. (2005). Cardiomyocytes structure, function and associated pathologies. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 37(9), 1746-1751. DOI: 10.1016/j.biocel.2005.04.011.
- Xing, C., Bao, L., Li, W., & Fan, H. (2023). Progress on role of ion channels of cardiac fibroblasts in fibrosis. *Front. Physiol.* 14:1138306. DOI: 10.3389/fphys.2023.1138306.
- Zhang, B., Jiang, J., Yue, Z., Liu, S., Ma, Y., Yu, N., Gao, Sun, S., Chen, S., & Liu, P. (2016). Store-Operated Ca²⁺ Entry (SOCE) contributes to angiotensin II-induced cardiac fibrosis in cardiac fibroblasts. *Journal of Pharmacological Sciences*. 132, 171-180. DOI: 10.1016/j.jpshs.2016.05.008.
- Zhang, Y., Van Laer, A.O., Baicu, C.F., Neff, L.S., Hoffman, S., Katz, M.R., et al. (2022) Phenotypic characterization of primary cardiac fibroblasts from patients with HFpEF. *PLoS ONE*. 17(1): e0262479. DOI: 10.1371/journal.pone.0262479.

- Zhou, Y., Cai, X., Nwokonko, R M., Loktionova, N A., Wang, Y., & Gill, D. (2017). The STIM-Orai coupling interface and gating of the ORai1 channel. *Cell Calcium*. 63, 8-13. DOI: 10.1016/j.ceca.2017.01.001.
- Zitt, C., Strauss, B., Schwarz, E. C., Spaeth, N., Rast, G., Hatzelmann, A., & Hoth, M. (2004). Potent Inhibition of Ca²⁺ Release-activated Ca²⁺ Channels and T-lymphocyte Activation by the Pyrazole Derivative BTP2. *The Journal of Biological Chemistry*. 279(13): 12427-12437. DOI: 10.1074/jbc.M309297200.