



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE MEDICINA
COMISIÓN DE ESTUDIOS DE POST-GRADO
POST-GRADO INDIVIDUALIZADO

**EFFECTO DEL CONSUMO DE DISTINTOS ACEITES EN LA
POTENCIACIÓN POST-REPOSO Y CALCIO
INTRACELULAR EN MIOCITOS AISLADOS DE RATAS
DIABÉTICAS**

Tesis que se presenta para optar al título de Doctora en Ciencias,
mención Bioquímica

Candelaria Alfonso Pérez

Negretti Sánchez Nilda Rosa

Caracas, Octubre 2012

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

VICERRECTORADO ACADÉMICO

SISTEMA DE INFORMACIÓN CIENTÍFICA, HUMANÍSTICA Y TECNOLÓGICA (SICHT)

FECHA: 21 de Octubre de 2012

**AUTORIZACIÓN PARA LA DIFUSIÓN ELECTRONICA DE LOS TRABAJOS DE TESIS DOCTORAL DE LA
UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA.**

Yo, Alfonso Pérez Candelaria, autor de la tesis: *Efecto del consumo de distintos aceites en la potenciación post-reposo y calcio intracelular en miocitos aislados de ratas diabéticas*

Presentado para optar: *Título de Doctora en Ciencias Mención Bioquímica*

Autorizo a la Universidad Central de Venezuela, a difundir la versión electrónica de este trabajo, a través de los servicios de información que ofrece la Institución, sólo con fines de académicos y de investigación, de acuerdo a lo previsto en la Ley sobre Derecho de Autor, Artículo 18, 23 y 42 (Gaceta Oficial Nº 4.638 Extraordinaria, 01-10-1993).

<input type="checkbox"/>	<i>Si autorizo</i>
<input type="checkbox"/>	<i>Autorizo después de 1 año</i>
<input type="checkbox"/>	<i>No autorizo</i>
<input checked="" type="checkbox"/>	<i>Autorizo difundir sólo algunas partes del trabajo</i>
<i>Indique:</i> <i>Resumen en español y en inglés</i>	



C.I. Nº V- 3.813198

candelaria.alfonso@ucv.ve

En Caracas, a los 21 días del mes de Octubre de 2012

Nota: En caso de no autorizarse la Escuela o Comisión de Estudios de Postgrado, publicará: la referencia bibliográfica, tabla de contenido (índice) y un resumen descriptivo, palabras clave y se indicará que el autor decidió no autorizar el acceso al documento a texto completo.

La cesión de derechos de difusión electrónica, no es cesión de los derechos de autor, porque este es intransferible.

Doctorado en Ciencias Mención Bioquímica

Tesista: MSc. Candelaria Alfonso Pérez

Miembros del Comité Académico del post-grado Individualizado

Tutora y coordinadora: Dra. Nilda Rosa Negretti Sánchez

Asesores: Dr. Vito Rodolfo Lamanna Nicolussi

Dr. Marco Antonio Álvarez Ochoa

Coordinador Comisión de Estudios de Posgrado

Dr. Luís Gaslonde

ÍNDICE

	Página
Índice	i
Abreviaturas y acrónimos	viii
Agradecimiento	xi
Resumen	xii
Capítulo I.- Introducción	1
I.1.- Planteamiento del problema.	2
I.2.- Justificación.	2
Capítulo II.- Marco teórico	4
II.1- Acoplamiento excitación-contracción del músculo cardiaco.	4
II.1.1.- La entrada de Ca^{2+} durante el potencial de acción cardiaco y el proceso de contracción.	4
II.1.2.- Disminución del calcio intracelular durante la relajación.	11
II.2.- Potenciación post-reposo.	12
II.3.- Los ácidos grasos.	16
II.4.- Músculo cardiaco y ácidos grasos.	19
II.5.- Efectos de la diabetes mellitus en el músculo cardiaco.	27
Capítulo III.- Procedimiento Experimental	47
III.1.- Animales y dieta.	47
III.2.- Preparación de la muestra para ensayo multicelulares.	48
III.3.- Aislamiento de los cardiomiocitos ventriculares.	50
III.4.- Procedimiento para la cuantificación de los ácidos grasos	52
III.5.- Medidas del calcio intracelular mediante el uso de Indo-1.	53
III.6.- Medida de la fluorescencia.	53
III.7.- Medida de la contracción de cardiomiocitos aislados.	55

III.8.- Análisis estadístico.	56
Capítulo IV.- Resultados y discusión.	57
IV.1.- Peso corporal y concentración de glicemia en plasma.	57
IV.2.- Análisis de los ácidos grasos en los aceites, en las dietas y en los cardiomiocitos.	59
IV.2.1.- Ácidos grasos contenidos en los aceites vegetales.	60
IV.2.2.- Ácidos grasos presentes en las dietas.	61
IV.2.3.- Ácidos grasos en los fosfolípidos de cardiomiocitos.	62
IV. 3.- Cinética de la Potenciación post-reposo en tiras de ventrículo derecho aislados de ratas no diabéticas y diabéticas con las diferentes dietas.	68
IV. 4.- Potenciación post reposo en cardiomiocitos aislados ratas no diabéticas y diabéticas con las diferentes dietas.	80
Capítulo V.- Conclusiones.	87
Referencias bibliográficas.	91

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 1.- Representación de un cardiomiocito, donde se muestran los movimientos del calcio, los receptores y canales iónicos involucrados en el acoplamiento excitación contracción.	6
Gráfico 2.- Distribución de los receptores beta adrenérgicos en la membrana plasmática de los cardiomiocitos de ratas adultas y en las caveolas.	7
Gráfico 3.- Modelo de simulación de una célula ventricular de mamífero, muestra las distintas corrientes y el flujo de Ca^{2+} en el RS.	8
Gráfico 4.- Receptor de rianodina: a) Proteínas de anclaje (Junctina y triadina) y la calsecuestrina (CSQ). b) Esquema tridimensional del receptor de rianodina y la disposición de las proteínas relacionadas con el ensamblaje del canal de RyR (FKBP12,6) y proteínas cinasas.	9
Gráfico 5.- Registro de fuerza de contracción que muestran la fuerza de contracción post-reposo con intervalo de 30 segundos, en músculo cardíaco en diferentes especies.	13
Gráfico 6.- Porcentaje de calcio liberado por el receptor de Rianodina (RYR) en el ventrículo de rata y conejos a diferentes frecuencias.	14
Gráfico 7.- Estudio cinético de la potenciación post-reposo, en tiras de ventrículo derecho de ratas.	16
Gráfico 8.- Series o familias de ácidos grasos insaturación, elongación de la cadena y oxidación.	18
Gráfico 9.- Transporte de los ácidos grasos y beta-oxidación peroxisomal y mitocondrial en miocitos cardíacos.	20
Gráfico 10.- Alteración de la cinética de la relajación de miocitos ventricular de ratones transgénicos (MHC-FATP) y ratones normales (WT), frecuencia 1Hz. ...	25
Gráfico 11.- Ácidos grasos o sus metabolitos pueden potencialmente activar múltiples vías que afecta la expresión de genes.	26
Gráfico 12.- Estructura representativa de la sustancia diabetogénica, N-[Metilnitrosocarbamil]-D-glucosamina (Estreptozotocina)	29
Gráfico 13.- Contracción isométrica del músculo papilar con 10 semanas de diabetes, $[Ca^{2+}]_e = 2,4mM$, de ratas diabéticas (- - -) y no diabéticas (—).	30

Gráfico14.- Curso temporal de la contracciones isométricas en trabéculas aisladas de ratas con $[Ca^{2+}]_e = 1,25$ mM.	32
Gráfico 15.- Ilustración de registros de contracción post-reposo con intervalo de reposo de 30 segundos de trabéculas de ventrículo derecho de rata: A.- no diabéticas, B.- 4 semanas diabéticas, C.- 8 semanas diabéticas. En presencia de $[Ca^{2+}]_e = 1,25$ mM a frecuencias de 0,2; 0,5 ó 1 Hz.	33
Gráfico16.- Producción de contracturas por enfriamiento rápido (RCC) en miocitos ventriculares de ratas no diabéticas (N=57), diabéticas (N=47) y diabéticas tratadas con insulina (N=41).	34
Gráfico 17.- El Gráfico muestra la disminución de la densidad SERCA2 y del RYR, en ventrículos de ratas (n=4), no diabéticas, diabetes (4 semanas), diabéticas + insulina.	34
Gráfico 18.- Las figuras A y B representan corrientes de salida de potasio en miocitos ventriculares de ratas no diabéticas (A) y diabéticas (B). En las figuras C y D se muestra la relación corriente - voltaje, donde se midió la amplitud del pico de I_{K^+} (•) y la corriente de estado estable (o) en un miocito no diabético (C) y diabético (D).	36
Gráfico 19.- Efectos de la diabetes sobre la concentración intracelular $[Ca^{2+}]_i$ en la diástoles y en el pico sistólico de miocitos aislados de ratas.	37
Gráfico 20.- Mecanismo propuesto para explicar la mediación del ácido linoleico en la activación de las células endoteliales en los procesos inflamatorios.	42
Gráfico 21.- Cuantificación de Nitrotirosina en plasma de ratas Spague Dawley ,sometidas por 6 semanas a distintas dietas: con ratarina y dos grupos con ratarina más 5% de aceite vegetal comestible (oleína +soya) o soya.	43
Gráfico 22.- Mecanismo de acción del óxido nítrico en los cardiomiocitos.	44
Gráfico 23.- Esquema de la acción de la fosfolipasa A2 independiente de calcio (FLA2i) y la formación de acilcarnitina y β -OH Acilcarnitina en mitocondrias de un corazón diabético. (AG) Ácido graso.	45
Gráfico 24.- Resumen del esquema experimental.	48
Gráfico 25.- Representación esquemática de superfusión de tiras de ventrículos derecho, registro de potenciación post-reposo.	51
Gráfico 26.- Diagrama del sistema utilizado para medir la fluorescencia. ED: espejo dicroico, DN: filtros de densidad neutra, FM: fotomultiplicador.	54
Gráfico 27.-Diagrama del sistema utilizado para medir la longitud y acortamiento de cardiomiocitos aislados.	55
Gráfico 28.- Análisis del peso corporal de las ratas no diabéticas (control) y diabéticas sometidas a dietas de ratarina (CR, DR) o ratarina enriquecida con 5 % de aceite de maíz (CM, DM) u oliva (CO, DO) al final del periodo experimental de 4 semanas.	58
Gráfico 29.- Concentración de la glicemia plasmática (mg/dL) las ratas no diabéticas (controles, N= 8) o diabéticas, N=7 sometidas a dietas de ratarina o	

ratarina enriquecida con 5% de aceite de maíz u oliva.	59
Gráfico 30.- Lámina de un cromatograma de la cromatografía en capa fina de sílica gel G-60 que muestra la separación de los fosfolípidos.	63
Gráfico 31.- Cromatografía en capa fina de sílica gel G-60 mostrando zonas de extracción de los fosfolípidos (FL) de los miocitos ventriculares y una muestra de fosfolípido de color marrón sin extraer.	64
Gráfico 32.- Resultado de una cromatografía en fase gas-líquida de ácidos grasos metilados de fosfolípidos de miocitos ventricular aislados de una rata sometida a dieta de ratarina.	65
Gráfico 33.- Fuerza de contracción del estado estable antes de 32 s de reposo de tiras de ventrículo derecho de ratas diabéticas y no diabéticas (Controles), sometidas a dietas de ratarina (N=6) o enriquecidas con 5 % de aceite de maíz (N=5) u oliva (diabética N=5 y no diabética N=7) a las frecuencias de 0.5 Hz, 1 Hz o 1 Hz en presencia de Verapamil (3×10^{-6} M)	69
Gráfico 34.- Cinética de la potenciación Post-reposo en relación al estado estable en tiras de ventrículos derecho de ratas diabéticas (DR) y no diabéticas (CR) alimentadas con dietas de ratarina, y estimuladas a las frecuencias de 0,5 o 1 Hz.	70
Gráfico 35.- Cinética de la potenciación post-reposo en relación al estado estable en tiras de ventrículos derecho de ratas diabéticas (DM) y no diabéticas (CM), alimentadas con dietas de ratarina enriquecidas con 5 % de aceite de Maíz, y estimuladas a las frecuencias de 0,5 o 1 Hz.	72
Gráfico 36.- Cinética de la potenciación post-reposo en relación al estado estable en tiras de ventrículos derecho de ratas diabéticas (DO) y no diabéticas (CO), alimentadas con dietas de ratarina enriquecidas con 5 % de aceite de Oliva, y estimuladas a las frecuencias de 0,5 o 1 Hz.	73
Gráfico 37.- Cinética de la potenciación post-reposo de tiras de ventrículo derecho de ratas no diabéticas, sometidas a dietas de ratarina (CR, N = 5) o enriquecidas con 5 % de aceite de maíz (CM, N=5) u oliva (CO, N=7) a la frecuencia de 1Hz.	74
Gráfico 38.- Cinética de la potenciación post-reposo de tiras de ventrículo derecho de ratas no diabéticas, sometidas a dietas de ratarina (CR, N =5) o enriquecidas con 5 % de aceite de maíz (CM, N =5) u oliva (CO, N =7) a la frecuencia de 0,5 Hz.	75
Gráfico 39.- Cinética de la potenciación post-reposo de tiras de ventrículo derecho de ratas diabéticas, sometidas a dietas de ratarina (DR, N = 4) o ratarina enriquecidas con 5 % de aceite de maíz (DM, N =5) u oliva (DO, N = 5) a la frecuencia de 1Hz.	76
Gráfico 40.- Cinética de la potenciación post-reposo de tiras de ventrículo derecho de ratas diabéticas, sometidas a dietas de ratarina (DR, N =4) o enriquecidas con 5 % de aceite de maíz (DM, N =5) u oliva (DO, N =5) a la frecuencia de 0,5 Hz. .	77
Gráfico 41.- Cinética de la potenciación post-reposo de tiras de ventrículo derecho de ratas no diabéticas (Controles), sometidas a dietas de ratarina (CR) o enriquecidas con 5 % de aceite de maíz (CM) u oliva (CO) en presencia de 3×10^{-6}	

M de Verapamil a la frecuencia de 1Hz.	78
Gráfico 42.- Cinética de la potenciación post-reposo de tiras de ventrículo derecho de ratas diabéticas, sometidas a dietas de ratarina (DR, N = 4) o enriquecidas con 5 % de aceite de maíz (DM) u oliva (DO) (N= 5), en presencia de 3×10^{-6} M de Verapamil a la frecuencia de 1Hz.	79
Gráfico 43.- Registros unitarios y simultáneos de Calcio sistólico ($[Ca^{2+}]_i$) y Contracción respecto al tiempo, obtenidos en miocitos aislados de ratas no diabéticas (controles), estimuladas a 0,5 Hz, alimentadas con ratarina (CR) o ratarina enriquecidas con 5% de aceite de oliva (CO) o maíz (CM)	82
Gráfico 44.- Registros unitarios y simultáneos de Calcio sistólico ($[Ca^{2+}]_i$) y Contracción respecto al tiempo, obtenidos en miocitos aislados de ratas diabéticas estimuladas a 0,5 Hz, alimentadas con dieta enriquecidas con aceite de oliva (DO), con maíz (DM) o ratarina (DR)	83

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1.- Ácidos grasos en los fosfolípidos del RS en el corazón de ratas Wistar diabéticas por varias semanas y tratadas con insulina. % respecto al total de los ácidos grasos.	38
Tabla 2.- Composición de la solución Tyrode utilizadas en la perfusión de tiras de ventrículo derecho (mM). pH 7,4.	49
Tabla 3.- Composición de la solución A y B (mM), para el aislamiento de miocitos. El pH de las soluciones A y B es de 7,4.	50
Tabla 4.- Composición (mM) de la solución Tyrode empleada en la superfusión de miocitos aislados pH = 7,4.	54
Tabla 5.- Porcentaje de ácidos grasos en las diferentes muestras de aceites de Maíz y de Oliva.	60
Tabla 6,. Porcentajes de ácidos grasos en los lípidos totales en las dietas de ratarina y de la ratarina enriquecida con 5% de aceite de maíz u oliva.	61
Tabla 7.- Porcentaje de los ácidos grasos de los fosfolípidos de miocitos ventricular aislados de corazón de ratas no diabéticas, con las diferentes dietas.	66
Tabla 8.- Porcentaje de los ácidos grasos de los fosfolípidos de miocitos ventricular aislados de ratas diabéticas, con diferentes dietas.	67
Tabla 9.- Diferentes parámetros de la potenciación post-reposo en miocitos ventriculares aislados de ratas con diferentes dietas, en relación al estado estable (%). Intervalos de reposo 32 segundos.	87

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Δ	Delta Desaturasa
ACh	Acetil colina
AD	Analógico a Digital
AG	Ácidoa grasos
AIN	America Institute of Nutrition
AM	acetoximetil
ATPasa Ca^{2+}	Corriente de calcio
ATPasa Na^+ / K^+	Corriente de Na^+ / K^+
Balb/c	Subcepas de las cepa de ratones Balb
BHT	hidrobutiltolueno
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	Concentración calcio intracelular
CICR	Liberación de calcio inducida por calcio
CM	Control Maíz
CO	Control Oliva
CoA	Coenzima A
CPTI	Carnitina Palmitoil Transferasa I
CR	Control ratarina o no diabética
CSQ	calsecuestrina
DBA/2J	Subcepas de las cepas de ratones DBA
DM	Diabética Maíz
DO	Diabética oliva
DR	Diabética ratarina
DT	Tensión en gramos
E-C	Excitación-contracción
EE	Error estandar
EIN	Efecto inotrópico negativo

EIP	Efecto inotrópico positivo
FAB	Proteínas que transportan ácidos grasos
FAT	Proteínas que transfieren ácidos grasos
FC	Fosfatidilcolina
FE	Fosfatidiletanolamina
FKBP12.6	Proteínas cinasas
FLA ₂	Fosfolipasa A ₂
FLC	Fosfolipasa C
GCS	Guanilciclase soluble
Gi	Proteína G inhibidora
Glut-4	Transportador de glucosa
HbA _{1c}	Proteína A glicosilada
HMC	Cadena pesada de miosina
Hz	Herz
Hz	Frecuencia en Herz
ICaL	Canales lentos de calcio
IK	Corriente de potasio
IK-1	Corriente de potasio rectificadora de entrada
IP3	Fosfatidilinositol trifosfato
ITo	Corriente de la fase lenta de la repolarización
IUPAC	Unión Internacional de Bioquímica Aplicada
JRS	Reticulo sarcoplásmico de unión
m ₂ AChR	Receptor muscarínico para acetilcolina
mN/mm ²	Fuerza por sección transversal del músculo
mtNOS	Óxido nítrico mitocondrial
mV	milivoltio
N	Número de casos
Na ⁺ /Ca ²⁺	Intercambiador sodio –calcio

NE	Norepinefrina
NF-KB	Factor de transcripción KappaB
NO·	Óxido nítrico
NOS	Sintetasa del oxido nítrico
NRS	Maya del Retículo sarcoplásmico
NSAID	Drogas antiinflamatorias
O ₂ ·	Superóxido
ONOO-	peroxinitrilo
pA	Pico amper
PCK	Proteína cinasa
PDE	Fosfodisterasa
PKA	Proteína cinasa A
PLB	Fosfolambano
PP1	Proteína cinasa uno
PPAR _s	Receptores activadores de peroxisomas
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
RCC	Contractura por enfriamiento
RS	Retículo sarcoplásmico
RYRS	Receptores de rianodina
SERCA	ATPasa Ca ²⁺ RS
β-AR	Beta adrenérgico
STZ	Estreptozotocina
T	Tensión
TF	Factores de transcripción
TnC	Troponina C
tPT	Tiempo de tensión pico
TZD	Thiazolidinediona
XO	Xantinooxidasa

AGRADECIMIENTO

- A DIOS TODO PODEROSO, POR CONCEDERME VIDA PARA REALIZAR TODAS MIS ASPIRACIONES
- AL ALMA MÁTER, POR ALIMENTAR MI INTELLECTO SIN PEDIR NADA A CAMBIO
- A MI MADRE QUE A SUS OCHENTA Y SEIS AÑOS EN SU SOLEDAD, ENTENDIÓ MI AUSENCIA
- A MI COMPAÑERO DE VIDA HOLGER ORTIZ, SIN ÉL IMPOSIBLE LOGRAR LAS METAS
- A MI TUTORA NILDA NEGRETTI, QUIEN CONFÍÓ EN MÍ Y ME GUIÓ EN EL CAMINO DE ESTA SAPIENSA
- AL POSGRADO POR SER COMPENSIVO CON LAS VICISITUDES DEL INVESTIGADOR.
- A MIS PROFESORES ASESORES, GRACIAS POR LAS RECOMENDACIONES.
- A LOS AMIGOS Y AMIGAS POR SU ENTREGA DÍA A DÍA.
- A LOS MAESTROS Y MAESTRAS AUSENTES QUE ESTÁN PRESENTE POR SUS ENSEÑANZAS, GRACIAS

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares hoy día son la principales causas morbilidad y mortalidad en los pacientes diabéticos. El origen de la diabetes es multifactorial y aparentemente está asociado con cambios metabólicos relacionados con el metabolismo de los carbohidratos y de los lípidos. El propósito de este trabajo es estudiar el efecto del consumo de dietas enriquecidas con distintos aceites sobre los cambios de la función cardíaca en ratas diabéticas con miras a futuras aplicaciones terapéuticas en pacientes diabéticos con disfunción cardíaca, con la finalidad de mejorar su calidad de vida.

En este estudio a ratas diabéticas y no diabéticas se les suministró una dieta enriquecida con 5% de aceites de maíz (n-6) u oliva (n-9). Se encontró que los fosfolípidos de los cardiomiocitos de las ratas diabéticas que ingirieron el aceite de maíz presentaron el mayor porcentaje de ácido linoleico (C18:2,n-6), mientras que las que ingirieron el aceite de oliva presentaron, el mayor porcentaje de C18:1,n-9 (oleico). Además, tanto en tiras de ventrículo como en los cardiomiocitos aislados de ratas diabéticas, se observó que a menor contenido de lípidos en la dieta, menor es la fuerza de contracción de la potenciación post-reposo independientemente de la frecuencia de estimulación utilizada (0,5Hz o 1 Hz).

En el registro de contracción, la relajación (Tau), fue igual entre las ratas no diabéticas que ingirieron maíz y oliva, y menor en las que ingirieron dieta con ratarina. Los miocitos de las ratas diabéticas alimentadas con una dieta enriquecida con aceite de oliva mostraron un mayor valor de Tau respecto a las ratas que ingirieron en su dieta ratarina o maíz.

Los registros de calcio sistólico realizados en miocitos de las ratas diabéticas y no diabéticas, cuyas dietas estaban enriquecidas con aceite de oliva, mostraron la mayor potenciación, hecho que se correlaciona con los resultados de los registro de contracción. En el registro de calcio sistólico realizado en cardiomiocitos de ratas no diabéticas sometidas a las distintas dietas no se encontró diferencias significativa en la Tau, mientras que en los de ratas diabéticas la Tau fue mayor en los sometidos a dieta enriquecida con aceite de maíz.

Las respuestas de la potenciación post-reposo en los estudios de los cardiomiocitos ventriculares, fue similar al comportamiento de las tiras de ventrículo derecho aislados de ratas diabéticas y no diabéticas con las distintas dietas.

Estos resultados obtenidos en las ratas diabéticas, tanto en tiras de ventriculares, como en miocitos aislados parecen sugerir que para mejorar la disfunción diastólica la dieta rica en aceite de maíz es más conveniente, ya que aumenta la velocidad de relajación disminuyendo la constante de tiempo Tau.

Palabras claves: Diabetes, ácidos grasos, cardiomiocitos, potenciación, calcio, ratas

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En los pacientes con diabetes mellitus se pueden desarrollar miocardiopatías no asociadas a complicaciones en las arterias coronarias, que estarían relacionadas con cambios en el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas (1), en estos pacientes es importante conocer los efectos de los ácidos grasos de los triacilglicéridos que son ingeridos con los aceites comestibles.

En Venezuela, los aceites vegetales comestibles son principalmente de maíz, soya, girasol, maní y sus mezclas, estos triacilglicéridos contienen ácidos grasos poliinsaturados de la familia n-6 y cuyo mayor porcentaje es el ácido linoleico un ácido grasos esencial, cuyos efectos antiarrítmicos son menores que los encontrados con los ácidos grasos de la familia n-3, estudiados más ampliamente. En la dieta mediterránea el aceite más consumido es extraído del olivo, cuyos triacilglicéridos son ricos en ácidos grasos monoinsaturados de la familia n-9, y con un alto porcentaje de ácido oleico, pero existen controversias con relación a sus efectos sobre los cardiomiocitos (2, 3).

En estudios efectuados en ratas no diabéticas y alimentadas con ratarina hemos observado que la máxima contracción post-reposo ocurre a los 32 s, tanto en aurículas como ventrículos aislados, adicionalmente distintas maniobras inotrópicas realizadas en aurículas izquierdas de ratas mostraron que la potenciación post-reposo no altera su cinética cuando se bloquean los canales lentos de calcio, pero si cambia cuando se bloquean los canales de rianodina del retículo sarcoplásmico(4).

En vista de la experiencia anterior y de los nuevos procedimientos metodológicos que permiten medir el movimiento de calcio intracelular y la fuerza de contracción post-reposo, en cardiomiocitos aislados de ratas *Sprague Dawley*, en este trabajo se evaluará cómo los ácidos grasos o/y lípidos de la dieta incorporados a los fosfolípidos de las membranas de los tejidos cardiacos, actúan sobre la fuerza de contracción post-reposo y el manejo del calcio en ratas diabéticas tipo 1. Esta información podría ser utilizada para realizar modificaciones en la ingesta de ácidos grasos en pacientes diabéticos con el fin de mejorar su función cardiovascular y calidad de vida.

I.1.- Planteamiento del problema.

En Venezuela, más de un millón de habitantes sufren de diabetes mellitus y es la sexta causa más frecuente de muerte, constituyendo un problema de salud pública. En América el número de personas con diabetes mellitus se estima en 35 millones para el año 2000, se espera un incremento a 64 millones para 2025 y se cree que el porcentaje de diabéticos será un 62% que representaría 40 millones de personas (5). En estos pacientes, la muerte no es solamente por infarto al miocardio sino también se ha asociado con una fallas cardiacas.

En los diabéticos ocurren cambios metabólicos del manejo de los lípidos y de los carbohidratos, y posiblemente de la composición en los ácidos grasos de los fosfolípidos en las membranas, los cuales pueden influir en la homeostasis del calcio en el músculo cardíaco y alterar el proceso de contracción-relajación. Se ha reportado que los ácidos grasos poliinsaturados de la familia n-3 y n-6 son agentes antiarrítmicos al compararlos con los ácidos grasos saturados (6). En relación a los ácidos grasos monoinsaturados de la familia n-9, los trabajos han estado enfocados principalmente al estudio de las hiperlipémias. En la dieta mediterránea el aceite empleado es el aceite de oliva, el cual es rico en ácidos grasos monoinsaturados de la familia n-9 y su uso se ha relacionado con la reducción del estrés oxidativo y los niveles de colesterol en el plasma, pero existen controversias con relación a sus efectos sobre las corrientes de calcio en los cardiomiocitos. Debido a que los lípidos de la dieta juega un papel importante en la modulación de funciones cardiovasculares, es importante estudiar el efecto de los ácidos monoinsaturados de la familia n-9, presentes en el aceite de oliva, con relación a la función cardiaca. En Venezuela los aceites vegetales comestibles son principalmente maíz, soya, girasol, entre otros y mezcla de ellos, los cuales contienen ácidos grasos esenciales como el ácido linoleico que es un ácido graso poliinsaturados de la familia n-6 abundante en estos aceites. El aceite de maíz contiene un 47% de este ácido graso esencial.

I.2.- Justificación.

La diabetes mellitus es un trastorno metabólico caracterizado por la hiperglucemia sostenida y su patogenia se puede resumir en dos mecanismos causales; el déficit total o parcial de la insulina o un estado de resistencia de los tejidos periféricos para la acción de esta hormona. En el siglo XXI, la diabetes será considerada una enfermedad epidémica, ya

que, la Federación Internacional de Diabetes ha calculado que para el año 2025 existirán 300 millones de diabéticos a nivel Mundial. La causa de esta epidemia está asociada a la presencia de obesidad, sedentarismo y una dieta basada en comidas ricas en grasas y carbohidratos, que caracterizan al estilo de vida occidental de países desarrollados, sumado al aumento de una mayor expectativa de vida en la población mundial. En Venezuela, la diabetes es un problema de salud pública, más de un millón de habitantes sufren la enfermedad y está colocada entre la sexta causa más frecuente de muerte. Un factor que contribuye a la insuficiencia cardíaca en estos pacientes es la cardiomiopatía independiente de las complicaciones en las arterias coronarias, que se manifiesta en principio como una disfunción diastólica y conlleva a una disfunción sistólica, por lo cual, estos pacientes tienen mayor probabilidad de sufrir enfermedad cardiovascular en relación a la población no diabética (7).

Es necesario realizar estudios que relacionen parámetros nutricionales, bioquímicos y fisiológicos de la función del músculo ventricular, en tejidos multicelulares y en miocitos aislados de animales, donde se induzca experimentalmente la diabetes, con la finalidad de mejorar su funcionamiento cardíaco, mediante recomendaciones dietéticas asociadas a los ácidos grasos, para elaborar estrategias nutricionales adecuadas para los pacientes diabéticos, que conduzcan a mejorar su calidad de vida. En este trabajo se utilizará el aceite comestible de oliva como fuente de ácido graso monoinsaturado n-9, empleado en la dieta mediterránea que está asociado a una disminución de los lípidos en sangre y el aceite de maíz, rico en ácidos grasos poliinsaturados n-6 utilizado en la alimentación de la población venezolana.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

II.1- Acoplamiento excitación-contracción del músculo cardiaco.

II.1.1.- La entrada de Ca^{2+} durante el potencial de acción cardiaco y el proceso de contracción.

El término acoplamiento excitación-contracción (EC) cardiaca fue introducido por Sandow (8) y asocia dos procesos: la despolarización y la contracción, donde el eslabón de conexión entre ellos es el Calcio. Durante el potencial de acción cardiaco, la despolarización del sarcolema del músculo cardíaco conduce a una entrada de calcio desde el exterior, durante la meseta de (fase 2) del potencial de acción, esta entrada de Calcio (Ca^{2+}) es a través de los canales tipo L del cardiomiocito en la zona yuxtapuesta al retículo sarcoplásmico (RS) la cual estimula la liberación de calcio del RS, a través de los receptores de Rianodina (RYRs), lo que se denomina mecanismo de liberación de calcio inducida por calcio (CICR) (9). Durante la contracción se utiliza calcio proveniente de dos fuentes, una del medio extracelular, que pasa por los canales dependientes de voltaje, localizados en el sarcolema (canales de Ca^{+2} tipo L) y otra del medio intracelular, el calcio liberado del retículo sarcoplásmico (RS) por los canales dependientes de ligando (RYRs). Se ha observado que en el miocito ventricular de conejo, el calcio sistólico depende más del Ca^{2+} extracelular y menos calcio es liberado del RS, mientras que, en la rata ocurre todo lo contrario, debido a las diferencias que existe en el manejo del calcio entre las diferentes especies (10); además, se ha demostrado que hay una proteína denominada calmodulina, que fija calcio y al parecer media la inactivación y activación de los canales de calcio tipo L y T en la membrana del cardiomiocito (11). Existen pequeñas liberaciones de Ca^{2+} , denominadas “chispas” de calcio, que son liberaciones de calcio de los RYRs, unidades fundamentales esenciales del RS. Espacial y temporalmente ocurre una suma discreta de las liberaciones de calcio (Ca^{2+} Transient), que activa a las proteínas que generan la contracción del músculo cardiaco. Se cree que las “chispas” de calcio están bajo un estricto control local de los canales tipo L. Así, las propiedades microscópicas de los RYRs en respuesta a las corrientes de calcio en los canales tipo L son determinantes importantes de la eficiencia del acoplamiento EC (12).

Las proteínas asociadas al ciclo del calcio en el acoplamiento EC son las proteínas: de los canales de calcio tipo L, de los receptores de Rianodina, y del Fosfolambano (PLB) que regula la ATPasa Ca^{2+} (SERCA) del RS. Todas estas proteínas son puntos de acción de la proteína cinasa A (PKA). Los efectos del Fosfolambano fosforilado sobre el corazón son atribuidos generalmente a un incremento de la afinidad de la SERCA del RS al Ca^{2+} (13). La relación PLB /SERCA, es tres veces mayor en el ventrículo que las aurículas en humanos; no obstante, la velocidad del transporte del calcio no difiere significativamente entre ventrículos y aurículas, aunque la expresión de SERCA es mayor en las aurículas y además, no existe diferencias en el contenido de calsequestrina entre esos tejidos (14).

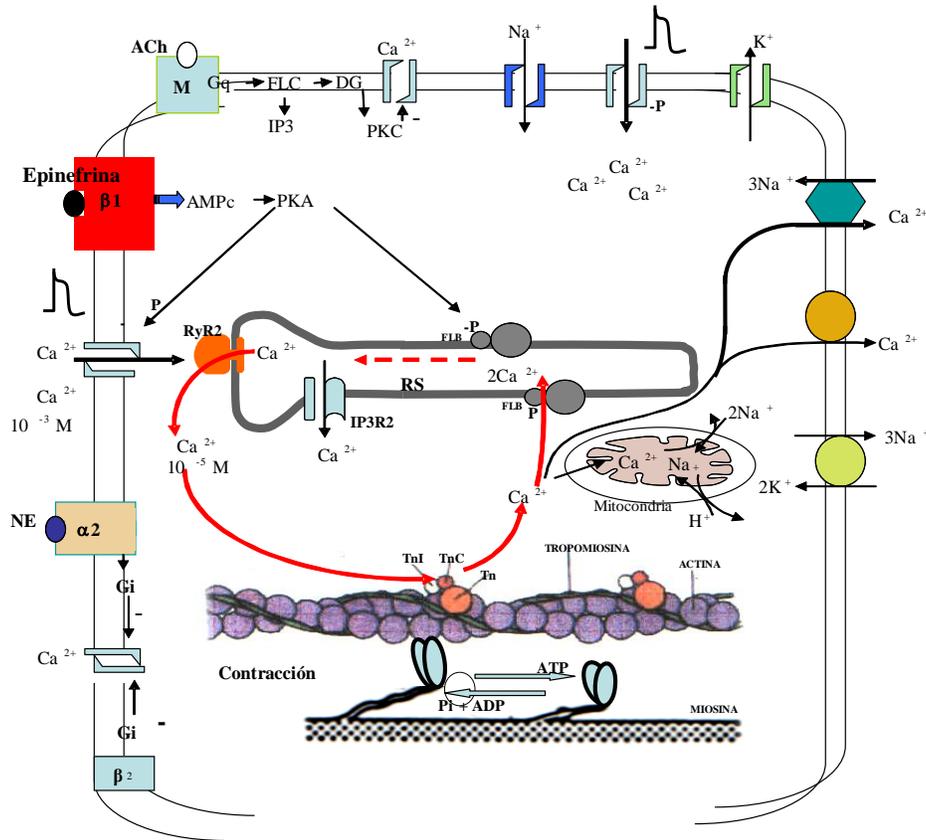
La entrada de calcio a la célula cardiaca está sujeta a regulación. La estimulación de los receptores β -Adrenérgicos (β -AR) por la norepinefrina (NE) o por la epinefrina, juega un papel principal en la modulación del canal de calcio tipo L y están involucradas en la regulación de la función cardiaca en respuesta al estrés y al ejercicio.

Existen interacciones entre la cascada β -Adrenérgica y otras vías que modulan las corrientes de Ca^{+2} (I_{Ca}), por ejemplo, la acetilcolina (ACh), que no tiene efecto sobre la corriente basal I_{Ca} en el miocito ventricular, estimula a un receptor muscarínico que media la activación de una proteína G_i ; ésta inhibe la adenilato ciclasa y la producción neta de AMPc. Un aumento del GMPc incrementa la proteína cinasa G (PKG), que al parecer no altera la I_{Ca} basal, pero disminuye la producción del AMPc por inhibición de la fosfodiesterasa (PDE) (15). También existen evidencias que sugieren que el óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) es requerido para que la ACh medie el antagonismo de la activación de la Corriente I_{Ca} en miocitos cardiacos, además, la ACh estimula a una proteína fosfatasa que puede revertir la fosforilación mediada por PKA (16).

El calcio que entra a través del canal tipo L es el principal mecanismo que induce la liberación del ion del RS (Gráfico 1), sin embargo en miocitos ventriculares de ciertos mamíferos como el Cobayo, la corriente de calcio de los canales T pueden liberar calcio del RS, aunque menos eficientemente que los canales tipo L (17). En el músculo cardiaco existen dos subtipos de receptores β adrenérgicos (β AR): β_1 AR y β_2 AR. En condiciones

Gráfico 1

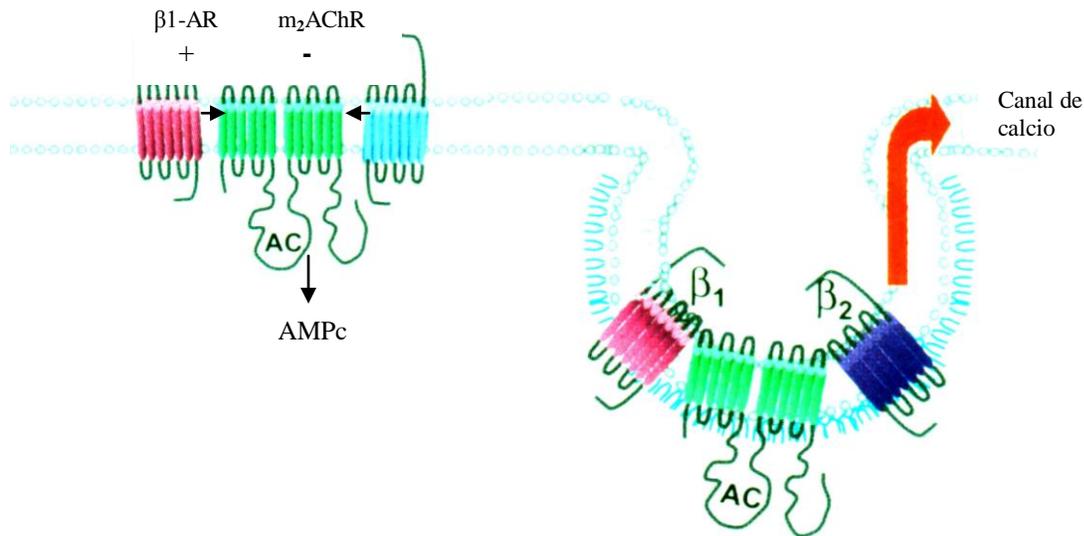
Representación de un cardiomiocito, donde se muestran los movimientos del calcio, los receptores y canales iónicos involucrados en el acoplamiento excitación-contracción. Tomado de Candelaria Alfonso y col.(4)



normales en las células cardiacas la estimulación del β_1 AR por intermedio de la proteína Gs estimula la adenililciclasa, encargada de generar AMPc que activa a la proteína cinasa PKA, que está asociada con la fosforilación de proteínas que conllevan a un efecto inotrópico positivo, mientras que, la estimulación β_2 AR está asociada a proteínas Gs ó Gi. Sato y col (18) mostraron que el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ constituye la unión entre β_2 AR/Gi. Cuando hay disfunción β_1 AR y β_2 AR que medían la respuesta contráctil en los miocitos existe una mayor expresión del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. La acción del β_2 AR/Gs está restringida a microdominios en la membrana (lípidos raft) (Gráfico 2) en la vecindad del canal de calcio tipo L.

Gráfico 2

Distribución de los receptores beta adrenérgicos en la membrana plasmática de los cardiocitos de ratas adultas y en las caveolas.



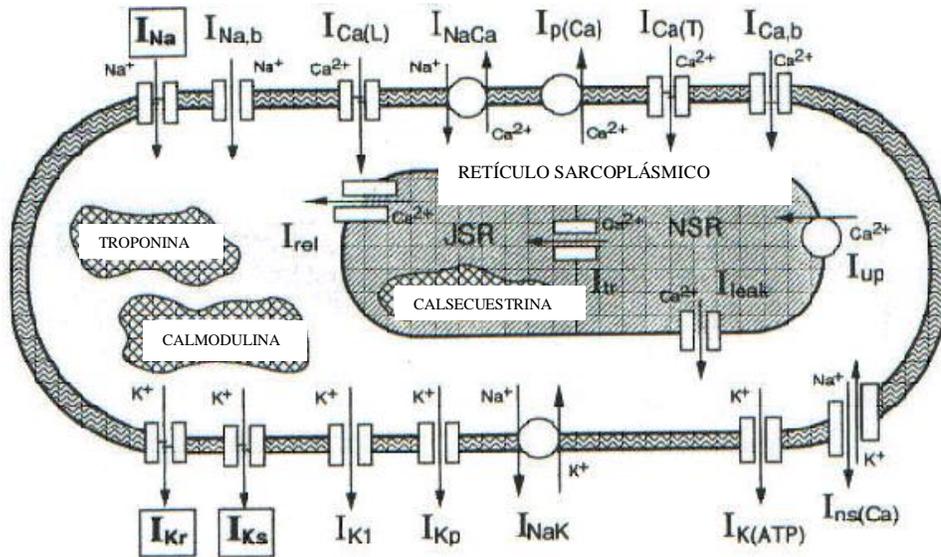
Color rojo β_1 -AR, color azul oscuro en la caveola β_2 -AR. La adenilciclasa (AC) esta representada en verde y el receptor muscarínico para la Acetilcolina (m_2 AChR) en azul claro. Tomado de Steinberg (18)

La entrada de calcio a la célula es requerida no sólo para la contracción sino y para mantener los parámetros metabólicos tales como, producción de NADH y ATP a nivel mitocondrial Helen y col. (19). Un incremento del potencial de membrana mitocondrial está asociado con una activación del canal de calcio y esto puede ayudar a nivel mitocondrial producir más ATP según las demandas del ciclo cardíaco, actuando coordinadamente el Canal tipo L y la función mitocondrial.

En el modelo de simulación de Luo y Rudy (20) el RS de una célula ventricular de mamífero está dividido en dos compartimentos (Gráfico 3) que los denominan: el retículo sarcoplásmico de unión, JRS (Junctional RS), que es el lugar del RS yuxtapuesto a la membrana plasmática donde se libera el Ca^{2+} y el otro, el retículo sarcoplásmico en maya, NRS (Network RS), lugar de recaptación de Ca^{2+} cercano a la miofibrillas. El Ca^{2+} recaptado en NRS es transferido a JRS a través de un proceso de transporte con una cons-

Gráfico 3

Modelo de simulación de una célula ventricular de mamífero, muestra las distintas corrientes y el flujo de Ca^{2+} en el RS. Tomado de Luo y Rudy. (20)



tante de tiempo de 180 ms. Cuando el JRS está cargado de Ca^{2+} a un nivel umbral, ocurren liberaciones espontáneas de Ca^{2+} desde esa zona del RS. De otra manera, el Ca^{2+} es transferido de regreso desde JRS a NRS, donde se fuga al citosol a través de canales de fuga (I_{leak}) y los iones que quedan en el mioplasma son eliminados de la célula por el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ después de que se completa el potencial de acción. Según este modelo, entre ambos compartimientos existe un transporte gradual de iones Ca^{2+} , además en el compartimiento JRS está la calscuestrina y predominan los canales de RyRs, mientras que, en el otro compartimiento predomina la SERCA. Existen dos proteínas integrales de membrana la Triadina y la Junctina que se une directamente al receptor Ryanodina, estas proteínas sirven de anclaje y estabilizan la calscuestrina a la cara interna de la membrana en la región JRS (21).

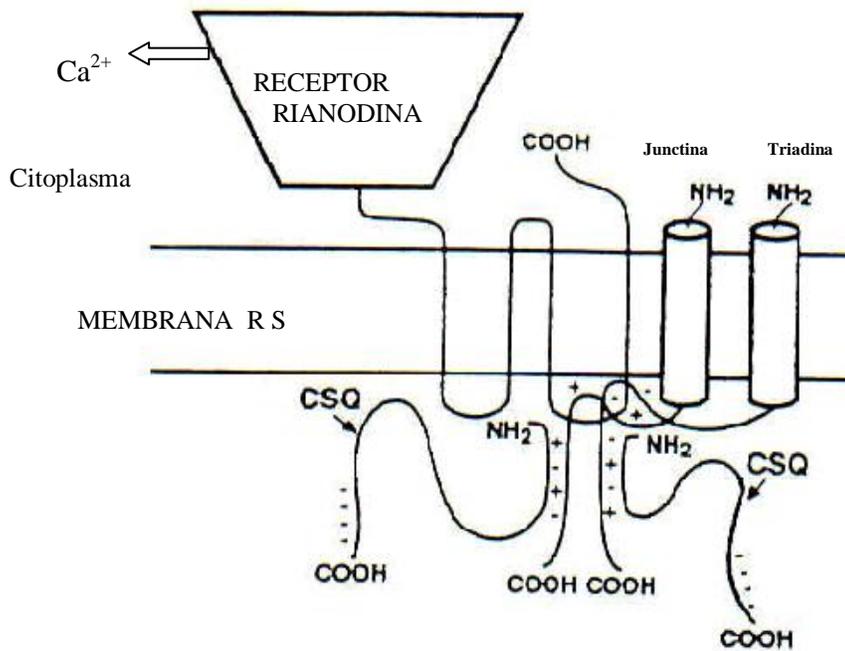
La microscopía electrónica muestra que la calscuestrina parece estar físicamente unida a los receptores de RyRs, formando un complejo cuaternario, este complejo es importante durante el acoplamiento EC, pues se ha propuesto que el Ca^{2+} se une directamente a la

calsequestrina (Gráfico 4) regulando la cantidad de iones de Ca^{2+} liberado por el RyRs, y la junctina podrían mediar los mecanismos de regulación (22).

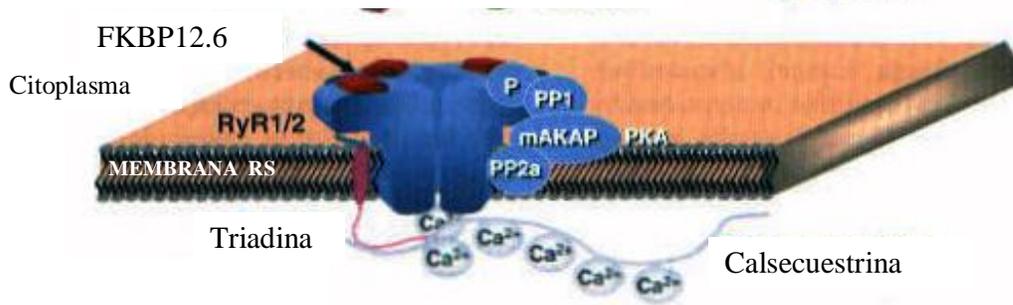
Gráfico 4

Receptor de rianodina: a) Proteínas de anclaje (Junctina y triadina) y la calsequestrina (CSQ). b) Esquema tridimensional del receptor de rianodina y la disposición de las proteínas relacionadas con el ensamblaje del canal de RyR (FKBP12,6) y proteínas cinasas. Tomado de Hove-Madsen y Bers DM, (22), Bers DM y Pérez (23),

a)



b)



P = sitio de fosforilación

PP1 y PP2a = proteína cinasa

mAKAP = proteína de anclaje para la PKA RyR1/2 = receptor de Rianodina

La troponina localizada en las miofibrillas, actúa como un sensor del calcio, es un complejo de tres proteínas troponina C, I, T. La troponina “C” es el componente que se une al calcio mediante cuatro sitios de unión: dos de alta afinidad y dos de baja afinidad. La troponina “I” es la unidad que inhibe la actividad de ATPasa de la actomiosina y las interacciones contráctiles de miosina-actina-tropomiosina. Por último la troponina “T” es el componente del complejo que se une a la tropomiosina. En el músculo cardíaco existen receptores intracelulares para el fosfatidiltrifosfato (IP3), que permiten la liberación de calcio por canales intracelulares dependientes de IP3 y existen varios subtipos IP3R1, IP3R2, y IP3R3. En el músculo cardíaco predomina el IP3R2 y estos son cincuenta veces menos abundantes que los receptores de RyRs. Los receptores para IP3 están ubicados en compartimientos de membranas intracelulares del RS diferentes al lugar donde se encuentran los receptores de RYR, estos receptores IP3 pueden jugar un papel importante en la regulación global de la concentración de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ pero requieren, de altas concentraciones de IP3 (22,23). El IP3R2 interviene en funciones especializadas de los cardiomiocitos como: 1) En la regulación de la permeabilidad en las membranas de las organelas, 2) Amplificación o propagación de las señales eléctricas en el corazón, 3) En las fibras de Purkinje se han encontrado altos niveles de IP3R2 encargadas de controlar las señales locales de calcio que puede jugar un papel importante en la regulación del crecimiento celular. El IP4 puede sostener la respuesta inotrópica positiva inicialmente inducida por IP3; el mecanismo no es conocido, pero se sabe que actúa sobre las vesículas de baja densidad, cuyos canales de calcio son dependientes de ATP y distintas de las vesículas pesadas del RS ricas en receptores RyR (24).

II.1.2.-Disminución del calcio intracelular durante la relajación.

Para que ocurra la relajación y el llenado ventricular, el calcio que activó los miofilamentos, debe ser removido del citosol por los cuatro sistemas: La SERCA del RS, el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, la Calcio ATPasa del sarcolema y el transportador unidireccional mitocondrial. Desde el punto de vista cuantitativo la SERCA del RS y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ son los mecanismos más importantes.

La SERCA es la bomba de calcio que moviliza el calcio del citosol al interior del RS y por tanto, interviene en el fenómeno de relajación del músculo cardíaco. Existen diferentes isoformas de SERCA (SERCA1, SERCA2 y SERCA3) pero en el músculo cardíaco predomina la isoforma SERCA2. Además, existen dos subtipos de SERCA2, la SERCA2a y la SERCA2b. La SERCA2b muestra un patrón de distribución alrededor de los túbulos T y poseen mayor afinidad por el calcio que la SERCA2a que se encuentra distribuida a lo largo de la membrana longitudinal y transversal del RS. La SERCA2a juega un papel central en el manejo del calcio en el RS involucrado en el acoplamiento excitación - contracción en el músculo cardíaco, encontrándose mayor expresión en las aurículas con relación a los ventrículos (14). En el miocito ventricular de conejo la SERCA del RS, moviliza un 70% del calcio del citosol, mientras que, en la rata la SERCA del RS, presenta mayor actividad y remueve el 92% del Ca^{2+} del citosol (22).

El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ juega un papel importante durante la relajación y la cantidad de calcio que expulsa del medio intracelular varía con la especie. El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ del conejo elimina 28% del calcio del citosol, y el de la rata elimina 7%. El balance del flujo de calcio en el cobayo, hurón, conejo y humanos son similares (25). En la insuficiencia cardíaca en el corazón humano, hay típicamente una reducción de la expresión de la SERCA del RS (26) y un incremento en la expresión del $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; esto podría cambiar el balance del flujo de calcio durante la relajación a favor de una salida de calcio vía el intercambiador y una reducción de la captación de calcio del RS. Así, en una insuficiencia cardíaca en el corazón humano como en el conejo, la SERCA del RS y el $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ pueden contribuir similarmente a disminuir la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante la relajación (27). La Calcio ATPasa del RS transporta dos iones de calcio por ATP consumido, y la salida por el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ bombea solamente un ion de Ca^{2+} por dos ATP utilizado

(indirectamente la bomba elimina tres iones de Na^+ , vía $\text{ATPasa Na}^+/\text{K}^+$ el cual entró vía el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$). Así, el ciclo del calcio trans-sarcolema gasta más energía que el transporte al RS. Cuando se incrementa el calcio intracelular, las mitocondrias de los miocitos cardiacos aislados captan calcio, pero este fenómeno no juega un papel importante en comparación con la captación por el RS. (27). Además, las mitocondrias liberan el Ca^{2+} recaptado durante la sístole tardía o en el reposo y al parecer está más relacionado con las demandas metabólicas como es la síntesis de ATP (28,29).

Cuando la célula cardiaca no pierde ni gana calcio está en situación de balance, ya que el calcio que entra durante el potencial de acción es igual al que es eliminado a través de la membrana por el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, mientras que, el calcio liberado del RS es recaptado por esa estructura. Cuando la situación de balance de calcio se pierde la célula aumenta o disminuye su fuerza de contracción. El Ca^{2+} es eliminado a través de la membrana de la célula por la baja afinidad y alta capacidad del intercambiador durante la sístole, mientras que, durante el intervalo diastólico, existe baja capacidad y alta afinidad de la bomba de calcio para eliminar calcio. La fuerza de contracción de un latido normal es probablemente sólo una fracción de la fuerza máxima que puede ser generada por los filamentos contráctiles (30). Esta fracción es probablemente cerca del 40%, esto significa que el 40% de los sitios de baja afinidad de la Troponina C están saturados con iones de calcio (31).

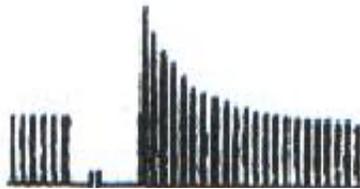
II.2.- Potenciación post-reposo.

McWilliam (32) fue el primero en observar que en el corazón de un mamífero, la amplitud de la primera contracción después de una pausa depende del intervalo entre latidos. El incremento en la fuerza de los latidos que sigue inmediatamente al período de reposo, se denomina potenciación post-reposo. Cada vez que el músculo cardiaco es excitado después del reposo, en los latidos sucesivos pueden ocurrir dos cambios temporales que tienen efectos opuestos sobre el grado de activación (contractilidad) de los elementos contráctiles. Un cambio que tiende a incrementar la fuerza de contracción y es denominado como efecto inotrópico positivo (EIP) y el otro que tiende a disminuir la contractilidad, y se le ha llamado efecto inotrópico negativo (EIN). Después del EIP se requiere de aproximadamente de 12 latidos para lograr alcanzar de nuevo el nivel de estado

estable. Diferentes patrones de contracción post-reposo se observan en los tejidos cardiacos de diversas especies (Gráfico 5).

Gráfico 5

Registro de fuerza de contracción que muestran la fuerza de contracción post-reposo con intervalo de 30 segundos, en músculo cardiaco en diferentes especies. Tomado de Koch-Weser J y Blinks JR. (33)



Tiras de ventrículo derecho de rata



Trabéculas de aurícula derecha humana



Tiras de aurícula izquierda de cobayo

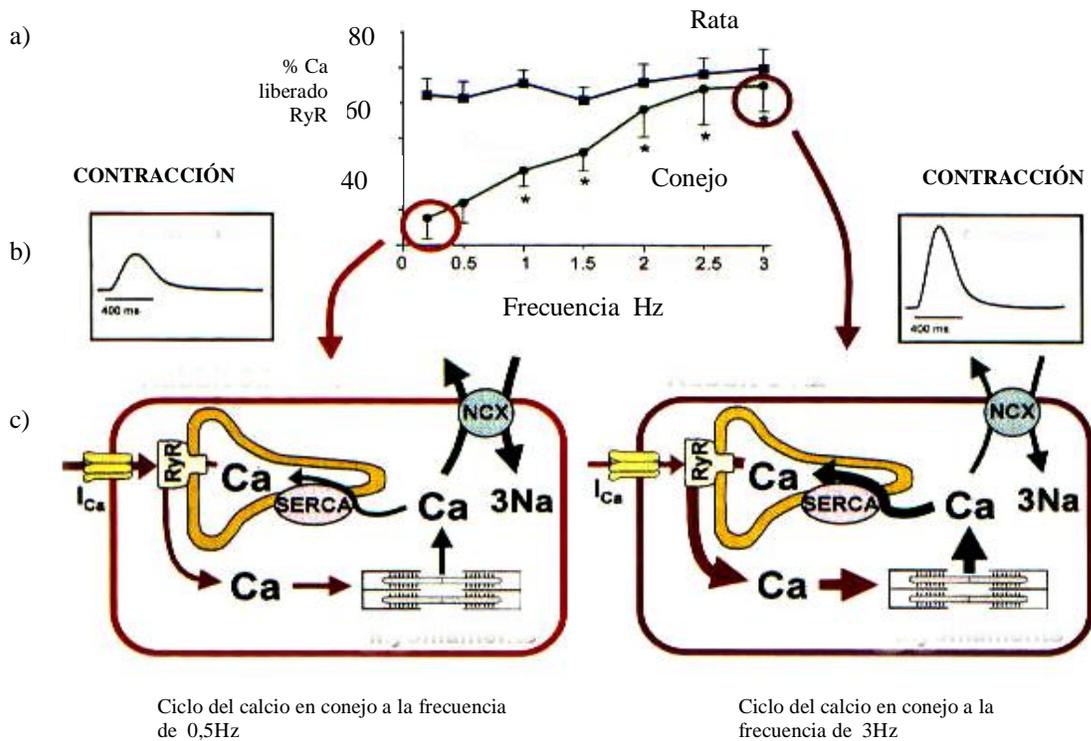


Músculo papilar ventricular derecho de cobayo

El potencial de acción desarrollado durante los primeros latidos después de una pausa prolongada incrementa en tiras de ventrículo derecho de ratas, trabéculas de la aurícula derecha de humanos y aurícula izquierda de cobayos (33), el patrón de disminución de la potenciación post-reposo es típica para el músculo cardiaco de ciertas especies como el Ventrículo derecho de cobayo y está relacionado, como vimos anteriormente, con el manejo de calcio por el músculo cardiaco en las diferentes especie. Al incrementar la frecuencias, el calcio liberado por el RYRs aumenta y a la frecuencia de 3 Hz no hay diferencias en el porcentaje de calcio liberado por el RS de conejos o en rata (Gráfico 6).

Gráfico 6

Porcentaje de calcio liberado por el receptor de Rianodina (RYR) en el ventrículo de rata y conejos a diferentes frecuencias. Tomado de Lars M y Bers D. (34)



Porcentaje de calcio liberado por el receptor de Rianodina (RYR) en el ventrículo de rata y conejos a diferentes frecuencias (a). Amplitud de la fuerza de contracción a diferentes frecuencias (b). Ciclo del calcio a frecuencias bajas y altas (c).

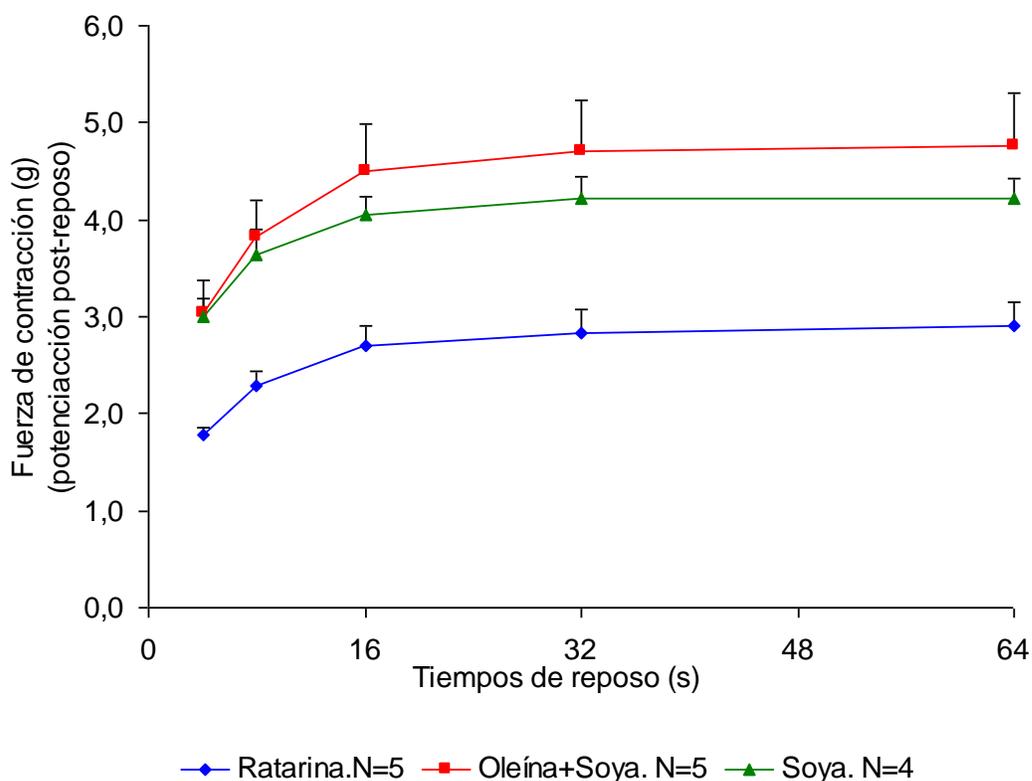
La potenciación post-reposo es un modelo de mecanismo subcelular, donde se puede estudiar los cambios cuantitativos de la fuerza de contracción, que resultan, al cambiar los intervalos entre latidos, es un ensayo seguro y altamente sensible a fenómenos o agentes que perturban la liberación del calcio del RS.

Al someter a ratas *Sprague Dawley* a dietas de ratarina o ratarina enriquecida con 5% de aceite de soya o una mezcla de aceites (soya + oleína de palma africana), se observó que el máximo valor absoluto de potenciación post-reposo en las tiras de ventrículo derecho se alcanzó a los 32 segundos de reposo en todos los grupos, resultado que se obtuvo al comparar los valores obtenidos con intervalos de reposo de 4, 8, 16, 32 ó 64 segundos, pero no se encontró diferencia significativa en la potenciación con los intervalos de reposo de 16, 32 y 64 segundos (Gráfico 7) es decir, que en estos experimentos de potenciación post-reposo la mayor liberación y recaptación absoluta de calcio (mayor cantidad de calcio recirculante), aparentemente fue a los 32 segundos, lo que indica que este fenómeno es independiente del contenido de lípidos totales en la dieta y del perfil de ácidos grasos en los ventrículos, estos resultados son compatibles con los encontrados en otros trabajos en nuestro laboratorio, donde se observó que el máximo valor absoluto de potencia post-reposo en los ventrículos fue 32 segundos y la inhibición del receptor RYR (relacionado con la liberación del calcio en el RS) con $1,5 \times 10^{-8}$ M de Rianodina cambió la cinética de potenciación post-reposo del ventrículo (4). Las tiras de ventrículos que presentaron mayor potenciación post-reposo expresada en gramos y mayor fuerza de contracción de estado estable, fueron las de los grupo oleína+soya o soya: 4,7 g y 1,9 g respectivamente, respecto al grupo ratarina. Los ventrículos del grupo ratarina presentaron menor potenciación post-reposo en todos los distintos intervalos de reposo y menor fuerza de contracción en el estado estable. Al compara las respuesta de la fuerza de contracción post-reposo de los ventrículos del grupo ratarina, con los otros dos grupos, se encontró un aumento significativo ($p < 0,05$) de potenciación post-reposo en los ventrículos del grupos oleína + soya ó soya. No se encontraron diferencias significativas de la potenciación post-reposo de los ventrículos, al comparar el grupo oleína + soya con el grupo soya. Esta respuesta se podría explicar, porque estos grupos ingirieron mayor cantidad de lípidos totales por día, en relación al grupo ratarina y por tanto, tendrían mayor disponibilidad de ácidos grasos de cadena larga para producir mayor cantidad de ATP, posiblemente a través

de la activación de los receptores de activación de lo peroxisomas (PPAR) que promueven la beta oxidación en peroxisomas y mitocondrias en el músculo cardiaco (35).

Gráfico 7

Estudio cinético de la potenciación post-reposo, en tiras de ventrículo derecho de ratas.
Media \pm EE



El grupo ratarina presentó diferencias significativas ($p < 0,05$) de potenciación post-reposo, en todos los intervalos de reposo, respecto a los grupos con dieta suplementada con 5% de aceites vegetales comestibles. Tomado de Candelaria Alfonso Pérez (35).

II.3.- Los ácidos grasos.

Los ácidos grasos insaturados se agrupan en familias o series: n-3, n-6 y n-9 (Gráfico 8). Se utiliza la letra n (por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, IUPAC) o la letra omega (ω) para indicar que el primer enlace doble está situado a seis (n-6), tres (n-3) o nueve (n-9) átomos de carbono contados a partir del grupo metilo terminal (H_3C-), por

ejemplo la denominación del ácido linoleico como: C18:2,n-6, indica que contienen 18 átomos de carbono y dos enlaces dobles C=C, el n-6 es el número para indicar la posición del primer enlace doble C=C contado a partir del grupo carboxilo terminal; el nombre sistemático del C18:2,n-6 es 9,12 octadecadienoico. Los ácidos grasos linoleico (18:2,n-6) y alfa linolénico (18:3,n-3) son indispensables para las funciones metabólicas normales.

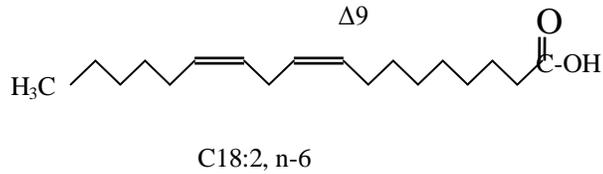
El valor del superíndice del símbolo delta (Δ) indica la posición del enlace doble a partir del carbono del grupo carboxilo. Los animales disponen de desaturasas capaces de introducir enlaces dobles en las posiciones 5, 6 y 9 (Δ^5 , Δ^6 y Δ^9) en los ácidos grasos con más de 16 carbonos, estas insaturaciones son de configuración "cis". Sin embargo, no podemos introducir enlaces dobles en posiciones posteriores al carbono 9, que sí realizan las plantas, ya que poseen desaturasas Δ^9 , Δ^{12} y Δ^{15} que les permite sintetizar el linoleico (C18:2, $\Delta^9, 12$) a partir del oleico (C18:1, Δ^9). Las elongasas alargan las cadenas de ácidos grasos hacia el extremo carboxilo. Esto hace que los ácidos linoleico (C18:2, n-6) y el linolénico (C18:3,n-3) sean esenciales en la dieta.

La eficacia de la desaturación varía en las diversas especies; la rata tiene un mecanismo de desaturasas muy eficiente, pero el gato requiere de ácidos grasos de cadena larga de la familia n-3 (36) como el ácido eicosapentaenoico (C20:5,n-3) que es abundante en la sardina. Los ácidos grasos insaturados de 20 a 22 átomos de carbono, derivados de los ácidos grasos linoleico y alfa linolénico se denominan ácidos grasos esenciales de cadena larga, los más importantes son el araquidónico (C20:4,n-6) de donde se originan las prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos y el docosahexaenoico (C22:6,n-3), presente en altos niveles en las células del sistema nervioso, espermatozoides, retina, (37). Cuando la ingesta de ácidos grasos esenciales disminuye, el organismo utiliza ácido esteárico (18:0) para formar el ácido oleico (18:1,n-9) a partir del cual se origina el ácido eicosatrienoico (20:3,n-9), estos constituyen la tercera familia de ácidos grasos poliénoicos que se encuentra en mayor proporción en el plasma en los animales y humanos con dietas deficientes de ácidos grasos esenciales (38).

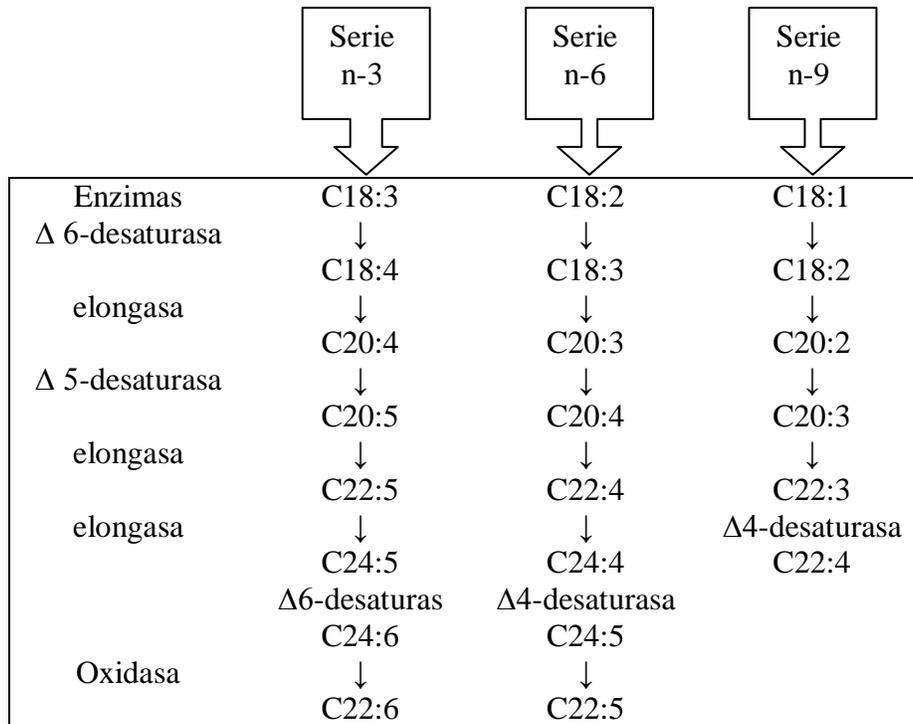
Gráfico 8

Series o familias de ácidos grasos, insaturación, elongación de la cadena y oxidación

a)



b)



a.-Estructura del ácido linoleico indicando la posición de las insaturaciones. b.-Series o familias n-3, n-6 y n-9 de los ácidos grasos y las enzimas desaturadas, elongadas y oxidasas que intervienen en la transformación de los ácidos grasos. Tomado de Kingsbury y col. (38).

II.4.- Músculo cardíaco y ácidos grasos

El músculo cardíaco puede utilizar como metabolitos a los ácidos grasos, la glucosa, el lactato y los cuerpos cetónicos como fuente de energía, de acuerdo a la condición metabólica del organismo. En condiciones fisiológicas el corazón utiliza como sustrato principal de energía en un 70% a los ácidos grasos y en un 30% a la glucosa. Por muchos años se pensó que el transporte de ácidos grasos a través de las membranas en las células del músculo era un proceso pasivo, pero las investigaciones en el área han localizado la existencia de proteínas que unen específicamente los ácidos grasos (FAB) y de las proteínas transferidoras (Gráfico 9) de ácidos grasos (FAT) (39,40).

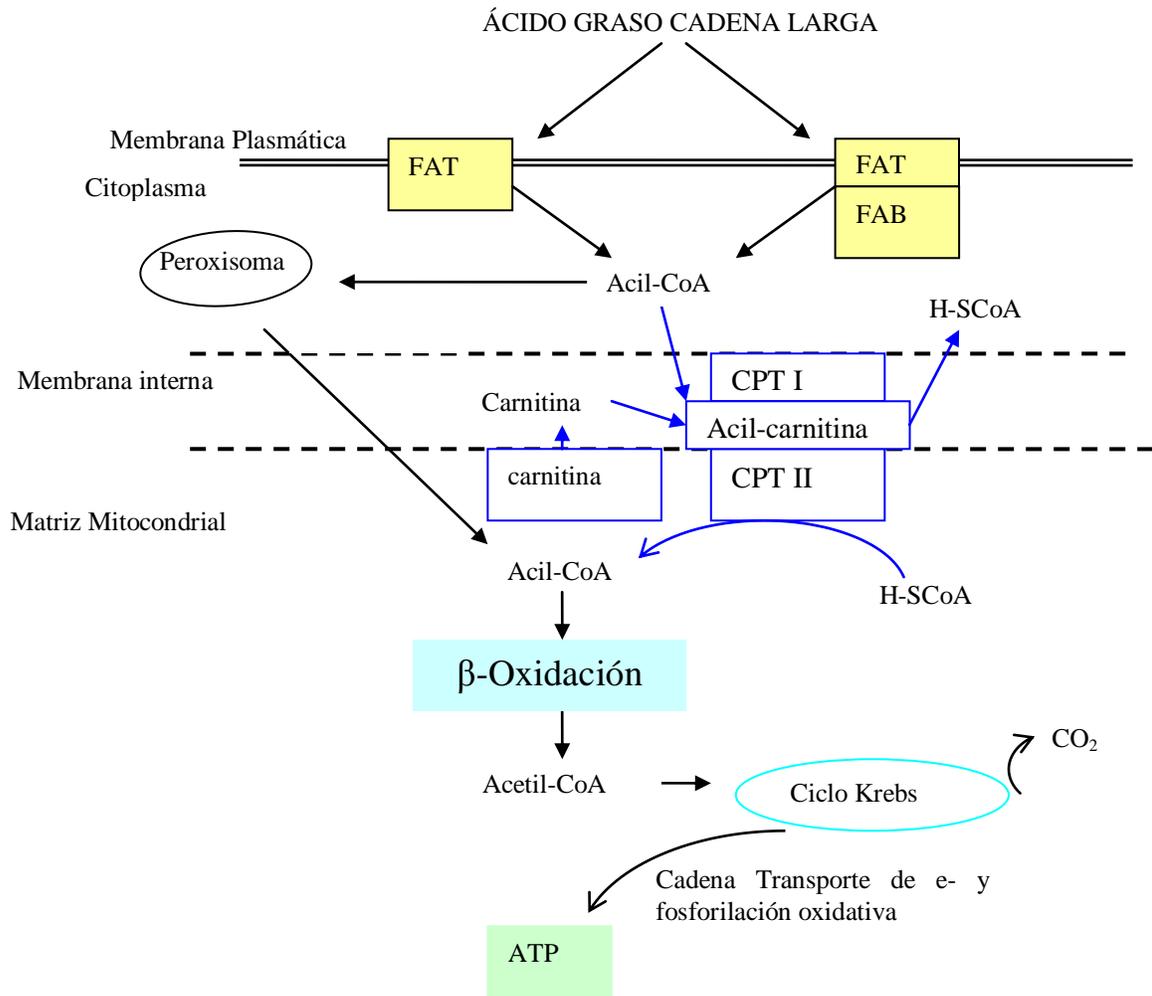
En el músculo cardíaco FAT se encuentra distribuida tanto a nivel celular (membrana plasmática) como a nivel subcelular (retículo endoplásmico), mientras que, el transportador de glucosa, el Glut-4, se encuentra predominantemente en la membrana plasmática y su redistribución está asociada a la respuesta de insulina (41). La captación de los ácidos grasos por el corazón depende en gran parte de la actividad metabólica del músculo cardíaco. Los ácidos grasos libres son utilizados principalmente para la obtención de energía mediante la β -oxidación para proveerse de ATP. El corazón utiliza los ácidos grasos liberados de la albúmina, de las lipoproteínas y los liberados de los fosfolípidos de las membranas mediante la acción de las fosfolipasas.

Los diacilglicéridos y ácidos grasos poliinsaturados *in vitro* pueden aumentar la actividad de la PKC (42). Una variedad de estímulos extracelulares causan liberación de ácido araquidónico (C20:4,n-6) y diacilglicéridos, Pi y Jeffery (43) encontraron que en miocitos ventriculares aislados, los ácidos grasos y los diacilglicéridos (DG) interactúan directamente con la PKC y además, la liberación transitoria de calcio incrementó paralelamente con el efecto inotrópico, sugiriendo que los ácidos grasos y DG participan en la regulación de la homeostasis del calcio.

Miocitos de neonatos tratados con Angiotensina II producen una elevación de diacilglicéridos vía acción de fosfolipasa A2 (FLA2) posiblemente activando subtipos de receptores, como los receptores adrenérgicos α_1 que están acoplados a la FLC y los receptores β_2 que están acoplados a la FLA2. La estimulación de FLC Y FLA2 pueden liberar DG y C20:4,n-6 en el corazón provocando respuestas inotrópicas positivas (45).

Gráfico 9

Transporte de los ácidos grasos y beta-oxidación peroxisomal y mitocondrial en miocitos cardiacos. Tomado de **Brian N. Finck y Daniel P. Kelly** (44).



Experimentos realizados en ratas machos adultos de la raza Wistar alimentadas con dieta estándar y agua *ad libitum* (46), en donde al grupo control se le inyectó por vía intraperitoneal solución fisiológica y a los otros grupos diferentes dosis de Epinefrina por 7 días (1, 2 ó 3 mg/Kg de peso corporal). Mostró que el primer día de inyección de epinefrina se incrementó significativamente el ácido oleico (18:1,n-9) en la fosfatidilcolina (FC) y en la fosfatidiletanolamina (FE) aislados del sarcolema del ventrículo de ratas. Este ácido graso en el tercer día de inyección, disminuyó significativamente en ambos

fosfolípidos y aumento significativamente el ácido linoleico (C18:2,n-6) y araquidónico (C20:4,n-6) en la FC, al compararlos con el grupo control. En el séptimo día de la inyección de epinefrina, el ácido docosahexaenoico (C22:6,n-3) aumento significativamente en ambos fosfolípidos, tanto si se compara con el primer día de inyección o con el control. El séptimo día de inyección de epinefrina se relaciona con una disminución del número total de receptores β , ("Down-regulation") con relación al control, éstos resultados soportaron la idea que alteraciones en la composición de los ácidos grasos de las membranas pueden influir en la respuesta de los segundos mensajeros en el músculo cardíaco. Estudios clínicos (47) han mostrado que el riesgo de muerte súbita se redujo en 50% en pacientes que han sobrevivido a infartos al miocardio al incluir en su dieta la familia de ácidos grasos C20:5,n-3 y C22:6,n-3 (especies de origen marino) y reduciendo simultáneamente los ácidos grasos de la familia n-6, alcanzando una relación n-3 / n-6 igual a uno. Los ácidos grasos de la familia n-3 inhiben las corrientes de calcio tipo L (48). Hagve y Sprecher (49) en corazones de ratas *Sprague-Dawley* perfundidos o en estudios de miocitos aislados donde se coloca ácido grasos marcado con ^{14}C tales como: C18:3n-3 ó C18:2n-6, encontraron que estas células no son capaces de desaturar o alargar la cadena carbonada de esos ácidos grasos, para producir ácidos grasos C20:5,n-3, C22:6,n-3 y C20:4n-6 por lo tanto, el corazón toma estos ácidos grasos de la circulación. En este punto existen controversias, ya que, Herelia y col. (50) en cultivos de miocitos de rata encontraron que los ácidos grasos esenciales C18:3,n-3 ó C18:2,n-6, sufren desaturación y alargamiento de la cadena de carbono, pero en presencia de docosahexaenoico (C22:6,n-3) se inhiben estos fenómenos.

En ratas que ingirieron dieta con aceite de pescado se observó que estaban protegidas contra la fibrilación ventricular inducida, al administrar en forma aguda altas dosis de catecolamina, mientras que, las ratas que ingirieron aceite de maíz presentaron fibrilación (51). McLennam y col. (52) han demostrado que animales que consumieron ácidos grasos poliinsaturados de la familia n-3 requieren significativamente mayor corriente de estimulación para inducir una fibrilación ventricular, en comparación con los que consumieron dietas con ácidos grasos de la familia n-6. En miocitos de ratas recién nacidas, se ha encontrado que el ácido oleico (C18:1,n-9) o los ácidos grasos saturados como: esteárico (C18:0), mirístico (C14:0) y láurico (C12:0), no afectaron la frecuencia de

contracción, mientras que, los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga como el C20:5,n-3 y C22:6,n-3 disminuyeron la frecuencia cardiaca, sin cambios significativo en la amplitud de las contracciones. Los ácidos grasos C18:2,n-6 ó C18:3,n-3 produjeron un efecto menor que los anteriores. El ácido araquidónico (C20:4,n-6) en algunos experimentos ocasionó aumentos de frecuencia y en otros disminución, pero en presencia de inhibidores de oxigenasa produce disminución de la frecuencia cardiaca (53). Huang y col. (54) han postulado que durante la isquemia en el tejido cardiaco, se concentra ácidos grasos no esterificados como el ácido oleico, araquidónico u otros ácidos grasos liberados de los fosfolípidos de las membranas que podrían estar asociados a un incremento del calcio intracelular. Estos ácidos grasos insaturados de cadena larga (oleico, linoleico, linolénico y ácido araquidónico) o saturados (palmítico, esteárico, araquídico) a concentraciones de 3 a 30 μM , incrementaron la ICa^{2+} indicando que activan los canales de Ca^{2+} . No obstante, ácidos grasos con 12 ó menos átomos de carbono o ácidos grasos esterificados no modifican las ICa^{2+} , señalando que la activación de los canales de calcio requieren ácidos grasos de cadenas largas y grupos carboxilos libres. Inhibición de las proteínas cinasas A, C o G y la producción de eicosaenoides u oxidaciones no enzimáticas, no bloquearon el incremento de la ICa^{2+} producida por los ácidos grasos libres y parece que los ácidos grasos de cadena larga activan directamente las ICa^{2+} actuando en sitios cerca del canal o en las proteínas del canal, esto explicaría las arritmias, disturbios en la conducción y efectos citotóxicos del calcio.

El perfil de ácidos grasos en las membranas de las células está directamente influenciado por la composición de los ácidos grasos de la dieta, pero además, esta sujeta a regulación endógenas. El consumo de aceite de pescado por 6 semanas altera la composición de los ácidos grasos de varios tejidos y los ácidos grasos en los fosfolípidos difieren marcadamente de los reportados en el plasma y en la dieta. Al suministrar a monos aceite de pescado que contenga 12 % de C20:5,n-3 y 28% de C22:6,n-3 se encontró que, en el miocardio de estos mamíferos los niveles del ácido graso C20:5,n-3 fue menor de 1% y el 30% fue de C22:6,n-3 además, se observó que el músculo cardiaco al igual que el cerebro acumula más ácido graso de la serie C22:6,n-3 (55).

El ácido graso C22:6,n-3 es una sustancia antiarrítmica potente, en relación al ácido C20:5,n-3, cuando se suministran en la dieta de ratas adultas. Mediante técnicas

electrofisiológicas de patch-clamp se determinó inhibición en un 50 % de la ICa^{2+} , cuando se adicionó 0,8 μ M de C20:5,n-3 a la solución que contenía un miocito aislado de rata recién nacida, resultados similares se encontraron con 2,1 μ M de C20:5,n-3 en miocito ventricular de rata adulta. Estos ácidos grasos poliinsaturados actuaron directamente disminuyendo la corriente de sodio (INa^+). Otros ácidos grasos que tuvieron el mismo efecto fueron: C22:6,n-3; C20:4,n-6; C18:3,n-3; 18:2,n-6 y además, produjeron inhibición de la corriente en los canales lentos de calcio ($ICaL$), fueron voltaje y tiempo dependiente, por lo cual estos ácidos grasos son antiarrítmicos (56). El ácido esteárico (C18:0) y el ácido monoinsaturado oleico (18:1,n-9) no produjeron efecto sobre las corrientes $I(CaL)$ (48). Leifert y col. (57) usando técnicas de patch-clamp encontraron que miocitos ventricular de ratas adultas, en presencia de ácidos grasos n-3 bloqueaban las INa^+ y se correlacionó con el aumento de la fluidez de la membrana, mientras que, los ácidos grasos: linoleico, oleico y esteárico, fueron menos efectivos en bloquear las INa^+ y no variaron significativamente la fluidez del sarcolema.

Es conocido que los ácidos grasos n-3 son antiarrítmicos debido a dos efectos en el retículo sarcoplásmico: ellos reducen la disponibilidad de calcio al RS e inhiben el mecanismo de liberación de calcio inducido por calcio (58). Honen y col. (59) han observado que los ácidos grasos no esterificados C22:6,n-3 y el ácido oleico, inhiben los receptores RyRs a concentraciones micromolares en miocitos ventriculares de ratas. Se ha encontrado que existe una relación inversa entre la composición de ácidos grasos de la serie n-3 en los fosfolípidos del músculo cardíaco, y una disminución de la frecuencia cardíaca (60). No obstante, Geelen y col. (61) no encontraron cambios en la frecuencia cardíaca en 84 humanos entre hombres y mujeres al suministrar 3,5 g / día de aceite de pescado por 12 semanas respecto al placebo.

Se han realizado estudios con ratones transgénico MHC-FATP, (Gráfico 10) cadena pesada de α -miosina-proteína transportadora de ácidos grasos), en estos modelos transgénicos, hay un incremento del transporte de ácidos grasos y su acumulación resulta en una disfunción diastólica similar a lo que ocurre en estados tempranos de cardiomiopatía diabética. Durante condiciones normales, aproximadamente el 60% del ATP es producido por la oxidación de los ácidos grasos y el remanente por el metabolismo de la glucosa, pero

cambios dramáticos pueden ocurrir en el miocardio diabético donde el 90 -100% del ATP producido es generado por la oxidación de los ácidos grasos (62).

En los miocitos ventriculares de los ratones transgénicos se encontró un aumento de la sensibilidad al calcio debido a una mayor expresión de isoformas β -MHC sustituyendo a las formas α -MHC y la función de los miofilamentos en los MHC-FATP, encontrándose una lenta cinética en la relajación, más que un cambio en el ciclo del calcio. Además, Flagg y col. (62) señalan que los cambios metabólicos son suficientes para generar una disfunción diastólica que también se observa en etapas tempranas de cardiomiopatía diabética, pero no descartan que en etapas posteriores de la diabetes exista alteración del manejo del calcio.

En el organismo, a partir de los ácidos grasos monocarboxílicos no esterificados se pueden sintetizar ácidos grasos dicarboxílicos por ω -oxidación, estas oxidaciones no son significante en las células normales, pero pueden incrementar en situaciones patológicas, como en la diabetes, que inducen peroxidación lipídica (63).

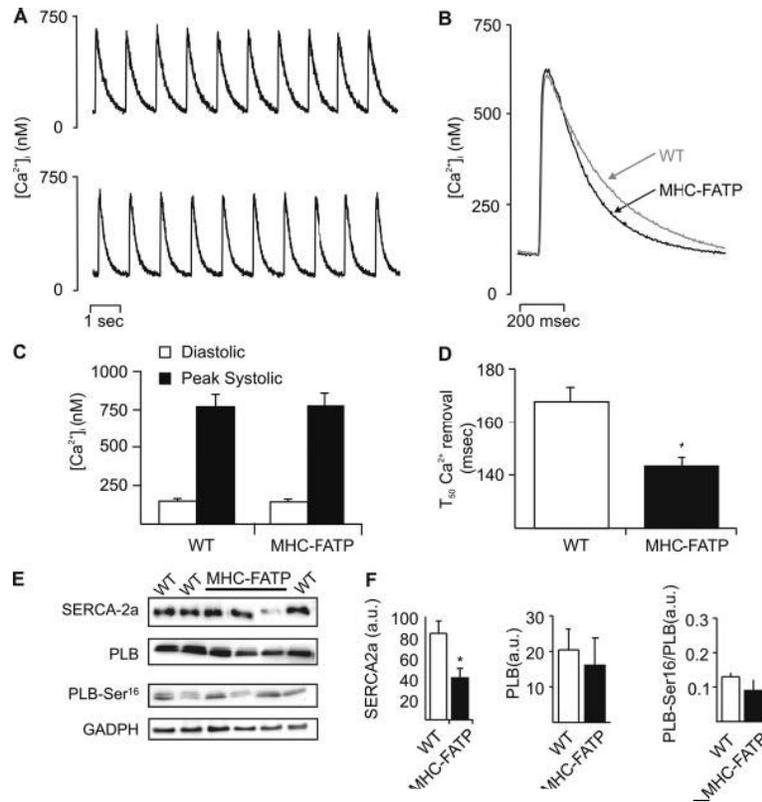
Barrer y col. (64) revelaron la existencia de una subfamilia de receptores nucleares denominados receptores activadores de la proliferación de peroxisomas (PPARs) cuyos factores de transcripción son activados por ligando y existen tres isoformas (PPAR α , PPAR β y PPAR γ). Estos receptores se encuentran en la membrana nuclear de varios tejidos incluyendo el músculo cardíaco y juegan un papel importante en el metabolismo de los lípidos, diferenciación, proliferación celular, procesos inflamatorios y adipogénesis.

En el corazón predomina el isómero PPAR α , que regula los genes asociados a la oxidación de los ácidos grasos en el corazón. Los ligandos de las PPARs pueden ser ácidos grasos, leucotrienos o prostaglandinas, palmitoiletanolamida y algunos fármacos .

La palmitoiletanolamida es una amida de ácido palmítico y etanolamina que presenta propiedades antiinflamatorias al activar selectivamente PPAR α *in vitro*, cuando dosis DE₅₀ de 3,1 \pm 0,4 μ M es aplicada tópicamente en la piel de ratones se induce la expresión de mRNA PPAR α (65). En cultivos primarios de cardiomiocitos se ha encontrado que la oleiletanolamida, una amida de ácido oleico, también actúan sobre los PPAR α aumentando la oxidación de los ácidos grasos (66). Este descubrimiento fue de gran

Gráfico 10

Alteración de la cinética de la relajación de miocitos ventricular de ratones transgénicos (MHC-FATP) y ratones normales (WT), frecuencia 1Hz. tomado de Flagg y col.(62)



A y B, muestra registros del $[Ca^{2+}]_i$ de células WT y MHC-FATP. C, pico diastólico y pico sistólico de $[Ca^{2+}]_i$. D, no fueron diferentes en la diástoles o pico de $[Ca^{2+}]_i$, la tasa de $[Ca^{2+}]_i$ eliminada (T_{50} tiempo en declinar 50% en el pico $[Ca^{2+}]_i$) fue significativo ($P < 0,05$) rápida en MHC-FATP comparada con ratones normales. E y F, Representan Western blots. (E) datos de expresión de proteínas acumulada. (F) para SERCA-2a y PLB. Es evidente la expresión de SERCA disminuida, la expresión PLB no fue afectada in MHC-FATP, comparada con ventrículos de ratones normales.(62)

importancia pues existen evidencias que la cardiomiopatía diabética puede estar relacionada con alteraciones en el metabolismo energético o intermediarios tóxicos que se pueden acumular en el miocito cardiaco (67).

Los ácidos grasos o sus metabolitos regulan factores de transcripción específicos que median en procesos asociados a metabolitos, eicosanoides /producción de factores de

II.5.- Efectos de la diabetes mellitus en el músculo cardiaco.

Durante la segunda mitad del siglo pasado se observó un incremento pandémico de la Diabetes Mellitus, asociada entre otros factores a los malos hábitos alimenticios con dietas basadas en comidas ricas en grasas y carbohidratos y al sedentarismo característico de la sociedad urbana contemporánea con estilo de vida occidental (69). La diabetes mellitus constituye un problema de salud pública en el mundo, en Venezuela existe un millón de personas afectadas por esta enfermedad que se caracteriza por ser un síndrome metabólico con hiperglicemias sostenidas. Su patogenia se puede resumir como un déficit total o parcial de insulina (diabetes tipo 1) o a un estado de resistencia a la insulina (diabetes tipo 2) (70). La epidemiología de la enfermedad cardiovascular en la población norteamericana en general se investigó mediante los estudios de Framingham en 1949 (71), donde se evidenció, durante 18 años de seguimiento, que los diabéticos incluidos en el estudio tuvieron una morbilidad y una mortalidad aumentada para todas las causas cardiovasculares.

En Venezuela se han descrito las principales características epidemiológicas de la diabetes en el país en base a los datos de morbilidad disponibles y las estadísticas de mortalidad publicadas en los Anuarios de Epidemiología y estadística Vital hasta 1996 y en los anuarios de Mortalidad del Ministerio de de salud y Desarrollo Social año 2000. En relación con la mortalidad por Tipo en el año 2000, el 3,8 % correspondió a la mortalidad por diabetes tipo 1, el 58,5 % al tipo 2 y 37,7 % a diabetes no especificada según tipo. Se estima que la mortalidad real por esta causa sea mucho mayor, pues una proporción importante se atribuye a enfermedades del corazón, accidentes cerebro-vascular o neuropatías. Se estima un posible subregistro en nuestro país, cuyo promedio sería del 42,2 % (72).

En los pacientes diabéticos se ha encontrado que la principal causa de muerte es la falla cardíaca congestiva. Un factor que contribuye a la insuficiencia cardíaca en estos pacientes es la cardiomiopatía independiente de complicaciones en las arterias coronarias e hipertensión, que se manifiesta en principio como una disfunción diastólica que conlleva a una disfunción sistólica (73).

Se ha demostrado la existencia de cambios en el corazón de pacientes diabéticos jóvenes asintomáticos que tienen anomalías funcionales cardíacas sin enfermedad coronaria ni

hipertensión arterial (74). La enfermedad muscular cardíaca diabética ocurre tanto en la diabetes tipo 1 (insulinopénicos y propensos a cetoacidosis con destrucción de las células beta) como en los diabético tipo 2 (no insulina dependientes que presentan un mayor porcentaje de grasa abdominal), y esto sugiere que la hiperglicemia y los cambios metabólicos asociados probablemente son los que influyen en la enfermedad muscular cardíaca diabética (75), también denominada cardiomiopatía diabética (76).

La mayoría de los estudios experimentales de la función del miocito cardíaco en ratas diabéticas, se ha realizado induciendo la diabetes Mellitus tipo 1 con alloxan o estreptozotocina; esta última droga tiene la ventaja que a menor dosis intravenosa (50 mg / kg de peso corporal) un 90% de las ratas son diabéticas, mientras que, el alloxan produce diabetes sólo a un 60% de las ratas (80).

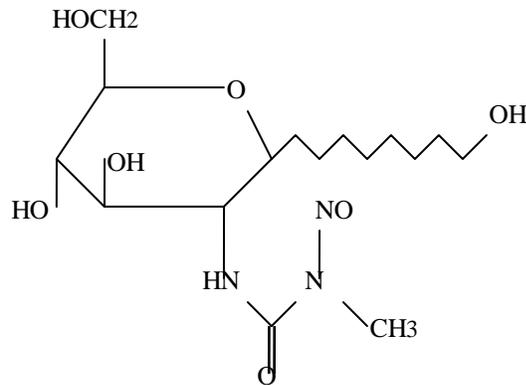
La estreptozotocina (STZ) es un agente beta-citotóxico (Gráfico 12) de los islotes de Langerhans; su toxicidad es altamente selectiva para las células beta del páncreas y es utilizado para producir diabetes experimental tipo1 en animales (77), los animales diabéticos con el tiempo desarrollan cardiomiopatías y la causa de la disfunción miocárdica que se produce, se cree es multifactorial y aparentemente está relacionada con los cambios metabólicos asociados a los lípidos y a los carbohidratos. La insuficiencia cardíaca que se puede desarrollar en estos modelos es comparable a la observada en pacientes diabéticos no dependientes de insulina (78).

El alloxan es otra sustancia utilizada para producir diabetes mellitus, estudios histológicos muestran que esta sustancia disminuye el número, tamaño de las células beta e infiltración de linfocitos en los islotes pancreáticos produciendo daño y muerte de las células beta del páncreas. Tanto el alloxan como la estreptozotocina inducen la fragmentación del ADN en las células beta del páncreas con la sucesiva muerte celular (80).

En estudios de la captación de ^{45}Ca en el retículo sarcoplásmico (RS) en las ratas después de 7 - 120 días de inducir la diabetes con alloxan o estreptozotocina, se encontró que ni a los 7 o 120 días hubo diferencias significativas entre la captación de calcio por el RS, no

Gráfico 12

Estructura representativa de la sustancia diabotogénica, N-[Metilnitrosocarbamil]-D-glucosamina (Estreptozotocina), Tomado catálogo Aldrich (79).



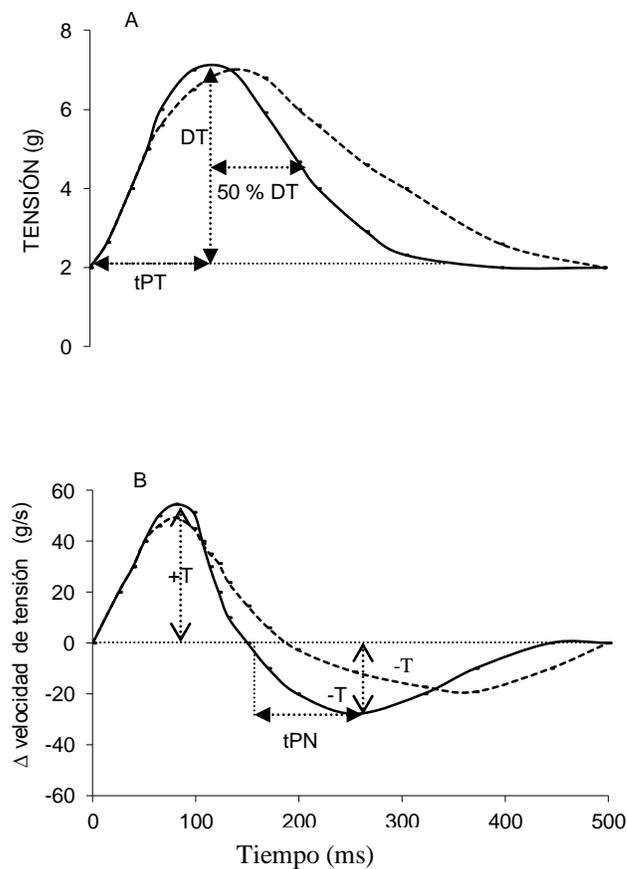
obstante, se presentó una disminución significativa de la velocidad de captación del calcio por el RS de las ratas diabéticas. Lo que se atribuyó a una disminución de la actividad de la ATPasa Ca^{2+} del RS y no a efectos tóxicos del alloxan o estreptozotocina, debido a la acción detergente de la L-palmitoilcarnitina, ya que, la porción hidrofóbica a concentraciones submicelar puede ser incorporada en la membrana del RS y alterar la actividad de la ATPasa Ca^{2+} que es altamente dependiente del microambiente lipídico (81). Fein y col. (82) indujeron la diabetes por inyección de estreptozotocina a ratas hembras de la raza *Wistar* y encontraron que después de un periodo de 5, 10 o 30 semanas en los estudios isométricos de los músculos papilares aislados del ventrículo izquierdo de las ratas, la tensión pico y la velocidad al pico de tensión son ligeramente menores en el ventrículo de las ratas diabéticas y se nota la mayor diferencia durante la relajación (Gráfico 13). También se observó en las ratas diabéticas el tiempo para desarrollar el pico de tensión fue menor y el tiempo de relajación se prolongó en un 50% y la velocidad del pico fue menor y persiste hasta las 30 semanas de estudio. La extensión del acortamiento en reposo del músculo a una precarga dada, no difiere entre el grupo diabético y el control este trabajo muestra que la actividad muscular cardíaca está alterada en la diabetes.

Con frecuencia la cardiomiopatía diabética se asocia con las alteraciones metabólicas, pero la interpretación de los estudios realizados en tejidos intactos *in vivo* ha sido compleja, pues es difícil interpretar ciertos resultados por la interferencia de los otros tejidos, de ahí

surge la idea de Horackova y Murphy (83) de realizar estudios en miocitos ventriculares aislados de ratas diabéticas con el fin de estudiar la respuesta contráctil a varios agentes inotrópico y el transporte de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, además de estudiar el perfil de ácidos grasos de sus fosfolípidos.

Gráfico 13

Contracción isométrica del músculo papilar con 10 semanas de diabetes, $[\text{Ca}^{2+}]_e = 2,4\text{mM}$, de ratas diabéticas (- - -) y no diabéticas (—). Tomado de Fein y col. (82).



En los gráficos se observa: A) desarrollo de tensión en gramos (DT) y tiempo del pico de tensión (tPT), B) Cambios de velocidad de tensión, positiva (+T) y negativa (-T) y tiempo desde la tensión pico a la caída de la velocidad de tensión pico (tPN).

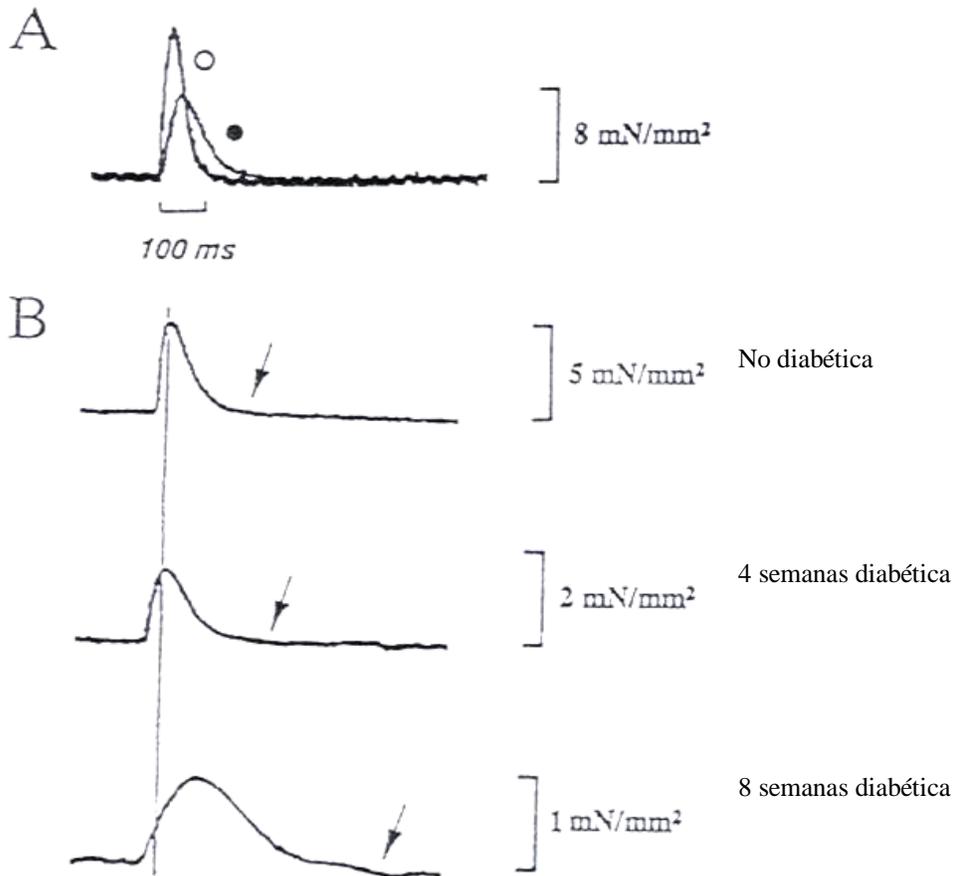
Cuando los miocitos aislados de ratas hembras *Sprague Dawley* diabéticas y no diabética, se someten a varios agentes inotrópicos tales como 10^{-7}M isoproterenol, 10^{-4}M ouabaina, 10^{-5}M acetilcolina, 10^{-6}M fenilefrina, 10^{-6}M Epinefrina y $8 \times 10^{-7}\text{M}$ veratridina, se encontró

una disminución de la respuesta contráctil en los miocitos diabéticos a los agonistas alfa y beta adrenérgicos (isoproterenol, epinefrina y fenilefrina) y una disminución de la respuesta a acetilcolina y a la ouabaina, mientras que, la veratridina produjo una prolongación en la fase final de la repolarización en los miocitos diabéticos, posiblemente por incremento de la actividad del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y las contracciones sostenidas pudieron ser debidas a la entrada de Na^+ (83). El transporte del $^{45}\text{Ca}^{2+}$ a través del sarcolema y la captación por el RS fue deficiente en miocitos ventriculares aislados de ratas diabéticas y se correlacionan con una respuesta contráctil prolongada con los diferentes agentes inotrópicos en los grupos con diabetes. El perfil de ácidos grasos en los fosfolípidos de los miocitos ventriculares encontrados por estos investigadores, fue similar tanto en las ratas diabéticas como en las no diabéticas y además, en los estudios de ultraestructura de miocitos aislados no mostraron cambios significativos aunque se observó mayor cantidad de gránulos de glucógeno en los miocitos de ratas diabética. (83) En estudios de ultraestructura en tejidos ventricular de ratas diabéticas se ha observado un aumento de los espacios entre los discos intercalados (84).

Bouchard y Rose (85) estudiaron las alteraciones contráctiles en trabéculas de ventrículo derecho de ratas con 4 y 8 semanas de diabetes y observaron que el tiempo pico disminuye y el curso temporal de la contracción isométrica aumenta con la duración de la enfermedad (Gráfico 14). Los mismos autores reportaron que el grado de la potenciación post-reposo decrece con la duración de la enfermedad, la potenciación post-reposo disminuyó al disminuir la frecuencia de 0,2 a 0,5 Hz y con 1,25 mM de calcio extracelular $[\text{Ca}^{2+}]_e$, con un intervalo de reposo de 30 s. Al incrementar la frecuencia a 1 Hz ó la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ a 2,5 mM, se eliminó aparentemente la carga de Ca^{2+} del RS. A las 8 semanas de diabetes, la potenciación post-reposo y la fuerza de contracción del estado estable estaban disminuidas (Gráfico 15). La disminución de la potenciación puede ser debida a disminución del calcio en el RS.

Gráfico 14

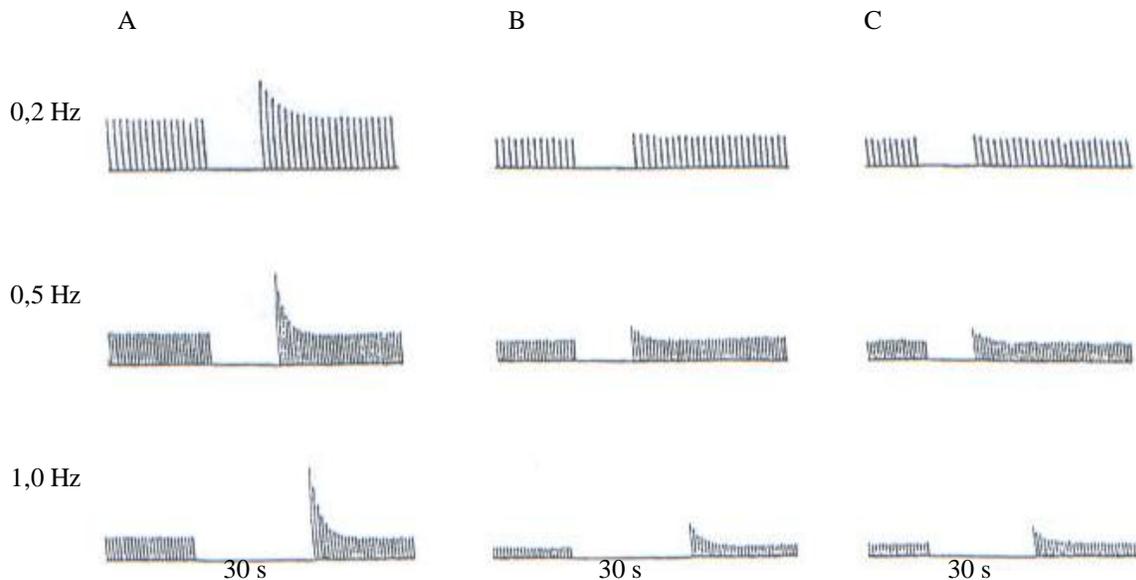
Curso temporal de la contracciones isométricas en trabéculas aisladas de ratas con $[Ca^{2+}]_e = 1,25 \text{ mM}$. Tomado de Bouchard y Rose (85)



A.- Superposición de registro de contracción a nivel de estado estable a las 8 semanas con diabetes (•) y sin diabetes (o). B.- Registro de la contracción de estado estable a 0,2 Hz en el control, a las 4 y 8 semanas con diabetes. La flecha indica el tiempo requerido para completar la relajación para cada contracción. (mN/mm²) unidades de fuerza normalizadas por área de sección transversal de músculo

Gráfico 15

Ilustración de registros de contracción post-reposo con intervalo de reposo de 30 segundos de trabéculas de ventrículo derecho de rata: A.- no diabéticas, B.- 4 semanas diabéticas, C.- 8 semanas diabéticas. En presencia de $[Ca^{2+}]_e = 1,25 \text{ mM}$ a frecuencias de 0,2; 0,5 ó 1 Hz. Tomado de Bouchard y Rose (85)



La alteración del contenido de calcio en el RS en ratas diabéticas fue estudiado por Zhen y col. (86) quienes encontraron en miocitos aislados del corazón de ratas diabéticas una disminución tanto de la contracción celular como en la contractura producida por 20mM de cafeína (que es una medida indirecta del contenido de calcio del RS). Además, mediante enfriamiento rápido (RCC) los miocitos aislados de ratas diabéticas presentaron menor contractura (Gráfico16) que las ratas no diabéticas y las diabéticas con insulina.

Zhong y col. (87) mostraron que en ratas diabéticas tanto la captación de Ca^{2+} por el RS como la afinidad de la $ATPaseCa^{2+}$ (SERCA2) estaban disminuidas y a las 6 semanas con diabetes se encontró una disminución de la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) de recaptación de calcio por el RS. Al determinar las concentraciones de las proteínas SERCA2 y del receptor de rianodina (RYR) en las ratas con 4 semanas de diabetes, (Gráfico 17) se encontró que las densidades fueron menores que las encontradas en las ratas no diabéticas y al inyectar a las ratas diabéticas con insulina por dos semanas, se observó reversión del efecto.

Gráfico16

Producción de contracturas por enfriamiento rápido (RCC) en miocitos ventriculares de ratas no diabéticas (N=57), diabéticas (N=47) y diabéticas tratadas con insulina (N=41). *p< 0,05 Zhen y col. (86)

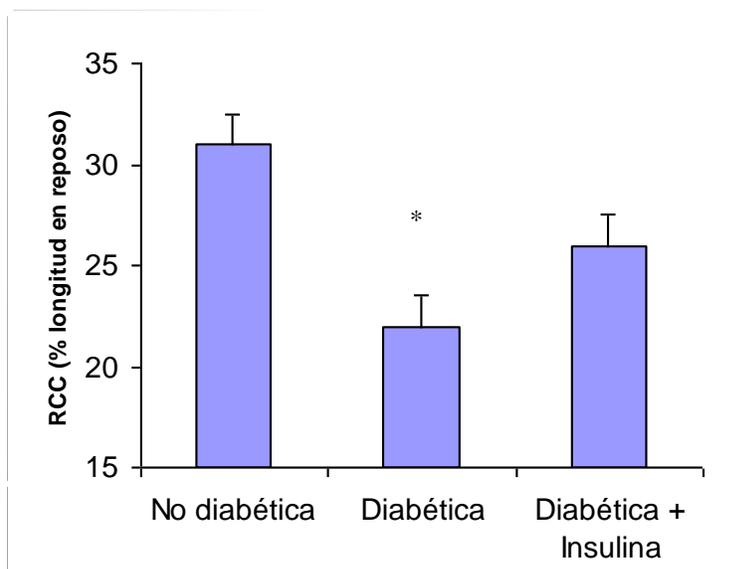
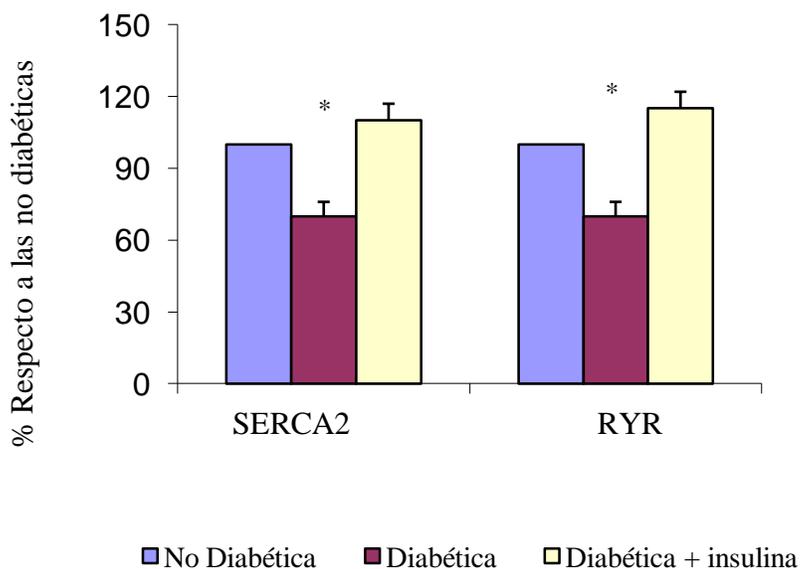


Gráfico 17

El Gráfico muestra la disminución de la densidad SERCA2 y del RYR, en ventrículos de ratas (n=4), no diabéticas, diabetes (4 semanas), diabéticas + insulina. (*) Diferencia respecto a la no diabética con p< 0,05. Zhong y col. (87)



Jourdon y Feuvray (88) mediante técnicas de voltaje controlado en miocitos aislados de ratas y en presencia de 0,001mM de rianodina, encontraron un ligero incremento no significativos en las ICa^{2+} del tipo L y una disminución significativa en las corrientes rectificadora retardada de potasio (IK) (corriente asociada a la fase lenta de la repolarización en el potencial de acción) en las ratas diabéticas (Gráfico18). Estos investigadores piensan que es razonable concluir que la IK en miocitos diabéticos puede contribuir a alargar el tiempo del potencial de acción en ratas diabéticas.

Guo y col. (89) en cultivos de miocitos ventriculares de ratas neonatas no diabéticas, observaron que la expresión de canales de potasio puede ser regulada por acción de un factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I). Además, existe una interesante correlación entre la regulación del transportador de glucosa, GLUT4 y la fracción $\alpha 2$ y B1 de la ATPasa Na^+/K^+ pues ambos transportadores son sintetizados en el citoplasma de la células y transportados a la superficie en lugares distintos de la membrana plasmática por acción de la insulina, además, la insulina está involucrada en la regulación de una series de señales intracelulares. La ATPasa Na^+/K^+ mantiene el gradiente electroquímico que genera el potencial de membrana por la diferencia de permeabilidad de los iones de Na^+ y K^+ a través de la membrana (90).

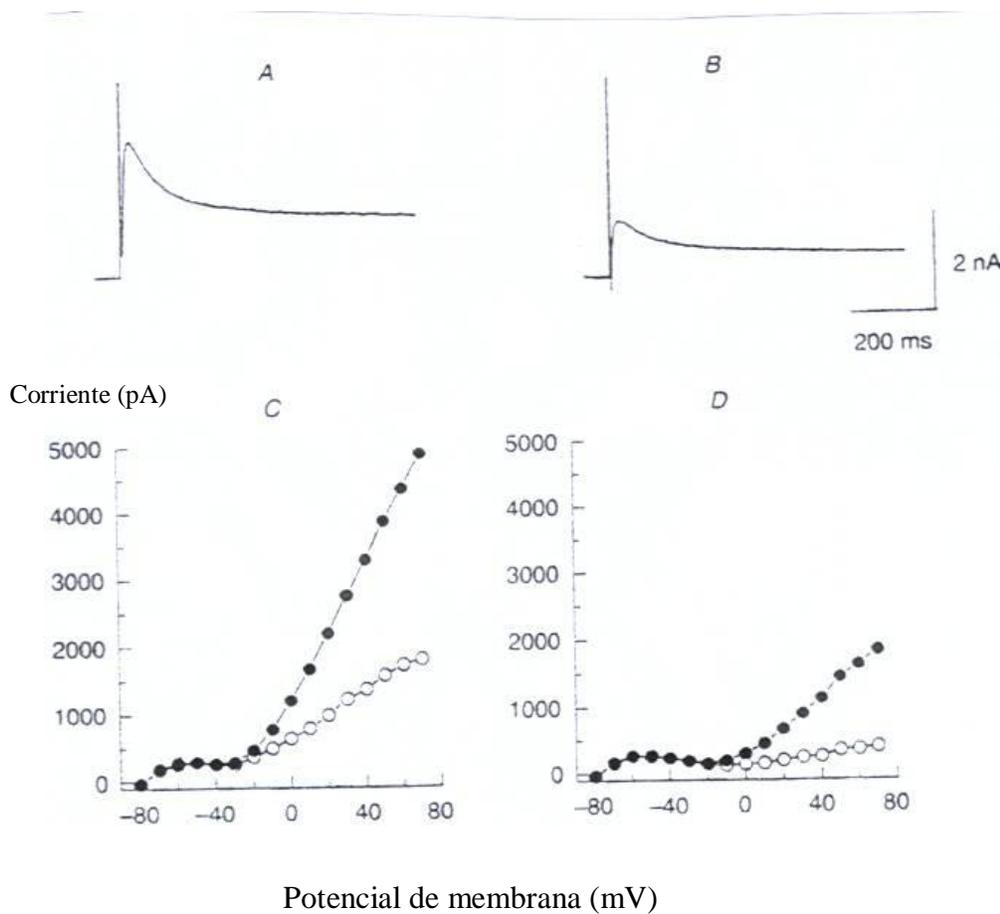
La alteración de la permeabilidad de estos iones, puede producir cambios del pH intracelular (pHi) del miocardio que normalmente es 7,2; pero debido a la existencia de un intercambiador Na^+/H^+ que utiliza la energía del gradiente de Na^+ entre los dos compartimientos, para regular el pHi, intercambiando un ión Na^+ por uno de H^+ , se impide cambios del pHi que podría indirectamente alterar la $[Ca^{2+}]_i$ por acción del intercambiador Na^+/Ca^{2+} (91). No obstante, en miocitos de ratas diabéticas disminuye la $[Ca^{2+}]_i$ sin diferencias significativas del pHi (92).

Lagadic-Gossmann y col. (93) en miocitos cardiacos aislados de ratas después de 3 a 4 semanas con diabetes, encontraron que la $[Ca^{2+}]_i$ tanto en la diástoles como en la sístoles es menor que en las ratas no diabéticas (Gráfico19). La disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ pudo ser debido a una estimulación de la salida de Ca^{2+} , al aumento de la actividad de la ATPasa Ca^{2+} , al intercambiador Na^+/Ca^{2+} o a la ATPasa Ca^{2+} RS. En este trabajo además, se observó una disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ en el pico en sístoles en miocitos ventriculares aislado de la ratas diabéticas, la mayor cantidad del calcio encontrado en el citosol fue en

sístoles y provino del RS. La aplicación de 10 mM de cafeína a miocitos diabéticos mostró que el calcio liberado del RS fue menor que en el grupo control, así como,

Gráfico 18

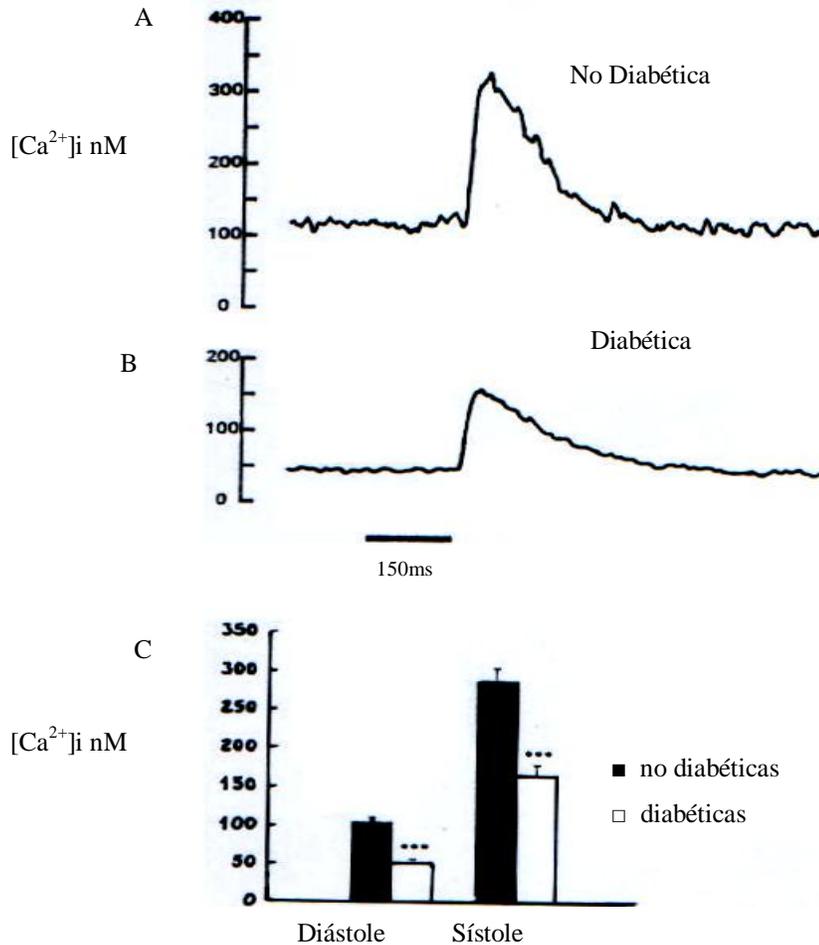
Las figuras A y B representan corrientes de salida de potasio en miocitos ventriculares de ratas no diabéticas (A) y diabéticas (B). En las figuras C y D se muestra la relación corriente - voltaje, donde se midió la amplitud del pico de I_{K} (•) y la corriente de estado estable (o) en un miocito no diabético (C) y diabético (D). Tomado de Jourdon y Feuvray (88)



el incremento sistólico de calcio debido a la disminución en la recaptación de Ca^{2+} por el RS, por acción de la ATPasa Ca^{2+} y no a una mayor eliminación de Ca^{2+} del miocito diabético por el intercambiador Na^{+}/Ca^{2+} , ya que, la salida neta de Ca^{2+} no fue afectada.

Gráfico 19

.Efectos de la diabetes sobre la concentración intracelular $[Ca^{2+}]_i$ en la diástoles y en el pico sistólico de miocitos aislados de ratas. Tomado de Lagadic-Gossmann y col. (93)



A y B representan promedio de registros $[Ca^{2+}]_i$ en miocitos diabéticos y no diabéticos en el pico sistólico. C) Promedio de la $[Ca^{2+}]_i$ en la diástole y pico sistólico para ratas no diabéticas y diabéticas a la frecuencia de 1 Hz, (***) $p < 0,001$.

Kuwahara y col. (94) reportaron que ratas *Wistar* machos después de 8 semanas con diabetes presentaron disminución de la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ en la membrana plasmática y un aumento de la cantidad de la fosfatidilcolina y fosfatidilserina, además, se encontraron que a las 4 semanas, en la membrana del RS de las ratas diabéticas, los ácidos grasos de los fosfolípidos presentaron un aumento significativo de ácido graso docosahexaenoico (C22:6,n-3) y una disminución del ácido araquidónico (C20:4,n-6), estas alteraciones fueron revertidas en presencia de insulina (Tabla 1). No obstante, Han y col.

(95) reportaron que el aumento de los triacilglicéridos en forma de triacilpalmitina en el corazón de las ratas diabéticas fue 5 veces mayor que en las ratas no diabéticas y no es corregido por la presencia de insulina. Se ha encontrado que cuando se aíslan las enzimas ATPasa Ca^{2+} o a la ATPasa Na^+/K^+ de las membranas, estas interactúan estrechamente con los lípidos de membrana ya que, la región hidrofóbica de las proteínas de membrana son estabilizadas en la membrana a través de sus interacciones con los lípidos (96).

Tabla 1

Ácidos grasos en los fosfolípidos del RS en el corazón de ratas Wistar diabéticas por varias semanas y tratadas con insulina.(% respecto al total de los ácidos grasos). Tomado de Kawahara y col. (94)

Ácidos grasos	NO DIABÉTICAS	DIABÉTICAS					Más insulina
		Semanas después de la inyección de estreptozotocina					
		4	6	8	12		
C16:0	17,4 ± 2,4	18,2 ± 1,1	17,4 ± 0,9	17,4 ± 3,6	17,0 ± 3,8	17,2 ± 1,1	
C18:0	25,8 ± 5,6	26,5 ± 1,0	27,4 ± 2,8	26,5 ± 3,9	27,9 ± 5,5	26,2 ± 1,1	
C18:1	8,0 ± 1,7	6,8 ± 1,8	7,1 ± 1,2	6,0 ± 1,9	6,5 ± 2,1	7,9 ± 0,7	
C18:2	18,4 ± 2,8	16,0 ± 3,4	16,7 ± 2,6	22,4 ± 6,2	20,2 ± 6,7	15,9 ± 1,5	
C20:4	22,6 ± 5,5	21,7 ± 2,6	19,1 ± 3,7	16,9 ± 4,4*	17,6 ± 3,6*	22,6 ± 0,7	
C22:6	8,1 ± 2,2	10,7 ± 2,4*	12,3 ± 3,2*	10,8 ± 4,0	10,4 ± 3,5	10,2 ± 1,3	

El grupo con diabéticas (8 semanas) más insulina (insulina tratamiento por 4 semanas). (*) = $p < 0,05$.

Huang y col. (54) estudiaron la composición porcentual de los ácidos grasos de los fosfolípidos de varios tejidos de ratas machos Sprague-Dawley de 3 semanas diabéticas y alimentadas con ratarina, encontrando disminuido el ácido palmítico (C16:0) y ácido araquidónico (C20:4,n-6) en los fosfolípidos del corazón de las ratas diabéticas, mientras que, se encontró un aumento en el ácido esteárico (C18:0), el ácido linoleico (C18:2,n-6) y el eicosatrienoico (C20:3,n-6) con respecto a los fosfolípidos de corazones del grupo de ratas no diabéticas. Se cree que los cambios fueron debido al patrón de incorporación de

estos ácidos grasos a los tejidos y a una disminución de la actividad de las enzimas desaturadas delta 5 y delta 6 (Δ^5 y Δ^6).

Dang y col. (97) han estudiado el efecto de varias dietas preparadas con 20% de diferente aceites (aceite de coco hidrogenado, aceite de girasol o aceite de pescado) más 0,1% de colesterol, por un periodo de 4 semanas, sobre la composición de los ácidos grasos y la actividad de la enzima Δ^5 desaturasa en ratas diabéticas y no diabéticas. En los microsomas hepáticos de las ratas diabéticas encontraron una disminución significativa de la actividad de la Δ^5 desaturasa en las distintas dietas con respecto a las no diabéticas. Estos resultados se correlacionan con los reportados por Eck y col. (98) en los microsomas hepáticos de ratas diabéticas encontraron una disminución de 64% la actividad de las enzimas Δ^6 desaturasa y un 22% de la actividad Δ^9 desaturasa, con respecto a la actividad de los microsomas de las ratas no diabéticas. La captación a través de la membrana plasmática de ácidos grasos de cadena larga es un proceso mediado por las proteínas transportadoras de ácidos grasos, las FAT/CD36 (homóloga a la proteína humana CD36 en la membrana) y las FAB, las cuales se encuentran en la membrana plasmática y en el citoplasma de las células musculares. En ratas obesas *Zucker* el transporte de ácidos grasos está aumentado tanto en el músculo esquelético como en el músculo cardíaco. La mayor expresión del transportador (FAT) no fue debido a una mayor síntesis, sino al aumento del transporte de estas proteínas del lugar de almacenamiento hacia la membrana plasmática. El transportador de glucosa (GLUT4) es movilizado por insulina desde su lugar de almacenamiento interno a la membrana plasmática en animales sanos, mientras que, en los músculos cardíaco y esquelético de ratas obesas el transporte de GLUT4 es inhibido en presencia de insulina. Estos experimentos mostraron que el patrón de distribución de los transportadores en la membrana plasmática es distinto, también en los compartimentos intracelulares parecen ser diametralmente opuestos en las ratas obesas (99). Cuando se induce diabetes en ratas, se ha encontrado que el transporte de ácidos grasos está aumentado en el músculo cardíaco y esquelético debido a un incremento del transportador (FAT) en la membrana plasmática (100). Luiken J y col. (101) observaron en ratas donde se indujo diabetes tipo 1 moderada o severa, un aumento del transporte de ácidos grasos que se correlaciona con un aumento del transportador FAT/CD36 en ambos estados y un

aumento del RNAm del FABP de la membrana plasmática en el músculo cardíaco en la diabetes severa.

Wright y col. (102) sometieron a ratones machos de la cepa DC-1 a una dieta deficiente de ácidos grasos esenciales por 1 mes, encontraron que estos eran resistentes a sufrir de diabetes inducida por estreptozotocina inyectada por vía intraperitoneal en múltiples dosis a bajas concentraciones (40 mg/Kg de peso/5 días) con respecto a los ratones controles. Estos investigadores sugirieron una relación de los lípidos como mediadores de la respuesta inmune.

En otros trabajos, Wright y col. (103) muestran que en ratones machos no obesos de Balb/cByJ, DBA/2J y C57BL/6J sometidos a dietas deficientes de ácidos grasos esenciales por 2 meses, al inyectar bajas dosis de estreptozotocina (40mg/Kg de peso/5 días) se encontró una disminución significativa de la concentración de glucosa en plasma en relación a los grupos control en cada cepa. Houseknecht y col. (104) han reportado que ácidos grasos conjugados previenen el desarrollo de diabetes mellitus en ratas *Zucker* obesas.

Se cree que el efecto de este ácido graso poliinsaturados y la droga Tiazolidinedionas (empleada en tratamiento de la diabetes tipo 2) es por la activación de los receptores (ubicados a nivel nuclear) de proliferación de los peroxisomas (PPARs) que inducen la expresión de genes (Gráfico 11) que codifican proteínas, las cuales responden a la acción de la insulina, tales como los transportadores de glucosa (105). En estudios realizados *in vitro* (106) con cultivo de células aisladas de un insulinoma, donde 1×10^5 células fueron incubadas por 5 horas con los ácidos grasos poliinsaturados: linoleico, linoleico conjugado, araquidónico, eicosapentenoico o docosahexenoico, a diferentes concentraciones (5, 10, 15 $\mu\text{g/mL}$) y luego se le agregó alloxan a diferentes concentraciones (1 a 12 mM) por 1 hora, se encontró que 15 $\mu\text{g/mL}$ ácido araquidónico fue más efectivo en proteger las células del efecto citotóxico producido por el alloxan. Simultáneos tratamientos con ácido araquidónico y alloxan, también previenen la citotoxicidad.

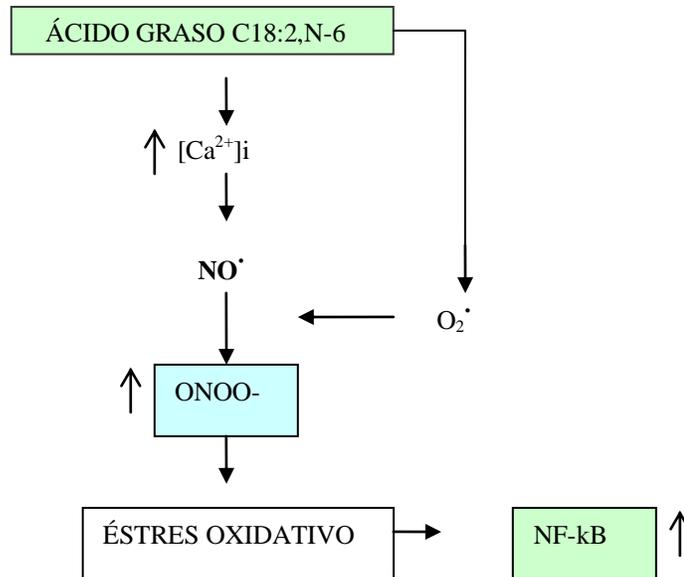
En un diseño experimental similar, *in vivo* (106) ratas machos de la raza *Wistar* se trataron durante 5 días con ácido linoleico por vía oral (100 μg) antes de inyectar por vía intraperitoneal, 75 mg de alloxan /Kg de peso, la diabetes se manifestó en 40 % de las ratas, mientras que con tratamientos simultáneos de ácido linoleico y alloxan, sólo el 30 %

de animales se hicieron diabéticas. Cuando se suministró simultáneamente el ácido araquidónico y alloxan, el 10 % de las ratas presentaron diabetes tipo 1. El pretratamiento con los ácidos grasos eicosapentaenoico, docosahexaenoico, araquidónico y ácido linoleico conjugado previno completamente la diabetes tipo 1. El efecto protector del ácido araquidónico y de los otros ácidos grasos poliinsaturados se cree que fue mediado por las PPARs, ya que estos ácidos grasos son ligando de dichos receptores y pueden disminuir la expresión de citoquinas por inhibición de factor nuclear kappa B(NF-kB) por acción del inhibidor Kappa B-alfa ($I\kappa B\alpha$) atenuando los procesos de inflamación.

En la dieta de los países americanos se consumen aceites vegetales que poseen un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados de la serie o familia n-6, tales como: aceite de maíz, aceite de girasol, aceite de soya que poseen un alto contenido de ácido linoleico (C18:2,n-6). Este ácido graso, liberado por hidrólisis de las lipoproteínas ricas en triacilglicéridos, puede ser causante del daño endotelial y diabetogénico en el cual se ha encontrado un incremento de la activación del factor transcripcional NF-kB. Cuando se cultivan células endoteliales arteriales del pulmón de cochino en presencia de 90 μ M de ácido C18:2,n-6 ó o C18:1,n-9 por 3 horas, se encontró un aumento significativo de la cantidad de nitrotirosina en el grupo de células endoteliales que fueron suplementadas con el ácido C18:2,n-6 ,además en éstas se incrementa el calcio intracelular que es necesario para mediar los efectos proinflamatorio de éste ácido graso. El mecanismo exacto que asocie el Ca^{2+} intracelular con la respuesta inflamatoria en el tejido endotelial es desconocido, sin embargo Saraswathi y col. (107) propuso un modelo, donde el aumento del calcio intracelular (Gráfico 20), estimula la formación de Oxido nítrico ($NO\cdot$) y en presencia del radical superóxido ($O_2\cdot^-$) forma el compuesto del peroxinitrilo ($ONOO^-$).

Gráfico 20

Mecanismo propuesto para explicar la mediación del ácido linoleico en la activación de las células endoteliales en los procesos inflamatorios. Tomado de Saraswathi y col. (107)

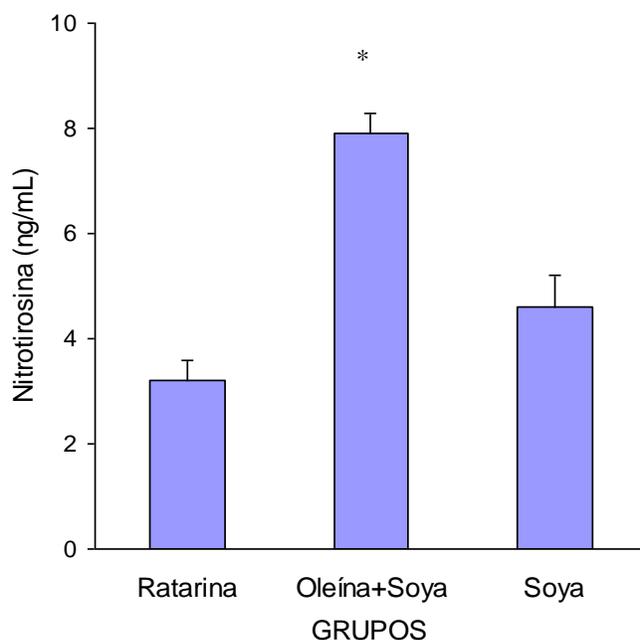


No obstante, en el plasma de ratas *Sprague Dawley* machos no diabéticos, sometidas a dietas enriquecidas con 5 % aceite de soja o una mezcla de aceite de soja más oleína de palma africana, se observó que en el plasma de las ratas que ingirieron aceite de soja rico en un 52 % de ácido C18:2,n-6, se produjo menos cantidad de nitrotirosina con respecto a los que ingirieron la mezcla de aceites que contenía 29 % de ácido C 18:2,n-6 y 36 % de C18:1,n-9 (Gráfico 21) (35).

Con respecto al óxido nítrico (NO•), liberado por prácticamente todas las células y del cual vimos que se forma el peroxinitrito, en el corazón éste ejerce múltiples efectos sobre la función cardíaca. Modula las respuestas inotrópicas y cronotópicas, el flujo de entrada del calcio y el ciclo del Ca²⁺ en el retículo sarcoplásmico, la transmisión autonómica, la frecuencia cardíaca, la respiración mitocondrial, el consumo miocárdico de oxígeno y la eficiencia mecánica. El NO• regula la contractilidad cardíaca en respuesta a la distensión e inhibe la relación fuerza frecuencia y las respuestas a la estimulación β Adrenérgica. También mejora la distensibilidad ventricular y aumenta el trabajo latido en pacientes con

Gráfico 21

Cuantificación de Nitrotirosina en plasma de ratas Spague Dawley ,sometidas por 6 semanas a distintas dietas: con ratarina y dos grupos con ratarina más 5% de aceite vegetal comestible (oleína +soya) o soya,



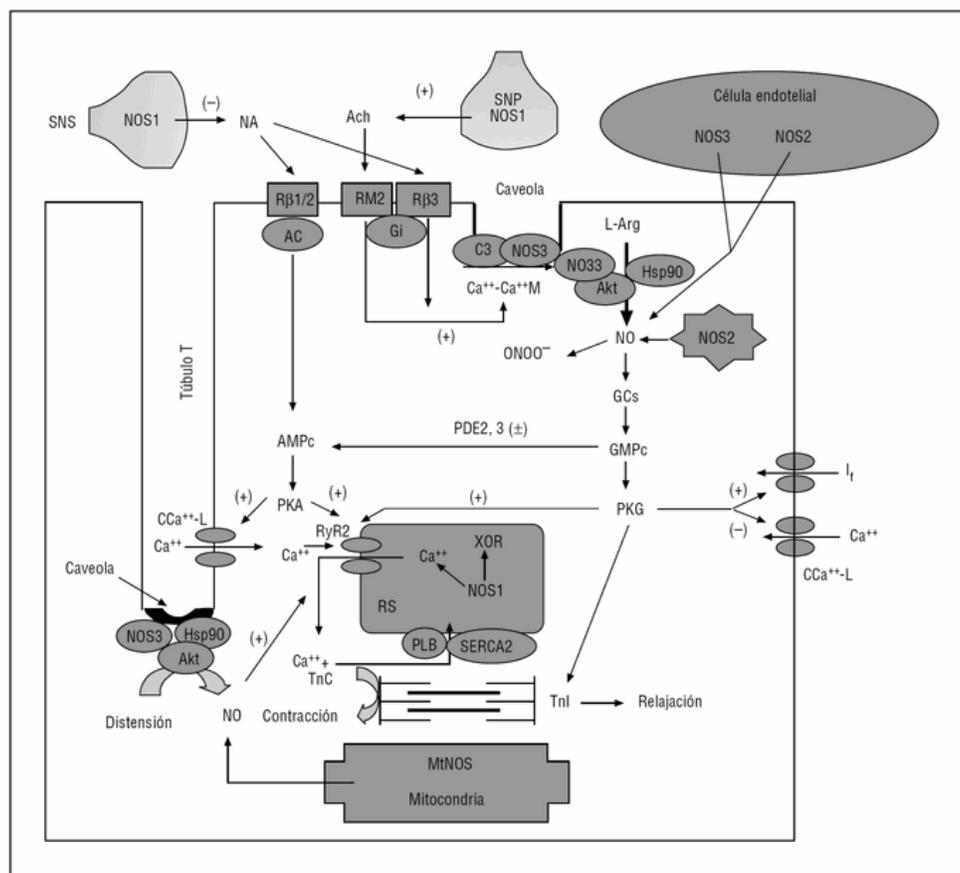
* $p < 0,05$. Media \pm EE, N =5. Tomado de Candelaria Alfonso Pérez (35)

miocardiopatía dilatada, y desempeña un papel importante en la fase tardía del preconditionamiento isquémico. Modula la actividad de los canales cardíacos, la arritmogénesis, la apoptosis y la función cardíaca en el miocardio insuficiente (Inhibiendo la entrada de corrientes I_{Na} , aumenta las corrientes de potasio ($IK_{(ATP)}$, $IK_{(ACh)}$ y regular corriente I_{Ca}) (Gráfico 22) (108).

Moder y col. (89) han empleado un método de espectrometría de masas para determinar la acilcarnitina (sustancia relacionada con el transporte de los ácidos grasos de cadena larga para ser oxidados en la mitocondría), que es excretada por la orina en personas normales y pacientes con diabetes mellitus. Los pacientes con diabetes mellitus excretan mayor cantidad de ésteres de acilcarnitina de cadena larga, por lo cual estos investigadores proponen

Gráfico 22

Mecanismo de acción del óxido nítrico en los cardiomiocitos.

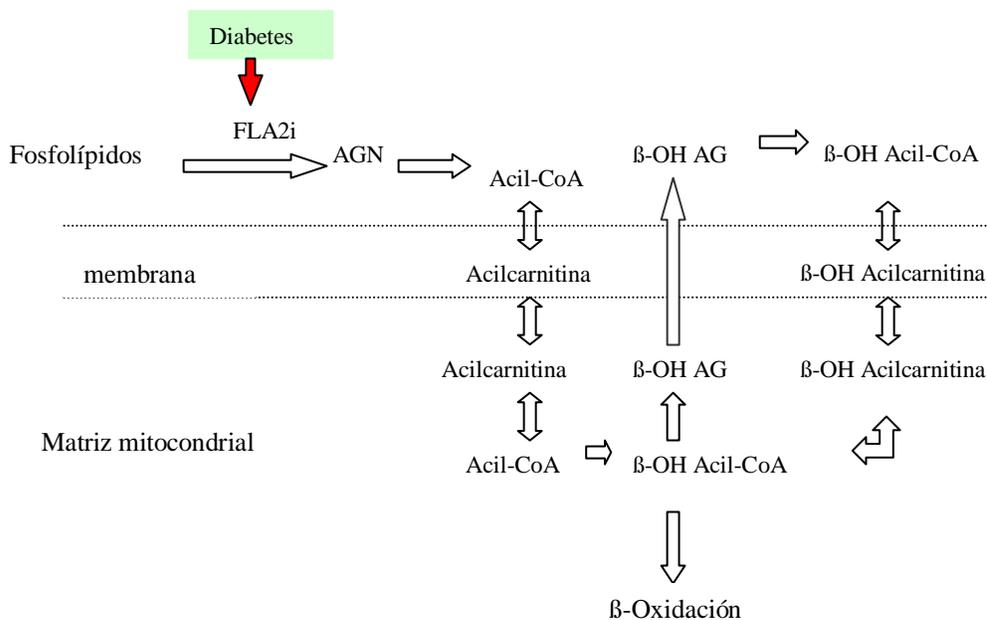


AC: adenil ciclasa; Ach: acetilcolina; Akt: proteincinasa B; C3: caveolinas-3; $[Ca^{++}]_i$: concentración intracelular de calcio; Ca^{++} - Ca^{++} M: complejo Ca^{++} -calmodulina; CCa^{++} -L: canales de calcio tipo L; GCs: guanilil ciclasa soluble; Gi: proteína G inhibitoria; Hsp: proteínas del choque térmico; If: corriente marcapaso de la célula cardíaca; mtNOS: óxido nítrico sintasa mitocondrial; NA: noradrenalina; NOS1: óxido nítrico sintasa neuronal; NOS2: óxido nítrico sintasa inducible; NOS3: óxido nítrico sintasa; ONOO: peroxinitrito; PDE: fosfodiesterasas; PKA/G: proteincinasas A y G; PLB: fosfolambano; $R\beta$: receptores β -adrenérgicos; RM2: receptores muscarínicos-M2; RS: retículo sarcoplásmico; RyR2: receptores/canales de calcio del retículo sarcoplásmico; SERCA2a: ATP-asa calcio-dependiente del retículo sarcoplásmico; SNP/SNS: terminales nerviosos parasimpáticos (vaginales) y simpáticos cardíacos; TnC/I: troponina C e I; XO: xantinoxidasa. Tomado de Tamargo y col. (108).

proponen este método como una herramienta útil en el diagnóstico de la diabetes mellitus. Recientemente se ha estudiado la actividad de la fosfolipasa A2 independiente de calcio (FA₂i) que cataliza la liberación de ácidos grasos y lisofosfolípidos de la membrana en respuesta a la estimulación de agonistas y proveen el sustrato para la síntesis de la acilcarnitina. La cardiomiopatía diabéticas es el resultado de cambios no adaptativos en la homeostasis energética, todavía no se conocen completamente los mecanismos bioquímicos fundamentales de la disfunción en el metabolismo lipídico en el miocardio diabético. Su y col. (110) utilizaron ratas sprague Dawley a las cuales se les inyectó por vía intravenosa estreptozotocina, a las 6 semanas a las ratas diabéticas se le extrajo el corazón y a éste los lípidos y por espectrometría de masa del extracto orgánico, se encontró acumulación de acilcarnitina y 3 hidroxiacilcarnitina (Gráfico 23) como consecuencia de la activación de la FA₂i. El aumento de estas sustancias se podría utilizar como un marcador de disfunción del metabolismo de lípidos y ácidos grasos mitocondrial en el miocardio de ratas diabéticas.

Gráfico 23

Esquema de la acción de la fosfolipasa A2 independiente de calcio (FLA2i) y la formación de acilcarnitina y β-OH Acilcarnitina en mitocondrias de un corazón diabético. (AG) Ácido graso. Su y col. (110)



Con respecto al control de la glicemia, un grupo de investigadores han manifestado que hoy día se desconocen las causas que originan la mayor mortalidad en los pacientes diabéticos que recibieron un control metabólico estricto, pero las sospechas recaen en las hipoglicemias y determinados fármacos o sus combinaciones. El control glucémico de los pacientes con insuficiencia cardiaca estable o con cardiopatía isquémica tiene unas características especiales que merecen consideración específica. De este modo, la elección de un antidiabético oral o de un tipo o pauta de insulina debe fundamentarse en su menor riesgo de producir hipoglucemias y en su mejor perfil de riesgo cardiovascular. Por otro lado, para los objetivos de control de la glicemias es necesario valorar la situación clínica del paciente, sus comorbilidades y su expectativa de vida. En pacientes ancianos, con una reducida expectativa de vida, el control ha de ser menos estricto, son aceptables HbA_{1c} (hemoglobina glucosilada) más moderados y debe procurarse mantener un grado de control que comporte el menor riesgo posible de hipoglucemias, (descompensaciones hiperglucémicas). El futuro del tratamiento del diabético con cardiopatía pasa por aclarar definitivamente, cuál es la estrategia farmacológica más segura para estos enfermos (111).

CAPÍTULO III

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

III-1.- Animales y dietas.

Se utilizó ratas de la raza *Sprague Dawley* del sexo masculino, con un peso inicial entre 90 ± 10 g, del Bioterio del Instituto de Medicina Experimental. Las ratas se distribuyeron al azar en seis grupos, y fueron colocadas en jaulas individuales. La dieta basal fue de fórmula cerrada (ratarina marca Protinal®), así denominada por la AIN (America Institute of Nutrition), porque en su preparación algunos ingredientes son secretos de la empresa, la ratarina contiene 2 % de lípidos totales, proteína 26 %, carbohidratos 40 % y fibra cruda 6 %, por tanto, todas las dietas fueron preparadas con el mismo lote de ratarina.

Los animales recibieron tres dietas y de cada dieta se formarán dos grupos: con diabetes tipo 1 inducida y el grupo no diabético (control). Las dietas utilizadas fueron: (a) ratarina, con 2 % de lípidos totales y aportaron entre 3,6 Kcal en forma de lípidos/día, tomando como base 9 Kcal/g de lípidos, (b) ratarina enriquecida con 5 % de aceite de oliva extra virgen, marca Lucca® de toscana (Italia), aceite rico en ácidos grasos monoinsaturados, y (c) ratarina enriquecida con 5 % de aceite puro de maíz, marca Mazeite® rico en ácidos grasos poliinsaturados. Las dietas enriquecidas con aceites contenían 7 % de lípidos totales y aportan entre 12,6 Kcal en forma de lípidos/día, considerando que las ratas ingirieron 20 - 25g/día. Tanto la dieta como el agua serán administradas *ad libitum* por un periodo de 3 semanas.

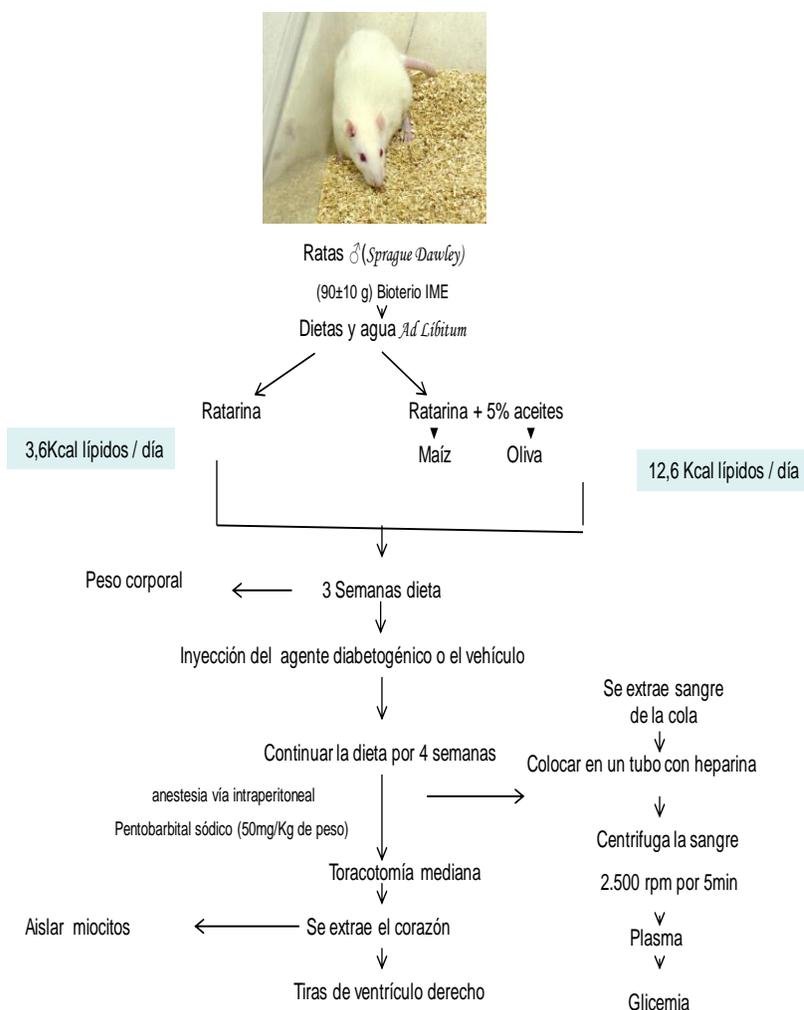
Después del periodo experimental con la dieta, las ratas en ayuno fueron anestesiadas por vía intraperitoneal con Pentobarbital sódico (Nesdonal® 50 mg/Kg de peso, una vez suspendida la estreptozotocina con la solución estéril de citrato, se inyectó por vía intraperitoneal en un período no mayor de 5 min). De cada dieta, se formaron dos grupos: uno al que se indujo la diabetes tipo 1, mediante inyección de estreptozotocina (50 mg/kg de peso), y el otro grupo no diabético (Control), al que se le inyectó el vehículo (solución citrato 0,1 M, pH 4,5 utilizado para disolver el agente diabetogénico). Cada grupo continuó con su dieta *ad libitum*, durante cuatro semanas.

Los seis grupos se denominaron: (DR) ratarina diabética, (CR) ratarina no diabética, (DO) oliva diabética, (CO) oliva no diabética, (DM) maíz diabética y (CM) maíz no diabética (Gráfico 24).

Al finalizar del periodo experimental, las ratas se anestesiaron con Pentobarbital sódico a la dosis mencionada anteriormente y se le extrajo una muestra de sangre de la cola, para cuantificar los niveles de glucosa en plasma (112).

Gráfico 24

Resumen del esquema experimental



III.2.- Preparación de la muestra para ensayos multicelulares.

A la ratas anestesiada, se le realizó una esternotomía mediana y se extrajo el corazón; éste se colocó en una solución Tyrode burbujeada con una mezcla de 95% de

O₂ más 5% CO₂, (pH 7,4) se aisló una tira de la pared libre del ventrículo derecho (peso húmedo entre 70 a 80 mg) y se colocó en un baño de superfusión de órgano con 15 mL de solución Tyrode a 37°C, (Tabla 2). Los productos químicos para la preparación de las soluciones son de las casas comerciales Merck y Riedel Haen.

Tabla 2

Composición de la solución Tyrode utilizadas en la perfusión de tiras de ventrículo derecho (mM). pH 7,4

Componentes	Concentración (mM)
NaCl	130,0
MgCl ₂ .6H ₂ O	1,0
NaHCO ₃	19,0
NaH ₂ PO ₄	0,40
Glucosa	10,0
CaCl ₂	2,7

La muestra de la pared libre del ventrículo derecho, se fijó por un lado al fondo del baño de superfusión de órgano y por el otro lado, al transductor de fuerza desplazamiento (modelo FT03 Grass Instruments Co), mediante finas ligaduras con hilo mercerizado (Gráfico 25a - 25c); se aplicó la tensión de reposo de un gramo. Las preparaciones fueron estimuladas bipolarmente con pulsos de 3ms de duración (Estimulador Grass, modelo S44) y con una intensidad de 1,5 veces el umbral, a una frecuencia basal de 1 Hz o 0,5 Hz. EL transductor fue conectado a un amplificador modelo 7PD y los registros de tensión se efectuaron en un polígrafo de la marca Grass. Las preparaciones multicelulares caracterizadas por poseer poblaciones heterogéneas de células y a su vez influenciadas por otros factores como las uniones intercelulares, se dejaron estabilizar en un baño de superfusión por 30 minutos, como se señala en el Gráfico 25a, luego se realizó el registro control. Las maniobras inotrópicas utilizadas (cambios de frecuencia) se dejaron actuar por 10 minutos antes de iniciar los registros experimentales. La cinética de la contracción post-reposo se obtuvo,

luego de detener la estimulación por períodos de 4, 8, 16, 32 y 64 segundos, (Gráfico 25b). La Gráfico 25c muestra un ejemplo de los registros del estado estable, el intervalo de reposo y la potenciación post-reposo a la frecuencia de 1Hz. Se utilizó un bloqueante de calcio como el verapamil a la concentración de $3 \times 10^{-6} \text{M}$, el cual se dejó actuar 10 minutos y luego se realizaron los registros de potenciación post-reposo con los intervalos de reposo anteriormente señalados a las frecuencias 1Hz

III.3.- Aislamiento de los cardiomiocitos ventriculares

Los miocitos del ventrículo del corazón de las ratas (diabéticas y no diabéticas) con diferente contenido de ácidos grasos fueron preparados por dispersión enzimática (113). Las ratas fueron anestesiadas por vía intraperitoneal con Pentobarbital sódico (Nesdonal® 50 mg/Kg). Mediante una esternotomía mediana se extrajo el corazón y fue colocado en un recipiente que contenía una solución A libre de calcio donde se eliminó el exceso de sangre; luego el corazón fue conectado en un aparato de Langendorff con canulación aórtica a 37 °C. El corazón fue perfundido a una velocidad de 8ml / min. Después de perfundido con la solución A, a la misma solución se añadió colagenasa y proteasa a una concentración final de 1,85 mg/mL y 0,15 mg/mL respectivamente. La perfusión se continuó por 7 minutos, luego de los cuales se perfundió el corazón con una solución B de taurina-Hepes por 10 minutos. El ventrículo derecho se aisló de las aurículas y se cortó en pequeñas piezas, agitado y lavado varias veces a 37°C. Las células aisladas y suspendidas se colocaron en la solución B. La composición de la solución A y B son expresada en la Tabla 3.

Tabla 3

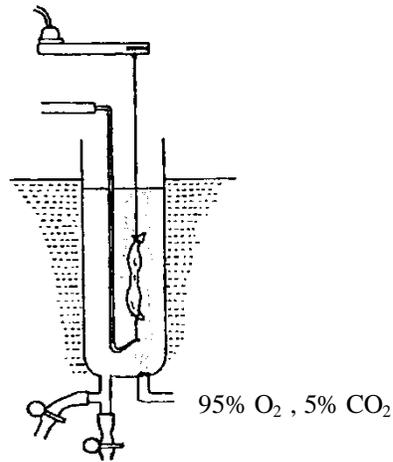
Composición de la solución A y B (mM), para el aislamiento de miocitos. El pH de las soluciones A y B es de 7,4.

Componentes	Solución A	Solución B
NaCl	134,0	108,0
Hepes	10,0	10,0
NaH ₂ PO ₄	1,2	1,2
MgSO ₄	1,2	1,2
KCl	4,0	4,0
Glucosa	11,0	11,0
Taurina	0,0	50,0

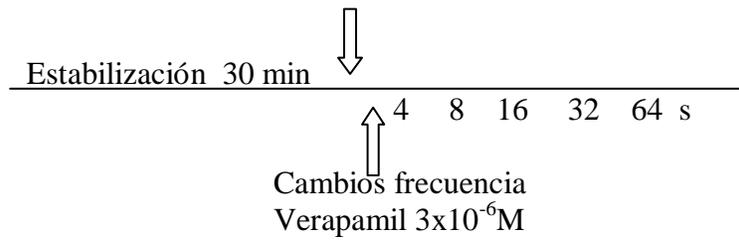
Gráfico 25

Representación esquemática de superfusión de tiras de ventrículos derecho, registro de potenciación post-reposo.

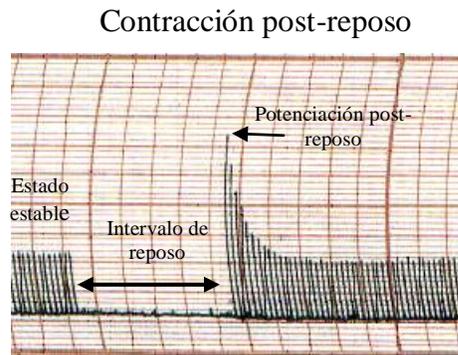
a) Tiras de ventrículo superfundidas



b) Cinética Potenciación



c) Registro en el polígrafo



a) Baño de superfusión que contiene el tejido, b) Diseño experimental y c) Registro donde se indica el estado estable, el intervalo de reposo y la contracción post-reposo o potenciación.

III.4.- Procedimiento para la cuantificación de los ácidos grasos.

El estudio de los ácidos grasos de las muestras tales como: aceites, dietas y fosfolípidos de los miocitos aislados, se realizó mediante la extracción de los lípidos por el método de Folch y col. (114). Se utilizó 10 μ L de cada uno de los aceites, 0,25 gramos de cada dieta morterizada ó 0,5 mL del homogenizado de los miocitos ventriculares aislados, se extrajeron los lípidos totales utilizando 6 mL de una mezcla cloroformo-metanol en proporción 2:1 (v/v) como antioxidante 10 mg de butil-hidroxi-tolueno/100 mL de solvente. Se agitó por una hora y se colocó 6 mL de agua, la mezcla se dejó en reposo por 24 horas a 4 °C. Al día siguiente se separó la fase orgánica y se filtró sobre papel de filtro libre de grasas. El cloroformo que contiene los lípidos se evaporó con una corriente de nitrógeno, para evitar la oxidación de los lípidos y se obtuvo un extracto de lípidos, que se resuspendió con Hexano. Los fosfolípidos se separaron por cromatografía en capa fina, mediante el uso de una lámina de sílica gel G-60 y 0,1 mm de espesor activadas por calor y utilizando la fase móvil: Hexano, dietil éter, ácido fórmico (80:20:2 v/v/v) y por raspado de la lámina de sílica gel se extrajeron los fosfolípidos (identificados mediante un estándar de fosfolípidos).

Los ácidos grasos de los fosfolípidos se transesterificaron a ésteres metílicos de ácidos grasos utilizando 3 mL de la mezcla anhídrida, metanol: tolueno: ácido sulfúrico en proporción 90:10:1 más BHT (200 μ g) en reflujo a 80 °C por una hora. Luego se agregó 3 mL de cloroformo en frío se agitó en un vortex y se obtuvo el extracto clorofórmico con los ésteres metílicos, se colocó 3mL de agua fría y se agitó en el vortex para eliminar las impurezas hidrofílicas y el extracto clorofórmico obtenido se filtró sobre papel Whatman® número 1. Mediante corriente de nitrógeno se evaporó el cloroformo y se utilizó hexano para el análisis cromatográfico.

El porcentaje de los ésteres metílicos de los ácidos grasos se analizó por cromatografía en fase gas-líquida en un cromatógrafo Hewlett Packard, modelo 6890®, con detector de llama, columna capilar de 30 m, 0,25 mm de diámetro y 0,25 μ m de espesor de la fase estacionaria INOWAX®, a 200 °C en condiciones isotérmicas con una fase móvil de nitrógeno a 1 mL/min. Se inyectó a la columna 1 μ L de las muestras y para identificar los ésteres metílicos, se utilizó el tiempo de retención de patrones de la marca comercial Sigma®.

III.5.- Medida del calcio intracelular mediante el uso de Indo-1.

La fluorescencia es una propiedad de ciertas moléculas donde un par de electrones que han sido excitados entra a un estado de alta energía por un fotón de luz, luego cae de regreso al estado fundamental y emite un fotón. Las moléculas fluorescentes presentan un característico patrón de excitación y de emisión. El indo-1 es un compuesto fluorescente con estas características, donde la unión del calcio altera el espectro de emisión de la molécula, cuando es excitado a 340nm, el pico de emisión ocurre aproximadamente a 500 nm en ausencia de calcio y cambia a un valor cercano a 400 nm cuando está saturado de calcio. La relación de la emisión (400:500) se usa como un indicador de la concentración de calcio (115). El indo-1 es incorporado a la célula como un éster de acetoximetil (AM), en esta forma cruza la membrana plasmática, el grupo éster es hidrolizado por una esterasa en el citosol donde el indo-1 queda atrapado. La solución madre de AM 1mM se disuelve en 25 % del detergente no iónico ácido Pluronic F-100 con dimetilsulfóxido. Esta solución se agregó a la suspensión celular a una concentración final de 5 μ M y se incubó a temperatura ambiente (aprox. 25°C) por 5 min. La incorporación de indo-1 al interior de la célula es inhibida con 1ml de la solución B (Tabla 3)

III.6.- Medida de la fluorescencia.

Se utiliza un microscopio fluorescente invertido (Nikon Diaphot), encerrado en una caja de Faraday en cuarto oscuro. La célula ventricular derecha aislada y cargada con el indo-1AM, se colocó en una cámara de suspensión cuyo volumen es de 100 μ L. La célula se perfundió continuamente con solución tyrode (Tabla 4) a una velocidad de flujo que se ajusta a la condición experimental. Se excita con una luz a una longitud de onda de 360 nm y la fluorescencia emitida por el indo-1 se registró a 400nm y a 500 nm utilizando la óptica para epi-fluorescencia; el diafragma del sistema se ajusta para asegurar que el registro provenga solamente de la célula en estudio (Gráfico 26) (116).

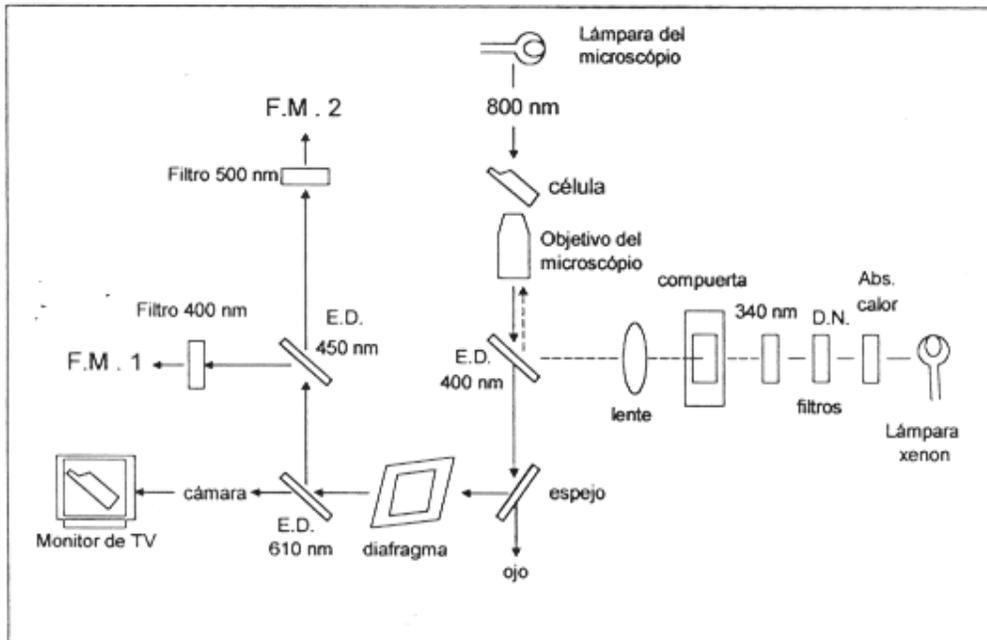
Tabla 4

Composición (mM) de la solución Tyrode empleada en la superfusión de miocitos aislados
pH = 7,4.

Componentes	Concentración (mM)
NaCl	134,0
Hepes	10,0
MgCl ₂	1,2
KCl	4,0
CaCl ₂	2,0
Glucosa	11,0

Gráfico 26

Diagrama del sistema utilizado para medir la fluorescencia. ED: espejo dicroico, DN: filtros de densidad neutra, FM: fotomultiplicador.



III.7.- Medida de la contracción de cardiomiocitos aislados:

La contracción del cardiomiocito ventricular aislado (colocados en el microscopio invertido) se indujo mediante una estimulación eléctrica con pulsos cuadrados con un par de electrodos de platino colocados en la cámara de suspensión, de intensidad umbral, 3ms de duración y a la frecuencia de 0,5 Hz , con intervalo de reposo de 32 segundos.

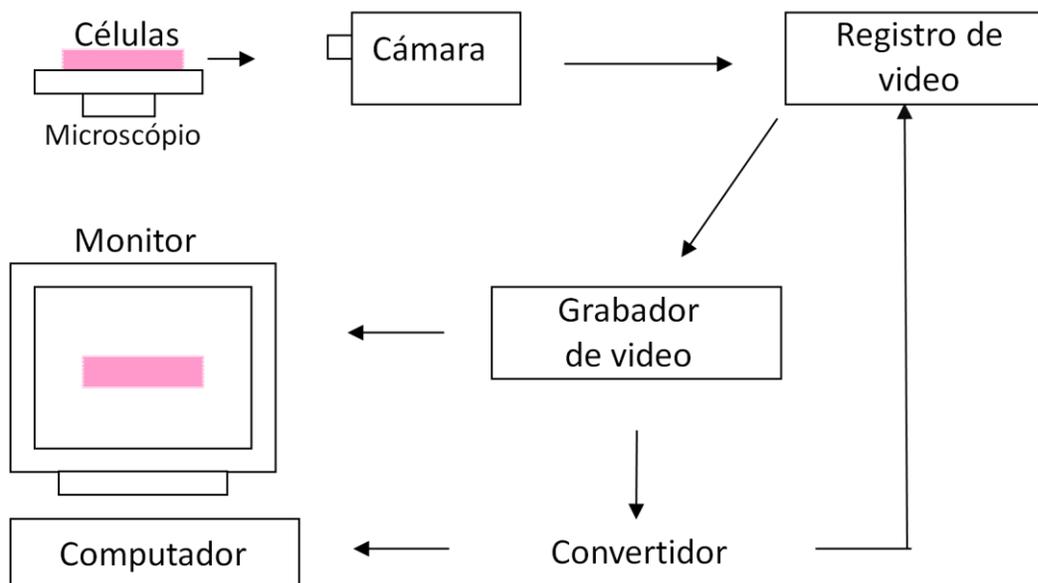
La longitud celular fue medida mediante un sistema detector de movimiento, basado en el videoimagen de la célula (117). El sistema se resume a continuación: La imagen del cardiomiocitos se registra mediante una cámara de video que la detecta como una serie de líneas horizontales paralelas, y el voltaje varía a lo largo de cada línea en respuesta a los cambios de la intensidad de la luz. Un sistema detector de borde usa estos voltajes para identificar cada extremo de la célula. Una vez que el eje longitudinal de la imagen se orienta paralelo a las líneas de detección, la longitud y posición de los detectores de borde se ajustan para asegurar que el movimiento del cardiomiocitos se realice dentro del campo de los detectores (Gráfico 27).

El punto detector debe estar en el centro del campo y coincidir con el borde del extremo celular y sigue los movimientos del mismo.

La señal se envió al grabador de video y la computadora pasando por la unidad convertidora que de analógica cambió a digital (A-D).

Gráfico 27

Diagrama del sistema utilizado para medir la longitud y acortamiento de cardiomiocitos aislados.



III.8.- Análisis estadístico

Los datos están presentados como media \pm error estándar, y fueron comparados usando t-student o ANOVA de una vía (programa GraphPad InStat®) con un nivel de confianza de 95 % ($p < 0,05$).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

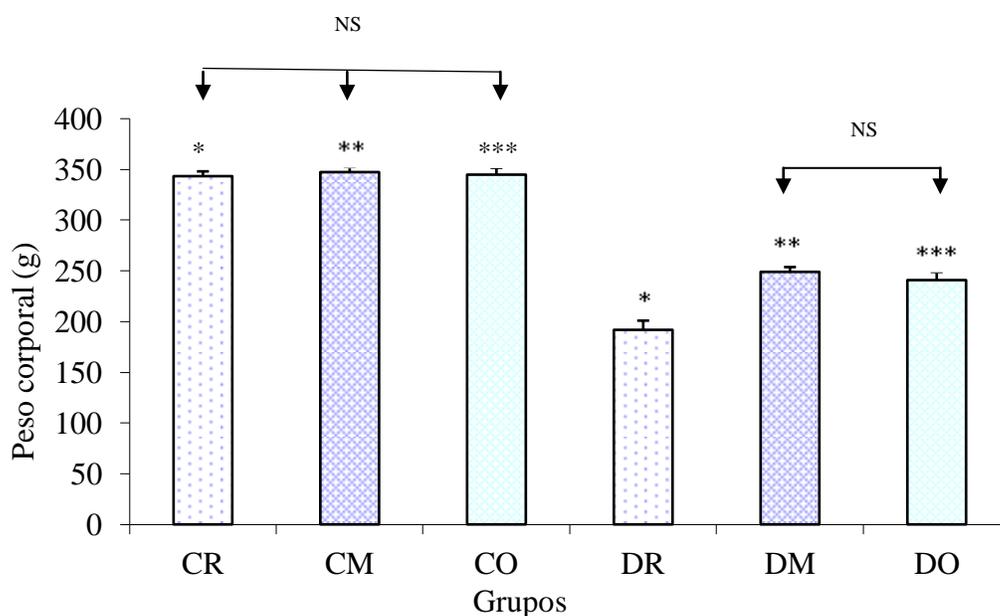
IV.1.- Peso corporal y concentración de glicemia en plasma.

Con respecto al peso corporal de las ratas machos *Sprague Dawley* sometidos a diferentes dietas por un periodo de tres semanas, antes de producir la diabetes tipo 1 con la inyección intraperitoneal de streptozotocina, no se encontró diferencias significativas entre ellos, a pesar de que las dietas aportan diferentes contenidos de calorías en forma de lípidos. Una vez inyectado el vehículo (ratas control) o la streptozotocina (ratas diabéticas), después de cuatro semanas el peso corporal de las ratas se muestra en el Gráfico 28.

El hecho que a este nivel experimental no existan diferencias en el peso corporal entre ratas controles sometidas a las distintas dietas, es debido a que 7 % de lípidos en la dieta no es suficiente para producir un aumento del tejido de reserva que provoque un aumento significativo del peso corporal, no obstante, no implica que pueda presentarse aumentos de triglicéridos como pequeñas gotas de lípidos en el tejido cardíaco en condiciones fisiológicas por el aumento de los lípidos de la dieta. Se ha encontrado un aumento de triacilglicéridos en forma patológica en cardiopatías cuando ocurre un desequilibrio entre los ácidos grasos que se incorporan al músculo cardíaco y el catabolismo de ellos por beta oxidación (118). Con respecto al peso corporal de las ratas diabéticas que estuvieron cuatro semanas ingiriendo la dieta, ratarina (DR) o ratarina enriquecida con 5% de maíz (DM) u oliva (DO), se encontró una disminución significativa ($p < 0,05$) en el peso corporal de las ratas que fueron alimentadas con ratarina (DR) cuyo contenido de lípidos totales fue 2% en relación a las ratas que sus dietas fueron enriquecidas con 5% de aceite, sin embargo, entre estas últimas (DM, DO) no se encontró diferencias significativas en el peso corporal. Las ratas no diabéticas presentaron un peso corporal significativamente mayor ($p < 0,05$) con respecto a las ratas diabéticas. Los animales diabéticos presentaron polifagia (2 veces mayor ingesta de alimento), polidipsia (8 veces más ingesta de agua) y poliuria, síntomas característicos en la diabetes. Además, en las ratas diabéticas se observó la secreción de un pigmento de color rosado, asociado a varias porfirinas IX, lípidos y melatoninas segregada por las glándulas lagrimales (glándulas de Harder) y orificios nasales que por acicalamiento

Gráfico 28

Análisis del peso corporal de las ratas no diabéticas (control) y diabéticas sometidas a dietas de ratarina (CR, DR) o ratarina enriquecida con 5 % de aceite de maíz (CM, DM) u oliva (CO, DO) al final del periodo experimental de 4 semanas. Media + EE, N = 5.



* CR vs DR, ** CM vs DM, *** CO vs DO, $p < 0,05$

C = control, D= diabética, R = ratarina, M= maíz, O= oliva

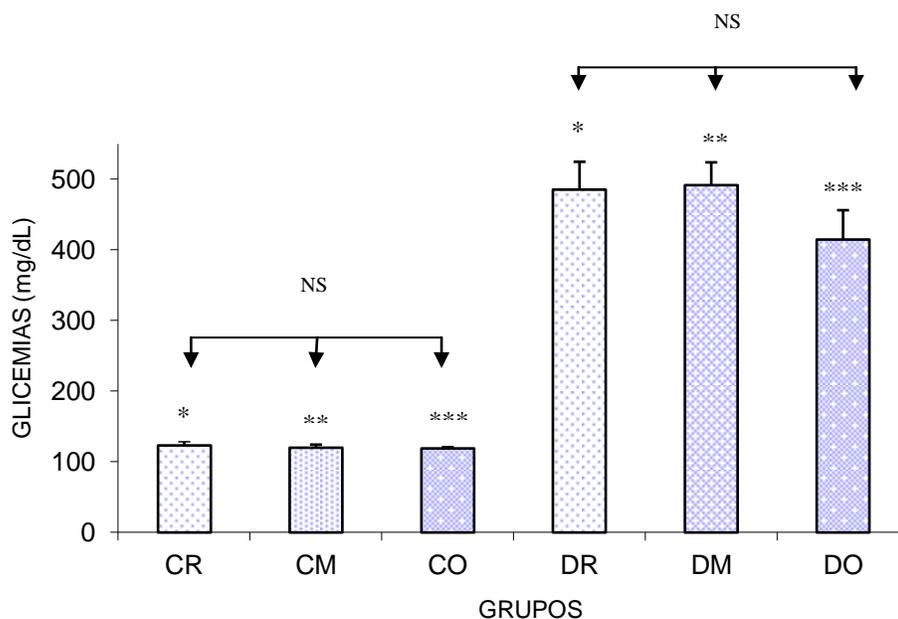
la distribuyeron en el pelaje. El incremento de esta secreción en los roedores está asociado al estrés (119).

Además, en las ratas diabéticas de nuestros experimentos se observó una desaparición de la grasa subcutánea o tejido adiposo abdominal en relación a las ratas no diabéticas.

Las ratas inyectadas con la Estreptozotocina produjeron en ella una diabetes tipo1, caracterizada por un aumento significativo ($p < 0,05$) de la glicemia en el plasma (mg/dL), en relación a las ratas que fueron inyectadas con el vehículo de la droga (Buffer citrato 0,1 M, pH 4,5) Gráfico 29.

Gráfico 29

Concentración de la glicemia plasmática (mg/dL) las ratas no diabéticas (controles, N= 8) o diabéticas, N=7 sometidas a dietas de ratarina o ratarina enriquecida con 5% de aceite de maíz u oliva. Media \pm EE.



* CR vs DR, ** CM vs DM, *** CO vs DO, $p < 0,05$

C = control, R = ratarina, M= Maíz, O= oliva D= diabética

A las ratas a las que se le inyectó el agente diabetogénico, además de presentar polifagia, polidipsia, poliuria, disminución de peso como se indicó anteriormente, se encontró un aumento de los niveles de glicemia en la sangre, que indican que las ratas son diabéticas.

IV.2.- Análisis de los ácidos grasos en los aceites, en las dietas y en los cardiomiocitos.

Los estudios con manipulación dietética de los lípidos y sus efectos en las respuestas fisiológicas en los tejidos multicelulares cardíacos aislados, nos permite conocer la respuesta de los cardiomiocitos como tejido integrado y aislados de otros tejidos, resultados que son de gran utilidad para entender las respuestas inotrópicas sin la influencias de otros tejidos como el tejido adiposo, además el estudio de la cinética de la potenciación ventricular es una forma indirecta de estudiar la recaptación del calcio por el retículo sarcoplásmico a diferentes intervalos de reposo.

IV.2.1.- Ácidos grasos contenidos en los aceites vegetales.

Comenzaremos por analizar el porcentaje de los distintos ácidos grasos de los aceites utilizados en la elaboración de las dietas. La Tabla 5, muestra los ácidos grasos presentes en el aceite de Maíz (obtenido del embrión o germen del maíz), es rico en ácidos grasos poliinsaturados con un 47,2% de ácido linoleico (C18:2,n-6) que es un ácido graso esencial en la dieta y precursor del ácido araquidónico (C20:4,n-6), ácido graso que se incorpora en la posición dos de los fosfoglicéridos de las membranas, de donde puede ser liberado por la acción de las fosfolipasas A₂ y utilizado para la formación de eicosanoides. En la misma Tabla 5, podemos observar la composición del aceite de Oliva (se extrae del Olivo) muy utilizado en la dieta del Mediterráneo, es un aceite rico en ácidos grasos monoinsaturados con un 71,3% de ácido oleico (C18:1,n-9). Como se puede observar existen diferencias significativas al comparar los aceites de maíz y oliva. El ácidos linoleico es significativamente mayor ($p < 0,05$) en el aceite de maíz y el ácido oleico es significativamente mayor ($p < 0,05$) en el aceite de oliva.

Tabla 5
Porcentaje de ácidos grasos en las diferentes muestras de aceites
de Maíz y de Oliva

Ácidos Grasos	Aceite de Maíz		Aceite de Oliva	
C16:0	15,5	± 0,1	13,9	± 0,0
C16:1,n-9	0,1	± 0,0	1,9	± 0,3
C18:0	3,0	± 0,1	2,4	± 0,0
C18:1,n-9	33,9	± 0,2	71,3	± 0,4a
C18:2,n-6	47,2	± 0,3a	10,1	± 0,2
C18:3,n-3	0,1	± 0,0	0,4	± 0,2

Media + EE. N=4. Letra (a) indica diferencia significativa entre los porcentajes del mismo ácido graso de los dos grupos, $p < 0,05$.

IV.2.2.- Ácidos grasos presentes en las dietas.

En la Tabla 6, encontramos los resultados del análisis de los ácidos grasos en las dietas utilizadas. La ratarina es la dieta control, es de fórmula cerrada, denominada así, por la American Institute Nutrition (AIN), es la ratarina comercial, marca Protinal® que contiene 2% de lípidos totales. Los experimentos fueron realizado con los mismos lotes de ratarina, ésta aporta 3,60 Kcal en forma de lípidos/día tomando como base 9 Kcal/g de lípidos y una ingesta de 20,2 gramos/día. Las dietas enriquecidas con 5% de los distintos aceites (aceite de Maíz o aceite de Oliva) contienen 7% de lípidos totales y aportan 12,6 Kcal en forma de lípidos/día, considerando que ingieren la misma cantidad. La ingesta de las dietas y el agua fueron *ad libitum* por un periodo de tres semanas, antes de inyectar la estreptozotocina como agente diabético y por un periodo de cuatro semanas después de inyectada la estreptozotocina o el vehículo de la droga a las ratas no diabéticas o controles. Las dietas enriquecidas con 5% de los distintos aceites (aceite de Maíz o aceite de Oliva) contienen 7% de lípidos totales y aportaron 27,88 Kcal en forma de lípidos/día considerando que las ratas diabéticas ingieren $44,25 \pm 3,78$ gramos/día.

Tabla 6

Porcentajes de ácidos grasos en los lípidos totales en las dietas de ratarina y de la ratarina enriquecida con 5% de aceite de maíz u oliva.

Ácidos Grasos	Ratarina	Ratarina 5 % Aceite Maíz	Ratarina 5 % Aceite Oliva
C14:0	2,3 ± 0,3	0,8 ± 0,0	1,0 ± 0,1
C16:0	18,8 ± 0,2	15,8 ± 0,0	13,4 ± 1,3
C16:1,n-9	2,8 ± 0,6	1,2 ± 0,2	1,0 ± 0,5
C18:0	4,9 ± 0,4	3,2 ± 0,0	2,3 ± 1,0
C18:1,n-9	22,6 ± 0,5	27,4 ± 0,5	54,0 ± 3,0 a
C18:2,n-6	41,6 ± 0,4	49,1 ± 0,6	24,1 ± 0,7a
C20:5,n-3	3,6 ± 0,1	1,3 ± 0,0	2,0 ± 0,2
C22:6,n-3	2,3 ± 0,2	1,1 ± 0,0	0,9 ± 0,3
Lípidos (%)	2	7	7

Media + EE, N= 3, p<0,05. Letra (a) indica diferencia significativa entre los porcentajes del mismo ácido graso de la ratarina con 5% aceite de oliva y los otros grupos, p <0,05

La dieta enriquecida con aceite de maíz tiene significativamente mayor porcentaje (49,1 %) de ácido linoleico (C18:2,n-6) ($p < 0,05$), que la dieta enriquecida con el aceite de oliva, cuyo valor es 24,1% y donde el ácido oleico (C18:1,n-9, $p < 0,05$) es significativamente mayor (54%). Es decir, que en la dieta enriquecida con el aceite de maíz se le suministró al animal mayor contenido de ácidos grasos poliinsaturados (51,5%) mientras que a los animales que se le suministró la dieta enriquecida con el aceite de oliva el porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados fue menor 27%, no obstante, el contenido de ácidos grasos monoinsaturados fue mayor en los animales experimentales alimentados con aceite de oliva el cual fue de 55%.

IV.2.3.- Ácidos grasos en los fosfolípidos de cardiomiocitos.

En el Gráfico 30, se muestra una cromatografía en capa fina de sílica G-60 donde observamos, los fosfolípidos aislados del resto de los otros lípidos, como se explicó en la metodología, esto se realiza con la finalidad de extraer por raspados los fosfolípidos adheridos a la sílica gel (Gráfico 31). Luego son transmetilados y por cromatografía gas-líquido, se realiza el análisis de los ácidos grasos contenidos en los fosfolípidos de los cardiomiocitos de las ratas diabéticas y no diabéticas con las distintas dietas (Gráfico 32).

Gráfico 30

Lámina de un cromatograma de la cromatografía en capa fina de silica gel G-60 que muestra la separación de los fosfolípidos. (1) Muestra de fosfolípidos (FL) de cardiomiocito, (2) estándar de ácidos grasos (AG), (3) estándar de Triacilglicéridos (TG) y ácidos grasos, (4) Triacilglicéridos, (5) Solventes (80 Hexano: 20 dietil éter: 2 ácido fórmico). DG diglicéridos

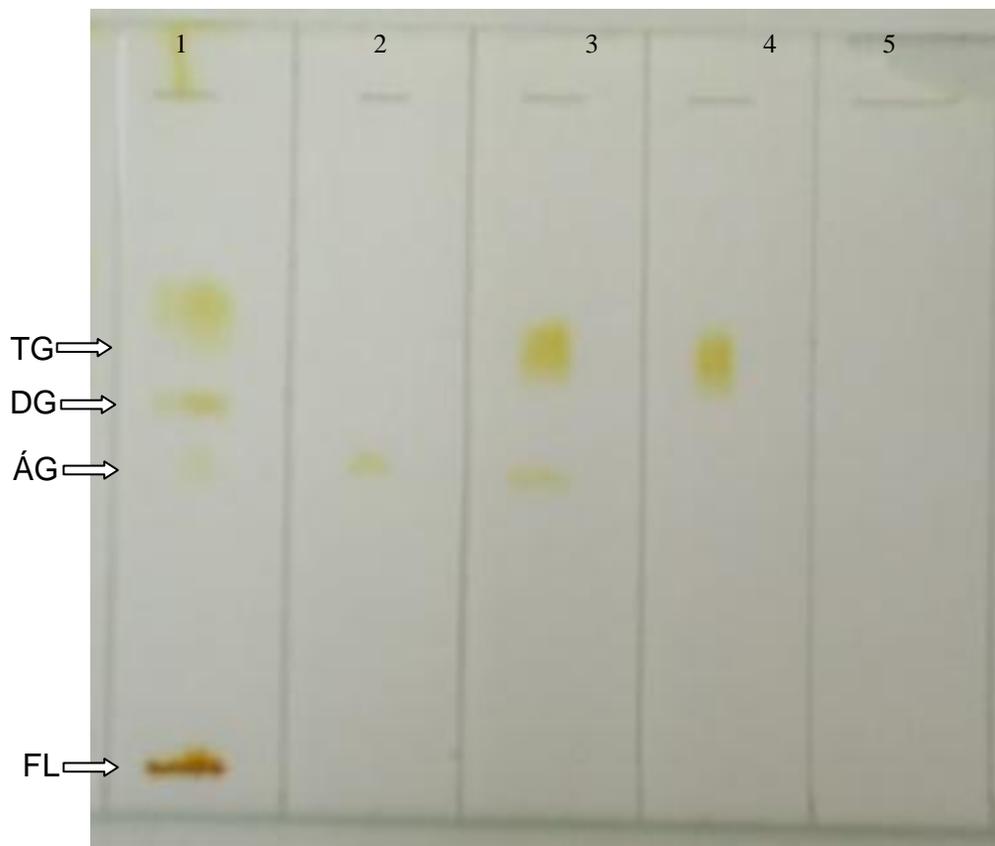


Gráfico 31

Cromatografía en capa fina de sílica gel G-60 mostrando zonas de extracción de los fosfolípidos (FL) de los miocitos ventriculares y una muestra de fosfolípido de color marrón sin extraer.

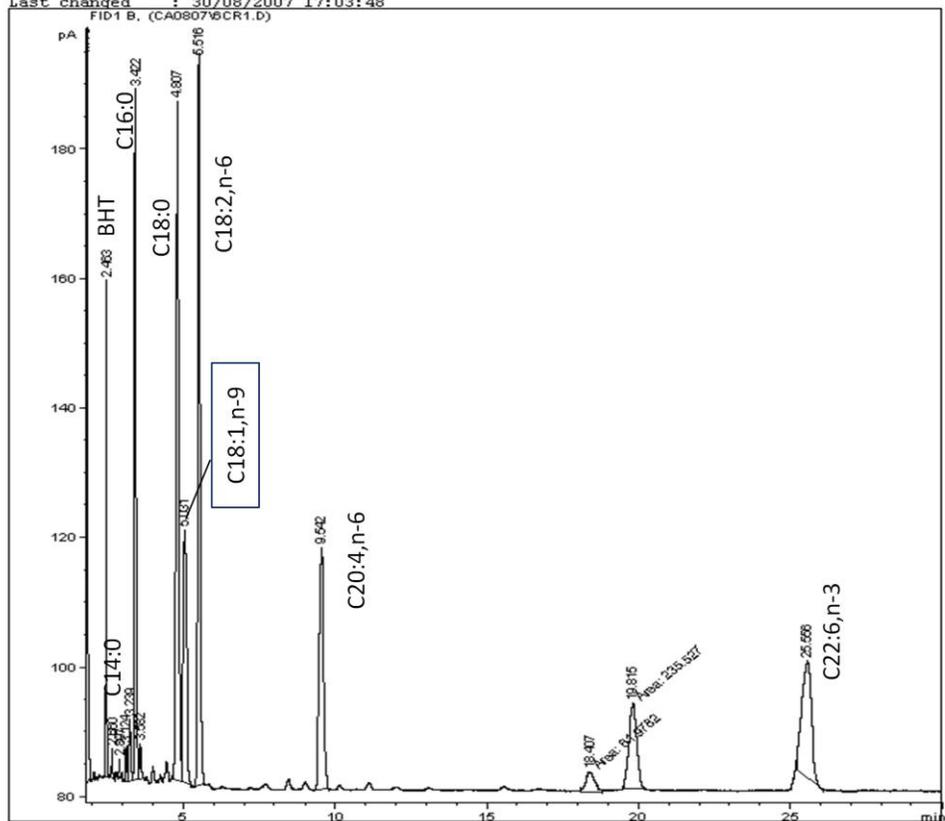


Gráfico 32

Resultado de una cromatografía en fase gas-líquida de ácidos grasos metilados de fosfolípidos de miocitos ventricular aislados de una rata sometida a dieta de ratarina.

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\CA0807\6CR1.D Sample Name: 6 C R 1
CONTROL RATARIN MIOC PL

=====
Injection Date : 28/08/2007 11:14:43 Location : Vial 2
Sample Name : 6 C R 1 Inj : 1
Acq. Operator : Inj Volume : Manually
Acq. Instrument : Instrument 1
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\AG2007.M
Last changed : 27/08/2007 16:24:03
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\AG2007.M
Last changed : 30/08/2007 17:03:48
=====



Instrument 1 03/09/2007 12:48:38

Page 1 of 2

Los números en los diferentes picos indican los tiempos de retención de los ácidos grasos metilados separados en la columna cromatográfica, que identifican a los distintos ácidos grasos.

En el Gráfico 32, el cromatograma muestra los ácidos grasos contenidos en los fosfolípidos de los miocitos ventriculares de una rata no diabética, que ingirió en su dieta ratarina y donde los distintos ácidos grasos metilados están representados mediante picos. El porcentaje de los ácidos grasos se calcula en base a la suma total de las áreas en el cromatograma, de los ácidos grasos identificados. El tiempo de retención de los ésteres metílicos de los ácidos grasos en la columna cromatográfica se determinó utilizando estándares comerciales de los ésteres metílico. En las Tablas 7 y 8, se muestra detalladamente el tipo y la familia de cada uno de los ácidos grasos encontrados en los fosfolípidos de los cardiomiocitos ventriculares y su porcentaje, en las ratas no diabéticas y diabéticas en los distintos grupos de dietas.

Tabla 7

Porcentaje de los ácidos grasos de los fosfolípidos de miocitos ventricular aislados de corazón de ratas no diabéticas, con las diferentes dietas. Media \pm EE.

Ácidos grasos	Ratarina (CR) (N=5)	Ratarina+ 5% Aceite Maíz (CM) (N=6)	Ratarina+ 5% Aceite Oliva (CO) (N=4)
C14:0	0,3 \pm 0,1	2,2 \pm 1,8	0,3 \pm 0,1
C16:0	12,7 \pm 0,6	14,3 \pm 1,3	11,5 \pm 0,1
C18:0	23,6 \pm 0,3	24,9 \pm 0,6	24,3 \pm 0,3
C18:1,n-9	9,4 \pm 0,6	8,0 \pm 0,4	10,8 \pm 0,3
C18:2,n-6	24,9 \pm 0,9 ^a	23,0 \pm 1,0 ^b	20,4 \pm 0,8^{a, b}
C20:4,n-6	16,9 \pm 1,0	15,5 \pm 1,6	18,4 \pm 0,4 ^b
C22:6,n-3	11,9 \pm 2,3	11,2 \pm 1,5	14,2 \pm 0,4

(a) indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los % de ácido graso entre los grupos, (b) indica diferencias significativa ($p < 0,05$) entre los ácidos grasos en grupos diabéticas y no diabéticas al comparar la Tabla 7 y 8. (N = número de corazones)

En la Tabla 7, se muestran los porcentajes ácidos grasos encontrados en los fosfolípidos de los miocitos ventriculares aislados del corazón de ratas no diabéticas o control, sometidas a las diferentes dietas, se observa una disminución significativa el porcentaje del ácido graso

C18:2,n-6 en los fosfolípidos de los cardiomiocitos ventriculares de las ratas que ingirieron una dieta enriquecida con aceite de oliva, con respecto a la que fueron sometidas a una dieta de ratarina. No hubo cambios en el porcentaje del ácido graso C22:6,n-3, en los fosfolípidos de los miocitos en las ratas no diabéticas. Se observa que los ácidos grasos C18:1,n-9 y C22:6,n-3 se incorporan de manera similar en los fosfolípidos de los miocitos en estas ratas, independientemente de la dieta.

Tabla 8

Porcentaje de los ácidos grasos de los fosfolípidos de miocitos ventricular aislados de ratas diabéticas, con diferentes dietas. Media \pm EE.

Ácidos grasos	Ratarina (DR) (N=7)	Ratarina + 5% Aceite Maíz (DM) (N=5)	Ratarina + 5% Aceite Oliva (DO) (N=4)
C14:0	0,3 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1
C16:0	11,1 \pm 0,2	10,1 \pm 0,5	9,7 \pm 1,3
C18:0	24,4 \pm 0,3	24,3 \pm 0,2	23,4 \pm 0,4
C18:1,n-9	7,0 \pm 0,6 ^a	8,7 \pm 0,6 ^a	12,1 \pm 1,2 ^a
C18:2,n-6	29,4 \pm 3,1	36,4 \pm 3,8 ^b	30,5 \pm 2,9 ^b
C20:4,n-6	12,3 \pm 1,6	10,2 \pm 2,4	12,2 \pm 1,2 ^b
C22:6,n-3	15,5 \pm 2,0	10,1 \pm 1,8	11,4 \pm 1,6

(a) indica diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los ácidos grasos de los diferentes grupos. (b) indica diferencia significativa ($p < 0,05$) entre ácidos grasos en grupos diabéticas y no diabéticas al comparar las Tablas 7 y 8, (N= número de corazones de ratas)

En la Tabla 8, se muestra un aumento significativo del porcentaje del ácido graso C18:1,n-9, en los fosfolípidos de los cardiomiocitos ventriculares de los animales diabéticos que ingirieron aceite de oliva en su dieta (DO), respecto a los animales que ingirieron ratarina (DR) o ratarina enriquecida con aceite de maíz (DM). Con respecto al porcentaje de ácido graso C18:2,n-6, no se encontró diferencia significativa entre ellos.

Si comparamos el porcentaje de la composición de los ácidos grasos de los fosfolípidos de miocitos ventriculares de las Tablas 7 y 8, señaladas con la letra b encontramos, que el porcentaje de ácidos grasos C18:2,n-6 en las ratas diabéticas es significativamente mayor en las ratas que ingirieron en su dieta aceite de maíz y oliva, que en las no diabéticas con la misma dieta y el porcentaje del ácido graso C20:4,n-6 en las ratas no diabéticas con dieta enriquecida con aceite de oliva, es significativamente mayor que en los fosfolípidos de los miocitos ventriculares de ratas diabética sin cambios significativos en los miocitos de las ratas que ingirieron ratarina. Respecto al C22:6,n-3 proveniente de la ratarina, no se encontró diferencias en los cardiomiocitos de las ratas no diabéticas y diabéticas estos resultados no coinciden con los obtenidos por Kuwahara y col. (120)

La manipulación dietética nos permite incorporar selectivamente ácidos grasos en los fosfolípidos de los cardiomiocitos de ratas controles o diabéticas. Al comparar las tablas 7 y 8 vemos que las ratas diabéticas que su dieta fue enriquecida con aceite de oliva, aumentó significativamente el ácido oleico (C18:1,n-9) mientras que en las ratas controles no.

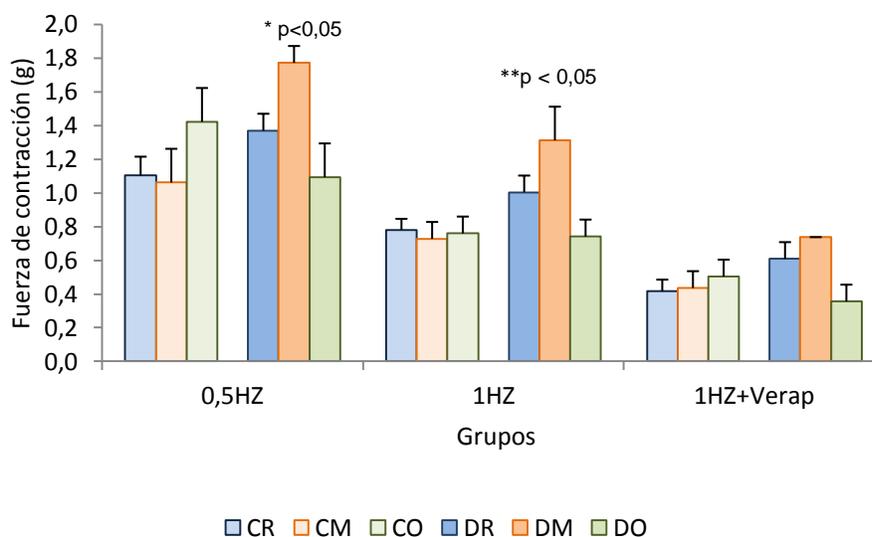
Por otro lado las ratas cuya dietas fueron enriquecidas con aceite de maíz, se encontró que el ácido linoleico (C18:2, n-6) aumento significativamente en las ratas diabéticas respecto a las controles. Es de señalar que los cardiomiocitos de las ratas diabéticas incorporaron más ácido linoleico que las ratas controles, y se encontró mayor porcentaje de ácido linoleico cuando la dieta es enriquecida con aceite de maíz. El ácido araquidónico producto de la elongación y desaturación del ácido linoleico en el metabolismo se incorporó en mayor porcentaje en las ratas no diabéticas en relación a las diabéticas y significativamente en las ratas no diabéticas cuya dieta fue enriquecida con aceite de maíz u oliva, señaladas en las tablas con la letra b. Esto está posiblemente relacionado con las proteínas específicas relacionadas con la unión y transporte de ácidos grasos.

IV.3.- Fuerza de contracción del estado estable y potenciación post-reposo en tiras de ventrículo derecho aislados de ratas no diabéticas y diabéticas con las diferentes dietas.

En estos resultados observaremos el comportamiento del estado estable y del primer latido después de distintos intervalos de reposo y su disminución consecutiva hasta alcanzar el estado estable en aproximadamente 10-12 latidos, en ratas diabéticas y no diabéticas con distintas dietas.

Gráfico 33

Fuerza de contracción del estado estable antes de 32 s de reposo de tiras de ventrículo derecho de ratas diabéticas y no diabéticas (Controles), sometidas a dietas de ratarina (N=6) o enriquecidas con 5 % de aceite de maíz (N=5) u oliva (diabética N=5 y no diabética N=7) a las frecuencias de 0.5 Hz, 1 Hz o 1 Hz en presencia de Verapamil (3×10^{-6} M).



C = control, R = ratarina, M= maíz, O= oliva D= diabética.

Media \pm EE. ** $p < 0,05$ (DM vs CM, CR y CO) ; DM vs DR y DO * $p < 0,05$)

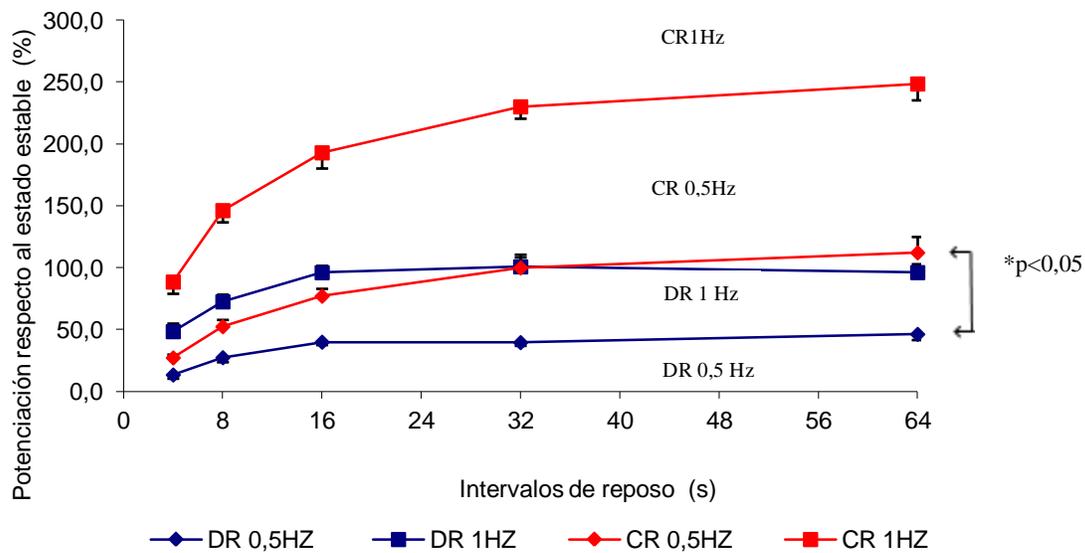
El estado estable se determinó antes del intervalos de reposo. Una vez que la potenciación ha disminuido constantemente (después de 10 a 12 latidos), se alcanza el estado estable tanto en ratas diabéticas como no diabéticas.

En el Gráfico 33, podemos observar la fuerza de contracción en el estado estable en tiras de ventrículo derecho de ratas no diabéticas (controles) y diabéticas, antes de un reposo de 32 segundos a diferentes frecuencias, con las diferentes dietas y con presencia y ausencia de Verapamil. Cuando se comparó entre sí la fuerza de contracción a nivel de estado estable en tiras de músculo ventricular derecho de rata no diabéticas con distintas dietas (CR, CM, CO) en cada grupo (0,5 Hz, 1Hz o 1Hz + Verapamil), no se encontró diferencias significativas entre ellas. Cuando se realiza la misma comparación entre las ratas diabéticas (DR, DM, DO), se encontró mayor fuerza (* $p < 0,05$) de contracción a 0,5Hz y a 1 Hz en las tiras ventriculares a nivel de estado estable en los animales que ingirieron en su dieta

aceite de maíz (DM) en comparación con las ratas que ingirieron aceite de oliva (DO) y con respecto al CR y CO. A la frecuencia de 1Hz el estado estable de los ventrículos de los animales diabéticos que ingirieron dieta de maíz (DM), la fuerza de contracción fue significativa mayor (** $p < 0,05$) respecto CR, CO y CM. Sin embargo, a la frecuencia de 1 Hz + verapamil no se encontraron cambios significativos en las ratas no diabéticas y en las diabéticas. Lo que nos indica que cuando el aceite de maíz esta presente en la dieta, en el estado estable posiblemente se favorece la entrada de Calcio del espacio extracelular al intracelular, que bloqueamos con la presencia de Verapamil.

Gráfico 34

Cinética de la potenciación Post-reposo en relación al estado estable en tiras de ventrículos derecho de ratas diabéticas (DR) y no diabéticas (CR) alimentadas con dietas de ratarina, y estimuladas a las frecuencias de 0,5 o 1 Hz.



Media \pm E, N=4, ratas no diabéticas (CR, rojo) y N=5 ratas diabéticas (DR, azul)
 C =control/no diabética, R = ratarina.

El gráfico 34 muestra la potenciación obtenida a diferentes intervalos de reposo en tiras de ventrículo derecho de ratas diabéticas y no diabéticas alimentadas con ratarina a diferentes frecuencias. La fuerza desarrollada en el latido post-reposo fue mayor a medida que se aumentó el tiempo sin estimulación, hasta alcanzar un máximo a los 32 segundos. El valor de 32 segundos es el mismo obtenido en el laboratorio para otros experimentos publicados

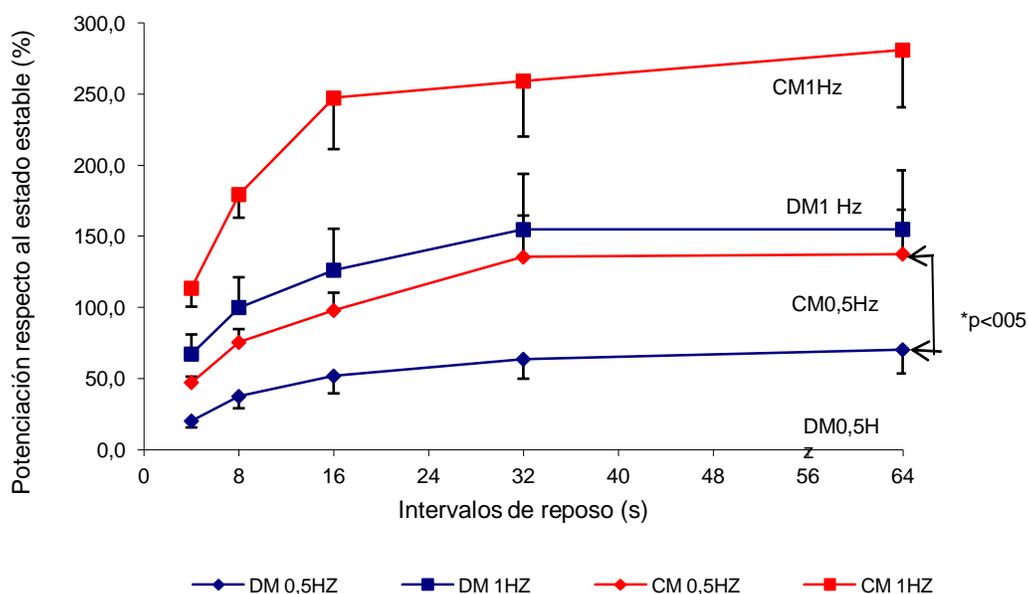
(121). El calcio recaptado en el reposo es transportado al RS hasta la zona de alta densidad en receptores de rianodina, de donde es liberado en la próxima contracción. El transporte del ión a este compartimiento y la probabilidad de que se abra el mayor número de canales de calcio del RS, ocurre en un tiempo de aproximadamente 32s. Además, se observa una tendencia a un aumento de la potenciación post-reposo que fue significativamente mayor $*p < 0,05$, en las tiras de ventrículo derecho de ratas no diabéticas (CR) con respecto a las diabéticas (DR) y mayor a 1 Hz que a 0,5 Hz, lo que indica que la cinética de la potenciación post-reposo es alterada por los efectos de la diabetes y también por la frecuencia. La tendencia a una menor potenciación en ratas diabéticas, puede ser explicada por una menor recaptación de calcio (Ca^{+2}) por el retículo sarcoplásmico (RS) en los distintos intervalos de reposo o por una mayor salida de Ca^{+2} por el intercambiador $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ en los miocitos ventriculares o quizás ambas situaciones. Sin embargo, se puede observar en el Gráfico 34 que no se encontró diferencia significativa al comparar el porcentaje del aumento de la potenciación ventricular de la rata no diabéticas a 0,5 Hz con las de ratas diabética a la frecuencia de 1Hz. En las tiras de ventrículo derecho de las ratas diabéticas al aumentar la frecuencia cardíaca, lo cual es una maniobra inotrópica positiva, mejora la recaptación de calcio a los distintos intervalos de reposo. Se ha sugerido que la potenciación post-reposo, resulta del incremento en la liberación de calcio del RS, como resultado del aumento del Ca^{2+} en este organelo (122). En experimentos realizados en nuestro laboratorio a diferentes concentraciones extracelular de calcio, hemos encontrado que una disminución de la concentración de Ca^{2+} de 2,7 mM a 1,35 mM en el medio externo produce una menor potenciación post-reposo en animales no diabéticos, pero aumentos de Ca^{2+} de 2,7mM a 5,4 mM no produce cambios en la potenciación post-reposo (121). Hay que tener presente que en estos experimentos a mayor frecuencia hay menor fuerza de contracción en el estado estable, debido a una menor entrada de calcio a través de la membrana.

En el Gráfico 35, se muestra la cinética de la fuerza de contracción o potenciación post reposo, con respecto al estado estable (%), de tiras de ventrículo derecho aislado de ratas no diabéticas y diabéticas, que ingirieron en su dieta ratarina enriquecidas con 5 % de aceite de Maíz a diferentes intervalos de reposo y con diferentes frecuencias. Se observa, que las ratas diabéticas a la frecuencia de 0,5 Hz (DM) presentaron una menor potenciación post-

reposito ($p < 0,05$) con respecto a las ratas no diabéticas (CM) así como con respecto a las diabéticas con la frecuencia de 1 HZ. La potenciación obtenida en tiras de ventrículo derecho de las ratas no diabéticas a 0,5 Hz y las diabéticas de 1Hz no presentaron diferencias significativas. Este resultado fue similar al encontrado en el Grafico 34, en ratas alimentadas con ratarina.

Gráfico 35

Cinética de la potenciación post-reposo en relación al estado estable en tiras de ventrículos derecho de ratas diabéticas (DM) y no diabéticas (CM), alimentadas con dietas de ratarina enriquecidas con 5 % de aceite de Maíz, y estimuladas a las frecuencias de 0,5 o 1 Hz.

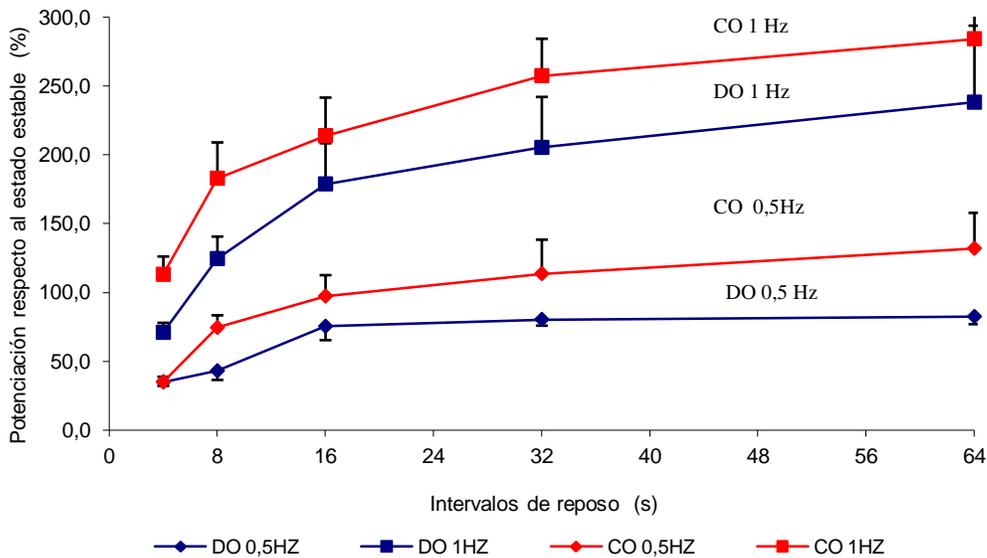


Media \pm EE, N=5, ratas no diabéticas (CM, rojo) y ratas diabéticas (DM, azul).
C=control /no diabéticas, M=maíz, D= diabética

En el Gráfico 36 se muestran los resultados comparativos de la potenciación obtenida en tiras de ventrículos de ratas diabéticas y no diabéticas sometidas a una dieta enriquecida con aceite de oliva, estimulados a 0,5 o a 1 Hz, donde observamos que no hay diferencia significativa entre la potenciación obtenidas en tiras ventriculares de ratas diabéticas (DO) y no diabéticas (CO) cuando son estimuladas a las mismas frecuencias.

Gráfico 36

Cinética de la potenciación post-reposo en relación al estado estable en tiras de ventrículos derecho de ratas diabéticas (DO) y no diabéticas (CO), alimentadas con dietas de ratarina enriquecidas con 5 % de aceite de Oliva, y estimuladas a las frecuencias de 0,5 o 1 Hz.

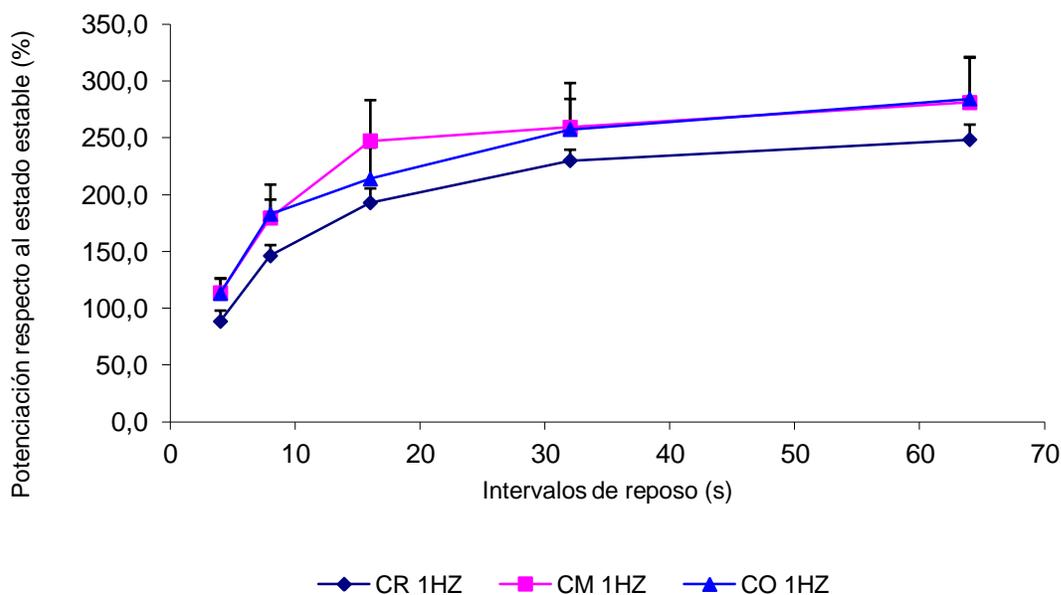


Media \pm EE, N=5, ratas no diabéticas (CO rojo) y ratas diabéticas (DO, azul).
C=control /no diabéticas, O=oliva, D= diabética.

En cada una de las frecuencias la potenciación post-reposo tendió a ser mayor en las tiras ventriculares de ratas no diabéticas (CO) que en las diabéticas (DO), pero no hubo diferencias significativas entre ellas. Aparentemente en esta dieta las diferencias significativas no vienen dadas por el hecho de ser diabéticas o no, sino por la frecuencia de estimulación, a mayor frecuencia, mayor potenciación post-reposo.

Gráfico 37

Cinética de la potenciación post-reposo de tiras de ventrículo derecho de ratas no diabéticas, sometidas a dietas de ratarina (CR, N = 5) o enriquecidas con 5 % de aceite de maíz (CM, N=5) u oliva (CO, N=7) a la frecuencia de 1Hz.

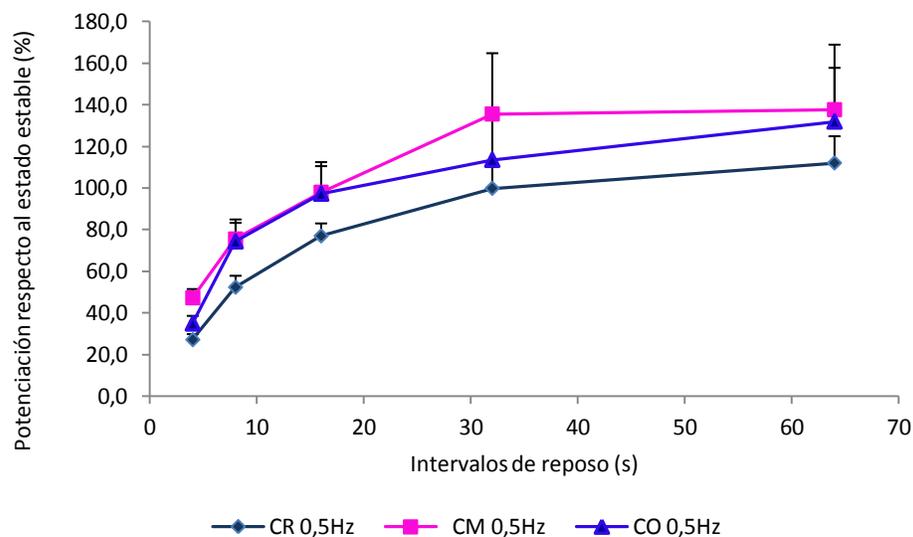


Media \pm EE , C =control/no diabéticas, O= oliva , M= maíz, R= ratarina

El Gráfico 37, se presenta de manera conjunta la cinética de la potenciación post-reposo de las tiras de ventrículos aislados de ratas no diabéticas, sometidas a diferentes dietas a la frecuencia de 1 Hz y donde no se encontró diferencias significativas entre los diferentes grupos, aunque en el grupo CR, que ingirió menor contenido de lípidos totales en su dieta (2%), la potenciación tendió a ser menor.

Gráfico 38

Cinética de la potenciación post-reposo de tiras de ventrículo derecho de ratas no diabéticas, sometidas a dietas de ratarina (CR, N =5) o enriquecidas con 5 % de aceite de maíz (CM, N =5) u oliva (CO, N =7) a la frecuencia de 0,5 Hz.

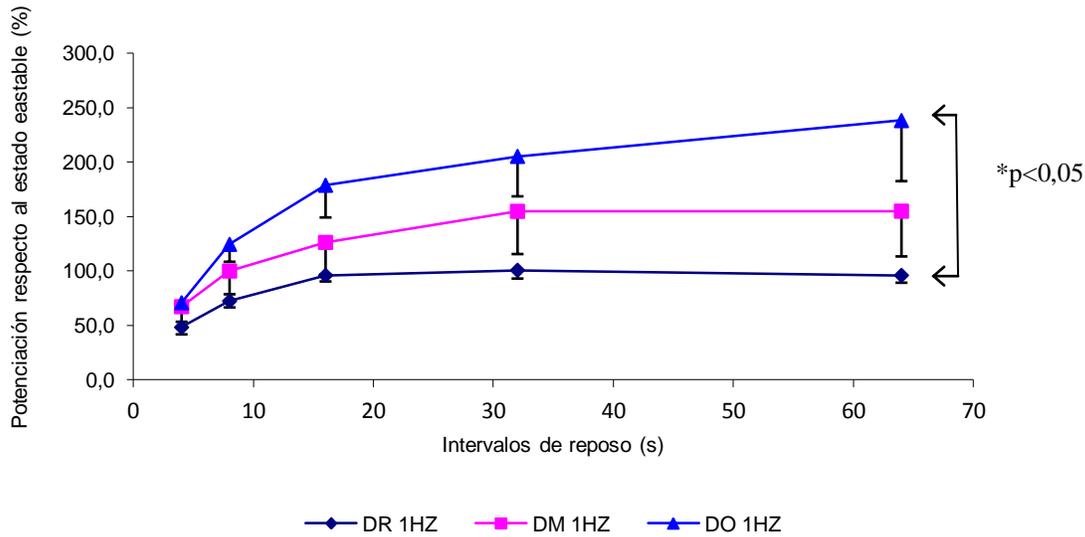


Media + EE , C =control/no diabéticas, O= oliva , M= maíz, R= ratarina

En el Gráfico 38, al igual que en el Gráfico 37, no se observó cambios significativos entre los diferentes grupos en la cinética de la potenciación post-reposo de las tiras de ventrículos aislados de ratas no diabéticas, sometidas a diferentes dietas, a la frecuencia de 0,5 Hz, pero también se encontró una tendencia a una menor potenciación en las tiras ventriculares de las ratas que ingirieron menor cantidad de lípidos totales (CR).

Gráfico 39

Cinética de la potenciación post-reposo de tiras de ventrículo derecho de ratas diabéticas, sometidas a dietas de ratarina (DR, N = 4) o ratarina enriquecidas con 5 % de aceite de maíz (DM, N=5) u oliva (DO, N = 5) a la frecuencia de 1Hz.



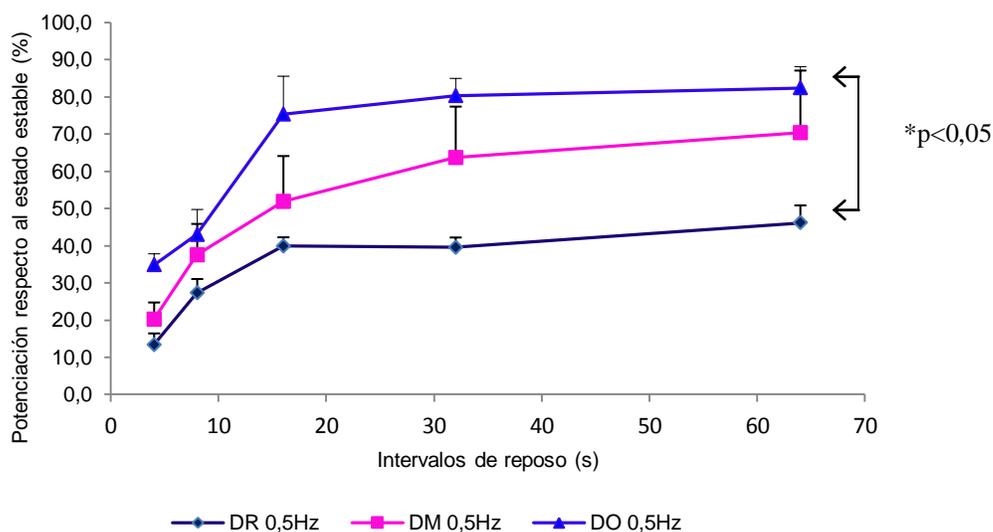
Media \pm EE. D= diabética, M= maíz, O= oliva, R= ratarina.

Cuando comparamos en el Gráfico 39 las cinéticas de la potenciación post-reposo de las tiras de ventrículos aislados de ratas diabéticas sometidas a diferentes dietas a la frecuencia de 1 Hz, observamos que la menor potenciación post-reposo se encontró en las tiras de ventrículo de las ratas alimentadas con ratarina (DR), que contenía menor porcentaje de lípidos totales en su dieta, mientras que las ratas cuya dietas fueron enriquecidas con aceite de maíz u oliva, presentaron una mayor potenciación post-reposo, quizás porque el contenido de lípidos totales es mayor (7%) como fue referido anteriormente. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas entre los grupos que contienen igual cantidad de lípidos totales (DM y DO). El grupo que ingirió aceite de oliva en su dieta (DO) presentó una mayor potenciación post-reposo, posiblemente debido al mayor porcentaje de ácido oleico ($12,1 \pm 1,2$) respecto al grupo que ingirió el aceite de maíz ($8,7 \pm 0,6$). Se encontraron diferencias significativas $p < 0,05$ entre la potenciación post-reposo de la tiras de ventrículo derecho de las rata diabéticas que ingirieron la dieta de ratarina (DR) y la que ingirieron

dieta de oliva (DO). No se encontró diferencias significativas en los grupos DR y DM. Lo que nos lleva a pensar, que en este caso lo que determina la mayor potenciación post-reposo no sea el contenido de lípidos porque es 7% en ambos grupos, sino el porcentaje y tipo de ácido graso incorporado a los fosfolípidos de los miocitos, es decir, mayor porcentaje de ácido oleico.

Gráfico 40

Cinética de la potenciación post-reposo de tiras de ventrículo derecho de ratas diabéticas, sometidas a dietas de ratarina (DR, N =4) o enriquecidas con 5 % de aceite de maíz (DM, N =5) u oliva (DO, N =5) a la frecuencia de 0,5 Hz.



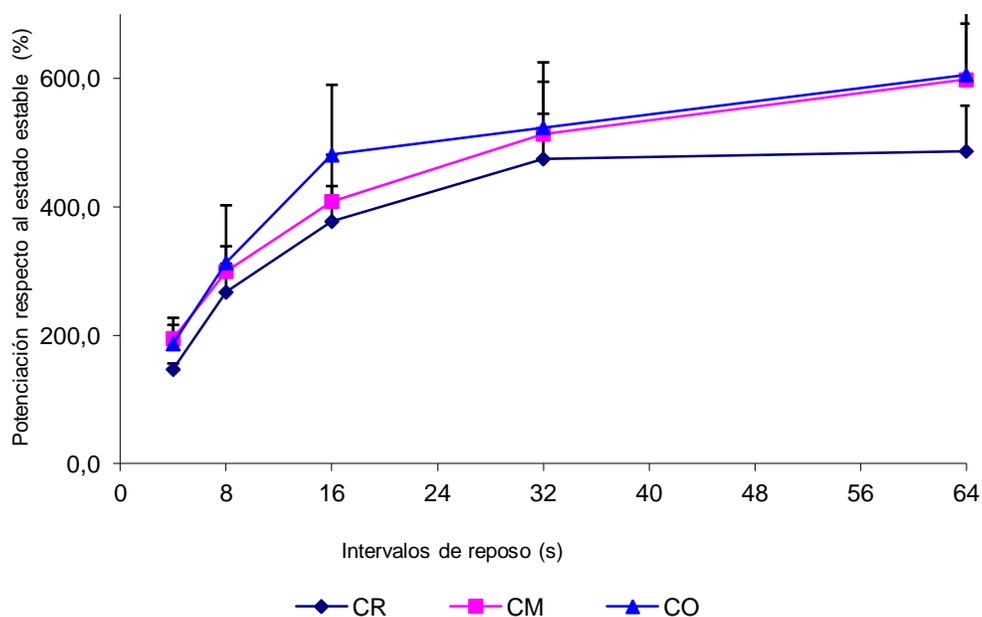
Media \pm EE. D= diabética, M= maíz, O= oliva, R= ratarina.

En el Gráfico 40 se muestra que a la frecuencia de 0,5 Hz las ratas que ingirieron dietas enriquecidas con aceite de oliva (DO) presentaron mayor potenciación ($p<0,05$) post-reposo con respecto a las ratas que ingirieron ratarina (DR), semejante resultado al encontrado a la frecuencia de 1 Hz (Gráfico 39). El grupo de ratas que ingirieron dietas enriquecidas con aceite de maíz (DM) no presentó diferencias significativas con ninguno de los dos grupos antes señalados (DR, DO). Los resultados a la frecuencia de 0,5 Hz son similares a los obtenidos a la frecuencia de 1 Hz.

A continuación evaluaremos el efecto de un agente bloqueante de los canales lentos de calcio, como el Verapamil, sobre tiras de ventrículo derecho de ratas no diabéticas y diabéticas sometidas a las diferentes dietas (1Hz). Cuando colocamos Verapamil (3×10^{-6} M) a la solución Tyrode en el baño de órganos que contiene las tiras de ventrículo derecho aislado de la rata no diabéticas, sometidas a las diferentes dietas, no encontramos diferencias significativas entre los diferentes grupos, como se observa en el Gráfico 41. El comportamiento es similar al mostrado en el Gráfico 37, en ratas no diabéticas sometidas a diferentes dietas y estimuladas a 1Hz. Al comparar los Gráficos 37 y 41, en ausencia y presencia de Verapamil, observamos que el nivel de potenciación alcanzado respecto al estado estable es mayor en presencia del inhibidor de Calcio que en su ausencia.

Gráfico 41

Cinética de la potenciación post-reposo de tiras de ventrículo derecho de ratas no diabéticas (Controles), sometidas a dietas de ratarina (CR) o enriquecidas con 5 % de aceite de maíz (CM) u oliva (CO) en presencia de 3×10^{-6} M de Verapamil a la frecuencia de 1Hz.



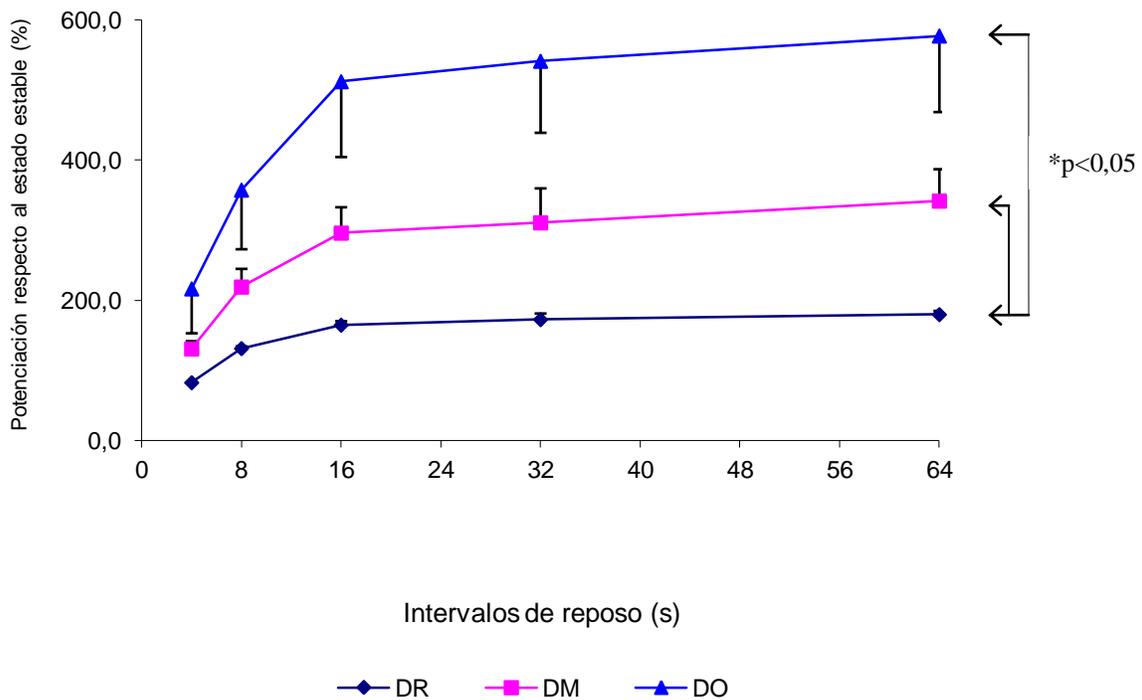
Media \pm EE C = control/no diabética, O= oliva, M= maíz R= ratarina. N=5

Si realizamos el mismo experimento pero con ratas diabéticas sometidas a las diferentes dietas (Gráfico 42), encontramos que el comportamiento es similar al del grupo diabético

sin verapamil (Gráfico 39), pero con una marcada y significativa tendencia a la diferenciación entre las curvas y de nuevo observamos que el nivel de potenciación alcanzado respecto al estado estable es mayor en presencia del inhibidor de Calcio que en su ausencia, a pesar de que el nivel de estado estable tiende a ser aún mayor en ausencia del inhibidor (Gráfico 33).

Gráfico 42

Cinética de la potenciación post-reposo de tiras de ventrículo derecho de ratas diabéticas, sometidas a dietas de ratarina (DR, N = 4) o enriquecidas con 5 % de aceite de maíz (DM) u oliva (DO) (N= 5), en presencia de 3×10^{-6} M de Verapamil a la frecuencia de 1Hz.



Media \pm EE D= diabética, M= maíz, O = oliva, R= ratarina. *p<0,05

El Gráfico 42, muestra diferencia significativa (*p<0,05) entre las potenciaciones obtenidas de las tiras ventriculares de ratas diabéticas que ingirieron ratarina (DR) respecto las que ingirieron aceite de oliva (DO) y las que ingirieron dietas enriquecidas con aceite de maíz

(DM), en todos los intervalos de reposo. No se encontró diferencia significativa entre las tiras de ventrículo de las ratas que ingirieron dietas de oliva (DO) y maíz (DM). El efecto del Verapamil es bloquear parcialmente los canales de Ca^{2+} tipo L, dependientes de voltaje disminuyendo la velocidad de conducción y en estos experimentos permitió demostrar las diferencias de la potenciación entre las tiras de ventrículo derecho de las ratas que ingirieron DR o DM.

Las tiras de los ventrículos derecho de las ratas diabéticas produjeron cambios en la cinética de la potenciación post-reposo, cuando las comparamos con sus respectivos grupos controles, pero además, éstas se ven influidas por el contenido de lípidos totales, así como el tipo de ácido graso y cuyas diferencias se evidencian al colocar un bloqueante de los canales lentos de calcio, como el Verapamil, que permitió diferenciar la potenciación del grupo DM del DR.

IV.4.- Potenciación post reposo en cardiomiocitos aislados ratas no diabéticas y diabéticas con las diferentes dietas.

Tomando en cuenta los resultados de la curva potenciación versus intervalo de reposo obtenida en tiras de ventrículo aislados de ratas diabéticas y no diabéticas con las diferentes dietas, donde encontramos que se alcanza la máxima fuerza de contracción o potenciación post-reposo después del intervalo de reposo de 32 segundos (periodo donde ocurre la mayor recaptación de calcio), decidimos escoger la potenciación a ese intervalo de reposo para posteriores estudios en miocitos aislados.

El análisis de los resultados obtenidos en miocitos aislados se realizó con el programa de Axón Instruments Inc.® que utiliza un cálculo de exponencial de probabilidad, método de algoritmos de Levenberg-Marquardt cuya ecuación es:

$$f(t) = \sum_{i=1}^n P_i (1 - e^{-t/\tau_i}) + C$$

P = Proporción, τ = constante de tiempo, i = componentes, C = constante de offset para cada i, t = tiempo. Esta ecuación minimiza la suma de cuadrados de las diferencias entre variables dependientes de la ecuación. Utilizando esta ecuación se calculó la magnitud de la el valor de Tau (constante de tiempo expresada en milisegundos) de la relajación en los registros de contracción y de calcio sistólico. También se calculó potenciación post-reposo en los registros de contracción y de calcio sistólico, estos datos se llevaron a la hoja de Excel donde se realizó los cálculos correspondientes y se estableció la diferencia entre la

potenciación y el estado estable previo al reposo, esta diferencia se expresó como porcentaje de variación del parámetro (contracción o calcio sistólico) respecto al estado estable. Los resultados obtenidos los visualizamos en la Tabla 9, que muestran la Media \pm EE en la magnitud de la potenciación post-reposo (en los registros de contracción de los miocitos y del calcio sistólico) respecto al estado estable expresado en porcentaje (%), y los valores de Tau en milisegundos en ratas no diabéticas y diabéticas, a la frecuencias 0,5 Hz con diferentes dietas.

De los resultados experimentales en tiras de ventrículos derecho aisladas de ratas se desprende que tanto la dieta, la frecuencia de estimulación (0,5 o 1 Hz) así como la diabetes, inciden sobre la potenciación post reposo, hemos decidido analizar los resultados obtenidos en miocitos aislados a la frecuencia de 0,5 Hz, de manera que podamos inferir el efecto de la dieta sobre la potenciación post reposo obtenida a 32 segundos en ratas no diabéticas y diabéticas. Los resultados obtenidos del estudio de la potenciación post-reposo en los miocitos ventriculares aislados se muestran en la Tabla 9. Ejemplos de los registros unitarios realizados en los miocitos aislados se observan en los Gráficos 43 y 44.

En el Gráfico 43, podemos observar, registros unitarios y simultáneos de Calcio sistólico ($[Ca^{2+}]_i$) y Contracción obtenidos en el estado estable (verde) y después de un intervalo de reposo de 32s (potenciación, rojo), en tres miocitos aislados de ratas no diabéticas (controles) estimuladas a 0,5 Hz. Están representados los registros obtenidos en un cardiomiocito aislado de una rata alimentada con ratarina (CR), de una rata alimentada con ratarina enriquecidas con 5% de aceite de oliva (CO) y de otra rata alimentada con maíz (CM). Tanto el calcio sistólico como la contracción se expresan en porcentaje, considerando el 100% la magnitud del parámetro en el estado estable. Este grafico evidencia que los miocitos de ratas alimentadas con dieta rica en aceite de oliva (CO) presentaron la mayor potenciación post-reposo cuyo valor puede ser observado en la Tabla 9.

Gráfico 43

Registros unitarios y simultáneos de Calcio sistólico ($[Ca^{2+}]_i$) y Contracción respecto al tiempo, obtenidos en miocitos aislados de ratas no diabéticas (controles), estimuladas a 0,5 Hz, alimentadas con ratarina (CR) o ratarina enriquecida con 5% de aceite de oliva (CO) o maíz (CM). Se muestran los registros en estado estable (color verde) y potenciación después del reposo de 32 s (color rojo), en azul se indica el lugar donde se calculó el Tau de la relajación y disminución del calcio sistólico.

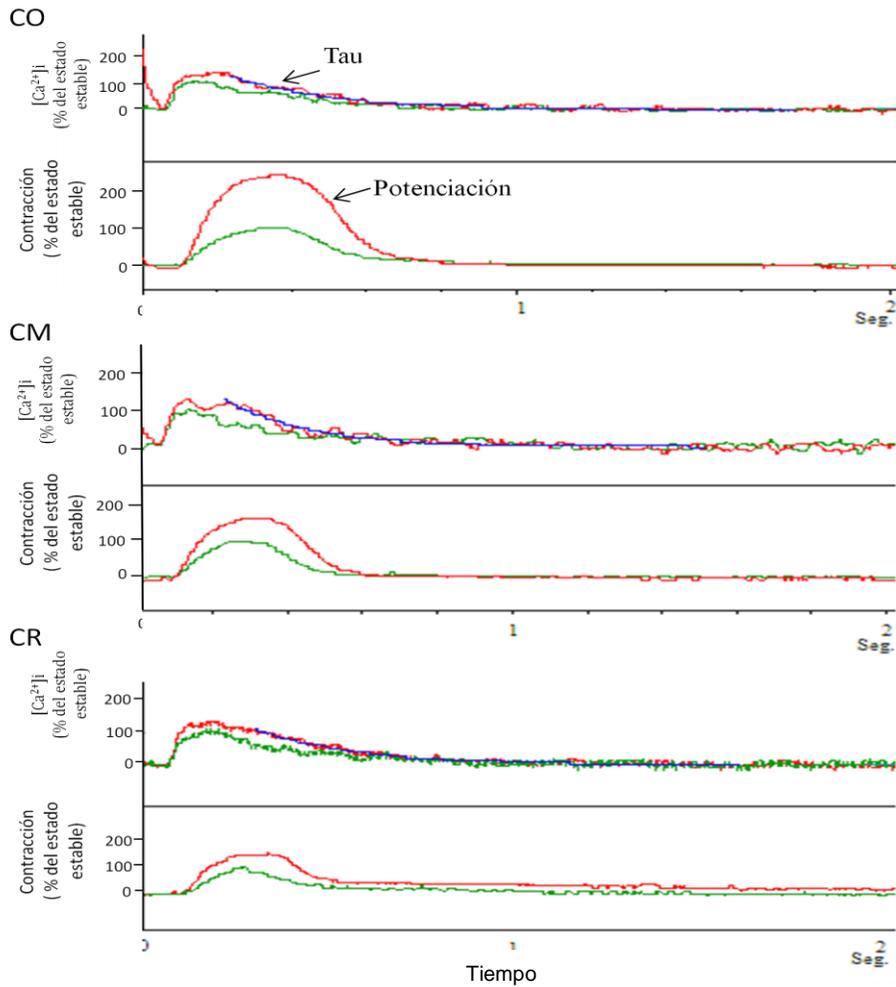
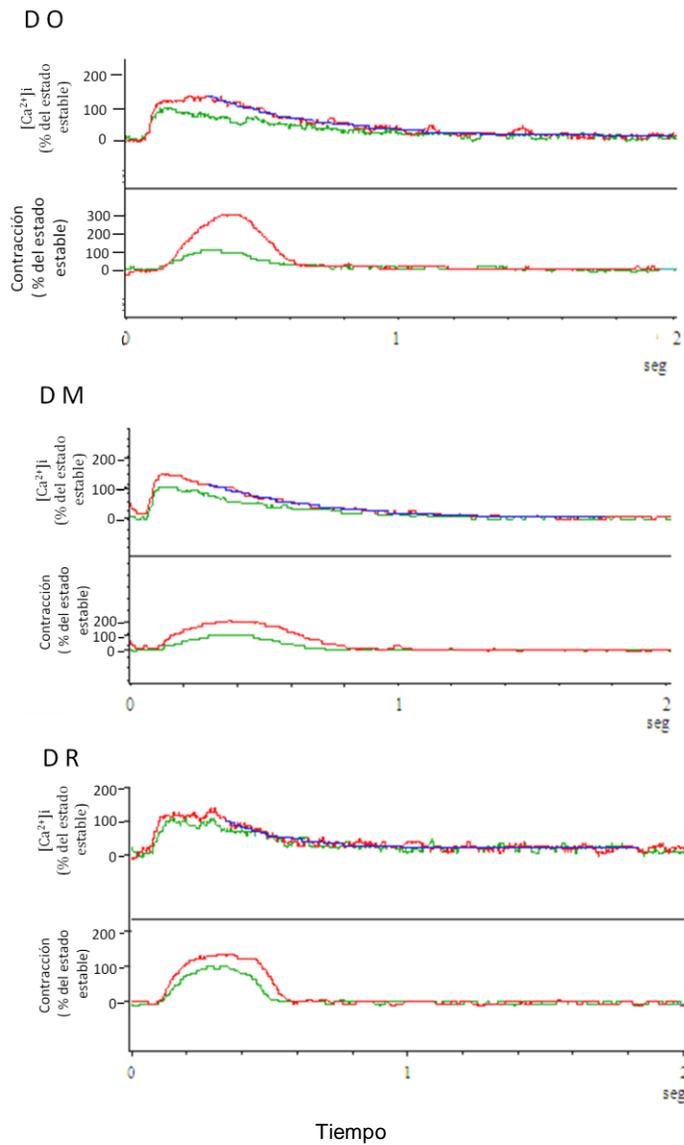


Gráfico 44

Registros unitarios y simultáneos de Calcio sistólico ($[Ca^{2+}]_i$) y Contracción respecto al tiempo, obtenidos en miocitos aislados de ratas diabéticas estimuladas a 0,5 Hz, alimentadas con dieta enriquecidas con aceite de oliva (DO), con maíz (DM) o ratarina (DR). Se muestran los registros en estado estable (color verde) y la potenciación después del reposo de 32 s (color rojo), en azul se indica el lugar donde se calculó el Tau de la relajación y disminución del calcio sistólico



En el Gráfico 44 se observa una mayor potenciación en las ratas diabéticas que ingirieron en su dieta aceite de oliva, que se correlaciona con mayor calcio sistólico en relación con las otras dos dietas y resultado similar al encontrado en las controles (CO, Gráfico 43), estos porcentajes están reportados en la Tabla 9.

En la Tabla 9, tenemos representados los porcentajes de variación de los diversos parámetros estudiados (Contracción, tau del registro de contracción, Calcio sistólico y tau del calcio sistólico) en los cardiomiocitos respecto al estado estable, aislados de ratas no diabéticas (controles) y diabéticas, sometidas a las distintas dietas y a la frecuencia de 0,5 Hz. En la Tabla referida se puede observar, una menor contracción post-reposo ($*P < 0,05$) en los cardiomiocitos aislados de las ratas no diabéticas que ingirieron una dieta enriquecida con aceite de maíz (CM) respecto al encontrado en ratas diabéticas que ingirieron la misma dieta (DM), así como al resto de los grupos estudiados. Se encontró menor calcio sistólico ($***p < 0,05$) en los cardiomiocitos de las ratas diabéticas (DM) que la CM, y con tau de calcio sistólico mayor. No se encontraron diferencias significativas en los animales que ingirieron la dieta CO (Gráfico 43) y los diabéticos con la dieta de oliva (DO) o con la dieta de aceite de maíz (DM).

Entre los cardiomiocitos diabéticos, el grupo de las ratas que ingirieron ratarina (DR, Gráfico 44) presentó una contracción significativamente menor ($*p < 0,05$) respecto a las ratas que ingirieron las demás dietas. Resultado semejante al mostrado en tiras ventriculares (Gráfico 40).

Al comparar la contracción registrada en la potenciación post-reposo de ratas no diabéticas y diabéticas, los cardiomiocitos de ratas sometidas a la dieta de oliva (CO y DO) no presentaron diferencia significativa en su contracción, resultado semejante al encontrado en las tiras ventriculares (Gráfico 36). Al comparar cardiomiocitos de dietas con ratarina, CR presenta una contracción significativamente mayor que DR, como en las tiras ventriculares (Gráfico 34). Es de hacer notar que en los miocitos de ratas alimentadas con ratarina la diabetes produce disminución de la contracción, hecho reportado por otros autores (89, 93), en ratas alimentadas con dieta rica en aceite de oliva la diabetes no produjo disminución de la contracción (CO Vs DO), sin embargo en las ratas con dietas ricas en maíz la fuerza de contracción aumenta (CM Vs DM), lo que implica una mejora en la función contráctil de las ratas diabéticas al incorporar en su dieta el ácido linoleico (C18: 2,n-6). Los cambios

producidos en la función contráctil producido por las diferentes dietas probablemente estén relacionados con cambios en el microambiente lipídico de las membranas de los diferentes organelos involucrados en el manejo intracelular del calcio (80).

En la Tabla 9, se muestra que el mayor cambio en la relajación del registro de contracción (Tau) se observó en las ratas diabéticas cuyas dietas fueron enriquecidas con aceite de oliva (DO), siendo significativamente mayor (** $p < 0,05$), respecto a todos los grupos, excepto el grupo CM. Esto nos indica que en ratas diabéticas que ingieren dieta rica en aceite de oliva ocurre un retardo en la disminución de la concentración del calcio citosólico, quizás por disminución en la recaptación de calcio por el RS (efecto sobre la ATPasa Ca del RS) o por retardo en la salida de Ca^{2+} del citosol (efecto sobre el intercambiador Na^+/Ca^{2+} y/o la ATPasa Ca del sarcolema), o ambas. Zhong y col. (89, 93) reportaron en ratas con diabetes de 4 y 8 semanas (dieta de ratarina), una disminución de la potenciación post reposo asociada con una menor recaptación de calcio por el RS por una baja afinidad de la ATPasa Ca del RS, efecto semejantes al reportado en este estudio en ratas DO. Al analizar la Tau del registro de contracción en las ratas no diabéticas con diferentes dietas concluimos que la de maíz hace que disminuya la relajación, pero al hacerse las ratas diabéticas esa dieta acelera la velocidad de relajación, hecho que constituye una ventaja ya que mejora la disfunción diastólica.

El porcentaje de la amplitud de la potenciación del cardiomiocito en relación al estado estable en el registro de calcio sistólico, con intervalos de reposo de 32s y 0,5 Hz, mostró que el pico de calcio sistólico, fue significativamente mayor (** $p < 0,05$) en las ratas no diabéticas y diabéticas que ingirieron una dieta enriquecida con aceite de oliva (CO y DO) respecto a los otros grupos (CR, CM, DR, DM). Los cardiomiocitos aislados de las ratas diabéticas, que en su dieta ingirieron aceite de oliva, presentaron el mayor porcentaje de calcio sistólico, que se correlaciona con lo observado en las tiras de ventrículo derecho, es decir, una mayor potenciación en ventrículos de las ratas diabéticas que ingirieron dietas enriquecidas con aceite de oliva.

Llama la atención que con dieta rica en aceite de maíz el porcentaje de calcio sistólico es menor respecto a el obtenido cuando esta presente el aceite de oliva (DM Vs DO), sin embargo con esta dieta (DM) se obtuvo en las ratas diabéticas un valor de contracción comparable al obtenido en las ratas DO, esto nos induce a pensar que en las ratas diabéticas

la dieta rica en aceite de maíz aparentemente induce a un aumento de la sensibilidad de la maquinaria contráctil al calcio, pero harían falta realizar experimentos para ahondar en este punto. Habría que estudiar la afinidad de la Troponina C por el calcio ya que este ión al quedar unido por más tiempo a ella y las proteínas contráctiles induciría un aumento en la contracción y un enlentecimiento en la relajación.

En vista de que la diabetes es una patología multifactorial desde el punto de vista metabólico donde las especies oxígeno reactivas y los PPARs están involucrados en la disfunción cardíaca (68,108), sería conveniente estudiar los efectos de los ácidos grasos oleico y linoleico sobre estos dos elementos.

Con respecto al tau del registro de calcio sistólico, se encontró valores mayores (**** $p < 0,05$) en el grupo de miocitos ventriculares aislados de ratas diabéticas que ingirieron una dieta enriquecida con aceite de maíz (DM) en relación a los demás grupos, excepto al grupo control (CR). Este hecho contrasta con la mayor velocidad de relajación obtenida en el registro de contracción del mismo grupo (DM), lo que se podría explicar como se dijo con antelación por el aumento de la sensibilidad de la maquinaria contráctil al calcio.

Los resultados obtenidos en este estudio en animales experimentales, parecen indicar que en pacientes con diabetes Tipo 1, que presenten una disfunción diastólica, la dieta en aceite de maíz, sería conveniente para mejorar esta patología.

Hoy día con las técnicas de diagnóstico no invasivas, se podría evaluar las cardiopatías diabéticas y observar el funcionamiento del corazón de estos pacientes. Tomando en consideración estos resultados se podría recomendar un cambio en la dieta con énfasis en determinado consumo de aceite con miras a mejorar la función cardíaca y su calidad de vida.

Tabla 9

Diferentes parámetros de la potenciación post-reposo en miocitos ventriculares aislados de ratas con diferentes dietas, en relación al estado estable. Intervalos de reposo 32 segundos, frecuencia 0,5 Hz, (N) = número de células. Media ± EE.

Parámetros / Dietas	No diabéticas (Control)			Diabéticas		
	Ratarina (CR)	Maíz (CM)	Oliva (CO)	Ratarina (DR)	Maíz (DM)	Oliva (DO)
Contracción miocitos (%)	64,77±9,34 (6)	26,38±2,16*	81,36±3,58 (4)	47,84±5,77 (8)	75,00±5,27 (5)	70,82±7,38 (4)
Tau Relajación (ms)	72,19±5,08 (8)	100,79±5,43 (10)	80,52±8,82 (5)	66,11±7,44 (7)	76,62±14,00 (10)	112,17±12,32** (6)
Calcio Sistólico (%)	35,02±7,77 (6)	28,30±5,04 (6)	120,00 ± 11,55 (4)	25,00±11,18 (6)	17,37±2,17 (10)	80,53±14,85*** (5)
Tau Calcio Sistólico (ms)	306,72±25,05 (8)	274±20,83 (9)	244,44±19,32 (6)	229,49±22,24 (7)	367,02±27,70 (15) ****	242,44±16,80 (6)

*p<0,05 CM es menor vs,CR, CO,DR,DM y DO además DR es menor vs DM y CO

**p<0,05 DO es mayor vs CR,CO,DR y DM

***P<0,05 DO es mayor vs CR,CM,DR y DM

****p<0,05 DM es mayor vs CM,CO,DR y DO

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

- 1.-La inyección de estreptozotocina por vía intraperitoneal, produjo una diabetes tipo 1, con aumento de la glicemia plasmática, polifagia, polidipsia y poliurea.
- 2.-Las ratas diabéticas que estuvieron cuatro semanas ingiriendo las distintas dietas presentaron un peso corporal menor que el de las ratas no diabéticas. En las ratas diabéticas a menor ingesta de lípidos en la dieta menor peso corporal.
- 3.-Se encontró que los ácidos grasos contenidos en los Lípidos de las dietas, se incorporan a los fosfolípidos de los cardiomiocitos ventriculares aislados de ratas diabéticas y no diabéticas en forma diferente.
- 4.-Se observó mayor porcentaje de C18:2,n-6 (linoleico) en los miocitos de los fosfolípidos de las ratas diabéticas cuya dieta fue enriquecida con aceite de maíz, y una disminución en los miocitos de los fosfolípidos de las ratas no diabéticas, mientras que el porcentaje C18:1,n-9 fue mayor en los cardiomiocitos de las ratas diabéticas que ingirieron en su dieta aceite de oliva.
- 5.-La máxima Potenciación post-reposo en relación al estado estable en las tiras de ventrículo derecho aisladas de ratas diabéticas y no diabéticas, fue a los 32 segundos, e independiente de la cantidad y calidad de lípidos en la dieta.
- 6.-Las tiras ventriculares de los animales diabéticos que ingirieron menor contenido de lípidos en la dieta (DR), tanto a la frecuencia de 0,5 o 1 Hz, presentaron la menor cinética de potenciación post-reposo, que podría estar relacionada con una depresión metabólica que conduce a menor producción de ATP y a una menor entrada de calcio a los cardiomiocitos.
- 7.-Independientemente de la dieta y de la presencia a no diabetes tipo 1 en las ratas, al aumentar la frecuencia de estimulación (0,5 Hz o 1 Hz) en las tiras de de los ventrículos derechos, aumentó la potenciación post-reposo respecto al estado estable, indicando que hay una mayor ganancia de calcio durante el reposo y mayor liberación de Ca^{+2} del RS.
- 8.-Las tiras ventriculares de las ratas diabéticas alimentadas con una dieta enriquecida con aceite de oliva (DO) presentaron mayor potenciación post-reposo respecto a las ratas que ingirieron ratarina (DR).

9.-Al bloquear parcialmente la entrada de calcio por los canales de calcio tipo L de los cardiomiocitos con Verapamil, se encontró que la fuerza de contracción en el estado estable es menor, es decir que entra menor cantidad de calcio del medio extracelular.

10.-En la cinética de potenciación post-reposo en las tiras de los ventrículos derechos de las ratas diabéticas con las diferentes dietas (DR, DM, DO) a la frecuencia de 1Hz en presencia de Verapamil, se observó, que al bloquear la entrada de calcio, la fuerza de contracción del estado estable es menor y el porcentaje de potenciación respecto a él, permitió observar las diferencias entre DM y DR.

10.-Los cardiomiocitos aislados de las ratas diabéticas, que ingirieron dietas de ratarina (DR) a 32 s de reposo presentaron la menor potenciación post-reposo lo que ratifica lo encontrado en las tiras de ventrículo derecho.

11.-Los cardiomiocitos aislados de las ratas diabéticas y no diabéticas, que en su dieta ingirieron aceite de oliva, presentaron el mayor porcentaje de calcio sistólico, que se correlaciona con lo observado en las tiras de ventrículo derecho, es decir, una mayor potenciación en ventrículos de las ratas diabéticas que ingirieron dietas enriquecidas con aceite de oliva.

12.-En los miocitos de ratas no diabéticas la mayor potenciación se observó en ratas donde la dieta fue enriquecida con aceite de oliva (CO) y la menor en los miocitos de las ratas cuya dieta fue enriquecida con aceite de maíz (CM).

13.-Los cardiomiocitos de ratas diabéticas, que ingirieron aceite de oliva (DO) y de maíz (DM) presentan un mayor porcentaje de potenciación que se correlaciona con lo observado en las tiras de ventrículo derecho; no obstante el calcio sistólico fue mayor en los cardiomiocitos de las ratas que ingirieron en su dieta aceite de oliva (DO), lo que sugiere que en la diabetes se produjo cambios en la sensibilidad de los miocitos dependiendo de la dieta, siendo mayor en DM que en DO.

14.-La constante de tiempo de la relajación (Tau) en el registro de contracción fue igual entre las ratas no diabéticas. En las ratas diabéticas que en su dieta fue enriquecida con aceite de oliva (DO y DM) mostraron una mayor Tau respecto a las ratas que ingirieron ratarina (DR).

15.-Entre los grupos de ratas no diabéticas el porcentaje de Calcio sistólico fue mayor en las ratas que ingirieron en su dieta aceite de Oliva y en el tau (ms) de calcio sistólico no se encontró diferencia significativas. En las ratas diabéticas las dieta que fue enriquecida con aceite de maíz (DM) presentaron el mayor Tau en el registro de calcio sistólico, esta fue incluso mayor que la Tau de las ratas no diabéticas, a excepción de las CR.

16.-Las respuesta de la potenciación post-reposo en el estudio en cardiomiocitos ventriculares aislados, fue similar al comportamiento de las tiras de ventrículo derecho aislados de ratas diabéticas y no diabéticas con las distintas dietas.

17.-Los resultados obtenidos en las ratas diabéticas, tanto en tiras ventriculares como en miocitos aislados parecen sugerir que para mejorar la disfunción diastólica, la dieta rica en aceite de maíz es más conveniente, ya que aumentó la fuerza de contracción y la velocidad de relajación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Corr PB, Yamada KA. Selected metabolic alterations in the ischemic heart and their contributions to arrhythmogenesis. *Herz* 1995; 20: 156-1568.
- 2.- Gudbjarnason S. Dynamics of w-3 and w-6 fatty acids in phospholipids of Heart muscle. *J Intern Med (suppl)*.1989; 225: 117-128.
- 3.- Honen BN, Saint DA, Laver DR. Suppression of calcium sparks in rat ventricular myocytes and direct inhibition of sheep cardiac RYR channels by EPA, DHA and oleic acid. *J Memb Biol*. 2003; 196: 95 -103.
- 4.- Alfonso-Pérez Candelaria. Efecto de distintas maniobras inotrópicas sobre la potenciación post-reposo en aurículas izquierda y ventrículo derecho aislado de rata. Trabajo de ascenso Asistente. Biblioteca IME-UCV. 2002; 1-87.
- 5.- King H, Aubert RE Herman WH. Global burden of diabetes, diabetes care. 1998; 21:1414-1431.
- 6.- Negretti N. Pérez MR, Walkerr DA, O'neill SC. Inhibition of sarcoplasmic reticulum function by polyunsaturated fatty acids in intact solated myocytes from rat ventricular muscle. *J Phys*. 2000; 523:367- 375.
- 7.- Gruñid SM, Benjamín IJ, Burke GL, Chait A, Eckel RH, Howard BV, Match W, Smith SC, Swers JR. Diabetes y cardiovascular disease: a statement for health care professionals from the American Heart Association. *Circulation* 1999; 1134 -1146.
- 8.- Sandow, A. The latent period of muscular contraction. *Arch Phys Med*. 1950; 31: 367-377.
- 9.- Fabiato A. Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of the skinned canine cardiac Purkinje cell. *J Gen Physiol*. 1985; 85: 247-289.
- 10.- Yuan W, Ginsburg KS, Bers DM . Comparison of sarcolemmal calcium channel current in rabbit and rat myocytes. *J Physiol (lond)*. 1996; 493: 733-746.
- 11.- Zühlke R D, Pitt GS, Deisseroth K, Tsien RW, Reuter H. Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L type calcium channels. *Nature* 1999; 399: 159 -162.

- 12.- López-López JR, Shacklock PS, Balke Cw, Wier WG. Local calcium transients triggered by single L-type calcium channel currents in cardiac cells. *Science*. 1995; 268: 1045 -1049.
- 13.- Boknik P, Unkel C, Kirchhefer U, Klein-Wiele O, Knapp J, Linck B, Luss H, Muller F, Schmitz W, Vahlensieck U, Zimmermann N, Jones L, Neuman J. Regional expresión of phospholamban in the human Heart. *Cardivas Res* 1999; 42: 67-76.
- 14.- Antipenko A, Spielman AI, Kirchberger MA. Kinetic differences in the phospholamban-Regulated Calcium Pump When Studied in Crude and Purified Cardiac Sarcoplasmic Reticulum Vesicles. *J Memb Biol*.1999; 167: 257-265.
- 15.- Ono K, Trautwein W. Potentation by cyclic GMP β -Adrenérgica effect on Ca^{2+} current in guinea- pig ventricular cells. *J Physiol lond*. 1991; 443: 387-404.
- 16.- Herzig S, Meier A, Pfeiffer M, Neumann J. Stimulation of proteinphosphatases as a mechanism of the muscarinic-receptor-mediated inhibition of cardiac L-type Ca^{2+} channels. *Pflugers Arch* .1995; 429: 531-538.
- 17.- Sipido KR, Carmeliet E, Van der Werf. T. Type Ca^{2+} current as a trigger for Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum in guinea-pig ventricular myocyte. *J Physiol (Lond)*. 1998; 508: 439-371.
- 18.- Sato M, Gong H, Terraccino CM, Harding SE. Loss of β - adrenoceptor response in myocytes overexpressing the Na^{+}/Ca^{2+} Exchanger. *J Mol Cell Cardiol*. 2004; 36: 45-48.
- 19.- Viola H M, Arthur P G, Hool L C. *J Mol and Cell Cardiol*. 2009; 46: 1016-1026.
- 20.- Luo CH, Rudy Y. A dynamic model of the cardiac ventricular action potential. II. Afterdepolarizations, triggered activity, and potentiation. *Circ Res*. 1994; 74: 1097-1113.
- 21.- Zhang L, Kelley J, Schmeisser G, Kobayashi YM, Jones L. Complex Formation between Junctin, Calsequestrin, and the Ryanodine Receptor. *J Biol Chem* 1997; 272: 23389-23397.

- 22.- Hove-Madsen L, Bers DM. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake and thapsigargin sensitivity in permeabilized rabbit and rat ventricular myocytes. *Circ Res.* 1993; 73: 820 - 828.
- 23.- Bers DM, Perez-Reyes E. Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release. *Cardiovascular Research* 1999; 42: 339 -360.
- 24.- Quist E E. Quist CW, Vasan R. Inositol Polyphosphates regulate Ca²⁺ efflux in a cardiac membrane subtype distinct from junctional sarcoplasmic reticulum. *Arch Biochem and Biophys.* 2000; 384: 181-189.
- 25.- Bassani JWM, Basan RA, Bers DM. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *J Physiol (Lond).* 1994; 476: 279-293.
- 26.- Arai M, Matsui H, Periasamy M Sarcoplasmic reticulum gene expression in cardiac hypertrophy and Herat failure. *Circ Res.* 1994; 74: 555-564
- 27.- Pogwizd S M. Qi M. Yuan W. Samarel AM. Bers DM. Upregulation of Na⁺/Ca²⁺ exchanger expression and function in an arrhythmogenic rabbit model of heart failure. *Circ Res.* 1999; 85: 1009-1019
- 28.- Isenberg G. Han S. Schiefer A. Wendt-Gallitelli M. Changes in mitochondrial calcium concentration during the cardiac contraction cycle. *Cardovasc Res.* 1993; 27: 1800-1809.
- 29.- Rutter G A and Hirsuto R. Regulation of mitochondrial metabolism by ER Ca²⁺ release: an intimate conection. *TIBS.* 2000; 25: 21-5220.
- 30.- Schouten V J, Bucx J.J, Trompe P.P, Ter Keurs H.E. Sarcolemma, sarcoplasmic, and sarcomere as limiting factors in force production in rat heart. *Circ.Res.*1990a; 67: 913-22.
- 31.- Solaro R J. Wise RM. Shiner J.S. Briggs FN. Calcium requirements for cardiac myofibrillar activation. *Circ. Res.* 1974; 34: 525-530.
- 32.- McWilliam JA. On the rhythm of the mammalian Heart. *J Physiol.* 1888; 9: 167-198.
- 33.- Koch-WwserJ, Blinks Jr. The influence of the interval betweenbeats on myocardial contractility. *Parmacol Rev.* 1963; 25: 601-652.

- 34.- Maier Lars S; Bers Donald M. Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2002; 34: 919-939.
- 35.- Alfonso-Pérez Candelaria. Cinética de la potenciación post-reposo, cronotropismo en tejido cardiaco y nitrotirosina en plasma de ratas, sometidas a dietas con diferentes aceites. Trabajo ascenso Agregado. Biblioteca IME-UCV. 2004; 1-77.
- 36.- Rivers, JP Sinclair AJ, Crawford MA. Inability of the cat to desaturate essential fatty acids. *Nature*. 1975; 258: 171-173.
- 37.- Benolken RM, Anderson RE, and Eles TG. Membrana fatty acids associated with the electrical response in visual excitation. *Science*. 1973; 182: 1253 -1254.
- 38.- Kingsbury KJ, Brett C, Stovold R, Chapman A, Anderson J, Morgan DM. Abnormal fatty acid composition and human atherosclerosis. *Postgrad. Med J* 1974; 50: 425 - 440.
- 39.- Muller H, Deckers K, Eckel J. The fatty acid translocase (Fat)/CD36 and the glucose transporte GLUT4 are localiza d in different cellular compartments in rat cardiac muscle. *Biochemical Biophys Res Comun.*2002; 239: 665 - 669.
- 40.- **Brian N. Finck and Daniel P. Kelly** .Peroxisome Proliferator-activated Receptor α (PPAR α) Signaling in the Gene Regulatory Control of Energy Metabolism in the Normal and Diseased Heart *J Mol Cell Cardiol.*2002; 34: 1247- 1257.
- 41.- Roy R, Calvo JH, Hayes H, Rodellar C, Eggen A. Fine mapping of the bovine heart fatty acid-binding protein gene (FABP3) to BTA2q45 by fluorescence in situ hybridization and radiation hybrid mapping. *Anim Genet*. 2003; 34: 466 -467.
- 42.- Shinomura T, Asaoka Y, Oka M, Yoshida K, Nishizuka Y. synergistic action of diacylglycerol and unsaturated fatty acid for protein kinase C activation : its possible implications *Proc Natl Acade Sci USA* 1991; 88: 5149 - 5153.
- 43.- Pi Y, Jeffery WW. Diacyl glycerol y fatty acids synergistically increase cardiomyocyte contraction via activation of PKC. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000; 279: H26 - H34.

- 44.- Brian N. Finck y Daniel P. Kelly J Mol Cell Cardiol.2002; 34: 1247- 1257
Peroxisome Proliferator-activated Receptor α (PPAR α) Signaling in the Gene
Regulatory Control of Energy Metabolism in the Normal and Diseased Heart
- 45.- Lokuta A, Cooper C, Gaas S, Wang H, Rogers T. Angiotensin II stimulates the
release of phospholipids-derived second messengers through multiple receptor
subtypes in Heart cells. J Biol Chem. 1994; 269: 4832 - 4838.
- 46.- Benediktsdottir VE, Curves J, Sigmundur G. Time of alterations in phospholipid fatty
acids and number of β adrenoceptors in the rat Heart during adrenergic stimulation in
vivo. J Mol Cell Cardiol.1999 ; 31: 1105 -1115.
- 47.- Siscovick DS, Raghunathan T, WeinmannS, Bovbjerg VE, Kushi L, Cobb LA, Copas
SM, Psaty BM, Lemaitre R, Retzlatt B, Knopp RH. Dietary intake of long-chain n-3
polyunsaturated fatty acids and the risk of primary cardiac arrest. Am J Clin Nutri.
2000; 71: 208S -212S.
- 48.- Xiao YF, Gómez AM, Morgan JP, Lederer WJ, Leaf A. Suppression of voltaje- gated
L type Ca currents by polyunsaturated fatty acids in adult and neonatal rat ventricular
myocytes. Proc Natl Acad Sci USA. 1997; 94: 4182 - 4187.
- 49.- Hagve TA, Sprecher H. Metabolismo of long-chain polyunsaturated fatty acids in
isolated cardiac myocytes. Bioch Bioph Acta.1989; 1001:338 - 344.
- 50.- Herelia S, Lopez Jiménez JA, Bordón A, Ngarro SZ, Horrobin DF, Rossi CA, Biagi
PL. Essential fatty acid in cultured rat cardiomyocyte response to ester n-6 or n-3
fatty acid supplementation. Biochem Biophys Res Commun.1995; 216:11 -19.
- 51.- Gudbjarnason S. Dynamics of w-3 and w-6 fatty acids in phospholipids of Heart
muscle. J Intern Med (suppl).1989; 225: 117-128.
- 52.- McLennam PL, Bridle TM, Abeywardena MY, Charnock JS. Comparative Efficacy of
n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids in modulating vascular fibrillation Threshold
in Marmoset Monkeys. Am J Clin Nutr. 1993; 58: 1555 -1561.
- 53.- Kang JX, Leaf A. Effects of long-chain polyunsaturated fatty acids on the contraction
of neonatal rat cardiac myocytes. Proc Natl Acade Sci USA. 1994; 91: 9886 - 9890.

- 54.- Huang JM, Xian H, Bacanes M. Long- Chain fatty acids activate calcium channels in ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89:6452 -6456.
- 55.- Charnock JS, Abeywardena MY, Poletti VM, McLenan PL. Differences in fatty acid composition of various tissues of the Marmoset Monkey (*callithrix jacchus*) after different lipid supplemented diets. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*.1992; 101: 387- 393.
- 56.- McLennam D, Mano M, Rayner T, Head R. The cardiovascular protective role of docosahexaenoic acid. *Eur. J. Pharmacol*. 1996; 300: 83 - 89.
- 57.- Leifert WR, MC Murchie EJ, Saint DA. Inhibition of cardiac sodium currents in adult rat myocytes by n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Physiol*. 1999; 520:Pt 3: 671 - 679.
- 58.- Negretti N. Pérez MR, Walkerr DA, O'neill SC. Inhibition of sarcoplasmic reticulum function by polyunsaturated fatty acids in intact isolated myocytes from rat ventricular muscle. *J Phys*. 2000; 523: 367- 375.
- 59.- Honen BN, Saint DA, Laver DR. Suppression of calcium sparks in rat ventricular myocytes and direct inhibition of sheep cardiac RYR channels by EPA, DHA and oleic acid. *J Memb Biol*. 2003; 196: 95 -103.
- 60.- Dallongeville J, Yarnell J, Ducimetiere P, Arvelier D Ferreieres J , Montaye M, Luc G, Evan SA, Bingham A, Hass B, Ruidavets JB, Amoyef P. Fish consumption is associated with lower Heart rates. *Circulation* 2003; 108: 820 -825.
- 61.- Geelen A, Brouwer IA ,Zock PL, Koers JA, Swenne CA, Katan MB, Schouten EG. (n-3) fatty acids not affect electrocardiographic characteristics of healthy men and women. *J Nutr*. 2002; 132: 3051- 3054.
- 62.- Flagg Thomas P., Cazorla Olivier, Remedi Maria S., Haim Todd E., Tones Michael A., Bahinski Anthony, Numann Randal E., Kovacs Attila, Schaffer Jean E., Nichols Colin G. and Nerbonne Jeanne M. Ca²⁺-Independent Alterations in Diastolic Sarcomere Length and Relaxation Kinetics in a Mouse Model of Lipotoxic Diabetic Cardiomyopathy *Circ. Res*. 2009; 104:95-103.

- 63.- Passi S, Picardo M, De Luca C, Nazzaro-Porro M, Rossi L, Rotilio G. Saturated dicarboxylic acids as products of unsaturated fatty acid oxidation. *Biochim Biophys Acta*. 1993; 1168: 190 -198.
- 64.- Barrer PM, Kelly DP. PPAR signaling in the control of cardiac energy metabolism. *Trends in Cardiovascular Med*. 2000; 10: 238-245.
- 65.- Lo Verme J, Fu J, Astarita G, La Rana G, Russo R, Calignano A, Piomelli D. The nuclear receptor PPAR- Alfa mediates the anti-inflammatory actions of palmitoytethanolamide. *Mol Pharmacol*. 2005; 67: 15 - 19.
- 66.- Guzman M, Lo Verme J, Fu J, Oveisi F, Blázquez C, Piomelli D. Oleil-etanolamida stimulates lipolysis the nuclear receptor peroxisome proliferator-activator receptor alpha (PPAR-Alpha). *J Biol. Chem*. 2004; 279: 27849-27854.
- 67.- Corr PB, Yamada KA. Selected metabolic alterations in the ischemic Heart and their contributions to arrhythmogenesis. *Herz*. 1995; 20: 156-1568.
- 68.- Jump Donald B. y Clarke Steven D. Regulation of gene expression by dietary fat.. *Ann. Rev. Nutr*. 1999; 19: 63 - 90.
- 69.- Chacín Álvarez L F, Padrón Novoa D, Rodríguez Vargas J L y Chapín Coz JS. Décimo octavo Curso de Actualización en Medicina Interna “Dr. Hernan Wauni Ettetdgui “. Y Terceras jornadas Científicas unidad de Diabetes del Hospital Vargas. 2004; 17- 49.
- 70.- Chacín Álvarez LF. Unidos Contra la Diabetes. Publicación de la Unidad de Diabetes del Hospital Vargas. 1999; 13 - 60.
- 71.- Garcia MJ, Mc Namara PH. Morbiditynda mortality in diabetic in the Framingham population. *Diabetes*. 1974; 23: 105 -111.
- 72.- Epidemiología de la Diabetes en Venezuela. Avilán Rovira J M. *Gaceta Méd Caracas*. 2004; 112: 1-5.
- 73.- Gruñid SM, Benjamín IJ, Burke GL, Chait A, Eckel RH, Howard BV, Match W, Smith SC, Swers JR. Diabetes y cardiovascular disease: a statement for health care professionals from the American Heart Association. *Circulation*. 1999; 1134 -1146.

- 74.- Fisher BM, Gillen G Lindop GB, Dargie HJ, Frier BM. Cardiac function and coronary arteriography in asymptomatic type I (insulin-dependent) diabetic patients: evidence for a specific diabetic heart disease. *Diabetology*. 1986; 29: 706 -712.
- 75.- Gotzsche O. Myocardial cell dysfunction in diabetes mellitus . A review of clinical and experimental studies *Diabetes*.1986; 10: 1158 -1162.
- 76.- Ledet T, Neubauer B, Christensen N J, Lundbaek K. Diabetic cardiopathy. *Diabetology* 1979; 16: 207-209.
- 77.- Ganda OP, Rossini AA, Like AA. Studies on Streptozocin diabetes *Diabetes* 1976; 25: 595 - 603.
- 78.- Rodríguez B, McNeill J, The diabetic Heart: metabolic causes for the development of a cardiomyopathy. *Cardiovas Res*.1992; 26: 913 - 922.
- 79.- Porwoll J. Streptozotocin. *Handbook of Fine Chemicals*. Sigma-Aldrich Biotechnology. 2007-2008; 2237.
- 80.- Yamamoto H, Uchigata Y, Okamoto H Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature* 1981; 294: 284 - 286.
- 81.- Lopaschuk GD, Katz S McNeill JH. Can. The effect of alloxan-and streptozotocin-induced on calcium transport in rat cardiac sarcoplasmic reticulum. The possible involvement of long chain acylcarnitines. *J Physiol Pharmacol*. 1983; 61: 439 - 448.
- 82.- Fein FS, Kornstein LB, Strobeck JE, Capaso JM, Sonnenblick EH. Altered myocardial Mechanics in diabetes rats. *Circ Res*. 1980; 47: 922-933.
- 83.- Horackova M y Murphy MG .effects of chronic diabetes mellitus on the electrical and contractil activities, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ transport, fatty acid profiles and ultrstructure of isolated rat ventricular myocytes. *Plügers Arch*. 1988; 411: 564 -572.
- 84.- Seager MJ, Singal PK ,Orchard R, Pierce GN, Dhalla NS. Cardiac cell damage: a primary myocardial disease in streptozotocin-induced chronic diabetes. *Br J Exp Path*.1984; 65: 613 - 623.

- 85.- Bouchard RA, Bose D. Influence of experimental diabetes on sarcoplasmic reticulum function in rat ventricular muscle. *Am J Physiol.* 1991; 260: H341-H354
- 86.- Zhen Y, Tibbits GF, McNeill J. Cellular functions of diabetic cardiomyocytes: contractility rapid-cooling contracture, and ryanodine binding. *Am J Physiol.* 1994; 266: H2082 - H2089.
- 87.- Zhong Y, Ahmed S, Gruppil, Mohammed A m, Alterad SR protein expresión associated with contractile dysfunction in diabetic rat Heart. *Am J Physiol. Heart Circ Physiol.* 2001; 281: H1137 - H1147.
- 88.- Jourdon P, Feuvray D. Calcium and potassium currents in ventricular Myocytes isolated from diabetic rats. *J Physiol.*1993; 470:411 - 429.
- 89.- Guo W, Kada K, Kamaiya K, Toyama J. IGF-I regulates K (+)- channel expresión of cultured neonatal rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1997; 272: H2599 - H2606.
- 90.- Sweeney G Slip A. Regulation of the Na⁺/K⁺-ATPase by insulin: why and How?. *Mol Cell Biol.*1998; 182: 121 -133.
- 91.- Gingolani H, Pérez NG, Camiló MC, ¿De que es culpable el intercambiador Na⁺/H⁺ en cardiología?. *Medicina* 2000; 60: 709 -721.
- 92.- Noda N, Hayashi H, Miyata H, Suzuki S, Kobayashi A, Yamazaki N. Cytosolic Ca²⁺ concentration and pH of diabetic rat myocytes during metabolic inhibition. *J Mol Cell Cardiol.*1992; 24: 435 - 446.
- 93.- Lagadic-Gossmann D, Buckler KJ, Le Prigent K, Feuray D. Altered Ca²⁺ handling in ventricular myocytes isolated from diabetic rats. *Am J Physiol.* 1996; 39: H1529 - H1537.
- 94.- Kuwahara Y, Yanagishita, Cono N, Katagiri T. Changes in microsomal membrane phospholipids and fatty acids and in activities of membrane-bound enzyme in diabetic rat heart. *Basic Res Cardiol.* 1997; 92: 214 - 222.
- 95.- Han W, Abendschein DR, Nelly JG, Gross WR. Diabetes-induced changes in specific molecular species in rat myocardium. *Biochem J.* 2000; 352: 79 - 89.

- 96.- Hidalgo C. Lipid-protein interactions and the function of Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *CRC Crit Rev Biochem*. 1987; 21: 319 - 347.
- 97.- Dang AQ, Kemp K, Faas FH, Carter WJ. Effects of dietary fats on fatty acid composition and Δ^5 desaturase in normal and diabetic rats. *Lipids*. 1989; 24: 882 - 889.
- 98.- Eck MG, Wynn JO, Carter WJ, Faas FH. Fatty acid desaturase in experimental diabetes mellitus. *Diabetes*. 1979; 28: 479 - 485.
- 99.- Bonen A, Luiken JF, Glaz FC. Regulation of fatty acid transport and membrane transporters in health and disease. *Mol cell Biochem*. 2002; 239: 181 -192.
- 100.- Pelsler ML, Lutgrink JT, Van Nieuwerhoven FA, Tandon NN, Van Der Vausse GJ, Arends JW, Hoogenboom HR, Glatz JF. Sensitive immunoassay for rat fatty acid translocase (CD36) using phage antibodies selected on cell transfectants : Abundant presence of fatty acid translocase /CD36 in cardiac and red skeletal muscle and up-regulation in diabetes. *Biochem J*. 1999; 337: 407- 414.
- 101.- Luiken JJ, Arumugam Y, Bell RC, Escandon JC, Tandon N N, Glatz JF, Bonen A. Changes in fatty acid transport and transporters are related to the severity of insulin deficiency. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002; 283:E612 - E621.
- 102.- Wright JR, Lefkowitz JB, Schreiner G, Lacy PE. Essential fatty acid deficiency prevents multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes in CD-1 mice. *Proc Natl Acad Sci*. 1988; 85:6137 - 6141.
- 103.- Wright JR, Fraser RB, Kapoor S, Cook HW. Essential Fatty acid deficiency prevents multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes in native and cyclosporin treated low-responder murine strains. *Acta Diabetol*. 1995; 32: 125 -130.
- 104.- Houseknecht KL, Vander HJ, Moya-camarena SY, Portocarrero CP, Peck LW, Níkel KP, elury MA. Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 244: 678 - 682.
- 105.- Hernández-Yero A, González RJ. Agentes farmacológicos actuales en el tratamiento de la diabetes no insulino dependiente. *Rev Cuban Med Gen integr*. 1997; 13: 596 - 609.

- 106.- Sures Y, Das UN. Protective action of arachidonic acid against alloxan-induced cytotoxicity and diabetes mellitus. *Prostaglandins leukotrienes essential Fatty acids*. 2001; 64: 37 - 52.
- 107.- Saraswathi V, Wu G, Toborek, Hennig B. Linoleic acid induced endothelial activation: role of calcium and peroxynitrite signaling. *J Lipid Res*. 2004; 45: 794 - 804.
- 108.- Tamargo Juan, caballero Ricardo, Gómez Ricardo, Núñez Lucía, Vaquero Miguel y Delpón Eva. Efecto del óxido nítrico sobre la función cardíaca. *Rev Esp Cardiol Supl*. 2006; 6:3A-20A.
- 109.- Moder M, Kiessling A, Loster H, Bruggemann L. The pattern of urinary acylcarnitines determined by electrospray mass spectrometry: a new tool in the diagnosis of diabetes mellitus. *Anal Bioanal Chem*. 2003; 375: 200 - 210
- 110.- Su X, Han X, Mancuso JD, Abendschein DR, Gross RW. Accumulation of long-chain acylcarnitine and 3-hydroxy acylcarnitine molecular species in diabetes myocardium: Identification of alterations in mitochondrial fatty acid processing in diabetic myocardium by shotgun lipidomics. *Biochemistry*. 2005; 44: 5234 - 5245.
- 111.- Alberto Cordero Lorenzo Fácila, Ángeles Alonso y Pilar Mazón. Novedades en hipertensión arterial y diabetes de 2010 *Rev. Esp Cardiol*. 2011; 64(Supl.1) :20-29.
- 112.- Huggett AS, Nixon DA. Use of glucose oxidase, peroxidase, and o-dianisidine in determination of blood and urinary glucose. *Lancet*. 1957; 273: 368-370.
- 113.- Eisner DA, Nichols CG, O'Neill SC, Smith GL, Valdeomillos M, The effects of metabolic inhibition on intracellular calcium and pH in isolated rat ventricular cell. *J Physiol*. 1989; 411: 393-418.
- 114.- Folch J, Lees M, Sloane GH. A simple method for isolation and purification of total lipid from tissues. *J Biol Chem*. 1956; 226: 497 - 509.
- 115.- Muller H, Deckers K, Eckel J. The fatty acid translocase (Fat)/CD36 and the glucose transporter GLUT4 are localized in different cellular compartments in rat cardiac muscle. *Biochemical Biophys Res Commun*. 2002; 239: 665 - 669.

- 116.- Roy R, Calvo JH, Hayes H, Rodellar C, Eggen A. Fine mapping of the bovine heart fatty acid-binding protein gene (FABP3) to BTA2q45 by fluorescence in situ hybridization and radiation hybrid mapping. *Anim Genet.* 2003; 34: 466 -467.
- 117.- Shinomura T, Asaoka Y, Oka M, Yoshida K, Nishizuka Y. synergistic action of diacylglycerol and unsaturated fatty acid for protein kinase C activation : its possible implications *Proc Natl Acade Sci USA* 1991; 88: 5149 - 5153.
- 118.- Zhouy T, Grayburn P, Karim A, Shimabuk M, Higa M, Bartens D, Orci L, Unger R. Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proce Natl Acad Sci USA.* 2000; 15: 1784-1789.
- 119.- Edmy Rosa, Ester María Danielli Nicola y col. Harder gland of wistar rats revised as protoporphyrin IX producer. *Braz J morphol Sci.*2005; 22:43-51
- 120.- Kuwahara Y, Yanagishita, Cono N, Katagiri T. Changes in microsomal membrane phospholipids and fatty acids and in activities of membrane-bound enzyme in diabetic rat. *Bsic Res Cardiol.* 1997; 92: 214-222
- 121.- Alfonso- Pérez, Lamanna V, Ortiz HN. Cinética de la potenciación post-reposo en tiras de ventrículo derecho aislados de rata después de varias maniobras inotrópicas. *Ach Ven Farm Terap.* 2006; 25: 1-4.
- 122.- Wang GX, Scmred R, Ebner F, Koth M. intracelular sodium activity and its regulation in guinea-pig atrial myocardium. *J physiol. (Lond).*1993;465:73-84
- 123.- Honen BN, Saint DA, Laver DR. Suppression of calcium sparks in rat ventricular myocytes and direct inhibition of sheep cardiac RyR channels by EPA, DHA and oleic acid. *J Membr Biol.* 2003; 196: 95-103.