



Benemérita Universidad Autónoma De Puebla

Facultad de Medicina
Licenciatura en Biomedicina



Instituto de Fisiología
Laboratorio de Fisiopatología Cardiovascular

EFFECTO DE LA DIABETES MELLITUS SOBRE LA EXCITABILIDAD
Y LA VELOCIDAD DE CONDUCCIÓN EN CORAZÓN DE RATÓN

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADO EN BIOMEDICINA

Presenta:
ROMMEL SÁNCHEZ HERNÁNDEZ

Director de tesis y asesor metodológico:

DR. JULIÁN TORRES JÁCOME

Noviembre, 2018

Este trabajo fue realizado con el financiamiento parcial de CONACyT a través de fronteras FC-2016-1/227, DGAPA-PAPIIT IV100116, proyecto 100059822-VIEP2018 y proyecto 100500599-VIEP2018

Agradezco

Al Laboratorio de Fisiopatología Cardiovascular

Al Instituto de Fisiología de la BUAP

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la BUAP

Al Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM

Al Dr. Julián Torres Jácome y a la Dra. Alondra Albarado Ibañez por aceptarme en su grupo de trabajo, por mostrarme el camino de la ciencia, por compartir su conocimiento conmigo, por enseñarme a no tener límites y por hacer de mí un mejor estudiante

A la Dra. Rosa Elena Arroyo Carmona por sus consejos y apoyo

A Marissa Limón Cantú y Daniela Bernabé Sánchez por ser incondicionales, porque no me dejaron rendirme y por hacer esas madrugadas de experimento menos largas

A Geovanni Ramos Ortiz, Benjamín López Silva, Sabino Ortiz Fuentes, Mauricio Martagón Domínguez y José Alonso Romero por hacer más amenos los días en el laboratorio

A mis padres Tomás Sánchez Sánchez y Estefanía Hernández Cortez, a mi hermano Eric Sánchez Hernández, a mi sobrina Regina Sánchez Ramírez y a Isabel Ramírez Nava por brindarme todo su amor, apoyo y confianza

“Hay que tener la mente abierta...

*Pero no tanto como para que se te caiga el cerebro al
suelo”*

-Richard Feynman

Índice

1.	Resumen.....	10
2.	Introducción.....	12
2.1	<i>El corazón.....</i>	<i>12</i>
2.2	<i>Función del corazón como bomba.....</i>	<i>12</i>
2.3	<i>Origen y propagación del impulso eléctrico.....</i>	<i>12</i>
2.3.1	<i>Sitios marcapaso en el corazón.....</i>	<i>14</i>
2.4	<i>Propiedades eléctricas de la membrana.....</i>	<i>16</i>
2.4.1	<i>Propiedades pasivas de la membrana.....</i>	<i>17</i>
2.4.2	<i>Propiedades activas de la membrana.....</i>	<i>21</i>
2.5	<i>Excitabilidad.....</i>	<i>25</i>
2.5.1	<i>Potencial de acción marcapaso de nodo senoauricular de ratón.....</i>	<i>26</i>
2.5.2	<i>Potencial de acción marcapaso de nodo auriculoventricular de ratón.....</i>	<i>28</i>
2.6	<i>Diabetes mellitus.....</i>	<i>29</i>
2.6.1	<i>Diabetes experimental.....</i>	<i>31</i>
3.	Antecedentes.....	32
3.1	<i>Alteraciones en corazón por la diabetes mellitus.....</i>	<i>32</i>
4.	Justificación.....	35
5.	Planteamiento del problema.....	35
6.	Hipótesis Científica.....	36
7.	Objetivos.....	36
7.1	<i>Objetivo General.....</i>	<i>36</i>
7.2	<i>Objetivos Particulares.....</i>	<i>36</i>
8.	Material y métodos.....	37
8.1	<i>Inducción de diabetes experimental (modelo animal).....</i>	<i>37</i>
8.2	<i>Registro de electrocardiograma (ECG).....</i>	<i>37</i>

8.3	<i>Preparación multicelular de nodo senoauricular y nodo auriculoventricular para registro electrofisiológico.....</i>	38
8.4	<i>Clasificación y caracterización de la actividad eléctrica del nodo senoauricular</i>	39
8.5	<i>Excitabilidad del nodo senoauricular.....</i>	40
8.6	<i>Velocidad de conducción entre el nodo senoauricular y el nodo auriculoventricular</i>	42
8.7	<i>Análisis estadístico.....</i>	43
9.	Resultados	44
9.1	<i>Diabetes mellitus experimental</i>	44
9.2	<i>Análisis del electrocardiograma</i>	45
9.3	<i>Clasificación y caracterización de la actividad eléctrica de nodo senoauricular en condición control.....</i>	46
9.4	<i>Efecto de la diabetes mellitus en la actividad eléctrica del nodo senoauricular.....</i>	49
9.5	<i>Efecto de la diabetes mellitus en la excitabilidad de las células de nodo senoauricular</i>	52
9.6	<i>Efecto de la diabetes mellitus en la velocidad de conducción</i>	56
10.	Discusión.....	58
11.	Conclusiones	63
12.	Bibliografía.....	64

Índice de figuras

Figura 1. Actividad eléctrica del corazón.....	14
Figura 2. Modelo del circuito eléctrico de una célula.....	17
Figura 3. Gráfica del cambio de voltaje en función del sitio de inyección de la corriente y en función del tiempo.....	20
Figura 4. Preparación multicelular del NSA de ratón.....	26
Figura 5. Potenciales de acción de nodo auriculoventricular de ratón	28
Figura 6. Efecto de la estreptozotocina en la concentración de glucosa en sangre y el peso corporal.....	44
Figura 7. Registro de ECG de ratón	45
Figura 8. Poblaciones de potenciales de acción de nodo senoauricular en condición control	46
Figura 9. Ubicación espacial de los 3 tipos de potenciales de acción en condición control	48
Figura 10. Efecto de la diabetes mellitus sobre los potenciales de acción tipo 1 ..	49
Figura 11. Efecto de la diabetes mellitus sobre los potenciales de acción tipo 2 y 3	50
Figura 12. Ubicación espacial de los 3 tipos de potenciales de acción en condición de diabetes mellitus.....	50
Figura 13. Gráfica de excitabilidad de los tres tipos de potenciales de acción en condición control vs diabetes mellitus	54
Figura 14. Gráfica de excitabilidad en condición control y diabetes mellitus.....	55
Figura 15. Disminución de la velocidad de conducción en condición de diabetes mellitus	57

Índice de tablas

Tabla 1. Características electrofisiológicas del potencial de acción marcapasos del nodo senoauricular de ratón.....	27
Tabla 2. Características electrofisiológicas del potencial de acción marcapasos del nodo auriculoventricular de ratón	28
Tabla 3. Criterios para el diagnóstico de diabetes mellitus	30
Tabla 4. Caracterización y clasificación de las poblaciones de potenciales de acción en condición control.	47
Tabla 5. Efecto de la diabetes mellitus en las tres poblaciones de potenciales de acción.....	51
Tabla 6. Efecto de la diabetes mellitus sobre la resistencia de entrada, la corriente umbral y el voltaje umbral en células de nodo senoauricular.	53
Tabla 7. Disminución de la velocidad de conducción en ratones diabéticos.	56

Abreviaturas

AD	Aurícula derecha
ATP	Adenosin trifosfato
C	Capacitancia
CaCl ₂	Cloruro de calcio
C _m	Capacitancia de la membrana
CO ₂	Dióxido de carbono
CT	Crista terminalis
Cx	Conexinas
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DR	Duración de la repolarización
ECG	Electrocardiograma
EEM	Error estándar de la media
ERT	Prueba de resistencia del electrodo (Electrode resistance test)
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
I _c	Corriente capacitiva
I _f	Corriente marcapaso
I _i	Corriente iónica
I _m	Corriente de membrana
I _{Na}	Corriente de sodio
I _{to, fast}	Corriente transitoria de salida de potasio rápida
I _{to, slow}	Corriente transitoria de salida de potasio lenta
KCl	Cloruro de potasio
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
NaCl	Cloruro de sodio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de sodio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
NAV	Nodo auriculoventricular
NSA	Nodo senoauricular
O ₂	Oxígeno
q	Carga
R _m	Resistencia de la membrana
R _o	Resistencia externa
SIA	Septum Interauricular
STZ	Estreptozotocina
V	Voltaje
VCI	Vena cava inferior
VCS	Vena cava superior
V _m	Voltaje de la membrana

1. Resumen

La diabetes mellitus produce alteraciones en el sistema de conducción cardiaco, lo que a su vez conlleva a arritmias supraventriculares; sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual las alteraciones en el sistema de conducción producen dichas arritmias en etapas crónicas de esta patología, es decir, después de 10 años de evolución de la enfermedad. Por esta razón, se requiere estudiar el nodo senoauricular o marcapasos principal y la velocidad de propagación en una etapa crónica. Para este trabajo se utilizaron ratones machos de la cepa CD-1 administrados con una dosis de 120 mg/kg de estreptozotocina vía intraperitoneal para inducir *diabetes mellitus* y se dejó evolucionar la patología por 20 semanas sin dar un tratamiento con insulina. El tiempo que evolucionó la diabetes mellitus en el ratón es equiparable a que un humano haya padecido la enfermedad por aproximadamente 15 años, por lo que es un modelo adecuado para estudiar la enfermedad en etapa crónica. Se realizó el registro de electrocardiograma, se determinó la excitabilidad de células de nodo senoauricular y se midió la velocidad de conducción desde el nodo senoauricular hasta el nodo auriculoventricular. En el registro de electrocardiogramas de ratones diabéticos se encontró bloqueo auriculoventricular tipo 1. En el nodo senoauricular de ratones controles y diabéticos se encontraron tres poblaciones de potenciales de acción sin cambios diferentes estadísticamente en su morfología, con excepción de la velocidad máxima de despolarización del potencial de acción tipo 1, la cual fue mayor en diabéticos. La resistencia de entrada de las células de nodo senoauricular de ratones diabéticos no fue diferente estadísticamente con respecto a los controles, pero si se observó una tendencia a tener una mayor resistencia de entrada. Al realizar la gráfica de excitabilidad se encontró un desplazamiento a la derecha de la población de potenciales de acción tipo 1 y 3, lo que implica que a un mismo valor de resistencia de entrada se necesita mayor corriente para despolarizar a las células obtenidas de ratones con diabetes mellitus tipo 1. La velocidad de conducción medida desde el nodo senoauricular hasta el nodo auriculoventricular disminuyó un 33%, lo que explicaría el aumento del intervalo PR encontrado en el electrocardiograma de ratones diabéticos y, lo que, a su vez, incrementa el riesgo de padecer fibrilación

auricular. Este trabajo permitió encontrar un mecanismo por el cual las alteraciones en el sistema de conducción que produce la diabetes mellitus en etapa crónica pueden conllevar a arritmias supraventriculares.

2. Introducción

2.1 El corazón

El corazón es el órgano del sistema cardiovascular que se encarga de bombear la sangre a través de los vasos sanguíneos transportando nutrientes, hormonas, productos del metabolismo, oxígeno, dióxido de carbono y provocando que la temperatura corporal sea homogénea (Boron & Boulpaep, 2012).

2.2 Función del corazón como bomba

La función del corazón es eyectar la sangre hacia el organismo. Funcionalmente, el corazón se puede dividir en dos, un lado derecho y un lado izquierdo, cada uno conformado por una aurícula y un ventrículo. El lado derecho del corazón se encarga de recibir la sangre desoxigenada, la cual llega a la aurícula derecha por las venas cavas superior e inferior, pasa a través de la válvula tricúspide hacia el ventrículo derecho en donde es expulsada por la arteria pulmonar hacia los pulmones para su oxigenación. El lado izquierdo del corazón recibe la sangre oxigenada a través de las venas pulmonares, llega a la aurícula izquierda, pasa a través de la válvula mitral hacia el ventrículo izquierdo en donde es expulsada por la aorta hacia todo el organismo. Durante un latido del corazón primero se contraen las aurículas y después los ventrículos desde el ápex hacia la base (Hurst et al., 2011).

2.3 Origen y propagación del impulso eléctrico

El latido del corazón es provocado por el inicio de actividad eléctrica y su propagación por todo el tejido. Las células forman un sincitio en el cual cada célula se comunica físicamente con sus vecinas por uniones intercelulares, lo que permite la conducción de la actividad eléctrica desde cualquier punto del sincitio hasta otro.

La actividad eléctrica del corazón puede monitorearse mediante el electrocardiograma (ECG) (figura 1), el cual es un registro de la suma espacial y

temporal de toda la actividad eléctrica del corazón que se mide como cambios de voltaje (Nerbonne & Kass, 2005; Yan & Antzelevitch, 1998). Dicha actividad tiene su origen en el nodo senoauricular (NSA), también conocido como marcapasos natural del corazón, se propaga a la pared auricular derecha y a la aurícula izquierda a través de tres haces internodales, el anterior o haz de Backman que rodea la parte superior de la aurícula derecha e izquierda, el haz medio o haz de Wenckebach que se difunde por la parte de atrás de la vena cava superior y, el haz posterior o haz de Thorel que se dirige hacia la *crista terminalis* y que conectan con el nodo auriculoventricular (NAV). El NAV tiene tres diferentes propiedades funcionales: 1) causa un retraso en la conducción eléctrica permitiendo la contracción auricular complete el llenado ventricular antes de que los ventrículos se contraigan, 2) bloquea impulsos prematuros que van desde aurículas hasta ventrículos y 3) funciona como marcapasos secundario en caso de que el NSA falle. Después se propaga por el haz de His el cual se expande por el septum interventricular dividiéndose en ramas izquierda y derecha y, por último, termina de propagarse en la red de fibras de Purkinje (Hurst et al., 2011).

Para su estudio el registro del electrocardiograma se divide en ondas, segmentos e intervalos. La onda P representa la despolarización auricular, el complejo QRS la despolarización ventricular y la onda T la heterogeneidad de la repolarización ventricular (Antzelevitch et al., 1998) (ver figura 1). El intervalo PR se mide desde el inicio de la onda P hasta el inicio de la onda Q, es una medida del tiempo transcurrido desde el comienzo de la despolarización auricular hasta el comienzo de la despolarización ventricular. El intervalo QT se mide desde el inicio de la onda Q hasta el final de la onda T e indica el tiempo que tarda la despolarización y repolarización ventricular. El segmento PR se ubica en el término de la onda P y el inicio de la onda Q, indica la conducción desde el NSA hacia el NAV. El segmento ST se encuentra al final de la onda S y el inicio de la onda T y representa el final de la despolarización ventricular y el inicio de la repolarización ventricular.

Este patrón de activación eléctrica causa una secuencia coordinada de contracción y relajación del corazón que permite la propulsión mecánica adecuada de la sangre por todo el cuerpo (Kusumoto & Bernath, 2012).

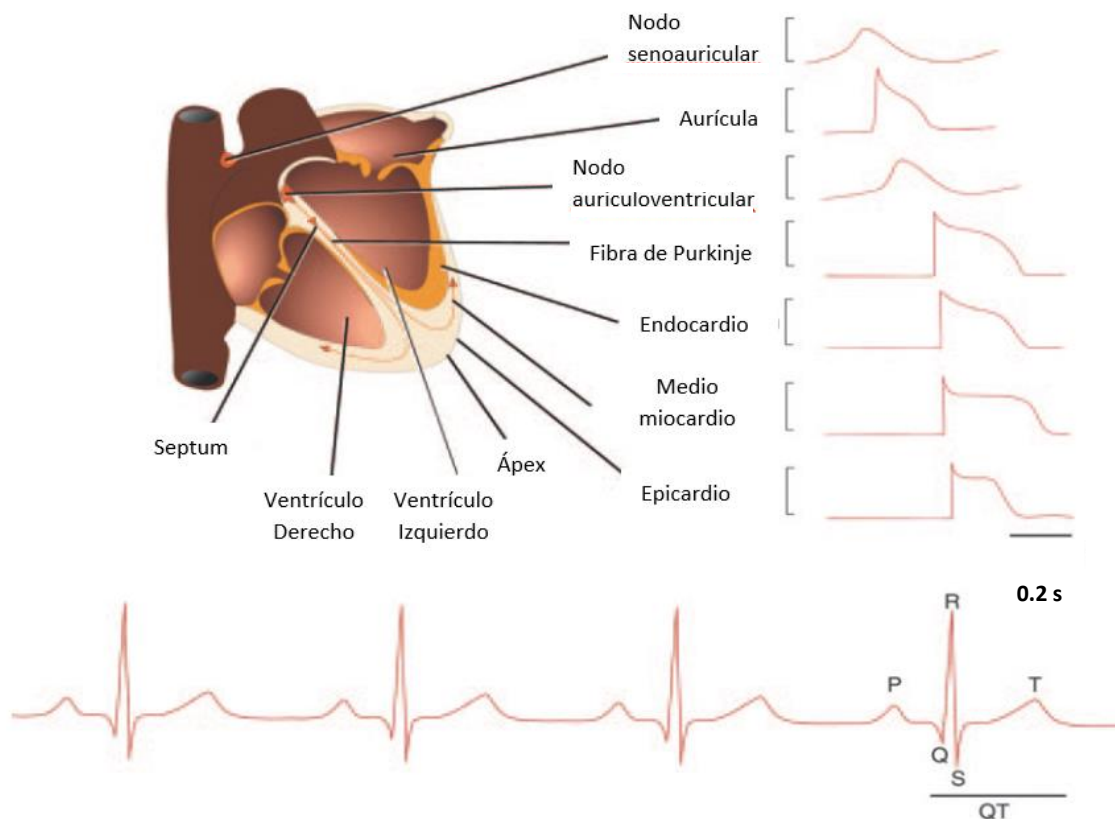


Figura 1. Actividad eléctrica del corazón. A) Potenciales de acción característicos de cada zona del corazón y registro de electrocardiograma (ECG) de humano. Cada región del corazón tiene un potencial de acción distinto, por lo que la suma espacial y temporal de la actividad eléctrica de todo el corazón produce el registro del ECG. Modificada de (Nerbonne & Kass, 2005).

2.3.1 Sitios marcapaso en el corazón

En el corazón existen tres tipos de tejido que pueden iniciar su actividad eléctrica sin la necesidad de un estímulo externo. Estos son, el nodo senoauricular, el nodo auriculoventricular y las fibras de Purkinje. Lo que determina el sitio de origen del impulso es el marcapaso cuya actividad sea la de mayor frecuencia.

Normalmente el nodo senoauricular produce impulsos más frecuentemente (60-150 ciclos por minuto en el ser humano) que el nodo auriculoventricular (40-60/min) o las fibras de Purkinje (<40/minuto), por eso el nodo senoauricular es el que comanda. Sin embargo, en caso de que alguno deje de funcionar, el siguiente con mayor frecuencia tomará su lugar.

2.3.1.1 *Nodo senoauricular*

En el corazón de los mamíferos, el NSA es el marcapasos principal. Se encuentra ubicado en la aurícula derecha, en la desembocadura de la vena cava superior e inferior y está delimitado por la *crista terminalis* y el septum interauricular (Hurst et al., 2011). En el nodo senoauricular se inicia el impulso eléctrico que se propagará por todo el corazón.

2.3.1.2 *Nodo auriculoventricular*

En condiciones normales, el nodo auriculoventricular es la única vía de conducción entre los ventrículos y las aurículas. El NAV se encuentra en el triángulo de Köch, que está delimitado por el seno coronario, septum auriculoventricular y el tendón de Todaro (Hurst, et al., 2011).

Se divide en 3 secciones, el nodo compacto que se encuentra sobre el septum, una extensión en la parte superior que se dirige hacia la aurícula llamada región AN (aurícula-nodo) y otra extensión en la parte inferior que se dirige hacia el haz de His llamada región NH (nodo-haz de his). Esta subdivisión se realizó tomando en cuenta la configuración de los potenciales de acción intracelulares registrados en cada región del NAV y el curso temporal observado durante la propagación auriculoventricular normal. Sin embargo, esta subdivisión no es estricta, puesto que el paso de una región a otra es gradual y existe una superposición de las células de una región a otra (Carvalho & Almeida, 1960).

2.4 Propiedades eléctricas de la membrana

Si se inserta un microelectrodo dentro de una célula, se encontrará una diferencia de potencial con respecto al líquido extracelular determinada por la distinta concentración de iones en líquido intracelular y extracelular, asumiendo que la membrana es semipermeable a los iones (potasio, sodio, calcio y cloro) (Stein, 1980). A esta diferencia de potencial se le conoce como potencial de membrana en reposo y puede cambiar si se generan corrientes eléctricas a través de la célula. Las corrientes eléctricas pueden producirse debido a que existen proteínas en la membrana denominadas canales iónicos que permiten el flujo selectivo de iones dependiendo del gradiente químico y eléctrico, es decir, el flujo de un ion depende de la ley de Fick y la Ley de Ohm, como se muestra en la ecuación 1 (Hodgkin & Huxley, 1952; Stein, 1980).

$$1) J_s = -D_s \frac{d[s]}{dx} - \frac{ZF}{RT} D_s [S] \frac{dV}{dx}$$

Donde J_s es el flujo del ion s , $[s]$ es la concentración del ion s , Z es la valencia del ion, F es la constante de Faraday, R es la constante universal de los gases, T es la temperatura, D_s es la constante de difusión del ion y V es el voltaje.

Si un estímulo eléctrico cambia el potencial de membrana en reposo, pero no produce corrientes iónicas, la respuesta está determinada por las propiedades pasivas de la membrana; sin embargo, si el estímulo eléctrico produce apertura de canales y por ende corrientes iónicas producirá un cambio de voltaje en el tiempo con una amplitud constante denominado potencial de acción (Aidley, 1989). Las propiedades eléctricas de la célula pueden ser representadas en un modelo de circuito eléctrico que contiene resistores y capacitores en paralelo. Además, puede ser dividida en unidades de membrana que consten de un solo resistor y un capacitor. Entonces, la membrana puede representarse como la unión de estas unidades, como se muestra en la figura 2 (Aidley, 1989; H. A. Fozzard, 1977; Harry A. Fozzard, 1991; Hernandez-Garcia, 1981).

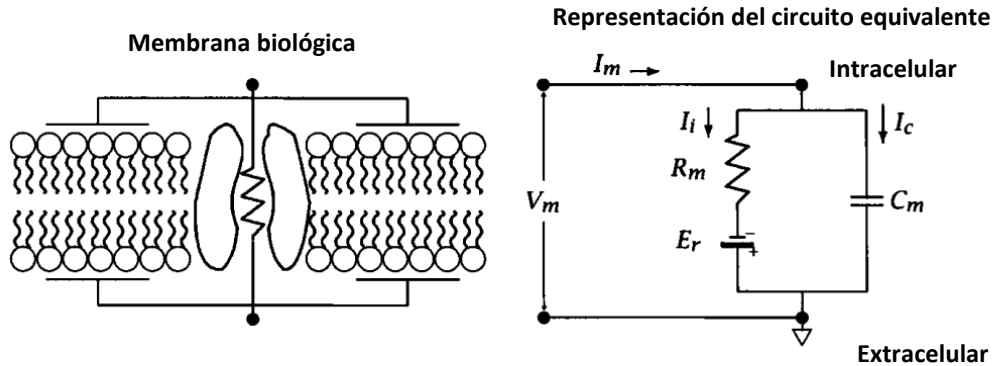


Figura 2. Modelo del circuito eléctrico de una célula. Circuito equivalente de la membrana que describe el comportamiento eléctrico al inyectar una corriente. Corriente de membrana (I_m), Corriente iónica (I_i), Voltaje de membrana (V_m), Resistencia de la membrana (R_m), Capacitancia de la membrana (C_m), Potencial de reposo de la célula (E_r). Modificada de (Johnston & Wu, 1995).

2.4.1 Propiedades pasivas de la membrana

Cuando una corriente es introducida a una célula, el cambio de voltaje va a ser proporcional a la corriente inyectada debido a sus propiedades pasivas de la membrana, a menos que la corriente sea suficiente para que la célula llegue al voltaje umbral y se genere un potencial de acción. La corriente que fluye a través de cualquier unidad de membrana consiste en dos componentes, 1) la corriente capacitiva (i_c) que pasa a través del capacitor y 2) la corriente iónica (i_i) que pasa a través del resistor. Por lo tanto, la corriente total que pasa por la membrana puede escribirse como:

$$2) i_m = i_i + i_c$$

De la definición de corriente tenemos que $i = \frac{dq}{dt}$. Por otro lado, i_c está determinada por la capacitancia de la unidad de membrana. De la definición de capacitancia, $C = \frac{q}{V}$, despejamos carga (q) para encontrar la corriente y de las leyes de la derivada se obtiene que:

$$3) i = C \frac{dV}{dt} + V \frac{dC}{dt}$$

Como demostraron Cole y Curtis (Cole & Curtis, 1939), la capacitancia en una célula es constante cuando se genera un potencial de acción, por lo que $V \frac{dC}{dt}$ se vuelve 0 y entonces la corriente se expresa como:

$$4) i_c = c_m \left(\frac{\partial V}{\partial t} \right)$$

De acuerdo con la ley de ohm, la corriente iónica va a estar directamente relacionada con el voltaje transmembranal, V_m , e inversamente relacionada con la resistencia de membrana r_m , expresada en Ωcm .

$$5) i_i = \frac{V_m}{r_m}$$

Entonces, para calcular la corriente total que se inyecta a una célula, se combina la ecuación 4 y 5, obteniendo:

$$6) i_m = c_m \left(\frac{\partial V}{\partial t} \right) + \frac{V_m}{r_m}$$

Por otra parte, se puede utilizar la ecuación del cable para estudiar la forma en la que se propaga una corriente en una célula. Esta ecuación provee una relación entre V_m , x y t , variables que se pueden encontrar experimentalmente.

$$7) \lambda^2 \frac{\partial^2 V_m}{\partial x^2} + \tau_m \left(\frac{\partial V_m}{\partial t} + V_m \right) = 0$$

Cuando una corriente es aplicada intracelularmente, el voltaje cambia de forma exponencial y está caracterizado por una constante, que es el tiempo en el que V_m llegue al 63% de su valor final, se le conoce como constante de tiempo y está determinada por:

$$8) \tau_m = r_m c_m$$

Al inyectar una corriente constante dentro de la célula, el voltaje V_x , definido como V_0 (donde V_0 es el voltaje en el punto de estimulación) a cualquier punto x , la relación es aproximadamente:

$$9) V_x = V_0 e^{-x/\lambda_m}$$

Por tanto, el cambio de voltaje va a cambiar a través del tiempo y del espacio.

El curso espacial y temporal del voltaje de membrana está representado por la figura 3. Dicho cambio de voltaje sigue un curso de tiempo exponencial, llega a un estado estable y desciende de forma exponencial. A este cambio de voltaje se le llama electrotono. La corriente inyectada en las células se propagará a través de estructuras que permiten la comunicación intercelular y median el transporte de iones entre las células cardíacas, estas estructuras son las uniones comunicantes, que ofrecen una resistencia al paso de corriente.

La resistencia longitudinal o interna está determinada por las uniones comunicantes y el citoplasma. Entonces, mientras la corriente inyectada no genere un potencial de acción, la membrana se comportará como un circuito RC (figura 2), por lo que, si graficamos el valor del voltaje en el estado estable en función del valor de la corriente aplicada, la gráfica es una recta y la pendiente de la recta de la gráfica voltaje-corriente es una medida de la resistencia de entrada de la célula (Blaustein et al., 2012; Mendez & Hernandez, 2001). De tal manera que, encontrar la resistencia de entrada de las células aporta información acerca de la conexión entre células cardíacas.

Si se conoce la resistencia de entrada y la corriente umbral de las células se puede construir una gráfica de excitabilidad que representaría lo mencionado anteriormente. Se han relacionado valores altos de resistencia de entrada a una menor conexión entre células, a valores bajos de resistencia de entrada la conexión entre células es mayor (Martinez-Ladron de Guevara et al., 2016).

Las propiedades pasivas varían en función del sitio que se explore de algún tejido. Se ha reportado que células de músculos papilares de rata se requieren diferentes valores de corriente umbral en distintos sitios del músculo para despolarizar a las células, lo que representaría una heterogeneidad en la

distribución espacial de las conexinas que participan en el potencial de acción. No obstante, en condiciones patológicas como la diabetes mellitus, la heterogeneidad en la conexión del corazón cambia con respecto al control, lo que puede incrementar la probabilidad de desarrollar arritmias (Martinez-Ladron de Guevara et al., 2016).

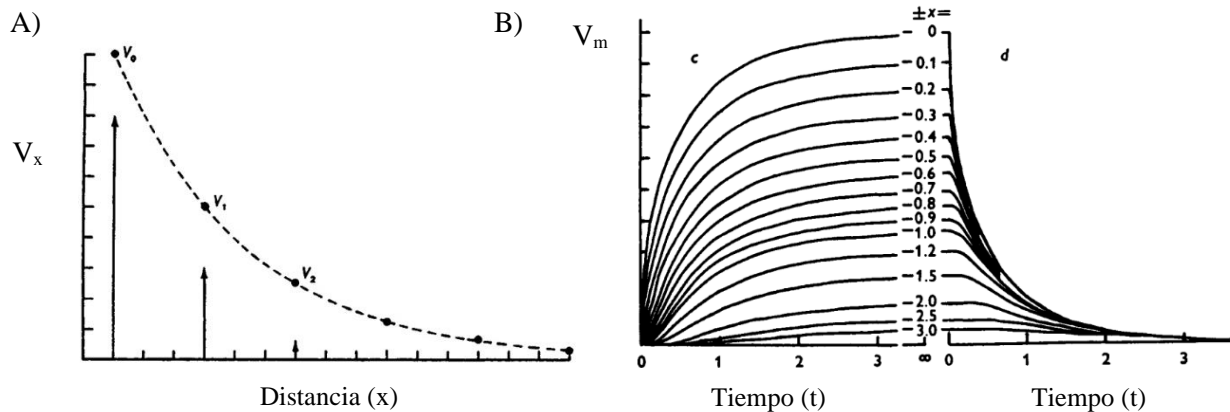


Figura 3. Gráfica del cambio de voltaje en función del sitio de inyección de la corriente y en función del tiempo. El cambio de voltaje de acuerdo con la distancia y el tiempo es exponencial. X está expresada en unidades iguales a la constante de espacio y t está expresada en unidades iguales a la constante de tiempo. Modificada de (Hodgkin & Rushton, 1946).

Otra forma de interpretar la propagación de corriente es que, la corriente que viaja de un área de baja resistencia hacia un área de alta resistencia se conducirá fácilmente debido a que la corriente fue suficiente para despolarizar a la siguiente célula. Sin embargo, si el frente despolarizante viene de un área de alta resistencia hacia un área de baja resistencia, se hace difícil la propagación porque la corriente no es suficiente para llegar al voltaje umbral y despolarizar a las siguientes células, lo que facilitaría la generación de arritmias. De tal forma que valores altos de resistencia de entrada implicaría la existencia de tejido con menos densidad de conexinas, pero la cantidad de corriente umbral que se necesita para despolarizar a las células con valores altos de resistencia es menor, mientras que para las células de menor resistencia de entrada conectadas con las mencionadas anteriormente (mayor resistencia de entrada) la velocidad de propagación del potencial de acción será menor.

En las células marcapaso verdaderas se originan los potenciales de acción, por lo que diferencia de voltaje resultante de las células despolarizadas y las que se encuentran en reposo produce corrientes iónicas que pasan a través de las uniones comunicantes y despolarizan el tejido en reposo provocando la despolarización de las células adyacentes. Se ha reportado que la densidad de las uniones comunicantes es distinta en todo el nodo senoauricular. Por ejemplo, en el nodo senoauricular de ratón las células con potenciales de acción verdaderos se encuentran delimitadas en un área de 0.01-0.02 mm² y expresan únicamente conexina (Cx) 45, en la zona periférica del nodo SA se expresan las Cx 45 y 43, mientras que en la aurícula se encuentra expresada la Cx 40 y 43 (Boyett et al., 2003; Verheijck et al., 2001).

Además, el acoplamiento entre células es pobre en el nodo central, como reportó Saffitz (1997) demostrando que una célula de nodo senoauricular de perro está conectada con un promedio de 4 a 5 células a su alrededor, a diferencia del músculo ventricular que están conectadas a un promedio de 11 células, lo que explicaría porque la velocidad de conducción del potencial de acción es distinta dependiendo de la zona del corazón, es bajo en la zona central de nodo senoauricular pero alta los ventrículos (Boyett et al., 2003; Saffitz et al., 1997).

2.4.2 Propiedades activas de la membrana

Si la corriente que se inyecta a la célula produce un cambio de voltaje con la suficiente intensidad para producir un flujo de iones a través de los canales iónicos, se generará un potencial de acción, el cual funciona como una señal que se propagará a la siguiente célula como mecanismo de transmisión de información. Recordando que en el corazón los potenciales de acción se originan en el nodo senoauricular y se propagan hacia el nodo auriculoventricular provocando la contracción de las células, podemos utilizar la teoría del cable para estudiar la conducción, considerando las siguientes suposiciones:

- Las células están ordenadas en columna con una baja resistencia del citoplasma, una membrana con una resistencia alta y conexiones de baja resistencia donde las células se encuentran en sus extremos y a los lados.
- La columna es cilíndrica y sin complicaciones por invaginaciones de la membrana o consideraciones en tres dimensiones.
- La resistencia longitudinal y la resistencia de la membrana son óhmicas para pequeños cambios en V_m , además, el flujo de corriente longitudinal es uniforme y las corrientes radiales son despreciables.
- El capacitor de la membrana es perfecto y uniforme.
- El volumen de la solución extracelular es tan grande que la resistencia externa es despreciable.

Con estas premisas, se puede considerar un comportamiento óhmico de la membrana. Por lo tanto, la ecuación del cable asumiendo que la resistencia externa (r_o) es pequeña, es:

$$10) i_m = \frac{1}{r_i} \frac{\partial^2 V_m}{\partial x^2} = \frac{V_m}{r_m} + c_m \frac{\partial V_m}{\partial t}$$

Donde i_m es el flujo de corriente a través de la membrana de una unidad de longitud del cable, r_i es la resistencia longitudinal interna, V_m es el voltaje transmembranal, r_m es la resistencia de la membrana y c_m es la capacitancia de la membrana (Cole & Curtis, 1939).

Las propiedades de conducción de los tejidos cardiacos funcionalmente dependen de las corrientes iónicas, de las propiedades pasivas que determinan la distribución espacial de las resistencias citoplásmicas y resistencias al flujo de corriente (uniones comunicantes), el tamaño, la forma de los miocitos y factores que determinan la unión entre células, incluyendo el tamaño, número y la distribución tridimensional de las uniones comunicantes (Boyett et al., 2003).

En cada región del corazón, la morfología del potencial de acción es distinta, y también es un factor que determina la velocidad de propagación. Entre mayor

amplitud del potencial de acción y mayor velocidad máxima de despolarización ($\frac{dV}{dt}$), mayor será la velocidad de conducción, ya que entre mayor sea la máxima velocidad de despolarización, las células se activarán con mayor rapidez provocando un aumento en la velocidad de propagación (Weidmann, 1955). Esto es, la amplitud del potencial de acción es igual a la diferencia de potencial entre la célula totalmente despolarizada y la que no está despolarizada. La magnitud de la corriente es proporcional a esta diferencia de potencial. Entonces, entre mayor diferencia de potencial entre la célula despolarizada y la que está en reposo (mayor magnitud del PA), más eficaz será el estímulo local que despolarizará la célula y más rápidamente se propagará la onda de despolarización a través del tejido. La distancia que recorre un potencial de acción entre el tiempo que tarda en recorrerla se le llama velocidad de conducción o de propagación. La velocidad de conducción depende del tipo de células, de las propiedades pasivas y de la velocidad máxima de despolarización (Harry A. Fozzard, 1991).

Por otro lado, la velocidad máxima de despolarización es una medida indirecta de la corriente iónica que se produce en la fase 0 del potencial de acción.

Usando la regla de la cadena se puede demostrar que

$$11) \frac{dV}{dt} = \frac{dV}{dx} \frac{dx}{dt} = \frac{dV}{dx} \theta$$

$$12) \frac{\partial^2 V}{\partial t^2} = \theta \frac{\partial^2 V}{\partial t \partial x} = \theta^2 \frac{\partial^2 V}{\partial x^2}$$

$$13) \frac{\partial^2 V_m}{\partial x^2} = \frac{1}{\theta^2} \left(\frac{\partial^2 V_m}{\partial t^2} \right)$$

Si combinamos la ecuación del cable (ecuación 7) con la ecuación 13, tenemos:

$$14) \frac{1}{r_i \theta^2} \frac{d^2 V_m}{dt^2} = c_m \frac{dV_m}{dt} + \frac{V_m}{r_m}$$

Ya que $\frac{V_m}{r_m}$ es la corriente iónica, la ecuación 14 llega a ser:

$$15) \frac{1}{r_i \theta^2} \frac{d^2 V_m}{dt^2} = c_m \frac{dV_m}{dt} + i_{iónica}$$

Si consideramos que V_{max} es la velocidad máxima de ascenso de la fase 0, esto es la máxima $\frac{dV_m}{dt}$, entonces, la segunda derivada, que es $\frac{d^2 V_m}{dt^2}$, en ese instante se hace 0 y la ecuación se convierte en

$$16) V_{max} = \frac{i_{iónica}}{c_m}$$

Es decir, la máxima derivada del potencial de acción nos da una medida de la corriente iónica en esa fase.

Con respecto al nodo senoauricular, la conexión entre células (acoplamiento eléctrico) es menor en comparación con el músculo auricular y en la zona periférica del nodo (Boyett et al., 2003). Esto explicaría porque la velocidad de conducción del potencial de acción es bajo en la zona central pero alta en la periferia y en la aurícula (Boyett et al., 2003). Además, en el centro del nodo SA, las células son pequeñas, están entrelazadas, y están orientadas en dirección perpendicular a la *crista terminalis* (Saffitz et al., 1997). En contraste, en la periferia del nodo senoauricular y en el músculo auricular, las células están orientadas en dirección paralela a la *crista terminalis*. Lo anterior en conjunto con la expresión de conexinas, podría ayudar a explicar el patrón de conducción del potencial de acción. La conducción del nodo senoauricular que se ha medido en ratón es de 0.03 m/s (Verheijck et al., 2001).

Por otro lado, se ha reportado que la velocidad de propagación a través del nodo auriculoventricular es lenta y tiene un valor aproximado de 0.02 a 0.05 m/s y se ha sugerido que la velocidad de propagación lenta puede deberse a una resistencia intracelular grande a lo largo de la vía de conducción (Hoffman et al., 1959).

Cualquier alteración en la generación, morfología y/o propagación de la actividad eléctrica en el corazón podrían producir arritmias cardíacas. Cabe mencionar que la propagación del nodo senoauricular al nodo auriculoventricular permite disminuir el paso de fibrilación auricular hacia los ventrículos, disminuyendo la probabilidad de fibrilación ventricular que puede causar arritmias mortales. Se sabe que las arritmias mortales pueden presentarse en enfermedades como insuficiencia cardíaca, hipertensión arterial y diabetes mellitus (Kittnar, 2015; Shimoni et al., 1994; Torres-Jacome et al., 2013).

2.5 Excitabilidad

Las células que tienen la capacidad de generar un potencial de acción se les conoce como células excitables. Se entiende excitabilidad como la capacidad de las células de generar una respuesta debido a un estímulo eléctrico, mecánico o químico (Harry A. Fozzard, 1991). Las células cardíacas son células excitables y la respuesta que generan (es decir, el potencial de acción) es distinto en cada una (Grant, 2009). Generalmente se describen dos tipos de potenciales de acción, los potenciales de acción rápidos y los potenciales de acción lentos, los cuales se dividen en fases para su estudio. Cada fase del potencial de acción está dada por la participación de distintas corrientes iónicas (Grant, 2009; Nerbonne & Kass, 2005), sin embargo, a continuación, se describen de forma general las que participan mayormente en cada fase.

En los potenciales de acción rápidos, la fase 4 corresponde a un potencial estable (también se le conoce como potencial de membrana en reposo) a -80 mV, la fase 0 es la despolarización rápida que está dada por una corriente de sodio. La fase 1 es la repolarización rápida y está dada por una corriente saliente de potasio, la fase 2 o meseta está dada por una corriente entrante de calcio y por último la fase 3 es la repolarización lenta y se produce por corrientes de potasio (Grant, 2009).

El potencial de acción lento (característico de células marcapaso) tiene un potencial diastólico máximo de -60 a -50 mV, presenta una pendiente de despolarización lenta en la fase 4 determinada principalmente por la corriente I_f , que se activa a voltajes hiperpolarizantes, no presenta fase 1, no tiene meseta y en la fase 3 se encuentran corrientes salientes de potasio, como I_{ks} , I_{kr} e I_{kur} que repolarizan hasta regresar al potencial diastólico máximo (Boyett et al., 2000; Grant, 2009).

2.5.1 Potencial de acción marcapaso de nodo senoauricular de ratón

En el nodo senoauricular de ratón mediante la técnica de microelectrodos convencionales se han encontrado distintas morfologías de potenciales de acción y se han clasificado en tres tipos 1) los marcapaso verdaderos (figura 4a y b), 2) los secundarios o transicionales (figura 4c y d) y 3) los tipo auriculares (figura 4e) (Golovko et al., 2015).

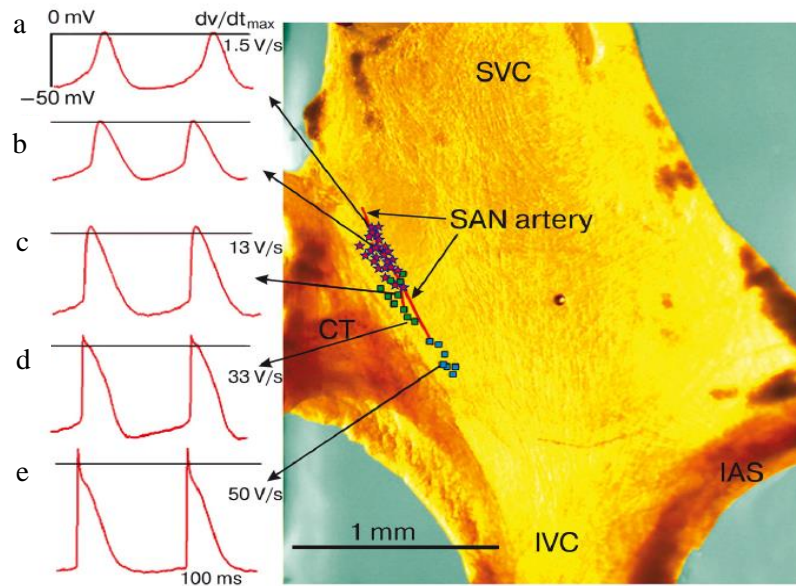


Figura 4. Preparación multicelular del NSA de ratón. La aurícula derecha fue cortada para exponer la crista terminalis (CT), el septum interauricular (IAS), la vena cava superior (SVC), vena cava inferior (IVC) y la arteria del NSA (SAN arteria). Potenciales de acción verdaderos (asterisco rosa), marcapasos latente (cuadrados verdes) y tipo auriculares (cuadrados azules). Tomada de (Golovko, et al., 2015).

El primer tipo de potenciales de acción son los dominantes y los que presentan la menor velocidad máxima de despolarización (<7 V/s), una pendiente de despolarización diastólica aproximadamente de 0.13 V/s y la mayor duración de la repolarización al 90% (figura 4a y b). Alrededor de la zona primaria del nodo senoauricular se encuentran las células secundarias o latentes, también denominada zona transicional, son células con características de verdaderas y tipo auriculares, tienen una menor pendiente de despolarización diastólica, una mayor velocidad máxima de despolarización y una menor duración de la repolarización al 90% en comparación con las verdaderas (figura 4c y d). En esta zona también se pueden encontrar células con actividad eléctrica parecida a una célula auricular, las cuales tienen una pendiente de despolarización diastólica igual a cero (es decir, potencial de membrana en reposo constante) (figura 4e) (Golovko et al., 2015). En la tabla 1 se encuentran las características electrofisiológicas de los potenciales de acción reportados por Golovko en 2015.

Parámetros	Verdaderos (figura 4a y b)	Latentes (figura 4c y d)	Tipo auriculares (figura 4e)
Potencial Diastólico Máximo (mV)	-55 ± 5	-62 ± 8	-79 ± 4
Amplitud del PA (mV)	52 ± 5	66 ± 12	96 ± 4
Velocidad máxima de despolarización (V/s)	3 ± 1	27 ± 16	110 ± 6
Voltaje umbral (mV)	-42 ± 6	-53 ± 10	-79 ± 4
DRPA20% (ms)	42 ± 8	24 ± 11	7 ± 1
DRPA50% (ms)	59 ± 9	47 ± 10	14 ± 3
DRPA90% (ms)	86 ± 11	76 ± 9	46 ± 13
Pendiente de despolarización lenta (V/s)	0.13 ± 0.03	0.09 ± 0.03	0

Tabla 1. Características electrofisiológicas del potencial de acción marcapasos del nodo senoauricular de ratón. Modificada de (Arroyo-Carmona, 2016; Golovko et al., 2015).

2.5.2 Potencial de acción marcapaso de nodo auriculoventricular de ratón

Se ha descrito en ratón que los potenciales de acción de NAV tienen un potencial diastólico menor que los reportados para NSA de ratón, la corriente iónica responsable de la pendiente de despolarización lenta (I_f) se encuentra en menor densidad y la velocidad máxima de despolarización de la fase 0 del potencial de acción es mayor en comparación con el NSA. En la tabla 2 se muestran los siguientes parámetros electrofisiológicos reportados para las células del nodo compacto de ratón (Marger et al., 2011).

Parámetros	n = 8 células
Potencial Sistólico Máximo	40 mV
Potencial Diastólico Máximo	-57 ± 1 mV
Amplitud del Potencial de Acción	91 ± 7 mV
Velocidad Máxima de Despolarización	13 ± 3 V/s
Voltaje Umbral	-41 ± 2 mV
Pendiente de Despolarización Diastólica	0.05 ± 0.01 V/s
Frecuencia de disparo	173 ± 27 eventos/min

Tabla 2. Características electrofisiológicas del potencial de acción marcapasos del nodo auriculoventricular de ratón. Modificada de (Marger et al., 2011).

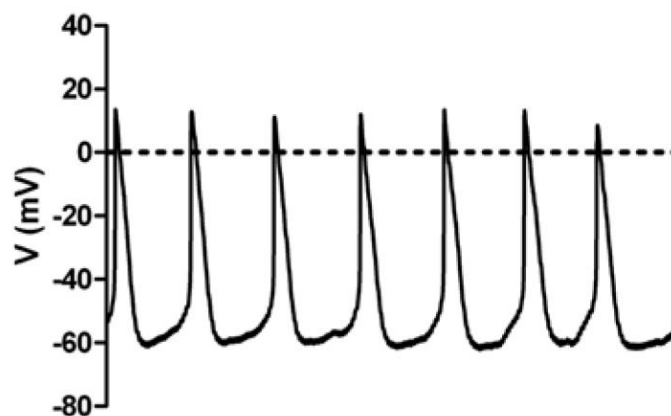


Figura 5. Potenciales de acción de nodo auriculoventricular de ratón. Se muestran potenciales de acción característicos de nodo auriculoventricular. Modificada de (Marger, et al., 2011).

2.6 Diabetes mellitus

La Diabetes Mellitus (DM) es un desorden metabólico caracterizado por una concentración de glucosa en sangre mayor a 126 mg/dL en ayuno en el humano, con alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas, resultado de un defecto en la secreción de insulina, en su mecanismo de acción, o en ambas (Alberti et al., 1998; Sonne & Hemmingsen, 2017).

Esta patología puede clasificarse de forma general en las siguientes categorías (Sonne & Hemmingsen, 2017):

a) DM Tipo 1: es causada por un problema autoinmune que resulta en la destrucción de células β -pancreáticas y, como consecuencia, una completa deficiencia de insulina.

b) DM Tipo 2: se debe a una producción inadecuada de insulina o a la incapacidad del organismo para responder a dicha hormona (resistencia a la insulina).

c) DM Gestacional: hiperglucemia diagnosticada en el segundo o tercer trimestre de embarazo, que no fue claramente diabetes antes de la gestación.

d) Diabetes de distintas etiologías: causada por otras enfermedades, por ejemplo, enfermedad de páncreas exocrino (fibrosis quística) o diabetes inducida por sustancias químicas o fármacos.

Para diagnosticar la DM se requiere que se cumpla uno o más de los siguientes criterios enlistados en la tabla 1 (ADA, 2018; Alberti et al., 1998; Sonne & Hemmingsen, 2017). Los signos y síntomas frecuentes son poliuria, polidipsia, pérdida de peso, fatiga, debilidad, visión borrosa, infecciones superficiales frecuentes y mala cicatrización de heridas (Assoc, 2014; Harrison et al., 2015).

Por otro lado, se ha planteado que el sedentarismo y el sobrepeso son factores de riesgo para que una persona desarrolle DM (Mokdad et al., 2003). La Organización Mundial de la Salud, ha reportado que el número de personas con diabetes en todo el mundo aumentó de 108 millones en 1980 a 422 millones en

2014. Con respecto a la DM en México, el 14 % de todas las muertes a nivel nacional son causadas por diabetes. De toda la población mexicana, la prevalencia de diabetes es del 10.4 %, de factores de riesgo como la obesidad es del 27.6 % y de inactividad física es del 25.4 % (OMS, 2016).

La DMT1 es causada por una deficiencia absoluta de insulina debido a una destrucción de las células β -pancreáticas por autoanticuerpos contra células β de los islotes de Langerhans, la descarboxilasa de ácido glutámico (GAD65), la insulina, la tirosina fosfatasa IA-2 y IA-2b y el transportador de zinc (ZnT8). La DMT1 se comprueba con la presencia de uno o más de estos autoanticuerpos (Sonne & Hemmingsen, 2017).

Criterios para el diagnóstico de diabetes mellitus

Glucosa en plasma en ayuno	≥ 126 mg/dL (7.0 mmol/L)	Ayuno está definido como la ingesta no calórica por al menos 8 horas.
Glucosa en plasma tras 2 horas durante una prueba de tolerancia a la glucosa	≥ 200 mg/dL	La prueba debe ser realizada como lo describe la OMS, usando una carga de glucosa que contenga el equivalente de 75 gramos de glucosa anhidra disuelta en agua
Fracción A1C	≥ 48 mmol/mol (6.5 %)	La prueba debería ser realizada en un laboratorio usando un método que está certificado por el Programa Nacional de Estandarización de Glucohemoglobina (NGSP, por sus siglas en inglés)
Glucosa al azar	≥ 11.1 mmol/L (200 mg/dL)	En un paciente con síntomas clásicos de hiperglucemia o crisis de hiperglucemia

Tabla 3. Criterios para el diagnóstico de diabetes mellitus. Se especifican los criterios determinados por la Asociación Americana de Diabetes y la Federación Internacional de Diabetes para el diagnóstico de diabetes mellitus Modificada de (Sonne & Hemmingsen, 2017).

2.6.1 Diabetes experimental

Un modelo de diabetes mellitus es el inducido por estreptozotocina (STZ). La STZ es un antibiótico que destruye las células beta-pancreáticas en diversas especies, como en ratón y rata, provocando la falta total de producción de insulina, por lo que la diabetes inducida por STZ se considera como DMT1 experimental. Estos modelos presentan un cuadro clínico parecido al humano. Por ejemplo, en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina se observó el efecto de la diabetes a largo plazo, 22 semanas, encontrando que la ganancia de peso corporal se ve disminuida y la concentración de glucosa en sangre se ve aumentada (ADA, 2018; Howarth et al., 2005).

Por otro lado, Arroyo-Carmona y colaboradores en 2016 caracterizaron el modelo de DMT1 experimental en ratón a las 10 semanas de haberse inducido con STZ sin darle un tratamiento con insulina, encontrando un aumento en la concentración de glucosa en sangre, una disminución de insulina, aumento de la concentración en sangre de colesterol, triglicéridos, LDL-c y una disminución en HDL-c, todos los parámetros con respecto al control. Además, en los ratones diabéticos aumentó la ingesta de agua, comida, así como las heces y la orina excretada, por lo que se concluyó que presentaba los signos típicos de la diabetes, poliuria, polidipsia y polifagia (Arroyo-Carmona et al., 2016; Furman, 2015).

3. Antecedentes

3.1 Alteraciones en corazón por la *diabetes mellitus*

La DM produce alteraciones en el sistema cardiovascular, por ejemplo, se ha reportado que las personas diabéticas presentan el doble de riesgo de padecer enfermedad cardiovascular que las personas que no tienen diabetes (Kannel & McGee, 1979; Resnick & Howard, 2002). De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes, de cada 1000 personas con diabetes tipo 1, cinco mueren por enfermedad cardiovascular anualmente, mientras que de cada 1000 personas con diabetes tipo 2, mueren 27 en un año (International Diabetes Federation, 2017).

Las alteraciones en la actividad eléctrica que se ha encontrado generalmente en pacientes diabéticos son aumento en la frecuencia cardíaca, acortamiento del complejo QRS, disminución del intervalo RR, disminución de la variabilidad de la frecuencia cardíaca y alargamiento del intervalo QT, aunque también se ha reportado acortamiento de este intervalo en pacientes diabéticos con neuropatía autonómica cardíaca, mientras que el alargamiento del intervalo se encontró en pacientes diabéticos sin neuropatía (Kittnar, 2015; Malpas & Maling, 1990).

Asimismo, se han estudiado las alteraciones que produce la diabetes mellitus en la actividad eléctrica en modelos animales. Por ejemplo, en ratas administradas con estreptozotocina se reportó el efecto que produce la patología a corto y largo plazo (30 días y 22 semanas después de la administración de STZ, respectivamente) en el electrocardiograma y se encontró una disminución en la frecuencia cardíaca, un aumento en el intervalo QT, una disminución en la variabilidad de la frecuencia cardíaca y una tendencia a un aumento del intervalo PQ, así como también una disminución en la actividad física y disminución en la temperatura corporal. Estos resultados se le atribuyen a la patología de la DM, ya que la administración de insulina a las ratas diabéticas provocó una tendencia a la recuperación de los parámetros mencionados (Howarth et al., 2005).

Arroyo-Carmona y cols. (2016) demostraron que la variabilidad en la frecuencia cardiaca de ratones diabéticos se ve aumentada en comparación con los ratones control. Además, se encontraron arritmias supraventriculares en ratones diabéticos, como P mellada, inversión de la onda P. Se ha propuesto que los cambios en la actividad eléctrica son debidos a alteraciones en la morfología de los potenciales de acción, y que dichos cambios son debidos a alteración en la densidad de las corrientes iónicas. Por ejemplo, se reportó una disminución de las corrientes $I_{(to,fast)}$, $I_{(to,slow)}$ e $I_{(Kslow)}$ en miocitos ventriculares de ratón y de conejo (Torres-Jacome et al., 2013).

En el laboratorio de Fisiopatología Cardiovascular del Instituto de Fisiología de la BUAP se ha encontrado al registrar electrocardiograma *in vivo* a ratones con 10 semanas de inducción de diabetes mellitus que la frecuencia cardiaca no cambia; sin embargo, al estudiar el tejido de nodo senoauricular aislado la frecuencia de disparo espontanea aumenta en ratones diabéticos con respecto a los controles (Arroyo-Carmona, 2016).

Una posible explicación a este suceso es una disminución de velocidad de conducción en la propagación del potencial de acción, como encontró Medel-Cajica en 2015, la velocidad de conducción desde nodo senoauricular a nodo auriculoventricular disminuyó en ratones diabéticos casi 3 veces, encontrándose valores de 178 cm/s para diabéticos y en ratones controles de 500 cm/s (Medel-Cajica, 2015). Para explicar el aumento de la frecuencia de disparo espontánea de nodo senoauricular se estudió su excitabilidad. No se encontraron cambios en los valores de resistencia de entrada, pero al realizar la gráfica de excitabilidad se encontró que al mismo valor de resistencia de entrada se requería menor corriente umbral para despolarizar a las células de ratones diabéticos (Medel-Cajica, 2015).

En el modelo de *diabetes mellitus experimental* en ratón CD-1 desarrollado y caracterizado en el laboratorio de Fisiopatología Cardiovascular del Instituto de Fisiología, se han encontrado arritmias supraventriculares al registrar electrocardiogramas en ratones diabéticos después de 10 semanas de haberse

inducido la patología, lo que es equivalente a que una persona haya pasado entre 5 y 7 años con la patología sin tratamiento de insulina (Arroyo-Carmona, 2016). Se ha propuesto que existen arritmias que se generan en el nodo senoauricular y se propagan hacia los ventrículos.

4. **Justificación**

La *diabetes mellitus* provoca alteraciones eléctricas en el corazón, las cuales son debidas a cambios en el metabolismo de la célula y a la falta de insulina (Torres-Jacome et al., 2013). Se ha encontrado en el modelo de *diabetes mellitus* en ratón administrado con estreptozotocina que la frecuencia cardiaca *in vivo* no se ve alterada, pero al registrar el nodo senoauricular aislado se encontró después de 10 semanas de haberse inducido la patología que la frecuencia de disparo espontánea es mayor en los ratones diabéticos que en los controles, lo cual sería contradictorio (Arroyo-Carmona, 2016). Para encontrar una explicación a esto es necesario estudiar la velocidad de propagación desde el nodo senoauricular hasta el nodo auriculoventricular y los cambios en las propiedades pasivas del marcapasos principal.

5. **Planteamiento del problema**

Aún se desconocen los mecanismos por los cuales se generan arritmias debido a las alteraciones producidas en el sistema de conducción por la diabetes mellitus en etapas crónicas, es decir, después de 10 años de evolución de la enfermedad, por lo que se requiere estudiar el nodo senoauricular o marcapasos principal y la velocidad de propagación en una etapa crónica.

Esto es, 20 semanas después de haberse inducido *diabetes mellitus* con estreptozotocina en ratones macho CD-1 es equiparable a que un adulto haya pasado aproximadamente 15 años con la patología sin tratamiento de insulina (Dutta & Sengupta, 2016), lo cual nos proporciona un modelo de diabetes mellitus tipo 1 en condición crónica.

6. Hipótesis Científica

La *diabetes mellitus* crónica induce cambios en la excitabilidad del marcapasos principal del corazón y modifica la velocidad de conducción entre el nodo senoauricular y nodo auriculoventricular en ratones con 20 semanas de evolución de *diabetes mellitus*.

7. Objetivos

7.1 Objetivo General

Determinar los cambios en la actividad eléctrica del corazón en ratones con 20 semanas de evolución de *diabetes mellitus*.

7.2 Objetivos Particulares

- Determinar los cambios en la excitabilidad del nodo senoauricular de ratón con 20 semanas de evolución de *diabetes mellitus* en preparación multicelular.
- Medir la velocidad de conducción entre el nodo senoauricular y el nodo auriculoventricular en ratón con 20 semanas de evolución de *diabetes mellitus* en preparación multicelular con la técnica de microelectrodos convencionales.

8. Material y métodos

8.1 Inducción de diabetes experimental (modelo animal)

Se utilizaron ratones machos de la cepa CD-1 con ocho semanas de edad los cuales se mantuvieron con un ciclo luz-oscuridad 12:12 (7:00 am-7:00 pm), se les permitió el acceso libre al alimento (Laboratory Autoclavable Rodent Diet 5010) y agua. Una semana antes de la inducción de *diabetes mellitus*, se les dio electrolitos suplementados con 10% de azúcar (NaCl 3.5 g/L, KCl 1.5 g/L, Na₃C₆H₅O₇ + H₂O 2.9 g/L y Glucosa 100 g/L) para prevenir un choque hipoglucémico debido a la administración de estreptozotocina (Lenzen, 2008). Cuatro horas antes de la administración, se les retiró el alimento. Se les administró una sola dosis de 120 mg/kg vía intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) disuelta en solución salina isotónica con un pH de 7.4. Todo el procedimiento se hizo en oscuridad total. Después de la administración, se les mantuvo con electrolitos suplementados con 10% de glucosa durante una semana y las semanas posteriores (hasta la semana 20) se les dio de beber electrolitos suplementados con 2% de glucosa para disminuir la mortalidad (Arroyo-Carmona, 2016).

8.2 Registro de electrocardiograma (ECG)

A la semana 20 posterior a la inducción de *diabetes mellitus* los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico a una dosis de 25 mg/kg de peso vía intraperitoneal. Después de confirmarse la pérdida de reflejo se procedió a insertar tres electrodos en configuración de derivación I (DI), uno por delante del esternón a la altura del segundo espacio intercostal derecho (electrodo positivo), otro a la altura del segundo espacio intercostal del lado izquierdo (electrodo negativo) y el último en la pata trasera izquierda (tierra). El registro se grabó a una frecuencia de captura de 10 Khz y la señal fue amplificada 70x para su posterior análisis en el programa pClamp 10.2. Del registro obtenido se midió la duración de todo el ECG, el intervalo PR y se determinó la frecuencia cardiaca con la fórmula:

$$16) \text{ Frecuencia} = \left(\frac{1}{RR} \right) * 60000$$

Donde RR es el intervalo entre ondas R expresado en milisegundos y la frecuencia está expresada en latidos por minuto.

8.3 Preparación multicelular de nodo senoauricular y nodo auriculoventricular para registro electrofisiológico

Después de registrar el electrocardiograma, se procedió a extraer el corazón y se lavó en un sistema Langendorff para quitar el remanente de sangre. Posteriormente se diseccionó el nodo senoauricular y nodo auriculoventricular como se describe a continuación.

El corazón se colocó en una placa de petri con base sylgard la cual contuvo solución TYRODE a una temperatura de 4 °C gaseada con carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂). Se cortó el ápex para exponer las cavidades de los ventrículos, se ubicó la pared libre del ventrículo derecho y se cortó por la mitad hasta atravesar la válvula tricúspide y llegar a la cavidad de la aurícula derecha. Se cortó por la mitad, se abrieron las venas cavas superior e inferior y seno coronario desde su desembocadura para exponer ambos nodos. Se cortaron los restos de ventrículo izquierdo, aurícula izquierda y ventrículo derecho, dejando intacto el nodo senoauricular y nodo auriculoventricular.

El tejido se montó en una cámara de acrílico para registro multicelular de tejido aislado con base sylgard®. Se dejó reposar el tejido una hora antes de comenzar el experimento y la preparación fue perfundida con solución TYRODE a un flujo de 3 mL/min a temperatura constante de 36 °C y gaseada con carbógeno.

Los potenciales de acción se registraron del lado del endocardio. Se utilizaron micropipetas con una resistencia de 20 a 40 MΩ elaborados con tubos capilares de borosilicato en un estirador de pipetas vertical modelo 700c David Kopf Instruments®. Los microelectrodos fueron llenados con KCl 3M y se les introdujo un electrodo de plata conectado a un amplificador Duo 773 Electrometer, WPI®, el

amplificador estuvo conectado a un osciloscopio GSD-1054B Series WG INSTEK® para la visualización de los potenciales de acción y acoplado a una computadora para el almacenamiento de la señal a una frecuencia de captura de 10 Khz. Cada uno de los sitios donde se registraron potenciales de acción se marcó en una fotografía de la preparación.

8.4 Clasificación y caracterización de la actividad eléctrica del nodo senoauricular

De los 27 ratones control, sólo se tomaron en cuenta para este trabajo 28 células de 9 tejidos distintos, mientras que de los 7 ratones diabéticos sólo se tomaron en cuenta 29 células de 5 tejidos distintos. De cada célula se registraron los potenciales de acción y fueron descartadas aquellas a las que no se les pudo realizar el protocolo de resistencia de entrada.

Para la clasificación electrofisiológica de los potenciales de acción del nodo senoauricular primero se midieron los siguientes parámetros (Arroyo-Carmona, 2016; Golovko et al., 2015; Verheijck et al., 2001):

- Pendiente de despolarización diastólica
- Potencial diastólico máximo
- Voltaje umbral
- Sobretiro
- Amplitud
- Velocidad máxima de despolarización
- Duración al 10% de la repolarización (DR10%)
- Duración al 30% de la repolarización (DR30%)
- Duración al 90% de la repolarización (DR90%)
- Frecuencia de disparo

Debido a que la actividad eléctrica del nodo senoauricular es heterogénea (Kodama & Boyett, 1985; Verheijck et al., 2001), se realizaron gráfica de distribución

de frecuencias de cada uno de los parámetros medidos en el potencial de acción para encontrar una separación en distintas poblaciones.

De la distribución de frecuencias de la velocidad máxima de despolarización en condición control, los 28 potenciales de acción se agruparon tres poblaciones de potenciales de acción, de los cuales 8 potenciales de acción tuvieron una velocidad máxima de despolarización $< 50\text{V/s}$ y se les denominó tipo 1, 6 potenciales de acción con una velocidad máxima de despolarización $> 50\text{ V/s}$ y $< 100\text{ V/s}$ y se les denominó tipo 2, y 14 potenciales de acción con una velocidad máxima de despolarización $> 100\text{ V/s}$ que se les denominó tipo 3. Se realizó el mismo procedimiento en condición de *diabetes mellitus* para la clasificación de las poblaciones de potenciales de acción, encontrándose tres poblaciones de los 29 potenciales de acción.

Cada parámetro medido en las tres poblaciones de potenciales de acción en condición control fue comparado con el grupo de *diabetes mellitus* mediante una prueba *t* de student con una $p < 0.05$.

8.5 Excitabilidad del nodo senoauricular

Para determinar la excitabilidad de la célula, primero fue necesario calcular la resistencia de entrada y el voltaje umbral de las células del nodo senoauricular.

Previo al registro de potenciales de acción, se midió la resistencia del microelectrodo dentro de la solución TYRODE. Para esto, se inyectó una corriente para determinar la resistencia del electrodo a través de la prueba ERT (Electrode Resistance Test) del amplificador (Duo 773 Electrometer, WPI®) que, según las especificaciones del proveedor, el aparato está calibrado para producir un cambio de voltaje de 100 mV por cada nanoamper inyectado a través del microelectrodo.

Mientras se registraron los potenciales de acción en la zona central del nodo senoauricular se aplicaron 6 pulsos de corriente (0.1nA, 0.2nA, 0.3nA, -0.3nA, -0.2nA, -0.1nA) de una duración de 9 ms con un estimulador (GRASS11®) y a una

frecuencia de estimulación mayor que la frecuencia de disparo espontánea del marcapaso. Se midió la amplitud del electrotono en el potencial diastólico máximo y se graficó con su respectivo valor de corriente. Con estos valores se realizó un ajuste a una línea recta para encontrar la ecuación

$$17) y = mx + b$$

donde los términos corresponden a y =*voltaje*, x = *corriente* y m = *resistencia total*.

Al valor de resistencia total se le restó el valor de resistencia del microelectrodo para obtener el valor de resistencia de entrada de la célula. Esta operación se puede realizar ya que el electrodo de registro está conectado en serie con la célula. Los valores de resistencia de entrada se separaron de acuerdo con el tipo de potencial de acción (tipo 1, 2 o 3).

Para calcular el voltaje umbral se derivó el voltaje con respecto al tiempo el registro de potencial de acción y se encontró el tiempo en el cual el valor de la derivada cambió desde 0 hasta que un valor mayor o igual a 3 veces el valor anterior. El voltaje del potencial de acción que se encuentre a ese mismo tiempo se le consideró como voltaje umbral.

Teniendo los valores de resistencia de entrada y voltaje umbral, se calculó la corriente umbral utilizando la Ley de Ohm:

$$18) V = RI$$

Los valores de corriente umbral se graficaron en función de su respectivo valor de resistencia de entrada y se hizo encontró la ecuación que se ajusta a la gráfica

$$19) y = a * x^b$$

donde y = *corriente*, x =*resistencia de entrada* y a =*voltaje umbral*.

Después se compararon las gráficas de ratones control y diabéticos. Por último, se compararon los valores de resistencia de entrada, corriente umbral y voltaje umbral entre ambos grupos.

8.6 Velocidad de conducción entre el nodo senoauricular y el nodo auriculoventricular

Se insertó un microelectrodo en el nodo senoauricular y un segundo microelectrodo en el nodo auriculoventricular. Los potenciales de acción de ambos nodos se grabaron a través de dos canales simultáneamente. Los datos fueron almacenados en una computadora con el programa ADQ_SIGN a una frecuencia de captura de 10 kHz.

Para medir la distancia en la cámara de acrílico se colocó un pedazo de papel milimétrico junto a la preparación multicelular como referencia entre ambos puntos de registro. En una fotografía se marcaron las zonas en las que se registraron los potenciales de acción y mediante el programa ImageJ® se calculó la distancia. Con el programa Clampfit 10.2®, se midió el tiempo de retardo entre la aparición de un potencial de acción del nodo senoauricular y el potencial de acción acoplado del nodo auriculoventricular. Con estos datos fue posible calcular la velocidad de conducción utilizando la fórmula:

$$20) V = \frac{d}{t}$$

Los potenciales de acción que no se encontraban acoplados o que el registro no fuera estable se descartaron.

Se realizó una prueba *t* de student con el programa Origin 9.2® entre ambos grupos de datos.

8.7 Análisis estadístico

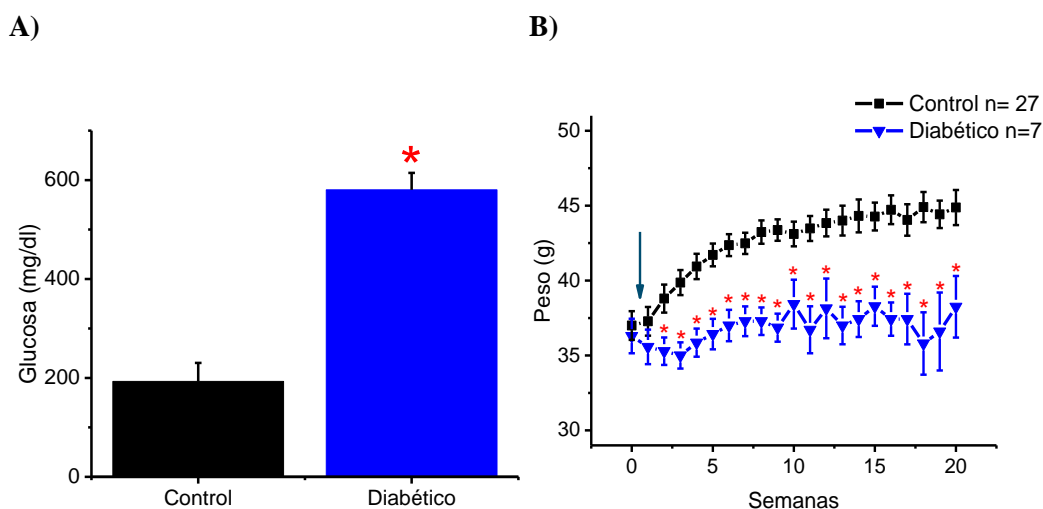
Todos los resultados de los experimentos son expresados como el valor medio \pm error estándar.

Para la comparación de los valores encontrados se usó la prueba t de student para datos no pareados. Las diferencias fueron consideradas como significativas con una $p < 0.05$.

9. Resultados

9.1 Diabetes mellitus experimental

La presencia de diabetes mellitus se confirmó mediante la prueba de glucosa en ayuno como lo indica la Asociación Americana de Diabetes y la Federación Internacional de Diabetes (ADA, 2018; Cho et al., 2018). El día del experimento se midió la glucemia con un glucómetro ACCU-CHEK Performa, en ratones controles fue de 193 ± 37 mg/dL mientras que en ratones diabéticos fue de 580 ± 34 mg/dL (figura 6A).



*Figura 6. Efecto de la estreptozotocina en la concentración de glucosa en sangre y el peso corporal. Se muestra en A) un aumento significativo de la glucemia y en B) un peso menor durante las 20 semanas de evolución en ratones administrados con estreptozotocina. * estadísticamente significativo con respecto al control.*

Además, a partir de la primera semana después de la administración de estreptozotocina se observó que los ratones presentaron los signos clínicos de una persona diabética, como lo son poliuria y polidipsia (datos reportados por Arroyo-Carmona, 2016). También presentaron un bajo peso corporal en comparación con los ratones control. Se hizo un seguimiento de peso semanal y se encontró que los ratones diabéticos presentan un bajo peso a partir de la tercera semana,

manteniéndose con un peso menor que los ratones control hasta la semana de experimento, sin disminuir su peso (figura 6B).

9.2 Análisis del electrocardiograma

En la figura 7 se muestra un electrocardiograma característico de ratones control (negro, $n=25$) y de ratones diabéticos (azul, $n=7$). Se encontró que la frecuencia cardíaca de ratones controles fue de 412 ± 1.4 latidos por minutos mientras que en ratones diabéticos fue de 421 ± 2.5 , siendo mayor estadísticamente respecto a los controles. La duración del ECG fue de 92 ± 6 ms y de 94 ± 5 , en control y diabético respectivamente, pero no se encontró diferencia significativa. Sin embargo, como medida de la velocidad de propagación en todo el corazón *in vivo* se midió el intervalo PR y se encontró un aumento del 14% en la duración en comparación con ratones control (38 ± 3.7 ms en control y 43.5 ± 3 ms en ratones diabéticos, *t* de student $p < 0.05$, media \pm error estándar).

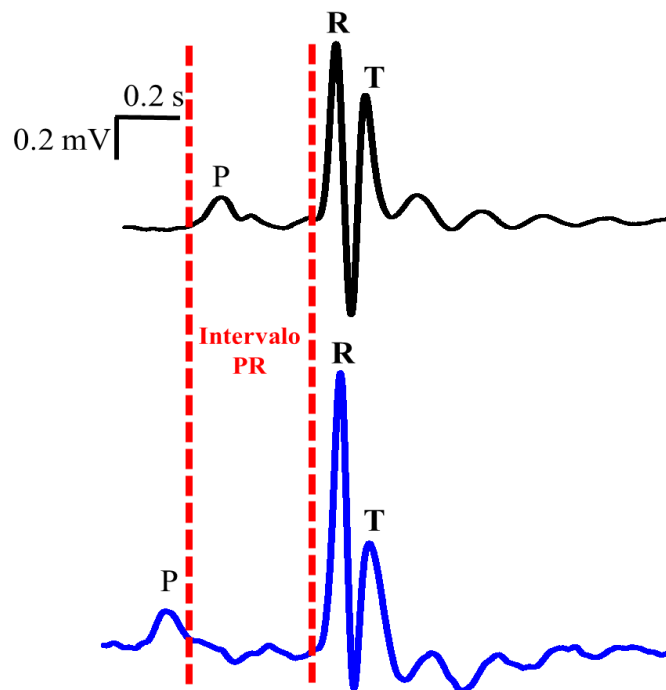


Figura 7. Registro de ECG de ratón. Intervalo PR indicado con las líneas punteadas rojas, coinciden con el inicio en la onda P y el inicio de la onda R en condiciones control (negro), pero existe un alargamiento del intervalo en ratones diabéticos (azul).

9.3 Clasificación y caracterización de la actividad eléctrica de nodo senoauricular en condición control

La actividad eléctrica del nodo senoauricular que se encontró fue heterogénea y los potenciales se clasificaron en tres poblaciones de acuerdo con la velocidad máxima de despolarización (figura 8).

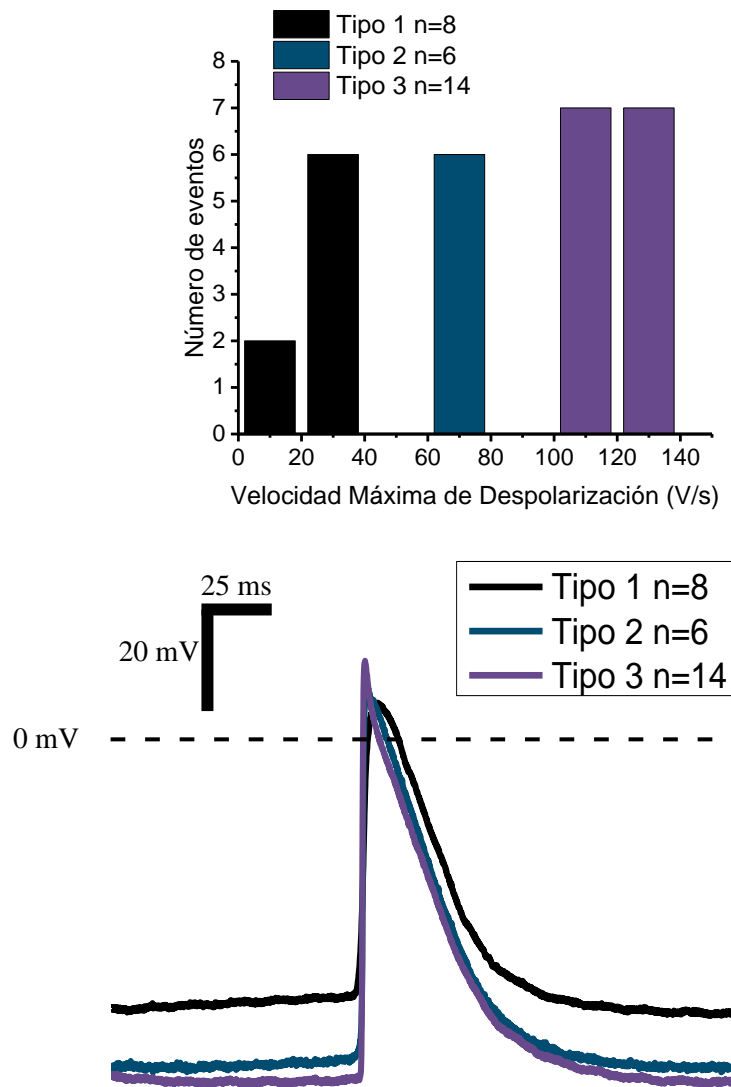


Figura 8. Poblaciones de potenciales de acción de nodo senoauricular en condición control. Los potenciales de acción se agrupan en tres poblaciones de acuerdo con este parámetro, tipo 1 (negro) con una velocidad máxima de despolarización <50 V/s, tipo 2 (azul) >50 y <100 V/s, tipo 3 (morado) >100 V/s. Nótese la diferencia en amplitud y potencial diastólico máximo entre las poblaciones.

El potencial de acción de tipo 1 tiene una pendiente de despolarización de 20 ± 5 mV/s, un potencial diastólico máximo de -64 ± 1.5 mV, sobretiro de 5 ± 2.5 mV, una velocidad máxima de despolarización de 30.6 ± 4.3 V/s, una amplitud de 69 ± 3 mV, una duración de la repolarización al 10% de 5.8 ± 0.5 ms, al 30% de 14 ± 6.2 ms y al 90% de 65 ± 6 ms.

El tipo 2 tiene un potencial diastólico máximo (-72 ± 2 mV) y un voltaje umbral (-68 ± 2 mV) menor respecto al tipo 1, la velocidad máxima de despolarización (67 ± 2.6 V/s) y la amplitud (83 ± 3 mV) son mayores, estos parámetros fueron diferentes estadísticamente. En los otros parámetros no se encontró diferencia significativa.

Parámetro	Tipo 1 (n=8)	Tipo 2 (n=6)	Tipo 3 (n=14)
Pendiente de Despolarización lenta (mV/s)	20 ± 5	10 ± 4	$9 \pm 2^{\Omega}$
Potencial Diastólico Máximo (mV)	-64 ± 1.5	$-72 \pm 2^{\Omega}$	$-77 \pm 0.6^{\Omega\beta}$
Voltaje umbral (mV)	-59 ± 1.7	$-68 \pm 2^{\Omega}$	$-73 \pm 0.8^{\Omega\beta}$
Sobretiro (mV)	5 ± 2.5	11 ± 3	$19.6 \pm 1.7^{\Omega\beta}$
Velocidad Máxima de Despolarización (V/s)	30.6 ± 4.3	$67 \pm 2.6^{\Omega}$	$119 \pm 2.2^{\Omega\beta}$
Amplitud (mV)	69 ± 3	$83 \pm 3^{\Omega}$	$97 \pm 1.8^{\Omega\beta}$
DR10% (ms)	5.8 ± 0.5	5.8 ± 0.7	$3.6 \pm 0.5^{\Omega\beta}$
DR30% (ms)	14 ± 6.2	15.8 ± 1	14 ± 1
DR90% (ms)	65 ± 6	70 ± 8	66 ± 1.7
Frecuencia de disparo (eventos/min)	217 ± 19	199 ± 32	251 ± 12

Tabla 4. Caracterización y clasificación de las poblaciones de potenciales de acción en condición control. Se realizó una prueba t de student con una $p < 0.05$. Ω estadísticamente significativo con respecto al tipo 1, β estadísticamente significativo con respecto al tipo 2. Media \pm error estándar.

Por último, en el tipo 3 la pendiente de despolarización lenta (9 ± 2 mV/s) con respecto a la población tipo 1, el potencial diastólico máximo (-77 ± 0.6), el voltaje umbral (-73 ± 0.8 mV) y la duración de la repolarización al 10% (3.6 ± 0.5 ms) son menores en comparación con el tipo 1 y 2, el sobretiro (19.6 ± 1.7 mV), la velocidad máxima de despolarización (119 ± 2.2 V/s) y la amplitud (97 ± 1.8 mV) son mayores respecto a la población tipo 1 y 2. Los parámetros mencionados fueron diferentes estadísticamente mientras que en los otros parámetros medidos no se encontró diferencia significativa. En la tabla 4 se muestran los valores de todos los parámetros medidos en las tres poblaciones de potenciales de acción. En la figura 9 se muestra una fotografía con la ubicación de los potenciales de acción registrados en el nodo senoauricular de ratones control. La actividad eléctrica se registró en la desembocadura de la vena cava superior delimitada por la *crista terminalis*, que es el sitio donde se encuentra la zona central del nodo senoauricular en ratón (Verheijck et al., 2001).

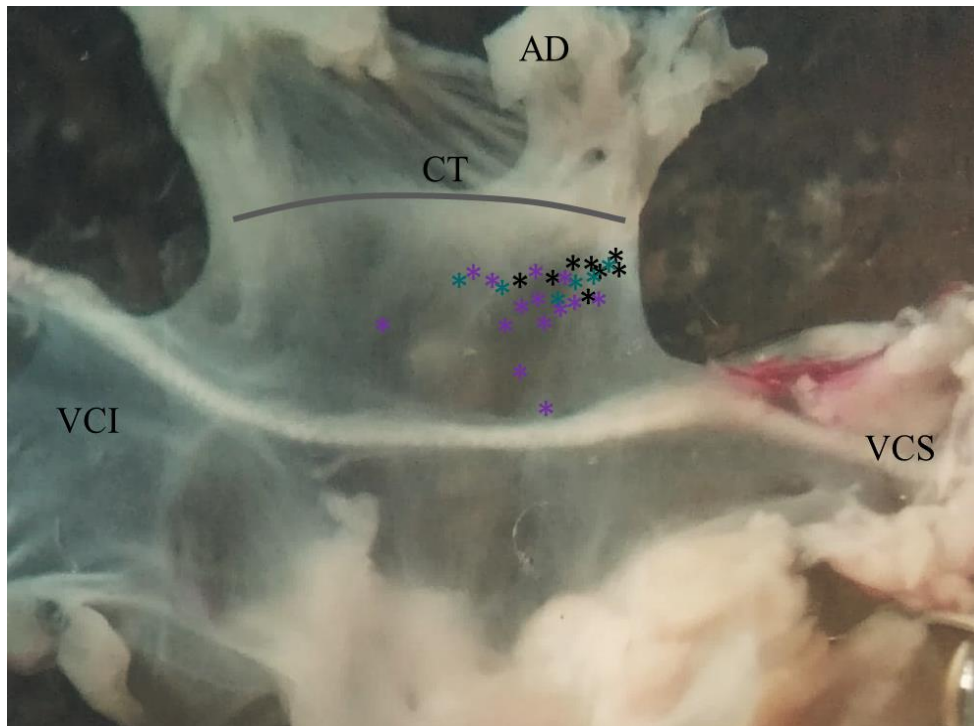


Figura 9. Ubicación espacial de los 3 tipos de potenciales de acción en condición control. En la fotografía se muestra la preparación de NSA de ratón en condiciones control expuesta con el lado de endocardio para el registro de potenciales de acción con la técnica de microelectrodos convencionales. Vena cava inferior (VCI), vena cava superior (VCS), crista terminalis (CT), aurícula derecha (AD).

9.4 Efecto de la *diabetes mellitus* en la actividad eléctrica del nodo senoauricular

En la condición de diabetes mellitus se encontraron las mismas tres poblaciones de potenciales de acción que en condición control, con los siguientes efectos:

En la población tipo 1 sólo se encontró un aumento estadísticamente significativo en la velocidad máxima de despolarización del potencial de acción tipo 1 (30.6 ± 4.3 V/s vs 45 ± 0.8 V/s en control y diabético respectivamente) y una tendencia a disminuir la duración al 90% de la repolarización sin ser significativa (figura 10). Los otros parámetros no fueron diferentes estadísticamente.

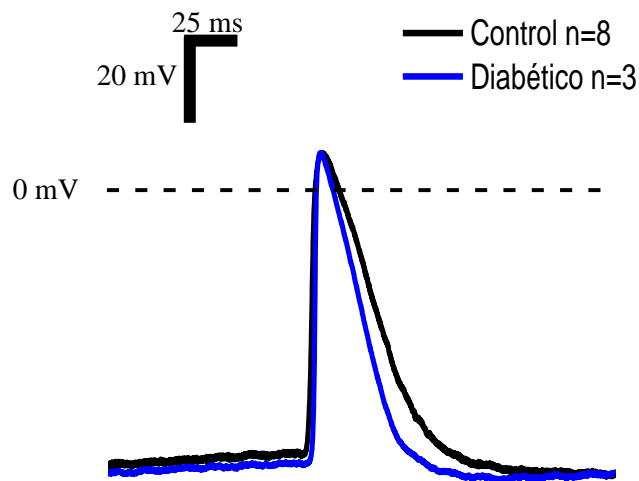


Figura 10. Efecto de la *diabetes mellitus* sobre los potenciales de acción tipo 1. En negro se observa el potencial de acción en condición control. La diabetes mellitus (azul) produce un aumento en la velocidad máxima de despolarización y una tendencia a disminuir la duración al 90% de la repolarización.

Al realizar la comparación de las poblaciones de potenciales de acción tipo 2 y 3 registrados en ratones diabéticos con su respectiva población en condición control (figura 11), no se encontró ninguna diferencia significativa en los parámetros medidos. En la tabla 5 se muestran los valores obtenidos para cada uno de los parámetros en condición control y de *diabetes mellitus* y en la figura 12 se muestra la ubicación espacial de los potenciales registrados en el nodo senoauricular de

ratones diabéticos, donde se aprecia que no hay una modificación de su localización con respecto al control.

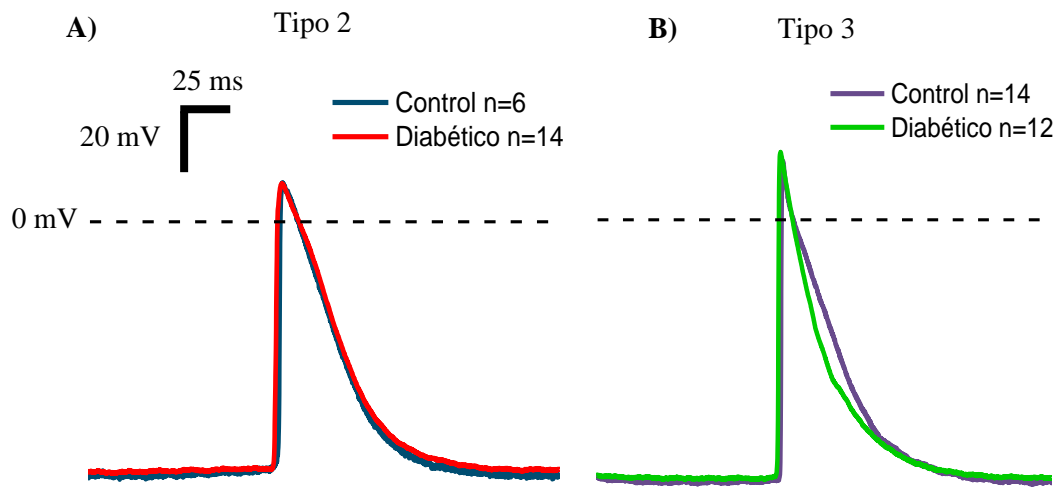


Figura 11. Efecto de la diabetes mellitus sobre los potenciales de acción tipo 2 y 3. **A)** Población tipo 2 en condición control (azul cyan) y en diabetes mellitus (rojo). **B)** Población tipo 3 en condición control (morado) y en diabetes mellitus (verde). No se produjo ningún cambio significativo en los parámetros medidos en las dos poblaciones de potenciales de acción.

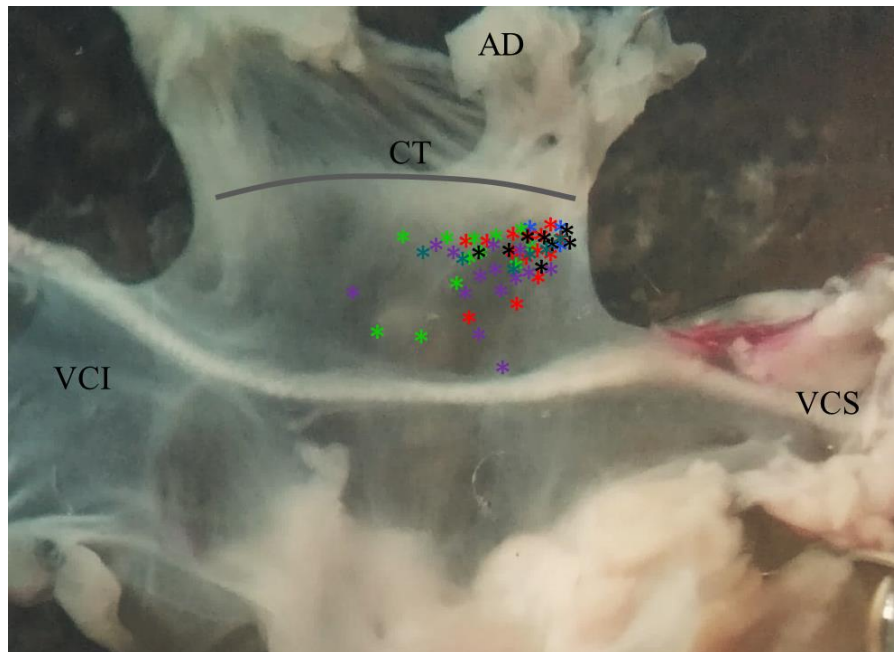


Figura 12. Ubicación espacial de los 3 tipos de potenciales de acción en condición de diabetes mellitus. Se observan las poblaciones de potenciales de acción tipo 1 (negro), tipo 2 (azul cyan), tipo 3 (morado) registrados en condición control y en condición de diabetes mellitus tipo 1 (azul rey), tipo 2 (rojo) y tipo 3 (verde). Vena cava inferior (VCI), vena cava superior (VCS), crista terminalis (CT), aurícula derecha (AD).

Parámetro	CONTROL			DIABÉTICO		
	Tipo 1 (n=8)	Tipo 2 (n=6)	Tipo 3 (n=14)	Tipo 1 DM (n=3)	Tipo 2 DM (n=14)	Tipo 3 DM (n=12)
Pendiente de Despolarización lenta (mV/s)	20 ± 5	10 ± 4	9 ± 2	14 ± 6	10 ± 3	6 ± 2
Potencial Diastólico Máximo (mV)	-64 ± 1.5	-72 ± 2 ^Ω	-77 ± 0.6 ^{Ωβ}	-70 ± 2.3	-72.8 ± 1	-79 ± 1 ^α
Voltaje umbral (mV)	-59 ± 1.7	-68 ± 2 ^Ω	-73 ± 0.8 ^{Ωβ}	-66 ± 2.5	-69 ± 1.4	-74 ± 1 ^{φ α}
Sobretiro (mV)	5 ± 2.5	11 ± 3	19 ± 1.7 ^{Ωβ}	1.4 ± 1	12 ± 2 ^φ	21 ± 2 ^{φ α}
Velocidad Máxima de Despolarización (V/s)	30.6 ± 4	67 ± 2 ^Ω	119 ± 2 ^{Ωβ}	45 ± 0.8*	79.2 ± 4 ^φ	118 ± 4 ^{φ α}
Amplitud (mV)	69 ± 3	83 ± 3 ^Ω	97 ± 1.8 ^{Ωβ}	73 ± 3	84 ± 1.5 ^φ	99 ± 2 ^{φ α}
DR10% (ms)	5.8 ± 0.5	5.8 ± 0.7	3.6 ± 0.5 ^{Ωβ}	5.1 ± 1.7	4.9 ± 0.4	4.4 ± 0.4
DR30% (ms)	14 ± 6.2	15.8 ± 1	14 ± 1	13 ± 2.7	14 ± 0.7	14 ± 0.8
DR90% (ms)	65 ± 6	70 ± 8	66 ± 1.7	52 ± 9	57 ± 4	60 ± 4
Frecuencia de disparo (eventos/min)	217 ± 19	199 ± 32	251 ± 12	200 ± 28	245 ± 18	250 ± 18

Tabla 5. Efecto de la diabetes mellitus en las tres poblaciones de potenciales de acción. Se realizó una prueba t de student con una p<0.05. ^Ω estadísticamente significativo con respecto al tipo 1 en condición control, ^β estadísticamente significativo con respecto a tipo 2 en condición control, ^φ estadísticamente significativo con respecto al tipo 1 en condición de diabetes mellitus, ^α estadísticamente significativo con respecto a tipo 2 en condición de diabetes mellitus, * estadísticamente significativo con respecto al control. Media ± error estándar.

9.5 Efecto de la diabetes mellitus en la excitabilidad de las células de nodo senoauricular

En cada una de las células donde se registró el potencial de acción se determinó la resistencia de entrada, la corriente umbral y el voltaje umbral (tabla 6). En ambas condiciones, los potenciales tipo 1 son los que tienen la resistencia de entrada mayor ($11.3 \pm 2.9 \text{ M}\Omega$ vs $13.1 \pm 2.3 \text{ M}\Omega$ en control y diabético respectivamente) pero no se encontró diferencia significativa entre las dos poblaciones. Tampoco se encontró diferencia significativa entre la resistencia de entrada de la población tipo 2 y 3 en ratones diabéticos con sus respectivas poblaciones.

En la población tipo 3 en condición de diabetes mellitus la resistencia de entrada fue menor estadísticamente que en las células tipo 1 de ratones control y tipo 1 de ratones diabéticos ($13.1 \pm 2.3 \text{ M}\Omega$ en tipo 1 control, $13.1 \pm 2.3 \text{ M}\Omega$ en tipo 1 de ratones diabéticos vs $6 \pm 0.7 \text{ M}\Omega$ en tipo 3 de ratones diabéticos), por lo que la corriente umbral fue mayor ($14.3 \pm 1.3 \text{ nA}$ en la población tipo 3 vs $5.5 \pm 1 \text{ nA}$ en la población tipo 1).

En condición control, la corriente umbral de la población tipo 3 fue mayor con respecto a la población tipo 1 ($12.8 \pm 1.8 \text{ nA}$ en la población tipo 3 vs $5.5 \pm 1 \text{ nA}$ en la población tipo 1). Al realizar la curva de excitabilidad (figura 13) de cada una de las poblaciones de ratones diabéticos con su respectiva población en condición control, se encontró un pequeño desplazamiento a la derecha en la gráfica de ratones diabéticos de la población tipo 1 y 3, ya que al realizar un ajuste alométrico se calculó el voltaje umbral resultando menor en ambas poblaciones con respecto al control.

	Resistencia de entrada	Corriente umbral	Voltaje umbral
Tipo 1 n=8	11.3 ± 2.9 MΩ	8.3 ± 1.9 nA	-62.9 ± 1.3 mV
Tipo 1 diabético n=3	13.1 ± 2.3 MΩ	5.5 ± 1 nA	-66.7 ± 1.9 mV
Tipo 2 n=6	7.5 ± 1.5 MΩ	12.5 ± 3.1 nA	-72.6 ± 1.8 mV
Tipo 2 diabético n=14	8.7 ± 1.4 MΩ	10.7 ± 1.6 nA	-71.2 ± 1.2 mV
Tipo 3 n=14	6.8 ± 0.7 MΩ	12.8 ± 1.8 nA ^Ω	-71.4 ± 0.8 mV
Tipo 3 diabético n=12	6 ± 0.7 MΩ ^{ΩΦ}	14.1 ± 1.3 nA ^Ω	-75.2 ± 1 mV

Tabla 6. Efecto de la diabetes mellitus sobre la resistencia de entrada, la corriente umbral y el voltaje umbral en células de nodo senoauricular. No se ve modificada la resistencia de entrada en células de nodo senoauricular de ratones diabéticos en comparación con los ratones control. ^Ω estadísticamente significativo con respecto al tipo 1 en condición control, ^Φ estadísticamente significativo con respecto al tipo 1 en condición de diabetes mellitus. Media ± error estándar.

Al ver la gráfica de excitabilidad con puntos (figura 14), se observa que alrededor del valor promedio de resistencia de entrada ($8.2 \pm 0.9 \text{ M}\Omega$ en control vs $8 \pm 0.8 \text{ M}\Omega$ en diabéticos), indicado con una raya punteada paralela al eje de las ordenadas, hay más células con una menor resistencia de entrada en condición control y que en condición de diabetes tienden a esparcirse en la gráfica hacia valores mayores resistencia de entrada, aunque no existe diferencia estadística

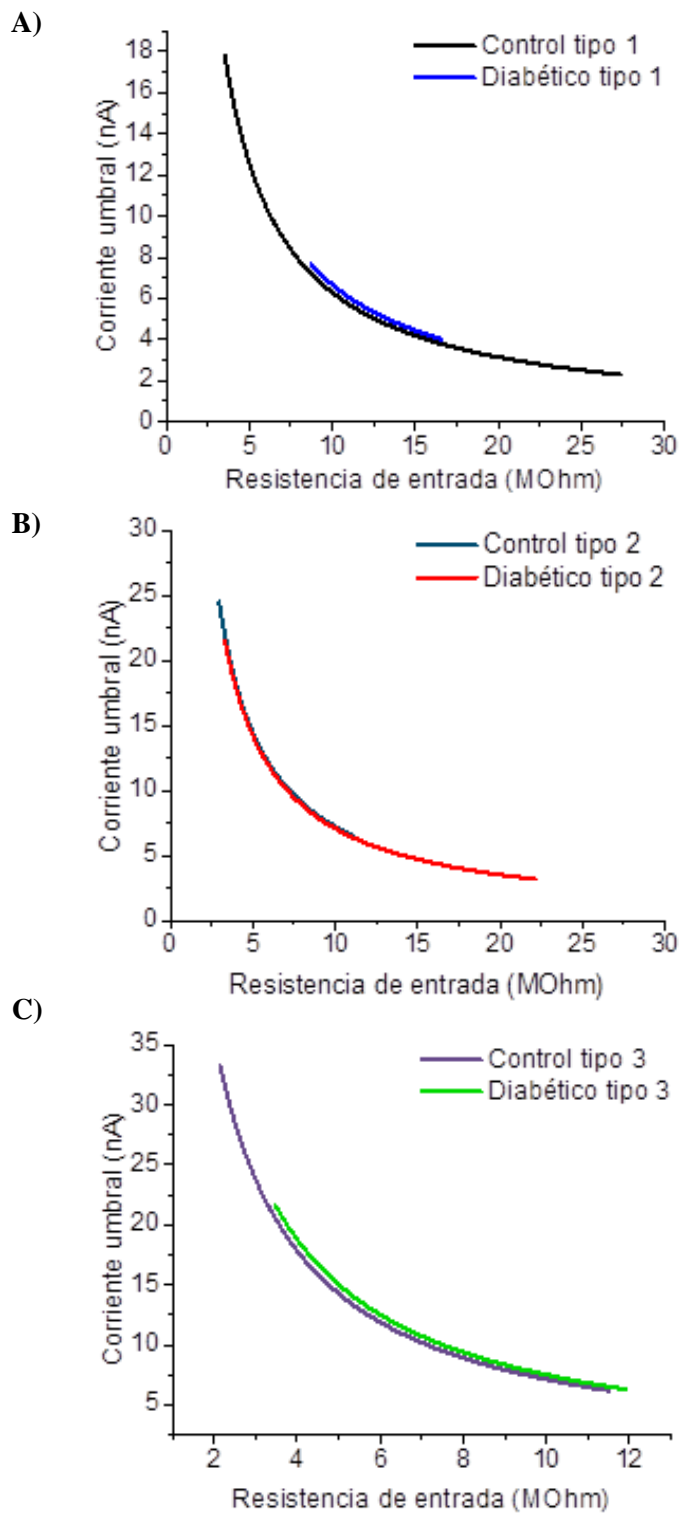


Figura 13. Gráfica de excitabilidad de los tres tipos de potenciales de acción en condición control vs diabetes mellitus. **A)** Potenciales de acción tipo 1, **B)** Potenciales de acción tipo 2 y **C)** Potenciales de acción tipo 3. En la población tipo 1 y 3 hay un desplazamiento de la gráfica a la derecha en diabéticos con respecto al control, indicando que a un mismo valor de resistencia de entrada se necesita mayor corriente.

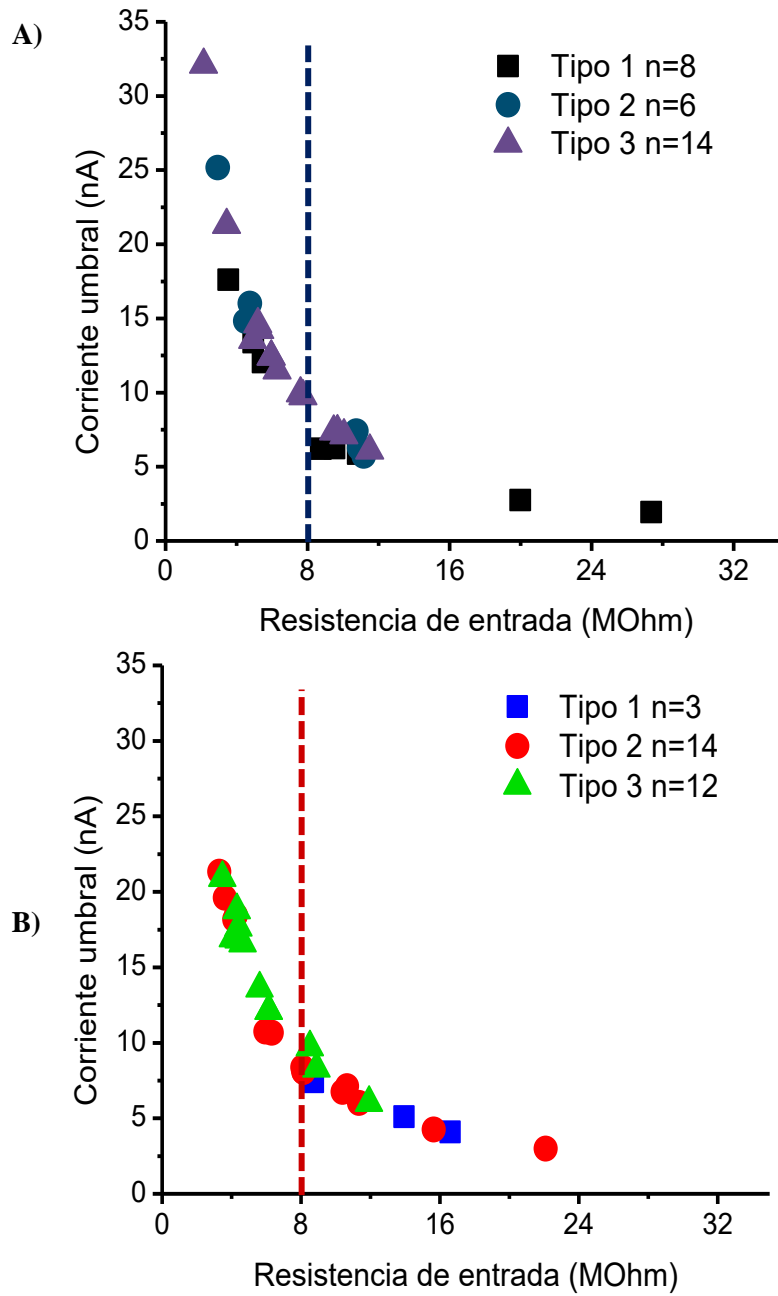


Figura 14. Gráfica de excitabilidad en condición control y diabetes mellitus. **A)** Gráfica de excitabilidad en condición control y **B)** gráfica de excitabilidad en condición de diabetes mellitus. Aunque no hay diferencia significativa en los valores de resistencia de entrada entre ambos grupos, hay una tendencia a un aumento en la resistencia de entrada de las células de nodo senoauricular de ratones diabéticos.

9.6 Efecto de la diabetes mellitus en la velocidad de conducción

Para la medición de la velocidad de conducción se requirió que un potencial de nodo auriculoventricular estuviera acoplado a un cualquier tipo de potencial de acción de nodo senoauricular. Se encontró una disminución del 33% en la velocidad de conducción desde el nodo senoauricular hasta el nodo auriculoventricular en ratones diabéticos con respecto a los controles (78 ± 10.8 cm/s en control vs 52.6 ± 4.5 cm/s en ratón diabético, $p < 0.05$) (figura 15).

Velocidad de conducción

Control (n=26)	78 ± 10.8 cm/s
Diabético (n=22)	52.6 ± 4.5 cm/s *

Tabla 7. Disminución de la velocidad de conducción en ratones diabéticos. La velocidad de conducción medida desde el nodo senoauricular hasta el nodo auriculoventricular se ve disminuía en condición de diabetes. Se realizó una prueba t de student con una $p < 0.05$, *estadísticamente significativo con respecto al control. Media \pm error estándar.

En condición control se encontraron cuatro valores de velocidad de conducción que fueron descartados para realizar la prueba estadística (6 cm/s, 324 cm/s, 392 cm/s y 292 cm/s), mientras que en condición de diabetes mellitus se descartó un valor (267 cm/s), ya que al realizar la gráfica de distribución de frecuencias de los valores de velocidad de conducción, estos se salieron del rango donde se concentraba la mayoría de los datos.

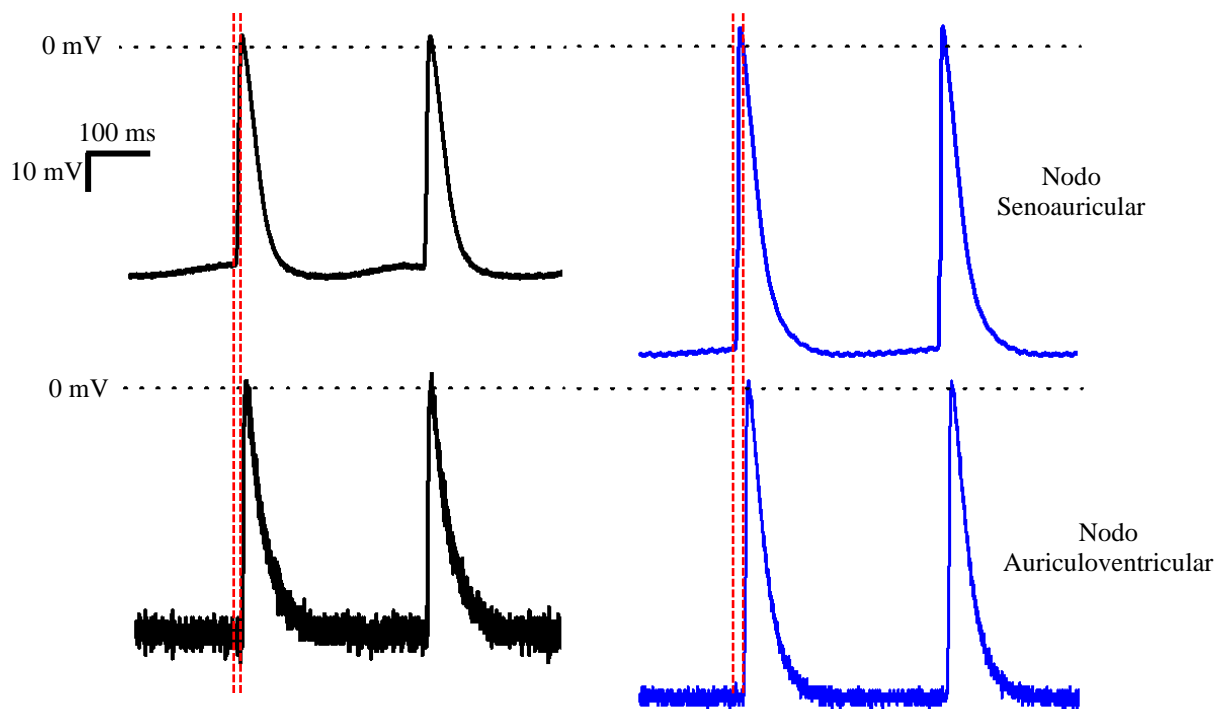


Figura 15. Disminución de la velocidad de conducción en condición de diabetes mellitus. Se observa un aumento en el retraso (líneas punteadas) entre el potencial de acción de nodo senoauricular acoplado con el potencial de acción de nodo auriculoventricular en condición de diabetes mellitus (azul, n=22 células acopladas) con respecto al control (negro, n=26 células acopladas).

10. Discusión

La Asociación Americana de Diabetes y la Federación Internacional de Diabetes proponen que el diagnóstico de *diabetes mellitus* es tener en sangre una concentración de glucosa en ayuno >126 mg/dL; sin embargo, este diagnóstico no se puede utilizar para ratones, ya que los valores de glucemia normal reportados para ratones de la cepa CD-1 son de 164 ± 28 mg/dL por los Laboratorios Charles River y 184 ± 13 mg/dL (Arroyo-Carmona et al., 2016). Por lo tanto, para este trabajo se utilizó el modelo de *diabetes mellitus* experimental inducido por estreptozotocina descrito por Arroyo-Carmona y cols en 2016. Los ratones administrados con estreptozotocina fueron considerados diabéticos si la glucosa en sangre era >483 mg/dL, de acuerdo con lo reportado (Arroyo-Carmona et al., 2016). Durante las semanas posteriores a la inducción los ratones mostraron un aumento estadísticamente significativo en la glucemia, también mostraron un aumento en la ingesta de agua, de alimento y en la cantidad de orina excretada, por lo que se puede confirmar que los ratones administrados con estreptozotocina son diabéticos (figura 6). Además, el tiempo que los ratones presentaron la patología fue de 20 semanas, sin recibir tratamiento con insulina, eso es equiparable a que un humano haya estado enfermo de *diabetes mellitus* aproximadamente 15 años (Dutta & Sengupta, 2016), también sin tratamiento de insulina, por lo proponemos que los resultados encontrados en este trabajo son debidos una condición de diabetes mellitus crónica.

Se ha reportado en ratones diabéticos con 10 semanas después de la inducción de *diabetes mellitus* presencia de arritmias supraventriculares sin cambios en la frecuencia cardiaca con respecto a los ratones control de su misma edad, por lo que se infirió que los ratones diabéticos no presentaban neuropatía autonómica cardiaca (Arroyo-Carmona et al., 2016); sin embargo, al hacer el análisis del registro de electrocardiograma de los ratones con 20 semanas de evolución de diabetes (figura 7), se encontró una frecuencia cardiaca menor en comparación con los ratones diabéticos de 10 semanas (421 ± 2.5 lpm vs 488 ± 5 lpm, respectivamente) y, también, la frecuencia cardiaca en ratones control de 20

semanas fue menor que los ratones control de 10 semanas (412 ± 1.4 vs 482 ± 5 lpm, respectivamente) lo que concuerda con que a medida que aumenta la edad la frecuencia cardiaca disminuye (Levine, 1997).

Por otro lado, se encontró un aumento en la frecuencia cardiaca de ratones diabéticos con 20 semanas de evolución con respecto al control. Se ha visto que en pacientes diabéticos con alteraciones en el sistema nervioso simpático y parasimpático tienen una frecuencia cardiaca mayor que los que no tienen alteraciones en el sistema nervioso autónomo, por lo que se podría inferir que los ratones con diabetes mellitus crónica presentan neuropatía autonómica cardiaca (Ewing et al., 1981). Además, se ha reportado que a medida que aumenta la frecuencia cardiaca de pacientes diabéticos aumenta la mortalidad (Carnethon et al., 2008; Ewing et al., 1981; Malpas & Maling, 1990). No se encontraron cambios aparentes en la morfología del registro de ratones diabéticos con respecto a los controles, pero si se encontró un aumento en la frecuencia cardiaca (figura 7).

Así mismo, se encontró que existe bloqueo auriculoventricular tipo 1, determinado con el alargamiento del intervalo PR (figura 7), lo que incrementa el riesgo de padecer fibrilación auricular y, a su vez, muerte súbita (Cheng et al., 2009). Medir el intervalo PR fue el primer acercamiento para encontrar si la velocidad de conducción se veía alterada. Por lo que después se realizaron los experimentos con la técnica de microelectrodos convencionales para un resultado más preciso.

De acuerdo con la literatura, la morfología de la actividad eléctrica de nodo senoauricular es heterogénea, como fue reportado para conejo (Bleeker et al., 1980; Boyett et al., 2000; Kodama & Boyett, 1985; Liu et al., 2007; Verheijck et al., 2001). En el nodo senoauricular de ratón se han reportado tres tipos de potenciales de acción, los marcapaso verdaderos, los transicionales y los tipo auriculares (figura 8) (Golovko et al., 2015), los cuales difieren de la morfología de los potenciales de acción de conejo. Además, el sitio reportado como marcapaso para el nodo de conejo se encuentra localizado en la región entre la vena cava superior e inferior, de 1 a 2 mm de distancia en el borde medial de la *crista terminalis*, mientras que en el ratón se ubica en la esquina entre el borde lateral y medial de la *crista terminalis*

más cercano a la desembocadura de la vena cava superior (figura 9) (Kodama & Boyett, 1985; Verheijck et al., 2001).

En este trabajo se encontraron en condiciones control y de *diabetes mellitus* tres poblaciones de potenciales de acción, los que parecieran ser marcapasos verdaderos con la menor velocidad máxima de despolarización (tipo 1), los transicionales que tienen una morfología intermedia entre los potenciales de acción centrales y auriculares (tipo 2) con una mayor velocidad máxima de despolarización que los tipo 1, y los que tienen una morfología mucho más parecida a los potenciales auriculares (tipo 3) con la mayor velocidad máxima de despolarización (figura 10).

Se ha descrito que en ratas diabéticas la duración del potencial de acción ventricular se ve aumentada duración del potencial de acción a los 6 días después de la administración con estreptozotocina (100 mg/kg de peso) (Shimoni et al., 1994). El mismo fenómeno se observa en el potencial de acción de músculo papilar de ratas con diabetes mellitus crónica (30 a 40 semanas después de la inducción con 65 mg/kg de peso de estreptozotocina) (Nobe et al., 1990); sin embargo, en este modelo de diabetes mellitus crónica no se produjo ningún cambio en la morfología de los potenciales de acción de la población 2 y 3 (figura 11), aunque existe un aumento significativo en la velocidad máxima de despolarización de la población de potenciales de acción tipo 1 en condiciones de diabetes. Esta diferencia puede deberse a que solo se encontraron tres células en ratones diabéticos, comparado con las ocho células registradas en ratones control (figura 10).

Tampoco se observó un cambio evidente en la ubicación del sitio marcapasos (figura 12), como fue reportado en nodo senoauricular de rata provocado por la edad, o por otras alteraciones metabólicas como obesidad (Yanni et al., 2010).

Acerca de la excitabilidad de nodo senoauricular, se encontró que la resistencia de entrada de las células de acuerdo con la clasificación de potenciales de acción disminuye conforme se alejan de la zona central marcapaso reportada para ratón por Verheijck (tabla 6). Esto indicaría que las propiedades pasivas son

diferentes en cada una de las células que conforman el nodo senoauricular. Para el caso de miocitos ventriculares aislados en condiciones de diabetes mellitus se ha encontrado una tendencia a un aumento en la resistencia de entrada ($62.8 \pm 28.3 \text{ M}\Omega$ en control vs $79.5 \pm 25.6 \text{ M}\Omega$ en diabético) (Shimoni et al., 1994).

La resistencia de entrada en promedio no se modificó por la *diabetes mellitus*, pero la gráfica de excitabilidad de acuerdo con la población de potenciales de acción tipo 1 y 3 se encontró un desplazamiento a la derecha de la gráfica (figura 13), lo que indica que a un mismo valor de resistencia de entrada se necesita mayor corriente para despolarizar a las células para que se pueda generar un potencial de acción. También, en la figura 14 se observó que en condiciones de *diabetes mellitus* los valores de resistencia de entrada tienden hacia un aumento, aunque no hubo diferencia significativa con respecto al control.

La modificación en la resistencia de entrada está relacionada con la forma en la que están conectadas las células por uniones comunicantes y el tipo de conexina que las conforman (Saffitz et al., 1997; Verheijck et al., 2001). Se ha reportado que el nodo senoauricular de ratón tiene conexina 45 en la zona marcapaso, mientras que las conexina 40 y 43 se encuentran en la zona periférica y en la aurícula. En ratas diabéticas con 4 semanas de evolución de la patología se ha encontrado una disminución en la expresión genética y en la cantidad de conexina 43 (Lin et al., 2006), por lo que podríamos suponer que una disminución en las conexinas provocaría un aumento en la resistencia de entrada.

La alteración en las conexinas también produciría una disminución en la velocidad de conducción de los potenciales de acción, como fue reportado por Lin y colaboradores quienes encontraron una disminución de la conexina 43 lo que produjo una disminución en la velocidad de conducción de endocardio de ventrículo derecho de corazón de rata diabética.

Asimismo, se encontró una disminución en la velocidad de conducción medida desde el nodo senoauricular hasta el nodo auriculoventricular en ratones con diabetes mellitus crónica (figura 15). Esta disminución en la velocidad puede

explicar a el aumento del intervalo PR medido en el electrocardiograma y reforzaría la hipótesis de que disminuye la cantidad de uniones comunicantes, lo que aumenta la posibilidad de que se generen arritmias de reentrada.

11. Conclusiones

- Se encontró un aumento en la excitabilidad de las células de nodo senoauricular y una disminución en la velocidad de conducción, por lo tanto, nuestra hipótesis fue verdadera.
- Uno de los mecanismos por los cuales pueden producirse arritmias cardíacas por alteraciones en el sistema especializado de conducción es por alteraciones en la excitabilidad de las células del marcapaso del corazón y una disminución en la velocidad de conducción del potencial de acción.
- La actividad eléctrica de nodo senoauricular de ratón es heterogénea.
- El modelo de diabetes mellitus experimental en ratones puede utilizarse para estudiar la patología en una condición crónica (20 semanas después de la administración de estreptozotocina, que es equiparable a aproximadamente 15 años de evolución de la patología en humanos sin tratamiento de insulina).
- La diabetes mellitus produce arritmias supraventriculares, como bloqueo auriculoventricular tipo 1, lo que aumenta el riesgo de fibrilación auricular.

12. Bibliografía.

- ADA, A. D. A. (2018). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care*, 41(Suppl 1), S13-S27. doi: 10.2337/dc18-S002
- Aidley, D. J. (1989). *The physiology of excitable cells* (3rd ed.). Cambridge [England] ; New York: Cambridge University Press.
- Alberti, K. G. M. M., Zimmet, P. Z., & Consultation, W. (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus - Provisional report of a WHO consultation. *Diabetic Medicine*, 15(7), 539-553. doi: Doi 10.1002/(Sici)1096-9136(199807)15:7<539::Aid-Dia668>3.0.Co;2-S
- Antzelevitch, C., Shimizu, W., Yan, G. X., & Sicouri, S. (1998). Cellular basis for QT dispersion. *J Electrocardiol*, 30 Suppl, 168-175.
- Arroyo-Carmona, R. E. (2016). *Estudio de la remodelación de la actividad eléctrica del nodo senoauricular inducida por la Diabetes mellitus tipo 1 experimental en ratón*. Doctorado, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México.
- Arroyo-Carmona, R. E., Lopez-Serrano, A. L., Albarado-Ibanez, A., Mendoza-Lucero, F. M. F., Medel-Cajica, D., Lopez-Mayorga, R. M., & Torres-Jacome, J. (2016). Heart Rate Variability as Early Biomarker for the Evaluation of Diabetes Mellitus Progress. *Journal of Diabetes Research*.
- Assoc, A. D. (2014). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 37, S81-S90. doi: 10.2337/dc14-S081
- Blaustein, M. P., Kao, J. P. Y., & Matteson, D. R. (2012). *Cellular physiology and neurophysiology* (2nd ed.). Edinburgh: Mosby.
- Bleeker, W. K., Mackaay, A. J., Masson-Pevet, M., Bouman, L. N., & Becker, A. E. (1980). Functional and morphological organization of the rabbit sinus node. *Circ Res*, 46(1), 11-22.
- Boron, W. F., & Boulpaep, E. L. (2012). *Medical physiology : a cellular and molecular approach* (Updated 2nd. ed.). Philadelphia, Pa.: Saunders Elsevier.
- Boyett, M. R., Dobrzynski, H., Lancaster, M. K., Jones, S. A., Honjo, H., & Kodama, I. (2003). Sophisticated architecture is required for the sinoatrial node to perform its normal pacemaker function. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 14(1), 104-106.
- Boyett, M. R., Honjo, H., & Kodama, I. (2000). The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovasc Res*, 47(4), 658-687. doi: S0008-6363(00)00135-8 [pii]

- Carnethon, M. R., Yan, L., Greenland, P., Garside, D. B., Dyer, A. R., Metzger, B., & Daviglius, M. L. (2008). Resting heart rate in middle age and diabetes development in older age. *Diabetes Care*, *31*(2), 335-339. doi: 10.2337/dc07-0874
- Carvalho, A. P. d., & Almeida, D. F. d. (1960). Spread of activity through the atrioventricular node. *Circ Res*, *8*, 801-809.
- Cole, K. S., & Curtis, H. J. (1939). Electric Impedance of the Squid Giant Axon during Activity. *J Gen Physiol*, *22*(5), 649-670.
- Cheng, S., Keyes, M. J., Larson, M. G., McCabe, E. L., Newton-Cheh, C., Levy, D., . . . Wang, T. J. (2009). Long-term outcomes in individuals with prolonged PR interval or first-degree atrioventricular block. *JAMA*, *301*(24), 2571-2577. doi: 10.1001/jama.2009.888
- Cho, N. H., Shaw, J. E., Karuranga, S., Huang, Y., da Rocha Fernandes, J. D., Ohlrogge, A. W., & Malanda, B. (2018). IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract*, *138*, 271-281. doi: S0168-8227(18)30203-1 [pii]
- Dutta, S., & Sengupta, P. (2016). Men and mice: Relating their ages. *Life Sci*, *152*, 244-248. doi: 10.1016/j.lfs.2015.10.025
- Ewing, D. J., Campbell, I. W., & Clarke, B. F. (1981). Heart rate changes in diabetes mellitus. *Lancet*, *1*(8213), 183-186.
- Fozzard, H. A. (1977). Cardiac muscle: excitability and passive electrical properties. *Prog Cardiovasc Dis*, *19*(5), 343-359. doi: 0033-0620(77)90015-9 [pii]
- Fozzard, H. A. (1991). *The Heart and cardiovascular system : scientific foundations* (2nd ed.). New York: Raven Press.
- Furman, B. L. (2015). Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr Protoc Pharmacol*, *70*, 5 47 41-20. doi: 10.1002/0471141755.ph0547s70
- Golovko, V., Gonotkov, M., & Lebedeva, E. (2015). Effects of 4-aminopyridine on action potentials generation in mouse sinoauricular node strips. *Physiol Rep*, *3*(7). doi: 10.14814/phy2.12447
- Grant, A. O. (2009). Cardiac ion channels. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, *2*(2), 185-194. doi: 10.1161/CIRCEP.108.789081
- Harrison, T. R., Kasper, D. L., Fauci, A. S., Hauser, S. L., Longo, D. L., Jameson, J. L., & Loscalzo, J. (2015). *Harrison's principles of internal medicine* (19th edition. ed.). New York: McGraw Hill Education.
- Hernandez-Garcia, V. (1981). *Reactivación e Inactivación de las células del nodo A-V del corazón de mamífero*. Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México.

- Hodgkin, A. L., & Huxley, A. F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol*, 117(4), 500-544.
- Hodgkin, A. L., & Rushton, W. A. (1946). The electrical constants of a crustacean nerve fibre. *Proc R Soc Med*, 134(873), 444-479.
- Hoffman, B. F., De Carvalho, A. P., Mello, W. C., & Cranefield, P. F. (1959). Electrical activity of single fibers of the atrioventricular node. *Circ Res*, 7(1), 11-18.
- Howarth, F. C., Jacobson, M., Naseer, O., & Adeghate, E. (2005). Short-term effects of streptozotocin-induced diabetes on the electrocardiogram, physical activity and body temperature in rats. *Exp Physiol*, 90(2), 237-245. doi: expphysiol.2004.029439 [pii]
- Howarth, F. C., Jacobson, M., Shafiullah, M., & Adeghate, E. (2005). Long-term effects of streptozotocin-induced diabetes on the electrocardiogram, physical activity and body temperature in rats. *Exp Physiol*, 90(6), 827-835. doi: expphysiol.2005.031252 [pii]
- Hurst, J. W., Fuster, V., Walsh, R. A., & Harrington, R. A. (2011). *Hurst's the heart* (13th ed.). New York: McGraw-Hill Medical.
- International Diabetes Federation. (2017). *Diabetes atlas* (8th ed.): IDF.
- Johnston, D., & Wu, S. M.-s. (1995). *Foundations of cellular neurophysiology*. Cambridge, Mass.: MIT Press.
- Kannel, W. B., & McGee, D. L. (1979). Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *JAMA*, 241(19), 2035-2038.
- Kittnar, O. (2015). Electrocardiographic changes in diabetes mellitus. *Physiol Res*, 64 Suppl 5, S559-566. doi: 933230 [pii]
- Kodama, I., & Boyett, M. R. (1985). Regional differences in the electrical activity of the rabbit sinus node. *Pflugers Arch*, 404(3), 214-226.
- Kusumoto, F., & Bernath, P. (2012). *ECG interpretation for everyone : an on-the-spot guide*. Oxford: Wiley-Blackwell.
- Lenzen, S. (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51(2), 216-226. doi: 10.1007/s00125-007-0886-7
- Levine, H. J. (1997). Rest heart rate and life expectancy. *J Am Coll Cardiol*, 30(4), 1104-1106.
- Lin, H., Ogawa, K., Imanaga, I., & Tribulova, N. (2006). Remodeling of connexin 43 in the diabetic rat heart. *Mol Cell Biochem*, 290(1-2), 69-78. doi: 10.1007/s11010-006-9166-y

- Liu, J., Dobrzynski, H., Yanni, J., Boyett, M. R., & Lei, M. (2007). Organisation of the mouse sinoatrial node: structure and expression of HCN channels. *Cardiovasc Res*, 73(4), 729-738. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.11.016
- Malpas, S. C., & Maling, T. J. (1990). Heart-rate variability and cardiac autonomic function in diabetes. *Diabetes*, 39(10), 1177-1181.
- Marger, L., Mesirca, P., Alig, J., Torrente, A., Dubel, S., Engeland, B., . . . Mangoni, M. E. (2011). Pacemaker activity and ionic currents in mouse atrioventricular node cells. *Channels (Austin)*, 5(3), 241-250. doi: 15264 [pii]
- Martinez-Ladron de Guevara, E., Perez-Hernandez, N., Villalobos-Lopez, M. A., Perez-Ishiwara, D. G., Salas-Benito, J. S., Martinez Martinez, A., & Hernandez-Garcia, V. (2016). The Actions of Lyophilized Apple Peel on the Electrical Activity and Organization of the Ventricular Syncytium of the Hearts of Diabetic Rats. *J Diabetes Res*, 2016, 8178936. doi: 10.1155/2016/8178936
- Medel-Cajica, D. (2015). *Remodelación eléctrica del nodo senoauricular ocasionada por la diabetes mellitus*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla Puebla.
- Mendez, C., & Hernandez, V. (2001). Inverse relation between input resistance and threshold current in canine cardiac syncytium. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 12(3), 337-342. doi: DOI 10.1046/j.1540-8167.2001.00337.x
- Mokdad, A. H., Ford, E. S., Bowman, B. A., Dietz, W. H., Vinicor, F., Bales, V. S., & Marks, J. S. (2003). Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *Jama-Journal of the American Medical Association*, 289(1), 76-79. doi: DOI 10.1001/jama.289.1.76
- Nerbonne, J. M., & Kass, R. S. (2005). Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev*, 85(4), 1205-1253. doi: 85/4/1205 [pii]
- Nobe, S., Aomine, M., Arita, M., Ito, S., & Takaki, R. (1990). Chronic diabetes mellitus prolongs action potential duration of rat ventricular muscles: circumstantial evidence for impaired Ca²⁺ channel. *Cardiovasc Res*, 24(5), 381-389.
- Resnick, H. E., & Howard, B. V. (2002). Diabetes and cardiovascular disease. *Annu Rev Med*, 53, 245-267. doi: 10.1146/annurev.med.53.082901.103904
- Saffitz, J. E., Green, K. G., & Schuessler, R. B. (1997). Structural determinants of slow conduction in the canine sinus node. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 8(7), 738-744.
- Shimoni, Y., Firek, L., Severson, D., & Giles, W. (1994). Short-term diabetes alters K⁺ currents in rat ventricular myocytes. *Circ Res*, 74(4), 620-628.

- Sonne, D. P., & Hemmingsen, B. (2017). Standards of Medical Care in Diabetes-2017. *Diabetes Care* 2017;40(Suppl. 1):S1-S135. *Diabetes Care*, 40(7), E92-E93.
- Stein, R. B. (1980). *Nerve and muscle : membranes, cells, and systems*. New York: Plenum Press.
- Torres-Jacome, J., Gallego, M., Rodriguez-Robledo, J. M., Sanchez-Chapula, J. A., & Casis, O. (2013). Improvement of the metabolic status recovers cardiac potassium channel synthesis in experimental diabetes. *Acta Physiol (Oxf)*, 207(3), 447-459. doi: 10.1111/apha.12043
- Verheijck, E. E., van Kempen, M. J., Veereschild, M., Lurvink, J., Jongasma, H. J., & Bouman, L. N. (2001). Electrophysiological features of the mouse sinoatrial node in relation to connexin distribution. *Cardiovasc Res*, 52(1), 40-50. doi: S0008636301003649 [pii]
- Weidmann, S. (1955). The effect of the cardiac membrane potential on the rapid availability of the sodium-carrying system. *J Physiol*, 127(1), 213-224.
- Yan, G. X., & Antzelevitch, C. (1998). Cellular basis for the normal T wave and the electrocardiographic manifestations of the long-QT syndrome. *Circulation*, 98(18), 1928-1936.
- Yanni, J., Tellez, J. O., Sutyagin, P. V., Boyett, M. R., & Dobrzynski, H. (2010). Structural remodelling of the sinoatrial node in obese old rats. *J Mol Cell Cardiol*, 48(4), 653-662. doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.08.023