



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**  
FACULTAD DE MEDICINA  
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE  
POSGRADOS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS E INVESTIGACIÓN

**TESIS**

**“Efecto de la diabetes mellitus tipo 2 sobre  
las propiedades eléctricas del corazón”**

Que para obtener el grado de  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS E INVESTIGACIÓN**

Presenta

**José Alonso Romero**

Director de Tesis

D.C. Roberto Berra Romani

Director de Tesis Externo

D.C. Alondra Albarado Ibáñez

Puebla, Pue.

Diciembre, 2019

Directores de Tesis



---

D.C Roberto Berra Romani  
Director de Tesis



---


D.C Alondra Albarado Ibañez  
Codirector de Tesis



---

COORDINACIÓN DE MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS E  
INVESTIGACIÓN

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORIAL



---

D.C. BLANCA GUADALUPE BAEZ DUARTE



---

D.C JULIAN TORRES JACOME

.....



---

D.C MARIO GARCIA CARRASCO

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)  
por el apoyo brindado con la Beca No. 473856 para realizar el  
proyecto titulado “Efecto de la diabetes mellitus tipo 2 sobre las  
propiedades eléctricas del corazón”

## **Agradezco**

A CONACYT y a la Maestría en Ciencias Médicas e Investigación

A mis padres, hermanos y abuela Guadalupe Alonso Jiménez, Virginia Romero Yahuitl Verónica Alonso Romero, Adrián Alonso Romero e Isabel Yahuitl Romero por todo el apoyo incondicional, paciencia y amor brindado.

A mis directores de tesis el Dr. Roberto Berra Romani, Dra. Alondra Albarado Ibañez y al Dr. Julián Torres Jácome por la paciencia y enseñanzas dadas durante esos dos años de la Maestría.

A Daniela Alexandra Bernabé Sánchez, Marissa Limón Cantú, Rommel Sánchez Hernández, Benjamín López Silva, Giovanni Ramos Ortiz, Sabino Ortiz Fuentes, Mauricio Martagón Domínguez quienes hicieron más divertidos los días en el laboratorio.

A Aldo Luna Leal, Ricardo Corro Hernández, Job Pérez Becerra, Adriana Paola Moreno Salgado, Nayeli Coyotl Santiago, Alejandro Benavides Carrasco y German Alfredo García Moreno, gracias por todos esos momentos agradables que pasamos.

Gracias a todos.

## Contenido

<b>1. CAPÍTULO - ANTECEDENTES</b>	<b>1</b>
1.1 Antecedentes Generales	1
1.1.1 Diabetes Mellitus	1
1.1.1.1 Clasificación	1
1.1.1.2 Signos y síntomas de la Diabetes Mellitus tipo 2	2
1.1.1.3 Prevalencia e Incidencia	2
1.1.1.4 Diagnóstico de la diabetes mellitus	3
1.1.1.5 Modelos Animales para el Estudio de la Diabetes Mellitus	4
1.1.1.5.1 Ratas Zucker Diabetic Fatty (ZDF) como Modelo de DM2	4
1.1.2 El Corazón	5
1.1.2.1 Funciones del Corazón	7
1.1.2.2 Electrofisiología de las células cardíacas	8
1.1.2.3 Potencial de acción en células ventriculares	9
1.1.2.4 Electrocardiograma	12
1.1.2.5 Intervalo QT y QTc	13
1.1.2.6 Diferencias del ECG en humanos y ratas	14
1.1.2.7 Variabilidad cardiaca como predictor de arritmias cardiacas	15
1.1.2.8 Diagramas de Poincare para el estudio de la variabilidad cardiaca	15
1.1.3 Relación entre las enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus	17
1.2 Antecedentes Específicos	20
1.2.1 Efectos de la DM sobre la corriente de K <sup>+</sup> transitoria de salida (I <sub>to</sub> ).	21
1.2.2 Efectos de la DM sobre la corriente rectificadora de salida de potasio (I <sub>k</sub> ).	21
1.2.3 Efectos de la DM sobre la corriente rectificadora entrante de potasio (I <sub>k1</sub> ).	21
1.2.4 Efectos de la DM sobre la variabilidad cardiaca	22
<b>2. CAPÍTULO – MARCO METODOLOGICO</b>	<b>23</b>
2.1 Justificación	23
2.3 Hipótesis	25
2.4 Objetivos	25

2.4.1 Objetivo General	25
2.4.2 Objetivos Específicos	25
2.5 Material y Métodos	26
2.5.1 Caracterización del modelo animal	26
2.5.2. Registro del electrocardiograma in vivo.	27
2.5.3 Medición de la Frecuencia Cardiaca	27
2.5.4 Medición del Intervalo RT	27
2.5.5 Variabilidad de la frecuencia cardiaca	28
2.5.6 Disociación de Miocitos	29
2.5.7 Medición del Potencial de Acción y Protocolos Experimentales de Corrientes	30
2.5.7.1 Medición del Potencial de Acción	30
2.5.7.2 Medición de la corriente $I_{to}$	31
2.5.7.3 Medición de la corriente $I_K$	32
2.5.7.4 Medición de la corriente $I_{K1}$	33
2.5.8 Análisis de Resultados	33
<b>3. CAPÍTULO - RESULTADOS</b>	<b>34</b>
3.1 Parámetros morfométricos y metabólicos	34
3.2 Efecto de la diabetes mellitus tipo 2 sobre la frecuencia cardiaca en las cepas de rata Zucker Diabetic Fatty y Long Evans.	36
3.3 Efecto de la diabetes mellitus tipo 2 sobre el intervalo RT y RTc en las cepas de rata Zucker Diabetic Fatty y Long Evans.	37
3.4 Efecto de la diabetes mellitus tipo 2 sobre la variabilidad cardiaca en las cepas de rata Zucker Diabetic Fatty y Long Evans.	37
3.5 Efecto de la diabetes mellitus sobre la morfología del potencial de acción y corrientes de potasio $I_{to}$ , $I_K$ e $I_{K1}$ en las cepas de ratas Zucker Diabetic Fatty y Long Evans	39
3.3.1 Epicardio	40
3.3.2 Pared libre de ventrículo izquierdo	42
3.3.3 Pared libre de ventrículo derecho	44
3.3.4 Septum	46
3.3.5 Papilar izquierdo	48
3.3.6 Papilar derecho	50
<b>Discusión</b>	<b>52</b>

<b>Conclusiones</b>	58
Perspectiva	59
<b>4. Referencias</b>	60
<b>5. Anexos</b>	71
5.1 Diseño del Estudio	71
5.2 Ubicación Espacio-Temporal	71
5.3 Estrategia de Trabajo	72
5.4 Definición de las Variables y Escalas de Medición	73
5.5 Diseño y Tipo de Muestreo	74
5.6 Tamaño de la Muestra	74
5.7 Logística	74
5.7.1 Recursos Humanos	74
5.7.2 Recursos Materiales	74
5.7.3 Recursos Financieros	74
5.8 Cronograma: Grafica de GANTT	75
5.9 Bioética	76
5.10 Soluciones	77
5.10.1 Soluciones para dispersión	77
5.10. 2 Soluciones de mantenimiento	77
5.10. 3 Soluciones de registro	77
<b>Abreviaturas</b>	78

## Resumen

La diabetes mellitus es un grupo de enfermedades crónico-degenerativas caracterizadas por niveles altos de glucosa en sangre y constituye la sexta causa de muerte en el mundo y la segunda causa de muerte en nuestro país. La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) da cuenta del 90-95% de todos los casos de diabetes reportados. Los pacientes con DM tienen de 3-4 veces mayor probabilidad de padecer complicaciones cardiovasculares, incluyendo arritmias cardíacas, prolongación del intervalo QT y muerte cardíaca súbita. A la fecha se desconocen los mecanismos moleculares precisos por los cuales la DM genera estas alteraciones a nivel cardíaco y los estudios sobre los efectos de la DM2 (la más común en el humano) sobre la actividad eléctrica del corazón son limitados. El objetivo del presente trabajo fue el de determinar el efecto de la diabetes mellitus tipo 2 sobre las propiedades eléctricas activas del corazón. Se emplearon ratas macho de aproximadamente 12 semanas de edad de la cepa Zucker Diabetic Fatty y de la cepa Long Evans. Se empleó la técnica del electrocardiograma para evaluar la frecuencia cardíaca, la duración del intervalo R-T, RTc y la variabilidad de la frecuencia cardíaca. En miocitos cardíacos obtenidos de diferentes regiones del corazón, se utilizó la técnica de fijación de voltaje en la modalidad de célula completa para la medición del potencial de acción y de las corrientes de  $K^+$ :  $I_{K1}$ ,  $I_{to}$  e  $I_K$ . Los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran que la DM2 causa una reducción de la variabilidad de la frecuencia cardíaca, reduce la duración del potencial de acción en el tejido epicárdico, y disminuye la densidad de la corriente  $I_K$  en células del septum intraventricular y pared libre del ventrículo derecho. En conclusión, la DM2 causa alteraciones en las propiedades eléctricas activas del corazón de rata.

# 1. CAPÍTULO - ANTECEDENTES

## 1.1 Antecedentes Generales

### 1.1.1 Diabetes Mellitus

La diabetes mellitus (DM) es un grupo de enfermedades crónico degenerativas caracterizadas por niveles altos de glucosa en sangre, debido a la nula o insuficiente producción de insulina por las células  $\beta$  del páncreas o por una inadecuada respuesta de las células del organismo a la insulina (2).

#### 1.1.1.1 Clasificación

Según la Asociación Americana de la diabetes (ADA) (3), la DM puede ser clasificada en las siguientes categorías generales:

1. Diabetes mellitus tipo 1 (DM1), en la cual los pacientes presentan incapacidad para producir insulina, por destrucción autoinmune de las células  $\beta$  del páncreas.
2. Diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Los pacientes con DM2, se caracterizan por la ineficiencia del empleo de insulina a nivel celular, esto hace que el cuerpo responda produciendo una gran cantidad de insulina, para compensar su ineficiencia al usarla; sin embargo, esto puede posteriormente originar la disminución de la función secretora de las células  $\beta$ .
3. La diabetes mellitus gestacional. Este tipo de DM, se diagnostica en el segundo trimestre de embarazo, es un estado en el que las mujeres presentan defectos en la secreción de insulina, debido a la demanda metabólica de su embarazo, por lo que presentan intolerancia a la glucosa, lo que significa que los niveles de glucosa en sangre se encuentran por encima de lo normal.
4. Otros tipos específicos de diabetes debidos a otras causas. Por ejemplo: síndrome de diabetes monogénica (diabetes neonatal), enfermedades del páncreas exocrino como; fibrosis quística, pancreatitis y diabetes inducida por exposición a drogas y químicos como los glucocorticoides.

En la población mundial la DM2 es padecida por el 90-95 % de las personas diabéticas (3,4).

#### *1.1.1.2 Signos y síntomas de la Diabetes Mellitus tipo 2*

La DM2 provoca un cuadro sintomatológico que puede servir como indicador para su diagnóstico: la poliuria, necesidad de ir al baño continuamente, polidipsia, necesidad descontrolada de beber agua y polifagia, necesidad descontrolada de ingerir alimentos. Además de infecciones frecuentes, visión borrosa, heridas o moretones que tardan en sanar, hormigueo o entumecimiento de las extremidades inferiores o superiores e infección recurrente de piel, encías o vejiga (3).

#### *1.1.1.3 Prevalencia e Incidencia*

En el año 1980, la Organización Mundial de la Salud (OMS) informó que había 108 millones de adultos con diabetes. En 2014 la cifra fue de 422 millones de adultos, por lo que la prevalencia mundial de la diabetes casi se ha duplicado desde ese año, ha pasado del 4.7 % al 8.5 % en la población adulta (5).

México ocupa el sexto lugar mundial de personas con DM, en la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2016 (6). El Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) informó que había 6.9 millones de mexicanos diagnosticados con diabetes. Actualmente contamos con los datos de la ENSANUT de medio camino 2016, al hacer la comparación entre la versión 2012 y la "versión de medio camino 2016", se puede observar que la población adulta con diagnóstico previo fue de 9.2 % en el año 2012 y 9.4 % en el año 2016. De la población diagnosticada y evaluada clínicamente se encontró que el 49.8 % está en riesgo de presentar complicaciones propias de la DM, además el 47 % tiene diagnóstico de hipertensión arterial (6,7).

Para el año 2014 la Federación Mexicana de Diabetes determinó que existen 4 millones de personas con este padecimiento en nuestro país. Los estados de mayor prevalencia son: la Ciudad de México, Nuevo León, Veracruz, Tamaulipas, Durango y San Luis Potosí. Esto representó un gasto importante de 3,430 millones de dólares (68,600,000 millones de pesos) al año en su atención y en el manejo de las complicaciones (8). En México la incidencia de DM aumenta con la edad, la cual varía de 3.2% en la población de edad de 20-29 años a 32.75% en personas con un

rango de edad entre 60-69 años y disminuye a 26.21% en la población por arriba de 70 años de edad (9).

Las complicaciones en pacientes con diagnóstico fueron: visión disminuida 54.5%, daño en retina 11.19%, pérdida de la vista 9.9%, úlceras 9.14% y amputaciones 5.5%, casi tres veces más a lo reportado en 2012. Con respecto a los factores de riesgo asociados a la DM, la encuesta informa que los adultos de 50 a 79 años de edad, fueron el grupo mayormente diagnosticado con hipercolesterolemia, de los cuales el 44.5 % se midió los niveles de colesterol en sangre y también de esta población el 28 % tuvo un diagnóstico médico previo de hipercolesterolemia (6).

#### *1.1.1.4 Diagnóstico de la diabetes mellitus*

Diversos estudios han demostrado que el detectar oportunamente y tratar los síntomas de la DM puede disminuir las complicaciones provocadas por esta afección según los estándares de atención médica en diabetes publicados por la Asociación Americana de la Diabetes(3).

En la revista de "Estándares de atención médica en diabetes 2019" de la ADA, se establecen cuatro pruebas para el diagnóstico de la DM:

- Prueba de glucosa plasmática con al menos 8 h de ayuno, con valores mayores o iguales a 126 mg/dL.
- Prueba de tolerancia a la glucosa midiendo los niveles de glucosa plasmática a las 2 h posteriores a la administración oral de 75g de glucosa, con un valor mayor o igual a 200mg/dL.
- Determinación bioquímica de la fracción A1C o hemoglobina glucosilada, la cual mide la concentración de la glucosa plasmática de los últimos 3 meses, siendo el valor mayor o igual a 6.5 %.
- Prueba aleatoria de la glucosa plasmática  $\geq 200$  mg/dl. Esta prueba se aplica a pacientes con síntomas clásicos de hiperglucemia o crisis hiperglucémica.

En la actualización del año 2019 de los estándares de atención médica en de la ADA, se modificó el criterio para confirmar el diagnóstico de la diabetes. Ahora, al

menos que haya un claro diagnóstico clínico de diabetes (paciente en crisis hiperglucémica o con síntomas clásicos de hiperglucemia y una glucosa plasmática aleatoria  $\geq 200$  mg/dl), además se requiere que en la misma muestra de laboratorio, resulten alterados al menos dos de los criterios diagnóstico antes mencionados, (por ejemplo, glucosa plasmática en ayuno y hemoglobina glucosilada) o que uno de los criterios resulte alterados en dos muestras diferentes tomadas en corto tiempo (3). En la DM2, generalmente se encuentran niveles elevados de triglicéridos (TGC) y colesterol LDL (Lipoproteína de baja densidad) en sangre, a su vez los niveles de colesterol HDL (Lipoproteína de alta densidad) se ven disminuidos (10).

#### *1.1.1.5 Modelos Animales para el Estudio de la Diabetes Mellitus*

Los diferentes modelos experimentales de DM comprenden distintas especies animales que dependiendo de la metodología usada para la inducción de la diabetes se pueden clasificar en cuatro grandes grupos: los modelos que utilizan agentes químicos para la inducción de la diabetes (diabetes química); los modelos en los que se induce la diabetes mediante procedimientos quirúrgicos (diabetes quirúrgica); aquellos en los que la diabetes se induce por infecciones víricas (diabetes vírica) y por último los modelos de diabetes espontánea (11).

##### *1.1.1.5.1 Ratas Zucker Diabetic Fatty (ZDF) como Modelo de DM2*

La rata Zucker Diabetic Fatty es un modelo animal de DM espontánea, que presenta las características de la DM2 en humanos. Este modelo presenta dos fenotipos uno obeso, obese zucker diabetic fatty (OZDF) y uno delgado, lean zucker diabetic fatty (LZDF) (12). La rata ZDF, es un modelo animal que a través de mutaciones genéticas espontáneas y una dieta alta en contenido calórico (Purina 5008), se aproxima a la DM2 en humanos (13).

Cuando se alimentan con la dieta Purina 5008 (una dieta rica en grasa que contiene alta energía, de LabDiet, Richmond, USA) los machos recesivos homocigotos (fa/fa) desarrollan obesidad, hiperlipidemia e hiperglucemia en ayuno, además los machos presentan un mayor decremento de la insulina en páncreas que sus contrapartes delgadas (12,13). La hiperglucemia se manifiesta inicialmente alrededor de las 7 semanas de edad, y todas las ratas machos alimentadas con la

Purina 5008, presentan una severa hiperglucemia y son totalmente diabéticas a partir de la semana 12 (14). La rata ZDF es un modelo adecuado para el estudio de la DM2 debido a su déficit en la tolerancia a la glucosa causada por la mutación del gen el cual lleva a la resistencia a la insulina. La mutación resulta en un acortamiento del receptor de leptina provocando que no pueda interactuar de manera adecuada con la leptina (15–17). Esta mutación es expresada fenotípicamente con obesidad y altos niveles de leptina en sangre. Las características de la cepa son: manchas negras y blancas en la espalda, también presentan un numeroso cuadro de alteraciones fisiológicas como: deficiencias en la cicatrización de heridas, DM2, hiperglucemia, neuropatía, nefropatía, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, hipertensión, incremento de la reactividad plaquetaria, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia (18).

En un estudio publicado por Marsh y Cols., (19) se reportó que el fenotipo delgado de la cepa ZDF presenta alteraciones en cuanto a su función renal, así como algunos cambios en su función cardíaca, esto representa un problema, ya que el fenotipo delgado es el control del fenotipo obeso, si la rata control presenta alteraciones en cuanto a su función cardíaca, no podremos diferenciar si los cambios observados o no, en el fenotipo obeso se deben a la DM2 o son efecto de alteraciones propias de la cepa ZDF. Es por este motivo que nos fue necesario implementar el uso adicional de otro modelo de rata como control sano. La cepa que utilizamos para esta tarea es la cepa de rata Long Evans que es un modelo de rata sana utilizado en diversas investigaciones.

### 1.1.2 El Corazón

El corazón humano es un órgano muscular del tamaño aproximado de un puño. Se localiza en el centro de la cavidad torácica y está encerrado en un saco membranoso denominado pericardio. Macroscópicamente la mayor parte del corazón corresponde a las paredes musculares gruesas de los ventrículos (las dos cavidades inferiores), **Figura 1**. Las aurículas de paredes más delgadas se ubican por encima de los ventrículos (20).

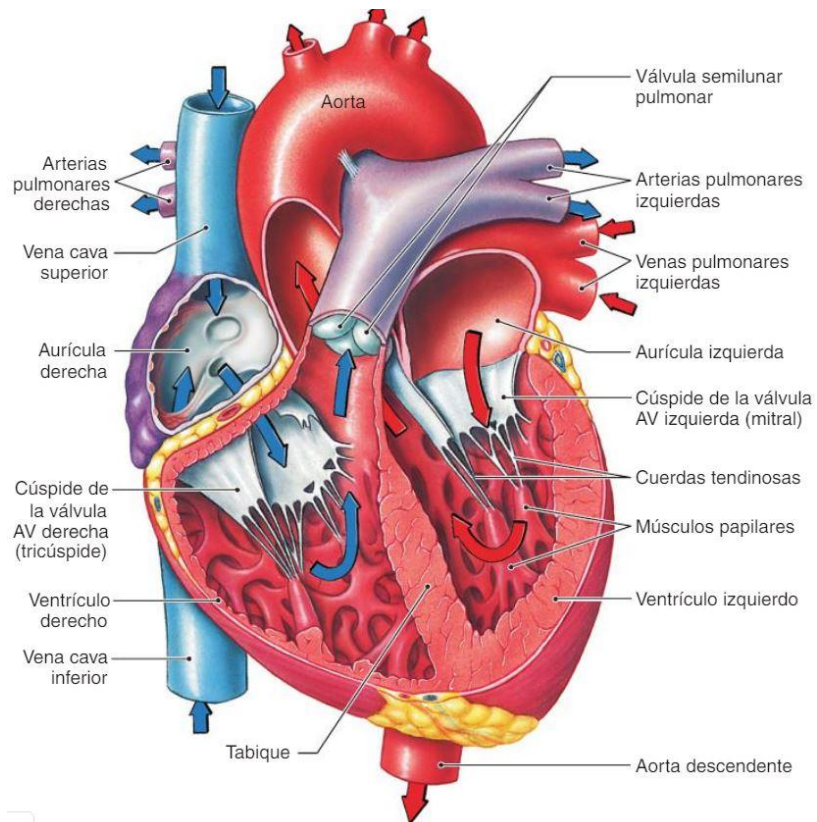


Figura 1. Anatomía cardíaca. El corazón está formado por un par de aurículas y ventrículos que se encargan de bombear sangre al organismo (Ilustración tomada de Fisiología Humana, Silverthorn 4ª edición, 2012).

Ambos ventrículos se encuentran separados por un tabique interventricular denominado septum de manera que la sangre de un lado no se mezcla con la sangre del otro lado. Ambos lados del corazón se contraen en forma coordinada. Primero, se contraen juntas las aurículas y, después, se contraen juntos los ventrículos (20). Dos conjuntos de válvulas cardíacas garantizan el flujo unidireccional de la sangre: las válvulas auriculoventriculares (AV) (tricúspide o AV derecha y la mitral o AV izquierda); y el segundo conjunto, las válvulas semilunares, entre los ventrículos y las arterias (válvula semilunar pulmonar y válvula semilunar aórtica). Las válvulas AV están formadas por valvas o colgajos tisulares delgados en la fase de un anillo de tejido conectivo. Los colgajos están ligeramente engrosados en el borde y se conectan del lado ventricular con tendones colágenos, denominados como cuerdas tendinosas. La mayoría de las cuerdas están fijadas en extensiones del músculo ventricular conocidas como músculos papilares. La función de los músculos

papilares es la de contraerse para evitar el prolapso de las válvulas AV cuando la presión intraventricular aumenta por arriba de la presión en las aurículas (21).

En la **Figura 1**, se muestran los principales vasos sanguíneos que emergen de la base del corazón. La aorta y el tronco pulmonar (arterias) dirigen la sangre del corazón a los tejidos y los pulmones, respectivamente. Las venas cavas (superior e inferior) y las venas pulmonares que devuelven la sangre al corazón (22).

A nivel tisular el corazón está constituido por tres capas de tejido:

- 1.- El epicardio; compuesto por una capa delgada de músculo y tejido conectivo.
- 2.- El miocardio; capa conformada principalmente por músculo
- 3.- El endocardio; el cual se compone por una capa delgada de músculo y por tejido conectivo que recubre la pared interna del corazón (23).

A pesar de que estas tres capas de tejido están constituidas principalmente por músculo cardíaco o miocardio, las propiedades electrofisiológicas y farmacológicas de éstas células difieren marcadamente de acuerdo a su localización anatómica (24)

#### 1.1.2.1 Funciones del Corazón

El corazón funciona como una bomba, generando la presión necesaria para llevar sangre a todas y cada una de las células del organismo, contribuyendo con:

- El mantenimiento de las necesidades metabólicas del cuerpo, en cualquier circunstancia (aportando O<sub>2</sub> y nutrientes; y removiendo CO<sub>2</sub> y otros desechos metabólicos).
- El mantenimiento de una adecuada presión sanguínea para que se lleve a cabo la filtración renal y la irrigación de órganos vitales (cerebro y corazón)
- La distribución de células del sistema inmune y hormonas a los tejidos apropiados
- La regulación de la temperatura corporal.

La función de bomba del corazón depende de la propiedad que tienen los miocitos cardiacos para contraerse en respuesta a una actividad eléctrica normalmente originada en un grupo de células miocárdicas especializadas conocidas como células autorríticas. Las células autorríticas también se denominan marcapasos, porque regulan la frecuencia del latido cardíaco (22).

#### *1.1.2.2 Electrofisiología de las células cardíacas*

La estructura principal encargada de generar la actividad eléctrica en el corazón, es un grupo de células cardiacas que conforman al nodo sinoauricular o nódulo senoauricular (SA) localizadas en la aurícula derecha (**Figura 2A y 2B1**). Estas células tienen actividad eléctrica espontánea conocida como potenciales de acción (PA). Esta señal eléctrica se genera entre 60 a 100 veces por minuto en un individuo sano en reposo. El PA generado espontáneamente en el nódulo SA será conducido de célula a célula a través del músculo de la aurícula derecha y se propagará hacia la aurícula izquierda (20,22) y hacia el nodo auriculoventricular (AV) a través de ases de conducción (vías internodales) (25) (**Figura 2A y 2B2**), donde la actividad eléctrica sufre un retraso ya que el nodo AV es un filtro pasa bajas, de allí se propaga hacia los ventrículos por el sistema denominado como haz de His, en el tabique interventricular (**Figura 2A, 2B3 y 2B4**) (21). Tras recorrer una breve distancia por el tabique, las fibras del haz AV se dividen en ramas del haz derecha e izquierda (**Figura 2A y 2B4**). Las fibras de las ramas del haz continúan su recorrido descendente hacia el vértice del corazón, donde se dividen en fibras de Purkinje más pequeñas que se extienden hacia afuera entre las células contráctiles (**Figura 2A y 2B5**), generando en estas últimas un PA y en consecuencia de éste la contracción ventricular necesaria para la función del corazón. De ésta manera la contracción de los ventrículos inicia en el apex del corazón y se continua hacia la base de éste órgano (22).

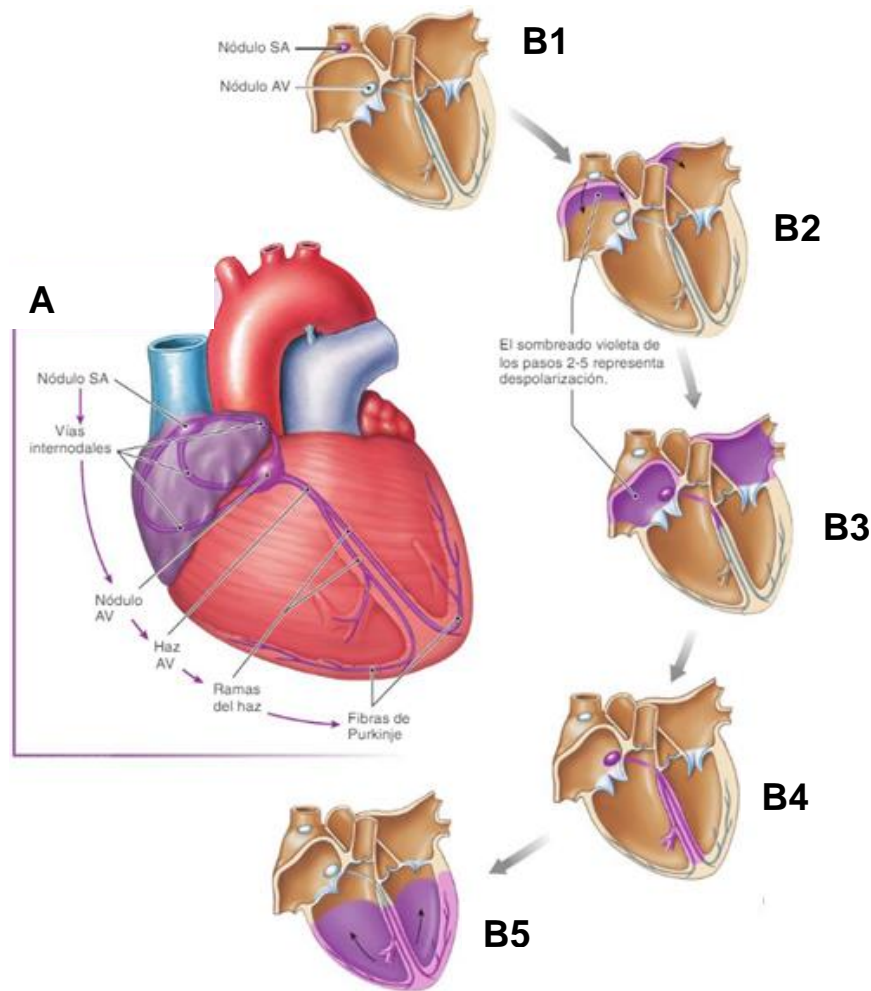


Figura 2. Sistema de conducción cardíaco. A, imagen que ilustra el sitio donde se inicia la actividad eléctrica del corazón (nodo SA) y el sistema de conducción especializado. La secuencia de imágenes B1-B5, ilustran en color obscuro las porciones del corazón que se van activando eléctricamente (ilustración obtenida y modificada de Fisiología Humana, Silverthorn 4ª edición, 2012).

### 1.1.2.3 Potencial de acción en células ventriculares

Antes de generarse un PA, la célula se encuentra en un estado de equilibrio denominado potencial de membrana (PM), el cual es definido como la diferencia de potencial a ambos lados de una membrana que separa dos soluciones con diferentes concentraciones iónicas. Las células miocárdicas contráctiles tienen un potencial de reposo estable de alrededor de -90 mV (**Figura 3, fase 4**) (26).

El PM en las células se modifica cuando ocurre un movimiento iónico (corriente iónica) entre el medio interno y externo de la célula provocando un cambio

en el potencial de equilibrio, este fenómeno es conocido como PA. Las corrientes iónicas se pueden generar gracias a un cambio en la permeabilidad de la membrana debido a la apertura de canales iónicos, los cuales permiten el flujo de iones (21).

Cuando una onda despolarizante llega a una célula contráctil con una amplitud suficiente para generar un PA, se produce la fase 0, la cual consiste en una rápida despolarización del PM, que pasa de aproximadamente -90 mV a +20 mV. Esta fase se debe a la rápida apertura (1-2 ms) de canales de  $\text{Na}^+$  regulados por voltaje, lo que permite que el  $\text{Na}^+$  ingrese a la célula y la despolarice con rapidez, generándose de este modo la corriente de  $\text{Na}^+$  ( $I_{\text{Na}}$ ). Pocos milisegundos después de la apertura de los canales de  $\text{Na}^+$  éstos se inactivan (26).

La fase 1 es una rápida repolarización, principalmente generada por una corriente saliente de potasio denominada ( $I_{\text{to}}$ ), formada por dos componentes, uno lento ( $I_{\text{tos}}$ ) y otro rápido ( $I_{\text{tof}}$ ).

La fase 2 es generada principalmente por una corriente entrante de calcio ( $I_{\text{ca}}$ ), junto al inicio de la activación de las corrientes de  $\text{K}^+$  rectificante rápida ( $I_{\text{kr}}$ ) y lenta ( $I_{\text{ks}}$ ).

La fase 3 es una repolarización lenta, dada por una parte por la inactivación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y principalmente por las corrientes  $I_{\text{kr}}$  e  $I_{\text{ks}}$  antes mencionadas. La fase 4 es el potencial de membrana en reposo, el cual esta mantenido por la corriente rectificante de  $\text{K}^+$  ( $I_{\text{k1}}$ ) (**Figura 3**).

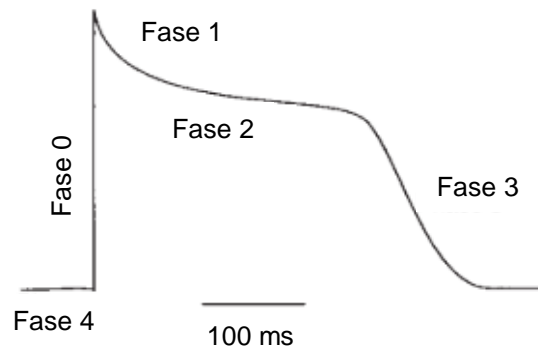


Figura 3. Morfología del potencial de acción de una célula ventricular. Para su estudio el PA se divide en 5 fases, cada una dependiente de una corriente iónica dominante (ver texto para mayores detalles) (imagen tomada y modificada de Nerbonne, 2005).

En el corazón existen diferentes tipos de PA, los PA ventriculares son diferentes a los auriculares y al mismo tiempo ambos son diferentes a los nodales o al tejido de conducción (27).

Así mismo, el miocardio ventricular está compuesto por células endocárdicas, epicárdicas y miocárdicas (células M). Estas células estructuralmente son similares, pero tienen diferentes propiedades electrofisiológicas. Las células M tienen potenciales de acción más largos que las que presentan las células localizadas en el epicardio y endocardio, como se muestra en la **Figura 4**. En condiciones normales, las diferencias fisiológicas entre estas células es minimizada por la influencia eléctrica de los miocitos bien acoplados (28).

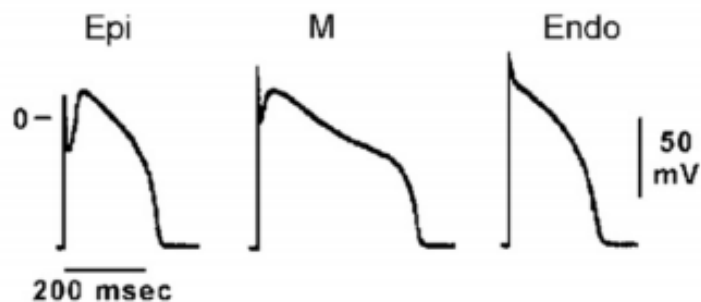


Figura 4. Heterogeneidad en la morfología de los potenciales de acción en el tejido cardiaco. El registro de la actividad eléctrica obtenido de las diferentes regiones del ventrículo es heterogénea, a la izquierda se muestra un PA de epicardio (Epi), central se muestra un PA de medio-miocardio (M) y a la derecha se muestra el PA de endocardio (Endo) (registros obtenidos y modificados de Antzelevitch y Burashnikov, 2011).

#### 1.1.2.4 *Electrocardiograma*

El electrocardiograma (ECG) es una herramienta clínica estándar utilizada para medir la actividad eléctrica del corazón y corresponde a la suma espacio-temporal de toda la actividad eléctrica durante un ciclo cardiaco (29).

En la **Figura 5** se muestra una representación de un ECG registrado en humano el cual se divide en ondas, segmentos e intervalos. Las ondas son las partes del trazado que ascienden o descienden respecto de la línea basal. Los segmentos son secciones de la línea basal entre dos ondas. Los intervalos son combinaciones de ondas y segmentos (30).

En un ECG humano se puede observar la actividad eléctrica en forma de ondas. La onda P, que corresponde a la despolarización de las aurículas. Resulta de la superposición de la despolarización de la aurícula derecha y de la aurícula izquierda. El siguiente trío de ondas, es el complejo QRS representa la onda progresiva de despolarización ventricular la onda final, la onda T, representa la repolarización de los ventrículos. La repolarización auricular no está representada por una onda especial, sino está incorporada en el complejo QRS (31).

El intervalo PR representa la despolarización de las aurículas y el retraso fisiológico que sufre el impulso en el nodo AV, el cual se mide del inicio de una onda P al inicio de la onda Q. El intervalo QRS mide el tiempo total de la despolarización ventricular y se mide del inicio de la onda Q al final de una onda S (32). El intervalo QT representa la despolarización y repolarización ventricular (33). El segmento ST es la representación de la repolarización ventricular y corresponde a la fase de repolarización lenta de los ventrículos a diferencia de los intervalos el segmento ST, corresponde a la heterogeneidad de la repolarización ventricular (34). El intervalo RR, es la distancia que hay entre la onda R contra la siguiente R, el inverso del intervalo entre estas ondas representa la frecuencia cardiaca (35).

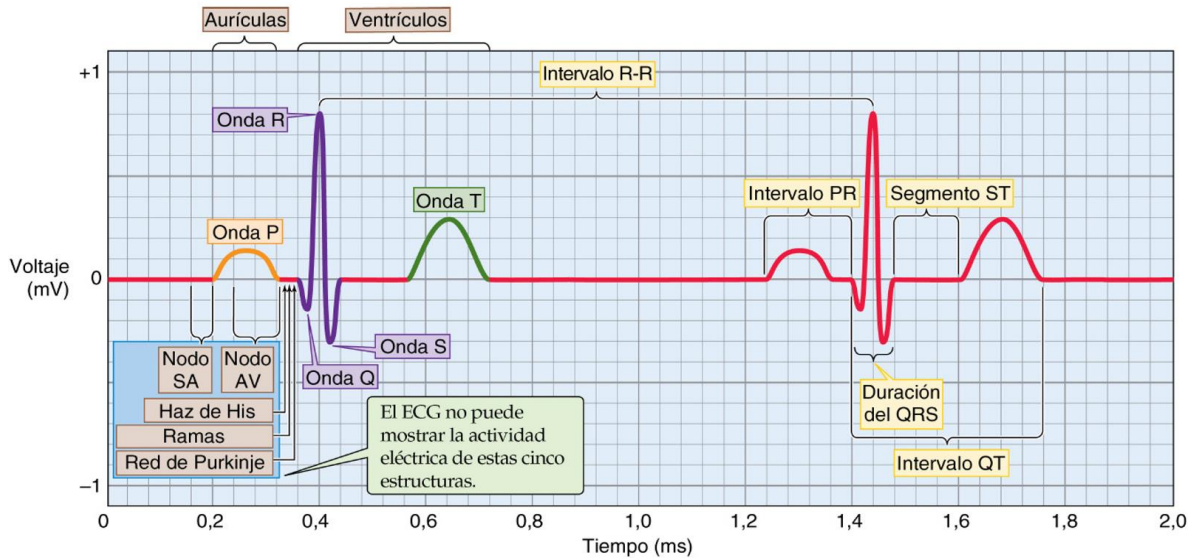


Figura 5. Electrocardiograma. El ECG es la suma espacio temporal de toda la actividad eléctrica del corazón, dividida en ondas, segmentos e intervalos (ilustración tomada de Fisiología médica Boron, Boulpaep 3ª edición, 2017).

#### 1.1.2.5 Intervalo QT y QTc

El intervalo QT representa la actividad eléctrica desde el inicio de la despolarización hasta el fin de la repolarización de los ventrículos, este intervalo puede darnos indicios de la actividad normal o anómala de la función eléctrica ventricular. Un alargamiento en el intervalo QT, se asocia a un mayor riesgo de arritmias cardiacas dado que puede causar postpotenciales precoces provocando "torsades de pointes" que pueden llevar a una fibrilación ventricular y a muerte súbita (36).

El intervalo QT está asociado a la frecuencia cardiaca, disminuye a frecuencias cardiacas rápidas y aumenta a frecuencias lentas, por ello se debe aplicar una corrección por la frecuencia en dicho intervalo. De las muchas fórmulas propuestas para describir esta relación, la más extensamente usada es la fórmula de Bazett (**ver fórmula 1**), con la que se obtiene el intervalo QT corregido (QTc) a partir de dividir el intervalo QT (QT) sobre la raíz cuadrada de la frecuencia cardiaca (RR) (32,37,38).

$$QTc = \frac{QT}{\sqrt{RR}} \quad \text{Fórmula 1.}$$

#### 1.1.2.6 Diferencias del ECG en humanos y ratas

La utilidad del ECG para evaluar la actividad eléctrica del corazón, se ha extendido al área de investigación básica. El ECG se realiza para el estudio de diferentes patologías en diversas especies animales entre ellas ratones y ratas. Sin embargo, la interpretación de los datos electrocardiográficos obtenidos en estos modelos experimentales representa un gran desafío. A diferencia del ECG humano, no se han establecido los criterios de los parámetros electrocardiográficos de referencia en ratas. Esto debido a variaciones significativas en los parámetros electrocardiográficos reportados en los diferentes estudios experimentales realizados en ratas (1,27,29,31,39). Esto último parece ser el resultado de las diferentes cepas de ratas utilizadas, diferentes entornos experimentales, como la edad, grado de estrés de los animales y el tipo de anestesia que se usa en el experimento (40).

En adición, existen diferencias en cuanto a la morfología del ECG registrado en humanos y el registrado en ratas. En la **Figura 6**, se muestra un electrocardiograma de humano (**Figura, 6A**) y uno de rata (**Figura 6B**). Las diferencias del registro electrocardiográfico entre el humano y la rata difiere en la morfología de algunas ondas como la onda Q, la cual está presente en el humano y ausente aparentemente en la rata. La onda T en el humano se presenta como una sola onda, mientras en la rata se presenta como una serie de oscilaciones. Por lo tanto, en ratas, el intervalo QT, se mide desde el inicio de la onda R hasta el final de las oscilaciones en la onda T, en el humano se cuenta con un segmento ST, mientras que en la rata no existe aparentemente. Por último dado a que el curso temporal del registro en el humano dura aproximadamente 500 ms, y el de una rata dura aproximadamente 200 ms (31), el valor de los intervalos y segmentos obtenidos en ratas difieren con los obtenidos en humanos.

A

B

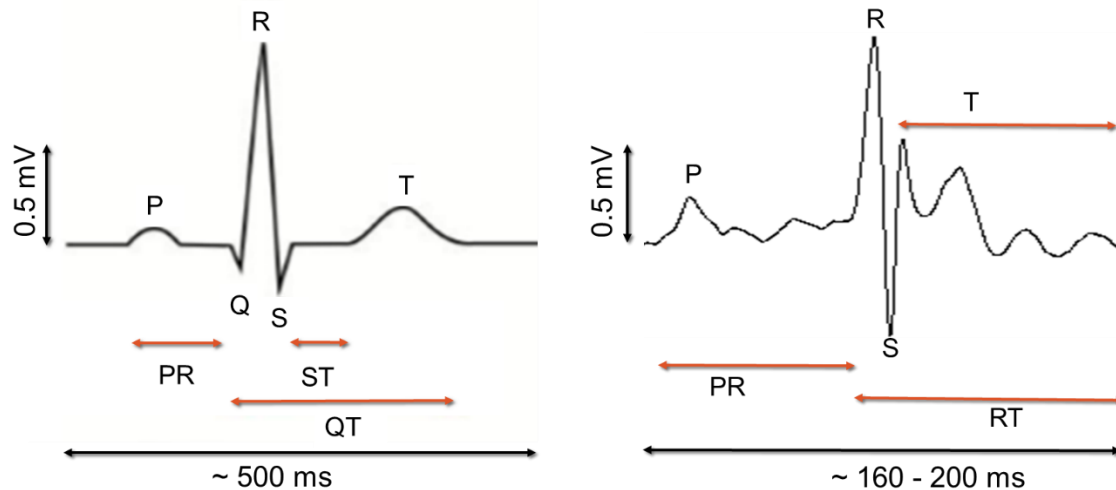


Figura 6. Comparación de la morfología de un electrocardiograma obtenido en humano y en rata. A) Representación de un electrocardiograma de humano (Tomada y modificada de Klabunde, 2005). B) Electrocardiograma de rata obtenido en nuestro laboratorio en rata Zucker Diabetic Fatty anestesiada con pentobarbital sódico durante la toma del registro. En el ECG de rata se pueden distinguir diferencias en la morfología como ausencia aparente de la onda Q, ausencia de segmento ST y oscilaciones en la onda T, así como una duración menor del registro.

#### 1.1.2.7 Variabilidad cardíaca como predictor de arritmias cardíacas

La variabilidad de la frecuencia cardíaca (VFC) es la variación en el tiempo entre latidos cardíacos consecutivos durante un periodo de tiempo y proporciona información clínica que permite evaluar y pronosticar eventos cardiovasculares antes de que éstos ocurran (37,41). Algunos estudios revelaron que una VFC disminuida se asocia con enfermedades cardíacas, principalmente arritmias ventriculares (37,42). La VFC tiene un comportamiento no lineal, una forma de evaluar la VFC es mediante el empleo de técnicas no lineales como el diagrama de Poincare (43).

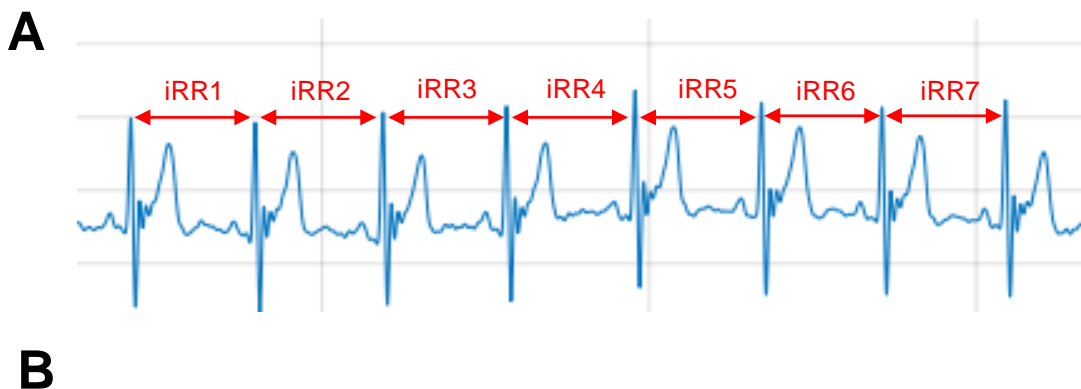
#### 1.1.2.8 Diagramas de Poincare para el estudio de la variabilidad cardíaca

El diagrama de Poincare también llamado diagrama de dispersión, es el diagrama no lineal más empleado en el análisis de la VFC. El diagrama de Poincare se construye a partir de un diagrama de dispersión de puntos, en el cual cada punto, tiene una coordenada en el eje de las abscisas correspondiente al valor de un intervalo RR en milisegundos (ms) y una coordenada en el eje de las ordenadas correspondiente al valor del siguiente intervalo RR en milisegundos (ms) (44). Como

ejemplo, en la **Figura 7A**, se muestra un electrocardiograma con 7 intervalos RR numerados como:  $iRR_1$ ,  $iRR_2$ ,  $iRR_3$  y así sucesivamente. Al construir el diagrama de Poincare, el primer punto, tendrá como coordenada en el eje "X", el valor del intervalo  $iRR_1$  y como coordenada en el eje "Y", el valor del intervalo  $iRR_2$ . El segundo punto en el diagrama de Poincare, tendrá como coordenada en el eje "X", el valor del intervalo  $iRR_2$  y como coordenada en el eje "Y", el valor del intervalo  $iRR_3$ , y así sucesivamente (41,45).

En un periodo de tiempo, se graficarán un número considerable de puntos y se obtendrá un gráfico como el mostrado en la **Figura 7B**. El diagrama de Poincare mostrado en dicha figura, corresponde al obtenido al graficar los intervalos RR de un electrocardiograma (45–48).

En humanos, la dispersión de los puntos perpendiculares del eje menor ( $D1_{i,j}$ ), representan la variabilidad cardiaca a corto plazo y es controlado predominantemente por la influencia del sistema nervioso autónomo, específicamente por la rama parasimpática (44,48). Mientras que la dispersión de los puntos a lo largo del eje mayor del diagrama ( $D2_{i,j}$ ), representa la variabilidad cardiaca a largo plazo y es dependiente principalmente del control simpático de la frecuencia cardiaca (37,44,48–50).



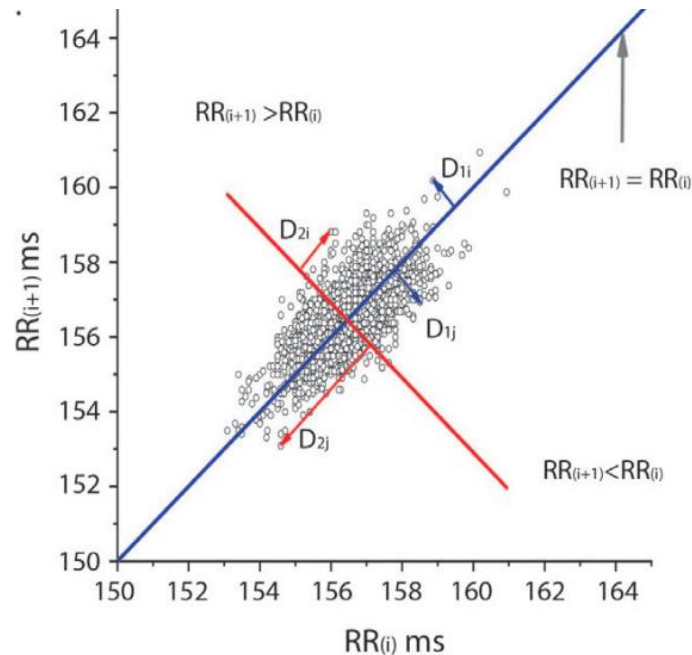


Figura 7. Descripción del diagrama de Poincaré. A) registro del electrocardiograma de humano donde se enumera una serie de intervalos R (de  $iRR_1$  al  $iRR_7$ ). B) representación gráfica del diagrama de Poincaré o gráfico de dispersión (ver texto para mayores detalles). Donde la dispersión de puntos es dividida por una línea recta de identidad, la cual dividirá en 3 el gráfico,  $RR_{(i+1)} = RR_{(i)}$  (línea azul),  $RR_{(i+1)} > RR_{(i)}$  (arriba de la línea recta de identidad) y  $RR_{(i+1)} < RR_{(i)}$  (debajo de la línea de identidad).  $D_{1i,j}$  representa la variabilidad de los puntos del diagrama corto plazo y  $D_{2i,j}$  la variabilidad de los puntos del diagrama a largo plazo (imagen superior obtenida y modificada de Aspuru 2019, imagen inferior B de Albarado y Cols., 2019).

### 1.1.3 Relación entre las enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus

En el estudio del corazón de Framingham (51), se dio a conocer por primera vez la correlación entre las enfermedades cardiovasculares (ECV) y la DM; entre los datos relevantes se determinó que la DM aumentaba un 33 % la morbimortalidad en las personas que padecían DM y ECV, que aquellas que solo padecían ECV (52).

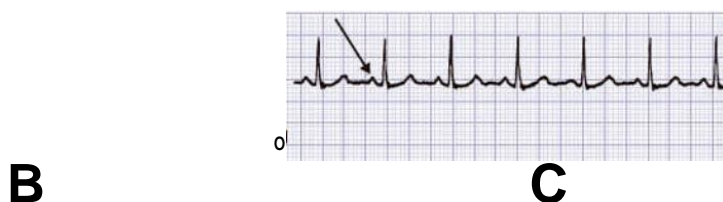
A nivel de corazón se sabe que la DM causa el desarrollo de una patología específica conocida como cardiomiopatía diabética (CMD) (53). La CMD se define como una disfunción cardíaca observada en pacientes con diabetes que ocurre en ausencia de otras enfermedades cardiovasculares, como enfermedades de las arterias coronarias, de las válvulas cardíacas, enfermedades congénitas cardíacas e hipertensión arterial o dislipidemias (54).

La prevalencia de la CMD se ha estimado en ~1.1% en la población general y de un 16.9% en la población diabética (55). La CMD se caracteriza por una compleja interacción entre alteraciones en la función mecánica y anomalías eléctricas del corazón que conllevan a la generación de arritmias cardíacas (56). En estadios avanzados se pueden observar cambios irreversibles en el miocardio, como anomalías estructurales y remodelación eléctrica cardíaca. La remodelación eléctrica en la CMD, se caracteriza por un enlentecimiento de la repolarización cardíaca, en particular de la repolarización de los ventrículos (57).

El intervalo QT se usa como un marcador del tiempo de la repolarización ventricular. Como se explicó anteriormente, el intervalo QT es una fase en el ECG; el cual se mide en milisegundos desde el inicio del complejo QRS hasta el final de la onda T, y refleja la duración total de la despolarización y repolarización de los ventrículos (58).

El síndrome de QT largo (SQTL) es un tipo de arritmia ventricular, representado como un alargamiento en el segmento QT del ECG (**Figura 8A**; ECG normal y **Figura 8B**; ECG con el intervalo QT incrementado) (34). Diversos investigadores hallaron que tanto el intervalo QT como QTc en pacientes con DM2 se encontraba alargado (59–62).

La prevalencia del SQTL en pacientes con DM2 ha sido reportada en un rango desde 19% (63), 25.8% (64) y hasta 44.1% (62). El SQTL incrementa el riesgo de desarrollar arritmias ventriculares mortales como Torsade de Pointes (TdP) (**Figura 8C**) y subsecuentemente muerte cardíaca súbita (65,66). Se ha reportado, en efecto, que los pacientes con DM tienen dos veces incrementado el riesgo de padecer muerte cardíaca súbita (67).



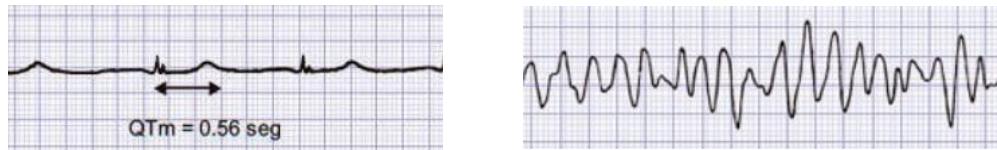


Figura 8. Síndrome de QT largo y Torsade de pointes. A, ECG normal. B, ECG con intervalo QT prolongado, mejor conocido como síndrome de QT largo. C, registro electrocardiográfico con pérdida total de la morfología del ECG normal, debido a una taquiarritmia denominada "Torsade de pointes" (figuras obtenidas de Cardiología 1ª edición, 2017).

## 1.2 Antecedentes Específicos

A pesar de que actualmente es claro que la DM causa alteraciones eléctricas en el corazón, poco se conoce acerca de los mecanismos celulares y moleculares por los cuales la DM causa estas alteraciones cardíacas. En un esfuerzo por esclarecer estos mecanismos celulares y moleculares, se han realizado diversos estudios utilizando diferentes modelos animales de DM.

Al igual que lo observado en pacientes diabéticos, diversos modelos animales de DM1 y DM2 presentaron un alargamiento en el intervalo QT y del intervalo QT corregido (QTc) del electrocardiograma. El alargamiento de estos parámetros fue reportado en ratones (37,68), ratas (69–71), conejos (72,73), y perros (1), a los cuales se les indujo DM1 administrándoles fármacos (aloxano y/o, estreptozotocina) que selectivamente destruyen a las células  $\beta$  del páncreas. El alargamiento del intervalo QT y QTc fue también reportado en modelos animales con DM2: la rata Goto–Kakizaki (74) y ratas Zucker Diabetic Fatty (75).

El alargamiento en el intervalo QT del electrocardiograma se correlacionó con un aumento en la duración del potencial de acción en células cardíacas obtenidas de ratón (76) (68), rata (77) (70) (69), conejo (72,76) y perro (1), todos éstos con DM1. Pan y Cols. en el 2018, disociaron miocitos de las aurículas del corazón de ratas Goto–Kakizaki, un modelo animal con DM2 donde también observó un alargamiento del PA (78).

Resultados preliminares de nuestro laboratorio realizados en ventrículo izquierdo de rata Zucker Diabetic Fatty, también demuestran un alargamiento de la duración del PA del endocardio del ventrículo derecho registrado con la técnica de microelectrodos convencionales (datos no publicados)

Mientras que la prolongación del PA causada por la DM es consistentemente reportada en varios estudios, los mecanismos moleculares implicados en el alargamiento del PA son menos claros.

En modelos animales de DM1, el alargamiento del PA se correlacionó con alteraciones en diferentes corrientes de  $K^+$ , en particular: la corriente de  $K^+$

transitoria de salida ( $I_{to}$ ), la corriente de  $K^+$  entrante, en sus dos componentes, lento ( $I_{ks}$ ) y rápido ( $I_{kr}$ ).

### 1.2.1 Efectos de la DM sobre la corriente de $K^+$ transitoria de salida ( $I_{to}$ ).

Diversos estudios confirman que en modelos animales de DM1, inducida principalmente por la destrucción química de las células  $\beta$  pancreáticas, causa una reducción de la corriente de  $K^+$  transitoria de salida ( $I_{to}$ ). Estos experimentos fueron realizados en células de corazón de conejo (79) y ratón (76). En ratas, Casis y Cols., en el 2000, reportaron una reducción del 50% en la corriente  $I_{to}$  en células cardiacas aisladas de tres regiones del ventrículo derecho: sub-endocardio de la base del ventrículo izquierdo, sub-epicardio del ápex del ventrículo izquierdo y del ventrículo derecho (80). Una reducción de 30% en la  $I_{to}$  fue reportada por Zhi Xu en el 2002, en miocitos disociados de ambos ventrículos de ratas Sprague Dawley tratadas con estreptozotocina (81). Similares resultados fueron reportados por otros grupos de investigación en ratas tratadas con estreptozotocina (70,77,90,82–89).

### 1.2.2 Efectos de la DM sobre la corriente rectificadora de salida de potasio ( $I_K$ ).

La DM1 también causa una reducción en la corriente rectificadora de salida de potasio o  $I_K$ , en diferentes especies animales: perro (1), conejo (73,79), ratón (68,76) y en rata (77,91), siendo estos modelos de DM1 inducida por estreptozotocina y aloxano.

### 1.2.3 Efectos de la DM sobre la corriente rectificadora entrante de potasio ( $I_{K1}$ ).

Por otro lado la corriente rectificadora entrante de potasio,  $I_{K1}$  no presento ningún cambio en su densidad de corriente en los distintos modelos animales de DM1 empleados, perro (1), conejo (73,79), ratón (76) y rata (77,85,92).

La mayor parte de los estudios sobre las alteraciones en la corriente de K se han realizado en modelos animales de DM1 y poco se sabe en modelos animales de DM2

#### 1.2.4 Efectos de la DM sobre la variabilidad cardiaca

En estudios donde se evaluó la variabilidad cardiaca, Arroyo y Cols. 2016, reportaron que la DM1 crónica, redujo la variabilidad cardiaca, en particular reportaron una reducción del 48% del parámetro SD2 del diagrama de Poincaré y un incremento del 38% en la relación SD1/SD2. Estos datos se asociaron a arritmias supra-ventriculares y ventriculares (37). En la rata Goto–Kakizaki, un modelo de DM2 también se reportó una reducción en la variabilidad cardiaca (74).

Por otro lado Meo y Cols., 2016, reportan un incremento en la variabilidad del intervalo QT y QTc y se correlaciona con un incremento en la susceptibilidad de desarrollar arritmias ventriculares (68).

Dadas estas controversias, es importante continuar con el estudio de los efectos de la DM2 sobre la variabilidad cardiaca.

## **2. CAPÍTULO – MARCO METODOLOGICO**

### **2.1 Justificación**

La DM es una enfermedad que en los últimos años ha aumentado su incidencia colocándola como una de las enfermedades más importantes en el mundo. La DM constituye la sexta causa de muerte en el mundo y la segunda causa de muerte en nuestro país por debajo de las enfermedades cardiovasculares, las cuales se relacionan íntimamente con la DM. La DM2 da cuenta del 90-95% de todos los casos de diabetes reportados. Los pacientes con DM tienen de 3-4 veces mayor probabilidad de padecer complicaciones cardiovasculares, incluyendo arritmias cardíacas, prolongación del intervalo QT y muerte cardíaca súbita. Es por esto que está bien establecido que la diabetes puede conducir a disfunción de la actividad eléctrica y mecánica del corazón. Sin embargo, a la fecha se desconocen los mecanismos moleculares precisos por los cuales la DM genera estas alteraciones a nivel cardíaco. Hay evidencias de que la DM provoca alteraciones en la expresión y/o actividad de canales iónicos. En la DM1, en particular, ha sido demostrado que altera varios tipos de corrientes iónicas, incluyendo la corriente de calcio tipo L, las corrientes de potasio en sus dos componentes, lento  $I_{Ks}$  y rápido  $I_{Kr}$  (1) y en la corriente transitoria de salida,  $I_{to}$ . Sin embargo, son muy limitados los estudios sobre los efectos de la DM2 sobre la actividad eléctrica del corazón. Muchos de los estudios se realizaron utilizando modelos animales de DM1 (el tipo de DM menos común en el humano). En la actualidad, no queda claro si la DM2 induce la misma remodelación eléctrica del corazón que la encontrada en DM1.

Las ratas de la cepa Zucker Diabetic Fatty, son un modelo experimental que presentan varias de las características presentes en el humano diabético con DM2 como son, hiperglucemia, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina, obesidad, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, entre otras. En la presente tesis se utilizaron a las ratas ZDF para estudiar los efectos de la DM2 sobre la actividad eléctrica del corazón.

## 2.2 Planteamiento del Problema

En México, la primera causa de muerte son las enfermedades cardiovasculares, un 60% de estas muertes están relacionadas con la DM. La DM aumenta de 3-4 veces el riesgo de padecer complicaciones cardiovasculares, incluyendo arritmias cardíacas y muerte cardíaca repentina.

Diversos estudios realizados en modelos animales de DM1, la menos frecuente en el humano, han demostrado alteraciones en la actividad eléctrica del corazón, entre las cuales, una disminución de la frecuencia cardíaca, alargamiento del intervalo QT del electrocardiograma, alargamiento del potencial de acción de células cardíacas, alteraciones en las corrientes iónicas de  $K^+$  y una reducción en la variabilidad de la frecuencia cardíaca.

A la fecha existe poca información con respecto a los efectos de la DM2, la más frecuente en humanos ocupando el 90% de los casos a nivel mundial, sobre los mecanismos moleculares implicados en las alteraciones de la actividad eléctrica del corazón causada por esta enfermedad.

Por lo que nos planteamos la siguiente pregunta. ¿La diabetes mellitus tipo 2 causará alteraciones en las propiedades eléctricas activas del corazón?

## 2.3 Hipótesis

La diabetes mellitus tipo 2 causa alteraciones en las propiedades eléctricas activas del corazón de rata.

## 2.4 Objetivos

### 2.4.1 Objetivo General

Determinar el efecto de la diabetes mellitus tipo 2 sobre las propiedades eléctricas activas del corazón.

### 2.4.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar el efecto de la diabetes mellitus tipo 2 sobre la frecuencia cardiaca en las cepas de rata Zucker Diabetic Fatty y Long Evans.
2. Evaluar el efecto de la diabetes mellitus tipo 2 sobre el intervalo QT y QTc en las cepas de rata Zucker Diabetic Fatty y Long Evans.
3. Evaluar el efecto de la diabetes mellitus tipo 2 sobre la variabilidad cardiaca en las cepas de rata Zucker Diabetic Fatty y Long Evans.
4. Evaluar el efecto de la diabetes mellitus tipo 2 sobre la morfología del potencial de acción en las cepas de rata Zucker Diabetic Fatty y Long Evans.
5. Evaluar el efecto de la diabetes mellitus tipo 2 sobre la densidad de corrientes de  $K^+$ ,  $I_{to}$  en las cepas de rata Zucker Diabetic Fatty y Long Evans.
6. Evaluar el efecto de la diabetes mellitus tipo 2 sobre la densidad de corrientes de  $K^+$   $I_K$  en las cepas de rata Zucker Diabetic Fatty y Long Evans.
7. Evaluar el efecto de la diabetes mellitus tipo 2 sobre la densidad de corrientes de  $K^+$   $I_{K1}$  en las cepas de rata Zucker Diabetic Fatty y Long Evans.

## 2.5 Material y Métodos

### 2.5.1 Caracterización del modelo animal

Para el desarrollo del presente proyecto se emplearon ratas macho de  $12 \pm 2$  semanas de edad de la cepa Zucker Diabetic Fatty (ZDF) en sus dos fenotipos, OZDF (Obese Zucker Diabetic Fatty) y LZDF (Lean Zucker Diabetic Fatty). Usamos ratas de la cepa Long Evans (LE) de la misma edad como control. Las ratas fueron proporcionadas por el Bioterio "*Claude Bernard*" de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, donde fueron mantenidas bajo condiciones de temperatura y humedad constante, expuestas a ciclos de luz-oscuridad de 12 h, con consumo de agua y alimento *ad libitum*.

Para determinar si las ratas en efecto desarrollaban DM2, una semana previa al experimento, se les realizó una prueba de tolerancia a la glucosa. Para esto, los animales fueron sometidos a un ayuno de 4 h con agua *ad libitum*. Inmediatamente después de las 4 h de ayuno, considerado como tiempo 0, se obtuvo una muestra de sangre mediante punción de la vena caudal para medir la concentración de glucosa sanguínea empleando el sistema comercial Accucheck® (ROCHE). Posterior a la primera muestra, a las ratas se le administró por vía intraperitoneal una dosis de glucosa de 2 gr/Kg de peso del animal (NOM-062-ZOO-1999, 9.4.2.1.3.). Posteriormente se tomaron muestras de sangre a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos posteriores a la administración de glucosa y los niveles de glucosa fueron medidos como se indicó anteriormente.

El día del experimento, se procedió a medir la masa corporal de la rata en gramos, empleando una balanza granataria. También se midió el largo de la rata (distancia desde la punta de la nariz hasta la base de la cola) y la circunferencia abdominal, utilizando una cinta métrica. Posteriormente por punción de la vena caudal se obtuvo una muestra de sangre para medir los niveles de glucosa basal (sin ayuno previo), utilizando el sistema Accucheck® (ROCHE).

Las ratas fueron anestesiadas con una dosis de pentobarbital sódico 0.7 ml/Kg de peso, en adición se les administró una dosis de heparina de 0.02 ml/100 gr de peso, para evitar la formación de coágulos.

Después del registro del electrocardiograma y la extracción del corazón (ver siguientes secciones para detalles), se procedió a remover cuidadosamente toda la grasa localizada alrededor del epidídimo de ambos testículos y la grasa peripancreática. La grasa epididimal y peripancreática fueron pesadas utilizando una balanza granataria.

#### 2.5.2. Registro del electrocardiograma in vivo.

Bajo anestesia, se procedió a realizar el registro del ECG, para ello la rata fue colocada en posición ventral y se procedió a insertar tres electrodos en configuración de derivación I (DI): uno debajo del pliegue axilar derecho (electrodo positivo), el segundo en el pliegue axilar izquierdo (electrodo negativo) y el tercero en la parte interna de la ingle izquierda (electrodo-tierra). El ECG fue registrado utilizando un electrocardiógrafo especial fabricado en el laboratorio para animales pequeños. La señal electrocardiográfica fue visualizada utilizando el programa Labview y con un conversor analógico digital fue capturada a una frecuencia de 10 kHz en una computadora personal para su ulterior análisis. Los registros fueron obtenidos durante 15 minutos.

#### 2.5.3 Medición de la Frecuencia Cardiaca

Para el cálculo de la frecuencia cardiaca se utilizó la **fórmula 2**, donde RR corresponde al intervalo entre ondas R expresado en milisegundos y la frecuencia está expresada en latidos por minuto. La medición del intervalo RR se realizó utilizando el programa Clampfit 10.7.

$$FC = \frac{1}{RR} \times 60000 \quad \text{Fórmula 2}$$

#### 2.5.4 Medición del Intervalo RT

El intervalo RT fue obtenido de aproximadamente 100 registros electrocardiográficos con el programa de análisis Clampfit 10.7. El intervalo RT fue medido desde el inicio de la onda R hasta el final de la onda T (ver **Figura 9**).

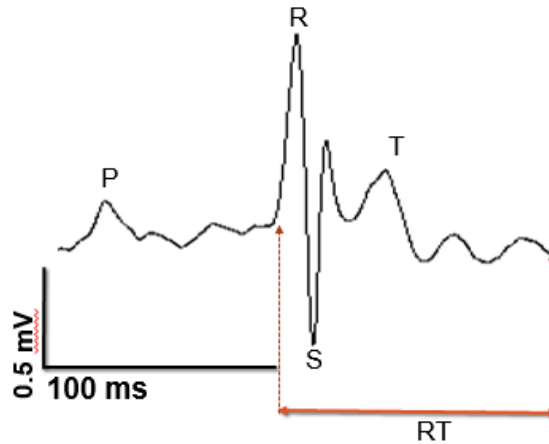


Figura 9. Intervalo RT. La medición del interalo RT es tomada desde el inicio de la onda R, hasta el final de la onda T.

Dada la relación del intervalo RT (RT) y la frecuencia cardiaca (FC), el intervalo RT fue corregido (RTc) fue calculado utilizando la fórmula de Bazett modificada para rata (ver **fórmula 3**), Fórmula de Bazzet modificada.

$$RTc = \frac{RT}{\sqrt{RR/FC}} \quad \text{Fórmula 3}$$

#### 2.5.5 Variabilidad de la frecuencia cardiaca

La medición de la variabilidad cardiaca se realizó utilizando el diagrama de Poincare (ver sección 1.1.2.8) y el cálculo de los valores SD1, SD2 y SD1/SD2. El cálculo de SD1 y SD2 se realizó mediante las **fórmulas 4 y 5** respectivamente.

La cuantificación de la variabilidad de la frecuencia cardiaca se realiza mediante el cálculo de SD1, SD2 y la relación SD1/SD2. SD1 o ancho del diagrama, es la desviación estándar de la distancia entre todos los puntos del diagrama de Poincaré a lo largo del eje  $RR_i$ , el cual es calculado con la fórmula 4, donde al intervalo RR ( $RR_i$ ) se le restara el intervalo RR siguiente ( $RR_{i+1}$ ) y dividido entre dos, para elevarse al cuadrado y sacar su raíz cuadrada. El SD2 o largo del diagrama, es la desviación estándar de la distancia entre todos los puntos del diagrama de Poincare a los largo del eje  $RR_{i+1}$ , el cual es calculado utilizando la fórmula 5 (93).

La relación SDD1/SDD2 es el valor que corresponde al delicado equilibrio entre el sistema simpático y parasimpático en el corazón (93).

$$D1i = \sqrt{\left(\frac{RR_i - RR_{i+1}}{2}\right)^2} \quad \text{Fórmula 4}$$

$$D2j = \sqrt{2\left(\frac{2\overline{RR}_i - RR_i - RR_{i+1}}{2}\right)^2} \quad \text{Fórmula 5}$$

Después de registrar el ECG *in vivo*, se procedió a extraer el corazón y se lavó con solución fisiológica (Tyrode) en un sistema de perfusión retrógrada de Langendorff para remover la sangre remanente.

#### 2.5.6 Disociación de Miocitos

La obtención de los miocitos cardíacos se realizó mediante disociación enzimática. Para ello, finalizado la toma del electrocardiograma en condición *ex vivo* se procedió a sustituir la solución Tyrode con otra solución Tyrode libre de calcio durante 9 minutos. Para la digestión enzimática se perfundió al corazón con 50 ml de solución Tyrode libre de calcio conteniendo 28 mg de colagenasa tipo 1 durante 8 minutos, posteriormente se perfundió con 1 mg de proteasa tipo XIV, también diluida en solución Tyrode libre de calcio durante 4 minutos. Después de la perfusión con enzimas, el corazón fue lavado con solución Kraft-Brueh durante 3 minutos. El corazón fue transferido en una cámara de disección conteniendo solución Kraft-Brueh, para disecar: la pared libre del ventrículo derecho, la pared libre del ventrículo izquierdo, el septum intraventricular, el papilar de ventrículo izquierdo, papilar de ventrículo derecho y epicardio de ventrículo derecho e izquierdo. Posteriormente los seis tejidos por separados fueron cortados en segmentos pequeños para realizar la dispersión mecánica de las células por agitación. Las

células así obtenidas, se mantuvieron en solución Kraft-Brueh a 4 °C hasta el momento de su uso.

La composición de las soluciones se describe en el anexo 5.10.

#### 2.5.7 Medición del Potencial de Acción y Protocolos Experimentales de Corrientes

Para la medición del potencial de acción y corrientes de potasio, se colocaron de 2 a 3 gotas de suspensión celular en una cámara de perfusión montada en la plataforma de un microscopio invertido (Nikon Tokio, Japón). Los miocitos se dejaron sedimentar en el fondo de la cámara (8 a 10 min) y posteriormente se perfundieron con una solución externa normal (ver composición de soluciones en anexo 5.10.3). Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente. Los registros se obtuvieron usando el método de whole cell patch-clamp con un amplificador Axopatch 200A (Axon Instruments, Foster City, CA). La adquisición de datos y la generación de protocolos de current-clamp y voltage-clamp se llevaron a cabo con una interfaz LabMaster TL-1 controlada por el software pCLAMP (Axon Instruments). Las micropipetas se obtuvieron de tubos capilares de vidrio de borosilicato (WPI TW50, World Precision Instruments, Sarasota, FL) utilizando un puller programable (Sutter Instruments, Novato, CA).

##### 2.5.7.1 Medición del Potencial de Acción

Para la medición del potencial de acción, se utilizó la técnica de current-clamp (fijación de corriente) utilizando electrodos con una resistencia de entre 2 y 3 M $\Omega$ , llenos con solución intracelular (ver anexo 5.10.2 para composición de soluciones). Para generar los potenciales de acción aplicamos pulsos cuadrados de 5 ms de duración y de amplitud creciente para determinar primero la corriente mínima necesaria para evocar un potencial de acción. La señal de potencial de acción fue adquirida a una frecuencia de 25 KHz, amplificada, digitalizada y almacenada en una computadora personal. En la **Figura 10** se muestra un registro de potencial de acción obtenido del epicardio de rata OZDF del donde se indican los parámetros medidos de dicho potencial de acción: el Potencial de membrana en reposo (PMR) que corresponde al voltaje de la célula antes de ser estimulada; amplitud del potencial de acción (Amp), que se mide como la diferencia del valor del voltaje máximo que alcanza el potencial de acción cuando la célula es estimulada y el PMR;

Voltaje Máximo, y la Duración de la repolarización (DRP) al 10%, 30%, 60% y 90%, que corresponde al tiempo que tarda el potencial de membrana en decaer al 10, 30, 60 y 90% de la amplitud total del potencial de acción.

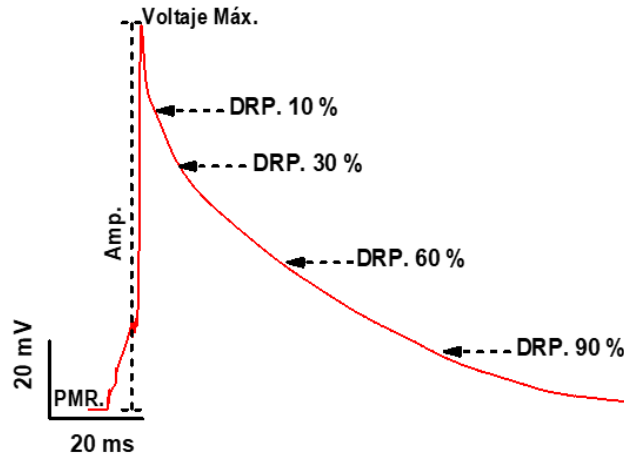


Figura 10. Parámetros medidos del Potencial de Acción. PMR: Potencial de Membrana en Reposo; Amp: Amplitud; Voltaje. Max: Voltaje Máximo; DRP 10, 30, 60 y 90 %: Duración de la Repolarización.

#### 2.5.7.2 Medición de la corriente $I_{to}$

Para medir la corriente  $I_{to}$  las células fueron perfundidas con una solución externa CaCo (ver anexo 5.10.3) para bloquear las corrientes de calcio tipo L, y se aplicó el siguiente protocolo: partiendo de un potencial de mantenimiento de -80 mV, se aplicó un pulso a -40mV durante 40ms para inactivar la corriente de sodio, y posteriormente fueron aplicados pulsos despolarizantes desde un potencial de -30mV hasta +60mV en incrementos de 10 mV, y con una duración de 500ms (ver **Figura 11A**). El valor de la densidad de corrientes de  $I_{to}$  a cada voltaje se determinó mediante el máximo valor de la corriente y restándole el valor mínimo de esta (ver **Figura 11B**).

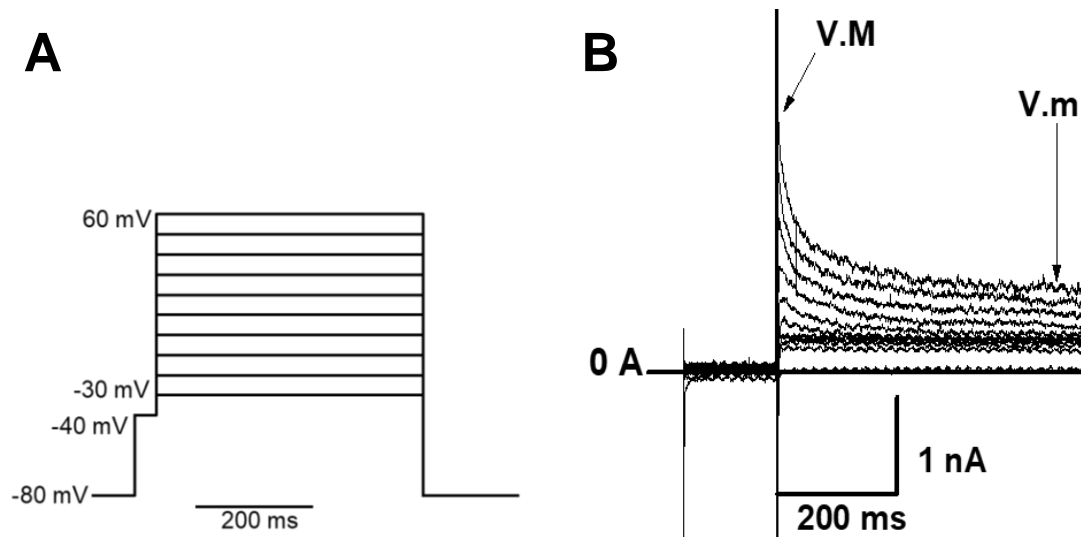


Figura 11. Protocolo de Corriente  $I_{to}$ . (A) Protocolo de corriente  $I_{to}$  (B) Familia de corrientes  $I_{to}$ . V.M: Valor maximo, V.m: Valor minimo, nA: nano Amperios.

### 2.5.7.3 Medición de la corriente $I_k$

Para medir la corriente  $I_k$  las células se perfundieron en solución externa de cobalto, aplicando el siguiente protocolo, partiendo en un potencial de mantenimiento de -80 mV, se aplicó un pulso de 200 ms de duración a -40 mV, para inactivar la corriente de sodio, posteriormente se dio una serie de pulsos despolarizantes desde -40 mV hasta +50 mV, en pasos de 10 mV y con una duración de 3000 ms (ver **Figura 12**). La amplitud de la corriente  $I_k$  se determinó tomando en cada pulso el valor máximo del registro de la corriente y se restara el valor mínimo.

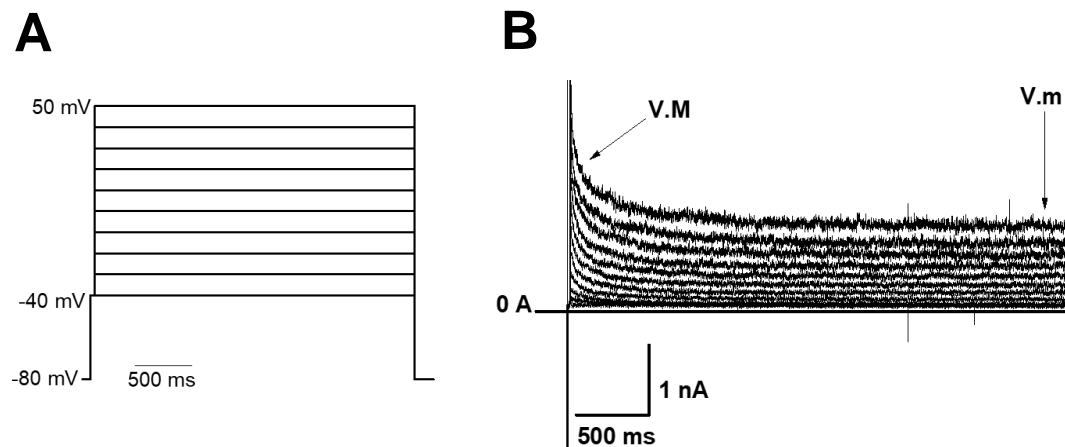


Figura 12. Protocolo de Corriente  $I_k$ . (A) Protocolo de corriente  $I_k$  (B) Familia de corrientes  $I_k$ . V.M: Valor maximo, V.m: Valor minimo, nA: nano Amperios.

#### 2.5.7.4 Medición de la corriente $I_{K1}$

Para el registro de la corriente  $I_{K1}$  las células fueron perfundidas con solución externa CaCo. Partiendo de un potencial de mantenimiento de -40 mV, se aplicaron pulsos de prueba desde -30 mV y hasta -120 mV, en incrementos de 10mV y de 500 ms de duración (ver **Figura 13**). La intensidad de corriente  $I_{K1}$  se determinó midiendo la corriente al final del pulso de prueba.

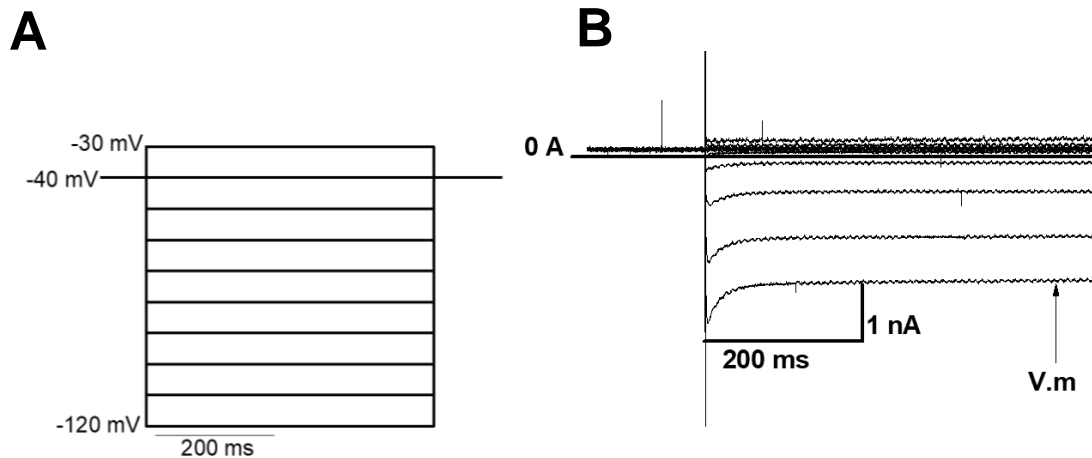


Figura 13. Protocolo de Corriente  $I_{K1}$ . (A) Protocolo de corriente  $I_{K1}$  (B) Familia de corrientes  $I_{K1}$ . V.m: Valor minimo, nA: nano Amperios.

#### 2.5.8 Análisis de Resultados

Los datos obtenidos fueron analizados con los softwares Clampfit 10.7 y GraphPad Prism 5. Se utilizó la prueba estadística ANOVA o Kruskal Wallis dependiendo de si los datos fueron paramétricos o no paramétricos para comparar los datos correspondientes, los cuales fueron las tres distintas corrientes analizadas;  $I_{to}$ ,  $I_K$  e  $I_{K1}$ . Con una  $p < 0.05$  para considerar significativo los resultados. Los resultados obtenidos se representarán usando la media  $\pm$  error estándar de al menos 6 ratas de cada cepa (OZDF, LZDF y Long Evans).

### 3. CAPÍTULO - RESULTADOS

#### 3.1 Parámetros morfométricos y metabólicos

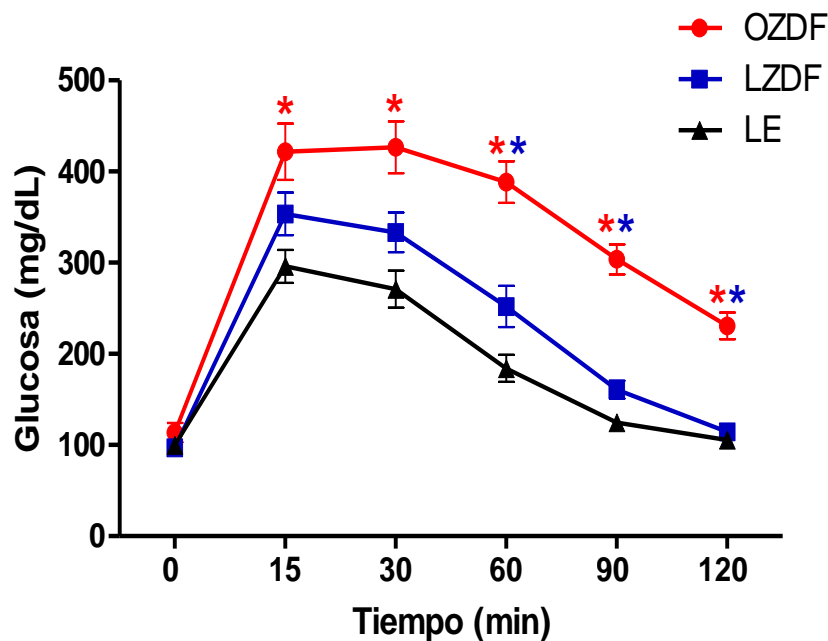
En el **cuadro 1** se muestra la media  $\pm$  el error estándar (ES) de los parámetros morfométricos y metabólicos obtenidos de los tres grupos de rata en estudio. Como lo muestra el análisis estadístico, las ratas OZDF presentaron un aumento significativo en comparación con las ratas LE y LZDF de: su masa corporal de aproximadamente 55% ( $p < 0.05$ ); de la circunferencia de su cintura de aproximadamente 70% ( $p < 0.05$ ); de la grasa epididimal de aproximadamente 375% ( $p < 0.05$ ); y de la grasa peripancreática de un 700% ( $p < 0.05$ ). En cuanto a la longitud nariz-cola solo se encontró un incremento de aproximadamente 4.6% en la rata LE vs OZDF y 5.1% LZDF ( $p < 0.05$ ). En los parámetros bioquímicos, encontramos que los niveles de glucosa sanguínea basal fueron 30.3% ( $p < 0.05$ ) mayor que en las ratas OZDF comparadas con las ratas LE y LZDF.

**Cuadro 1. Parámetros morfométricos y metabólicos de ratas LE, LZDF y OZDF.**

	LE n= 14	LZDF n= 16	OZDF n= 17
<b>Peso (g)</b>	292.8 $\pm$ 6.5	295.1 $\pm$ 5.1	450.2 $\pm$ 14 **
<b>Longitud (g)</b>	21.4 $\pm$ 0.1	21.3 $\pm$ 0.1	22.4 $\pm$ 0.3 *
<b>Circunferencia (g)</b>	16.1 $\pm$ 0.3	17.1 $\pm$ 0.2	23.5 $\pm$ 0.2 **
<b>IMC</b>	6.358 $\pm$ 0.1239	6.471 $\pm$ 0.09724	8.946 $\pm$ 0.2216 **
<b>Grasa Epididimal (g)</b>	2 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.1	9.5 $\pm$ 0.7 **
<b>Grasa Peripancreática (g)</b>	0.3 $\pm$ 0.08	0.2 $\pm$ 0.3	2.4 $\pm$ 0.3 **
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	145 $\pm$ 3.6	139.1 $\pm$ 3.6	189 $\pm$ 15.8 **

Datos representados con media  $\pm$  E.E., prueba estadística Kruskal Wallis con un valor de  $p < 0.05$ , \*(LZDF vs OZDF), \*(LE vs OZDF).

La curva de tolerancia a la glucosa obtenida de los grupos de rata LE (línea negra); LZDF (línea azul) y OZDF (línea roja), se muestra en la **Figura 14**. Los valores de glucosa sanguínea después de 4 horas de ayuno (minuto 0) fue mayor en las ratas OZDF ( $p>0.05$ ), aunque no encontramos diferencias significativas con respecto a los valores de glucosa obtenidos de las ratas LE y LZDF ( $p>0.05$ ). Sin embargo, después de la administración de glucosa (2 gr/Kg de peso del animal) los valores de glucosa obtenidos de las ratas OZDF a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos después de la aplicación, fueron estadísticamente superiores a los obtenidos en ratas LE y LZDF ( $p<0.05$ ). No se encontraron diferencias significativas en las curvas de tolerancia a la glucosa entre los grupos de ratas LE y LZDF ( $p>0.05$ ).



**Figura 14. Curva de tolerancia a la glucosa.** Después de haber pasado 4 h de ayuno se tomó la primer toma de glucosa basal (tiempo 0) y se aplicó una carga de glucosa a una concentración de 2 g por kilo de peso vía intraperitoneal, la segunda (tiempo 15) y tercer toma (tiempo 30) se procedieron a tomar cada 15 minutos, mientras que la cuarta (tiempo 60), quinta (tiempo 90) y sexta (tiempo 120) toma se realizaron cada 30 min. Todos los datos obtenidos se representan como media  $\pm$  E.E., prueba estadística Kruskal Wallis con un valor de  $p < 0.05$ , \*(LZDF vs OZDF), \*(LE vs OZDF).

### 3.2 Efecto de la diabetes mellitus tipo 2 sobre la frecuencia cardiaca en las cepas de rata Zucker Diabetic Fatty y Long Evans.

En la **Figura 15** se muestran los registros de electrocardiograma obtenidos de ratas Long Evans (panel A), LZDF (panel B) y OZDF (panel C). El análisis del intervalo RR, demuestra que las ratas de la cepa ZDF (LZDF y OZDF) presentaron una disminución significativa en la duración del intervalo RR en comparación con el intervalo RR medido en las ratas LE ( $p < 0.05$ ) (**Cuadro 2**). Este alargamiento en el intervalo RR en las ratas de la cepa LZDF y OZDF dio como resultado una disminución significativa de la frecuencia cardiaca de ~ 8% y 11 % en ratas LZDF y OZDF al compararlas con las ratas LE respectivamente ( $p < 0.05$ ) (**Cuadro 2**).

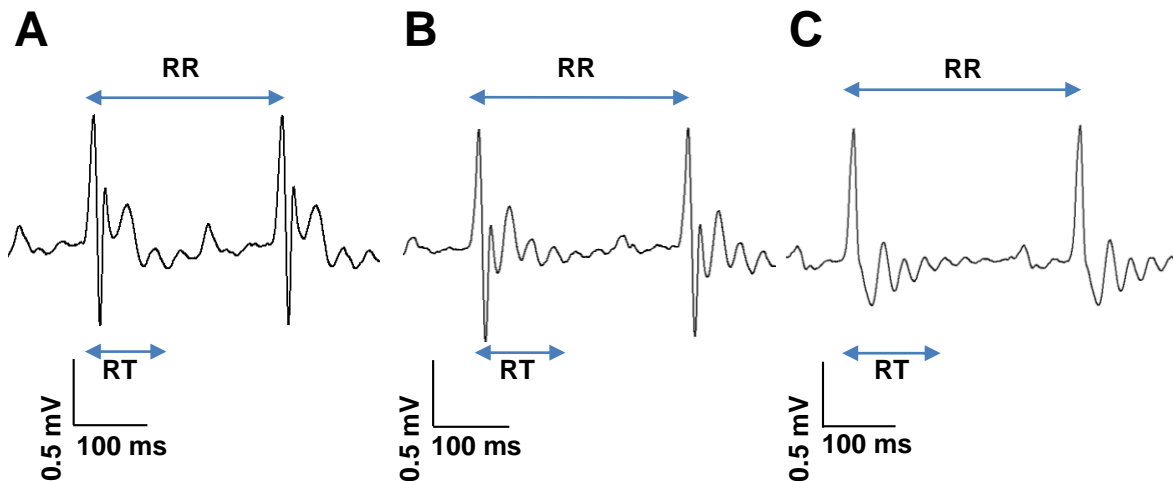


Figura 15. Electrocardiogramas obtenidos de ratas LE (A), LZDF (B) y OZDF (C). Las flechas indican la duración de los intervalos RR y RT.

**Cuadro 2. Intervalo RR y frecuencia cardiaca.**

	Long Evans (n=14)	LZDF (n=16)	OZDF (n=15)
Intervalo R-R (ms)	173.0 ± 4.4	188.4 ± 4.6*	193.0 ± 3.2*
F.C. (LPM)	349.8 ± 8.8	321.5 ± 8.3*	312.1 ± 5.1*

Los valores representan la media±EE, prueba estadística Kruskal Wallis con un valor de  $p < 0.05$ , \* (LZDF vs OZDF), \* (LE vs OZDF). LPM= latidos por minuto.

### 3.3 Efecto de la diabetes mellitus tipo 2 sobre el intervalo RT y RTc en las cepas de rata Zucker Diabetic Fatty y Long Evans.

En la **Cuadro 3** se muestra la media  $\pm$  ES del intervalo RT y RTc medidos de los electrocardiogramas obtenidos de ratas LE, LZDF y OZDF. No encontramos diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en ambos parámetros entre los grupos de estudio.

**Cuadro 3. Intervalo RT, RTc.**

	Long Evans (n=14)	LZDF (n=16)	OZDF (n=15)
Intervalo R-T (ms)	49.1 $\pm$ 2.5	52.9 $\pm$ 2.8	57.0 $\pm$ 1.4
Intervalo R-Tc (ms)	69.9 $\pm$ 3.5	69.5 $\pm$ 3.8	72.5 $\pm$ 1.9

Los datos representan la media  $\pm$  EE, prueba estadística Kruskal Wallis con un valor de  $p > 0.05$ .

### 3.4 Efecto de la diabetes mellitus tipo 2 sobre la variabilidad cardiaca en las cepas de rata Zucker Diabetic Fatty y Long Evans.

Para el estudio de los efectos de la diabetes mellitus tipo 2 sobre la variabilidad cardiaca, se realizaron los diagramas de Poincaré utilizando el intervalo RR (**Figura 16A**) y del intervalo RT (**Figura 16B**) del ECG de las ratas LE (puntos negros), LZDF (puntos azules) y OZDF (puntos rojos). A partir de los diagramas de Poincaré se calcularon los parámetros SD1, SD2 utilizando las **fórmulas 4 y 5** respectivamente y la relación SD1/SD2 como indicadores de la variabilidad de la frecuencia cardiaca en los tres grupos experimentales.

En la **Cuadro 4**, se puede observar una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) del valor SD2 obtenido del diagrama de Poincaré de los intervalos RR en las ratas OZDF al compararlas con los datos obtenidos en las ratas LE y LZDF.

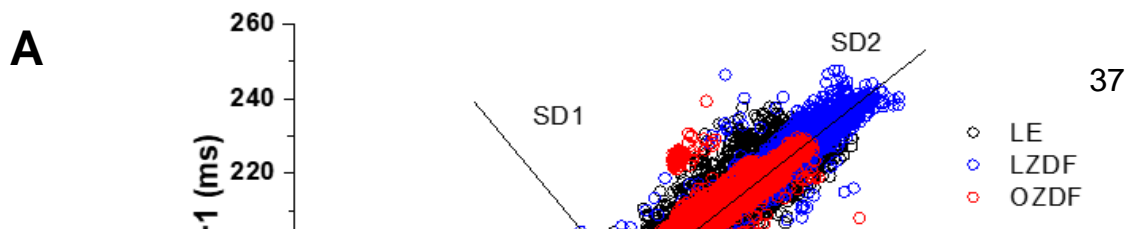


Figura 16. Diagramas de Poincaré contruidos con los intervalos RR (A) y RT (B) de los electrocardiogramas obtenidos de ratas LE (círculos negros), LZDF (círculos azules) y OZDF (círculos rojos).

**Cuadro 4. Efecto de la Diabetes mellitus tipo 2 sobre la variabilidad de la frecuencia cardiaca (intervalo RR).**

	LE	LZDF	OZDF
<b>SD1</b>	0.51	0.50	0.56
<b>SD2</b>	3.95	5.03	3.13*
<b>SD1/SD2</b>	0.13	0.1	0.2

Se realizó una prueba Kruskal-Wallis con una  $p < 0.05$ . \* Estadísticamente significativo con respecto a LZDF. Media  $\pm$  error estándar.

Por otro lado, En la **Cuadro 5** se observa un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en los parámetros SD1 y SD2 en las ratas de la cepa ZDF (LZDF y OZDF) con respecto a la rata LE.

**Cuadro 5. Efecto de la Diabetes mellitus tipo 2 sobre la variabilidad de la frecuencia cardiaca (intervalo RT).**

	LE	LZDF	OZDF
<b>SD1</b>	0.25	0.50*	0.37*
<b>SD2</b>	0.70	0.53*	0.48*
<b>SD1/SD2</b>	0.36	0.94	0.94

Se realizó una prueba Kruskal-Wallis con una  $p < 0.05$ . \* Estadísticamente significativo con respecto a LE. Media  $\pm$  error estándar.

### 3.5 Efecto de la diabetes mellitus sobre la morfología del potencial de acción y corrientes de potasio $I_{to}$ , $I_K$ e $I_{K1}$ en las cepas de ratas Zucker Diabetic Fatty y Long Evans

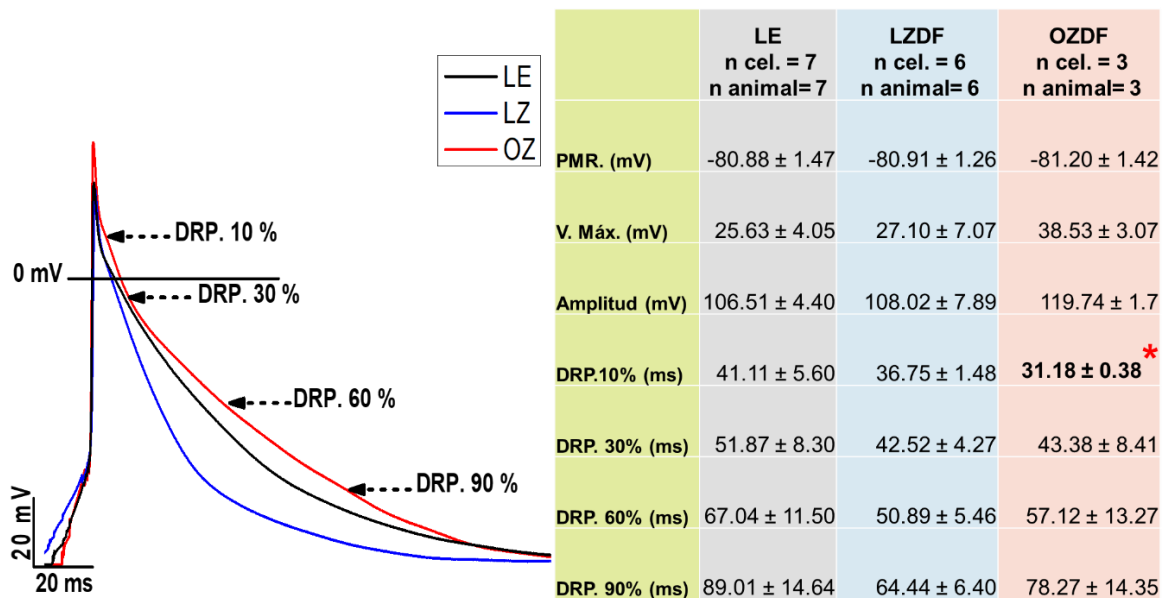
Dadas las diferencias en la morfología de los potenciales de acción y densidad de corrientes iónicas (76,80,94,95) de  $K^+$  reportadas en los diferentes tejidos del corazón, en esta tesis se midieron los potenciales de acción y corrientes iónicas de  $K^+$  antes mencionadas en los siguientes tejidos: epicardio, pared libre del

ventrículo izquierdo, pared libre del ventrículo derecho, septum intraventricular, papilar del ventrículo izquierdo y papilar del ventrículo derecho. A continuación, se describen los resultados obtenidos en cada uno de los tejidos.

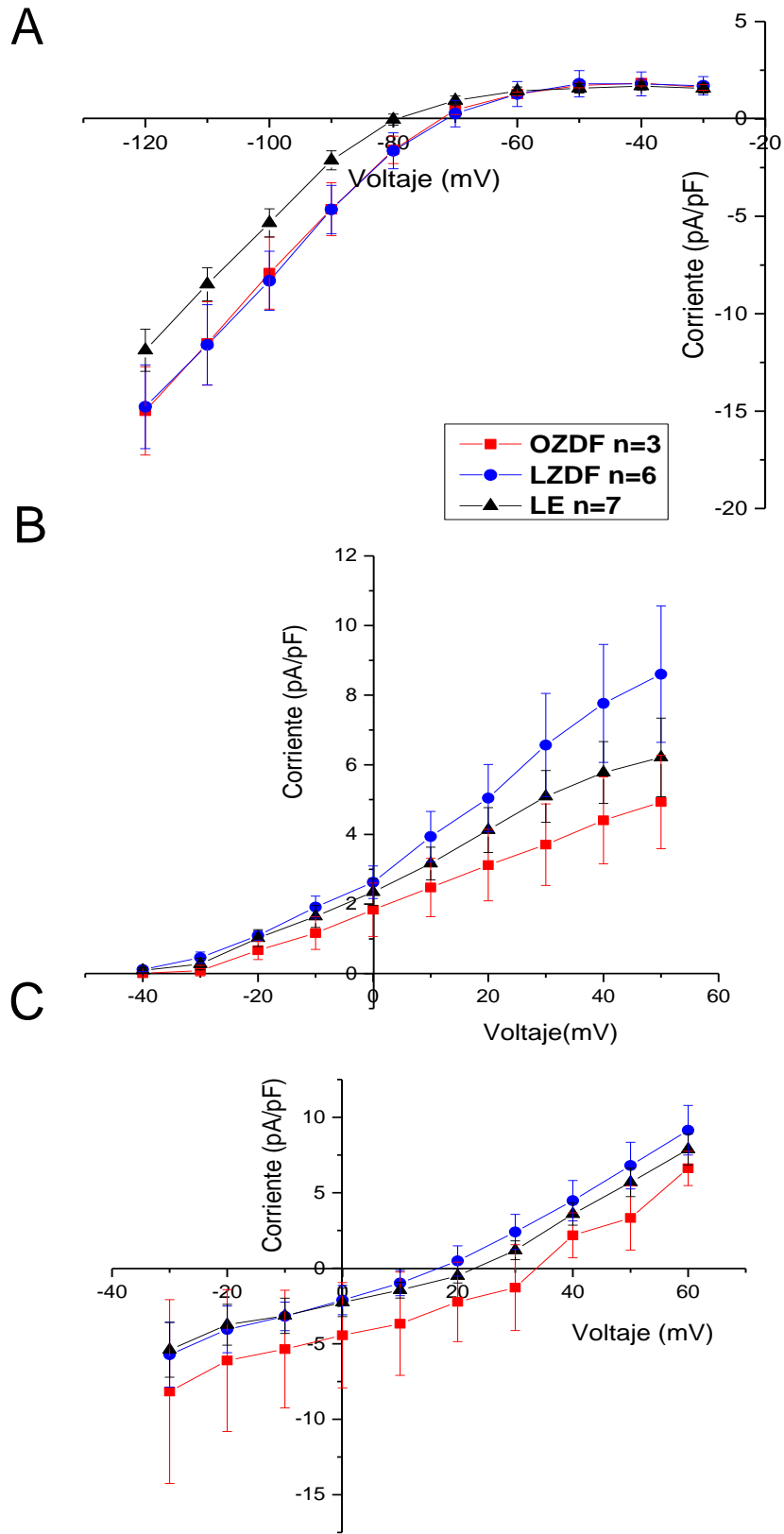
### 3.3.1 Epicardio

En la **Figura 17**, se muestran los registros de PA obtenido del epicardio del corazón de rata OZDF (rojo), LZDF (azul) y Long-Evans (negro). En el **cuadro de la Figura 17** se muestra la media  $\pm$  ES de los parámetros medidos de los potenciales de acción en los tres grupos experimentales. Como se puede observar, la única diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) resultante fue un aumento de la duración en el tiempo de repolarización al 10% en la rata OZDF en comparación con la rata LZDF.

En la Figura 17, se muestran las gráficas de la densidad de corriente  $I_{K1}$  (panel A),  $I_K$  (panel B) e  $I_{to}$  (panel C) obtenidas de células del epicardio. Aunque se observa una tendencia a la disminución de las corrientes  $I_{to}$  e  $I_K$  en ratas OZDF en comparación con LZDF y LE, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en ninguna de las corrientes medidas.



**Figura 17. Potencial de acción de epicardio y cuadro de los parámetros analizados.** Potencial de acción de rata OZDF (roja), LZDF (azul) y LE (negra). Todos los datos obtenidos se representan como media  $\pm$  E.E., prueba estadística Kruskal Wallis con un valor de  $p < 0.05$ , \*(LZDF vs OZDF).

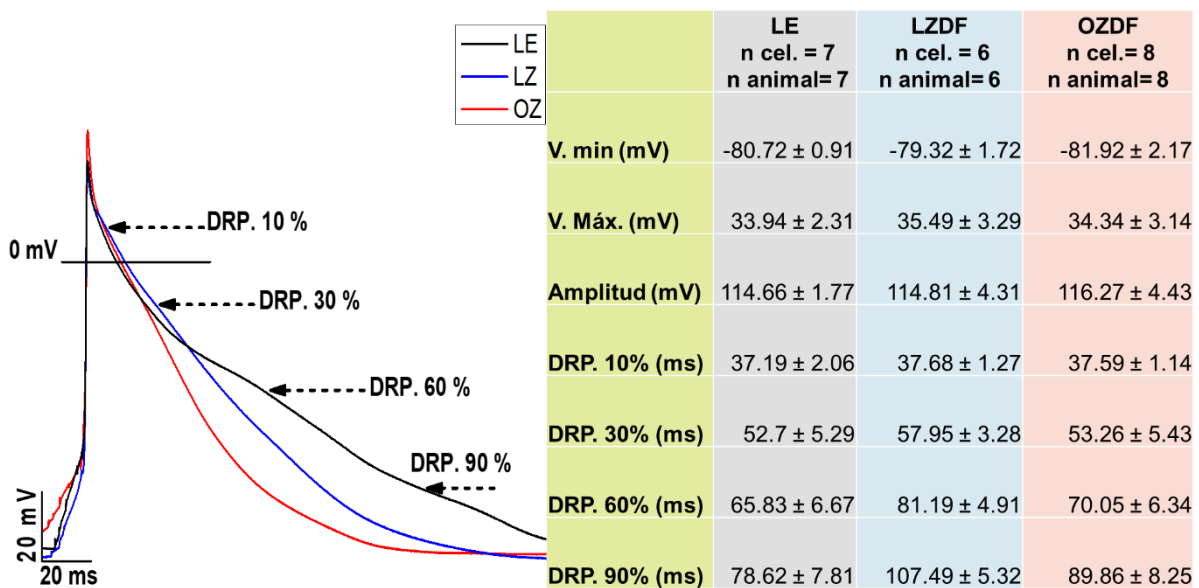


**Figura 18. Curvas corriente-voltaje de epicardio.** Corriente  $I_{k1}$  (A),  $I_k$  (B) y corriente  $I_{to}$  (C) se empleó la prueba estadística Kruskal Wallis con un valor de  $p < 0.05$ .

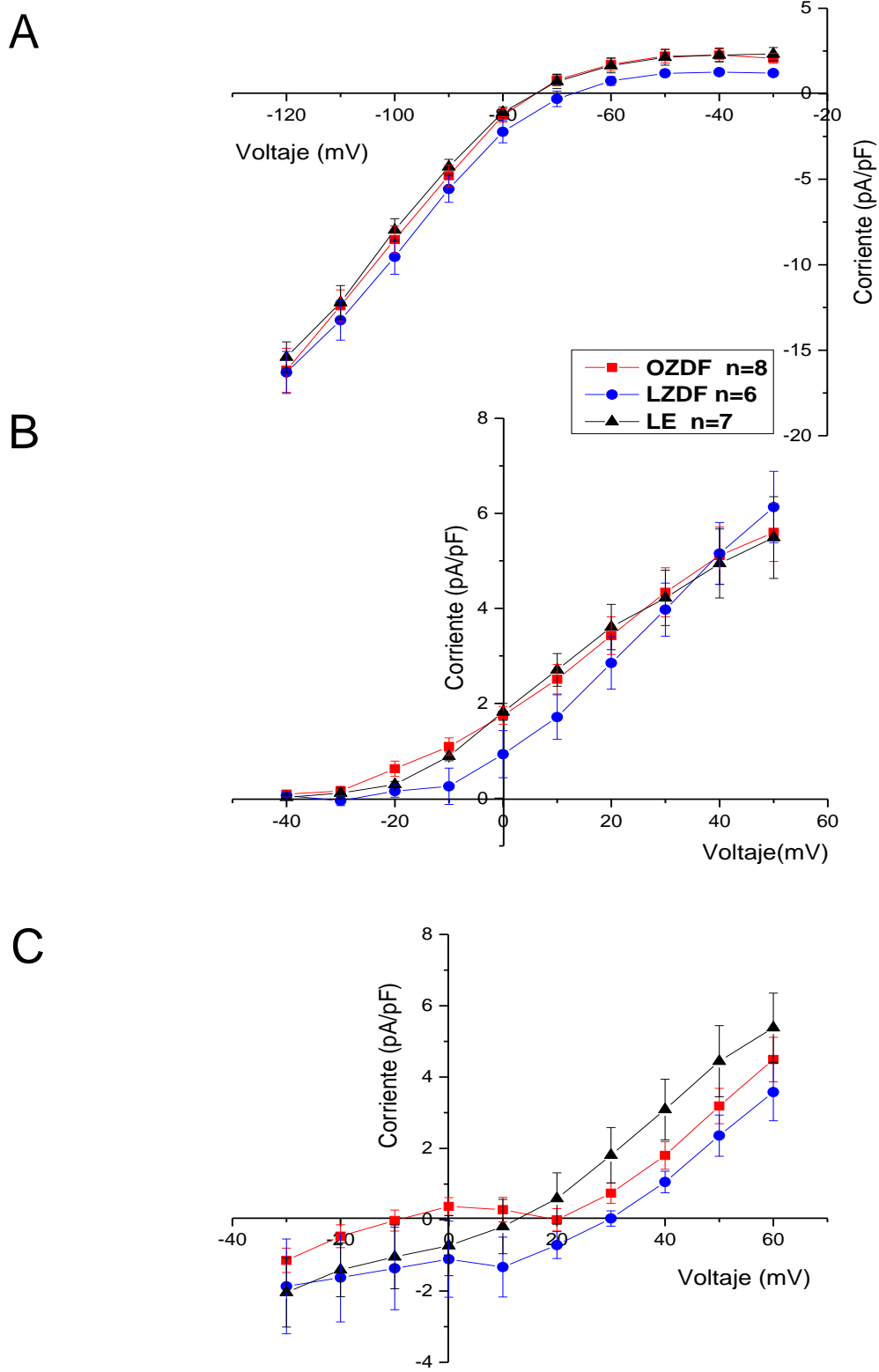
### 3.3.2 Pared libre de ventrículo izquierdo

En la **Figura 19**, se muestran los registros de PA obtenido de la pared del ventrículo izquierdo del corazón de rata OZDF (rojo), LZDF (azul) y Long-Evans (negro). En el **cuadro de la figura 19** se muestra la media±ES de los parámetros medidos de los potenciales de acción en los tres grupos experimentales. No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en ninguno de los parámetros estudiados.

En la **Figura 19**, se muestran las gráficas de la densidad de corriente  $I_{K1}$  (panel A),  $I_K$  (panel B) e  $I_{to}$  (panel C) obtenidas de célula de la pared libre del ventrículo izquierdo. No encontramos diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en ninguna de las corrientes medidas.



**Figura 19. Potencial de acción de Pared libre de ventrículo izquierdo y cuadro de los parámetros analizados.** Potencial de acción de rata OZDF (roja), LZDF (azul) y LE (negra). Todos los datos obtenidos se representan como media ± E.E., prueba estadística Kruskal Wallis con un valor de  $p < 0.05$ .

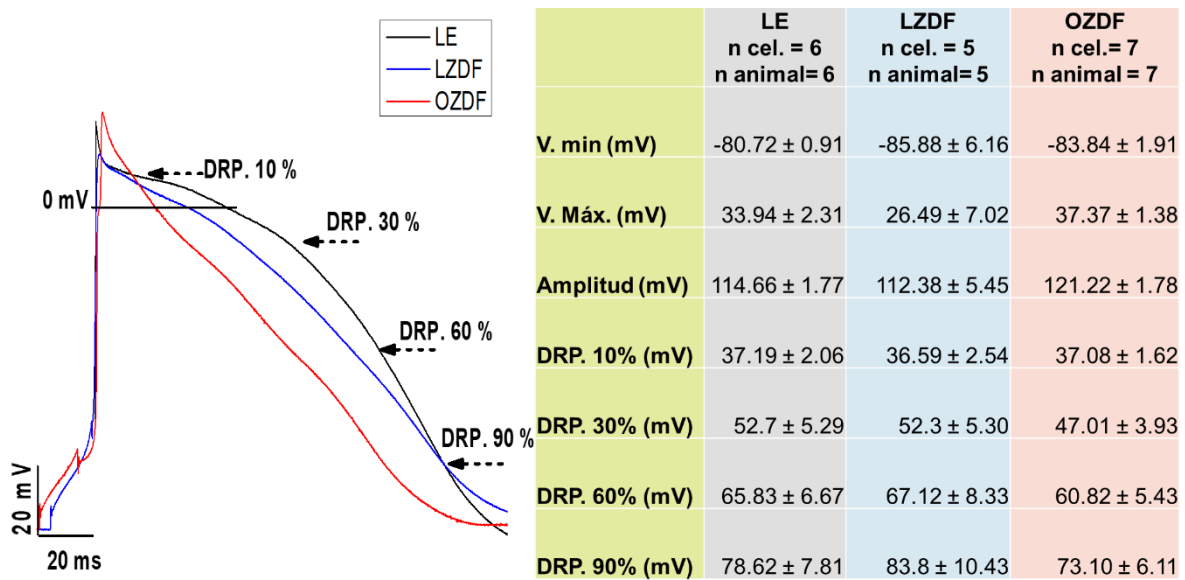


**Figura 20. Curvas corriente-voltaje de Pared libre de ventrículo izquierdo.** Corriente  $I_{k1}$  (A),  $I_k$  (B) y corriente  $I_{to}$  (C) Se empleó la prueba estadística Kruskal Wallis con un valor de  $p < 0.05$ .

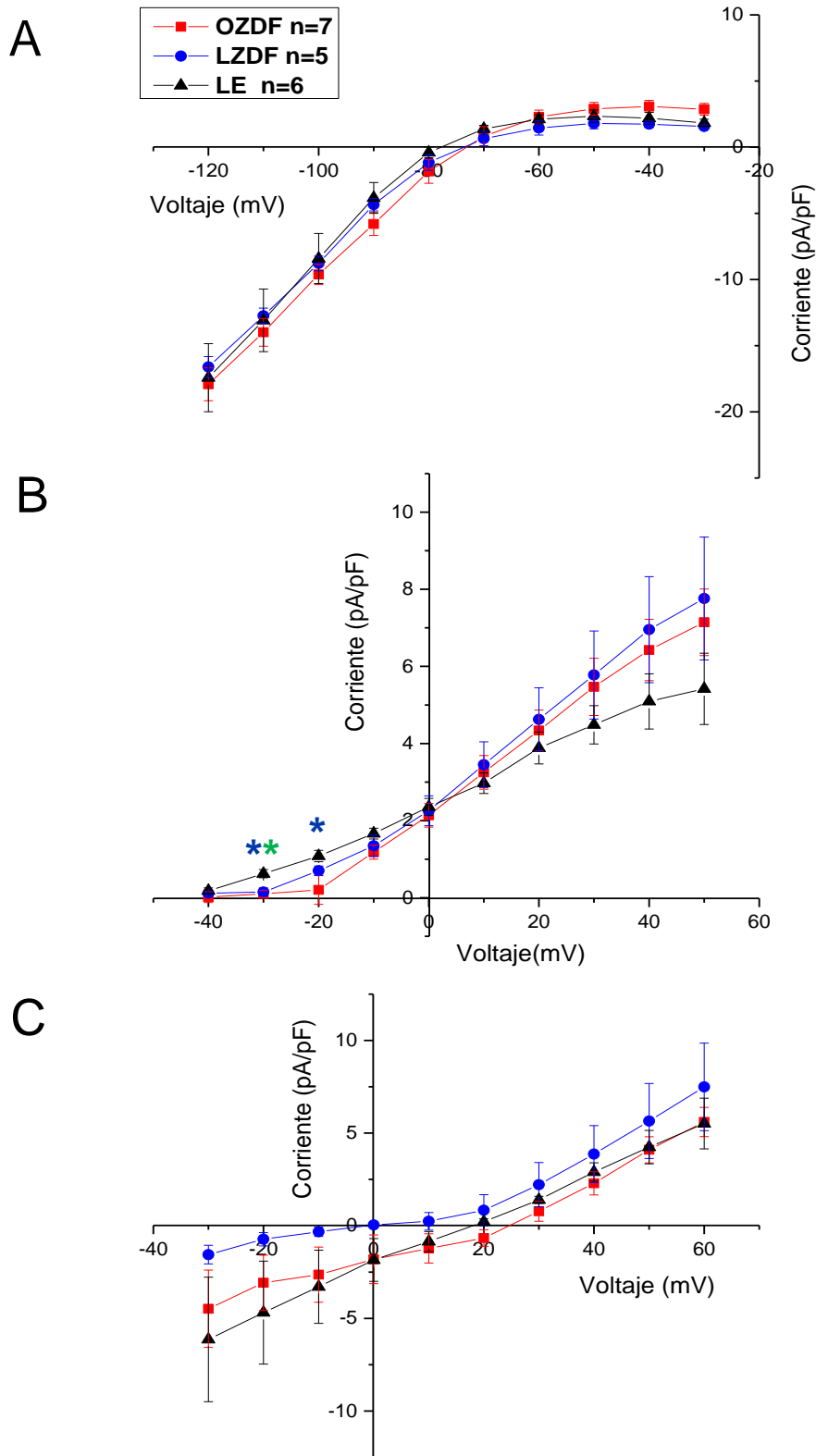
### 3.3.3 Pared libre de ventrículo derecho

En la **Figura 21**, se muestran los registros de PA obtenido de la pared del ventrículo derecho del corazón de rata OZDF (rojo), LZDF (azul) y Long-Evans (negro). En el **cuadro de la Figura 21** se muestra la media  $\pm$  ES de los parámetros medidos de los potenciales de acción en los tres grupos experimentales. No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en ninguno de los parámetros estudiados.

En la **Figura 21**, se muestran las gráficas de la densidad de corriente  $I_{K1}$  (panel A),  $I_K$  (panel B) e  $I_{to}$  (panel C) obtenidas de célula de la pared libre del ventrículo derecho. En el panel B, se puede apreciar una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) de la corriente  $I_K$  del grupo OZDF vs LE a los voltajes de -30 y -20 mV de la curva corriente contra voltaje, al igual que hubo una disminución de la densidad de corriente a un voltaje de -20 mV al comparar el grupo LZDF vs LE.



**Figura 21. Potencial de acción de Pared libre de ventrículo derecho y cuadro de los parámetros analizados.** Potencial de acción de rata OZDF (roja), LZDF (azul) y LE (negra). Todos los datos obtenidos se representan como media  $\pm$  E.E., prueba estadística Kruskal Wallis con un valor de  $p < 0.05$ .

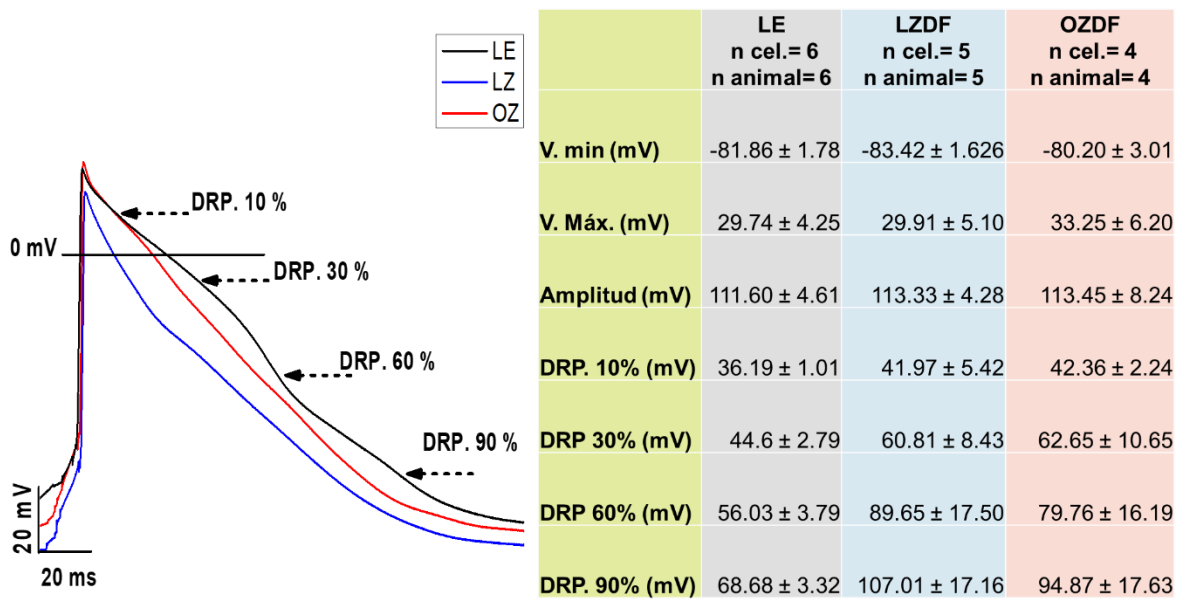


**Figura 22. Curvas corriente-voltaje de Pared libre de ventrículo derecho.** Corriente  $I_{K1}$  (A),  $I_K$  (B) y corriente  $I_{to}$  (C). Se empleó la prueba estadística Kruskal Wallis con un valor de  $p < 0.05$ . \*(LE vs LZDF), \*(LE vs OZDF),

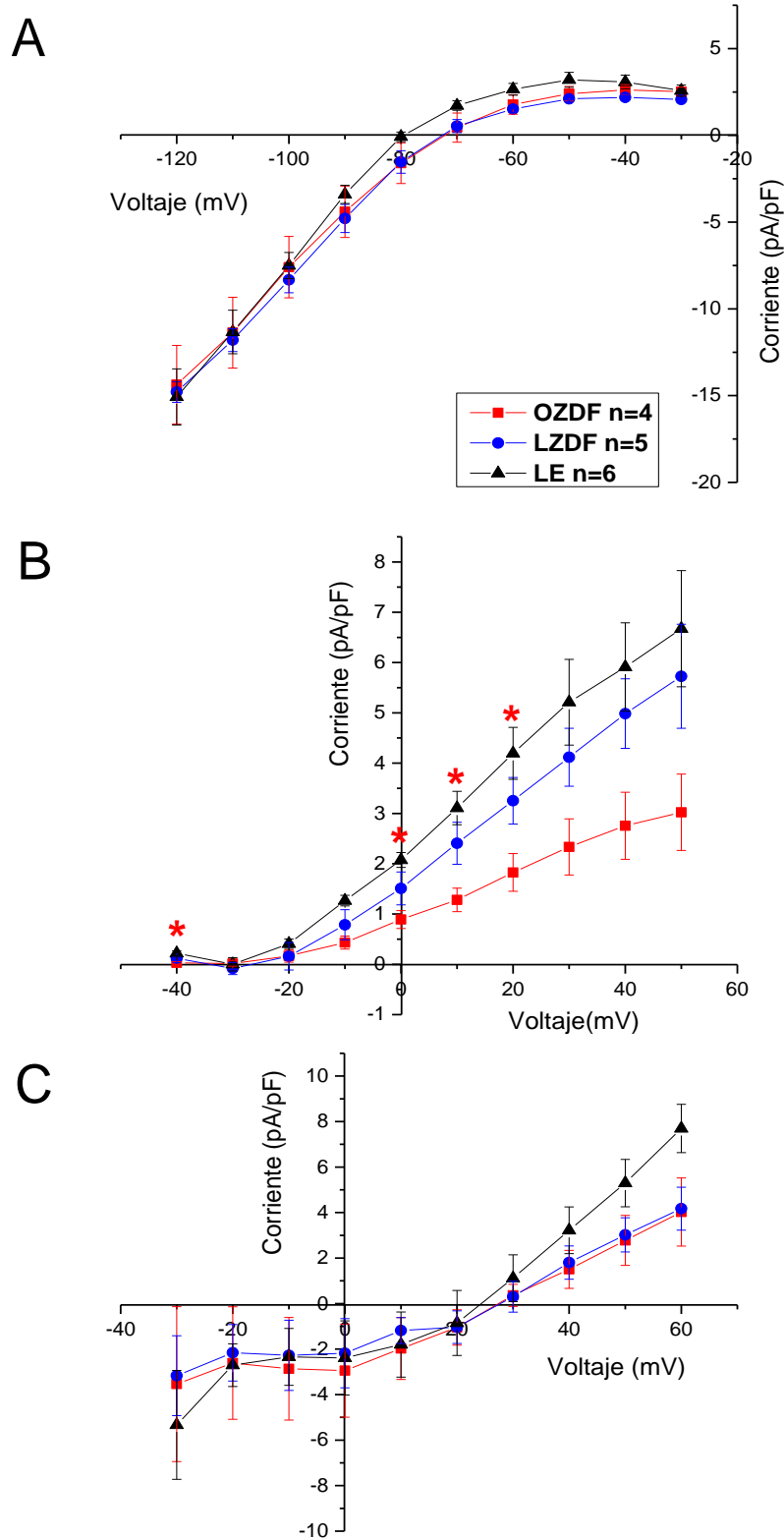
### 3.3.4 Septum

En la Figura 23, se muestran los registros de PA obtenidos del septum del corazón de rata OZDF (rojo), LZDF (azul) y Long-Evans (negro). En el cuadro de la Figura 23 se muestra la media±ES de los parámetros medidos de los potenciales de acción en los tres grupos experimentales. No se encontraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) en ninguno de los parámetros estudiados.

En la Figura 23, se muestran las gráficas de la densidad de corriente  $I_{K1}$  (panel A),  $I_K$  (panel B) e  $I_{to}$  (panel C) obtenidas de célula del septum. En el panel B, se puede apreciar una disminución significativa ( $p<0.05$ ) de la densidad de la corriente  $I_K$  del grupo OZDF en comparación con el grupo LE a los voltajes de -40, 0, 10 y 20 mV.



**Figura 23. Potencial de acción de septum y cuadro de los parámetros analizados.** Potencial de acción de rata OZDF (roja), LZDF (azul) y LE (negra). Todos los datos obtenidos se representan como media ± E.E., prueba estadística Kruskal Wallis con un valor de  $p < 0.05$ .

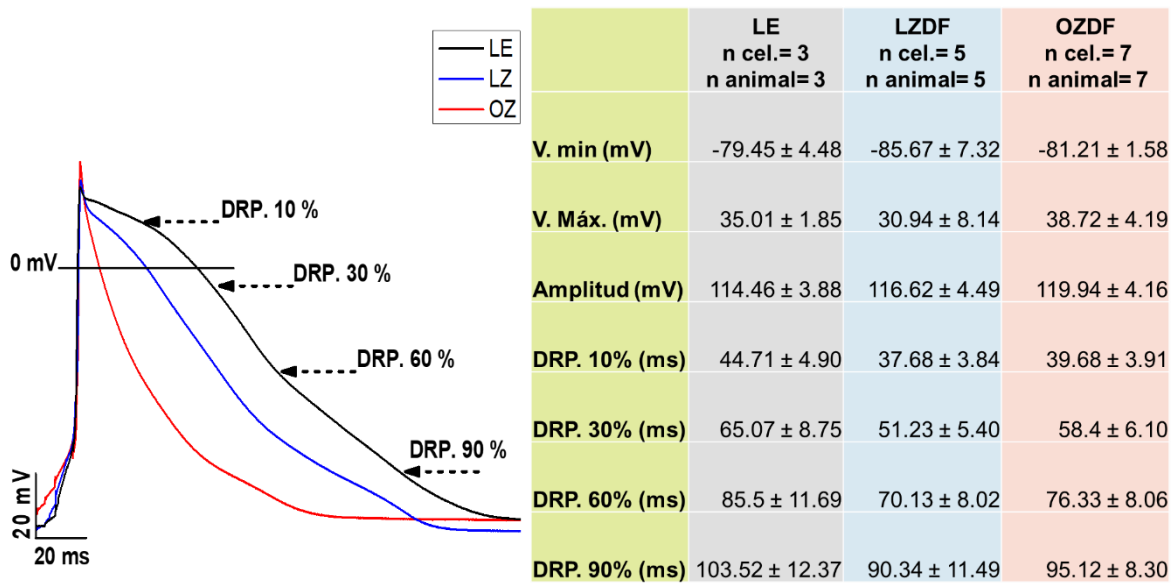


**Figura 24. Curvas corriente-voltaje de septum.** Corriente  $I_{k1}$  (A),  $I_k$  (B) y corriente  $I_{to}$  (C). Se empleó la prueba estadística Kruskal Wallis con un valor de  $p < 0.05$ . \* (LE vs OZDF).

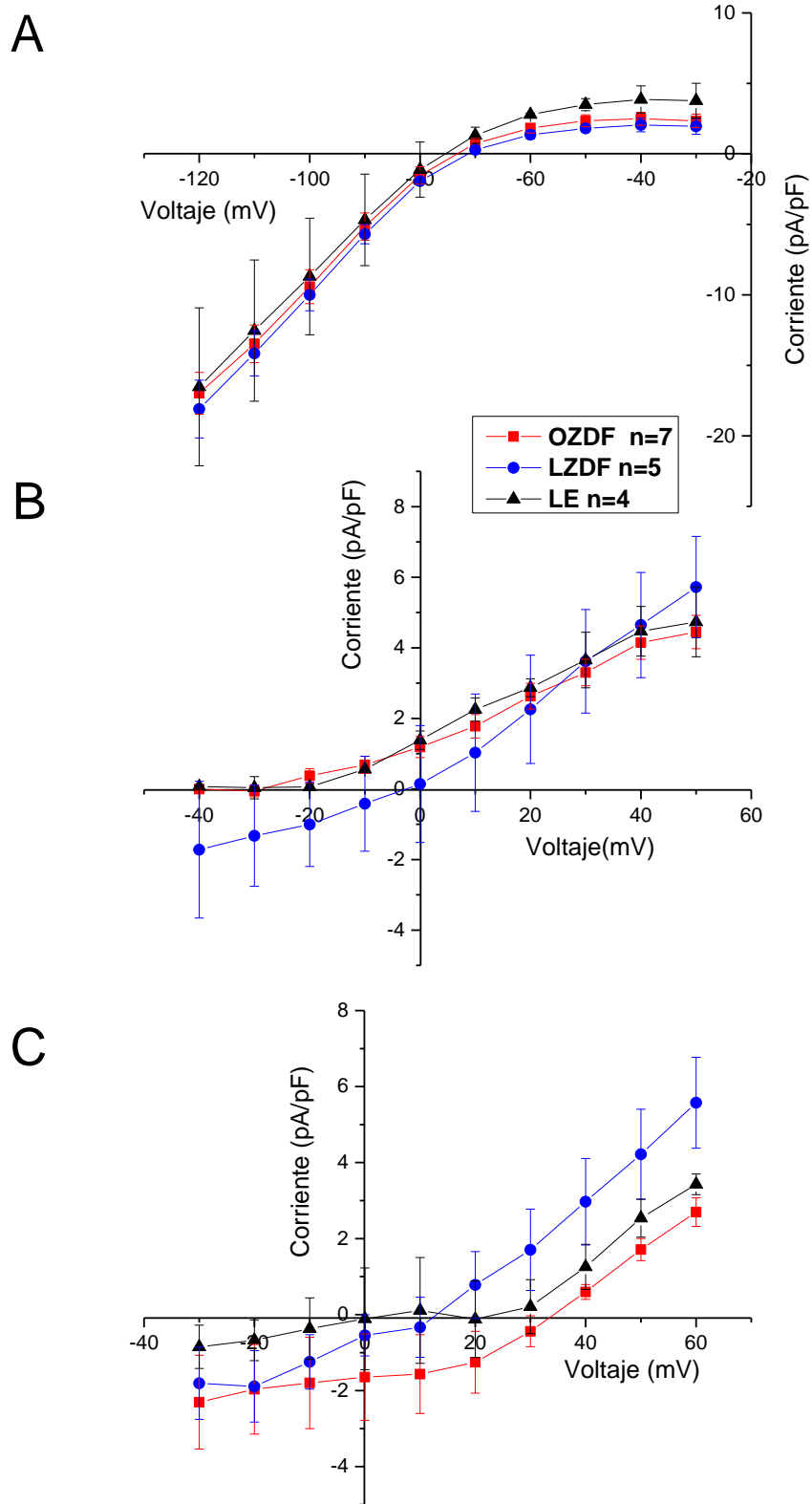
### 3.3.5 Papilar izquierdo

En la Figura 25, se muestran los registros de PA obtenidos del papilar del ventrículo izquierdo del corazón de rata OZDF (rojo), LZDF (azul) y Long-Evans (negro). En el **cuadro de la Figura 25** se muestra la media  $\pm$  ES de los parámetros medidos de los potenciales de acción en los tres grupos experimentales. No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en ninguno de los parámetros estudiados.

En la **Figura 2**, se muestran las gráficas de la densidad de corriente  $I_{K1}$  (panel A),  $I_K$  (panel B) e  $I_{to}$  (panel C) obtenidas de célula del papilar obtenido de ventrículo izquierdo. No encontramos diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en ninguna de las corrientes medidas.



**Figura 25. Potencial de acción de Papilar izquierdo y cuadro de los parámetros analizados.** Potencial de acción de rata OZDF (roja), LZDF (azul) y LE (negra). Todos los datos obtenidos se representan como media  $\pm$  E.E., prueba estadística Kruskal Wallis con un valor de  $p < 0.05$ .

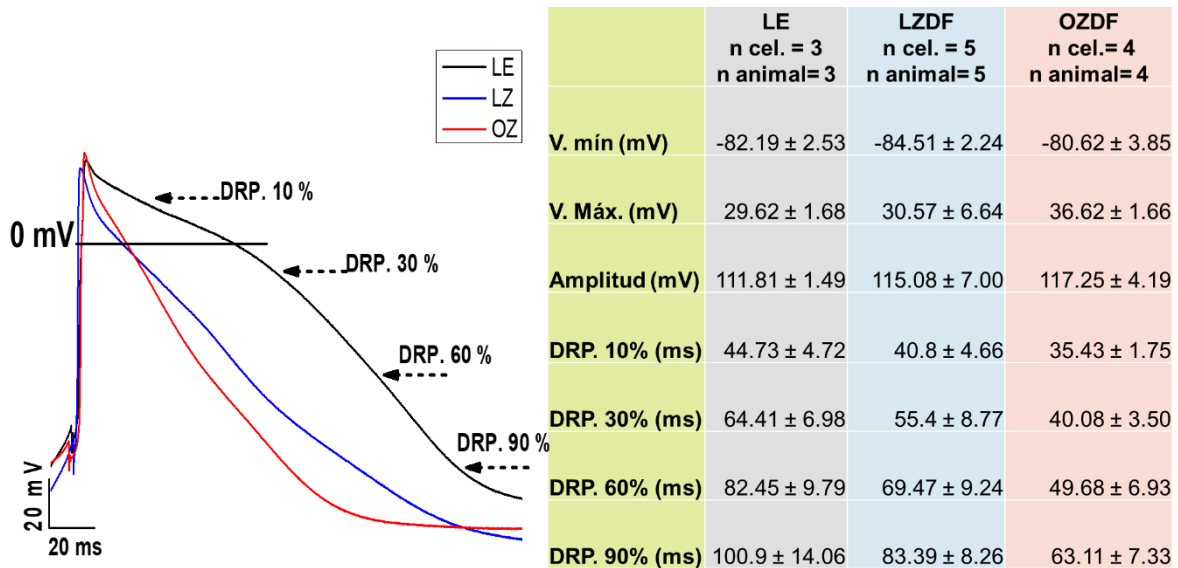


**Figura 26. Curvas corriente-voltaje de Papilar izquierdo.** Corriente  $I_{k1}$  (A),  $I_k$  (B) y corriente  $I_{to}$  (C) Se empleó la prueba estadística Kruskal Wallis con un valor de  $p < 0.05$ .

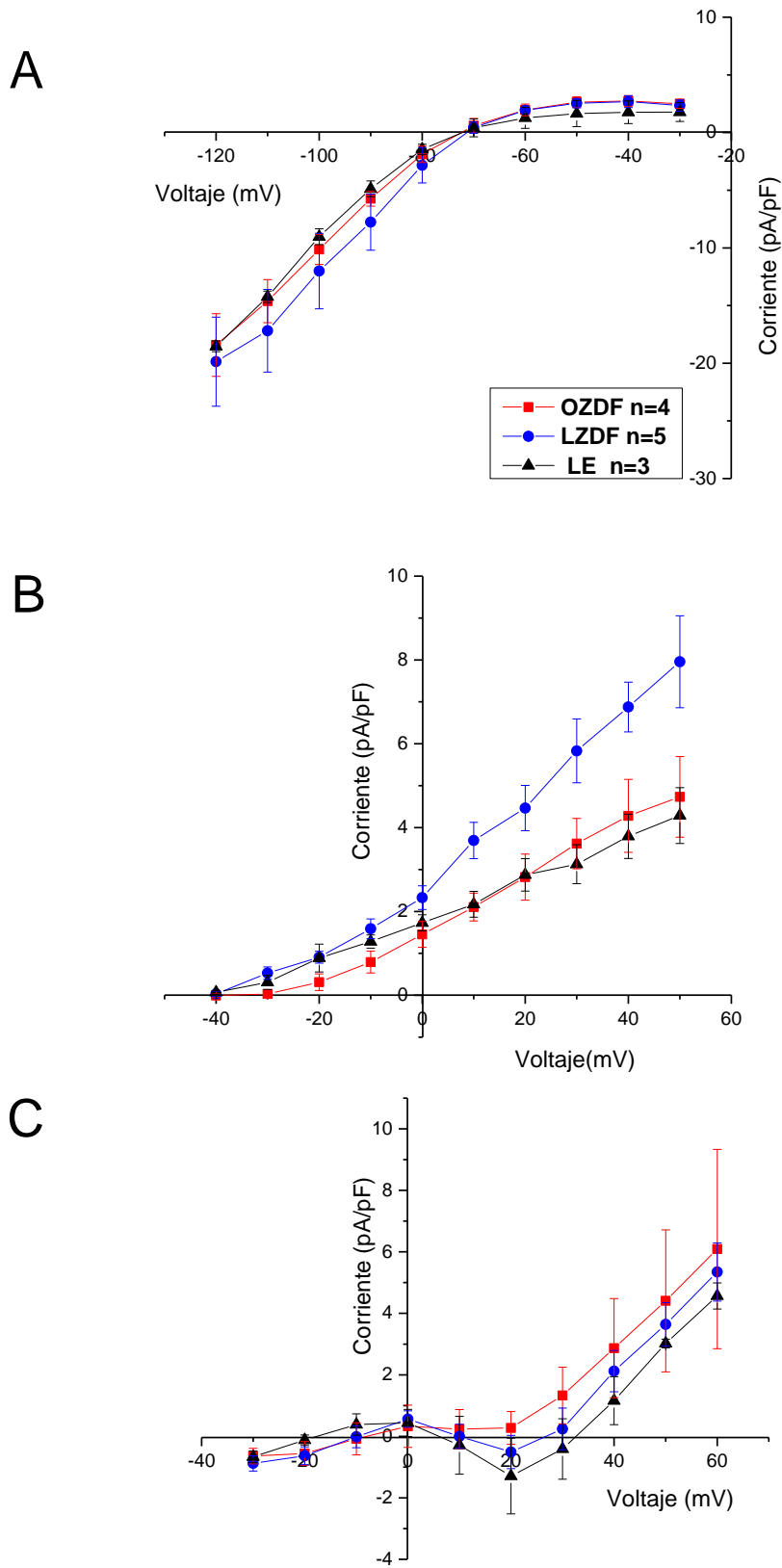
### 3.3.6 Papilar derecho

En la **Figura 27**, se muestran los registros de PA obtenidos del papilar del ventrículo derecho del corazón de rata OZDF (rojo), LZDF (azul) y Long-Evans (negro). En el **cuadro de la Figura 27** se muestra la media  $\pm$  ES de los parámetros medidos de los potenciales de acción en los tres grupos experimentales. No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en ninguno de los parámetros estudiados.

En la **Figura 28**, se muestran las gráficas de la densidad de corriente  $I_{K1}$  (panel A),  $I_K$  (panel B) e  $I_{to}$  (panel C) obtenidas de célula del papilar obtenido de ventrículo derecho. No encontramos diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en ninguna de las corrientes medidas.



**Figura 27. Potencial de acción de Papilar derecho y cuadro de los parámetros analizados.** Potencial de acción de rata OZDF (roja), LZDF (azul) y LE (negra). Todos los datos obtenidos se representan como media  $\pm$  E.E., prueba estadística Kruskal Wallis con un valor de  $p < 0.05$ .



**Figura 28. Curvas corriente-voltaje de Papillar derecho.** Corriente  $I_{k1}$  (A),  $I_k$  (B) y corriente  $I_{to}$  (C) Se empleó la prueba estadística Kruskal Wallis con un valor de  $p < 0.05$ .

## Discusión

En la actualidad no existen dudas sobre la relación entre DM y enfermedades cardiovasculares, por lo que numerosos estudios se han realizado con la finalidad de comprender los mecanismos moleculares por los cuales la DM causa alteraciones sobre vasos sanguíneos y el corazón.

A nivel cardiaco, la mayoría de los estudios donde se ha estudiado los efectos de la DM se han realizados en modelos animales con DM1, la cual representa tan solo el 10% de los pacientes diagnosticados con diabetes. Esto podría explicarse por la complejidad que representa la generación de un modelo animal, que reproduzca fielmente, todas las alteraciones que se presentan en las personas con DM2.

El modelo de ratas Zucker Diabetic Fatty (ZDF) ha sido utilizado ampliamente utilizado en el estudio de las alteraciones cardiovasculares causadas por la DM2 (19,96–99) , en particular, porque este modelo presenta varios de los signos clínicos que presentan los pacientes con DM2, como son: obesidad, incremento de la ingesta de alimentos, dislipidemia, hiperglicemia, hiperinsulinemia, disfunción de células  $\beta$ -pancreáticas, resistencia a la insulina, hipertensión arterial (97,100) y cardiopatías (101).

Por esto en el presente proyecto utilizamos a la rata ZDF para estudiar las posibles alteraciones que causa la DM sobre las propiedades eléctricas activas en el corazón.

Existen numerosos trabajos en los que se ha tomado al fenotipo delgado (Lean de la cepa Zucker, denominado en la presente tesis como LZDF), como grupo control o "sano", bajo el entendido de que al tener una mutación de tipo recesivo, estas no expresarán la enfermedad al ser heterocigotas (102–107). Sin embargo, en este trabajo usamos también a la cepa de ratas Long Evans como grupo control ya que éstas no presentan alteración genética alguna, y porque las ratas ZDF provienen de la cepa Long Evans (99).

Nuestros resultados confirman el fenotipo obeso ya que las ratas OZDF son estadísticamente más pesadas y grandes que sus grupos controles. El incremento de la longitud del fenotipo obeso nos haría suponer que este sería una causa probable del incremento de su peso. Sin embargo, al calcular el IMC observamos que esta variable resultó ser mayor en la rata OZDF a comparación de su control. Este último dato sugiere que el aumento en el peso puede ser debido más a un aumento en el tejido graso que en el incremento en el tamaño del grupo OZDF. La presencia de obesidad en las ratas OZDF fue demostrada por el incremento del 600% en el tejido adiposo formado alrededor del epidídimo y por el incremento del 1200% en la grasa peripancreática. Con todo esto, podemos afirmar que, de acuerdo a lo reportado en la literatura, las ratas OZDF presentan obesidad a la edad de  $12 \pm 3$  semanas de edad (correspondiente a 20 a 25 años de edad en el humano). Con estos resultados podemos concluir que la rata OZDF en efecto, es un modelo animal que presenta obesidad, como ha sido reportado por otros (100,108).

Así mismo, nuestros resultados confirman el fenotipo diabético de las ratas OZDF al presentar valores estadísticamente incrementados tanto en los niveles basales de glucosa en ratas sin ayuno, así como en los niveles de glucosa durante la curva de tolerancia a la glucosa. Esta información nos permite corroborar que las ratas OZDF presentan hiperglicemia e intolerancia a la glucosa, ambos criterios que, de acuerdo con la ADA, son suficientes para diagnosticar DM2 en humanos, permitiendo aseverar que las ratas OZDF, en efecto, desarrollan DM2 (109). Cabe señalar que dado a que actualmente no se cuenta con criterios y puntos de corte establecidos para el diagnóstico de DM2 en roedores, y por la cercanía de los valores de glucosa y los de la curva de tolerancia a la glucosa con los obtenidos en humanos, nos basamos en los criterios indicados por la ADA para el diagnóstico de DM2.

Una vez confirmada la presencia de diabetes en las ratas OZDF y la ausencia de ésta en las ratas control procedimos a evaluar los efectos de la DM2 sobre las propiedades eléctricas del corazón.

Al evaluar la frecuencia cardiaca en los tres grupos de animales, encontramos un aumento significativo en el intervalo R-R y la respectiva reducción significativa de la frecuencia cardiaca en las ratas de la cepa ZDF (LZDF y OZDF) en comparación con el grupo control (Long Evans). Este efecto no puede ser atribuido a la DM2, ya que la rata LZDF no es diabética, por lo que una posibilidad es que la bradicardia se deba principalmente a la mutación genética que portan las ratas ZDF y que no se encuentra presente en las ratas Long Evans. Este resultado es relevante, ya que se pone a discusión el uso de las ratas LZDF como control de la rata OZDF al no considerar que la mutación que porta la rata LZDF podría alterar la función cardiaca de forma independiente de la DM. Estos resultados nos llevan a concluir que la DM2 no causa alteraciones en la frecuencia cardiaca.

En modelos animales con DM1 y DM2, una disminución en la frecuencia cardiaca se correlacionó con un incremento en el intervalo QT y el intervalo QTc del electrocardiograma (1,37,69,70,72,74–76,110). Nosotros al evaluar el intervalo R-T y RTc del electrocardiograma, no encontramos diferencias significativas en estos parámetros, indicando que la DM2 no causa alteraciones en el intervalo QT del electrocardiograma. Este dato controversial los podemos explicar de la siguiente manera: en nuestro estudio utilizamos ratas de  $12 \pm 3$  semanas de edad que según Sengupta y Cols., en 2012 (111) correspondería en el humano, a una edad de 20-25 años de edad. Según datos del atlas de diabetes 2017 (112) los grupos de edad con mayor prevalencia de DM son los de 60-74 años de edad con una prevalencia superior al 17%, mientras que la prevalencia para los pacientes con edades de 25-29 años es de tan solo 3%. Por esta razón, es probable que, en la edad de nuestro modelo animal, la DM se encuentre en sus etapas iniciales y por lo tanto los daños a nivel cardiaco no se hayan establecido contundentemente y por esto no sean evidentes experimentalmente. Consideramos por lo tanto que se deberán realizar estos mismos estudios en animales con edades mayores a la de este estudio para constatar estos resultados.

Al estudiar el efecto de la DM2 sobre la variabilidad cardiaca utilizando como herramienta los diagramas de Poincaré y los valores de SD1 y SD2, encontramos

que las ratas OZDF presentaron una disminución significativa en SD2 en comparación con los dos grupos de ratas control. Estos datos sugieren que la DM2 podría estar causando una neuropatía diabética, en particular afectando al sistema nervioso parasimpático, reduciendo su actividad (113). Este resultado entonces, confirma la hipótesis planteada en la presente tesis, la diabetes mellitus altera las propiedades eléctricas activas del corazón. Particularmente la variabilidad de la frecuencia cardiaca. Este resultado es relevante dado a que estas alteraciones se estarían presentando en etapas tempranas de la enfermedad, como se ha discutido en el párrafo anterior.

En el presente estudio únicamente encontramos diferencias significativas en la duración del PA al 10% de la repolarización en epicardio de la rata OZDF en comparación con la rata LZDF y no encontramos diferencias significativas en los potenciales de acción en los demás tejidos estudiados. Una de las posibles explicaciones para este resultado, es que experimentalmente obtuvimos una gran variabilidad en la morfología y en los parámetros del PA en los tres grupos de ratas. Si bien la "n" experimental fue obtenida de al menos 3 animales, consideramos que para disminuir la variabilidad y poder concluir si realmente la DM2 no altera la morfología del PA es necesario incrementar la "n". Por la duración de la Maestría, no nos fue posible realizar estos experimentos.

En cuanto a las corrientes de  $K^+$ , encontramos que la DM2 causa una reducción en la densidad de corriente  $I_K$  en la pared libre del ventrículo derecho y el septum intraventricular. Estos datos concuerdan con los reportados en animales con DM1, entre ellos perro (1), conejo (73,79), ratón (68,76) y en rata (77,91), siendo estos modelos de DM1 inducida por estreptozotocina y aloxano.

También de acuerdo con lo reportado en animales con DM1: perro (1), conejo (73,79), ratón (76) y rata (77,85,92), la DM2 en nuestro estudio no causó alteraciones en la densidad de corriente  $I_{K1}$ .

Por otro lado, contrario a lo reportado en la DM1, la cual causa una reducción en la corriente  $I_{to}$ , en diversos modelos animales (70,76,87–90,77,79,80,82–86) de DM1, en ninguno de los tejidos estudiados encontramos alteraciones en esta

corriente. Estos resultados indican que la DM2 no modifica la corriente  $I_{to}$ . Esta discrepancia en cuanto a los resultados puede ser debida al tiempo de evolución de la DM2 en nuestros animales, que es reducida, o bien, puede ser a la diferencia en el mecanismo molecular por el cual la DM2 causa alteraciones a nivel cardiaco.

Una de la fortaleza de nuestro estudio es la de haber empleado ratas de la cepa Zucker Diabetic Fatty, un bio-modelo que presenta varias de las características presentes en los pacientes con DM2, la más frecuente en el humano. En adición se utilizaron ratas jóvenes de 12 semanas de edad que corresponderían en el humano a una edad de 20 a 25 años de edad, esto con la finalidad de estudiar los efectos de la DM2 sobre las propiedades eléctricas activas del corazón en etapas iniciales de la enfermedad. Nuestros resultados demuestran que ya desde etapas tempranas, la DM2 causa una reducción de la variabilidad de la frecuencia cardiaca, reduce la duración del potencial de acción en el tejido epicárdico, y disminuye la densidad de la corriente  $I_K$  en células del septum intraventricular y pared libre del ventrículo derecho. Estos resultados podrían ser relevantes para el diseño de estrategias de tratamiento en las etapas iniciales de la enfermedad.

Comparando nuestros resultados con los obtenidos en modelos animales de DM1, los cambios en la duración del potencial de acción y la densidad de las corrientes de potasio, fueron menos marcadas en nuestro modelo experimental. Esto puede ser explicado por el hecho de que en el presente estudio se utilizaron animales en etapas tempranas de la enfermedad (DM2) o porque los mecanismos moleculares implicados en las alteraciones a nivel cardiaco son diferentes a los provocados por la DM1. Una posibilidad es que la DM2 modifique otras corrientes iónicas implicadas en la duración y morfología del PA como son las corrientes de  $Na^+$ , corrientes de  $Ca^{2+}$  y la del intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$ .

## Limitaciones del estudio.

1.- Se utilizaron solo ratas jóvenes (en etapas tempranas de DM2), y se requieren estudios en ratas con mayor tiempo de evolución de la DM2 para determinar el grado de afectación que genera la DM2 sobre la actividad eléctrica del corazón.

2.- En el presente estudio se presentó una gran variabilidad en la duración del PA en los diferentes tejidos estudiados, por lo que se habría requerido aumentar el número de experimentos para obtener datos más homogéneos.

3.- Solo se estudiaron las corrientes de  $K^+$ , se requiere investigar si la DM2 puede afectar las corrientes de  $Na^+$ , de  $Ca^{2+}$  y del intercambiador  $Na^2+/Ca^{2+}$ .

## Conclusiones

1. La DM2 no causa alteraciones en la frecuencia cardiaca
2. La DM2 no causa alteraciones en el intervalo R-T y R-Tc
3. La DM2 disminuye la variabilidad de la frecuencia cardiaca
4. La DM2 causa alteraciones en el potencial de acción de tejido epicárdico pero no el de otros tejidos del corazón
5. La DM2 disminuye la densidad de la corriente  $I_K$  y estos cambios varían dependiendo de la región del corazón.
6. La DM2 no altera la densidad de la corriente  $I_{K1}$ .
7. La DM2 no altera la densidad de la corriente  $I_{to}$ .

## **Perspectiva**

- 1.- Realizar estudios en ratas de mayor edad para estudiar los efectos de la DM2 en etapas avanzadas de la enfermedad.
- 2.- Estudiar el efecto de la DM2 sobre otras corrientes iónicas implicadas en la morfología del potencial de acción, en particular las corrientes de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ .
- 3.- Por medio de técnicas de biología molecular, estudiar las alteraciones causadas por la DM2 sobre la expresión de los canales de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ .

## 4. Referencias

1. Lengyel C, VIRAG L, BIRO T, JOST N, MAGYAR J, BILICZKI P, et al. Diabetes mellitus attenuates the repolarization reserve in mammalian heart. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2007 Feb 1;73(3):512–20. Available from: <https://academic.oup.com/cardiovascres/article-lookup/doi/10.1016/j.cardiores.2006.11.010>
2. Haghvirdizadeh P, Mohamed Z, Abdullah NA, Haghvirdizadeh P, Haerian MS, Haerian BS. KCNJ11: Genetic Polymorphisms and Risk of Diabetes Mellitus. *J Diabetes Res* [Internet]. 2015;2015:908152. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/jdr/2015/908152/>
3. American Diabetes Association. Introduction: Standards of Medical Care in Diabetes—2019. *Diabetes Care* [Internet]. 2019 Jan 17;42(Supplement 1):S1–2. Available from: <https://doi.org/10.2337/dc19-SINT01>
4. Wu Y, Ding Y, Tanaka Y, Zhang W. Risk Factors Contributing to Type 2 Diabetes and Recent Advances in the Treatment and Prevention. *Int J Med Sci* [Internet]. 2014 [cited 2017 Oct 7];11(11):1185–200. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25249787>
5. OMS. Organización Mundial De La Salud [Internet]. Centro de prensa. World Health Organization; 2017 [cited 2017 Nov 6]. Available from: <http://www.who.int/es/>
6. ENSANUT. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. In 2016. p. 149. Available from: <http://fmdiabetes.org/encuesta-nacional-salud-nutricion-medio-camino-2016/>
7. ENSANUT. Summary for Policymakers. In: Intergovernmental Panel on Climate Change, editor. *Climate Change 2013 - The Physical Science Basis* [Internet]. Cambridge: Cambridge University Press; 2012. p. 1–30. Available from: <http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf>
8. Instituto Mexicano del Seguro. Diagnóstico y Tratamiento de la Evidencias y Recomendaciones. In: *Guía de practica clinica* [Internet]. 2017. p. 4–71. Available from: <http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/Cathttp://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/IMSS-706-14-TxDermatitisatopica/706GER.pdfalogoMaestro/IMSS-706-14-TxDermatitisatopica/706GER.pdf>
9. Bello-Chavolla OY, Rojas-Martinez R, Aguilar-Salinas CA, Hernández-Avila M. Epidemiology of diabetes mellitus in Mexico. *Nutr Rev* [Internet]. 2017 Jan 3;75(suppl 1):4–12. Available from: <https://academic.oup.com/nutritionreviews/article-lookup/doi/10.1093/nutrit/nuw030>
10. Chait A, Goldberg I. Treatment of Dyslipidemia in Diabetes: Recent Advances and Remaining Questions. *Curr Diab Rep* [Internet]. 2017 Nov 27;17(11):112. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11892-017-0942-8>
11. Acharjee S, Ghosh B, Al-Dhubiab BE, Nair AB. Understanding Type 1 Diabetes: Etiology and Models. *Can J Diabetes* [Internet]. 2013 Aug;37(4):269–76. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1499267113007363>

12. Zucker LM, Antoniades HN. Insulin and Obesity in the Zucker Genetically Obese Rat "Fatty." *Endocrinology* [Internet]. 1972 May;90(5):1320–30. Available from: <https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/endo-90-5-1320>
13. Clark JB, Palmer CJ, Shaw WN. The Diabetic Zucker Fatty Rat. *Exp Biol Med* [Internet]. 1983 May 1;173(1):68–75. Available from: <http://ebm.sagepub.com/lookup/doi/10.3181/00379727-173-41611>
14. Mulder GB, Luo S, Gramlich P. The Zucker Diabetic Fatty (ZDF) Rat: Diet Evaluation Study for the Induction of Type 2 Diabetes in Obese Female ZDF Rats [Internet]. *Frontiers: A Journal of Women Studies*. 2010. Available from: [http://www.criver.com/files/pdfs/rms/zdf/rm\\_rm\\_r\\_zdf\\_diet\\_eval\\_tech\\_sheet.aspx](http://www.criver.com/files/pdfs/rms/zdf/rm_rm_r_zdf_diet_eval_tech_sheet.aspx)
15. Techniques C. *Animal Models in Diabetes Research* [Internet]. Joost H-G, Al-Hasani H, Schürmann A, editors. Vol. 933. Totowa, NJ: Humana Press; 2012. 229–253 p. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-068-7>
16. Weigt C, Hertrampf T, Flenker U, Hülsemann F, Kurnaz P, Fritzscheier KH, et al. Effects of estradiol, estrogen receptor subtype-selective agonists and genistein on glucose metabolism in leptin resistant female Zucker diabetic fatty (ZDF) rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* [Internet]. 2015 Nov;154:12–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.06.002>
17. Duffy S, Lutz TA, Boyle CN. Rodent models of leptin receptor deficiency are less sensitive to amylin. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* [Internet]. 2018 Oct 1;315(4):R856–65. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpregu.00179.2018>
18. Lepage DF, Conlon RA. *Animal Models of Disease* [Internet]. Vol. 129. 2007. 41–67 p. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1257773/%5Chttp://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Animal+Models+for+Disease#0>
19. Marsh SA, Powell PC, Agarwal A, Dell'Italia LJ, Chatham JC. Cardiovascular dysfunction in Zucker obese and Zucker diabetic fatty rats: role of hydronephrosis. *Am J Physiol Circ Physiol* [Internet]. 2007 Jul 1 [cited 2015 Jan 21];293(1):H292–8. Available from: <http://ajpheart.physiology.org/content/293/1/H292>
20. Boron WF, Boulpaep EL. *Fisiología Médica*. 3ra ed. ELSEVIER; 2017. 1290 p.
21. Hall JE. *Tratado de Fisiología Médica*. 13a ed. Mississippi: ELSEVIER; 2016. 1170 p.
22. Silverthorn A. Summary for Policymakers [Internet]. Intergovernmental Panel on Climate Change, editor. Vol. 53, *Climate Change 2013 - The Physical Science Basis*. Cambridge: Cambridge University Press; 2013. 1–30 p. Available from: [https://www.cambridge.org/core/product/identifier/CBO9781107415324A009/type/book\\_part](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/CBO9781107415324A009/type/book_part)
23. Xin M, Olson EN, Bassel-Duby R. Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2013 Aug 10;14(8):529–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23839576%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3757945>

24. Liu DW, Gintant GA, Antzelevitch C. Ionic bases for electrophysiological distinctions among epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes from the free wall of the canine left ventricle. *Circ Res* [Internet]. 1993 Mar;72(3):671–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8431990>
25. Weisbrod D, Khun SH, Bueno H, Peretz A, Attali B. Mechanisms underlying the cardiac pacemaker: the role of SK4 calcium-activated potassium channels. *Acta Pharmacol Sin* [Internet]. 2016 Jan 4;37(1):82–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/aps.2015.135>
26. Blaustein MP, Kao JPY, Matteson DR. *Celular Physiology and Neurophysiology*. 2a ed. ELSEVIER; 2011. 368 p.
27. Antzelevitch C, Fish J. Electrical heterogeneity within the ventricular wall. *Basic Res Cardiol* [Internet]. 2001 Dec 1;96(6):517–27. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s003950170002>
28. Albarado-Ibañez A, Avelino-Cruz JE, Velasco M, Torres-Jácome J, Hiriart M. Metabolic Syndrome Remodels Electrical Activity of the Sinoatrial Node and Produces Arrhythmias in Rats. Bencharit S, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Nov 8;8(11):e76534. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0076534>
29. Farraj AK, Hazari MS, Cascio WE. The Utility of the Small Rodent Electrocardiogram in Toxicology. *Toxicol Sci* [Internet]. 2011 May;121(1):11–30. Available from: <https://academic.oup.com/toxsci/article/1636867/The>
30. Nerbonne JM, Kass RS. Molecular Physiology of Cardiac Repolarization. *Physiol Rev* [Internet]. 2005 Oct;85(4):1205–53. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00002.2005>
31. Konopelski P, Ufnal M. Electrocardiography in rats: a comparison to human. *Physiol Res* [Internet]. 2016 Nov 23;65(5):717–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27429108>
32. Kittnar O. Electrocardiographic changes in diabetes mellitus. *Physiol Res* [Internet]. 2015;64 Suppl 5:S559-66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26674294>
33. Shen MJ, Zipes DP. Role of the Autonomic Nervous System in Modulating Cardiac Arrhythmias. *Circ Res* [Internet]. 2014 Mar 14 [cited 2017 Nov 8];114(6):1004–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24625726>
34. Johnston J, Pal S, Nagele P. Perioperative Torsade de Pointes. *Anesth Analg* [Internet]. 2013 Sep;117(3):559–64. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00000539-201309000-00003>
35. Eryu Y, Hata T, Nagatani A, Funamoto Y, Uchida H, Fujino M, et al. Electrocardiographic RR and QT Interval Variability in Patients with Atrial Septal Defect and Healthy Children. *Pediatr Cardiol* [Internet]. 2017 Mar 5;38(3):582–7. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00246-016-1551-z>
36. Lepeschkin E, Surawicz B. The Measurement of the Q-T Interval of the Electrocardiogram. *Circulation* [Internet]. 1952 Sep;6(3):378–88. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.CIR.6.3.378>
37. Arroyo-Carmona RE, López-Serrano AL, Albarado-Ibañez A, Mendoza-Lucero FMF,

- Medel-Cajica D, López-Mayorga RM, et al. Heart Rate Variability as Early Biomarker for the Evaluation of Diabetes Mellitus Progress. *J Diabetes Res* [Internet]. 2016;2016:1–8. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/jdr/2016/8483537/>
38. Castro-Torres Y. Ventricular repolarization markers for predicting malignant arrhythmias in clinical practice. *World J Clin Cases* [Internet]. 2015;3(8):705. Available from: <http://www.wjgnet.com/2307-8960/full/v3/i8/705.htm>
  39. Venable PW, Taylor TG, Shibayama J, Warren M, Zaitsev A V. Complex structure of electrophysiological gradients emerging during long-duration ventricular fibrillation in the canine heart. *Am J Physiol Circ Physiol* [Internet]. 2010 Nov;299(5):H1405–18. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2993199&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  40. Michal Zorniak, MD, Katarzyna Mitrega, MD, Szymon Bialka, MD, Maurycy Porc, MD, PhD, and Tadeusz F. Krzeminski, MD P. Comparison of Thiopental, Urethane, and Pentobarbital in the Study of Experimental Cardiology in Rats In Vivo. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2010;56(Figure 2):2652–5.
  41. Rajendra Acharya U, Paul Joseph K, Kannathal N, Lim CM, Suri JS. Heart rate variability: a review. *Med Biol Eng Comput* [Internet]. 2006 Dec 17;44(12):1031–51. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11517-006-0119-0>
  42. Fei L, Copie X, Malik M, Camm AJ. Short- and long-term assessment of heart rate variability for risk stratification after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* [Internet]. 1996 Apr;77(9):681–4. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002914997891990>
  43. Goldberger A. Is the Normal Heartbeat Chaotic or Homeostatic? *Physiology* [Internet]. 1991 Apr 1;6(2):87–91. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/physiologyonline.1991.6.2.87>
  44. Goshvarpour A, Goshvarpour A. Poincare indices for analyzing meditative heart rate signals. *Biomed J* [Internet]. 2015;38(3):229. Available from: [http://biomedj.cgu.edu.tw/pdfs/2015/38/3/images/BiomedJ\\_2015\\_38\\_3\\_229\\_143528.pdf](http://biomedj.cgu.edu.tw/pdfs/2015/38/3/images/BiomedJ_2015_38_3_229_143528.pdf)
  45. Albarado-Ibañez A, Elena Arroyo-Carmona R, Alexandra Bernabé-Sánchez D, Limón-Cantú M, López-Silva B, Lucía Ita-Amador M, et al. Heart Rate Variability as Biomarker for Prognostic of Metabolic Disease. In: *Autonomic Nervous System Monitoring [Working Title]* [Internet]. IntechOpen; 2019. p. 13. Available from: <http://www.intechopen.com/books/trends-in-helicobacter-pylori-infection/floating-drug-delivery-systems-for-eradication-of-helicobacter-pylori-in-treatment-of-peptic-ulcer-d>
  46. Karmakar CK, Khandoker AH, Gubbi J, Palaniswami M. Defining asymmetry in heart rate variability signals using a Poincaré plot. *Physiol Meas* [Internet]. 2009 Nov 1;30(11):1227–40. Available from: <http://stacks.iop.org/0967-3334/30/i=11/a=007?key=crossref.95c5e2270b84853e615da5155d9f3fab>
  47. Brennan M, Palaniswami M, Kamen P. Do existing measures of Poincare plot geometry reflect nonlinear features of heart rate variability? *IEEE Trans Biomed Eng* [Internet]. 2001;48(11):1342–7. Available from:

<http://ieeexplore.ieee.org/document/959330/>

48. Brennan M, Palaniswami M, Kamen P. Poincaré plot interpretation using a physiological model of HRV based on a network of oscillators. *Am J Physiol Circ Physiol* [Internet]. 2002 Nov;283(5):H1873–86. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpheart.00405.2000>
49. Nguyen Phuc Thu T, Hernández AI, Costet N, Patural H, Pichot V, Carrault G, et al. Improving methodology in heart rate variability analysis for the premature infants: Impact of the time length. Baud O, editor. *PLoS One* [Internet]. 2019 Aug 9;14(8):e0220692. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0220692>
50. Phoemsapthawee J, Prasertsri P, Leelayuwat N. Heart rate variability responses to a combined exercise training program: correlation with adiposity and cardiorespiratory fitness changes in obese young men. *J Exerc Rehabil* [Internet]. 2019 Feb 25;15(1):114–22. Available from: <http://e-jer.org/journal/view.php?number=2013600651>
51. Kannel WB. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *JAMA J Am Med Assoc* [Internet]. 1979 May 11;241(19):2035–8. Available from: <http://jama.ama-assn.org/cgi/doi/10.1001/jama.241.19.2035>
52. Kannel WB. Framingham Study Insights on Diabetes and Cardiovascular Disease. *Clin Chem* [Internet]. 2011 Feb 1;57(2):338–9. Available from: <http://www.clinchem.org/cgi/doi/10.1373/clinchem.2010.149740>
53. Gulsin GS, Athithan L, McCann GP. Diabetic cardiomyopathy: prevalence, determinants and potential treatments. *Ther Adv Endocrinol Metab* [Internet]. 2019 Jan 27;10(6):204201881983486. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2042018819834869>
54. Paolillo S, Marsico F, Prastaro M, Renga F, Esposito L, De Martino F, et al. Diabetic Cardiomyopathy. *Heart Fail Clin* [Internet]. 2019 Jul;15(3):341–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.hfc.2019.02.003>
55. Dandamudi S, Slusser J, Mahoney DW, Redfield MM, Rodeheffer RJ, Chen HH. The Prevalence of Diabetic Cardiomyopathy: A Population-Based Study in Olmsted County, Minnesota. *J Card Fail* [Internet]. 2014 May;20(5):304–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1071916414000785>
56. Bell DSH, Goncalves E. Heart failure in the patient with diabetes: Epidemiology, aetiology, prognosis, therapy and the effect of glucose-lowering medications. *Diabetes, Obes Metab* [Internet]. 2019 Jun 6;21(6):1277–90. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/dom.13652>
57. Rodgers JL, Samal E, Mohapatra S, Panguluri SK. Hyperoxia-induced cardiotoxicity and ventricular remodeling in type-II diabetes mice. *Heart Vessels* [Internet]. 2018 May 5;33(5):561–72. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00380-017-1100-6>
58. Vandael E, Vandenberk B, Vandenberghe J, Willems R, Foulon V. Risk factors for QTc-prolongation: systematic review of the evidence. *Int J Clin Pharm* [Internet]. 2017 Feb 23;39(1):16–25. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11096-016-0414-2>
59. Sertbas Y, Ozdemir A, Sertbas M, Dayan A, Sancak S, Uyan C. The effect of

- glucose variability on QTc duration and dispersion in patients with type 2 diabetes mellitus. *Pakistan J Med Sci*. 2017;33(1):22–6.
60. Yang X, Su J, Zhang X, Zhao L, Xu F, Wang X, et al. The relationship between insulin sensitivity and heart rate-corrected QT interval in patients with type 2 diabetes. *Diabetol Metab Syndr* [Internet]. 2017 Dec 11 [cited 2017 Oct 7];9(1):69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28912840>
  61. Erande S, Sarwardekar S, Desai B. QT/QTc safety and efficacy evaluation of teneligliptin in Indian type 2 diabetes mellitus patients: the "thorough QT/QTc" study (Q-SET study). *Diabetes, Metab Syndr Obes Targets Ther* [Internet]. 2019 Jun;Volume 12:961–7. Available from: <https://www.dovepress.com/qtqtc-safety-and-efficacy-evaluation-of-teneligliptin-in-indian-type-2-peer-reviewed-article-DMSO>
  62. Ninkovic VM, Ninkovic SM, Miloradovic V, Stanojevic D, Babic M, Giga V, et al. Prevalence and risk factors for prolonged QT interval and QT dispersion in patients with type 2 diabetes. *Acta Diabetol* [Internet]. 2016 Oct 23;53(5):737–44. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00592-016-0864-y>
  63. Targher G, Valbusa F, Bonapace S, Bertolini L, Zenari L, Pichiri I, et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease with QTc interval in patients with type 2 diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* [Internet]. 2014 Jun;24(6):663–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.numecd.2014.01.005>
  64. Veglio M, Bruno G, Borra M, Macchia G, Bargero G, D'errico N, et al. Prevalence of increased QT interval duration and dispersion in type 2 diabetic patients and its relationship with coronary heart disease: a population-based cohort. *J Intern Med* [Internet]. 2002 Apr;251(4):317–24. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2796.2002.00955.x>
  65. Seferović PM, Paulus WJ. Clinical diabetic cardiomyopathy: a two-faced disease with restrictive and dilated phenotypes. *Eur Heart J* [Internet]. 2015 Jul 14;36(27):1718–27. Available from: <https://academic.oup.com/eurheartj/article-lookup/doi/10.1093/eurheartj/ehv134>
  66. Kang Y, Wang S, Huang J, Cai L, Keller BB. Right ventricular dysfunction and remodeling in diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Circ Physiol* [Internet]. 2019 Jan;316(1):H113–22. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpheart.00440.2018>
  67. Hamilton S, Terentyev D. Proarrhythmic Remodeling of Calcium Homeostasis in Cardiac Disease; Implications for Diabetes and Obesity. *Front Physiol* [Internet]. 2018 Oct 30;9(OCT):1–20. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2018.01517/full>
  68. Meo M, Meste O, Signore S, Sorrentino A, Cannata A, Zhou Y, et al. Reduction in Kv Current Enhances the Temporal Dispersion of the Action Potential in Diabetic Myocytes: Insights From a Novel Repolarization Algorithm. *J Am Heart Assoc* [Internet]. 2016 Feb 23;5(2):1–18. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/JAHA.115.003078>
  69. Lee T-I, Chen Y-C, Lin Y-K, Chung C-C, Lu Y-Y, Kao Y-H, et al. Empagliflozin Attenuates Myocardial Sodium and Calcium Dysregulation and Reverses Cardiac Remodeling in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Apr 4;20(7):1680. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/7/1680>

70. Chen L, Wang L, Xu B, Ni G, Yu L, Han B, et al. Mechanisms of  $\alpha 1$ -adrenoceptor mediated QT prolongation in the diabetic rat heart. *Life Sci* [Internet]. 2009 Feb;84(7–8):250–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320508005018>
71. Wang L-H, Li X-L, Li Q, Fu Y, Yu H-J, Sun Y-Q, et al. Berberine alleviates ischemic arrhythmias via recovering depressed Ito and ICa currents in diabetic rats. *Phytomedicine* [Internet]. 2012 Feb;19(3–4):206–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2011.11.002>
72. Zhang Y, Xiao J, Wang H, Luo X, Wang J, Villeneuve LR, et al. Restoring depressed HERG K + channel function as a mechanism for insulin treatment of abnormal QT prolongation and associated arrhythmias in diabetic rabbits . *Am J Physiol Circ Physiol*. 2006;291(3):H1446–55.
73. Lengyel C, Virág L, Kovács PP, Kristóf A, Pacher P, Kocsis E, et al. Role of slow delayed rectifier K + -current in QT prolongation in the alloxan-induced diabetic rabbit heart. *Acta Physiol* [Internet]. 2008 Mar;192(3):359–68. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1748-1716.2007.01753.x>
74. Howarth FC, Jacobson M, Shafiullah M, Adeghate E. Long-term effects of type 2 diabetes mellitus on heart rhythm in the Goto-Kakizaki rat. *Exp Physiol* [Internet]. 2008 Mar 1;93(3):362–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1113/expphysiol.2007.040055>
75. VanHoose L, Sawers Y, Loganathan R, Vacek JL, Stehno-Bittel L, Novikova L, et al. Electrocardiographic changes with the onset of diabetes and the impact of aerobic exercise training in the Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rat. *Cardiovasc Diabetol* [Internet]. 2010;9(1):56. Available from: <http://cardiab.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2840-9-56>
76. Torres-Jacome J, Gallego M, Rodríguez-Robledo JM, Sanchez-Chapula JA, Casis O. Improvement of the metabolic status recovers cardiac potassium channel synthesis in experimental diabetes. *Acta Physiol* [Internet]. 2013 Mar;207(3):447–59. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/apha.12043>
77. Shimoni Y, Firek L, Severson D, Giles W. Short-term diabetes alters K+ currents in rat ventricular myocytes. *Circ Res* [Internet]. 1994 Apr;74(4):620–8. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.RES.74.4.620>
78. Fu X, Pan Y, Cao Q, Li B, Wang S, Du H, et al. Metformin restores electrophysiology of small conductance calcium-activated potassium channels in the atrium of GK diabetic rats. *BMC Cardiovasc Disord* [Internet]. 2018 Dec 10;18(1):63. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L621584733%0Ahttp://dx.doi.org/10.1186/s12872-018-0805-5>
79. Zhang Y, Xiao J, Lin H, Luo X, Wang H, Bai Y, et al. Ionic Mechanisms Underlying Abnormal QT Prolongation and the Associated Arrhythmias in Diabetic Rabbits: A Role of Rapid Delayed Rectifier K+ Current. *Cell Physiol Biochem* [Internet]. 2007;19(5–6):225–38. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/100642>
80. Casis O, Gallego M, Iriarte M, Sánchez-Chapula JA. Effects of diabetic cardiomyopathy on regional electrophysiologic characteristics of rat ventricle.

- Diabetologia [Internet]. 2000 Jan 10;43(1):101–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s001250050013>
81. Xu Z. Up-regulation of K<sup>+</sup> channels in diabetic rat ventricular myocytes by insulin and glutathione. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2002 Jan;53(1):80–8. Available from: [https://academic.oup.com/cardiovasces/article-lookup/doi/10.1016/S0008-6363\(01\)00446-1](https://academic.oup.com/cardiovasces/article-lookup/doi/10.1016/S0008-6363(01)00446-1)
  82. Wang DW, Kiyosue T, Shigematsu S, Arita M. Abnormalities of K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> currents in ventricular myocytes from rats with chronic diabetes. *Am J Physiol Circ Physiol* [Internet]. 1995 Oct;269(4):H1288–96. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpheart.1995.269.4.H1288>
  83. Gallego M, Casis O. Regulation of cardiac transient outward potassium current by norepinephrine in normal and diabetic rats. *Diabetes Metab Res Rev* [Internet]. 2001 Jul;17(4):304–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/dmrr.212>
  84. Shimoni Y, Severson D, Giles W. Thyroid status and diabetes modulate regional differences in potassium currents in rat ventricle. *J Physiol* [Internet]. 1995 Nov 1;488(3):673–88. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.1995.sp020999>
  85. Shimoni Y, Ewart HS, Severson D. Insulin stimulation of rat ventricular K<sup>+</sup> currents depends on the integrity of the cytoskeleton. *J Physiol* [Internet]. 1999 Feb;514(3):735–45. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-7793.1999.735ad.x>
  86. Shimoni Y. Inhibition of the formation or action of angiotensin II reverses attenuated K<sup>+</sup> currents in type 1 and type 2 diabetes. *J Physiol* [Internet]. 2001 Nov;537(1):83–92. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-7793.2001.0083k.x>
  87. Li X, Xu Z, Li S, Rozanski GJ. Redox regulation of I<sub>to</sub> remodeling in diabetic rat heart. *Am J Physiol Circ Physiol* [Internet]. 2005 Mar;288(3):H1417–24. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpheart.00559.2004>
  88. Xi S, Zhou G, Zhang X, Zhang W, Cai L, Zhao C. Protective effect of total aralosides of *Aralia elata* (Miq) Seem (TASAES) against diabetic cardiomyopathy in rats during the early stage, and possible mechanisms. *Exp Mol Med* [Internet]. 2009;41(8):538. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.3858/emm.2009.41.8.059>
  89. Zhang X, Qu L, Chen L, Chen C. Improvement of cardiomyocyte function by in vivo hexarelin treatment in streptozotocin-induced diabetic rats. *Physiol Rep* [Internet]. 2018 Feb;6(4):e13612. Available from: <http://doi.wiley.com/10.14814/phy2.13612>
  90. Chang G, Yeh Y, Chen W, Ko Y, Pang JS, Lee H. Inhibition of Advanced Glycation End Products Formation Attenuates Cardiac Electrical and Mechanical Remodeling and Vulnerability to Tachyarrhythmias in Diabetic Rats. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 2019 Jan;368(1):66–78. Available from: <http://jpet.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/jpet.118.252080>
  91. Ding Y, Zou R, Judd RL, Zhong J. Endothelin-1 Receptor Blockade Prevented the Electrophysiological Dysfunction in Cardiac Myocytes of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Endocrine* [Internet]. 2006;30(1):121–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1385/ENDO:30:1:121>

92. Xu Z, Patel KP, Rozanski GJ. Metabolic basis of decreased transient outward K<sup>+</sup> current in ventricular myocytes from diabetic rats. *Am J Physiol Circ Physiol* [Internet]. 1996 Nov;271(5):H2190–6. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpheart.1996.271.5.H2190>
93. Acharya R, Kumar A, Bhat PS, Lim CM, Lyengar SS, Kannathal N, et al. Classification of cardiac abnormalities using heart rate signals. *Med Biol Eng Comput* [Internet]. 2004 May;42(3):288–93. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF02344702>
94. Ferrer T, Gallego M, Madrigal-Quiñónez R, Torres-Jácome J, Navarro-Polanco R, Cásis O, et al. DITPA restores the repolarizing potassium currents I<sub>tof</sub> and I<sub>ss</sub> in cardiac ventricular myocytes of diabetic rats. *Life Sci* [Internet]. 2006 Jul;79(9):883–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320506002426>
95. Anumonwo JMB, Tallini YN, Vetter FJ, Jalife J. Action Potential Characteristics and Arrhythmogenic Properties of the Cardiac Conduction System of the Murine Heart. *Circ Res* [Internet]. 2001 Aug 17;89(4):329–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11509449>
96. Hempe J, Elvert R, Schmidts H-L, Kramer W, Herling AW. Appropriateness of the Zucker Diabetic Fatty rat as a model for diabetic microvascular late complications. *Lab Anim* [Internet]. 2012 Jan;46(1):32–9. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1258/la.2011.010165>
97. Kitada M, Ogura Y, Koya D. Rodent models of diabetic nephropathy: their utility and limitations. *Int J Nephrol Renovasc Dis* [Internet]. 2016 Nov;9:279–90. Available from: <https://www.dovepress.com/rodent-models-of-diabetic-nephropathy-their-utility-and-limitations-peer-reviewed-article-IJNRD>
98. Shiota M, Printz RL. Diabetes in Zucker Diabetic Fatty Rat. In: *Animal Models in Diabetes Research* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2012. p. 103–23. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-068-7\\_8](http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-068-7_8)
99. Yokoi N, Hoshino M, Hidaka S, Yoshida E, Beppu M, Hoshikawa R, et al. A Novel Rat Model of Type 2 Diabetes: The Zucker Fatty Diabetes Mellitus ZFDM Rat. *J Diabetes Res* [Internet]. 2013;2013:1–9. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/jdr/2013/103731/>
100. Al-awar A, Kupai K, Veszelka M, Szűcs G, Attieh Z, Murlasits Z, et al. Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models. *J Diabetes Res* [Internet]. 2016;2016:1–12. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/jdr/2016/9051426/>
101. Povlsen JA, Løfgren B, Dalgas C, Birkler RID, Johannsen M, Støttrup NB, et al. Protection against myocardial ischemia-reperfusion injury at onset of type 2 diabetes in Zucker diabetic fatty rats is associated with altered glucose oxidation. *PLoS One*. 2013 Jan;8(5):e64093.
102. Adachi T, Kikuchi N, Yasuda K, Anahara R, Gu N, Matsunaga T, et al. Fibre type distribution and gene expression levels of both succinate dehydrogenase and peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  of fibres in the soleus muscle of Zucker diabetic fatty rats. *Exp Physiol* [Internet]. 2007 Mar 1;92(2):449–55. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1113/expphysiol.2006.035451>

103. Van den Brom CE, Bosmans JWAM, Vlasblom R, Handoko LM, Huisman MC, Lubberink M, et al. Diabetic cardiomyopathy in Zucker diabetic fatty rats: The forgotten right ventricle. *Cardiovasc Diabetol*. 2010;9:1–7.
104. Daniels A, Linz D, Van Bilsen M, Rütten H, Sadowski T, Ruf S, et al. Long-term severe diabetes only leads to mild cardiac diastolic dysfunction in Zucker diabetic fatty rats. *Eur J Heart Fail*. 2012;14(2):193–201.
105. Sharma S, Adroque J V., Golfman L, Uray I, Lemm J, Youker K, et al. Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. *FASEB J* [Internet]. 2004 Nov;18(14):1692–700. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5124535>
106. Wijekoon EP, Hall B, Ratnam S, Brosnan ME, Zeisel SH, Brosnan JT. Homocysteine Metabolism in ZDF (Type 2) Diabetic Rats. *Diabetes* [Internet]. 2005 Nov 1;54(11):3245–51. Available from: <http://diabetes.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/diabetes.54.11.3245>
107. Schäfer S, Huber J, Wihler C, Rütten H, Busch AE, Linz W. Impaired left ventricular relaxation in type 2 diabetic rats is related to myocardial accumulation of N  $\epsilon$  - (carboxymethyl) lysine. *Eur J Heart Fail* [Internet]. 2006 Jan;8(1):2–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.ejheart.2005.04.011>
108. Lum-Naihe K, Toedebusch R, Mahmood A, Bajwa J, Carmack T, Kumar SA, et al. Cardiovascular disease progression in female Zucker Diabetic Fatty rats occurs via unique mechanisms compared to males. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Dec 19;7(1):17823. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-18003-8>
109. American Diabetes Association. 6. Glycemic Targets: Standards of Medical Care in Diabetes—2018. *Diabetes Care* [Internet]. 2018 Jan;41(Supplement 1):S55–64. Available from: <http://care.diabetesjournals.org/lookup/doi/10.2337/dc18-S006>
110. Zorniak M, Mitrega K, Bialka S, Porc M, Krzeminski TF. Comparison of Thiopental, Urethane, and Pentobarbital in the Study of Experimental Cardiology in Rats In Vivo. *J Cardiovasc Pharmacol* [Internet]. 2010 Jul;56(1):38–44. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00005344-201007000-00006>
111. Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med* [Internet]. 2013 Jun;4(6):624–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23930179>
112. Aschner P. New IDF clinical practice recommendations for managing type 2 diabetes in primary care. *Diabetes Res Clin Pract* [Internet]. 2017 Oct;132:169–70. Available from: [file:///C:/Users/jesus\\_000/Downloads/Mexico diabetes 2016 OMS.pdf](file:///C:/Users/jesus_000/Downloads/Mexico%20diabetes%202016%20OMS.pdf)<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016882271731464X><http://www.diabetesatlas.org>[http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S034-98872015000800021&lng=en&nrm=iso&tlng=](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S034-98872015000800021&lng=en&nrm=iso&tlng=)
113. Albarado-Ibañez A, Arroyo-Carmona RE, Sánchez-Hernández R, Ramos-Ortiz G, Frank A, García-Gudiño D, et al. The Role of the Autonomic Nervous System on Cardiac Rhythm during the Evolution of Diabetes Mellitus Using Heart Rate Variability as a Biomarker. *J Diabetes Res* [Internet]. 2019 May 9;2019:1–10. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/jdr/2019/5157024/>



## **5. Anexos**

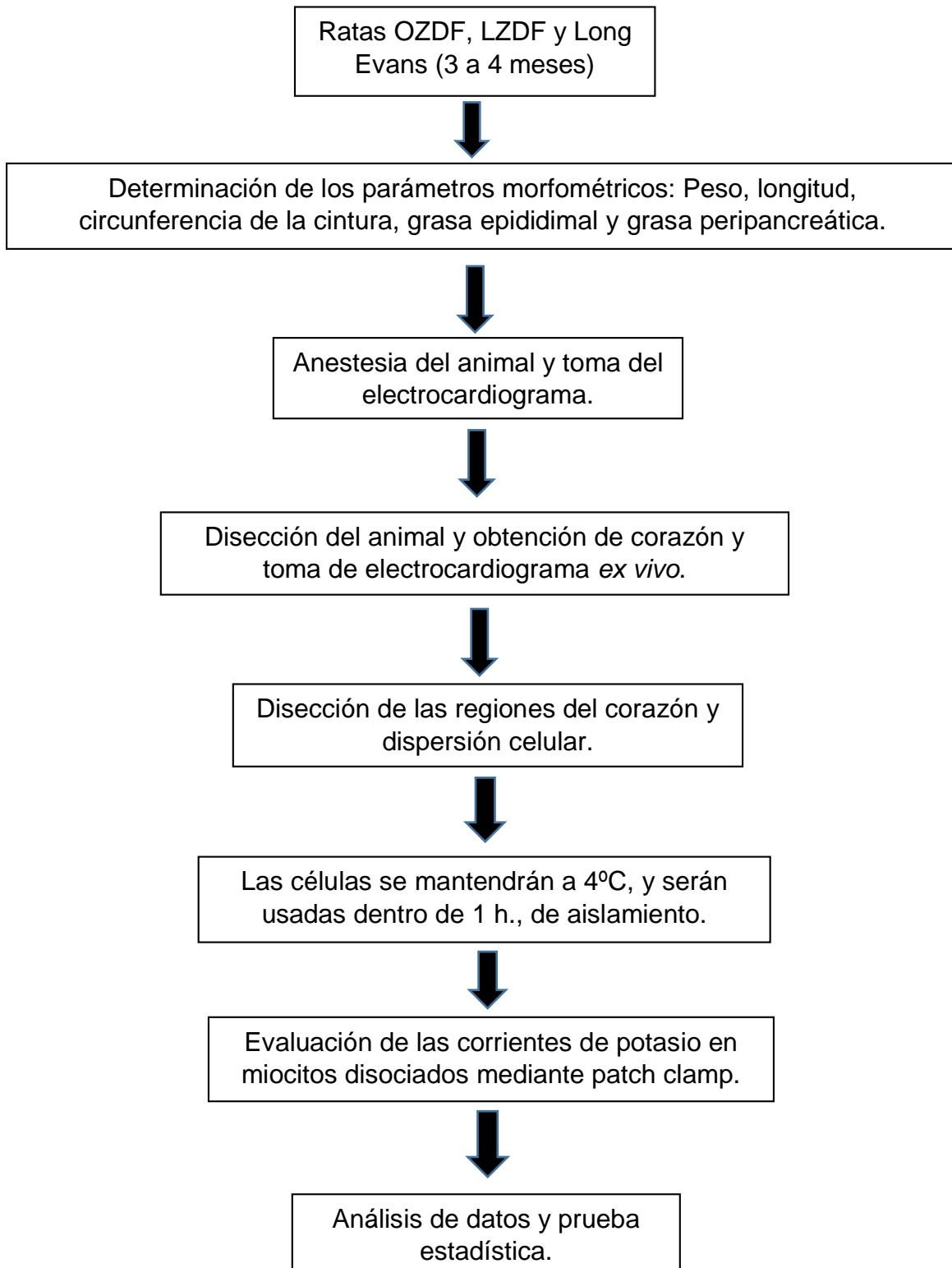
### **5.1 Diseño del Estudio**

Por objetivo	Comparativo
Por el tipo de Agente	Maniobra
Por la intervención	Experimental
Por la temporalidad	Transversal
Por la recolección de datos	Prolectivo
Por los componentes del grupo	Homodémico

### **5.2 Ubicación Espacio-Temporal**

El estudio se llevará a cabo en el Instituto de Fisiología y en el laboratorio de Fisiología Cardiovascular pertenecientes a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP); en el periodo comprendido entre agosto de 2017 y julio de 2019.

### 5.3 Estrategia de Trabajo



## 5.4 Definición de las Variables y Escalas de Medición

<b>Variables de Estudio</b>	<b>Definición Conceptual</b>	<b>Definición Operacional</b>	<b>Escala de Medición</b>	<b>Unidades de Escala</b>
Diabetes Mellitus tipo 2	Desorden metabólico que manifiesta niveles elevados de glucosa en sangre, caracterizado por un defecto en la acción y/o secreción de la insulina.	Niveles de glucosa en sangre mayores a 200 mg/dl en ratas después de aplicar la prueba de tolerancia a la glucosa en ratas	Categoría.	Con/Sin diabetes.
Peso	Cantidad en gramos del peso corporal de cada rata.	Medición del peso corporal	Cuantitativa Continúa.	Gramos (g).
Largo	Longitud comprendida entre la base de la cola y la punta de la nariz.	Medición de la distancia existente entre la base de la cola y la punta de la nariz	Cuantitativa Continúa.	Centímetros (cm).
Circunferencia abdominal	Longitud de la circunferencia de la parte media del abdomen.	Medición de la parte media abdominal	Cuantitativa Continúa.	Centímetros (cm).
Grasa Epididimal	Formación de tejido adiposo en la parte superior del epidídimo testicular.	Extracción de la grasa epididimal de ambos testículos	Cuantitativa Continúa.	Gramos (g).
Corrientes iónicas de potasio ( $I_k$ , $I_{k1}$ e $I_{to}$ )	Flujo de iones que pasa a través de canales en la membrana celular.	Flujo iónico que será cuantificado por medio de la técnica electrofisiológica, Whole Cell Patch Clamp	Cuantitativa Continúa.	Amperios (A).
Potencial de Acción	Cambio brusco y transitorio del gradiente de concentración iónico de una célula.	Cambio del gradiente iónico que será evaluado por medio de técnicas electrofisiológicas Current Clamp.	Cuantitativa Continúa.	Voltios (V).
Electrocardiograma	Registra total de la actividad eléctrica del corazón.	Actividad eléctrica promedio total del corazón evaluado con	Cuantitativa Continúa.	Voltios (V)

## **5.5 Diseño y Tipo de Muestreo**

Aleatorio Simple

## **5.6 Tamaño de la Muestra**

Por acuerdo, la "n" de al menos 6 ratas para cada cepa y por cada tipo de tratamiento

## **5.7 Logística**

### 5.7.1 Recursos Humanos

#### **Investigadores expertos:**

D.C. Roberto Berra Romani

D.C. Alondra Albarado Ibáñez

#### **Alumno de MCMi:**

José Alonso Romero

### 5.7.2 Recursos Materiales

Se cuenta con los recursos materiales del Laboratorio de Fisiología Cardiovascular de la Facultad de Medicina y del Laboratorio de Fisiopatología Cardiovascular del Instituto de Fisiología ambos pertenecientes a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

### 5.7.3 Recursos Financieros

Se cuenta con los recursos financieros del Laboratorio de Fisiología Cardiovascular de la Facultad de Medicina de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).

### 5.8 Cronograma: Grafica de GANTT

Año	2017		2018				2019		
Actividades/ Mes	Ago Sep	Oct Nov Dic	Ene Feb Mar	Abr May Jun	Jul Ago Sep	Oct Nov Dic	Ene Feb Mar	Abr May Jun	Jul Ago
Revisión bibliográfica									
Elaboración de protocolo									
Ejecución experimental									
Análisis de datos									
Redacción de tesis									

## 5.9 Bioética

Todas las ratas que se emplearon para el desarrollo del presente estudio fueron proporcionadas por el Bioterio "Claude Bernard" de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. El manejo, mantenimiento y sacrificio de los animales se realizó en apego a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. El sacrificio de los animales fue realizado únicamente por personal de laboratorio que recibió la capacitación y la certificación necesaria para el uso y manejo del modelo murino por parte de los veterinarios del Bioterio Claude Bernard de nuestra Universidad. Los animales serán anestesiados con pentobarbital 0.7 mL por cada Kg de peso más heparina 0.2 mL/kg por cada Kg de peso (apartado 9.4.1.2 de la NOM-062-ZOO-1999)

El procedimiento experimental se llevará a cabo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, descrita bajo el Título 7 de la Ley General de Salud en Materia de Investigación." No existe otro procedimiento conocido para hacer ese protocolo sin la utilización de seres vivos. Las ratas estarán confinadas en el bioterio de la Facultad de Medicina, a cargo de su cuidado estará el MVZ Martín Páez Peláez, encargado del mantenimiento, manejo y desecho de los modelos animales de investigación con los que se trabaja en la Facultad de Medicina. Se colocarán en cajas adecuadas para su movilización y adoptamiento de postura según la especie, protegidos de amenazas externas y de escape de los especímenes, con ventilación adecuada, agua y alimento *ad libitum*, limpios y secos, en el bioterio sólo se manejan roedores como modelos de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999, 5.1.). Los cadáveres se concentrarán para su recolección en las instalaciones destinadas para tal efecto en la Facultad de Medicina, siguiendo las instrucciones de la NOM-087-ECOL-2002; 4.3.3., 6. Y 7.

## 5.10 Soluciones

### 5.10.1 Soluciones para dispersión

Solución Tyrode con la siguiente composición en mmol/mL: NaCl 118, KCl 5.4, MgCl $\cdot$ 7H $_2$ O 1.02, NaHCO $_3$  24, Na $_2$ HPO $_4$  $\cdot$ 2H $_2$ O 0.42, Dextrosa 12, Taurina 20, CaCl $_2$  1.8 y gaseada con carbógeno (95% de O $_2$  y 5% de CO $_2$ ).

Solución Tyrode Ca $^{+2}$  0: con la siguiente composición en mmol/mL: NaCl 118, KCl 5.4, MgCl $\cdot$ 7H $_2$ O 1.02, NaHCO $_3$  24, Na $_2$ HPO $_4$  $\cdot$ 2H $_2$ O 0.42, Dextrosa 12, Taurina 20 y gaseada con carbógeno (95% de O $_2$  y 5% de CO $_2$ ).

### 5.10. 2 Soluciones de mantenimiento

Solución Kraft-Brueh con la siguiente composición en mmol/mL: Taurina 20, Acido glutámico 80, Creatinina 0.5, Acido succínico 10, Dextrosa 10, KH $_2$ PO $_4$  10, MgSO $_4$  $\cdot$ H $_2$ O 5, KCl 40, HEPES 10, EGTA 0.2 y ajustado el pH con KOH.

Solución interna con la siguiente composición en mmol/mL: Ácido L-aspartico 80, KH $_2$ PO $_4$  10, MgSO 4,1, KCl 50, HEPES-K $^+$  5, ATP-Na 2,5, EGTA-K $^+$  10, GTP-Na 0,2 y ajustado a pH 7.2 con KOH.

### 5.10. 3 Soluciones de registro

Solución externa normal (SEN) con una solución externa normal con una composición (mmol): 136 NaCl, 4 KCl, 1 MgCl $_2$ , 1.8 CaCl $_2$ , 10 HEPES y 11 glucosa y ajustado a pH a 7.3 con NaOH.

Solución de Cloruro de Cobalto (CaCo) con una composición (mmol): 134 NaCl, 4 KCl, 1 MgCl $_2$ , 10 HEPES, 0.1 CaCl $_2$ , 0.5 CoCl $_2$ , 11 dextrosa y ajustado el pH a 7.3 con NaOH.

## Abreviaturas

<b>ADA</b>	Asociación Americana de Diabetes
<b>AV</b>	Aurículo-ventricular
<b>Hba1C</b>	Prueba de hemoglobina glucosilada
<b>Ca0</b>	Calcio cero
<b>DM</b>	Diabetes mellitus
<b>DM1</b>	Diabetes mellitus tipo 1
<b>DM2</b>	Diabetes mellitus tipo 2
<b>DRP</b>	Duración de la Repolarización
<b>ECG</b>	Electrocardiograma
<b>ECV</b>	Enfermedades cardiovasculares
<b>I<sub>k</sub></b>	Corriente de potasio
<b>I<sub>k1</sub></b>	Corriente de potasio 1
<b>I<sub>to</sub></b>	Corriente transitoria de salida
<b>K<sup>+</sup></b>	Ion potasio
<b>LZDF</b>	Lean Zucker Diabetic Fatty (rata Zucker delgada, control)
<b>OMS</b>	Organización de las Naciones Unidas
<b>OZDF</b>	Obese Zucker Diabetic Fatty (rata Zucker obesa, diabética)
<b>PA</b>	Potencial de Acción
<b>PM</b>	Potencial de membrana
<b>QRS</b>	Segmento QRS del electrocardiograma
<b>QT</b>	Intervalo QT
<b>QTc</b>	Intervalo QT corregido
<b>RR<sub>i</sub></b>	Intervalo RR
<b>RT</b>	Intervalo RT
<b>RTc</b>	Intervalo RT
<b>SD1</b>	Desviación estándar a corto plazo
<b>SD2</b>	Desviación estándar a largo plazo
<b>SD1/SD2</b>	Equilibrio simpato-vagal
<b>SQTL</b>	Síndrome de QT largo
<b>TdP</b>	Torside de Pointes
<b>ZDF</b>	Zucker Diabetic Fatty

## Índice de figuras

Figura 1. Anatomía cardiaca.....	17
Figura 2. Sistema de conducción cardiaco.....	20
Figura 3. Morfología del potencial de acción de una celula ventricular.....	22
Figura 4. Heterogeneidad en la morfología de los potenciales de acción en el tejido cardiaco.....	23
Figura 5. Electrocardiograma.....	24
Figura 6. Comparación de la morfología de un electrocardiograma obtenido en humano y en rata.....	26
Figura 7. Descripción del diagrama de Poincaré.....	28
Figura 8. Síndrome de QT largo y Torsade de pointes.....	30
Figura 9. Intervalo RT.....	39
Figura 10. Parámetros medidos del potencial de acción.....	42
Figura 11. Protocolo de corriente Ito .....	43
Figura 12. Protocolo de corriente I <sub>k</sub> .....	43
Figura 13. Protocolo de corriente I <sub>k1</sub> .....	44
Figura 14. Curva de tolerancia a la glucosa.....	46
Figura 15. Intervalos RR y RT.....	47
Figura 16. Variabilidad de la frecuencia cardiaca.....	49
Figura 17. Potencial de acción de epicardio y parámetros analizados.....	52
Figura 18. Curvas corriente-voltaje de epicardio.....	52
Figura 19. Potencial de acción de pared libre de ventrículo izquierdo.....	54
Figura 20. Curvas de corriente voltaje de pared libre de ventricular.....	55
Figura 21. Potencial de acción de pared libre de ventrículo derecho.....	56
Figura 22. Curvas de corriente voltaje de pared libre de ventrículo derecho.....	57
Figura 23. Potencial de acción de septum.....	58
Figura 24. Curvas de corriente voltaje de septum.....	59
Figura 25. Potencial de acción de papilar izquierdo.....	60
Figura 26. Curvas de corriente voltaje de papilar izquierdo.....	61

Figura 27. Potencial de acción de papilar derecho.....	62
Figura 28. Curva de corriente voltaje de papilar derecho.....	63

Índice de cuadros.

Cuadro 1. Parámetros morfométricos y metabólicos de ratas LE, LZDF y OZDF.....45

Cuadro 2. Intervalo RR y frecuencia cardíaca.....47

Cuadro 3. Intervalo RT y RTc.....48

Cuadro 4. Efecto de la diabetes mellitus tipo 2 sobre la variabilidad de la frecuencia cardíaca (intervalo RR).....50

Cuadro 5. Efecto de la diabetes mellitus tipo 2 sobre la variabilidad de la frecuencia cardíaca (intervalo RT).....50